

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ОБЛАП РУСЛАН ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 613.2/.3-027.45:577.2(043)

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕТОДОЛОГІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО
ОЦІНЮВАННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПРОДУКЦІЇ**

03.00.15 – генетика

(сільськогосподарські науки)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Р.В. Облап

Науковий консультант: **Димань Тетяна Миколаївна**, доктор сільськогосподарських наук, професор

Біла Церква – 2021

АНОТАЦІЯ

Облап Р.В. Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – Генетика. – Білоцерківський національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України. – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця Національної академії аграрних наук України, 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.

Ґрунтуючись на отриманих результатах було розроблено, впроваджено та запропоновано до використання серію молекулярно-генетичних діагностичних систем на основі різновидів методу полімеразної ланцюгової реакції.

Для розроблення і валідації методології ідентифікації генотипів тварин, асоційованих з поліпшеними характеристиками якості продукції, було досліджено генетичну структуру двох популяцій української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби ($n=451$) за потенційними генами-маркерами молочної продуктивності – κ -казеїном (*CSNK*), β -лактоглобуліном (*BLG*) і пролактином (*PRL*).

Дослідження взаємозв'язків між виявленими генотипами та основними параметрами молочної продуктивності (загальний надій, вміст % жиру та білка) показало що найвищою молочною продуктивністю характеризувалися тварини з генотипами BLG AA та PRL AG, найвищий % жиру в молоці мали корови з генотипом BLG AA, найвищий % білка у молоці мали тварини з генотипами BLG BB та PRL AG. Оцінювання генетичної структури двох популяцій BPX за трьома локусами одночасно дало змогу встановити асоціацію комплексних генотипів CSNK AA / BLG AA / PRL AG, CSNK AA / BLG AA / PRL GG та CSNK AB / BLG AA / PRL AG 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. За результатами досліджень впливу комбінацій генетичних варіантів CSNK, BLG та PRL на сиропридатність молока найкращі показники тривалості сичужного зсідання молока було встановлено для тварин з комплексними генотипами CSNK AB / BLG BB / PRL GG та CSNK AB / BLG AB / PRL GG.

Для удосконалення методології ідентифікації небезпечних чинників у харчовій продукції тваринного походження було проведено порівняльну діагностику поголів'я BPX на присутність провірусної ДНК вірусу ВЛ BPX (BLV) за допомогою технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі. Як молекулярно-генетичний маркер було використано консервативну ділянку гена *Env*, який кодує поверхневий вірусний глікопротеїд gp51. Отримані результати продемонстрували значно більшу чутливість та специфічність ПЛР-РЧ порівняно з методом РІД-аналізу, при цьому рівень інфікованості дослідженого поголів'я за двома методами становив відповідно 6,8 та 2,4 %. За результатами оцінювання ефективності використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу для ідентифікації збудника лейкозу було запропоновано застосування тест-системи як додаткового інструменту під час проведення протилейкозних заходів у господарствах та

під час перевірки молока на молокопереробних підприємствах країни.

За використання як молекулярно-генетичних маркерів ділянок генів *16S rPHK* та фактору елонгації *Tu* для 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.

Послідовності ДНК, локалізовані в межах мітохондріальних генів цитохрому *b* (*cytb*) курки і свині та сателітної IV ДНК ВРХ (1.709 satellite IV DNA family), було використано як маркерні для видової ідентифікації тваринної ДНК, на основі чого розроблено метод визначення фальсифікації видової належності м'яса курятини, свинини та яловичини у харчовій продукції та кормах для тварин. До визначених послідовностей підібрано праймери з зондами для розроблення мультиплексної тест-системи на основі технології *TaqMan®* методу ПЛР у реальному часі. Розроблена діагностична тест-система «М'ясо-тест» уможливорює ідентифікацію ДНК птиці, свині та ВРХ з межею виявлення не менш ніж 1×10^{-6} нг (1фг). Специфічність тест-системи становить 100%, аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг (0,1нг/мл). Діагностикум характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу. Розроблена тест-система може бути рекомендована випробувальним лабораторіям для здійснення контролю фальсифікації видової належності м'яса у складі м'ясних продуктів.

Розроблено підходи до 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 прайсерів і зондів слугували як регуляторні елементи (Р-35S, T-nos) генно-інженерних конструктів, так і гени «нової ознаки» – 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 послідовності ДНК вбудованої генно-інженерної конструкції, так і в ДНК самої рослини. Кожну розроблену тест-систему було виконано в форматі мультиплексу, що уможлиблює одночасне проведення двох, трьох або навіть чотирьох незалежних реакцій. Одна реакція направлена на виявлення внутрішнього ендогенного контролю перебігу ПЛР (ген рослини), інші – відповідного елемента генно-інженерного конструкту. Загальна кількість розроблених діагностикумів – 51 найменування, включаючи тест-системи серії «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація». Якість розроблених тест-систем підтверджено під час вітчизняних та міжнародних раундів порівнювальних випробувань. 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 України на корисну модель № 72083.

Вивчено питання присутності у харчовій продукції та продовольчій сировині злакових культур глютену, який пов'язаний з виникненням захворювання на целиакію у людей. Визначено молекулярно-генетичні маркери (ω -gliadin пшениці, ω -secalin жита, B1 hordein ячменю, avenin вівсу)

зернових культур та розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему, яка уможлиблює ідентифікацію навіть слідових кількостей пшениці, жита, вівса і ячменю у харчових продуктах. Валідаційні характеристики тест-системи перевірено шляхом порівняльних випробувань з комерційними ІФА- та ПЛР-діагностикумами. За отриманими результатами затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою ПЛР-РЧ тест-системи «Глютен-скринінг».

На основі аналізу літературних джерел і вивчення поліморфізму окремих генів було визначено молекулярно-генетичні маркери (гени *hly*, *invA*, *ipaH*) для ідентифікації збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу за допомогою технології *TaqMan*[®] ПЛР-РЧ. Проведені дослідження дали змогу розробити три діагностичні мультиплексні ПЛР-РЧ тест-системи для ідентифікації *L. Monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині тваринного та рослинного походження. Специфічність розроблених тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація», «*Shigella spp.*- ідентифікація» становить 100%, аналітична чутливість знаходиться у межах $n \times 10^3$ ГЕ/мл. Визначення аналітичної чутливості проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК відповідних патогенів. Тест-системи характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, що є підставою рекомендувати їх для здійснення контролю продовольчої сировини та харчових продуктів на вміст патогенів.

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

ABSTRACT

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

Thesis for the Doctor's degree of Agricultural Sciences, specialty 03.00.15 – Genetics. – Bila Tserkva National Agrarian University of the Ministry of Education

and Science of Ukraine. – 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 (QTLs) was performed. DNA sequences of animal, plant and microorganisms` genome regions were analyzed. Molecular genetic markers for evaluation of safety and quality of foodstuff of animal and vegetable origin were determined. Molecular genetic analyzes-based methodology of evaluation of agricultural products was developed. PCR-based diagnostic kits were developed, implemented and offered for use.

Genetic structure of two Black-and White Ukrainian Dairy cattle populations was investigated for development of the methodology of identification of genotypes associated with improved production quality indexes. Polymorphism of genes κ -casein (*CSNK*), β -lactoglobuline (*BLG*) and prolactin (*PRL*) associated with high productive traits were studied in these two populations (n=451).

Investigation of associations between detected genotypes and main milk production parameters (milk yield, fat and protein content) indicated that the highest milk yield had-animals with genotypes BLG AA and PRL AG, the highest fat content in milk had cows with genotypes BLG AA, the highest protein content had cows with genotypes BLG BB and PRL AG. Evaluation of genetic structure of two cattle populations on three loci simultaneously (genotype complexes) enabled to make some important associations as well. Particularly the highest milk yield was observed in cows with complex genotypes CSNK AA / BLG AA / PRL AG, CSNK AA / BLG AA / PRL GG and CSNK AB / BLG AA / PRL AG, the highest fat content in milk – in animals with genotypes CSNK AA / BLG AA / PRL AG, CSNK AA / BLG AA / PRL GG and CSNK AA / BLG AB / PRL GG genotypes, the highest protein content in milk – in cows with genotypes CSNK AB / BLG AA / PRL AG, CSNK AB / BLG BB / PRL AG. The effect of different genetic variants of CSNK, BLG and PRL combination on cheesemaking properties of milk was

studied as well. The best indexes of rennet milk coagulation were detected for animals with CSNK AB / BLG BB / PRL GG та CSNK AB / BLG AB / PRL GG complex genotypes.

For the improvement of identification of dangerous infection agents in food of animal origin the comparative diagnostic on BLV was done in cattle with Real-Time PCR and RID methods. Conservative region of *Env gene* which encodes viral glycoprotein gp51 was used as molecular genetic marker. Better sensitivity and specificity was observed with Real-Time PCR method with RID method. The cattle infection rate by two methods was 6,8 and 2,4 % respectively. The efficiency of using milk as alternative bio-material for BLV diagnostics was evaluated. The new diagnostic kit was proposed as an additive tool for antileukemic measures in farms and 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 the beneficial microflora in dairy products. The 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 satellite IV cattle DNA (1.709 satellite IV DNA family) were used as molecular genetic markers for the 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. Primers and probes were designed also for multiplex Real-Time PCR *TaqMan*-technology kit. Developed diagnostic kit «Meat-test» enables poultry, pork and cattle DNA identification with limit of detection at least 1×10^{-6} ng (1fg). Diagnostic kit's specificity is 100 %, analytical sensitivity is 1×10^{-5} ng (0,1ng/ml). Diagnostic kit has high level of repeatability and reproducibility of analysis results. Designed kit may be recommended for species-specific meat falsification control.

Real-Time PCR GMO detection methodology has been developed. This 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 (for used genetic constructs` elements) has been developed for appropriate kits panel development. Regulator elements (P-35S, T-nos) and «new trait» genes – EPSPS from *Agrobacterium tumefaciens* (CP4), phosphinothricin N-acetyltransferase from *Streptomyces viridochromogenes* (pat), phosphinothricin N-acetyltransferase from *Streptomyces hygroscopicus* (bar) were used as DNA targets for oligonucleotide primers and probes design. Genes of soya lectin (*lec*), maize alcohol dehydrogenase (*adh1*), rapeseed cruciferin (*cru*), sugar beet glutamine synthase (*gs*) and rice phospholipase D (*pld*) 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. General number of designed kits is 51 with kits of «GMO screening», «GMO quantity» and «GMO identification» series. Quality of designed kits was tested and confirmed by Ukrainian and international comparative testing rounds. Technical requirements TY Y 24.6-02568182-001:2011 and utility model patent was given.

The problem of cereal gluten presence in foodstuff associated with morbidity on human celiac disease was studied. Molecular genetic markers (*ω-gliadins* of wheat and rye, *B1 hordein* of barley, *avenin* of oat) were determined and multiplex Real-Time PCR kit «Gluten-screening» was designed. This kit enables the identification of even trace amounts of wheat, rye, oat and barley. Validation characteristics of kit were evaluated by comparative testing with ELISA and PCR kits. Method of performing measurements (МБІ 17/59-12) – gluten-cereal detection with Real-Time PCR kit «Gluten-screening» has been approved.

Molecular genetic markers (*hly*, *invA*, *ipaH* genes) for listeriosis,

salmonellosis and shigellosis pathogens identification by Real-Time PCR *TaqMan*-technology were selected. Three multiplex Real-Time PCR kits for *L. Monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* identification in food and agricultural raw material were developed. Specificity of «*L. Monocytogenes*-identification », «*Salmonella spp*-identification», «*Shigella spp.*- identification» kits is 100 %, analytical sensitivity is $n \times 10^3$ GE/ml. Detection of analytical sensitivity was performed by using quantitative-known DNA of appropriate pathogens. Kits have high repeatability and reproducibility rate what allows to recommend foregoing kits for foodstuff control on pathogen presence.

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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 симпозіумів, 8 – додатково відображають наукові результати дисертації, 1 – патент України на корисну модель.

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: Імплементація 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
(сільськогосподарські науки)**

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

12. 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).*

13. 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).*

14. 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).

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

16. Плівачук О.П., Димань Т.М., **Облап Р.В.** Сиропридатність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капаказеїну, 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).*

17. **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).*

18. **Облап Р.,** Новак Н., Димань Т. Дослідження меду на вміст пилку з генетично модифікованих рослин методом ПЛР у реальному часі інгредієнтів. *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).*

19. **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).*

20. **Облап Р. В.** Внутрішньолабораторна валідація методу визначення видової приналежності м'яса за використання ПЛР-РЧ тест-системи «М'ясо-тест». *Наукові горизонти*. 2018. № 9-10. С. 96–103.

**Публікації у наукових фахових виданнях України
(біологічні науки)**

21. 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).

22. 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)

**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 дослідження, 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 міжлабораторних 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).*

Додатково відображають наукові результати дисертації

31. 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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

32. 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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

33. Мельничук М.Д., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції в тваринництві. Методичний посібник. К.: НУБІПУ, 2009. 127 с. *(Здобувачем викладено частину основного змісту).*

34. **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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

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

36. 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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

37. 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. *(Здобувачем викладено частину основного змісту).*

38. **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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

Наукові праці апробаційного характеру

39. 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. *(Здобувачем викладено частину основного змісту).*

40. **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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

41. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

42. **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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

43. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

44. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

45. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Т.Н.Дымань, 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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

46. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

47. Малиєнко 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).

48. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

49. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

50. **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'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (ТМУ). Ялта, Україна, 2013. С. 403. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

51. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

52. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

53. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Малієнко 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

54. **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 сільськогосподарській сировині рослинного походження. *Якість і безпека харчових продуктів: міжнародна науково-технічна конференція*. Київ, Україна, 2013. С. 75–76. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

55. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Застосування методу ПЛР у реальному часі в діагностиці *Listeria monocytogenes*. *Проблеми ветеринарної паразитології та якість і безпека продуктів тваринництва: всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція*. Полтава, Україна, 2014. С. 154–157. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

56. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

57. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

58. **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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

59. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

60. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

61. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

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

63. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

64. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

65. **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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

66. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

67. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

68. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

69. **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 науково-практична конференція. Київ, Україна, 2017. С. 117–118. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

70. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

71. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

72. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

Патенти на корисну модель, які безпосередньо стосуються наукових результатів дисертації

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 (ПІР-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.

ЗМІСТ

	Стр.
АНОТАЦІЯ.....	2
ABSTRACT.....	6
ЗМІСТ.....	25
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	30
ВСТУП.....	31
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	42
1.1 Безпечність та якість сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження і методи її оцінювання.....	42
1.2 Молекулярно-генетичні методи оцінювання безпечності та якості продукції тваринного походження.....	50
1.2.1 Ідентифікація QTL-генів у тваринництві.....	55
1.2.2 Молекулярно-генетична діагностика інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин.....	60
1.2.3 Виявлення фальсифікації м'ясної продукції і методи визначення видової належності тканин.....	67
1.3 Молекулярно-генетичні методи оцінювання безпечності та якості продукції рослинного походження.....	72
1.3.1 Біотехнологічні сільськогосподарські культури, методи і підходи щодо діагностики ГМО (ГМР).....	73
1.3.2 Проблема харчових алергенів та методи ідентифікації глютену.....	86
1.4 Методи молекулярно-генетичної ідентифікації мікроорганізмів у харчовій продукції.....	95
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	104
2.1. Місце проведення досліджень, дослідний матеріал та загальна схема досліджень.....	104
2.2. Відбір, маркування та зберігання зразків.....	107
2.3. Методи і підходи щодо виділення ДНК.....	108
2.3.1. Метод фенольно-хлороформної екстракції ДНК.....	108
2.3.2. Метод Кавасакі.....	110
2.3.3. Метод температурного лізису.....	111
2.3.4. Метод виділення ДНК на силікагелі.....	112
2.3.5. Метод виділення ДНК на основі ЦТАБ.....	113
2.3.6. Метод виділення ДНК на Silica Spin колонках.....	115
2.4. Спектрофотометричний аналіз виділеної ДНК.....	117
2.5. Підбір праймерів і зондів та проведення ПЛР.....	118
2.5.1. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей.....	118
2.5.2. Конструювання специфічних олігонуклеотидних праймерів.....	118
2.5.3. Визначення концентрації праймерів та зондів.....	119
2.5.4. Проведення різновидів полімеразної ланцюгової реакції.....	120
2.6. Визначення масової частки жиру та білку у молоці.....	121

2.7. Отримання генно-інженерних позитивних контрольних зразків у вигляді плазмідної ДНК.....	122
2.7.1. Напрацювання фрагментів ДНК.....	122
2.7.2. Молекулярне клонування.....	123
2.7.3. Отримання компетентних клітин.....	124
2.7.4. Проведення процедури трансформації.....	125
2.7.5. Відбір та аналіз клонів-трансформантів.....	125
2.8. Статистична обробка результатів досліджень.....	126
2.9. Засоби вимірювальної техніки та устаткування.....	127
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	129
3.1. Оцінювання показників безпечності та якості продукції тваринництва за використання молекулярно-генетичних методів.....	130
3.1.1. Визначення потенціалу молочної продуктивності великої рогатої худоби за аналізом поліморфізму QTL-генів.....	131
3.1.1.1. Визначення генотипів <i>CSNK</i> , <i>BLG</i> та <i>PRL</i> , асоційованих з молочною продуктивністю ВРХ.....	133
3.1.1.2. Якісний склад молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами генів <i>CSNK</i> , <i>BLG</i> та <i>PRL</i> ...	139
3.1.2. Вплив комбінацій генетичних варіантів <i>CSNK</i> , <i>BLG</i> та <i>PRL</i> на сиропридатність молока.....	145
3.1.3. Діагностика поголів'я ВРХ на присутність вірусу лейкозу ВРХ	147
3.1.3.1. Оцінка інформативності молекулярно - генетичних маркерів для ідентифікації ВЛ ВРХ.....	149
3.1.3.2. Визначення ВЛ ВРХ у коров'ячому молоці методом ПЛР-РЧ.....	153
3.1.4. Якісна та кількісна оцінка вмісту молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів у молочних продуктах.....	157
3.1.4.1. Визначення бактеріальної ДНК за використання технології SYBR®Green методу ПЛР у реальному часі.....	160
3.1.4.2. Кількісна оцінка вмісту молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів у молочній продукції.....	168
3.2. Визначення видової належності м'яса домашніх тварин і птиці у складі сільськогосподарської сировини і харчової продукції методом ПЛР у режимі реального часу.....	175
3.2.1. Визначення молекулярних-генетичних маркерів та вибір праймерів з зондами для проведення ПЛР у реальному часі.....	177
3.2.2. Проведення ПЛР-РЧ та оцінювання продуктивності обраних праймерів та зондів.....	179
3.2.3. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу.....	183
3.2.4. Дослідження специфічності та ефективності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу.....	191
3.2.5. Визначення аналітичної чутливості мультиплексу.....	195
3.2.6. Комплектація тест-системи «М'ясо-тест».....	199

3.2.7. Порівняльні випробування розробленої тест-системи.....	200
3.3. Розроблення методології та підбір молекулярно-генетичних маркерів для визначення ГМР у сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції методом ПЛР-РЧ.....	206
3.3.1. Методологія визначення ГМО з застосуванням молекулярно-генетичних методів дослідження.....	207
3.3.2. Аналіз зареєстрованих та дозволених до використання ліній біотехнологічних сільськогосподарських культур.....	210
3.3.3. Розроблення та виробництво тест-систем серії «ГМО скринінг».....	211
3.3.3.1. Визначення молекулярно-генетичних маркерів для проведення скринінгового аналізу на вміст ГМО за регуляторними та кодуєчими елементами генно-інженерних конструктів.....	213
3.3.3.2. Підбір праймерів з зондами до послідовності промотору 35S з вірусу CaMV.....	215
3.3.3.3. Підбір праймерів з зондами до термінатора T-nos з <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	221
3.3.3.4. Підбір праймерів з зондами до послідовностей генів «нової ознаки» – <i>CP4-epsps</i> , <i>pat</i> , <i>bar</i>	224
3.3.3.5. Підбір праймерів з зондами до генів видової ознаки деяких біотехнологічних культур.....	230
3.3.3.6. Оптимізація умов проведення ПЛР у реальному часі з обраними праймерами і зондами.....	235
3.3.3.7. Дослідження специфічності та ефективності роботи праймерів і зондів.....	240
3.3.3.8. Оптимізація умов ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу та комплектація тест-систем серії «ГМО скринінг».....	246
3.3.3.9. Дослідження специфічності та ефективності роботи тест-систем.....	259
3.3.3.10. Конструювання генно-інженерних позитивних контролів та визначення аналітичної чутливості розроблених тест-систем.....	264
3.3.3.11. Комплектація тест-систем серії «ГМО скринінг».....	268
3.3.4. Розроблення та виробництво тест-систем серії «ГМО ідентифікація».....	270
3.3.4.1. Визначення ДНК-маркерів для проведення аналізу з ідентифікації біотехнологічних сільськогосподарських культур за трансформаційними подіями.....	271
3.3.4.2. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації ліній ГМ сої.....	273
3.3.4.3. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації ліній ГМ кукурудзи.....	275
3.3.4.4. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації ліній ГМ ріпаку.....	282

3.3.4.5. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації інших ГМ-ліній, традиційних культур, а також вірусу CaMV і бактерії <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	285
3.3.4.6. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ з обраними праймерами і зондами та комплектація тест-систем серії «ГМО ідентифікація».....	287
3.3.5. Розроблення та виробництво тест-систем серії «ГМО кількість».....	292
3.3.5.1. Підготовка референтних стандартних зразків для проведення кількісного аналізу з визначення ГМО.....	293
3.3.5.2. Валідація та комплектація тест-систем для проведення кількісного аналізу вмісту ГМО за регуляторними елементами та трансформаційними подіями.....	295
3.3.6. Проведення комісійних випробувань та апробація розроблених тест-систем шляхом участі у міжнародних раундах порівняльних випробувань.....	299
3.3.7. Економічна ефективність виробництва тест-систем.....	301
3.3.8. Моніторинг сільськогосподарської сировини, кормів для тварин та харчової продукції в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів.....	303
3.4. Визначення присутності глютену злакових культур у харчовій продукції.....	312
3.4.1. Розроблення методології визначення глютенів пшениці, жита, ячміню та вівса на основі технології <i>TaqMan</i> [®] ПЛР-РЧ.....	314
3.4.1.1. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до пшениці (<i>Triticum aestivum</i>).....	315
3.4.1.2. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до жита (<i>Secale cereale</i>).....	318
3.4.1.3. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до ячменю (<i>Hordeum vulgare</i>).....	320
3.4.1.4. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до вівса (<i>Avena sativa</i>).....	321
3.4.2. Проведення ПЛР-РЧ та оцінювання продуктивності обраних праймерів та зондів.....	324
3.4.3. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу.....	328
3.4.3.1. Дослідження специфічності та ефективності роботи тест-системи у форматі мультиплексів.....	336
3.4.3.2. Визначення аналітичної чутливості тест-систем.....	341
3.4.4. Комплектація тест-системи «Глютен-скринінг».....	345
3.4.5. Порівняльні випробування тест-системи «Глютен-скринінг».....	347
3.5. Діагностика бактеріальних патогенів з аліментарним шляхом передачі за використання молекулярно-генетичних маркерів.....	351
3.5.1. Застосування <i>TaqMan</i> -технології методу ПЛР у реальному часі для ідентифікації харчових патогенів.....	351

3.5.1.1. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для <i>Listeria monocytogenes</i>	353
3.5.1.2. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для <i>Salmonella spp.</i>	356
3.5.1.3. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для <i>Shigella spp.</i>	360
3.5.1.4. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для створення внутрішнього ендогенного контролю перебігу ПЛР-РЧ.....	362
3.5.2. Проведення ПЛР-РЧ та оцінка продуктивності обраних праймерів та зондів.....	365
3.5.3. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу.....	369
3.5.4. Дослідження специфічності та ефективності роботи тест-систем у форматі мультиплексу.....	375
3.5.5. Визначення аналітичної чутливості тест-систем.....	385
3.5.6. Комплектація тест-систем.....	389
3.5.7. Апробація роботи розроблених тест-систем.....	390
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	397
ВИСНОВКИ.....	406
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....	410
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	411
ДОДАТКИ.....	486

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЛ ВРХ, BLV	вірус лейкозу великої рогатої худоби – bovine leukemia virus
ГЕ	геном еквівалент
ГМО	гентишно модифіковані організми
ГМР	генетично модифіковані рослини
ПДРФ, RFLP	поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів - restriction fragment length polymorphism
п.н., б.р.	пар нуклеотидів – base pairs
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПЛР-РЧ	полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі
РІД	реакція імунодифузії
ІФА, ELISA	імуноферментний аналіз – enzyme-linked immunosorbent assay
АОС	american oil chemists` society - американське товариство хіміків нафти
BLAST	basic local alignment search tool – засіб пошуку основного локального вирівнювання
CaMV	cauliflower mosaic virus – вірус мозаїки цвітної капусти
Ct	threshold cycle – пороговий цикл
НАССР	hazard analysis and critical control points – система аналізу небезпечних факторів та контролю у критичних точках
NCBI	national center for biotechnology information-національний центр з біотехнологічної інформації
ІНСП	institute of health and consumer protection – інститут захисту здоров'я та споживачів
IRMM	institute for reference materials and measurements – інститут референсних матеріалів та методів
ISAAA	international service for the acquisition of agri-biotech applications – міжнародна служба з прийняття агробіотехнологічних застосувань
JRC	joint research centre – центр об'єднаних досліджень
LOD	limit of detection – межа визначення
MAS-selection	marker-assisted selection- селекція за допомогою маркерів
qPCR	quantitative PCR – кількісна ПЛР
QTL	quantitative trait loci – локуси кількісних ознак
Rn	репортерна флюоресценція
Ta	temperature annealing – температура відпалу
Tm	temperature melting – температура плавлення

ВСТУП

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 на загальновизнаних засадах. 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 неможливий без наявності відповідних аналітичних методів аналізу та діагностичних тест-систем. Тому сьогодні розробленню сучасних високоефективних підходів та методів детектування показників безпечності та якості приділяють велику увагу [1,2].

Проблеми безпечності харчової продукції носять комплексний характер, а її вирішення потребує численних зусиль як з боку вчених, виробників, санітарно-епідеміологічних служб, державних органів, так і споживачів. Актуальність даної проблеми зростає з кожним роком, оскільки безпека харчової продукції безпосередньо впливає не тільки на здоров'я людей, але і на збереження генофонду людства в цілому.

Генетика, молекулярна біологія, молекулярна генетика використовують низку спільних методів і підходів, які в сукупності становлять методологію – певний спосіб вивчення спадкового матеріалу (ДНК). Важливе прикладне значення методів, якими оперують зазначені предметні галузі – застосування для оцінювання небезпечних чинників для життя і здоров'я людини. З огляду на це, розроблення методології оцінювання безпечності і якості сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження, а також готової до споживання харчової продукції на основі молекулярно-генетичних підходів становить науковий інтерес і має практичне значення.

Останні десятиріччя ознаменувалися значним прогресом у розробленні та застосуванні підходів щодо визначення поліморфізму ДНК і підборі

відповідних систем молекулярно-генетичних маркерів, які б сприяли ширшому впровадженню сучасних молекулярно-генетичних методів та технологій оцінювання для поліпшення безпечності та якості продукції у аграрному секторі. Сьогодні виділяють такі основні напрями розвитку ДНК-технологій для потреб агропродовольчої сфери: розроблення молекулярних методів діагностики та контролю безпечності і якості сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження; діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських видів тварин та фітосанітарний карантинний контроль; виявлення генетичних захворювань тварин на ранніх стадіях розвитку; генотипування організмів для створення генетичних паспортів порід, видів, таксономічних груп; маркер-асоційована селекція (MAS) [3].

В Україні впродовж останніх двадцяти років проводилися численні дослідження з застосування сучасних досягнень молекулярної генетики та різновидів молекулярно-генетичних маркерів у найрізноманітніших галузях вітчизняного тваринництва, рослинництва та харчової мікробіології [4-6]. Незважаючи на це, спостерігається значний дефіцит робіт з практичного застосування сучасних досягнень генетики та напрацювань під час селекції високопродуктивних порід тварин, отримання сортів рослин з покращеними властивостями, розроблення систем моніторингу показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини та харчової продукції на всіх етапах її виробництва.

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), дані методи успішно застосовуються у провідних санітарно-епідемічних, діагностичних і науково-дослідних центрах розвинених країн світу, витісняючи «класичний» формат ПЛР [7].

Виходячи із зазначеного, теоретичне обґрунтування та практична

реалізація заходів із розроблення методології молекулярно-генетичного оцінювання низки показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції, а також впровадження та застосування вітчизняних діагностиків для їх оцінки, відносяться до найактуальніших завдань держави та мають суттєве теоретичне та практичне значення, 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 ектофології 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 «Укрметртестстандарт» 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 уможлиблювала 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 целиакію 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 тридцятьох 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.

.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Безпечність та якість сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження і методи її оцінювання

Безпечність та якість харчування є одними з найважливіших чинників, які визначають здоров'я націй [8,9]. Останні десятиліття характеризуються стійким погіршенням показників здоров'я населення нашої країни. Безумовно, це пов'язано передусім зі зниженням якості життя, низьким рівнем соціального захисту та недолугою системою охорони здоров'я. Як наслідок, тривалість життя в Україні є однією з найнижчих у Європі та становить у середньому 76,0 років для жінок, 66,2 років для чоловіків [10]. За даними ВООЗ та Державної служби статистики України смертність на 1000 чоловік збільшилася з 12,10 в 1990 році до 15,72 в 2014 році. Серед причин високої захворюваності та смертності провідне місце посідають серцево-судинні та онкологічні захворювання, розвиток яких пов'язаний серед інших причин і з харчуванням [11–16].

Кожна людина має невід'ємне природне право на безпеку свого життя. Одним з важливих елементів безпеки життя є безпека харчових продуктів. Адже добре відомо, що наслідками вживання неякісних те небезпечних харчових продуктів можуть бути небезпека для здоров'я людини різного ступеня аж до летальних випадків. Харчові отруєння, крім шкоди для здоров'я конкретного споживача, завдають значних втрат для економіки та іміджу держави, виробничих підприємств, торгівлі, туризму тощо. Для запобігання цим несприятливим наслідкам у кожній державі здійснюються певні засади державної політики щодо забезпечення безпеки та якості харчових продуктів і продовольчої сировини. В нашій державі вони визначаються Законом України «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини», прийнятим Верховною Радою України за №771/97

– ВР від 23 грудня 1997 р. із змінами та доповненнями від 13.09.2001 р. та 24.10.2002 р. [17,18].

Тенденції світової економічної політики поставили Україну перед необхідністю приймати кардинальні рішення стосовно гармонізації законодавства у сфері виробництва харчових продуктів із міжнародним стандартом, та адаптації національних стандартів безпеки харчової продукції до світових вимог. У сучасних умовах успішний процес інтеграції України у світове економічне співробітництво неможливий без координації зусиль із забезпечення випуску безпечної та якісної харчової продукції. З цією метою на підприємствах харчової промисловості розробляють і запроваджують системи управління безпекою і якістю, для успішного використання яких необхідно дотримуватися загальних принципів гігієни харчових продуктів [19,20].

Сучасне ставлення до безпеки харчової продукції сформувалось відносно недавно. Ріст рівня забруднення навколишнього середовища, запровадження нових технологій виготовлення харчової продукції, застосування генної інженерії та біотехнології, глобалізація сучасного виробництва харчової продукції та посилення міжнародних торгових відносин між країнами спонукало до запровадження нового міжнародного харчового законодавства з метою запровадження більш жорстких вимог до безпеки та якості харчових продуктів [21]. З огляду на це у 1963 р. продовольчою та сільськогосподарською організацією ООН (Food and Agriculture Organization, FAO) та Всесвітньою організацією охорони здоров'я (World Health Organization, WHO) було створено комісію з Кодексу Аліментаріусу (*Codex Alimentarius*). Основною метою діяльності комісії було створення сукупності визнаних міжнародною спільнотою стандартів на харчові продукти. Це стало відправною точкою для розробки вимог з забезпечення безпеки і якості харчової продукції на національних рівнях [22].

Криза у харчовій промисловості, пов'язана із спалахами інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин (ящур, трансмісивна губкоподібна

енцефалопатія ВРХ, пташина чума), виявленням гормонів у свинині, антибіотиків в медові, діоксинів у птиці тощо, призвело до розроблення й обґрунтування нових підходів стосовно управління ризиками у сфері безпеки харчової продукції. Ці підходи увійшли до «Зеленої книги» (1997 р.) та «Білої книги» (2000 р.) про безпеку харчових продуктів, а пізніші трансформувалися у низку нормативних документів основного законодавства ЄС [23-26]. На сьогодні глобальний та інтегрований підхід до системи безпеки харчової продукції включає цілу низку основоположних моментів, між іншим, таких як визнання тварин істотами, що мають відчуття; обов'язковий державний контроль за всіма ланками ланцюжка з виробництва та споживання харчових продуктів; диференціація відповідальності за дотримання принципів безпечності; права на об'єктивну та своєчасну інформацію; підвищення довіри населення до продуцентів продовольчих ресурсів; запровадження ефективних систем контролю та оцінювання результативності роботи національних органів влади [27].

У 2002 р. в Німеччині було запроваджено міжнародний стандарт на харчові продукти (International Food Standard, IFS) який дозволив створити єдину систему оцінювання постачальників продукції. Пізніше почали розроблятися інші стандарти, зокрема BRC Food, BRC IoP, Dutch HACCP, GlobalGAP, ISO 9001, ISO 14001, ISO 22000, FSSC, які фактично стали інструментом конкуренції серед постачальників торгівельних мереж, оскільки кожний із них позиціонував вищий від попереднього рівень гарантій якості та безпечності продукції [22]. У нормативних актах Регламентів (ЄС) № 172/2002 та № 178/2002 Європейського парламенту і Ради (від 28.01.2002 р.). розкрито та надано такі поняття як ризик, простежуваність, запобігання, прозорість, міжнародні стандарти. Найбільш прийнятними у цьому відношенні є систематизовані в Постанові (ЄС) № 852/2004 Європейського Парламенту та Ради щодо гігієни харчової продукції (від 29.04.2004 р.) базові принципи безпечності агрохарчової продукції у продовольчому ланцюгу, а саме: безпосередня відповідальність підприємств за безпеку харчової

продукції; забезпечення безпеки харчової продукції на всіх етапах харчового ланцюга; зберігання харчової продукції за належної температури на всіх етапах харчового ланцюга; належне застосування на підприємствах відповідних санітарно-гігієнічних процедур та процедур, які ґрунтуються на принципах аналізу небезпек та критичних контрольних точок (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP); необхідність визначення мікробіологічних критеріїв; оцінка відповідності імпортованої продукції вимогам ЄС щодо безпечності харчових продуктів [28,29].

В Україні до основних правових аспектів забезпечення безпеки та якості харчової продукції належать передусім Конституція України, Господарський кодекс України, Кодекс України про адміністративні правопорушення та низка Законів України: «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів»; «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин»; «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення»; «Про захист прав споживачів»; «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів»; тощо [21,30].

У сукупності ці документи містять норми, спрямовані на забезпечення прав споживачів, у тому числі на придбання гарантовано безпечних та якісних товарів. Важливе значення в період реформування державної політики в сфері забезпечення безпеки та якості харчової продукції має Закон України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів» як базовий національний законодавчий акт, який регулює відносини між органами виконавчої влади, операторами ринку харчових продуктів та споживачами харчових продуктів. Закон має на меті гармонізацію законодавства України із законодавством ЄС у сфері безпеки та якості харчової продукції, забезпечення високого рівня захисту здоров'я людей та інтересів споживачів, а також створення прозорих умов ведення господарської діяльності, підвищення конкурентоспроможності вітчизняних

харчових продуктів та зменшення їх ціни [31]. Також Закон «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів» передбачає запровадження в Україні моделі європейської системи безпеки та якості харчових продуктів, побудованої на принципі «від лану до столу», та положень системи НАССР, законодавчі основи якої регламентовані в стандарті Комісії Кодекс Аліментаріус [32-34].

На сьогоднішній день забезпечення якості продовольчої сировини та харчової продукції на виробництві досягається шляхом запровадження та дотримання систем управління якістю продукції, а також стандартів, які регламентують вимоги до них. Міжнародними організаціями було розроблено та запроваджено цілу низку систем для забезпечення якості та безпеки харчової продукції. До однієї з таких систем можна віднести систему НАССР. НАССР – найбільш поширений метод забезпечення безпеки та якості продуктів харчування. Дана система базується на таких основних принципах як проведення аналізу ризиків, визначення критичних контрольних точок, визначення критичних меж, створення системи моніторингу за критичними контрольними точками, опис корегуючих дій, визначення процедур верифікації ефективності функціонування системи НАССР, документування всіх процедур та запис свідчень [35-41].

Проблеми безпеки харчової продукції носять комплексний характер, а їх вирішення потребує численних зусиль як з боку вчених, виробників, санітарно-епідеміологічних служб, державних органів, так і споживачів. Актуальність даної проблеми зростає з кожним роком, оскільки безпека харчової продукції безпосередньо впливає не тільки на здоров'я людей, але і на збереження генофонду людства в цілому. Безпека харчової продукції це передусім відсутність безпосередньої небезпеки для здоров'я людини при вживанні їжі (харчові отруєння, харчові інфекції), а також відсутність небезпеки віддалених наслідків (канцерогенна, мутагенна та тератогенна дія). Таким чином безпечними вважаються продукти харчування, які не шкодять здоров'ю не тільки теперішнього покоління, але й майбутнього [42-48].

Із продуктами харчування в організм людини можуть в значній кількості надходити речовини, небезпечні для здоров'я. На сьогодні дуже гостро стоїть питання підвищення відповідальності виробників щодо забезпечення ефективних механізмів контролю якості харчової продукції та гарантування їх безпеки для здоров'я споживача. Безпека харчової продукції оцінюється за санітарно-гігієнічними нормами, які включають біологічні об'єкти, потенційно небезпечні хімічні сполуки, радіонукліди та шкідливі рослинні домішки. Присутність їх у продуктах харчування повинна регламентуватися та не перевищувати допустимих норм. Більше половини шкідливих речовин, що регулярно потрапляють в організм людини, надходять з їжею. Тому забезпечення екологічної безпеки харчової продукції є вкрай важливим. В останні роки актуальність цієї проблеми додатково зросла у зв'язку з широким застосуванням різного роду харчових добавок та нових пакувальних матеріалів. Крім того, з'явилася велика кількість малих підприємств, на яких недостатньо контролюється технологічний процес виготовлення харчової продукції [49-59].

У харчову продукцію небезпечні речовини можуть потрапляти на стадії одержання продовольчої сировини з об'єктів навколишнього середовища, у результаті введення спеціальних добавок під час виробництва харчової продукції з метою підвищення смакових якостей, поліпшення зовнішнього вигляду або збільшення строків зберігання [60-64]. Безпека харчової продукції може також зменшитись під час застосування нових технологій виробництва, таких як генна інженерія або радіаційне опромінення [65-67]. Зниження екологічної безпеки на стадії виробництва сировини рослинного та тваринного походження відбувається в результаті засвоєння та накопичення даними організмами хімічних речовин. Процес накопичення може відбуватися шляхом біоконцентрування, біопомноження або біоаккумуляції. В першому випадку накопичення хімічних речовин відбувається за рахунок прямого сприйняття з навколишнього середовища, у другому – під час харчування, у третьому як за рахунок навколишнього середовища, так і

продуктів харчування [68-71].

Таким чином, у зв'язку із глобальним забрудненням зовнішнього середовища проблема потрапляння сторонніх речовин у харчову продукцію та сировину набуває соціально-медичного та соціально-економічного значення. Актуальність і складність цієї проблеми на сучасному етапі розвитку промисловості визначається не тільки тим, що в природу щодня надходять нові речовини, утворюються нові комбінації хімічних сполук, дія яких є невивченою, але й тим, що методи визначення сторонніх речовин значною мірою є громіздкими, трудомісткими та, на жаль, не завжди точними. Якщо на початку 20-го століття завдяки успіхам медичної та біологічної наук, а також профілактичним заходам багато хвороб втратили свою провідну роль, то в теперішній час у зв'язку з екологічним неблагополуччям число захворювань зростає [72-80].

Фундаментом методологічної основи контролю безпеки та якості харчової продукції є оцінка цієї продукції. Оцінку безпеки та якості харчової продукції можна розглядати як систему, складовими елементами якої є методи випробувань двох напрямків - стандартизовані та науково-дослідні. До основних принципів оцінки харчової продукції належать регламентованість, вірогідність, збіжність та відтворюваність результатів аналізу. Характер оцінки безпеки та якості харчових продуктів визначається видом контролю, який поділяється на вхідний, операційний та приймальний. Здійснення контролю за харчовою продукцією строго регламентується нормативною документацією, зокрема стандартами, нормами, методичними вказівками, тощо. Безпеку та якість харчової продукції оцінюють за такими показниками як органолептичні, фізико-хімічні, мікробіологічні, а також токсикологічні. В залежності від характеру параметрів показників застосовуються органолептичні або вимірювальні методи дослідження [81,82].

У таблиці 1.1 наведено методичні підходи до визначення різних ксенобіотиків у складі харчових продуктів і продовольчої сировини.

Таблиця 1.1

Методи визначення ксенобіотиків у складі харчових продуктів

№	Основні показники безпеки	Методи детекції
1	Металічні забруднення	Мас-спектрометрія, атомна абсорбція, емісійна спектроскопія, рентгенівська флуоресценція
2	Радіонукліди	Радіохімічні методи аналізу, гамма- або бета-спектрометрія
3	Нітрати, нітрити нітрозоаміни	Газова хроматографія з флуоресцентним детектуванням, потенціометричні, фотометричні, хроматографічні та електрохімічні методи
4	Пестициди	Капілярна газова хроматографія, вискоєфективна рідинна хроматографія, тонкошарова хроматографія і капілярний електрофорез
5	Діоксини, діоксиноподібні сполуки	Газова і рідинна хроматографія з мас-спектрометриєю низького і високого розділення
6	Мікотоксини	Хроматографія, радіоімунні методи, ІФА
7	Патогенні мікроорганізми	Мікробіологічні методи аналізу, ІФА, ПЛР
8	Дріжджі, пліснява	Мікробіологічні методи аналізу, ІФА, ПЛР
9	Токсини природного походження	Різновиди хроматографічних методів аналізу
10	Лікарські та хімічні препарати	Люмінесцентний аналіз, газова хроматографія
11	Генетично модифіковані інгредієнти	ІФА, ПЛР

Як видно із таблиці 1.1, одним із інструментальних методів визначення забруднюючих речовин, які можуть становити небезпеку для здоров'я людини, є методи, які базуються на ПЛР. Завдяки своїм характеристикам, а саме простоті виконання, високій чутливості та специфічності метод ПЛР набув нечуваної популярності та за короткий проміжок часу перейшов із лабораторій науково-дослідних закладів у випробувальні лабораторії клінічної і ветеринарної медицини, АПК, харчової промисловості. У теперішній час він широко застосовується під час клонування генів,

введення мутацій, секвенування, створення і визначення ГМО, діагностиці захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства. Крім того транскрипційні системи на основі Таq ДНК-полімерази використовуються під час тестування селективності інгібування біологічних процесів різного роду хімічними сполуками, що є перспективним напрямком досліджень з точки зору розробки сучасних лікарських засобів [83]. Що стосується харчової продукції виготовленої за використання генетично модифікованих організмів (ГМО) – рослин, тварин і мікроорганізмів, то тут думки вчених, спеціалістів і громадських діячів сильно розходяться. Прибічники ГМО вважають, що ці продукти не є шкідливими, інші – небезпечними. І якщо у природному середовищі значної екологічної небезпечності від генетично змінених (трансгенних) сортів і гібридів рослин не виявлено, то їх потенційна небезпечність, на думку деяких вчених, не підлягає сумніву. До потенційної харчової небезпечності використання трансгенних (біотехнологічних) сільськогосподарських культур відносять алергенність, мутагенність, тератогенність, гонадо- та ембріотоксичність, зміну біологічної і споживної цінності. Для визначення ГМО у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині на сьогодні використовують імунологічні та молекулярно-генетичні методи аналізу [84].

Таким чином, застосування вимірювальних методів аналізу, використання відповідного сучасного високочутливого устаткування дозволяє здійснювати оперативний контроль показників на всіх етапах технологічного процесу і спрямовано регулювати показники безпеки і якості харчової продукції.

1.2. Молекулярно-генетичні методи оцінювання безпечності та якості продукції тваринного походження

Сучасний розвиток аграрного виробництва виводить на порядок денний проблеми продовольчої та біологічної безпеки, вирішення яких

неможливе без залучення надійних засобів моніторингу, прогнозування та ранньої діагностики. Вирішення цих проблем у сучасному світі базується на інтеграції таких фундаментальних дисциплін як генетика, молекулярна біологія та біотехнологія.

Технології маркер-асоційованої і геномної селекції, картування генів і генетико-популяційні дослідження, генетичний контроль походження і проблема збереження генофонду і генетичного різноманіття, поліпшення якості продукції і оздоровлення стад потребують розроблення все більш нових генетичних маркерів, ефективних під час вирішення конкретних завдань.

Останні десятиріччя ознаменувалися помітним прогресом у розробці підходів щодо визначення поліморфізму ДНК та підбору відповідних систем ДНК-маркерів, які б сприяли більш широкому запровадженню сучасних молекулярно-генетичних методів та технологій оцінки та поліпшення безпеки та якості продукції у аграрному секторі, зокрема у тваринництві. На сьогодні виділяють такі основні напрямки розвитку: розробка молекулярних методів діагностики та контролю безпеки і якості продуктів харчування та сільськогосподарської сировини; діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських видів тварин та фітосанітарний карантинний контроль; виявлення генетичних захворювань тварин на ранніх стадіях розвитку; генотипування організмів для створення генетичних паспортів порід, видів, таксономічних груп; маркер-асоційована селекція (MAS) [85].

Застосування молекулярно-генетичних (ДНК) маркерів базується на генетичному поліморфізмі, який лежить в основі спадкової мінливості будь-якого організму. Генетичний поліморфізм діагностується на різних рівнях організації живого матеріалу, зокрема фенотиповому, біохімічному, хромосомному, молекулярному та генному. Щодо молекулярно-генетичного поліморфізму, то йдеться про зміни в структурі ДНК, зумовлені поодинокими нуклеотидними замінами, делеціями, інсерціями та іншими видами мутаційної мінливості [86].

Роль молекулярно-генетичних маркерів у сучасній генетиці важко переоцінити. З їхньою допомогою складено докладні молекулярні карти геному людини та деяких видів тварин і рослин. Локалізовано найважливіші гени, що визначають ріст і розвиток організмів, морфологічні ознаки, стійкість до захворювань та цілу низку інших властивостей. Молекулярні маркери широко використовуються в популяційній та порівняльній генетиці, геноміці та у філогенетичних дослідженнях. Завдяки молекулярним маркерам розширюються можливості медичної та ветеринарної діагностики, з'являються нові більш точні методи паспортизації порід тварин та сортів рослин. Використання молекулярно-генетичних маркерів дозволяє значно прискорювати процес селекції [87-92].

Проте практичне застосування молекулярно-генетичних маркерів для створення нових високопродуктивних і екологічно-пластичних порід і породних груп сільськогосподарських видів тварин поки що є дуже обмеженим. Пов'язано це передусім з відносно високими витратами на організацію відповідного рівня лабораторій та недостатньою технологізацією процесів. Але по мірі спрощення і автоматизації методів молекулярно-генетичного аналізу зникають технічні перешкоди на шляху запровадження молекулярно-генетичних маркерів в практику селекції та розведення.

Молекулярно-генетичні маркери (ДНК-маркери) є третім поколінням генетичних маркерів, їм передували білкові маркери, а ще раніше - класичні генетичні маркери [93,94]. Вперше теоретичне обґрунтування використанню генетичних маркерів ("сигналей") дав близько століття назад А.С. Серебровский: "... сигналами ми називаємо зручні для менделівських спостережень, альтернативні гени з більш-менш відомою локалізацією, які, не роблячи впливу на досліджувану трансгресуючу ознаку та впливаючи досить певним чином, полегшують генетичний аналіз цієї ознаки, дозволяючи стежити за успадкуванням тієї ділянки хромосоми, у якій ці сигнали розташовані." [95].

Молекулярні маркери представляють собою генетичні маркери, які

аналізуються на рівні ДНК. До них застосовуються терміни класичної генетики, а саме локус, алель, домінантний і кодомінантний тип успадкування. Алелі маркерних локусів являють собою різні форми того ж самого маркеру, які відрізняються довжиною нуклеотидних послідовностей та/або нуклеотидними замінами, розташовані в однакових ділянках (локусах) гомологічних хромосом. Якщо метод аналізу маркера дозволяє виявляти обидва алеля, говорять про кодомінантний тип успадкування даного маркеру, якщо виявляється тільки один - про домінантне успадкування [92].

На сьогодні налічують вже кілька десятків типів молекулярно-генетичних маркерів, які умовно можна поділити на три групи, відповідно до основного методу аналізу. Це маркери, що досліджуються за допомогою блот-гібридизації (RFLP, мінісателіти), ПЛР-аналізу (SSR, IRAP) та ДНК-чипів (SNP, DArT) (табл. 1.2). При цьому в кожній із трьох груп маркери розподіляються на монолокусні та мультилокусні. Всі мультилокусні маркери поєднуються загальною назвою «методи геномного фінгер-принтингу». Монолокусні маркери успадковуються, як правило, за кодомінантним типом, мультилокусні - за домінантним [96,97].

Даний поділ відображає процес «еволюції» ДНК-маркерів. Маркери, що досліджувалися за допомогою блот-гібридизації, являють собою перше покоління ДНК-маркерів та набули широкого поширення у 80-і роки. В 90-і роки ключові позиції зайняли ПЛР-маркери, а згодом у 2000-і їх істотно потіснили молекулярні маркери, засновані на використанні ДНК-чипів. В останні декілька років для аналізу поліморфізму ДНК всі частіше використовують метод прямого секвенування геному або його окремих ділянок [92,98].

Для адекватного підбору ДНК-маркерів з метою вирішення того або іншого генетико-селекційного завдання необхідно враховувати певні критерії: ціль використання, можливість співставлення отриманих результатів з даними інших дослідників, рівень поліморфізму, можливість

Таблиця 1.2

Основні типи молекулярно-генетичних маркерів [96]

Метод	Скорочена назва	Повна назва
Гібридизація	RFLP	restriction fragment length polymorphism / поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів
	мінісателіти	minisatellite / повторювані фрагменти ДНК від 9-10 і більше (звичайно до 100) нуклеотидів
ПЛР	AFLP	amplified fragment length polymorphism / поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів
	CAPS	cleaved amplified polymorphic sequences / розщеплені ампліфіковані поліморфні послідовності
	IRAP	inter-retrotransposon amplified polymorphism / поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами
	ISSR	inter simple sequence repeats / міжмікросателітні послідовності
	RAPD	random amplified polymorphic DNA / випадково ампліфікована поліморфна ДНК
	SCAR	sequence characterized amplified region / охарактеризована нуклеотидною послідовністю ампліфікована область
	SSAP	sequence-specific amplification polymorphism / поліморфізм сиквенс-специфічної ампліфікації
	SSCP	single strand conformation polymorphism / поліморфізм конформації одноланцюгової ДНК
	SSR	simple sequence repeats / прості послідовності, що повторюються - мікросателіти
	STS	sequence tagged site / маркований нуклеотидною послідовністю сайт чи локус
ДНК-чіпи	SNP	single-nucleotide polymorphism / одонуклеотидний поліморфізм
	DArT	diversity array technology / ДНК-чіп технологія для вивчення різноманіття

автоматизації процесу та матеріальні витрати. Загальні характеристики маркерів служать для підбору відповідного типу маркерів залежно від

зазначених вище критеріїв. Так, кодомінантні монолокусні маркери, що характеризують індивідуальний локус, часто використовуються для популяційно-генетичних досліджень, картування генів і геномів, порівняльного картування та побудови консенсусних карт у межах роду (SSR, RFLP) або більших таксономічних одиниць (RFLP). Геномний фінгерпринтинг застосовується найчастіше при популяційно-генетичному аналізі видів, геном яких практично не є вивченим. Крім того, такі методи геномного фінгерпринтинга як AFLP і DArT, є ефективними для насичення генетичних карт локусами молекулярних маркерів [96].

Серед молекулярно-генетичних маркерів розрізняють маркери з відомою локалізацією у певній хромосомі, ділянці хромосоми або поблизу конкретного гену і маркери, про локалізацію яких нічого невідомо. Як правило, сюди відносяться мультилокусні маркери. Як ті, так і інші знаходять своє застосування при проведенні генетичних досліджень та селекційних процесах. Молекулярні маркери з невідомою локалізацією не можна використати для маркування певного гена або хромосоми, зате їх успішно застосовують у філогенетичних дослідженнях, для паспортизації порід тварин і сортів рослин. Деякі мультилокусні маркери підходять для створення генетичних карт (DArT, AFLP), а також геномної селекції (DArT). На вибір потрібного типу ДНК-маркерів для вирішення конкретної задачі впливають такі характеристики як рівень внутрішньовидового поліморфізму та можливість автоматизації процесу аналізу поліморфізму ДНК.

Запровадження ДНК-маркерів у сучасну лабораторну практику підштовхнуло розвиток таких напрямків як картування генів, локусів кількісних ознак та, врешті-решт, створення молекулярних карт окремих хромосом та цілих геномів.

1.2.1. Ідентифікація QTL-генів у тваринництві

Розвиток тваринництва завжди був пов'язаний із прагненням і спробами поліпшення різних продуктивних показників тварин, яке

здійснювалось, як правило, на примітивному рівні, за фенотипічними параметрами. Вважалося, небезпідставно, що від видатних за екстер'єрними показниками тварини будуть отримані й нащадки із високими показниками продуктивності. Таким чином з безлічі продуктивних показників тварин, важливих для здійснення господарської діяльності людини, було відібрано основні: молочність та жива вага у тваринництві, м'ясо-сальність у свинарстві, жвавистість і витривалість у конярстві, кількість і якість вовни у вівчарстві, яйценосність у птахівництві. На розвиток і удосконалювання саме цих ознак були в основному спрямовані дослідження вчених і зусилля селекціонерів. В подальшому, з накопиченням знань із загальної біології та з бурхливим розвитком генетики, все більшу популярність знаходили дослідження, спрямовані на пошук вже інтер'єрних показників, що характеризують ті або інші фенотипічні параметри та продуктивні якості тварин [99,100].

Більшість цих показників має полігенну природу і детермінується багатьма генами малого ефекту при взаємодії з умовами зовнішнього середовища. При цьому адитивна генетична мінливість може варіювати від 2 до 50%. Природа генів, що лежать в основі цієї мінливості, вивчена недостатньо. У той же час є гени або група генів, внесок яких у прояв тієї або іншої ознаки продуктивності при будь-яких умовах середовища є більш значним і має чітко виражений ефект. Такі гени отримали назву головних генів кількісних ознак (*Quantitative Trait Loci*, QTL). Сучасні молекулярно-генетичні методи досліджень дозволяють визначати розходження між тваринами за алельними варіантами у локусах ДНК, які або безпосередньо впливають на прояв бажаної ознаки, або пов'язані з QTL, що уможливорює картування цих локусів і проведення відбору тварин безпосередньо по генотипах, тобто за генетичними маркерами. Такий підхід одержав назву маркер-асоційованої селекції або MAS-селекції (*Marker Assisted Selection*, MAS) [101,102].

Таким чином ефективність селекційної роботи визначається

успішністю підбору генотипів, носії яких у певних умовах відрізняються бажаною продуктивністю. Для цього використовують молекулярно-генетичні маркери генів, які дозволяють одержувати інформацію про різні стани генів (алельні варіанти) і безпосередньо експериментально досліджувати, які варіанти окремих генів і генних ансамблів мають переважне поширення в групі організмів, що несуть бажаний комплекс ознак у конкретних умовах навколишнього середовища. Застосування достатньо великої кількості генетичних маркерів в якості критеріїв селекційних процесів дозволяє більш вірогідно оцінювати генетичний потенціал порід, популяцій і окремо взятих особин, більш точно контролювати селекційні процеси в стадах, корегувати їхню спрямованість [103,104].

Перші монолокусні генетичні маркери на основі RFLP-аналізу були розроблені D. Botstein et al. (1980), і показано можливість їх використання під час створення генетичних карт [105]. Перша RFLP-карта була запропонована Liu & Tsunewaki (1991) і містила в 1,5 разів більше локусів ніж попередня класична генетична карта, яка була результатом наполегливої праці багатьох дослідників протягом декількох десятиліть [106]. Поява RFLP-карт уможливила визначення точного положення окремих генів у геномі та дозволила клонувати їхні послідовності (map-based gene cloning, позиційне клонування генів) [107,108].

У 1983 р. ряд дослідників на чолі з S. Tanksley оцінили потенційні переваги відбору за генотипом та запропонували використовувати ДНК-маркери в селекції [109-111]. Але масове поширення робіт з картування генів, а також локусів кількісних ознак прийшлося на епоху більш дешевих і зручних у застосуванні ПЛР-маркерів. В цей час розробляються маркерні системи, які дозволяють проводити пряме дослідження ДНК різних організмів. ДНК-маркери представляють собою поліморфні ділянки ДНК із невідомими функціями, але з відомою локалізацією на хромосомі [112]. До їх основних переваг належить той факт, що зміни в послідовності ДНК є першопричиною всіх наступних змін організму. Крім того, вони

забезпечують можливість аналізу будь-яких послідовностей генома, а не лише білок-кодуєчих, до яких належить від 1 до 10% усього геному [113,114]. До найбільш підходящих та затребуваних для картування ПЛР-маркерів можна віднести мікросателітні маркери (SSR), а також ISSR- та IRAP-маркери. Вперше запропонував використовувати в якості маркерів гіперваріабельні послідовності, що складаються з простих повторів, D. Tautz у 1989 р. [115].

На сьогодні в селекції із залученням ДНК-маркерів застосовують два основних методи. Перший, як вже згадувалось вище - маркер-асоційована селекція. Це підхід, який дозволяє проводити відбір за генотипом, використовуючи ДНК-маркери, які тісно зчеплені із бажаним геном. Метод MAS-селекції добре себе зарекомендував при беккросній та лінійній селекції, а також при створенні пірамід генів [116].

Процес запровадження ДНК-маркерів у MAS-селекцію вимагає проведення цілої низки заходів. По-перше, необхідно виділити спектр генів-кандидатів, які можуть слугувати в якості молекулярно-генетичних маркерів QTL та розробити тест-системи для аналізу їхнього алельного поліморфізму. Далі слід визначити частоти зустрічання алельних варіантів даних генів у різних порід сільськогосподарських тварин та провести кореляційні дослідження. Тільки після цього можна оцінити ефективність використання даних генетичних маркерів у селекційному процесі. Так, загальноприйнятими ДНК-маркерами молочної продуктивності ВРХ вважаються гени, що приймають участь у формуванні якісного складу молока, а саме гени к-казеїну (CSNK), β -лактоглобуліну (BLG) і α -лактальбуміну (α -LA), а також гени, що контролюють кількісні характеристики молочної продуктивності, такі як надій, жирномолочність і білкововмісність (гіпофізарний фактор росту-1 (Pit-1), гормон росту (GH), рецептор гормону росту (GHR), пролактин (PRL), інсуліноподібний фактор росту-1 (iGF-1), тощо). Щодо маркування ознак м'ясної продуктивності ВРХ, то сюди відносять декілька маркерних генів, що пов'язані з метаболізмом

ліпідів - тіреоглобулін (TG5), діацилгліцерол О-ацилтрансфераза (DGAT), лептин, міостатин, калпаїн і калпастатин [117].

Другий метод сучасної селекції, це метод геномної селекції (genomic selection). Метод геномної селекції дозволяє проводити відбір за генотипами навіть за відсутності даних про гени, що впливають на корисну ознаку, за рахунок використання рівномірно розподілених по геному ДНК-маркерів [90]. Розвиток даного підходу став можливим за рахунок зниження собівартості секвенування нуклеотидних послідовностей і стрімкого розвитку методів високопродуктивного секвенування. Секвенування та порівняння геномів різних представників того ж самого виду дозволяє виявляти поліморфні ділянки геному та розробляти маркери, які рівномірно і щільно вкривають геном. Як правило, це SNP маркери. На сьогодні вже існують повногеномні SNP-чипи для автоматичного аналізу поліморфізму ДНК. Даний підхід вже успішно застосовується для деяких видів сільськогосподарських тварин та рослин. Не так давно з'явилась перспектива використання методу геномної селекції також для організмів, геном яких ще повністю не відсеквеновано або навіть не вивчено. Такої можливості надав інший підхід - високопродуктивне генотипування за допомогою DaRT-маркерів [116]. Останній тип маркерів не вимагає наявності даних щодо первинної послідовності НК організму. Як перший, так і другий типи селекції засновані на використанні ДНК-маркерів та відбору за генотипом, але між ними існує і принципова різниця. Оскільки для застосування методу генної селекції не потрібна вихідна інформація щодо генів, які впливають на бажану ознаку, це значно прискорює селекційний процес. Крім того, геномна селекція має перевагу при відборі за ознаками, що мають складний полігенний контроль, в той час як MAS-селекція, як правило, ефективна лише у випадку моно- або олігогенного контролю ознак. Але якщо під час геномної селекції виникне небажана коселекція ознак, уникнути додаткових генетичних досліджень, подібних тим, що потрібні для MAS-селекції, не вдасться.

Геномну селекцію можна поділити на три етапи: «training generations» аналіз за використання методів фенотипування та генотипування, виявлення кореляцій між фенотипом і генотипом, подальший відбір за генотипом «selection candidates». Необхідною умовою проведення геномної селекції є достатня кількість «тренувальних» поколінь та ДНК-маркерів, а також правильне співвідношення числа маркерів і досліджуваних генотипів.

Найбільші програми з геномної селекції сільськогосподарських видів тварин (BPX, свині) проводилися в Нідерландах (TOPIGS), Франції (INRA), Казахстані (КазАгроИнновация), Данії і Швеції (VikingGenetics), Німеччині і Австрії (LFL-LGL-ZuchtData), а також ряді компаній у США. Економічну вигоду від геномної селекції важко переоцінити. Так, геномна селекція BPX дозволяє заощадити близько 92% коштів при проведенні заходів з оцінки биків-плідників та скоротити час оцінки з 6 років до 21 місяця [90].

1.2.2. Молекулярно-генетична діагностика інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин

Особливості ведення сучасного сільського господарства у світовому масштабі призвели до виникнення низки нових проблем. Широкий обмін генетичним матеріалом між різними країнами та континентами супроводжується поширенням не тільки генетичних захворювань (BLAD, DUMPS, AHQS), але й різних інфекційних агентів (губчаста енцефалопатія BPX, лейкоз BPX, африканська чума свиней). У деяких випадках спостерігається дуже висока швидкість розповсюдження генетичних мутацій, вірусів та бактерій. Великі економічні збитки, що виникають під час поширення спадкових та інфекційних хвороб, призводять до необхідності запровадження суворого контролю щодо сільськогосподарських видів тварин [85,118-120].

До цього часу епізоотична ситуація в країнах ближнього і далекого зарубіжжя залишається напруженою, а небезпека потрапляння збудників

різних хвороб до країни різко зросла, серед іншого, через збільшення імпорту тваринницької продукції з інших країн. За багатьох особливо небезпечних і карантинних інфекцій епізоотична ситуація перебуває під контролем. Однак зберігається загроза потрапляння таких хвороб як ящур, нодулярний дерматит ВРХ, африканська чума свиней, везикулярна хвороба свиней, віспа овець і кіз, катаральна лихоманка овець, губчата енцефалопатія ВРХ, хвороба Ньюкасла, грип птахів та ін. [121,122].

На сьогодні серйозну проблему представляють такі захворювання тварин як сибірська виразка, сказ, класична чума свиней, хвороба Ауески, туберкульоз, бруцельоз, лейкоз, респіраторно-репродуктивний синдром свиней, сальмонельози, чума м'ясоїдних, хвороба Марека, мікотоксикози та ряд інших. Найвищий рівень захворюваності інфекційними хворобами відзначається в одній із основних галузей - скотарстві. За останні 20 років показник захворюваності за деякими хворобами ВРХ зріс - ешеріхіоз, сальмонельоз, пастерельоз, некробактеріоз, лейкоз, сказ. У той же час знизилась захворюваність туберкульозом, трихофітозом, бруцельозом; стабільно на низькому рівні залишається захворюваність сибірською виразкою і емкаром, ліквідовано ящур. Питома вага різних захворювань у загальній інфекційній патології ВРХ складає: лейкоз – 30-35 %, туберкульоз – 18-21 %, бруцельоз – 6-10 %, некробактеріоз, ешеріхіоз і сальмонельоз – 9 %, пастерельоз – 5 %. Серед захворювань свиней основне місце займають ешеріхіоз і набрякова хвороба (25 %), пастерельоз (9 %), дизентерія, сальмонельоз, респіраторно-репродуктивний синдром, бешиха. Продовжує становити небезпеку чума свиней, хоча захворюваність нею різко знизилась. Серед інфекційної патології у МРХ переважають такі як копитна гниль (до 50 %) і клостридіози (13 %), іноді реєструється бруцельоз. У коней частіше за все реєструється ринопневмонія, інфекційна анемія та правець. У цілому захворюваність коней інфекційними хворобами знижується [123-125].

На початку 2000-х років сильна епізоотія ящура спостерігалася у Великобританії серед ВРХ, МРХ, свиней і диких копитних. Більше 130 тис.

тварин довелося знищити. Захворювання затронуло й ряд європейських країн, зокрема Францію, Нідерланди і Ірландію, однак завдяки інтенсивним протиепізоотичним заходам осередки вдалося досить швидко ліквідувати. У РФ протягом 1991-2000 рр. так само реєструвалися окремі випадки ящура. Стосовно України, з 1992 р. вона має офіційно визнаний статус Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (МЭБ) країни, вільної від ящура без вакцинації [126,127]. Сибірку зареєстровано в багатьох країнах світу і практично на всіх континентах. У країнах СНД спалахи сибірки реєструвалися в РФ (2011-13, 2016, 2019 рр.), Білорусі (2019 р.), Киргизії (2012,2013,2018 рр.), Молдові (2013 р.), Таджикистані (2013 р.), Вірменії (2013 р) [128]. З початку 90-х р. ХХ ст. спостерігався стійкий ріст захворюваності на сказ. Ця інфекція належить до погано контрольованих. В Україні сказ зустрічається у всіх областях, реєструється до 1,5 тис. випадків на рік [129]. 28 червня 2011 р. ООН проголосила про викорінювання чуми ВРХ, у такий спосіб дане захворювання стало другим після віспи, що вдалося повністю знищити [130]. А щодо чуми свиней, то дане захворювання реєструється майже у 40 країнах світу. Наприкінці ХХ ст. неблагополучними за даним захворюванням залишалися Великобританія, Німеччина, Австрія, Італія, Іспанія, колишня Югославія, а також РФ, Китай, Індія, країни Латинської Америки. В Україні за останні 5 років зареєстровано більше 300 спалахів АЧС [131,132]. Віспа овець і кіз реєструється в 40 державах, у тому числі у 18 країнах в Азії, 14 в Африці, 5 у СНД. У Європі віспа зареєстрована в Болгарії й Греції. На території нашої держави ця хвороба історично не реєструється [133]. Незважаючи на багаторічні зусилля й вакцинацію худоби в неблагополучних зонах, бруцельоз як і раніше залишається проблемною інфекцією. За даними ВООЗ, у світі щорічно реєструється біля 500 тис. нових випадків бруцельозу людей. В Україні випадки бруцельозу серед людей є спорадичними. За період 1994-2011 рр. позитивний діагноз підтверджено у 30 осіб. За даними інформаційного бюлетеня МОЗ України, у 2012, 2013 рр. зареєстровано по 1 випадку серед людей. За даними Державного комітету

ветеринарної медицини, останній випадок бруцельозу серед корів підтверджено у 1992 р., серед свиней – у 2008 р., серед диких тварин – у 2010 р. [134]. Лейкоз ВРХ поширений у багатьох країнах світу. За інформацією МЕБ, захворювання продовжують реєструвати у США, Канаді, Росії, Японії, Німеччині, Болгарії, Хорватії, Литві, Польщі та ін. Україна впродовж останніх шестидесяти років є країною неблагополучною щодо даного захворювання. І хоча на сьогодні епізоотію подолано, однак щорічно продовжують реєструватися спорадичні випадки інфекції ВЛ ВРХ, що вказує на збереженість джерел збудника інфекції та загрозу розвитку нової епізоотії [135,136].

Для експрес-діагностики вірусної інфекції найчастіше використовують методи які дозволяють виявляти у біологічному матеріалі вірусні антигени (білки вірусів), вірусні тільця-включення, віріони та вірусні гемаглютиніни. До класичних методів діагностики можна віднести метод вірусоскопії за допомогою світлового мікроскопа. Метод вірусоскопії відрізняється простотою техніки і швидкістю, але вимагає значного досвіду при оцінці отриманих результатів. Крім того від дієвий лише при діагностиці крупних вірусів (віспа), при інших інфекціях його не застосовують. Що стосується електронної мікроскопії, то її застосовують лише для вивчення тонкої морфології вже відомих вірусів [137].

На присутність певного вірусу у клінічному матеріалі вказує наявність вірусних білків, як у складі цілих вірусних часток, так і у вигляді обломків віріонів. Як і всякі білки, вірусні білки мають антигенні властивості. Більш того, вони обумовлюють антигенні властивості самого вірусу. Тому, маючи у своєму розпорядженні сироватки, що містять антитіла до певних вірусів, можливо виявляти у біоматеріалі антигени до цих вірусів за допомогою серологічних реакцій. Дуже добре себе зарекомендували радіоімунний аналіз (RIA), реакція імунофлюоресценції (РІФ) та імуноферментний метод аналізу (ІФА). Менш чутливими і специфічними є реакції зв'язування комплекменту (РЗК) і дифузійної преципітації (РДП) [138,139].

Особливість методу РІА полягає в тому, що сироватку з антитілами до певного антигену обробляють радіоактивним йодом. Мічену ^{125}I сироватку наносять на препарат з досліджуваним матеріалом. Після відмивання неспецифічних антитіл, що не зв'язалися, препарат досліджують за допомогою лічильника радіоімпульсів або авторадіографа на рентгенівській плівці [140].

Метод РІФ заснований на виявленні антигенів збудника за допомогою специфічних сироваток, які мічені флюорохромами. В основі реакції лежить утворення специфічного комплексу антиген-антитіло, який виявляють за допомогою люмінісцентного мікроскопа. У цілому даний метод має такі переваги як поєднання точності мікроскопії зі специфічністю сірологічних реакцій; дозволяє виявляти самі мінімальні кількості антигенів або антитіл; вирізняється простотою техніки і швидкістю одержання результатів [141].

ІФА (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) відрізняється від попереднього методу аналізу тим, що сироватку кон'югують не флюорохромом, а такими ферментами як пероксидазою хрому або лужною фосфатазою. Раніше даним кон'югатом обробляли культури клітин, мазки, відбитки або зрізи дослідного матеріалу. Під час нанесення на препарат розчину субстрату відбувалась зміна забарвлення, яке досліджувалось за допомогою світлового мікроскопа. Останніми роками в діагностиці набув популярності різновид даного методу - твердофазний ІФА. Його особливість полягає в тому, що досліджуваний матеріал у вигляді суспензії вноситься у лунки полістиролових планшетів, які попередньо були сенсibiliзовані гамма-глобулінами з антитілами до досліджуваного антигену. Інтенсивність забарвлення визначається за допомогою рідера або спектрофотометра. Даний підхід дозволив автоматизувати процес і довести продуктивність досліджень до 2000 зразків на годину [137].

Інший підхід в діагностиці вірусних інфекцій - це визначення вірусної нуклеїнової кислоти. Сюди відноситься метод ДНК (або РНК)-зондів. Даний метод засновано на реакції гібридизації нуклеїнових кислот - здатності

односпіральних комплементарних ланцюгів ДНК або РНК формувати двоспіральні структури. Реакція може протікати між комплементарними молекулами типу: ДНК/ДНК, ДНК/РНК, РНК/РНК. Зонд являє собою нуклеотидну послідовність обмеженого розміру, що комплементарна певній ділянці вірусного генома. Зонд мітять за допомогою радіоактивного фосфору ^{32}P , біотину або флуоресцентного барвника, що дає змогу його ідентифікувати, а відповідно й детектувати вірусну нуклеїнову кислоту, з якою він з'єднався під час молекулярної гібридизації. До переваг методу можна віднести його високу чутливість і специфічність, відносну швидкість аналізу, універсальність, відсутність необхідності стерильної роботи. Недоліки полягають у певних технологічних труднощах під час одержання зонду, крім того, заміна мітки на більш безпечну нерадіоактивну призводить до зниження чутливості більше ніж в 10 разів. Слід зазначити, що на сьогодні даний метод практично повністю витиснутий з діагностичної практики полімеразною ланцюговою реакцією [138,142,143].

Останні десятиліття велика увага приділяється розробці ПЛР діагностиків, що застосовуються в області інфекційних захворювань тварин. Простота постановки, висока чутливість, добра відтворюваність швидко перетворила цей метод в один з найбільш перспективних діагностичних інструментів. До основних переваг застосування методу ПЛР у діагностиці інфекційних хвороб можна віднести наступне: безпосереднє визначення збудника інфекції, швидкість одержання результату, можливість кількісного аналізу, висока чутливість і специфічність, можливість роботи з будь-яким біологічним матеріалом, одночасний аналіз декількох мішеней (патогенів), можливість повної автоматизації [144].

Застосування молекулярно-генетичних методів в діагностиці збудників інфекційних хвороб є актуальним напрямком сучасної мікробіології, генетики, біотехнології та цілої низки прикладних ветеринарних наук. Метод ПЛР на сьогодні вважається «золотим стандартом» молекулярної діагностики. Застосування методів молекулярної діагностики для виявлення

збудників інфекційних хвороб дуже тісно пов'язане з їх типуванням, виявленням поліморфізму генів, встановленням геному патогенних штамів, можливістю клонування генів і створення генно-інженерних вакцин [139].

Практична ПЛР-діагностика знайшла своє застосування в закладах медичного, ветеринарного та сільськогосподарського профілю. Метод ПЛР використовується не тільки для виявлення патогенів, але також для визначення антибіотикорезистентності, контролю динаміки інфекційного процесу, оцінки ефективності схем лікування. З кожним роком з'являються все нові модифікації методу ПЛР (SybrGreen, TaqMan, Scorpion), удосконалюється відповідне устаткування. Так, на сьогодні провідні фірми-виробники ампліфікаторів для проведення Real-Time PCR (Applied Biosystems, Bio-Rad, Qiagen) позиціонують прилади, що дозволяють виконувати одночасну детекцію до п'яти мішеней [145].

На теперішній час в області ветеринарної медицини вже розроблено тест-системи для діагностики методом ПЛР таких захворювань як туберкульоз, сибірська виразка, лейкоз, чума ВРХ, сказ, ящур, бруцельоз, кампілобактеріоз, лістеріоз, сальмонельоз, стафілококоз, хламідіоз, класична та африканська чума свиней, респіраторно-репродуктивний синдром свиней, трансмісивний гастроентерит свиней, хвороба Ауескі, везикулярна хвороба свиней, парвовірусна інфекція свиней, мікоплазмоз, хвороба Марека, реовірусна інфекція, хвороба Ньюкасла, нодулярний дерматит ВРХ і багатьох інших [85,145].

Але спектр інфекційних хвороб постійно поповнюється за рахунок раніше невідомих (вірусні лихоманки Ласса, Ебола, Марбург, хантавірусний легеневий синдром, коронавірусна інфекція COVID-19) та етіологічної розшифровки захворювань, що раніше вважалися неінфекційними (хронічні гепатити, лімфома Беркітта, саркома Капоші). На сьогодні не менш 300 відомих вірусів людини та тварин, що відносяться до 51 роду та 30 родин, здатні викликати пандемії (грип А, SARS-CoV-2, віспа, поліомієліт), епідемії (гарячка денге, західного Нілу), епідемічні спалахи (гепатити, сказ, АЧС) та

спорадичні захворювання. Тому сьогодні як ніколи вкрай важливим є розвиток сучасної біотехнології, генної інженерії та молекулярно-генетичних методів діагностики [146].

1.2.3. Виявлення фальсифікації м'ясної продукції і методи визначення видової належності тканин

У різних країнах і культурах вживають різні види м'яса. Це залежить від традицій, релігійних переконань та цілого ряду інших причин. Доступність на споживчому ринку м'яса тих або інших тварин і доходи населення теж відіграють не останню роль. До м'ясних свійських тварин насамперед відносяться корови, коні, кози, вівці, свині і кролі. М'ясо більш екзотичних тварин, таких, наприклад, як верблюди і кенгуру, вживають у їжу переважно в місцях їхнього існування. До птахів, яких споживає людина, відносяться кури, качки, гуси, голуби, індики, цесарки, ему, страуси і, меншою мірою, інші. Крім того, людина харчується й "дичиною"- м'ясом диких тварин, таких як кабани, лосі та олені [147].

В аграрному секторі України тваринництво знаходиться на другому місці за значимістю для економіки. Ситуація на м'ясному ринку України постійно змінюється. На ринок м'яса та м'ясних виробів впливають такі фактори як собівартість виробництва, торгівельні обмеження, зміна курсу валюти, коливання споживчого попиту. На сьогодні м'ясний ринок у країні складається з таких сегментів як м'ясо птиці, яловичина, свинина і м'ясо інших тварин (баранина, козлятина і т.д.). Останніми роками в Україні відбувається скорочення поголів'я великої рогатої худоби і свиней. За перші шість місяців 2016 р., у порівнянні з таким же періодом 2015, скоротилася кількість великої рогатої худоби на 2,4%, свиней на 3%, птахів на 4,5%. Аналіз виробництва м'яса і м'ясної продукції за період 2011-2017 рр. так само свідчить про його занепад. Найбільше м'яса ВРХ було вироблено в 2014 р., і з тих пір обсяги постійно зменшуються. Подібна ситуація і зі свининою

та субпродуктами. В 2017 р. було вироблено 1 344.8 тис. тонн м'яса всіх сортів. Обсяг випуску та реалізації м'яса птахів (курятини) у два рази перебільшує сумарний обсягу виробництва всіх інших сортів м'яса. Це співвідношення зберігалось протягом періоду з 2011 по 2017 рр. [148,149].

Незважаючи на зниження виробництва, експорт продовжує нарощуватись. В Україні найбільше виробляють курятини - і вона ж становить левову частку експорту - 83%. В 2017 р. країна експортувала 271 327 тонн курятини. Це на 12% більше, ніж у 2016 р. та на 68% ніж у 2015 р. Так само зростає, хоч і повільними темпами, експорт яловичини (41 875 тонн) і відновлюється експорт свинини, на який сильно вплинули спалахи африканської чуми свиней. В імпорті більшу частину займає птиця (курятини) - 66%. Частка інших продуктів набагато нижча. Причина такої переваги курятини пояснюється її доступністю та порівняно низькою ціною [150]. Нижче наведено структуру виробництва м'яса в усіх категоріях господарств України за 2017 рік (рис. 1.1). Як видно з діаграми, найбільший розрив спостерігається між виробництвом курятини та іншими видами м'яса.

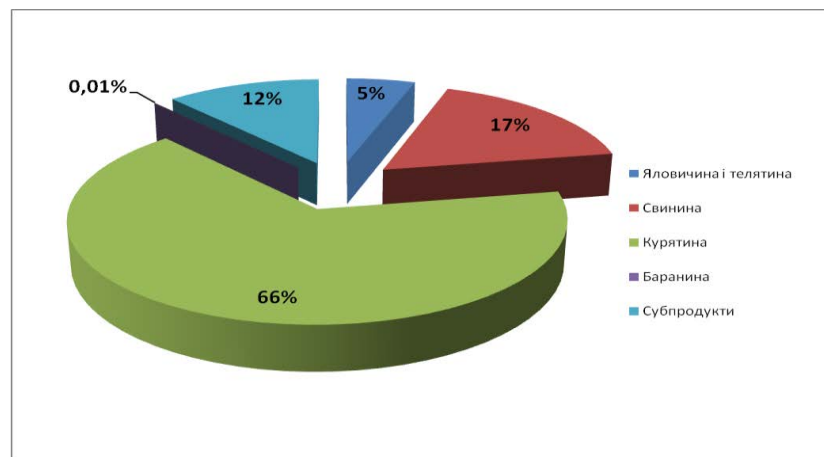


Рис. 1.1. Структура виробництва м'яса (%) в усіх категоріях господарств України станом на 2017 р. Розраховано на основі даних Державного комітету статистики України [151].

За прогнозами FAO до 2020 року у структурі споживання українців 80% буде займати м'ясо у чистому вигляді, на сьогодні ж більшу частину раціону складають консерви та готові м'ясні вироби. У 2016 році в Україні у структурі споживання м'яса найбільша питома вага припадала на м'ясо птиці – 46,8%, свинини – 42,8%, яловичини 10,4%. Баланс попиту і пропозиції ще

раз підтверджує домінуючу позицію м'яса птиці у загальному об'ємі виробництва та споживання серед інших видів м'яса і те, що дешеве м'ясо птиці користується попитом серед споживачів.

В Україні м'ясну сировину виробляють не тільки для забезпечення потреб внутрішнього ринку, але й для експорту. Тому забезпечення належного рівня ветеринарно-санітарного контролю за безпечністю та якістю м'ясної продукції має велике значення. М'ясна сировина та харчові продукти, до складу яких вона входить, потребують ретельної перевірки за органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними показниками [152–154]. Контроль м'ясної сировини за показниками безпеки та якості в Україні здійснює державна служба з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів відповідно до ряду Законів України та чинних нормативно-правових актів щодо виробництва, транспортування, зберігання, реалізації, а також експорту та імпорту відповідної продукції [155–158].

Реорганізація контролюючих установ в Україні, яку проводили останніми роками, призвела до того, що на ринках і в магазинах країни значно збільшилась кількість фальсифікованих продовольчих товарів, у тому числі м'ясної продукції як вітчизняного, так і імпортного виробництва. Прийняття нових законів, спрямованих на суворе дотримання певних вимог щодо якості сировини і продукції без належного рівня контролю ще не гарантує повного зникнення фальсифікатів з полиць магазинів.

За результатами перевірок контролюючих органів, 15–30 % м'ясної продукції, що реалізується в торговельній мережі і на ринках, не відповідає чинним вимогам. Мають місце випадки реалізації фальсифікованої продукції, що супроводжується всіма належними документами і сертифікатами відповідності. Як фальсифікат найчастіше виступає малоцінна м'ясна сировина, продукція другого та третього сортів, яку реалізують як продукцію високої якості. З огляду на це, нині особливо гостро постає питання про необхідність більш достовірного визначення як видової належності самої м'ясної сировини, так і складу готової подрібненої м'ясної продукції. Через

фальсифікацію м'ясної сировини за видовим складом змінюються не тільки споживчі властивості готових виробів, але й виникає небезпека для здоров'я споживачів. Крім того, фальсифікація видової приналежності м'ясної сировини в багатокомпонентних м'ясних продуктах може нанести велику моральну шкоду тій категорії споживачів, національні або релігійні погляди яких не дозволяють вживати м'ясо окремих видів тварин [159–162].

Контроль за свіжістю та безпекою (наявність патогенів або токсичних речовин) м'ясної сировини та готових м'ясних виробів здійснюють за допомогою органолептичних, фізико-хімічних та мікробіологічних методів аналізу. На жаль, за їх допомогою неможливо встановити видовий склад м'яса в продуктах, особливо якщо кількість внесеного фальсифікату незначна порівняно з основною сировиною.

Застосування імунологічних методів (РА, РП, РІД, ІФА) для виявлення фальсифікації м'ясної продукції також не дає 100 % гарантії. Дані методи аналізу не дають змоги встановити видову належність м'ясної сировини, якщо її вміст у готовій продукції не перевищує 10–20 % від загальної маси продукту. Крім того, зазначені методи практично є непридатними для дослідження м'ясної сировини, отриманої від близькоспоріднених видів тварин, а також м'ясних продуктів, що зазнали термічної обробки. Іноді існує потреба не тільки в ідентифікації видового складу м'ясної сировини, але й у проведенні кількісного аналізу та оцінюванні відсотка фальсифікованого м'яса від основної маси продукту. Деякі модифікації ІФА дають змогу з достатньо високим рівнем достовірності встановити частку фальсифікованого м'яса. Однак даний метод має свої обмеження, пов'язані передусім з неможливістю диференціювання тканин близькоспоріднених видів тварин, неможливістю дослідження зразків, що зазнали термічної обробки та зразків, де вміст фальсифікату менший за 20 % [163–165].

Найбільш перспективними для визначення видової належності тканин тваринного походження у складі як м'ясної сировини, так і готової продукції, що зазнала термічної обробки, є молекулярно-генетичні методи аналізу,

особливо полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Порівняно із зазначеними вище імунологічними методами досліджень встановлення видової належності за допомогою ПЛР-аналізу характеризується на порядок більшою чутливістю, ширшим спектром диференціювання тваринних тканин, відсутністю обмежень щодо співвідношення складників дослідного зразка, високою відтворюваністю та повторюваністю результатів, своєю універсальністю, а також можливістю здійснення як якісного, так і кількісного аналізу [166,167]. Упродовж останніх десятиріч ПЛР-аналіз набув практичного застосування в усіх сферах сучасної біології, медицини та ветеринарії, зокрема у діагностиці інфекційних захворювань різної етіології, генотипуванні живих організмів, оцінюванні вірулентності патогенів та визначенні стійкості до антибіотиків, генодіагностиці та геномній дактилоскопії, пренатальній діагностиці та дослідженні рівня експресії генів. Нині до використання запропоновано безліч різних модифікацій ПЛР (гніздова, ПЛР у реальному часі, кількісна ПЛР), розробляються нові технології (*TaqMan*[®], *SYBR*[®] *Green*) на основі ПЛР-реакції, як матриці використовуються як молекули ДНК, так і РНК [168–170].

У 1995 р. Meyer зі співавторами для ідентифікації тканин близькоспоріднених видів тварин запропонували до використання метод ПЛР з подальшим рестрикційним аналізом ампліконів. В якості мішені було використано мітохондріальний ген цитохрому В (сyt b). Застосування 20 різних рестриктаз дозволяло ідентифікувати таких тварин як олень, лось, косуля, лань, серна та газель [171]. Тест-систему для визначення видової належності тканин жуйних тварин в м'ясо-кістковому борошні, кормах для тварин, не оброблених м'ясних продуктах та продуктах, що зазнали термічної обробки, було запропоновано у 2000 р. Сорокіна зі співавторами [172], Коновалова зі співавторами (2011 р.) розробили мультиплексний метод ДНК-ідентифікації видового походження тваринницької продукції. В якості мішені вони також використали консервативну ділянку гену цитохрому В таких видів як *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Gallus gallus* [173]. Одним з найбільш

зручних методів ідентифікації видової приналежності м'яса тварин у термічно обробленій продукції є ПЛР у реальному часі, оскільки дозволяє ідентифікувати навіть невеликі фрагменти ДНК, що збереглися після теплової обробки м'яса. У роботі Jonker K.M. (2006 р.) було розроблено і оцінено підхід на основі методу ПЛР-РЧ, який дозволяв ідентифікувати в тестових сумішах яловичину, що зазнала термічної обробки, слідові кількості свинини, конини, баранини, курятини і індички. Рівень виявлення складав 0,05%, кросреактивності із іншими дикими та свійськими тваринами не було виявлено [174].

Крім ПЛР для виявлення видової приналежності тканин тварин у м'ясних продуктах використовується технологія біочипів. У роботі Azuka N. Iwobi (2010 р.) описуються порівняльні дослідження двох комерційних наборів CarnoCheck TestmmKit і MEATspecies LCD Array на основі чипів із ПЛР тест-системами з погляду чутливості, надійності, відтворюваності та простоти використання. Технологія біочипів добре себе показала, межа виявлення наборів перебувала у діапазоні від 0,1% до 0,5% для м'ясних сумішей, з гарною відтворюваністю результатів [175].

На сьогодні у лабораторіях ветеринарної медицини для контролю фальсифікатів м'ясної продукції використовують зареєстровані на території ЄС діагностикуми SureFood PREP AnimalX (R-Biopharm, Німеччина), First Cattle/Pig/Chicken/Horse PCR Kit (GEN-IAL, Німеччина) [162].

1.3. Молекулярно-генетичні методи оцінювання безпечності та якості продукції рослинного походження

Забезпечення населення якісним продовольством має актуальне значення, оскільки прямо або побічно впливає на демографічні, соціальні, політичні зміни, що відбуваються в державі, а також забезпечує стабільність і безпеку держави у взаємозалежному світі. Тому розробка та запровадження якісно нових, безпечних харчових продуктів, максимальне використання біологічних властивостей сировини і компонентів, які сприяють збереженню

здоров'я, є одним з найважливіших напрямків у сфері здорового харчування [176].

Аналіз якості харчової продукції, у тому числі і рослинного походження, є завданням непростим. Це пов'язано передусім з її багатокомпонентністю та індивідуальністю [177]. Порівняно недавно основна перевага під час оцінки якості харчової продукції надавалося сенсорним методам, заснованим на аналізі відчуттів органами почуттів людини (органолептичний метод) [178]. За останні десятиліття було розроблено безліч сучасних високоефективних методів визначення безпеки і якості харчової продукції, заснованих на застосуванні останніх наукових досягнень, зокрема, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕЖХ), газова хроматографія (ГХ), атомно-абсорбційна і атомно-емісійна спектрофотометрії, вольтамперометрія. Особливе місце займають методи, що опираються на досягнення молекулярної біології і генетики [179]. Так на сучасному етапі розвитку в області оцінки безпеки та якості продовольчої сировини і харчових продуктів найбільшого значення набувають високоточні, чутливі і специфічні методи досліджень, серед яких провідне місце займає метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЦР). Він широко застосовується під час визначення генетично модифікованих сільськогосподарських рослин (ГМО/ГМР), харчових алергенів рослинного походження, різного роду фальсифікацій харчової продукції шляхом додавання рослинних білків або олій [180].

1.3.1. Біотехнологічні сільськогосподарські культури, методи і підходи щодо діагностики ГМО (ГМР)

Протягом майже двох десятиліть, що пройшли з початку тисячоліття, світова потреба в продовольстві неухильно росте на тлі збільшення чисельності населення, рекордних урожаїв, підвищення рівня доходів і все більшої розмаїтості раціону харчування. Зростання виробництва продуктів харчування дещо відстає від стрімко зростаючого попиту на продовольство.

За оцінками ООН, смерть від голоду загрожує 10 % населення світу, а кількість людей, що страждає від хронічного недоїдання, постійно збільшувалася, починаючи з 2015 року і досягла 821 млн чоловік у 2018 році [181,182]. Глобальна фінансова криза 2008-2009 років завдала серйозного удару по продовольчій безпеці багатьох держав. Згідно даних Доповіді про продовольчу безпеку й харчування у світі за 2019 рік, у багатьох країнах із середнім доходом, що зазнали сповільнення економічного росту, збільшилася кількість голодуючих [183]. За постійного зменшення площ орних земель на особу та повторюваних економічних кризах у різних країнах збільшувати виробництво продовольства стає дедалі важче. Розвиток генетичної інженерії та створення за її допомогою генетично модифікованих (ГМ) сільськогосподарських культур відкриває нові можливості для виживання людини у змінюваних середовищних умовах та за збіднення біоресурсів. Потенціал сучасної молекулярної генетики та біотехнології в умовах світової економічної кризи є надзвичайно великим [184].

Науковим досягненням, зокрема генетичній інженерії, належить важлива роль на шляху вдосконалення сільськогосподарського виробництва. За своєю суттю генетична інженерія продовжує напрям традиційної селекції з поліпшення генотипу господарсько цінних рослин, але при цьому використовуються сучасні методи, які значно скорочують процес отримання рослин з заданими ознаками і властивостями [185].

Успішне використання методів генетичної інженерії в селекційно-генетичних роботах з поліпшення сільськогосподарських рослин залежить передусім від можливості ізолювання генів, що контролюють задані господарсько-корисні ознаки. Велика частина таких ознак успадковується полігенно. На сьогодні в різних галузях народного господарства використовують штами бактерій, грибів, дріжджів, клітинні лінії рослин і тварин, сорти рослин, отримані з використанням генно-інженерних прийомів. Змінені таким чином багатоклітинні організми називають «трансгенними» або генетично модифікованими. Трансгенні організми – це рослини, тварини,

риби, інші живі об'єкти, які мають у геномі генетичну інформацію, введену за допомогою методів генетичної трансформації. Поява трансгенних організмів пов'язана як з розвитком методів власне генетичної інженерії, технологій рекомбінантних ДНК, так і з розробленням методів введення реконструйованої ДНК в живі клітини і регенерації з них фізіологічно нормальних об'єктів. З моменту перших публікацій про одержання трансгенних еукаріотних організмів пройшло майже 40 років. Нині існує ряд міжконтинентальних комерційних фірм, основною метою яких є одержання трансгенних організмів з новими корисними властивостями [186,187].

Комерціалізація біотехнологічних сільськогосподарських культур / генетично модифікованих рослин (ГМР) відбувається вже майже 25 років. На 2018 р. генно-модифіковані культури вирощували у 26 країнах світу на площі 191,7 млн га. Це еквівалентно 12,8 % загальної світової площі під сільськогосподарськими культурами, яка становить 1,5 млрд га та приблизно у 113 разів більше порівняно з 1996 р. (1,7 млн га). Такі дані наводить галузева неурядова Міжнародна служба з моніторингу за застосуванням агробіотехнологій (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISAAA) [188].

З 26 країн, що культивували ГМ рослини у 2018 р., 21 належить до країн, що розвиваються та 5 до промислово-розвинених країн (рис. 1.2). В країнах, що розвиваються, розташовано 54% (103,5 млн. га) площ, відведених під біотехнологічні культури порівняно з 46% в промислових країнах. Ще 44 країни, з яких 26 - країни ЄС, офіційно імпортували біотехнологічні культури для виробництва харчової продукції, кормів або переробки. Таким чином, 68 країн світу в той або інший спосіб використовували біотехнологічні культури.

Найбільші посівні площі відведено під чотири основні біотехнологічні культури, а саме сою, кукурудзу, бавовник та ріпак. Біотехнологічна соя займає 78% від загальних посівних площ в світі, відведених під дану культуру. Відповідно біотехнологічний бавовник займає 76%, кукурудза 30%, ріпак 29%. Соеві боби вирощують на 95,9 млн га, що становить 50% від

загальної площі, відведеної під біотехнологічні культури у 26 країнах світу. Далі йдуть кукурудза (58,9 млн га), бавовник (24,9 млн га) та ріпак (10,1 млн га) (рис. 1.3). США була лідером з насаджень біотехнологічних культур у 2018 (75 млн га), далі Бразилія (51.3 млн га), Аргентина (23.9 млн га), Канада (12.7 млн га) та Індія (11.6 млн га) (табл. 1.3). Так, загальний обсяг біотехнологічних насаджень становив 174.5 млн га, що складає 91% загальної площі. Отже, культивування біотехнологічних культур принесло користь для більш ніж 1.95 білліона людей у п'яти країнах світу або 26% поточного світового населення у 7.7 білліонів.



Рис. 1.2. Культивування біотехнологічних культур у світі. Кольором позначено 26 країн, які у 2018 році вирощували ГМР.

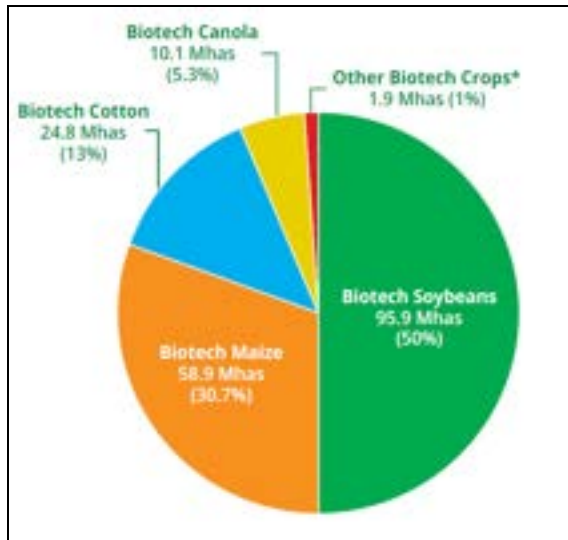


Рис. 1.3. Площі, на яких оброблялись основні ГМР у 2018 р. та їхній % від загальної площі, відведеної під біотехнологічні культури у світі. * До інших культур належать: цукровий буряк, картопля, яблука, сквош, папайя та баклажани.

Зростання на 4% площ, відведених під культури з комбінованим типом ознак, які зчеплені зі стійкістю до комах та гербіцидів (42% від загальної площі), є доказом дотримання фермерами практики розумного сільського господарства з використанням інсектицидів не у великій та не в зменшеній кількості. Гербіцидотолерантність у соєвих бобах, ріпакові, кукурудзі, люцерні, і бавовнику послідовно стає домінантною ознакою, котра у 2018 займала 46% загальної площі – зменшилась на 1% порівняно з 2017.

Таблиця 1.3

Світові площі, відведені під біотехнологічні / ГМ сільськогосподарські культури у світі у 2018 році [188]

№	Країни	Площі, млн га	Біотехнологічні культури
1	США	75,0	Кукурудза, соя, бавовник, ріпак, цукровий буряк, люцерна, папайя, сквош, картопля, яблука
2	Бразилія	51,3	Соя, кукурудза, бавовник, цукрова тростина
3	Аргентина	23,9	Соя, кукурудза, бавовник
4	Канада	12,7	Ріпак, кукурудза, соя, цукровий буряк, люцерна, картопля
5	Індія	11,6	Бавовник
6	Парагвай	3,8	Соя, кукурудза, бавовник
7	Китай	2,9	Бавовник, папайя
8	Пакистан	2,8	Бавовник
9	Південна Африка	2,7	Кукурудза, соя, бавовник,
10	Болівія	1,3	Соя
11	Уругвай	1,3	Соя, кукурудза

12	Австралія	0,8	Ріпак, бавовник
13	Філіппіни	0,6	Кукурудза
14	М'янма	0,3	Бавовник
15	Судан	0,2	Бавовник
16	Мексика	0,2	Бавовник
17	Іспанія	0,1	Кукурудза
18	Колумбія	0,1	Кукурудза, бавовник
19	В'єтнам	< 0,1	Кукурудза
20	Гондурас	< 0,1	Кукурудза
21	Чилі	< 0,1	Кукурудза, ріпак, соя
22	Португалія	< 0,1	Кукурудза
23	Бангладеш	< 0,1	Баклажани
24	Коста-Ріка	< 0,1	Бавовник, соя
25	Індонезія	< 0,1	цукрова тростина
26	Есватіні	< 0,1	Бавовник
	Всього	191,7	

Переважає більшість оброблюваних у світі біотехнологічних культур представлена ГМО першого покоління, які характеризуються стійкістю до гербіцидів, комах, вірусів. Перше покоління ГМ рослин було створене для того, щоб підвищити якість та ефективність сільськогосподарського виробництва [189,190]. На сьогодні вже розроблені та починають запроваджуватися ГМО другого покоління, які безпосередньо споживаються людьми у вигляді продуктів харчування. До другого покоління ГМ рослин належать рослини із вбудованими вакцинами і вітамінами, які повинні насамперед сприяти покращенню здоров'я людини (ГМ дерева, фрукти та овочі із затримкою дозрівання та збільшеним терміном зберігання, амілопектинова картопля Amflora, «золотий рис»). Проте як і у випадку з першим поколінням ГМО, дослідники з тривогою намагаються визначити чи є результати їхніх досліджень безпечними для людей та навколишнього середовища [191,192]. Сьогодні у біотехнологічних лабораторіях ведуться активні роботи щодо розробки ГМО третього покоління. За прогнозами, культури третього покоління, крім наведених вище характеристик, матимуть змінені час квітання і плодоношення, розміри, форму і кількість плодів, підвищену ефективність фотосинтезу, вироблятимуть речовини з

підвищеним рівнем асимілювання, а також фармацевтичні матеріали (гормони зростання, чинники згортання крові, індустриальні ензими, людські антитіла, контрацептивні білки, що пригнічують імунітет, цитокіни і таке інше) [193].

Однак незважаючи на вже існуючі досягнення та багатообіцяючі перспективи на майбутнє, існує й цілий ряд ризиків та побоювань щодо безпеки використання ГМО. Такі ризики можна поділити на три основні групи: харчові, що пов'язані з небезпекою використання ГМО у продуктах харчування; екологічні, пов'язані з небезпеками впливу трансгенних рослин на довкілля та соціально-економічні – руйнування національної системи насінництва по стратегічно важливих культурах [194-196]. Оскільки вірогідність появи будь-яких наслідків залежить від масштабів та тривалості використання, у багатьох країнах світу здійснюється контроль за обігом ГМО, який передбачає реєстрацію нових ГМО, пост-реєстраційний контроль та маркування харчових продуктів, виготовлених за їх допомогою [197-202].

Україна нині посідає провідні позиції в світі як виробник та експортер зернових культур, а також має великий потенціал розвитку виробництва харчової продукції. Вкрай важливим та актуальним є створення ефективної та прозорої системи регулювання обігу та використання ГМО в країні. Чинне законодавство України у цій галузі є досить об'ємним, таким що відповідає міжнародним стандартам, але водночас недосконалим і тому потребує значного доопрацювання [203,204].

Регулювання використання ГМО в Україні забезпечує низка законодавчих актів, основними серед яких є закони: «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про захист прав споживачів», «Про дитяче харчування», «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини», «Про основні засади (стратегію) державної екологічної політики України на період до 2030 року» [205-209].

Крім законів існує низка Постанов Кабінету Міністрів щодо генно-інженерної діяльності та ГМО, зокрема «Про затвердження тимчасових критеріїв безпеки поводження з генетично модифікованими організмами та провадження генетично-інженерної діяльності у замкненій системі», «Про затвердження Порядку видачі дозволу на ввезення на митну територію України незареєстрованих генетично модифікованих організмів для науково-дослідних цілей або державних апробацій (випробувань)», «Про затвердження Порядку видачі дозволу на транзитне переміщення незареєстрованих в Україні генетично модифікованих організмів», «Про затвердження Порядку видачі дозволу на проведення державної апробації (випробування) генетично модифікованих організмів у відкритій системі», «Про затвердження Порядку державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням», «Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг» [210-215].

Відповідно до останньої постанови, етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми обсягом понад 0,9 відсотка або вироблені із сільськогосподарської продукції, вміст генетично модифікованих організмів у якій становить понад 0,9 відсотка, має проводитись їх виробником (постачальником) із зазначенням відповідної інформації. Етикетування харчових продуктів, які не містять генетично модифіковані організми або вміст яких становить менш як 0,1 відсотка може бути здійснено добровільно з виконанням напису «Без ГМО».

Натепер в Україні затверджено серію національних стандартів ДСТУ ISO (табл. 1.4), які регламентують загальні вимоги до випробувальних та калібрувальних лабораторій, обладнання та методів визначення генетично модифікованих організмів, їх похідних та продуктів з їхнім вмістом [216].

Відповідно до Закону України № 1778-VI Про внесення змін до Закону

України «Про безпечність та якість харчових продуктів» щодо інформування громадян про наявність у харчових продуктах генетично модифікованих організмів (ГМО), який набрав чинності 30.12.2009 р., в Україні введено обов'язкове маркування продукції щодо вмісту або відсутності ГМО. Однак відповідно до Регламентів (ЄС) № 1829/2003, № 1830/2003 Європейського Парламенту і Ради від 22.09.2003 «Про генетично модифіковані продукти харчування і корми» та «Про можливості контролю та етикетування генетично модифікованих харчових продуктів та кормів», обов'язковому маркуванню підлягають лише ті харчові продукти, які виготовляються з ГМ сировини рослинного походження, або містять інгредієнти, що виробляються з ГМ-сировини [217]. З метою недопущення невиправданих витрат суб'єктів господарювання та приведення національного законодавства у відповідність з європейським, Міністерством економічного розвитку і торгівлі разом з Міністерством охорони здоров'я було розроблено та затверджено «Перелік харчових продуктів, щодо яких здійснюється контроль вмісту генетично модифікованих організмів» (Додаток А), який набрав чинності 30.12.2010 р. [218,219].

Таблиця 1.4

Нормативна документація щодо визначення ГМО [220-230]

№	Позначення	Назва	Стан документа
1	ДСТУ ISO/IEC 17025:2006	Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (ISO/IEC 17025:2005, IDT)	чинний
2	ДСТУ ISO 24276:2008	Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Основні вимоги, терміни та визначення понять (ISO 24276:2006, IDT)	чинний
3	ДСТУ-П CEN/TS 15568:2008	Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Відбирання проб (CEN/TS 15568:2006, IDT)	скасовано
4	ДСТУ ISO 13690:2003	Зернові, бобові та продукти їхнього помелу. Відбирання проб (ISO 13690:1999, IDT)	чинний
5	ДСТУ 5021.1:2008	Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Частина 1. Методи відбирання та правила готування проб.	чинний
6	ДСТУ 5021.2:2008	Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Частина 2. Метод визначення генетично модифікованих організмів.	чинний

7	ДСТУ ISO 21572:2006	Продукти харчові. Методи аналізу для визначення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів. Методи, які ґрунтуються на аналізі білків (ISO 21572:2004, IDT)	чинний
8	ДСТУ ISO/TS 21098:2009	Продукти харчові. Методи виявлення ГМО і продуктів з їхнім вмістом. Додаткові процедури та інформація щодо методів аналізування на основі нуклеїнової кислоти, описаних в ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571 (ISO/TS 21098:2005, IDT)	чинний
9	ДСТУ ISO 21571:2008	Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстракція нуклеїнової кислоти (ISO21571:2005, IDT)	чинний
10	ДСТУ ISO 21569:2008	Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти (ISO 21569:2005, IDT)	чинний
11	ДСТУ ISO 21570:2008	Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти (ISO 21570:2005, IDT)	чинний
12	ДСТУ ISO/TS 21098:2009	Харчові продукти. Методи аналізу по визначенню генетично модифікованих організмів та похідних продуктів, створені на основі аналізу нуклеїнових кислот. Доповнення до стандартів ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571, IDT	чинний
13	ДСТУ 6056:2008	Буряки. Метод визначення живих змінених організмів у насіннєвому та рослинному матеріалі з використанням полімеразної ланцюгової реакції	чинний
14	ДСТУ 5021:2008	Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Ч.1. Методи відбирання та правила готування проб	чинний
15	ДСТУ 5021:2008	Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Ч.2. Метод визначення генетично модифікованих організмів	чинний

Основою будь-якої технології виявлення ГМО є використання відмінностей між немодифікованими сортами рослин та генетично зміненими (трансгенними) аналогами, що може здійснюватись шляхом детекції нової ДНК, яку було введено шляхом біотехнологічних маніпуляцій, або *de novo* експресованого білка [231].

Затвердження нового методу аналізу є важливим етапом як для випробувальних лабораторій, так і для контролюючих організацій. В ідеалі, кожен метод повинен бути апробований певною кількістю лабораторій з висококваліфікованим персоналом для підтвердження його відтворюваності та повторюваності, встановлення чутливості та одержання специфічного

результату. Об'єднаний науковий центр Європейської Комісії (Joint Research Centre, JRC) першим затвердив метод ELISA для аналізу сільсько-господарської сировини на вміст біотехнологічної сої Roundup Ready® та метод ПЛР для визначення сої Roundup Ready® і кукурудзи лінії Bt-176 як у сировині, так і в харчових продуктах, що зазнали термічної обробки [232-234]. З того часу перелік розроблених та затверджених методів та підходів щодо визначення ГМО значно розширився завдяки постійному конструюванню і впровадженню дедалі нових біотехнологічних ліній та культур.

Одним із критичних моментів під час виявлення ГМО та визначення його кількісного вмісту як для методів на основі ДНК-аналізу, так і аналізу білків, є пробопідготовка зразків. При цьому важливо враховувати не тільки обмеження кожного з етапів пробопідготовки, але й специфіку аналізу. Також на кінцевий результат суттєво впливає розмір зразка та процедура його відбору. Не менш важливим етапом розроблення методів визначення ГМО на основі ДНК-аналізу є оптимізація процедури екстракції ДНК. Це пов'язано передусім з тим, що по-перше, зразки харчової продукції містять достатньо високу кількість інгібуючих агентів, а по-друге, переважна більшість з них зазнає термічної обробки [235-239].

Сьогодні існує низка підходів щодо визначення трансгенних організмів, однак найпоширенішими є два, зокрема імуноферментний метод та метод полімеразної ланцюгової реакції. Імуноферментний метод (ІФА, ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay) включає тестування на присутність специфічних білків з використанням специфічного зв'язування між експресованим антигеном та антитілом. Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR – Polymerase chain reaction) оснований на детекції послідовностей ДНК, введених у дану культурну рослину. Ці методи можуть бути використані як для проведення якісного аналізу, показуючи наявність або відсутність ГМО, так і для визначення кількісного (відсоткового) вмісту ГМО у досліджуваному зразку [240,241].

У методах тестування, основаних на аналізі білків, використовують специфічну реакцію антиген-антитіло, яка дає змогу визначати бажаний білок. За допомогою методу ІФА можна не тільки виявляти білок, але й вимірювати його кількісний йміст у досліджуваному зразку, який містить безліч інших білків. У методі ІФА використовують одне антитіло для зв'язування специфічного білка, інше антитіло – для посилення ефекту детекції (необов'язковий етап), а також антитіло, кон'юговане з ферментом, продукт якого дає забарвлення, що забезпечує візуалізацію присутності білка та можливість його кількісного визначення. Кількісне визначення здійснюється за рахунок порівняння інтенсивності забарвлення досліджуваного зразку з інтенсивністю забарвлення калібрувальної кривої, побудованої за стандартними зразками.

Імуноферментний метод вимагає наявності навченого персоналу, спеціального устаткування та ретельного виконання всієї процедури тесту. Це метод середньої складності, тривалість аналізу становить від 2 до 8 годин. Порівняно з методами ДНК-аналізу метод ELISA характеризується меншою чутливістю і водночас меншою здатністю до хибно-позитивних результатів, що виникають завдяки низьким концентраціям домішок. Розроблення та виробництво тест-систем на основі методу ELISA є більш витратним за рахунок одержання нових антитіл та стандартів білків, але в подальшому собівартість одного аналізу є нижчою порівняно з методом ПЛР. До недоліків цього методу можна віднести неможливість розпізнавання різних моделей експресії та видів трансгенних подій, які характеризуються експресією білків, близьких за характеристиками. Тестування методом ELISA є практичною та ефективною процедурою, коли йдеться про визначення цільового білка. Однак у деяких випадках продукт трансгена може продукуватися тільки на певних стадіях розвитку, або в певних частинах рослини, і тоді за допомогою методу ELISA визначити ГМО досить складно. Крім того, білки легко руйнуються під впливом високої температури та тиску, що робить досить проблематичним, а часом просто

неможливим, застосування методу ELISA для визначення ГМО в харчовій продукції, що зазнала термічної обробки [242].

Аналітичні методи, основані на технології ПЛР, дедалі більше застосовують для детекції послідовностей ДНК, пов'язаних з ГМО. Метод ПЛР дає можливість селективно ампліфікувати (множити) специфічні ділянки ДНК, які представлені в невеликій кількості в складній суміші інших послідовностей ДНК. Отримані фрагменти ДНК (амплікони) піддаються подальшому дослідженню за допомогою гелі-електрофорезу або детектора випромінювання флуоресценції у випадку ПЛР у реальному часі для виявлення присутності бажаної послідовності. Розроблено численні методи на основі ПЛР, які можуть виявляти та визначати кількісний вміст ГМО в харчових продуктах та сировині рослинного походження. Крім того, визначення генетичної ідентичності дає змогу використовувати даний метод для сегрегації та відстеження просування ГМ-культур ланцюгом «від лану до столу» [243].

Передумовами виявлення ГМО методом ПЛР є знання про тип генетичної модифікації, включаючи молекулярні модифікації введеного гена, а також про використані регуляторні елементи (промотори, термінатори, енхансери). Для аналізу необхідна наявність мінімальної кількості зразка, що містить інтактну ДНК, яка несе цільовий ген.

ПЛР є лабораторною методикою, яка вимагає наявності кваліфікованого персоналу та спеціалізованого устаткування. До ключових характеристик ПЛР-діагностики можна віднести високу чутливість та специфічність, здатність визначення навіть однієї копії гена в генетичному матеріалі цілого організму. Така висока чутливість водночас має свої недоліки, оскільки може призводити до отримання хибно-негативних результатів [241,244]. Даний метод не вимагає тривалої підготовки реагентів порівняно з імунологічним методом аналізу. Аналіз зразків займає приблизно один-два дні. Метод ПЛР дає змогу розрізняти різні типи генетичних

модифікацій (трансформаційних подій) та встановлювати кількісний вміст ГМО у досліджуваному зразку.

Зазначене вище засвідчує той факт, що в практиці визначення ГМО обидва методи – ELISA і ПЛР – доцільно розглядати як ті, що доповнюють один одного, а не взаємовиключають (табл. 1.5).

Таблиця 1.5

Результати порівняння методів ELISA і ПЛР

Метод	Мішень	Час	Складність	Можливості
ELISA	білок	2-8 годин	Середня складність, вимагає навичок роботи у лабораторії	Підтверджує наявність специфічних генетичних модифікацій і визначає відсоток ГМО в зразку, що аналізувався; придатний для матриць, що не зазнали термічної обробки
ПЛР	ДНК	1-3 дні	Висока складність, вимагає додаткового навчання та знання спеціалізованого устаткування	Високочутливий метод; дозволяє проводити скринінговий аналіз за елементами трансгенних конструктів, визначати трансформаційні події та здійснювати кількісний аналіз; придатний для всіх типів матриць

1.3.2. Проблема харчових алергенів та методи ідентифікації глютену

Харчовою алергією називають несприятливу реакцію імунної системи організму на харчові продукти. Реакції непереносимості харчових продуктів періодично зустрічаються майже у кожної людини, але вперше найчастіше вони проявляються у дитинстві. В останні десятиліття відзначається зростання рівня реакцій непереносимості харчових продуктів, а також посилення ступеня їхньої важкості. Складність проблеми полягає ще й у тому, що в процесі виникнення такої непереносимості можуть бути задіяні

різні механізми, як імунологічно обумовлені (харчова алергія), так і не імунологічні (харчова непереносимість). Клінічні симптоми харчових алергій варіюються між легким дискомфортом і серйозними або навіть загрозливими для життя реакціями, які вимагають негайного медичного втручання. Симптоми можуть проявлятися на шкірі, у шлунково-кишковому тракті, у дихальних шляхах, в очах та в серцево-судинній системі [245].

Реакції підвищеної чутливості до харчових продуктів відомі з давніх часів. Уперше важкі реакції у вигляді шлунково-кишкових і шкірних проявів після вживання коров'ячого молока описав ще Гіппократ. Гален уперше повідомив про алергічно-подібні реакції в дітей після вживання козячого молока. Починаючи з сімнадцятого століття, кількість спостережень важких побічних реакцій на їжу (приступи задухи після вживання риби, шкірні висипи після вживання яєць або морепродуктів) постійно зростала. У 1901-1902 р. французький вчений Ch.R. Richet з колегами вперше описав харчову анафілаксію, а в 1911 р. було опубліковано монографію «Харчова анафілаксія». Істотний внесок у розуміння проблеми харчової алергії на початку 1930-х рр. вніс американський дослідник А.Н. Rowe, позначивши її як найважливішу медичну проблему. Сам термін «алергія» був запропонований в 1906 році австрійським педіатром С.Р. Pirquet для позначення незвичайної, зміненої реакції деяких дітей на введення з лікувальною метою протидифтерійної сироватки [246,247].

До алергії відносять імунні реакції (реакції гіперчутливості I типу), при яких в організмі людини виробляються антитіла (імуноглобуліни класу E, Ig E) на специфічні білки. Коли ці речовини приводять до гіперчутливості організму, вони називаються алергенами. В залежності від будови алергени поділяють на повні і неповні (гаптени). Гаптен стає антигеном тільки після з'єднання з білками тканин організму (метаболіти ліків, прості хімічні речовини) [248]. Існують різні класифікації специфічних алергічних реакцій. Найбільшого поширення набула класифікація, запропонована у 1947 р. R.A. Cooke, в якій виділено алергічні реакції негайного і уповільненого типу. В

основу класифікації покладено час появи реакції після контакту з алергеном. Реакції негайного типу розвиваються протягом 15–20 хв, уповільненого типу – через 1-2 доби [249]. Ця класифікація, однак, не охоплює всієї різноманітності проявів алергії. Тому відмінності між алергічними реакціями стали пов'язувати з різними механізмами їх розвитку.

З числа існуючих класифікацій найбільшого поширення набула запропонована в 1968 р P.G. Gell і R.R.A. Coombs [250]. Відповідно до неї виділяють 5 типів алергічних реакцій (анафілактичну, цитотоксичну, імунокомплексну, уповільнену гіперчутливість та стимулюючу). Кожен із цих типів має особливий імунний механізм і властивий йому набір медіаторів, що визначає клініку захворювання.

За своєю природою алергени найчастіше є білками, білково-полісахаридними або білково-ліпоїдними комплексами (сироваткові, тканинні, бактеріальні алергени), складними сполуками небілкової природи (полісахариди, полісахаридно-ліпоїдні комплекси, алерген домашнього пилу, бактеріальні алергени), простими хімічними речовинами, в тому числі окремими елементами (бром, йод, хром, нікель). За класифікацією А.Д. Адо (1970) залежно від походження розрізняють екзо- і ендоеалергени [251].

У 2003 р. Всесвітня організація з алергії (World Allergy Organization, WAO) запропонувала переглянуту номенклатуру алергійних і алергоподібних реакцій [252]. Відповідно до цих змін, негативну нетоксичну реакцію на харчові продукти почали називати харчовою гіперсенситивністю. Термін «харчова алергія» почали використовувати у випадку встановлення імунологічного характеру перебігу реакції. Харчова алергія далі конкретизується залежно від того чи причетні до включення імунологічного механізму антитіла IgE чи ні. Інші види реакцій на харчові продукти, які раніше мали назву «харчова непереносимість», стали називати неалергічною харчовою гіперсенситивністю.

Згідно даних Міжнародної мережі органів з безпеки харчових продуктів (INFOSAN) харчову алергію можуть викликати більше ніж 70

продуктів. Найбільш вираженою алергенною активністю характеризуються харчові продукти білкового походження (тваринні і рослинні білки), однак будь-яка їжа здатна викликати алергійну реакцію у чутливих людей. Виділяють три групи харчових алергенів: харчові алергени тваринного походження, харчові алергени рослинного походження, харчові добавки і домішки. Але переважну більшість алергійних реакцій серед дорослого населення викликають фрукти, овочі і горіхи, зокрема арахіс. Особи, що страждають на алергію, викликану квітковим пилом або латексом, часто відчують алергічні симптоми під час вживання певних фруктів, овочів або горіхів. У Європі та США арахіс та інші горіхи вважаються харчовими продуктами, які найчастіше призводять до загрозливих для життя реакцій [253].

Комітетом з маркування харчових продуктів Комісії *Кодекс Аліментаріус* було підготовлено та видано перелік харчових продуктів і інгредієнтів, що викликають найбільш гострі реакції та більшість випадків харчової гіперсенситивності [254]. У розділі 4.2.1.4 Загальних стандартів по маркуванню розфасованих продуктів харчування наведено перелік харчових продуктів і інгредієнтів, які завжди повинні вказуватися:

- зернові продукти, що містять глютен (пшениця, жито, ячмінь, овес, пшениця-спельта або їхні гібридні різновиди, а також продукти з них);
- ракоподібні і молюски, а також продукти з них;
- яйця і яєчні продукти;
- риба, а також продукти з риби;
- арахіс, соя, а також продукти з них;
- молоко і молочні продукти (включаючи лактозу);
- лісові горіхи, а також продукти з горіхів;
- сульфіді в концентрації 10 мг/кг або більше.

Але слід зазначити, що поширеність харчових алергій варіюється в різних географічних регіонах. Деякі країни доповнили міжнародний перелік регіональними харчовими продуктами і інгредієнтами. Так, наприклад,

країни ЄС доповнили список селерою, гірчицею та насінням сезаму.

За допомогою експериментальних досліджень харчових продуктів на алергенність, отримана певна інформація щодо кількісної характеристики алергенів, які можуть викликати несприятливу реакцію у людини. Як правило, дози алергенів варіюювали від ста мкг до грамів [255].

На сьогодні немає точних даних щодо поширеності харчової алергії. Це обумовлено безліччю причин, серед яких відсутність єдиних підходів до діагностики та уніфікованої класифікації, наявність в харчових продуктах великої кількості потенційних алергенів, прихованих харчових алергенів (у вигляді харчових добавок), вживання генетично модифікованих продуктів та інше. За деякими оцінками, поширеність харчових алергій становить приблизно 1-3% серед дорослого населення та 4-6% серед дітей [253]. Згідно з даними вітчизняної літератури, в Україні на алергію страждає більше 10 млн осіб, що складає 20-30% [256].

Серед алергенів далеко не останнє місце посідають злакові культури. За ступенем зростання алергенності злакові культури умовно можна розподілити наступним чином: рис, овес, ячмінь, жито, пшениця. Алергічні реакції викликають білки зернових культур, а саме глютен пшениці та жита, гордеїн ячменю, авенін вівсу, зеїн кукурудзи, *ory s1* рису. Доволі часто може зустрічатися перехресна алергія на декілька видів злакових культур та пилок польових трав (тимофіївка, костриця, грястиця), оскільки вони мають схожі за структурою білки. Алергія до пшениці та жита може проявлятися симптомами, які характерні як для алергії на пилок, так і реакціями з боку кишково-травного тракту, а часом навіть розвитком анафілаксії. Анафілактичний шок здатен викликати ω -5 гліадин жита.

Людям з алергією до пшениці варто бути уважними при виборі продуктів харчування та лікарських препаратів. Алергія до пшеничного і житнього борошна є професійним захворюванням працівників хлібопекарських виробництв, а також людей які працюють з кормами для тварин (атопічна астма). Ячмінь має перехресну реакцію із пшеницею, житом

і вівсом. У країнах Азії, де провідною зерновою культурою є рис, спостерігається й найвища частота алергії на нього. Серед дорослого населення алергія на рис поширена ширше, ніж у дітей, і проявляється atopічним дерматитом, астмою, ринітом та екземою. Для рису описано більше 10 алергенних білків, тому не дивно, що він здатен викликати не тільки харчову, але й респіраторну алергію [257,258].

Однак крім справжньої харчової алергії, злакові культури здатні викликати харчову непереносимість – реакцію травної системи на певні компоненти харчових продуктів, які мають подразнювальну дію, порушують травлення та всмоктування їжі через стінки тонкого кишечника. Непереносимість глютену злакових культур одержала назву «целиакія» [259,260]. Таким чином целиакія (глютеніт ентеропатія) – це аутоімунне спадково обумовлене захворювання, яке характеризується неприйнятністю глютену таких злакових культур як пшениця, жито, ячмінь та, меншою мірою, овес, з розвитком гіперрегенераторної атрофії слизової оболонки тонкої кишки та пов'язаним з цим синдромом мальабсорбції [261].

Слід зазначити, що на сьогодні під діагнозом алергії до глютену розуміють три захворювання: справжню алергію до глютену (40%), целиакію (20%), їхнє сполучення (20%), чутливість до глютену (20%).

Ще донедавна целиакію вважали рідкісним захворюванням з частотою зустрічання 1 : 5 000 – 10 000. Однак широке впровадження у практику лабораторної діагностики методу визначення антигліадинових антитіл суттєво змінило уяву щодо поширення цього захворювання. За даними ВООЗ, у різних країнах світу целиакія зустрічається з частотою від 1 : 80 до 1 : 300, кількість хворих на неї в світі коливається в межах 0,5–1% [262]. Безпосередньо в країнах Європейського Союзу, де діагностування целиакії є найефективнішим у світі, це співвідношення знаходиться на рівні від 1:5 до 1:13 у різних країнах. При цьому співвідношення хворих на целиакію жінок і чоловіків становить 2:1 [263,264].

У нашій країні до 2003 р. діагностувати це захворювання було

практично неможливо, тому статистичні дані щодо захворюваності на целиацію відсутні. Нині в Україні діагностовано близько 2500 хворих на целиацію, 1500 з яких діти. Згідно з даними Української Спілки Целиакії, загальна кількість хворих може сягати до 400-500 тис. осіб [265,266].

Сьогодні доступними є декілька технологій якісного та кількісного визначення присутності глютену в харчовій продукції: тести з використанням специфічних антитіл, наприклад імуноферментний аналіз (ІФА), горизонтальний проточний імуноаналіз, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), мас-спектрометрія [267]. Під час розроблення аналітичних діагностиків, особливо імунологічного спрямування, звертають увагу на те, щоб виявляти епітопи, які беруть участь у розвитку целиакії. Клейковина являє собою складну суміш білків, які присутні в широкому діапазоні матриць як термічно оброблених, так і необроблених харчових продуктів, і цей факт додає проблем під час розроблення кількісних методів визначення глютену та підбору відповідного стандартного зразку. В 1985 році в Європі було засновано робочу групу з проламінів (PWG), одним із завдань якої було розроблення стандартів глютену і, відповідно, гліадину [268]. Даний стандарт було отримано шляхом виділення гліадинів із найпоширеніших сортів пшениці. Інститут стандартних матеріалів і вимірів (IRMM) затвердив гліадиновий стандарт PWG як сертифікований референтний матеріал. Пізніше рішення IRMM було відкликано, однак гліадин, розроблений PWG, і нині залишається єдиним стандартним матеріалом, що одержав визнання і широко використовувався під час калібрування тест-систем.

Імуноферментний аналіз (ІФА) – рекомендований метод для визначення глютену в їжі. Сьогодні існує велика кількість комерційних наборів на основі ІФА. В імунологічних методах застосовуються антитіла, що підібрані до різних проламінових фракцій або специфічних послідовностей, які спричиняють несприйнятність глютену людиною. Різні тест-набори не завжди дають однакові результати з низки причин. До них можна віднести різні індивідуальні особливості поліклональних і

моноклональних антитіл, різні методи екстракції білків, а також різні калібратори тестів.

В 80-х роках Скеррітт одержав моноклональні антитіла, здатні розпізнавати високомолекулярні глютенінові субодиниці і термостабільні субфракції, які називаються омега-гліадинами. Це дало змогу проводити аналіз оброблених харчових продуктів. Однак ця система мала свої недоліки, серед яких відсутність можливості здійснення точного кількісного аналізу та слабка відповідь на гордеїни. Також моноклональні антитіла для виявлення глютену (R5) було отримано в лабораторії Мендеса в Іспанії [269]. Антитіла R5 було індуковано до секаліну жита (розпізнає пентапептид QQPFP), однак вони показували сильну перехресну реактивність з гліадином пшениці. Крім того, вони розпізнавали білки сої та люпину.

Зміна напряму пошуку від виявлення проламінів до виявлення імунотоксичних пептидів, що беруть участь у патогенезі целиакії, сприяло створенню нового покоління антитіл [270]. Так, у складі альфа-2-гліадину було ідентифіковано пептид 33-мер, що робить основний внесок в імунотоксичність клейковини. Цей токсичний фрагмент було ідентифіковано в Стенфордському університеті й описано в журналі Science в 2002 році [271]. На підставі отриманих результатів було індуковано антитіло G12, що розпізнає гексапептидну послідовність QRQLPY і подібні пептиди, виявлені в ячмені, житі та вівсі. На відміну від R5, антитіло G12 специфічно націлене на токсичний фрагмент, що запускає аутоімунні реакції у хворих на целиакію. G12 не дає хибнопозитивних результатів з соєю і, отже, підходить для визначення глютену в продуктах, що містять сою. Не спостерігається також перехресної реактивності з кукурудзою та рисом [272]. Дотепер немає однозначної думки щодо безпеки вживання вівса хворими на целиакію [273]. У ряді робіт показано, що деякі сорти вівса можуть викликати аутоімунні реакції у хворих. Антитіло G12 може бути використане для виявлення сортів вівса з низьким вмістом клейковини та, відповідно, більш безпечних для людей, що знаходяться у групі ризику.

На сьогоднішній день існує ціла низка комерційних ІФА-наборів, здатних з великою специфічністю визначати глютен в харчовій продукції, серед яких AgraQuant[®] Gluten G12 (RomerLabs[®]), RIDASCREEN[®] Gliadin (R-Biopharm) та інші [274,275].

Крім імунологічного методу виявлення глютену, дедалі більшої популярності набуває молекулярно-генетичний метод на основі ПЛР-аналізу. У літературі описано метод напівкількісної ПЛР [276] та SYBR[®] Green-технологія методу ПЛР у реальному часі, які було використано під час визначення вмісту глютену у харчовій продукції [277]. Dahinden I. et al. (2001) запропонували метод кількісної конкурентної ПЛР (QC-PCR), який можна використовувати для перевірки безглютенової їжі на присутність контамінації злаковими культурами, що викликають целиакію. Дана система дозволяє одночасно детектувати ДНК пшениці, ячменю та жита шляхом визначення ділянки некодуючої області хлоропластного гену *trnL* [278]. Використання специфічних флуоресційних проб у ПЛР-РЧ-системах дає змогу проводити одночасно ампліфікацію і детекцію як цільової послідовності, так і послідовності внутрішнього контролю перебігу ПЛР. Останній підхід має суттєві переваги, оскільки зменшує ризики щодо контамінації реакційної суміші та надає можливості для створення системи кількісного аналізу вмісту глютену завдяки наявності специфічної проби. Крім того, ПЛР-РЧ системи з *TaqMan* пробами відповідають вимогам нових розроблених стандартів щодо аналізу харчової продукції молекулярно-генетичними методами та проведення процедур верифікації ПЛР результатів [279]. Hernaandez M. et al. (2005) розробили чотири незалежні *TaqMan* ПЛР-РЧ системи для ідентифікації та кількісної оцінки таких культур як ячмінь, рис, соняшник та пшениця. В якості мішеней було використано гени *γ-hordein*, *gos9*, *helianthinin* та *acetyl-CoA carboxylase*, відповідно. Межі детектування та кількісного визначення для ячменю, соняшнику і пшениці становили по 1 геномній копії та 10 геномних копій відповідно, для рису - 3,3 геномних копії та 100 гаплоїдних геномів відповідно [280]. З 2013 р. фірма R-

Biopharm (Німеччина) розпочинає виробництво лінійки комерційних наборів SureFood® Алерген для визначення харчових алергенів, зокрема глютену (SureFood® ALLERGEN QUANT Gluten) за допомогою *TaqMan*-технології ПЛР-РЧ. Набір дозволяє кількісно визначати від 1 до 400 мг алергенної речовини / кг харчового продукту. Межа детектування набору становить $\leq 0,4$ мг / кг, межа кількісного визначення - 1 мг / кг, та залежить певною мірою від матриці зразку, типу обробки, підготовки зразків ДНК та вмісту ДНК [281].

1.4. Методи молекулярно-генетичної ідентифікації мікроорганізмів у харчовій продукції

Проблема поширення хвороб харчового походження, що викликаються мікроорганізмами, є актуальною як у країнах з високим, так і з низьким рівнем доходу. За даними ВООЗ, щороку в світі через вживання в їжу контамінованої харчової продукції потерпає кожна десята людина, близько 420 тис. з них вмирає [282].

Більше половини світового «тягаря» хвороб харчового походження припадає на діарейні хвороби, від яких потерпає близько 550 мільйонів людей щороку, з них 230 тис. з летальними наслідками. У зоні особливої небезпеки залишаються діти. Діарейні хвороби, як правило, є наслідком вживання сирих або недостатньо оброблених м'ясних і молочних продуктів, яєць та свіжих овочів, вражених норовірусом, кампілобактером, нетифоїдною сальмонелою і патогенною кишковою паличкою. Також небезпеку при вживанні неякісної їжі представляють тифоїдна лихоманка, гепатит А, свинячий солітер і афлатоксин, що виробляється пліснявим грибом під час неправильного зберігання зернових продуктів [283-285].

Хвороби харчового походження, викликані інфекційними збудниками, характеризуються як короткостроковими симптомами (нудота, блювання, діарея), так можуть призводити і до довгострокових наслідків, серед яких

онкологія, ниркова або печінкова недостатність, враження мізкової тканини, неврологічні розлади. Ці захворювання, як правило, мають більш серйозні наслідки для дітей, вагітних жінок, людей похилого віку та людей з ослабленою імунною системою. Діти, що перенесли деякі більш важкі форми захворювань, можуть страждати на затримку фізичного та розумового розвитку [286].

ВООЗ наголошує, що безпека харчової продукції належить до рівня загальної відповідальності і підкреслює необхідність посилення заходів щодо більш жорсткого контролю з боку урядів, харчової промисловості та окремих людей для забезпечення безпеки харчових продуктів і попередження хвороб харчового походження. Актуальною є діяльність з просвітницької роботи серед виробників харчової продукції, постачальників, посередників і широкої публічності в сфері профілактики хвороб харчового походження. ВООЗ тісно співпрацює з урядами країн над розробкою і реалізацією стратегій і політики в сфері безпеки харчової продукції, що, в свою чергу, має забезпечити позитивний вплив на дану проблему на світовому ринку [287,288].

Харчові інфекції та харчові отруєння викликають деякі мікроорганізми або продукти їхньої життєдіяльності. На відміну від харчових інфекцій, харчові отруєння не передаються від людини людині. Для запобігання захворюванням, викликаним харчовими інфекціями, встановлено певні нормативи, які передбачають контроль за окремими групами мікроорганізмів. Відповідно до СанПіН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» нормуються показники за п'ятьма групами мікроорганізмів: санітарно-показовим, умовно-патогенним, патогенним, збудникам псування та мікроорганізмам заквасочної мікрофлори та пробіотичним [289,290].

Безпека продукту визначається відсутністю патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, а також мінімальною кількістю збудників псування. Найбільшу небезпеку представляють сальмонели, патогенні стафілококи, лістерії та ентеропатогенні бактерії групи кишкових паличок.

Одне з головних завдань з досягнення безпеки та високої якості харчових продуктів - попередження бактеріального забруднення і наступного масивного розвитку в ньому патогенних мікроорганізмів. Мікроорганізми повторного обсіменіння можуть потрапляти у продукт із устаткування, пакувальних матеріалів, з води, повітря.

Санітарно-показові мікроорганізми. Мезофільні аеробні і факультативно-анаеробні мікроорганізми (МАФАНМ), а також бактерії групи кишкових паличок (БГКП), які постійно знаходяться у природних порожнинах людини чи тварини, виділяються у зовнішнє середовище, але там не розмножуються. Наявність даних мікроорганізмів у об'єктах зовнішнього середовища свідчить про їх забруднення виділеннями людей або тварин. Чим більше санітарно-показових організмів у зовнішньому середовищі, тим вища імовірність присутності специфічних збудників інфекційних захворювань. Зараз як тест-бактерії пропонують використовувати ентерококи, стрептококи та ентеровіруси. Виявлення бактерій групи кишкових паличок свідчить про порушення технологічного режиму виготовлення продукції. При цьому важливо не лише встановити наявність кишкової палички, але і дізнатися її чисельність. Для цього визначають колі-титр (найменша величина досліджуваного матеріалу, в якій виявляється хоча б одна клітина *E. coli*) та колі-індекс (кількість бактерій у 1 дм³ досліджуваного матеріалу) [291,292].

Умовно-патогенні мікроорганізми. Чимала група мікроорганізмів, нешкідлива для організму людини за звичайних умов. Мають корисні властивості, зокрема здатні синтезувати біологічно-активні речовини та антимікробні метаболіти, задіяні в доперетравлюванні їжі та печінко-кишковій рециркуляції жовчних кислот. Але у разі зниження імунітету або різкого збільшення кількості здатні викликати інфекційні захворювання.

Умовно-патогенні мікроорганізми здатні спричиняти бактеріальні харчові отруєння, які поділяють на харчові токсикоінфекції і харчові інтоксикації. Харчові токсикоінфекції завжди пов'язані з вживанням

інфікованих продуктів, які не пройшли достатньої термічної обробки або були інфіковані після приготування. У другому випадку харчовий продукт може містити незначну кількість мікроорганізмів, але токсин, виділений бактеріями, здатен призводити до інтоксикації [293,294]. До умовно-патогенних мікроорганізмів належать, серед інших, деякі серотипи *Escherichia coli*, бактерії родів *Proteus* і *Streptococcus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* та інші [295].

Патогенні мікроорганізми. До даної групи належать бактерії і віруси, які здатні викликати захворювання людей. Зараження може відбуватися через повітря, воду, їжу, ґрунт, комах або гризунів. Його джерелом можуть виступати хворі люди або тварини. Захворювання, які виникають від мікроорганізмів, що потрапляють в організм людини з їжею або водою, називаються харчовими інфекціями. Деякі захворювання передаються від хворих тварин і мають назву зоонози. До кишкових інфекційних захворювань належать бактеріальні дизентерії, сальмонельози, тиф, паратиф, холера, вірусний гепатит та інші [296].

Бактерії роду *Salmonella* спричиняють гострі інфекційні кишкові захворювання. На сьогодні відомо понад 2 200 різних типів сальмонели. Сальмонели не утворюють екзотоксинів, але під час їх загибелі вивільнюється ендотоксини з сильною хвороботворною дією. Як правило, зараження сальмонелою призводить до розвитку лихоманки, діареї, появи болю в животі й блювання. Збудники сальмонельозу відносно стійкі в навколишньому середовищі, добре зберігаються у продуктах харчування. Сальмонельоз поширений повсемісно, захворюваність на нього відносно висока. Зустрічається хвороба як у вигляді спорадичних випадків, так і епідемічних спалахів. Смертність від сальмонельозу становить 0,2-2%, часто захворювання призводить до ускладнень (гастроентерит, холецистит). В США на сальмонельоз щорічно хворіє близько 1,4 млн людей, а в країнах ЄС, згідно звітів EFSA (європейське Агентство з безпеки продуктів

харчування), – 130 тис. Кількість випадків на сальмонельоз в Україні у 2015 р. становила 19,5 на 100 тис. населення [297-299].

Бактерії *Listeria monocytogenes* викликають інфекційне захворювання лістеріоз. Харчовий лістеріоз є однією з найважчих хвороб харчового походження. Це відносно рідкісна хвороба, оскільки щорічно трапляється від 0,1 до 10 випадків захворювання на 1 мільйон чоловік залежно від країн і регіонів. І хоча випадків захворювання небагато, ця інфекція представляє значну проблему в області суспільної охорони здоров'я у зв'язку з високою смертністю [300]. Резервуаром інфекції в природі є дикі та свійські птиці та тварини. Забруднення овочів може відбуватися через ґрунт або при використанні гною як добрива. *L. monocytogenes* здатна виживати і розмножуватися за температури, що підтримується у холодильнику. Вживання забруднених харчових продуктів, що містять *L. monocytogenes* у великих кількостях, є основним шляхом передачі інфекції. Інфекція може також передаватися від людини до людини фекально-оральним шляхом, а також від вагітних жінок до плода [301]. Протягом останніх 10 років в Україні було зареєстровано близько 25 випадків лістеріозу, із них 11 – в 2017 році. Летальні наслідки мали сім випадків. Захворюваність в Україні на лістеріоз реєструється на спорадичному рівні, у вигляді поодиноких випадків, не пов'язаних між собою. За даними Європейського агентства з безпеки харчових продуктів, в Європі у 2018 році було зареєстровано 47 випадків на лістеріоз, десять з яких з летальними наслідками [302].

Бактерії роду *Shigella* спричиняють бактеріальну дизентерію, а дане інфекційне захворювання отримало назву шигельоз. У структурі гострих кишкових інфекційних хвороб шигельоз займає одне з головних місць, оскільки епідеміологічна ситуація захворюваності залишається неблагополучною. Джерелом збудника є хворі з маніфестною або субклінічною формою недуги. Найбільшу небезпеку становлять особи із субклінічною, стертою і легкою формою хвороби, які працюють на підприємствах громадського харчування, водопостачання, у дитячих

дошкільних і лікувальних закладах тощо. Поширення збудника відбувається харчовим, водним, побутовим шляхами, а також комахами. Мухи здатні переносити збудника на відстань до 5 км [303]. Кожного року у світі на шигельоз потерпає до 165 млн осіб, переважна більшість - у країнах, що розвиваються, та серед дітей у віці до 5 років. Частка шигельозу серед інших діарей коливається від 70 до 90%. Близько 1 млн випадків захворювання на шигельоз є летальними. В Україні інтенсивний показник захворюваності на шигельоз коливається в середньому на рівні 30-80 на 100 тис. населення [304].

Лабораторний контроль забруднення харчової продукції патогенними бактеріями за використання традиційних мікробіологічних методів аналізу пов'язаний з низкою труднощів, зокрема є досить трудомістким та потребує багато часу. Навіть у випадку отримання негативного результату процедура проведення аналізу від забору матеріалу до формування висновку потребує приблизно семи робочих днів. Цей строк значно збільшується у разі необхідності у подальшій ідентифікації ізолятів біохімічними та серологічними методами досліджень, що, своєю чергою, негативно впливає на розслідування та своєчасну ліквідацію спалахів гострих кишкових інфекцій та інших захворювань з харчовим шляхом передачі [21].

Разом з тим, серед мікробних контамінантів харчових продуктів дедалі більше поширюються збудники нових захворювань або бактерії зі зміненими властивостями та додатковими факторами патогенності, наприклад, такі як ентерогеморогічна *Escherichia coli* (O157:H7), *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*. Культуральні методи досліджень найчастіше не дають змоги провести їхню чітку диференціацію від споріднених непатогенних штамів, що мають однакові фенотипічні властивості. Це знижує вірогідність результатів аналізу, ускладнює оцінювання поширеності патогенів у харчовій продукції, а також може призводити до необґрунтованого відбракування продукції [305].

Істотно оптимізувати процедури визначення патогенів, скоротити час

досліджень, підвищити чутливість та специфічність аналізів уможлиблюють сучасні молекулярно-генетичні технології, зокрема методи ДНК-діагностики. Найбільш надійними останніми роками вважають дослідження послідовностей нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) з метою виявлення специфічних ділянок-мішеней. Найчастіше для цього використовують різні модифікації ПЛР-аналізу [21,306].

Нині метод ПЛР-аналізу є достойною альтернативою класичним методам, зокрема бактеріологічному посіву, та передбачає прискорене визначення наявності або відсутності ДНК у певній масі харчового продукту, який попередньо піддавався інкубації в рідких селективних або неселективних середовищах. Попередня інкубація досліджуваних продуктів у живильних середовищах є обов'язковим етапом аналізу, що забезпечує біологічне накопичення збудників.

ПЛР-аналіз як один із найпотужніших молекулярно-генетичних методів діагностики інфекційних агентів має низку переваг. По-перше, безпосереднє визначення присутності збудника. Деякі традиційні методи діагностики, зокрема імуноферментний аналіз, виявляють білки-маркери, що є продуктами життєдіяльності інфекційних агентів. Це дає лише опосередковану інформацію щодо присутності інфекційного агента. Виявлення специфічної ділянки ДНК збудника методом ПЛР є прямим свідченням присутності патогена.

По-друге, висока специфічність. Висока специфічність методу ПЛР обумовлена тим, що в досліджуваному матеріалі виявляють унікальний, характерний тільки для даного збудника фрагмент ДНК. Специфічність задається нуклеотидною послідовністю праймерів, що виключає можливість одержання помилкових результатів, на відміну від методу ІФА, у разі використання якого часто трапляються помилки, що виникають у зв'язку з перехресно-реагуючими антигенами.

По-третє, висока чутливість. Метод ПЛР дає змогу виявляти навіть поодинокі клітини бактерій або вірусів. ПЛР-діагностика забезпечує

можливість виявлення збудників інфекційних захворювань у тих випадках, коли іншими методами (імунологічними, бактеріологічними, мікроскопічними) це зробити неможливо. Чутливість ПЛР-аналізу становить 10–1000 клітин у пробі. Для порівняння, чутливість імунологічних і мікроскопічних тестів – 10^3 – 10^5 клітин.

Крім того, метод ПЛР характеризується універсальністю. Біоматеріалом для проведення ПЛР слугує ДНК збудника. Метод оснований на виявленні фрагментів ДНК або РНК, які є специфічними для конкретного організму. Подібність хімічного складу всіх нуклеїнових кислот дає змогу застосовувати уніфіковані методи проведення лабораторних досліджень. Метод дає можливість діагностувати кілька збудників з однієї біопробі. Як досліджувані зразки можуть бути використані різні біологічні виділення (слиз, сеча, мокротиння), зішкріби епітеліальних клітин, кров, сироватка.

Для ПЛР характерна висока швидкість одержання результатів аналізу. Для проведення ПЛР-аналізу не потрібне виділення та вирощування культури збудника, що зазвичай потребує багато часу. Уніфіковані техніки обробки біоматеріалу, детекції продуктів реакції та автоматизація процесу ампліфікації уможливають отримання результатів досліджень упродовж 4–5 годин.

Також з ПЛР можливе доклінічне та ретроспективне діагностування. Метод дає змогу здійснювати визначення патогена або дефектного гена в організмі ще до розвитку захворювання, наприклад, в інкубаційний період (серонегативна фаза) або за латентного характеру захворювання. Особливо ефективний метод ПЛР для діагностики культур, що важко культивуються, або взагалі не культивуються, та персистуючих форм мікроорганізмів. ПЛР-аналіз уможливорює дослідження архівного (фіксованого) матеріалу та залишків біологічного матеріалу, що важливо у разі ідентифікації особистості та встановлення батьківства.

Слід зазначити, що за допомогою методу ПЛР можливо виявляти збудників захворювань не тільки в клінічному матеріалі, отриманому від

хворого, але й у харчовій продукції, сільськогосподарській сировині та об'єктах зовнішнього середовища (вода, ґрунт тощо) [307].

У країнах ЄС та США сьогодні існує низка розроблених комерційних діагностикумів, які забезпечують визначення методом ПЛР таких збудників як бактерії родів *Salmonella* і *Shigella*, видів *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* і *Escherichia coli* (O157:H7), видів термофільних *Campylobacter spp.* – *C.jejuni*, *C.coli* та *C.lari*. У Російській Федерації у 2011 р. затверджено методичні вказівки МУК 4.2.2872-11 щодо ідентифікації патогенних збудників інфекційних захворювань у харчових продуктах методом ПЛР у реальному часі [308].

Результати даного розділу висвітлено у наступних публікаціях:

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.

Димань Т. М., Козловська М. В., Облап Р. В., Дубін О. В., Кравченко О. І. Генетично модифіковані сільськогосподарські культури: прогрес, проблеми, перспективи: монографія. *Серія «Імплементация європейських норм і практик. Регулювання ринків та дослідництво в умовах СОТ»*. Спецвипуск від 03-04-2013. Київ: Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. 158 с.

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.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Місце проведення досліджень, дослідний матеріал та загальна схема досліджень

Більшу частину досліджень, виконаних за темою дисертаційної роботи, було проведено у Білоцерківському національному аграрному університеті на базі науково-дослідної лабораторії новітніх методів досліджень. Окремі дослідження проводились на базі науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень, акредитованої за ДСТУ ISO/IEC 17025 Державного підприємства «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (м. Київ). Дослідження з визначення пробіотичних мікроорганізмів проводилися у співпраці зі старшим науковим співробітником відділу Фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, кандидатом біол. наук Л. Б. Зеленою. Популяційно-генетичні дослідження поголів'я української чорно-рябої молочної породи ВРХ та діагностика вірусу ВЛ ВРХ проводилися спільно з науковим співробітником ДП «Укрметртестстандарт», кандидатом с.-г. наук Н. Б. Новак. Показники молочної продуктивності тварин визначали на базі лабораторії ДП «Галактон» разом із Н. О. Ключаденко.

Для вивчення генетичної структури української чорно-рябої молочної породи ВРХ було досліджено дві популяції чистопорідного поголів'я, які відтворювалися у Васильківському та Сквирському районах Київської області. Кількість досліджених за кожним із локусів тварин наведено у відповідних таблицях розділу «Результати досліджень».

Дослідження щодо визначення провірусної ДНК вірусу ВЛ ВРХ проводили на зразках крові та молока, відібраних від тварин української чорно-рябої молочної худоби, яка відтворювалася в умовах агростанції

«Митниця» Васильківського району Київської області. Попередньо всі тварини було протестовано методом РІД-аналізу щодо присутності антитіл до ВЛ ВРХ у рамках регулярних протилейкозних заходів у господарстві. Кількість тварин, використаних для досліджень, наведено у відповідних підрозділах розділу «Результати досліджень».

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 торгівельній мережі.

При розробці 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 жиролійної промисловості AOCS (США), а також зразки харчової продукції та сільськогосподарської сировини, що надходили до лабораторії ДП «Укрметртестстандарт» протягом 2007-2017 рр. Перелік використаного референтного матеріалу та зразків продукції наведено у відповідних таблицях розділу «Результати досліджень».

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). Перелік використаних мікроорганізмів наведено у розділі «Результати досліджень».

Роботу виконано відповідно запланованої схеми досліджень, яку наведено на рисунку 2.1

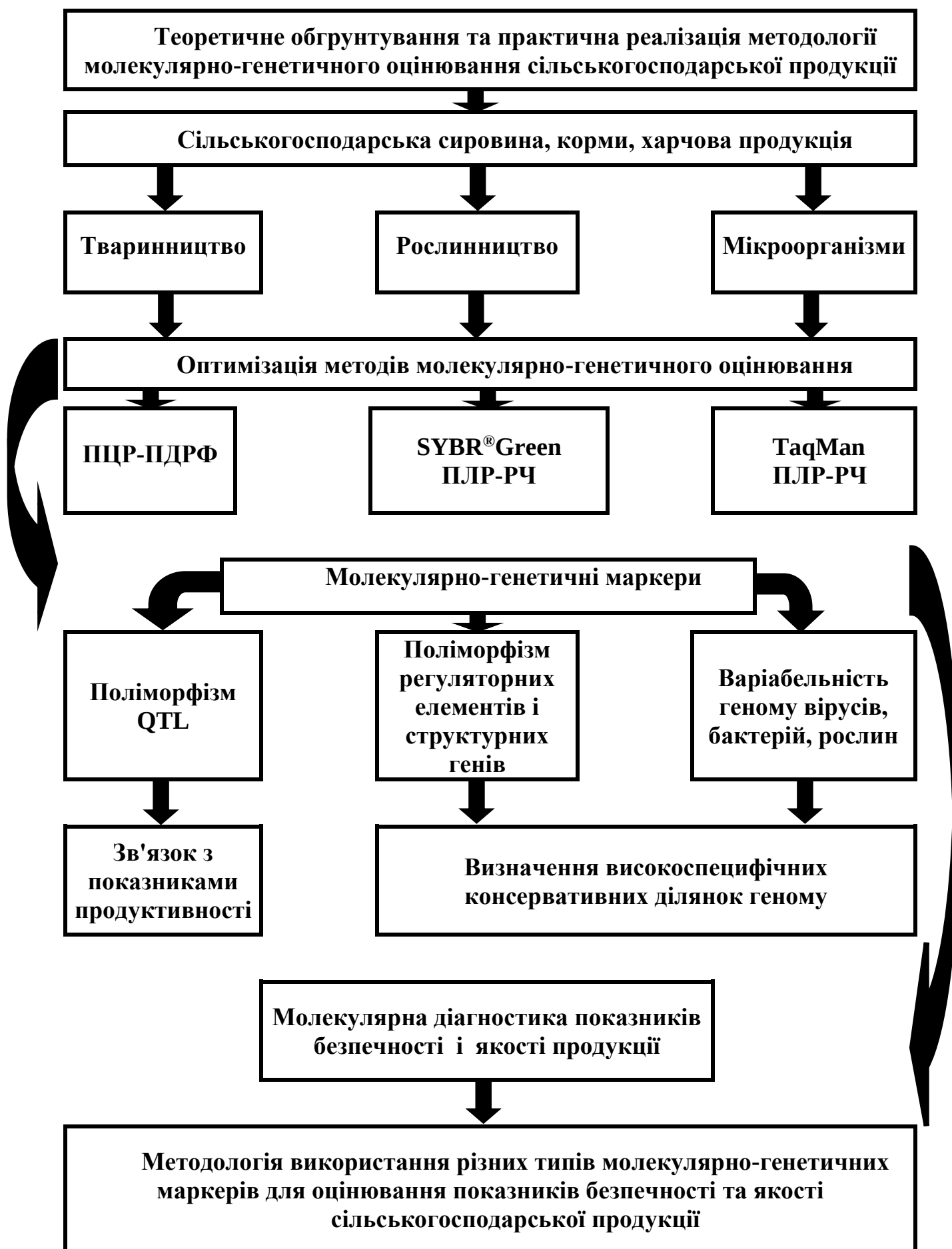


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

2.2. Відбір, маркування та зберігання зразків

У зв'язку із специфікою та різноплановістю дисертаційної роботи під час проведення досліджень було використано різний за походженням дослідний матеріал. Досліджувані зразки були представлені біологічним матеріалом від тварин, рослин та мікроорганізмів, продуктами переробки сільськогосподарської сировини, напівфабрикатами та готовою до споживання харчовою продукцією.

Перед відбиранням зразків крові та молока від корів визначали індивідуальні номери тварин. Кров відбирали одноразовим інструментом із яремної вени в об'ємі 5–10 мл в пробірки з 3%-м розчином ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1. Зберігали зразки крові за температури +4-7°C протягом тижня або -18-20°C - більш тривалий час. Зразки молока відбирали в одноразові пробірки типу *Falcon* на 50 мл та зберігали за температури +4-7°C протягом тижня або -18-20°C - більш тривалий час.

Під час розробки діагностичних тест-систем з визначення корисної мікрофлори, видової приналежності м'яса, ГМО та глютену використовували зразки готової харчової продукції, у тому числі м'ясної та молочної, напівфабрикати, безглютенові вироби, а також ті, що містили в своєму складі зернові культури (пшеницю, ячмінь, жито та овес), корми для тварин, продукти переробки сільськогосподарської сировини рослинного та тваринного походження. Дані зразки закуповувалися у торгівельній мережі міста або надходили на перевірку до лабораторій. Маркування та простежуваність зразків здійснювалась згідно вимог «Систем якості», запроваджених у лабораторіях. Відбір та пробопідготовку зразків здійснювали відповідно до вимог нормативної документації, наведеної у підрозділі 3.4.1. Зберігалися зразки в залежності від типу та своїх фізико-хімічних властивостей за кімнатної температури або у побутових холодильниках за +4-7°C та -18-20°C.

Зразки культур використаних у роботі мікроорганізмів отримували у

вигляді водних розчинів ДНК або культуральної рідини. В останньому випадку зразки центрифугувалися, а отриманий осад клітин заморожували при $-18-20^{\circ}\text{C}$. Розчини ДНК зберігалися протягом тижня за температури $+4-7^{\circ}\text{C}$ або $-18-20^{\circ}\text{C}$ - більш тривалий час. Маркувалися зразки відповідно до інформації, зазначеної у супровідних документах.

Під час пробопідготовки зразків використовували дозатори змінних об'ємів, одноразові поліпропіленові пробірки різних об'ємів та наконечники з аерозольним бар'єром. Подрібнення зразків за необхідності здійснювали за допомогою побутового блендери або лабораторного млину. Відпрацьований одноразовий посуд (пробірки, наконечники) утилізували в спеціальні контейнери, що містили 5%-вий розчин хлораміну Б або дезінфікуючого засобу ДП-2Т.

2.3. Методи і підходи щодо виділення ДНК

З огляду на те, що під час проведення досліджень використовувалися різні організми та тканини (бактерії, рослинні та тваринні тканини), виникла необхідність підбору індивідуальних методик екстракції ДНК для кожної конкретної матриці. Для проведення аналізів на основі різновидів методу полімеразної ланцюгової реакції можна використовувати ДНК з середньою довжиною фрагментів близько 20 т.п.н. [309,310]. Оскільки не вимагається наявність високомолекулярної ДНК, зазвичай використовують прості методи виділення нуклеїнової кислоти.

2.3.1. Метод фенольно-хлороформної екстракції ДНК

Метод фенольно-хлороформної екстракції ДНК розроблений Blin N. & Stafford D.W. (1976 p.) [311] та модифікований Ausubel F.M. et al. (1987 p.) [312], належить до найбільш широковживаних методів очистки і концентрації НК. Модифікація даного методу успішно використовується для

виділення ДНК із тваринних тканин, крові та молока. Пропис розчинів, що використовуються у даному методі, наведено у табл. 2.1.

Для екстракції ДНК з тваринних тканин використовували зразки свіжої, свіжорозмороженої або термічно обробленої тканини вагою 50-100 мг. Наважку поміщали в 1.5 мл поліпропіленову пробірку, в яку вносили 350 мкл лізуючого буферу та розчин протеїнази К до кінцевої концентрації 0.7-1.0 мг/мл. Лізис проводили протягом 8-12 годин за температури 56°C.

Таблиця 2.1

Склад розчинів для фенольно-хлороформного методу екстракції ДНК

Назва розчину	Склад	Умови зберігання
Лізуючий буфер	50 mM Тріс-НCl, pH-8.0; 100 mM NaCl; 100 mM ЕДТА, pH-8.0; 1% SDS	кімнатна температура
Розчин протеїнази К	20 мг/мл в дН ₂ О	+4°C
Розчин ACD	0.48 г лимонної кислоти, 1.42 г цитрату натрію 1.47 г глюкози дН ₂ О до 100 мл	+4°C
TE буфер	10 mM Тріс-НCl, pH-7.8; 10 mM ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура
Розчин NDB	75 mM NaCl; 25 mM ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура
Фенол-CIA	Фенол (pH-8.0), хлороформ, ізоаміловий спирт (співвідношення 25:24:1)	-20°C
CIA	Хлороформ, ізоаміловий спирт (співвідношення 24:1)	+4°C

Для екстракції ДНК з *цільної крові* використовували зразки консервовані антикоагулянтами ЕДТА або АCD (кислий цитратний розчин). В 2 мл пропіленові пробірки вносили 400 мкл крові і 4 об'єми ТЕ буферу. Вміст пробірок перемішували на вортексі та центрифугували протягом 30 сек. при 15000 об/хв, для осадження лейкоцитарної фракції. Надосадову рідину видаляли, додавали 5 об'ємів ТЕ буферу і процедуру повторювали. Очищену лейкоцитарну фракцію ресуспендували в 1 об'ємі (~400 мкл)

буферу NDB з додаванням 1/20 об'єму 10% розчину додецилсульфату натрію (SDS) і протеїнази К до кінцевої концентрації 0.5 мг/мл. Зразок інкубували впродовж 2-12 годин при 56°C.

Для екстракції ДНК з *молока* в 15 мл центрифужні пробірки поміщали 10-15 мл цільного молока і центрифугували протягом 5 хв, 3,5 тис. об/хв, при +4°C. Після центрифугування в пробірці візуалізувалися три фракції: молочний жир, обезжирене молоко і осад з соматичними клітинами. Жирова та рідка фракції видалялися, а осад двічі промивався розчином PBS. Відмитий осад ресуспендували в 350 мкл лізуючого буферу, що містив протеїназу К з кінцевою концентрацією 1 мг/мл та інкубували протягом 8-12 годин при +56°C.

Наступний процес виділення ДНК був загальним для всіх типів зразків. До освітленого лізату додавали 1 об'єм (≈ 400 мкл) фенол-СІА і після інтенсивного струшування (приблизно 3 хв) центрифугували впродовж 2-3 хв за 14 тис. об/хв. Верхню фракцію, яка містила ДНК, обережно переносили у нову 1.5 мл пробірку і додавали 1 об'єм (≈ 400 мкл) СІА. Інтенсивно струшували протягом 3 хв з наступним центрифугуванням протягом 2-3 хв за 14 тис. об/хв. Верхню фазу переносили в нову пробірку, додавали 1/10 об'єму 3 М розчину ацетату натрію, рН-5.2 і 2.5 об'єму 100% етилового спирту. Кілька разів обережно перемішували з наступним центрифугуванням протягом 15 хв за 14 тис. об/хв. Осад ДНК промивали 70% спиртом, підсушували та розчиняли в 30-80 мкл деіонізованої води. Пробірки залишали на ніч при +4°C. Концентрацію та чистоту розчину ДНК вимірювали на спектрофотометрі згідно методики, наведеної у підрозділі 2.4.

2.3.2. Метод Кавасакі

Метод, запропонований Kawasaki E.S. (1990 р.) [313], дозволяє обходитись без тривалої процедури фенольно-хлороформної екстракції та

використовувати безпосередньо клітинний лізат для проведення ПЛР-аналізу. Може бути застосований як для виділення ДНК із *тваринних тканин*, так і *бактеріальних культур* [314,315]. Пропис розчинів наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Склад розчинів, що використовуються у методі Кавасакі

Назва розчину	Склад	Умови зберігання
Буфер Кавасакі	20 мМ Тріс-НCl, pH=8.3; 1.5 мМ MgCl ₂ , 25 мМ KCl; 0.5% (v/v) Tween 20	кімнатна температура
Розчин протеїнази К	20 мг/мл в дН ₂ O	+4°C

Зразки тканин (~1 мм³) поміщали в 200 мкл буферу Кавасакі з додаванням 5 мкл протеїнази К до кінцевої концентрації 0.5 мг/мл і інкубували протягом 8-24 годин при 56°C. Далі протеїназу К інактивували при 95°C протягом 10-15 хвилин. Для освітлення лізату попередньо охолоджені пробірки центрифугували протягом 1-2 хв при 14 тис. об/хв. Супернатант переносили в нову пробірку і використовували для проведення ПЛР-аналізу. У випадку необхідності проведення повторних аналізів лізат може зберігатися при +4°C 2-3 тижня або при -20°C протягом кількох місяців.

2.3.3. Метод температурного лізису

Метод температурного лізису [316] також дозволяє обходитись без тривалої процедури очищення ДНК та використовувати безпосередньо клітинний лізат для проведення ПЛР-аналізу. Застосовується переважно для екстракції ДНК з *бактеріальних культур*. Перевагою даного методу є висока швидкість отримання препарату ДНК, основний недолік – короткий термін зберігання. Для збільшення терміну зберігання екстрагованої ДНК необхідне додаткове доочищення, наприклад комерційними наборами. Власну

модифікацію даного методу наведено нижче.

Культуральну рідину поміщали в 1,5 мл поліпропіленові пробірки і центрифугували протягом 10 хв при 5-6 тис об/хв. Надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували у 1000 мкл дН₂О з наступним центрифугуванням протягом 1 хв при 10-12 тис об/хв. Процедуру відмивання осаду дН₂О проводили двічі. Після цього осад ресуспендували у 100-250 мкл дН₂О та інкубували впродовж 10 хв при 95°C, періодично струшуючи на вортексі. Пробірки центрифугували протягом 10 хв на тах обертах, а супернатант використовували для проведення ПЛР.

2.3.4. Метод виділення ДНК на силікагелі

Зручна та ефективна модифікація методу виділення ДНК, описаного Boom R. et al. (1990) [317]. Даний підхід дозволяє успішно екстрагувати ДНК та РНК з крові, сечі, харчових продуктів та об'єктів зовнішнього середовища. Перелік необхідних розчинів наведено у табл. 2.3.

Для приготування суспензії силікагелю 60 г SiO₂ суспендують в 500 мл дН₂О і залишають на 24 години за кімнатної температури. Відбирають 440 мл супернатанту та додають дН₂О до об'єму 500 мл. Струшують та залишають на 5 годин за кімнатної температури. Видаляють 440 мл супернатанту та додають 600 мкл HCl, для отримання рН-2,0. Суспензію автоклавують протягом 20 хвилин при +120°C.

Таблиця 2.3

Склад розчинів, що використовуються при виділенні ДНК на силікагелі

Назва розчину	Склад	Умови зберігання
Лізуючий розчин	5 М гуанідинтіоціонат; 50 мМ Тріс-HCl, рН 6.4; 20 мМ ЕДТА, рН-8.0; 0.5% Тритон X100	кімнатна температура
Відмивочний розчин 1	5 М гуанідинтіоціонат; 50 мМ Тріс-HCl, рН 6.4; 0.1 М ЕДТА, рН-8.0	кімнатна температура

Відмивочний розчин 2	80% Етанол; 10 мМ Тріс-НСl, рН 7.5	кімнатна температура
Буфер для елюції	10 мМ Тріс-НСl, рН-8.5; 1 мМ ЕДТА, рН-8.0	+4°C
Силікагель	Суспензія SiO ₂	+4°C

В пробірку з 300 мкл лізуючого розчину вносили 100 мкл зразку, перемішували та інкубували протягом 5 хв при 65°C. Центрифугували 5 сек при 5 тис. об./хв. Додавали 25 мкл силікагелю та ретельно перемішували на вортексі. Витримували 2 хв, перемішували на вортексі, витримували ще 5 хв. Перемішували на вортексі, центрифугували протягом 30 сек при 5 тис. об./хв. Обережно видаляли супернатант, осад ретельно суспендували в 300 мкл відмивочного розчину 1. Центрифугували протягом 30 сек при 5 тис. об./хв. Обережно видаляли супернатант, осад ретельно суспендували в 500 мкл відмивочного розчину 2. Центрифугували впродовж 30 сек при 10 тис. об./хв. Супернатант видаляли та ще раз повторювали процедуру. Підсушували осад протягом 5-10 хв при 65°C та ресуспендували в 50-75 мкл ТЕ-буферу. Зберігали отримані зразки ДНК при -20 С.

2.3.5. Метод виділення ДНК на основі ЦТАБ

Метод екстракції ДНК на основі діючої речовини ЦТАБ/СТАВ (гексадецилтриметилбромід амонію, cetyltrimethylammonium bromide) був розроблений Murray M.G. & Thompson W.F. (1980 р.), а згодом опублікований Wagner D.B. et al. (1987 р.) [318,319]. Метод добре підходить для екстракції ДНК із рослин і харчових продуктів рослинного походження, оскільки дозволяє добре очистити препарат ДНК від полісахаридів і поліфенольних з'єднань, які негативно впливають на якість проходження ПЛР. Дана процедура широко застосовується в молекулярній генетиці рослин та була затверджена як методика, придатна для виявлення ГМО рослинного походження [228,236].

Нижче наведено перелік розчинів (табл. 2.4) та методику виділення

ДНК на основі ЦТАБ з власними модифікаціями.

Таблиця 2.4

Склад розчинів для методу виділення ДНК на основі ЦТАБ

Назва розчину	Склад	Умови зберігання
Лізуючий буфер	2% СТАБ; 1.4 М NaCl; 0,1 М Tris-HCl, pH-8.0; 20 мМ ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура
Буфер для преципітації	0.5% СТАБ; 40 мМ NaCl	кімнатна температура
Розчин NaCl	1.2 М NaCl	кімнатна температура
Розчин для елюції	10 мМ Tris-HCl, pH-8.0; 1 мМ ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура
Хлороформ	-	кімнатна температура
η-Гексан	-	кімнатна температура

У 1,5 мл пробірки типу *Eppendorf* вносили 800 мкл лізуючого буферу та ~50-300 мг дослідного зразку. Інкубували протягом 30 хв при 65°C. Зразки з високим змістом жиру (лецитин, шоколад, кондитерські вироби) інкубували не менш ніж 12 годин. Далі центрифугували 10 хв при 12-14 тис. об/хв., надосадову рідину (~400 мкл) переносили в нові пробірки.

Зразки з високим вмістом жиру обробляли η-гексаном. Для цього вносили 800 мкл η-гексану, перемішували протягом 30 секунд на вортексі і центрифугували 10 хв при 12-14 тис. об/хв. Нижню водну фазу (~400 мкл) переносили в нову пробірку. Процедура за необхідності повторювали.

Далі вносили 250 мкл хлороформу, перемішували 1-3 хв на вортексі і центрифугували 10 хв. при 12-14 тис. об/хв. Верхню водну фазу (~300-400 мкл) переносили в нові пробірки та додавали 2 обсяги буфера для преципітації. Перемішували на вортексі та інкубували за кімнатної температури протягом 40 хв. Центрифугували 10 хв. при 12-14 тис. об./хв. Надосадову рідину видаляли. Осад розчиняли у 350 мкл 1.2М NaCl. Вносили 350 мкл хлороформу, вміст пробірок інтенсивно перемішували (~3 хв) та центрифугували 10 хв при 12-14 тис. об/хв. Верхню фазу переносили в нові

пробірки, додавали 2 об'єми 96% етанолу. Обережно перемішували та центрифугували 15 хв при 14 тис. об/хв. Надосадову рідину обережно видаляли, а осад промивали 70% етанолом. Для цього вносили 500 мкл спирту, пробірки обережно перевертали декілька разів і центрифугували 5 хв при 12-14 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляли, а пробірки з відкритими кришками поміщали у термостат і витримували 5-10 хв при 65°C до повного випаровування рідини. Вносили 50-100 мкл розчину для елюції, витримували 10-15 хв при 65°C, періодично струшуючи пробірки на вортексі. Осаджували краплини зі стінок пробірок короточасним центрифугуванням на вортексі. Препарат ДНК зберігали при +4-7°C протягом тижня або при -18-20°C до року.

2.3.6. Метод виділення ДНК на *Silica Spin* колонках

Метод засновано на класичних методиках виділення рослинної ДНК за використання ЦТАБ, описаних у роботах Murray M.G. (1980 p.), Boom R. et al. (1990 p.) та Poms R.E. et al. (2001 p.) [317,318,320]. В його основі лежить екстракція загальної ДНК в комплексі з гексадецилтриметилбромід амонієм та наступною сорбцією на частинках силікогелю у присутності гуанідин тіоціанату. Нижче наведено перелік використаних розчинів (табл. 2.5) та методика з деякими власними модифікаціями. Замість силікагелю було використано *Silica Spin* колонки.

Таблиця 2.5

Склад розчинів для методу виділення ДНК на колонках

Назва розчину	Склад	Умови зберігання
Лізуючий буфер	2% СТАВ; 1.4 М NaCl; 0,1 М Tris-HCl, pH-8.0; 20 мМ ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура або +4-7°C
Протеїназа К	2 мг/мл протеїназа К; 50 мМ Трис-HCl, pH-8,0; 5 мМ CaCl ₂ ; 50% гліцерол	-20°C

Хлороформ	-	кімнатна температура або +4-7°C
Буфер для осаджування	0.5% СТАВ; 40 мМ NaCl; 5 мМ Tris-HCl, pH-8.0	кімнатна температура або +4-7°C
Розчин для промивки №1	60% EtOH; 0,1 М Tris-HCl, pH-8.0; 2 мМ ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура або +4-7°C
Розчин для промивки №2	70% EtOH	кімнатна температура або +4-7°C
Розчин для елюції	10 мМ Tris-HCl, pH-8.5; 1 мМ ЕДТА, pH-8.0	кімнатна температура або +4-7°C

В пробірки на 1,5 мл вносили по 800 мкл буфера для лізису та 10 мкл розчину протеїнази К (2 мг/мл). Перемішували та осаджували краплі на вортексі. Вносили по 100-200 мг гомогенізованого зразку. Вміст пробірок перемішували протягом 30 сек на вортексі та інкубували 60 хв при 60°C. Центрифугували 5 хв при 12-14 тис. об/хв, верхню водну фазу (~600 мкл) переносили в нові пробірки. Додавали 500 мкл хлороформу та інтенсивно струшували на вортексі. Центрифугували 10 хв при 12-14 тис. об/хв. Верхню водну фазу (~300 мкл) переносили в нові пробірки та додавали 2 об'єми буферу для осадження. Лізат ретельно перемішували та наносили на колонку. Колонки центрифугували 1 хв при 7 тис. об/хв. Розчин, що пройшов через колонку, видаляли, решту лізату наносили на колонку та повторювали процедуру. Наносили 400 мкл розчину для промивки №1, центрифугували 30 сек при 7 тис. об/хв. Розчин, що пройшов через колонку, видаляли, а процедуру відмивання повторювали. Наносили 400 мкл розчину для промивки №2, центрифугували 30 сек при 7 тис. об/хв. Розчин, що пройшов через колонку, видаляли. Проводили центрифугування порожніх колонок. Внутрішню частину колонки з фільтром переносили у нові пробірки, вносили 100-150 мкл ТЕ-буферу та інкубували 5 хв при 60°C. Центрифугували 1 хв при 7 тис. об/хв. Отриманий розчин ДНК використовували для проведення ПЛР. Зберігали при +4-7°C протягом тижня або при -18-20°C до року.

2.4. Спектрофотометричний аналіз виділеної ДНК

Стандартним методом визначення концентрації препаратів ДНК є вимірювання на спектрофотометрі ступеня поглинання розчином ДНК ультрафіолетового світла з довжиною хвилі 260 нм. Між концентрацією ДНК і ступенем поглинання світла існує пряма залежність: чим більше світла поглинає розчин ДНК, тим вище його концентрація.

Для вимірювання концентрації, вихідний розчин ДНК в більшості випадків розбавляють в 200-400 разів і визначають його оптичну густину при проходженні променів з довжиною хвилі 260 нм (OD_{260}) та оптичним шляхом в 1 см.

Розрахунок концентрації ДНК проводять за наступною формулою [321]:

$$C [\text{мкг/мл}] = OD_{260} \times 50 \times F / 1000 \quad (2.1), \quad \text{де}$$

OD_{260} – оптична густина розчину ДНК при довжині хвилі 260 нм;

F - фактор розбавлення;

1000 - коефіцієнт для приведення концентрації в мкг/мл;

50 - концентрація ДНК (мкг/мл) при $OD_{260}=1$.

Для контролю ступеня очистки ДНК визначають співвідношення оптичних густин розчину ДНК при довжинах хвиль 260 і 280 нм (OD_{260}/OD_{280}) та 260 і 230 нм (OD_{260}/OD_{230}). Для чистих препаратів ДНК це співвідношення дорівнює 1.8-2.0 та 1.5-2.0, відповідно. Якщо значення більше 2.0, то препарат ДНК забруднений домішками РНК, а якщо менше 1.8 та 1.5 – білками, вуглеводами, солями та органічними розчинниками.

Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer AG 22331» (Eppendorf, Німеччина). Для вимірювання оптичної густини використовували 2 мкл зразка. Для подальшої роботи використовували лише препарати нуклеїнових кислот, для яких співвідношення OD_{260}/OD_{280} та OD_{260}/OD_{230} знаходилися у межах діапазонів 1,8 - 2,0 та 1,5 - 2,0, відповідно.

2.5. Підбір праймерів і зондів та проведення ПЛР

Успішне проведення полімеразної ланцюгової реакції передусім залежить від правильного підбору олігонуклеотидних праймерів та якості їх синтезу. Під час конструювання праймерів, як правило, використовуються спеціалізовані комп'ютерні додатки або інтернет-ресурси, які дозволяють задати бажані параметри. Крім того, праймери слід підбирати до унікальних консервативних ділянок ДНК, щоб уникнути появи хибно-негативних або хибно-позитивних сигналів.

Для даної роботи синтез олігонуклеотидів здійснювався компаніями «Metabion international AG» (Німеччина) та ЗАО «Синтол» (РФ) [322,323].

2.5.1. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей

Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей для знаходження консервативних ділянок ДНК проводили за використання комп'ютерної програми *Vector NTI Advance™ 9.1.0*. Нуклеотидні послідовності було взято з інтернет-бази даних GenBank® серверу NCBI [324].

2.5.2. Конструювання специфічних олігонуклеотидних праймерів

Конструювання специфічних олігонуклеотидних праймерів і зондів здійснювалось за допомогою комп'ютерної програми *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems) відповідно до загальноприйнятих вимог, які враховуються при проведенні ПЛР. Під час роботи з програмою вводили такі основні параметри як розмір кінцевого продукту ампліфікації (100-250 п.н.), температуру плавлення праймерів (55-65°C), довжину праймерів та зондів (18-40 п.н.), GC склад (40-60%). Також слідкували за відсутністю схильності до утворювання вторинних структур та праймер-димерів.

Частину праймерів було запозичено з електронних баз даних та літературних джерел.

Теоретичну специфічність всіх обраних пар праймерів та зондів оцінювали за допомогою алгоритму онлайн-ресурсу *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, NCBI) [325]. Для всіх розроблених послідовностей праймерів та зондів було отримано повну ідентичність тільки з очікуваними цільовими послідовностями. Нуклеотидні послідовності олігонуклеотидних праймерів та зондів наведено у таблицях відповідних підрозділів розділу 3.

2.5.3. Визначення концентрації праймерів та зондів

В спеціалізованій науковій літературі наводяться різні формули щодо визначення концентрації синтезованих олігонуклеотидів. А на сайті ЗАО "Синтол", яка займається синтезом праймерів, наведено наступну формулу:

$$C = 500 \times A_{260} / (1,54 \times nA + 0,754 \times nC + 1,174 \times nG + 0,924 \times nT) \quad (2.2), \text{ де}$$

C – концентрація олігонуклеотиду (пмоль / мкл-1);

A_{260} – коефіцієнт поглинання за довжини хвилі 260 нм (о.е.);

n – кількість відповідних нуклеотидів у нуклеотидній послідовності олігонуклеотиду (од).

У більшості випадків фірми, які займаються синтезом праймерів на продаж, у супровідній документації вже надають інформацію щодо концентрації праймерів в оптичних одиницях (OD), мкг або нмоль. У випадку ж ліофілізованого продукту- як його розвести, щоб отримати бажану концентрацію у пкмоль/мкл.

В даній роботі для оптимізації умов ампліфікації за концентрацією праймерів та/або зондів спиралися на інформацію, надану фірмою-виробником.

2.5.4. Проведення різновидів полімеразної ланцюгової реакції

Проведення ПЛР здійснювали за допомогою приладів GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, США), ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems, США), iQCyler (BioRad, Франція) та CFX96 (BioRad, США). Отримані результати оброблялися за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення та інструкцій виробників приладів. Умови ампліфікації наведено у відповідних підрозділах розділу 3.

Процедуру ПЛР-ПДРФ аналізу здійснювали в три етапи: проведення полімеразної ланцюгової реакції, проведення рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації та електрофоретичне розділення продуктів рестрикції.

Електрофоретичну частину аналізу проводили за використання приладу PowerPac™ Basic (BioRad) у 2 або 3% агарозних гелях з 1x TAE буфером (50x: 2 М Tris, 1 М оцтова кислота, 50 мМ ЕДТА, рН 8,4) та барвником бромистим етидієм (0,5 мкг/мл гелю). Візуалізацію фрагментів ДНК здійснювали в ультрафіолетовому випромінюванні на хвилі збудження 312 нм за допомогою трансільюмінатору T-312-K (Neogene). Для визначення генотипів використовували маркери молекулярних ваг GeneRuler™ 50bp DNA Ladder і 100bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Литва).

ПЛР у реальному часі з *SYBR® Green*-технологією проводили за використання комерційного набору Maxima SYBR Green/ROX qPCR (BioRad). Визначення граничних циклів (Ct) та проведення процедури аналітичного плавлення ПЛР-продуктів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Manager™.

При проведенні ПЛР-РЧ з *TaqMan®*-технологією пороговий цикл (Ct) для кожного зразка визначали циклом, при якому кінетична крива флуоресценції перетинала порогову лінію. Базову лінію, що являє собою фоновий рівень флуоресценції, в приладі ABI PRISM SDS 7000 задавали з 3 по 15 цикл ампліфікації. В приладах iQCyler та CFX96 базова лінія розраховувалась автоматично програмним забезпеченням.

В якості критеріїв для оцінки ефективності проходження ампліфікації при ПЛР-РЧ застосовувались такі показники як нахил стандартної кривої (α), ефективність ампліфікації (E) та коефіцієнт кореляції (R^2). За успішної ампліфікації середні значення нахилу стандартної кривої лежать в діапазоні від -3.6 до -3.1, показник ефективності ампліфікації знаходиться у межах 90 - 110%, а коефіцієнт $R^2 \geq 0,98$.

2.6. Визначення масової частки жиру та білку у молоці

Підготовку зразків молока до аналізу здійснювали згідно ГОСТ 13928 [326].

Визначення масової частки жиру в молоці проводили за допомогою кислотного методу згідно ГОСТ 5867–90 (СТ СЭВ 3838–82). В молочний жиромір, уникаючи змішування, вносили 10 мл сірчаної кислоти та 10,77 мл молока. Додавали 1 мл ізоамілового спирту. Жиромір щільно закривали і струшували до повного розчинення білкових речовин. Поміщали жиромір у водяну баню пробкою вниз та інкубували впродовж 5 хв при 65°C. Після інкубації жиромір центрифугували впродовж 5 хв при 1 тис. об/хв. Після центрифугування стовбчик жиру переміщували в градуйовану частину жироміру і повторно інкубували впродовж 5 хв. Після завершення інкубації швидко проводили розрахунок жиру.

Рухом пробки встановлювали нижню межу стовбчику жиру на нульову відмітку шкали жироміру і від неї проводили відлік числа поділок до нижньої точки меніску стовбчика жиру. За відсутності чітко вираженої межі розділу фаз жиру і кислоти, а також за наявності примісей у стовбчику жиру, проводили повторне вимірювання. Для кожного зразка молока проводили два паралельних вимірювання. За результат вимірювань приймали середнє арифметичне значення результатів двох паралельних визначень, розбіжності між якими не перевищували 0,1%. Покази жироміру відповідали масовій частці жиру в молоці у відсотках.

Визначення масової частки білка в молоці здійснювали колориметричним методом аналізу за ГОСТ 25179–82. Для цього у скляній пробірці обережно змішували 1 мл молока та 20 мл розчину кислотного синьо-чорного барвника. Для відділення утвореного нерозчинного комплексу пробірку центрифугували впродовж 10 хв за 1 тис. об/хв. Відбирали 2 мл надосадової рідини у 200 мл колбу і розводили дН₂О в 100 разів. Оптичну густину вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 590–600 нм.

Для кожного зразка молока проводили два паралельних вимірювання. Масову частку білка в молоці (%) встановлювали за градувальним графіком на основі середньої величини оптичної густини двох паралельних вимірювань, якщо розбіжність між ними не перевищувала 0,05% білку.

2.7. Отримання генно-інженерних позитивних контрольних зразків у вигляді плазмідної ДНК

2.7.1. Напрацювання фрагментів ДНК

Для проведення процедури молекулярного клонування у плазмідний вектор pBluescript II SK(+) («Stratagene», США) було ампліфіковано ДНК фрагменти з праймерами, наведеними у табл. 3.24 підрозділу 3.4.3.10. Реакційна суміш для проведення ПЛР складала 100 мкл. Умови ампліфікації представлені у табл. 3.25 підрозділу 3.4.3.10.

Процедуру очищення бажаних фрагментів ДНК виконували за допомогою препаративного електрофорезу у 1,5-2 % агарозному гелі з 1x TAE буфером. Після проведення процедури електрофорезу фрагмент ДНК відповідної довжини вирізали з гелю, зважували і поміщали у поліпропіленову пробірку на 1,5 мл. Вагу геля в мг чисельно прирівнювали до його об'єму у мкл (100 мг геля = 100 мкл). Додавали 3 об'єми лізуючого буферу і витримували при 50-60°C до повного розчинення гелю. Після цього додавали рівний об'єм суміші фенол/хлороформ (1:1), ретельно

перемішували на вортексі та центрифугували впродовж 1 хв при 12-14 тис об/хв. Супернатант переносили у нову пробірку і повторювали процедуру очистки лише з хлороформом. Супернатант наносили на *Silica Spin* колонку, центрифугували впродовж 1 хв при 7 тис об/хв., фільтрат видаляли. Наносили 400 мкл відмивочного розчину 1, центрифугували 30 сек при 7 тис об/хв., фільтрат видаляли. Наносили 400 мкл відмивочного розчину 2, повторювали центрифугування, фільтрат видаляли. Наносили 30-50 мкл буферу для елюції, центрифугували 30 с при 7 тис об/хв.. За необхідності елюат повторно наносили на колонку. Пропис розчинів наведено у табл. 2.3. Концентрацію елюірованих фрагментів ДНК визначали спектрофотометрично.

2.7.2. Молекулярне клонування

Отримані ПЛР-продукти клонували у Т-вектор, який було створено на основі pBluescript II SK(+). Для цього послідовно проводили рестрикційний аналіз плазмідної ДНК та приєднання залишків dT.

Рестрикційний аналіз проводили за допомогою ендонуклеази рестрикції EcoRV, яка дозволяє отримати так звані «тупі кінці». Об'єм реакційної суміші становив 50 мкл та містив 1x буфер (10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 мг/мл BSA); 30 од. Eco32I (EcoRV) (Thermo Scientific, США) та 30 мкг ДНК. Температурний режим складав 3 год при 37°C. Повноту рестрикції перевіряли електрофорезом.

Процедуру приєднування Т-кінців проводили у 100 мкл реакційної суміші, яка містила 1x Taq-буфер (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 2 mM dTTP; 2,5 mM MgCl₂; 5 од. Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) та 47 мкл рестрикційної суміші. Температурний режим складав 2 год при 72°C. Після завершення реакційну суміш екстрагували рівним об'ємом суміші фенол хлороформу (1:1), рівнем об'ємом хлороформу та висаджували ДНК шляхом додавання 4 мкл 5 M

NaCl та 250 мкл 96% EtOH. Осад ДНК промивали 70% EtOH та розчиняли у 50 мкл дН₂O. Концентрацію отриманого Т-вектору перевіряли спектрофотометрично.

Для розрахунку співвідношення Т-вектору до фрагменту, що клонується, використовували наступну формулу [279]:

$$Insert [ng] = \frac{100 \text{ ng Vector} * m.n.n. Insert}{m.n.n. Vector} * \frac{3}{1} \quad (2.3), \text{ де}$$

Insert – фрагмент, що клонується;

Vector – Т-вектор.

Реакцію лігування проводили у 20 мкл реакційної суміші, що містила 1х лігазний буфер (50 mM Tris-HCl (pH 7.8); 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM АТР); 1 мкл Т-вектору (0,1 мг/мл); 1-5 мкл вставки (0,1 мг/мл); 100 од. Т4 ДНК лігази (СибЭнзим, РФ). Температурний режим складав ніч за температури 4-7°C.

2.7.3. Отримання компетентних клітин

Компетентні клітини отримували за допомогою кальцієвого методу, модифікованого Mandel M. & Higa A. (1970 р.) [327,328]. Штам DH5α *Escherichia coli* («Invitrogen», США) розсівали штрихом на чашки Петрі з LB-агаром без додавання антибіотику за стерильних умов [329]. Інкубацію проводили впродовж ночі при 37°C до появи окремих колоній. Кілька колоній переносили в 50 мл середовища SOB (2% бакто-тріптон, 0,5% дріжджовий екстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) та культивували при 37°C на шейкері з інтенсивною аерацією до оптичної густини OD₆₀₀ = 0,3-0,5. Суспензію клітин швидко поміщали в лід на 10 хв. Бактерії осаджували центрифугуванням впродовж 10 хв при 4 тис. об/хв. та 4°C. Клітинний осад, що утворився, ресуспендували у 25 мл стерильного та охолодженого 0.1 М CaCl₂ та витримували протягом 1 год. Суспензію

бактерій центрифугували 10 хв при 4 тис. об/хв. з наступним ресуспендуванням у 4 мл розчину, що містив 0.1 М CaCl_2 та 15% (v/v) гліцерин. Отримані клітини аліквотили по 100 мкл та зберігали протягом доби за +4-7°C або довше за -70°C.

2.7.4. Проведення процедури трансформації

Процедуру трансформації клітин проводили за стандартною методикою [329].

В пробірку зі 100 мкл компетентних клітин DH5 α вносили 10 мкл лігазної суміші. Клітини інкубували впродовж 30 хв при +4-7°C. Після чого піддавали процедурі «теплого шоку», витримуючи 40 с при 42°C з наступним швидким охолодженням до 0°C (льодяна баня). До клітин додавали 800 мкл поживного середовища LB (1% NaCl, 1% тріптон, 0.5% дріжджовий екстракт, рН 7.0), пробірку поміщали у шейкер-інкубатор і інкубували впродовж 1 год. при 37°C та 80 об/хв. Далі суміш висівали на чашку Петрі з середовищем LB, 1,5% бакто-агаром, 100 мкг/мл ампіциліну, 4 мкл (200 мг/мл) ізопропіл- β -D-тіогалактозидом (IPTG), 40 мкл 2% X-Gal та інкубували впродовж ночі при 37°C.

2.7.5. Відбір та аналіз клонів-трансформантів

Вектор pBluescript II SK(+)-T містить у своєму складі ген стійкості до ампіциліну та ген β -галактозидази, що дозволяє проводити «біло-блакитну» селекцію рекомбінантних клонів. Даний підхід полягає в тому, що незмінні клітини утворюють блакитні колонії, в той час як носії рекомбінантної ДНК-білі.

Таким чином з чашки Петрі відбирали лише білі колонії, які пересівали у 3 мл рідкого середовища LB з ампіциліном. Пробірки інкубували у шейкері-інкубаторі впродовж ночі при 37°C та 250 об/хв. Нічну культуру

використовували для виділення плазмідної ДНК. Для цього клітини *E. coli* осаджували центрифугуванням впродовж 1-3 хв при 12-14 тис. об/хв. Далі плазмідну ДНК виділяли на силікагелі за допомогою методу, який описано у підрозділі 2.3.4.

Наявність у плазмідному векторі відповідної вставки ДНК та її орієнтацію перевіряли за допомогою ПЛР зі специфічними праймерами та рестрикційного аналізу. Послідовність праймерів та умови ампліфікації наведено у підрозділі 3.4.3.10.

Отриману рекомбінантну пДНК зберігали при -20°C . Для довготривалого зберігання рекомбінантних штамів *E. coli* 800 мкл нічної культури в середовищі LB змішували з 200 мкл 100% стерильного гліцерину та заморожували при -70°C .

2.8. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку даних здійснювали з використанням стандартних комп'ютерних програм "POPGENE 1.32" і "ANOVA" (пакет STATISTICA 7). У всіх досліджуваних групах тварин за кожним локусом виконано розрахунок частот алельних і генотипових варіантів. Статистичну значимість відмінностей частот алелей між вибірками оцінювали за допомогою χ^2 критерію Пірсона [330-332].

Асоціація між поліморфними варіантами досліджуваних локусів і ознаками молочної продуктивності аналізувалась за допомогою GLM процедури програми STATISTICA. Кореляційний та регресійний аналіз проведено із використанням 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). Дослідження кожного зразку проводили в подвійному повторі. Статистичну обробку даних проводили за

допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2013.

2.9. Засоби вимірювальної техніки та устаткування

- прилад для проведення ПЛР GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, США) та ПЛР у реальному часі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems, США), iQCyler (BioRad, Франція) та CFX96 (BioRad, США);
- настільний ПЛР-бокс Airstream® (Esco, Сінгапур);
- бокс біологічної безпеки Streamline® II класу (Esco, Сінгапур);
- центрифуга настільна для пробірок ємністю 1,5/2,0 мл MiniSpin Plus (Eppendorf, Німеччина);
- центрифуга-вортекс зі змінним диском на 0,5/1,5 мл Microspin FV–2400 (BioSan, Латвія);
- магнітна мішалка с підігрівом (IKA, США);
- рН–метр (Sartorius, Німеччина);
- біофотометр (Eppendorf, Німеччина);
- твердотільний термостат для пробірок ємністю 0,5/1,5 мл TDB–120 (BioSan, Латвія);
- ваги електронні до 3100 г, дискретність 10 мг (Ohaus RV-3102, КНР);
- ваги електронні до 260 г, дискретність 0,1 мг (Ohaus Adventurer Pro AV КНР);
- джерело живлення для електрофорезу PowerPack Basic (Bio-Rad, США);
- камера для горизонтального електрофорезу Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США);
- транслюмінатор для огляду гелів за довжини хвилі УФ-випромінювання 365 нм UView™ (Bio-Rad, США);
- шейкер-інкубатор ES-20/60 (BioSan, Латвія);
- ножовий млин Grindomix GM 200 (Retsch, Німеччина);
- побутова морозильна камера з температурним режимом не вище -18°C (Gorenje, Сербія);

- побутовий холодильник з температурним режимом + 4-8°C (Gorenje, Сербія);

набір автоматичних дозаторів змінного об'єму: 0,5–10 мкл, 2–20 мкл, 10–100 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 500–5000 мкл відповідно до ДСТУ ISO 9001 (Eppendorf, Німеччина).

Перелік наукових робіт, в яких опубліковані власні методики і матеріал дослідження:

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.

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

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.

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., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Біотехнологія рослин: практикум. К.: Аграр Медіа Груп, 2011. 215 с.

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.

Облап Р. В., Гриневич Н. Є., Новак Н. Б., Димань Т. М. 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.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підписавши у 2014 році Угоду про асоціацію з ЄС, Україна взяла на себе низку зобов'язань, які стосуються поступового створення зони вільної торгівлі з державами-членами Європейського Союзу. Упродовж перехідного десятирічного періоду уряд України має проводити послідовну політику «гармонізації» вітчизняного законодавства в напрямі поглиблення співпраці з європейськими інтеграційними об'єднаннями. «Гармонізація» українських законів відбувається двома шляхами: перший – це приєднання до міжнародно-правових документів, які закріплюють міжнародні стандарти у певній галузі. Другий – ухвалення внутрішніх правових актів, положення яких відповідають нормам права ЄС. 20 вересня 2015 року набув чинності один з євроінтеграційних законів, ухвалених Верховною Радою №4179-а «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів». Його прийняття передбачає запровадження в Україні нової моделі європейської системи безпечності та якості харчових продуктів. Основа її функціонування – принцип «від лану до столу», що передбачає безпеку та якість всіх стадій виробництва харчових продуктів, а також застосування системи НАССР – визначення небезпечних чинників і контроль «критичних точок» виробництва безпечної продукції. Крім того, 18 травня 2017 року було ухвалено ще один Закон України № 2042-VIII «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» [333, 334].

Згідно оновленого законодавства, реалізацію функцій контролю та нагляду покладено на єдиний контролюючий орган для всієї харчової продукції – «Державну службу України з питань безпечності харчових

продуктів та захисту споживачів» («Держпродспоживслужба»). Новостворені управління безпечності харчових продуктів та ветеринарної медицини в областях мають реалізовувати державну політику в галузі ветеринарної медицини, забезпечувати проведення державного ветеринарно-санітарного нагляду (контролю) за здоров'ям та благополуччям тварин, безпечністю та окремими показниками якості харчових продуктів, неїстівних продуктів тваринного походження, кормів та інших об'єктів санітарних заходів, організовувати та контролювати здійснення протиепізоотичних заходів, координувати діяльність державних установ ветеринарної медицини.

Тим часом для успішної реалізації інтегрованого підходу «від лану до столу» недостатньо лише ухвалення самого Закону. Існує нагальна потреба в затвердженні низки підзаконних актів, навчанні висококваліфікованих інспекторів/аудиторів, створенні та оптимізації мережі випробувальних лабораторій, а також розробленні та затвердженні сучасних високочутливих процедур і методів, які б уможливили контроль безпечності та якості харчової продукції на всіх етапах її виробництва.

3.1. Оцінювання показників безпечності та якості продукції тваринництва за використання молекулярно-генетичних методів

Нині для оцінювання безпечності та якості продукції агропромислового виробництва використовують цілий арсенал вимірювальних методів, у тому числі фізичні, хімічні, фізико-хімічні, біологічні, фізіологічні, технологічні та ряд інших [335, 336]. Розвиток сучасної біологічної науки дає змогу розробити методичні підходи не тільки для контролю мікробіологічного забруднення харчової продукції, моніторингу епізоотологічного стану в господарствах, а також для оцінювання генетичного потенціалу сільськогосподарських тварин з метою коригування як показників продуктивності, так і технологічних властивостей кінцевого продукту [21].

3.1.1. Визначення потенціалу молочної продуктивності великої рогатої худоби за аналізом поліморфізму QTL-генів

Стрімкий розвиток генетики, молекулярної біології та генної інженерії сприяв активному впровадженню молекулярно-генетичних і генетико-біохімічних методів і підходів у різних галузях не тільки фундаментальної біологічної науки, але й прикладних напрямів сільськогосподарської науки. Так, розвиток сучасного тваринництва, орієнтованого на одержання високопродуктивного поголів'я тварин, стійких до впливу різних факторів абіотичного і біотичного стресу, базується безпосередньо на аналізі спадкового генетичного матеріалу [337,338], тобто турбота про безпечність і якість готових харчових продуктів має розпочинатись задовго до суто технологічного процесу їх виробництва. У зв'язку з цим розроблення і запровадження у практику тваринництва методів і підходів щодо оцінювання ознак продуктивності сільськогосподарських тварин є своєчасним і актуальним завданням.

Більшість господарсько-цінних селекційних ознак сільськогосподарських тварин носять полігенний характер, який обумовлений впливом багатьох генів та генних комплексів, а також різних факторів зовнішнього середовища. Однак виділяють гени або цілі комплекси генів, внесок яких у прояв тієї або іншої ознаки продуктивності є більш значущим і має чітко виражений ефект. Такі гени одержали назву головних генів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci, QTL) [339].

Молекулярно-генетичні методи досліджень дають змогу визначати різні алельні варіанти певного локусу ДНК, які або безпосередньо впливають на прояв ознаки, або пов'язані з QTL. Це дає змогу картування цього локусу та проведення добору тварин безпосередньо за генотипами, тобто за генетичними маркерами. Для оцінювання господарсько-корисних ознак продуктивності найбільш інформативним виявився підхід позиційного картування, який дає змогу одночасно оцінювати стан багатьох елементів

геному, представлених на всіх хромосомах [340,341]. Цей напрям отримав назву «маркер-асоційовано селекції» (Marker Assisted Selection, MAS), і його активно запроваджують у країнах з розвиненим тваринництвом [342,343,344].

Таким чином, маркер-асоційована селекція сприяє інтенсифікації сільськогосподарського тваринництва. Досвід країн з розвиненим тваринництвом демонструє ефективність застосування генетичних маркерів (ДНК-маркерів), що пов'язані з кількісними ознаками молочної продуктивності ВРХ [345-348]. Їх використання дає змогу оцінити та спрогнозувати генетичний потенціал продуктивності тварин, що може бути використано для прискорення селекційного процесу та одержання високопродуктивного поголів'я ВРХ, що характеризуються покращеними технологічними властивостями молока та його оптимальним складом [349].

До основних селекційних ознак, що характеризують якість молока, його склад, технологічні та біологічні властивості, відносять уміст білка і жиру, фізико-хімічні показники, а також сиропридатність [350]. Спектр генів-кандидатів, пов'язаних з параметрами молочної продуктивності ВРХ, включає гени основних білків молока, гени гормонів, що їх контролюють, а також гени, продукти яких відіграють значну роль у формуванні або регуляції біохімічних та фізіологічних процесів в організмі, наприклад, ліпідного та протеїнового обміну [351]. Сам ген-кандидат має характеризуватися високим рівнем поліморфізму, який пов'язаний з варіативністю бажаного показника продуктивності. Ступінь впливу і рівень інформативності більшості маркерних генів та їх алельних варіантів залежить від генофонду конкретної популяції (т.з. «груповий генотип»). Впровадження в селекційний процес ДНК-маркерів має неодмінно супроводжуватися вивченням взаємозв'язку окремих генотипів з показниками продуктивності з урахуванням «групового генотипу» всієї популяції [352,353].

Для розроблення та відпрацювання методології дослідження генетичної структури ВРХ за генами господарсько-корисних ознак було

розглянуто поліморфізм потенційних генів-маркерів молочної продуктивності, зокрема κ -казеїну (*CSNK*), β -лактоглобуліну (*BLG*) та пролактину (*PRL*). Ген κ -казеїну було обрано у зв'язку з тим, що його пов'язують з ознаками білково-молочності та технологічними властивостями молока. Літературні джерела свідчать, що алель В κ -казеїну (*CSNK B*) асоційований з вищим умістом білка у молоці та, своєю чергою, більшим виходом сиру [354,355]. Ген β -лактоглобуліну відносять до другого за значущістю маркера молочної продуктивності BPX та технологічних властивостей молока. Алель BLG В пов'язаний з високим умістом казеїнових білків, більшим відсотком жиру та кращими параметрами казеїнового коагулянту, тимчасом алель BLG А асоціюється з високим умістом сироваткових білків та загальним надоем [356]. Стосовно гена пролактину, він бере участь у диференціюванні епітеліальних клітин молочної залози, ініціації і підтриманні лактації, регуляції синтезу молочних білків та жирів. Відповідно до даних літературних джерел, спостерігається негативна кореляція між жирністю молока та генотипом ВВ гена *PRL* [357].

У зв'язку з тим, що технологічні властивості молока є полігенною ознакою та формуються під впливом не тільки генів білків молока, але й низки гормонів, дослідження останніми роками дедалі більше зосереджені на вивченні комплексних генотипів різних комбінацій генів. Наприклад, вже описано вплив на показники молочної продуктивності BPX таких фенотипічних комбінацій як *CSNK/BLG* [358], *CSNK/PRL/GH* [359], *CSNK/BLG/PRL/GH* [360] та ряду інших [361].

3.1.1.1. Визначення генотипів *CSNK*, *BLG* та *PRL*, асоційованих з молочною продуктивністю BPX

Сьогодні у багатьох генетичних центрах світу здійснюється генотипування BPX за допомогою таких молекулярних маркерів як *CSNK*, *BLG* та *PRL*, поліморфізм яких тісно пов'язаний з такими основними

показниками молочної продуктивності ВРХ, як загальний надій, вміст білка та жиру, технологічні властивості молока.

Ген к-казеїну (*CSNK*, *CSN3*) ВРХ локалізований на 6 хромосомі та має розмір приблизно 13 000 п.н. Він складається з 5 екзонів загальною довжиною 850 п.н та 4 інтронів. Для ВРХ описано тринадцять алельних варіантів *CSNK* (A, B, C, D, E, F, G, H, J, I, X, Az, Al), однак з найбільшою частотою зустрічаються лише два – А і В. Ці алелі різняться між собою двома амінокислотними замінами в 136 та 148 положеннях поліпептидного ланцюга. Амінокислотні заміни спричинені точковими мутаціями С→Т та А→С відповідно, в положеннях 5309 та 5345 послідовності ДНК [354,355,360].

Доведено, що алель В гена *CSNK* має позитивну кореляцію з вищим вмістом загального білка в молоці, підвищеним вмістом к-казеїну, а також кращою сиропридатністю молока. Численні дослідження продемонстрували, що високоякісні тверді сири можуть бути виготовлені лише з молока корів з генотипом ВВ. Крім того, таке молоко характеризується більшим виходом сиру порівняно з молоком корів, що несуть генотипи АА та АВ. У зв'язку з зазначеним вище, алель В гена *CSNK* може бути запропонований до використання в селекційних програмах господарств як генетичний маркер молочної продуктивності ВРХ [361-364].

Як мішені для ампліфікації фрагменту гена *CSNK* розміром 273 п.н. було обрано праймери, описані S. Kamiński та L. Figiel (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 [365]. Послідовність обраних праймерів наведено у таблиці 3.1.

Ген β-лактоглобуліну (*BLG*) ВРХ, що кодує основний білок сироватки молока, локалізовано на 11 хромосомі, має розмір 4 662 п.н., складається з 7 екзонів та 6 інтронів. Сьогодні описано 10 алельних варіантів гена *BLG* (A, B, C, D, E, F, G, I, J, W), однак з найбільшою частотою зустрічаються чотири алелі – А, В, С і D. У європейської худоби домінують алелі А і В [366,367].

Поліморфізм алельних варіантів *BLG* обумовлено точковими мутаціями в I, II, III та IV екзонах послідовності ДНК. Як наслідок, відбулися амінокислотні заміни Glu→Gln в позиції 45 (варіант D), Gln→His в позиції 59 (варіант C), Asp→Gly в позиції 64 (варіант B) та Val→Ala в позиції 118 (варіант A) поліпептидного ланцюга [368,369].

Результати численних досліджень з вивчення зв'язків між поліморфними формами *BLG* та показниками молочної продуктивності ВРХ встановили їх вплив на склад та технологічні властивості молока. Рядом авторів було показано асоціацію генотипу *BLG* BB з вищою жирністю молока, високим вмістом казеїнових білків та кращими параметрами казеїнового коагуляту [370,371]. Тим часом генотип AA був асоційований з вищими надоями, більшим виходом молочного білка та вищим вмістом сироваткових білків [372,373]. Крім того, рядом дослідників було показано зв'язок гетерозиготного генотипу *BLG* AB з високими показниками надоїв, більшим умістом білка та жиру у молоці [374].

Для ампліфікації фрагменту гена *BLG* розміром 247 п.н. було обрано праймери, описані Medrano та Aguilar-Cordova (1990). Продукт ампліфікації включав у себе ділянку IV екзону гена *BLG*, що давало змогу визначати алельні варіанти A і B [375]. Послідовність обраних праймерів наведено у таблиці 3.1.

Ген пролактину (PRL) ВРХ локалізований на 23 хромосомі, має довжину 9 388 п.н. та складається з 5 екзонів і 4 інтронів [376-378]. В літературі описано понад 20 однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) у різних регіонах гена [379, 380]. До найбільш вивченого SNP можна віднести транзицію A→G у 103 кодоні III екзону гена, яка зумовлює появу сайту рестрикції RsaI. Поліморфізм за цим сайтом дає змогу діагностувати алельні варіанти A і B методом ПЛР-ПДРФ [381-383]. Для даного поліморфізму встановлено статистично достовірні асоціації з показниками молочної продуктивності та показано взаємозв'язок алельних варіантів гена з такими господарсько-цінними ознаками як надій, вміст білку і жиру, вихід сиру [384-386]. Крім

того, велику кількість досліджень присвячено поліморфізму, що виник у 8398 положенні IV екзону гена пролактину. Даний SNP пов'язаний з нуклеотидною заміною G→A, яка також визначається за допомогою ендонуклеази рестрикції RsaI і дає змогу типувати алельні варіанти A і G [378]. Встановлено, що алельний варіант G має позитивну кореляцію з вищим рівнем надоїв, виходом молочного жиру та білка. Тварини з генотипом AG характеризувалися найбільшим надоєм, натомість з генотипом GG – вищим умістом жиру [378,387,388]. У зв'язку з тим, що пролактин відіграє важливу роль у розвитку молочної залози, ініціюванні та підтриманні лактації, ген пролактину BPX розглядають як потенційний маркер молочної продуктивності.

Для ампліфікації фрагменту гена *PRL* розміром 294 п.н. нами було обрано праймери, описані Р. Врум (2005). Продукт ампліфікації включав у себе ділянку IV екзону гена і давав змогу визначати алельні варіанти A і G [379]. Послідовність обраних праймерів наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Характеристика олігонуклеотидних праймерів, обраних для визначення поліморфізму генів *CSNK* [364] *BLG* [375] та *PRL* [379].

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина, п.н.	GC- склад, %	Tm, °C	ПЛР продукт, п.н.
CSN _к -F CSN _к -R	gaaatccctaccatcaatacc ccatctacgctagtttagatg	21 21	43 43	59 58	273
BLG-F BLG-R	tgtgctggacaccgactacaaaag gctcccggtatatgaccaccctct	24 24	50 58	68 69	247
PRL-F PRL-R	ccaaatccactgaattatgctt acagaaatcacctctctcattca	22 23	36 39	60 62	294

Підбір умов ампліфікації обраних праймерів та зондів здійснювали за допомогою приладу «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 100 нг геномної ДНК; 5пкМ кожного з праймерів; 67мМ Tris-HCl, pH-8.3; 17мМ (NH₄)₂SO₄; 2,5мМ MgCl₂; 0,1%

Твін-20; 0,12 мг/мл БСА; 8% гліцерину; 0,2мМ дНТФ суміші та 0,2 од. «ДиаТак» Таq-полімерази (Амплиценс®, РФ) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Протокол приготування реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти	Кінцева концентрація в ПЛР-суміші	мкл/реакцію
Таq-буфер 10x	1x	2
дНТФ 2 мМ кожного	0,2 мМ кожного	2
MgCl ₂ 25 мМ	2,5 мМ	2
Таq-полімераза 5 од./мкл	0,05 од./мкл	0,2
Зразок ДНК	100 нг	2
Праймер F 100 пкмоль	5 пкмоль	1
Праймер R 100 пкмоль	5 пкмоль	1
Деіонізована Н ₂ О	-	14,8
Кінцевий об'єм:	25 мкл	

Для проведення ампліфікації було використано класичний трьохстадійний температурний профіль (табл. 3.3). Розрахунок температури гібридизації праймерів (T_a) здійснювали за допомогою формули $T_a \approx T_m - 5$, де T_m – температура плавлення праймерів [241]. Умови ПЛР реакції наведено в таблиці 3.3.

Після закінчення ампліфікації проводили електрофоретичний аналіз отриманих ПЛР-продуктів у 2 % агарозному гелі. Для цього використовували 5 мкл ПЛР-суміші, яку змішували з 5 мкл буферу для нанесення проб (15 % Ficoll-400; 0,02 М Na₃ЕДТА, рН 8,0; 0,15 % ксиленціанол). Розмір отриманих фрагментів ДНК оцінювали за маркером молекулярних мас.

Дослідження поліморфізму обраних генів кількісних ознак проводили методом ПЛР-ПДРФ-аналізу. Для цього продукти ампліфікації піддавали рестрикційному аналізу. Реакційна суміш об'ємом 40 мкл містила 20 мкл ПЛР-суміші, 4 мкл 10x рестрикційного буферу, 0,2 мкл відповідної рестриктази та 15,8 мкл дН₂О. Зразки інкубували впродовж 12–16 годин (ніч) за 37 °С. По завершенню інкубації продукти рестрикції аналізували методом електрофорезу у 3% агарозному гелі. Розмір фрагментів рестрикції

оцінювали за маркером молекулярних мас. Умови рестрикційного аналізу, застосовані ендонуклеази рестрикції та результати ПЛР-ПДРФ аналізу для кожного з досліджуваних генів наведено в таблиці 3.3 [389,390].

Таблиця 3.3

Умови проведення ПЛР-ПДРФ аналізу.

Назва гену	Умови ампліфікації	Рестрикційний аналіз		
		Фермент	Умови реакції	Алелі та фрагменти рестрикції (п.н.)
CSN _K	94°C – 60 с 95°C – 20 с 55°C – 20 с 72°C – 20 с 72°C – 300 с	Hinf I	37°C ніч	A 133, 91, 49 B 224
BLG		Hae III		A 148, 99 B 99, 2 x 74
PRL		Rsa I		A 162, 132 G 294

Для локусу *CSNK* було виявлено три генотипи (рис. 3.1 а). Генотип AA характеризувався продуктами рестрикції розміром 133, 91 і 49 п.н., генотип BB – фрагментом 224 п.н., генотип AB, відповідно – 224, 133, 91 і 49 п.н. Локус *BLG* також характеризувався наявністю трьох генотипів – AA, AB і BB. Гомозигота AA була представлена фрагментами розміром 148 і 99 п.н., гомозигота BB фрагментами – 99, 74 і 74 п.н. Гетерозиготний генотип AB було представлено відповідно фрагментами 148, 2 x 99, 2 x 74 п.н. (рис. 3.1 б). Стосовно *PRL*, за даним локусом також було виявлено три генотипи (рис. 3.1 с). Генотип AA 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.

Таким чином, відпрацьовано методику визначення алельних варіантів трьох найбільш важливих генів кількісних ознак, пов'язаних з молочною продуктивністю ВРХ, що оцінювання генетичного потенціалу тварин для корекції селекційного процесу у бажаному напрямі [391]

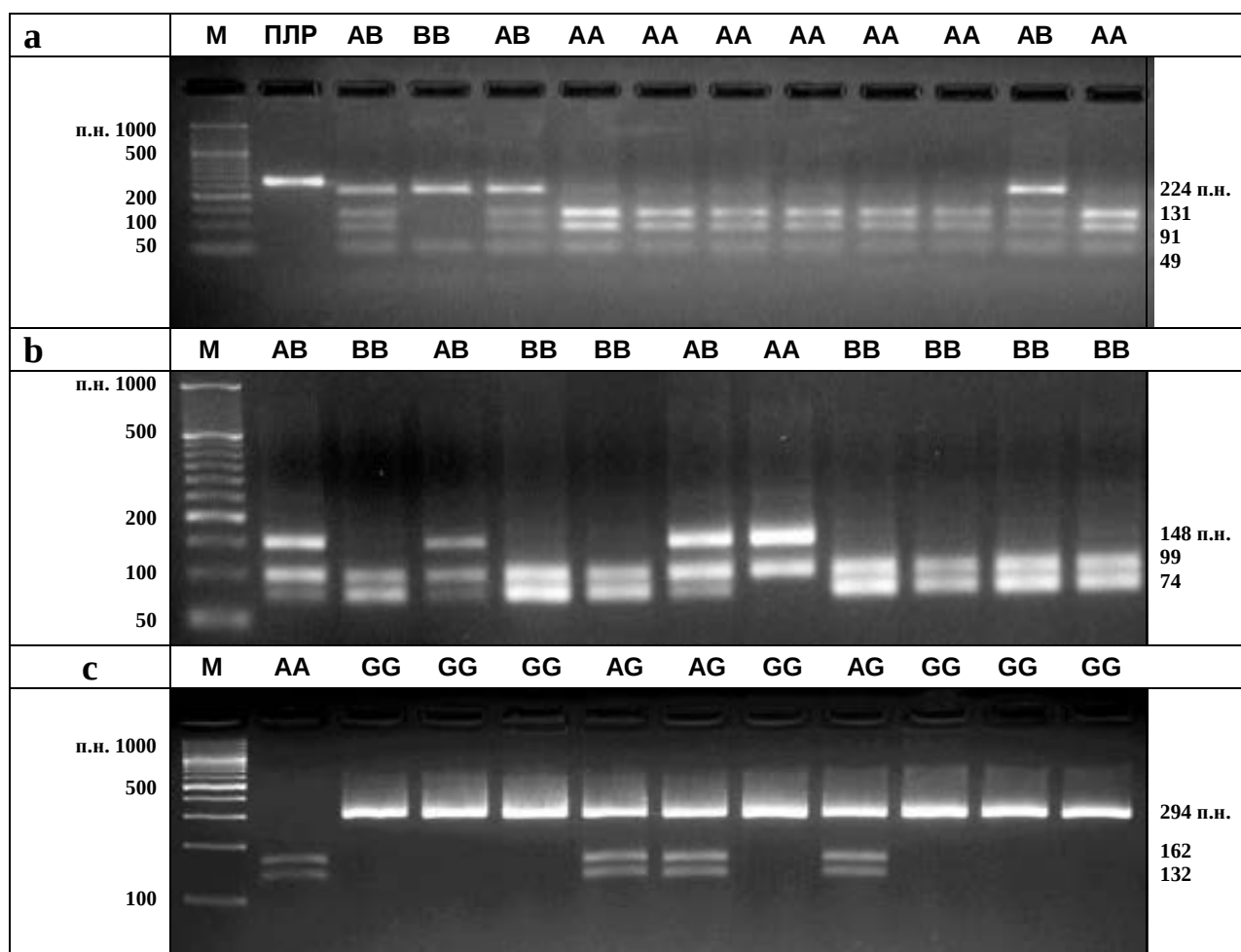


Рис. 3.1. ПЛР-ПДРФ-аналіз поліморфізму генів-кандидатів молочної продуктивності ВРХ: (а) ген κ-казеїну (*CSNK*); (б) ген β-лактоглобуліну (*BLG*); (с) ген пролактину (*PRL*). Оцінку продуктів рестрикції здійснювали за використання маркерів молекулярних мас (М) GeneRuler™ 50bp DNA Ladder або GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Литва).

3.1.1.2. Якісний склад молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами генів *CSNK*, *BLG* та *PRL*

Для оцінювання поліморфізму локусів κ-казеїну, β-лактоглобуліну та пролактину нами досліджено дві популяції української чорно-рябої молочної породи, що відтворювалися у Васильківському (n=251) та Сквирському (n=200) районах Київської області. Матеріалом для досліджень слугували зразки крові та молока. Аналіз генетичної структури двох популяцій української чорно-рябої породи виявив наявність високого рівня поліморфізму за всіма дослідженими локусами.

Для локусу κ-казеїну було виявлено три генотипи – AA, AB та BB.

Переважаючим у двох популяціях виявився алельний варіант А, який зустрічався з частотами 0,894 та 0,903 (табл. 3.4). Частота алеля В становила 0,106 та 0,097, що є характерним для європейських комерційних порід ВРХ. Генотип ВВ було виявлено лише у однієї тварини, яка утримувалася у господарстві «Митниця».

Стосовно β -лактоглобуліну, отримані результати в двох популяціях були зовсім протилежними. Як у першій, так і в другій популяціях було виявлено по три генотипи BLG – АА, АВ і ВВ. Але найбільш цінний алельний варіант BLG В, який пов'язують з високим умістом жиру та казеїнових білків у молоці, переважав у популяції ВРХ з «Митниці». Частота алеля BLG В у даній популяції становила 0,639, тимчасом BLG А – 0,361. І навпаки, в популяції, що відтворювалась в господарстві «Агрофірма Колос», переважаючим був алель А з частотою 0,630 (табл. 3.4). Водночас частоти гетерозиготного генотипу АВ в обох популяціях практично однакові – 0,474 та 0,400.

Локус пролактину також було представлено трьома генотипами – АА, АГ і GG. Однак слід зазначити, що тварини с генотипом АА були присутні лише в господарстві «Агрофірма Колос». Як у першій, так і в другій популяції ВРХ переважав господарсько-цінний алельний варіант PRL G з частотами 0,881 та 0,880 відповідно (табл. 3.4).

Наступним етапом роботи було встановлення взаємозв'язків між виявленими генотипами та комплексами генотипів корів за генами кількісних ознак молочної продуктивності, такими як загальний надій, вміст % жиру та білка.

У таблиці 3.5 наведено дані щодо співвідношення всіх виявлених генотипів досліджених локусів кількісних ознак та основних параметрів молочної продуктивності популяції української чорно-рябої молочної породи з господарства «Митниця».

Серед дослідженого поголів'я найвищою молочною продуктивністю характеризувалися тварини з генотипами BLG АА (4435 кг) та PRL АГ (4216

кг). Такі тварини становили 12,4 % (n=31) та 23,9 % (n=60), відповідно. Найменші надой було виявлено у тварин с 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 у однієї тварини.

Таблиця 3.4

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

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

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). Тварини з іншими генотипами не відрізнялися між собою за даним показником.

За вмістом % білка у молоці 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.

Крім того, нами проведено оцінку генетичної структури двох популяцій української чорно-рябої худоби за трьома локусами одночасно. У таблиці 3.6 представлені співвідношення комплексних генотипів досліджених локусів кількісних ознак та основних параметрів молочної продуктивності корів з господарств «Митниця» та «Агрофірма Колос». Із 27 теоретично можливих комплексних генотипів було виявлено 13 в популяції корів господарства «Митниця» та 9 в популяції «Агрофірма Колос» (табл. 3.7). В першій популяції найбільш чисельними виявились такі комплекси генотипів як CSNK AA / BLG AB / PRL GG та CSNK AA / BLG BB / PRL GG. Їх частота становила 32,3 та 23,0 %, відповідно. У популяції тварин господарства «Агрофірма Колос» переважали три комплекси генотипів, зокрема CSNK AA / BLG AA / PRL AG, CSNK AA / BLG AA / PRL GG та CSNK AA / BLG AB / PRL GG. Їх частоти становили 15,5, 21,0 та 29,0 %, відповідно. Частоти інших виявлених комплексних генотипів не перевищували 10 %.

Серед дослідженого поголів'я двох популяцій української чорно-рябої молочної породи найвищу продуктивність (4413–5537 кг) спостерігали у корів з генотипами CSNK AA / BLG AA / PRL AG та CSNK AA / BLG AA / PRL GG. Також високий рівень надоїв (4557 кг) було зафіксовано у корів з генотипом CSNK AB / BLG AA / PRL AG господарства «Митниця». Частка даних комплексних генотипів у тварин господарства «Митниця» відповідно становили 4,4, 5,6 та 1,6 %. Дещо більший відсоток тварин з зазначеними генотипами спостерігали в господарстві «Агрофірма Колос» – 15,5 та 21 %, відповідно.

За показниками жирності молока в популяції господарства «Митниця» мали перевагу тварини с генотипами CSNK AA / BLG AA / PRL AG (3,47%), CSNKAA / BLGAA / PRLGG (3,48%) та CSNKAA / BLGAB / PRLGG (3,45%).

Таблиця 3.5

Показники молочної продуктивності популяції корів української чорно-рябої молочної породи ВРХ 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

Таблиця 3.6

Порівняльна характеристика показників молочної продуктивності популяцій української чорно-рябої молочної породи ВРХ 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).

Таблиця 3.7

Розподіл частот комплексів генотипів за локусами трьох генів кількісних ознак (*CSNK*, *BLG*, *PRL*) в двох популяціях української чорно-рябії молочної породи

№	<i>CSNK/BLG/PRL</i>	«Митниця», n=251		«Агрофірма Колос», n=200	
		n	%	n	%
1	AA/AA/AA	0	0,0	3	1,5
2	AA/AA/AG	11	4,4	31	15,5
3	AA/AA/GG	14	5,6	42	21,0
4	AB/AA/AG	4	1,6	0	0,0
5	AB/AA/GG	2	0,8	10	5,0
6	AA/AB/AG	18	7,2	11	5,5
7	AA/AB/GG	81	32,3	58	29,0
8	AB/AB/AG	5	2,0	0	0,0
9	AB/AB/GG	15	6,0	11	5,5
10	AA/BB/AG	17	6,7	0	0,0
11	AA/BB/GG	58	23,0	16	8,0
12	AB/BB/AG	5	2,0	0	0,0
13	AB/BB/GG	20	8,0	18	9,0
14	BB/BB/GG	1	0,4	0	0,0

Частка таких генотипів у популяції становила 4,4, 5,6 та 7,2 %, відповідно. Стосовно другого господарства, незважаючи на відносно вищий загальний показник масової частки жиру в молоці (3,84–3,88 %) суттєвих статистично значущих відмінностей між групами тварин з різними комплексними генотипами виявлено не було. Виняток становила група тварин с генотипом *CSNK* AB / *BLG* BB / *PRL* GG, молоко яких характеризувалося дещо меншим умістом жиру (3,63 %). Відсоток таких тварин в господарстві становив 9,0.

Стосовно 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 популяції становила 0,8 та 2,0 %, відповідно. Статистично значущих відмінностей за даним показником в популяції корів господарства «Агрофірма Колос» виявлено не було.

Таким чином, встановлено взаємозв'язок як окремих генотипів локусів *CSNK*, *BLG*, *PRL*, так і їх комплексів з показниками молочної продуктивності

на прикладі двох популяцій української чорно-рябої молочної худоби. Отримані результати доцільно розглядати як додатковий критерій під час проведення селекційно-племінних робіт з метою підвищення кількісних та якісних характеристик молока.

3.1.2. Вплив комбінацій генетичних варіантів *CSNK*, *BLG* та *PRL* на сиропридатність молока

Молоко корів різних порід ВРХ різняться не тільки своїми фізико-хімічними властивостями, жирністю та вмістом білка, а й здатністю до сироваріння. Як показують численні дослідження, сиропридатність молока є спадково обумовленою та залежить від комбінації певних генотипів [392-395]. Зростаючі потреби виробництва білкової продукції диктують необхідність швидшого впровадження молекулярно-генетичних і селекційних методів та підходів для підвищення економічної ефективності молочного скотарства. В Україні селекційна робота у молочному скотарстві є спрямованою передусім на підвищення надоїв та жирно- і білковомолочності. Стосовно технологічних властивостей молока, наразі їм не приділяється належна увага.

Матеріалом для досліджень слугували зразки молока від популяції корів української чорно-рябої породи з господарства «Агрофірма Колос». З огляду на те, що в даній популяції було 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 кожна. Тривалість сичужного зсідання молока визначали шляхом нагрівання молока до 35 °C у присутності молокозсідального препарату Maxiren 1800 (“DSMF.S.”, Голандія). Час фіксували з моменту утворення перших пластівців згустку. Кожен зразок аналізували у трьох повтореннях.

Аналіз отриманих даних показав, що сиропридатність молока дещо різниться у корів з різними комплексними генотипами *CSNK* / *BLG* / *PRL*

(табл. 3.8). В цілому молоко корів дослідженої популяції було придатним для виготовлення сиру, оскільки тривалість його зсідання не перевищувала 40 хв. Утворені під впливом ферменту згустки були однорідними і щільними, лише іноді розірваними, сироватка була переважно прозорою. 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. Найдовше, приблизно 32,2 хв, сичужне зсідання тривало у молоці від корів з комплексним генотипом *CSNK AA / BLG AA / PRL AG*. За тривалістю сичужного зсідання молока від мінімальної до максимальної комплексні генотипи *CSNK / BLG / PRL* можна розподілити у наступній 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 *BPX* визначає експресія алельних варіантів *CSNK B* і *BLG B* та меншою мірою *PRL G*.

Таблиця 3.8

Зв'язок комплексних генотипів *CSNK / BLG / PRL* з тривалістю сичужного зсідання молока на прикладі популяції корів української чорно-рябої молочної породи

№	Комплексний генотип <i>CSNK / BLG / 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

Таким чином, встановлено зв'язок технологічних характеристик молока, зокрема сиропридатності, з окремими генотипами генів κ -казеїну, β -

лактоглобуліну та пролактину. Отримані результати свідчать про можливість прогнозування бажаних генотипів та ведення селекції у заданому напрямі.

3.1.3. Діагностика поголів'я ВРХ на присутність вірусу лейкозу ВРХ

Харчові продукти та сировина тваринного походження є потенційним джерелом різних патогенів бактеріального та вірусного походження, здатних зашкодити здоров'ю людини. Забруднення харчової продукції може відбуватися на всіх етапах виробництва, починаючи з господарств, де розводять та утримують тварин [21]. З огляду на це, одним із головних завдань державної ветеринарної та фітосанітарної служби є своєчасне виявлення та локалізація джерел інфекції. На жаль, деякі захворювання не мають яскраво виражених клінічних ознак прояву, крім того, спектр та поширеність збудників хвороб постійно змінюється. До однієї з таких хвороб належить і лейкоз великої рогатої худоби (ЛВРХ).

Лейкоз ВРХ є одним із найбільш розповсюджених злоякісних захворювань сільськогосподарських тварин вірусної етіології. Збудником хвороби є РНК-вмісний онкогенний вірус типу С (BLV, ВЛ ВРХ) який належить до родини *Retroviridae* роду *Deltaretrovirus* [396]. Життєвий цикл вірусу передбачає обов'язкову стадію інтегрування ДНК-копії (провірусу) вірусного геному в геном інфікованої клітини. ВЛ ВРХ має близьку морфологічну та еволюційну спорідненість з вірусом Т-клітинного лейкозу людини (HTLV-1,2), тому ЛВРХ є однією з найважливіших проблем як ветеринарної медицини і тваринництва, так і інших галузей, які мають безпосереднє відношення до безпеки та здоров'я людини [397].

Щороку тваринництво зазнає значних економічних збитків від ЛВРХ внаслідок загибелі та передчасного вибраковування високопродуктивних особин, зниження продуктивності та зменшення строку господарського використання тварин, погіршення якості молока і м'яса та витрат на

протилейкозні заходи. Крім того, дотепер залишається відкритим питання безпеки молока, отриманого від інфікованих тварин. Тому молоко від хворих на ЛВРХ тварин заборонено до використання, а молоко вірусоносіїв дозволено до переробки після процесу пастеризації [398–400]. Рядом дослідників доведено, що молоко та м'ясо хворих на ЛВРХ тварин містять шкідливі метаболіти триптофану, лізину та інших циклічних амінокислот, які мають яскраво виражені канцерогенні властивості та можуть бути небезпечними для людини [401,402]. Тим не менше, дотепер немає переконливих доказів щодо шкоди самого вірусу BLV для здоров'я людини [403,404].

Географія ЛВРХ досить широка, захворювання розповсюджено на всіх континентах та у всіх країнах світу. Україна, де впродовж десятиліть це захворювання залишається серйозною проблемою вітчизняного тваринництва, не є винятком [405].

Важливою умовою для профілактики та боротьби з лейкозом ВРХ є своєчасна достовірна діагностика та ізоляція інфікованих тварин. У вітчизняній практиці лабораторної діагностики ВЛ ВРХ широко застосовують реакцію імунодифузії (РІД) як найбільш доступний та технологічний, хоча і менш чутливий та специфічний метод, ніж імуноферментний аналіз (ІФА). В останнє десятиріччя набув популярності метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та його численні модифікації, завдяки чому з'явилась можливість виявляти мінімальні кількості копій провірусної ДНК у латентному періоді хвороби. Діагностичним матеріалом зазвичай слугують цільна кров або сироватка, в яких містяться специфічні антитіла або сам збудник [406].

На жаль, усі зазначені вище методи діагностики ВЛ ВРХ мають такий спільний недолік, як необхідність відбирання крові у тварин. Зазвичай такі маніпуляції є певним фактором стресу, що негативно впливає на рівень надоїв і може призводити до загального недоотримання молока. Використання молока як діагностичного матеріалу уможливило б значне

спрощення процедури безпосереднього контролю за виробництвом якісної та безпечної молочної продукції [407].

3.1.3.1. Оцінка інформативності молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації ВЛ ВРХ

Останнім часом у світовій літературі з'являються публікації щодо використання молока корів для діагностики ВЛ ВРХ. При цьому застосовують як імунологічні, так і молекулярно-генетичні методи аналізу [408–411]. Молоко як секрет молочних залоз містить у своєму складі достатню кількість соматичних клітин, переважну більшість з яких становлять лейкоцити, морфологічно та функціонально схожі з аналогічними клітинами периферійної крові. Тому молоко тварин також може використовуватись для виділення ДНК. За даними Tagrowski S.P. (1983 р.) в молоці великої рогатої худоби міститься від 10^4 до 10^7 соматичних клітин. Переважно це лейкоцити, але також є невелика фракція (<2%) епітеліальних клітин [412].

Для своїх досліджень ми обрали метод ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR), який набуває дедалі більшої популярності в практиці вітчизняної лабораторної діагностики. На відміну від класичного ПЛР це кількісний метод, який характеризується високою чутливістю, специфічністю та швидкістю виконання. Під час досліджень зразків ДНК з крові та молока на присутність ВЛ ВРХ використовували технологію *TaqMan* методу ПЛР-РЧ [413]. В основу технології *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ покладено 5'-екзонуклеазну активність ферменту *Taq* ДНК-полімерази. Крім того, в реакційну суміш поряд з двома традиційними олігонуклеотидними праймерами додатково вводять ДНК-зонд (Probe). Зонд також є комплементарним до фрагменту ДНК, що має ампліфікуватися та гібридизується між двома праймерами. На 5'-кінці зонда розташований флуоресцентний барвник, тимчасом на 3'-кінці – фосфатна група і гасник

флуоресценції. Гасник поглинає випромінювання від флуоресцентної мітки за умови, якщо молекула зонда є цілою, а фосфатна група в 3'-положенні блокує полімеразу. Під час ПЛР-реакції відбувається розщеплення зонду за рахунок 5'-екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази. Флуоресцентна мітка звільняється від впливу гасника і починає випромінювати флуоресценцію, яка детектується фотооптичною системою приладу. Сигнал флуоресценції зростає прямо пропорційно кількості ПЛР-продукту [241].

В якості молекулярно-генетичних маркерів для визначення провірусної ДНК ВЛ ВРХ зазвичай використовують послідовності вірусних генів *Env*, *Gag* і *Pol* [414]. На основі аналізу літературних джерел та нуклеотидних послідовностей вірусних генів представлених в інтернет базі даних сервера NCBI нами було обрано консервативну ділянку гена *Env*, який кодує поверхневий вірусний глікопротеїд gp51 [324]. Праймери з зондом для проведення ПЛР у реальному часі було розроблено в Українській лабораторії якості та безпеки продукції АПК НУБіП України за допомогою комп'ютерної програми Primer Express™ (Applied Biosystems) [414]. Також було підібрано другу пару праймерів з зондом до гена пріонового білка (*PRNP*) ВРХ. Цю пару праймерів ми використовували як внутрішній ендогенний контроль для перевірки якості виділеної ДНК та перебігу ПЛР-РЧ (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондом для визначення провірусної ДНК BLV

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина, п.н.	GC- склад, %	Tm, °C	ПЛР продукт, п.н.
gp-F	cccctgatcaccttttctttaca	23	43	63	82
gp-R	agggaaccagtcactgttca	20	50	64	
gp-P	atccctgatccccctcaacccga	23	61	72	
prnp-F	acgtgggcctctgcaaga	18	61	66	81
prnp-R	gactgccctgtcctgggtatc	21	62	67	
prnp-P	cgaccaaaacctggaggaggatgga	25	56	71	

Зонд для визначення гена *Env* BLV нами було мічено флуоресційним барвником FAM та гасником флуоресценції BHQ1. Зонд для *PRNP* –

флуоресційним барвником JOE та гасником флуоресценції BHQ1. Теоретичну специфічність олігонуклеотидів було перевірено за використання алгоритму *BLAST* сервера NCBI [325]. Проведений *BLAST*-аналіз показав 100% специфічність обраних олігонуклеотидних праймерів.

Підбір умов ампліфікації обраних праймерів та зондів здійснювали за допомогою приладу ABI PRISM SDS 7000 в 25 мкл реакційної суміші, яка містила 100 нг геномної ДНК, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 0,2мМ dNTP/dUTP суміші, 5 пкМ кожного праймера, 2,5 пкМ зондів, 0,25 мкМ ROX, 0,1 од. урацил-ДНК глікозилази та 1 од. AmliTaq[®]Gold-полімерази (Applied Biosystems). Умови ампліфікації наведено у таблиці 3.10. Флуоресцентний сигнал вимірювали на стадії елонгації (72°C) у кожному циклі ампліфікації.

Таблиця 3.10

Протокол підбору умов ампліфікації, що використовувався для первинної оцінки роботи праймерів.

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Руйнування ампліконів		50	300	ні	1х
2	Початкова денатурація		95	600	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація	60	60	ні	
		Синтез	72	30	так	

Реакційна суміш містила обидві пари праймерів з зондами. За допомогою першої пари (gr) визначали присутність у досліджуваному зразку провірусної ДНК ВЛ ВРХ, тимчасом друга пара (prnp) виступала як внутрішній ендегенний контроль та давала змогу контролювати перебіг ПРЛ-РЧ. Пороговий цикл (Ct) для кожного зразка визначали циклом, за якого кінетична крива флуоресценції перетинала порогову лінію. Базову лінію, що являє собою фоновий рівень флуоресценції, задавали з 3 по 15 цикл ампліфікації. Зразок розглядали як позитивний на присутність провірусної ДНК ВЛ ВРХ тільки в тому випадку, якщо сигнал флуоресценції детектували за двома каналами (FAM і JOE), а значення Ct не перевищувало 40 циклу.

Відповідно, зразок розглядали як негативний у випадку присутності флуоресцентного сигналу лише за каналом JOE. За відсутності сигналів за двома каналами (FAM і JOE) проводили повторне дослідження даного зразка.

Оптимізацію умов ампліфікації у форматі мультиплексу було здійснено за такими основними параметрами, як температура гібридизації праймерів, концентрація праймерів і зондів, а також концентрація $MgCl_2$. Проведені дослідження дали змогу встановити, що оптимальна температура роботи праймерів знаходилася в межах від 58 до 62°C, оптимальна концентрація становила 5 пкМ для праймерів і 2.5 пкМ для зондів, найкращі результати було отримано за концентрації 3 мМ $MgCl_2$. Межа чутливості даної системи становила приблизно 10 копій ДНК-мішені як для вірусу ВЛ ВРХ, так і для ендогенного контролю [414,415].

Ефективність роботи мультиплексної ПЛР-РЧ системи було перевірено шляхом тестування поголів'я української чорно-рябої молочної худоби, яка відтворювалася в умовах агростанції «Митниця» Васильківського району Київської області. Всього було досліджено 251 тварину. Попередньо всіх тварин у рамках регулярно здійснюваних протилейкозних заходів у господарствах України було протестовано за допомогою серологічного методу, зокрема реакції імунодифузії в агарозному гелі (РІД).

Таблиця 3.11

Порівняльний аналіз визначення тварин, інфікованих ВЛ ВРХ

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

На момент відбору зразків крові 6 тварин із 251 були РІД-позитивними. Повторний аналіз шести РІД-позитивних тварин на присутність ВЛ ВРХ за допомогою методу ПЛР-РЧ підтвердив даний діагноз. Перевірка 245 РІД-негативних тварин методом ПЛР-РЧ дала змогу додатково виявити ще одинадцять носіїв вірусу. Отже, загальна кількість інфікованих тварин

становила 17 голів. У таблиці 3.11 та на рисунку 3.2 представлено результати тестування поголів'я корів української чорно-рябої молочної породи господарства «Митниця» на наявність провірусної ДНК ВЛ ВРХ. Таким чином, нами була встановлена значно більша чутливість та специфічність методу ПЛР у реальному часі порівняно з серологічними методами аналізу. Інфікованість дослідженого поголів'я ВРХ після додаткової перевірки зросла з 2,4 до 6,8 %. З огляду на це, даний підхід ми можемо рекомендувати до системи протилейкозних заходів для своєчасного виявлення інфікованих BLV тварин. Застосування ПЛР-діагностики може бути корисним на всіх етапах оздоровлення поголів'я ВРХ від збудника інфекції [416–418].

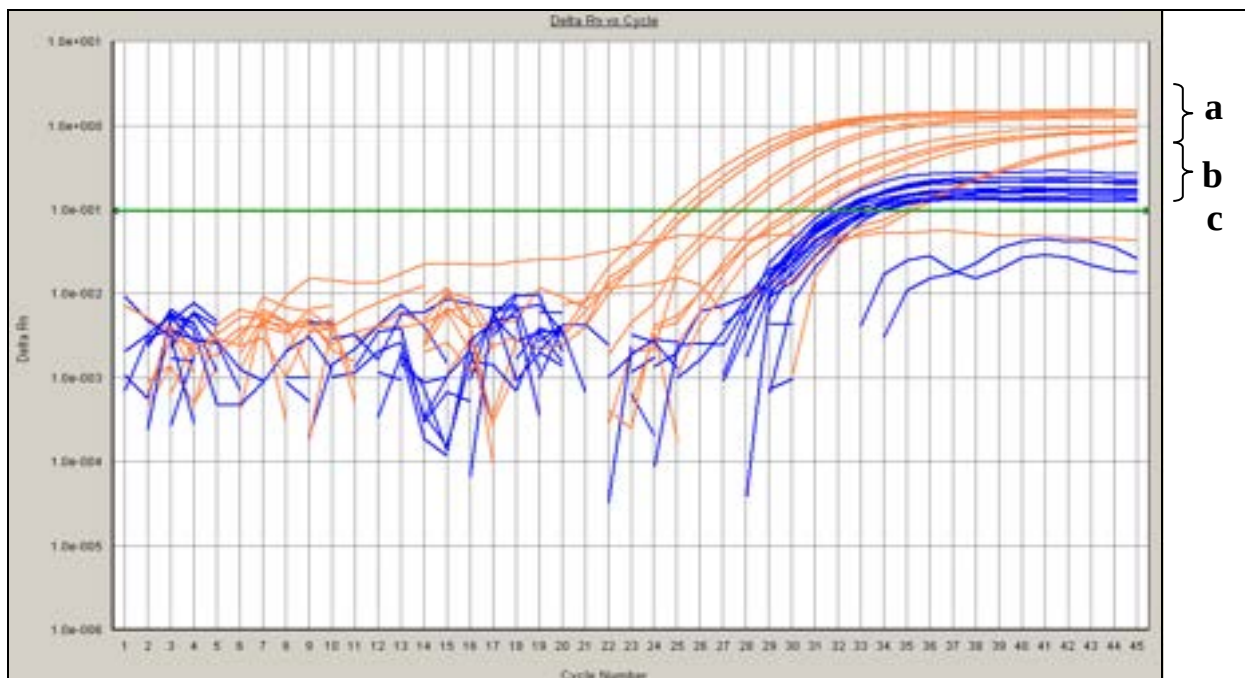


Рис. 3.2. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Діагностика поголів'я ВРХ на присутність у крові провірусної ДНК ВЛ ВРХ: а – провірусна ДНК; б – внутрішній ендogenous контроль; с – порогова лінія.

3.1.3.2. Визначення ВЛ ВРХ у коров'ячому молоці методом ПЛР-РЧ

Для визначення збудника ЛВРХ у молоці ми відбирали зразки молока об'ємом 50 мл від десяти корів української чорно-рябої молочної породи. Зразки відбирали в одноразові стерильні контейнери під кінець доїння. Дев'ять тварин з десяти були інфіковані ВЛ ВРХ, а діагноз підтверджено методом імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA).

Для відпрацювання оптимальної методики виділення ДНК із молока використовували такі загальноприйняті методи, як СТАБ-преципітацію, фенольно-хлороформну екстракцію та сорбцію на силікагелі [391]. Попередньо зразок об'ємом 15 мл центрифугували за температури 4 °C впродовж 30 хв. при $2,000 \times g$. Отриманий осад відмивали в 1 мл PBS, після чого соматичні клітини осаджували впродовж 10 хв. при $13,000 \times g$ та використовували для екстрагування ДНК. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали методом спектрофотометрії за довжини хвилі $\lambda=260$ нм [419].

Всі три випробувані підходи екстракції ДНК з молока дали позитивний результат (табл. 3.12). Найбільшу кількість ДНК за її задовільної якості вдалось отримати у разі використання методу сорбції на силікагелі. Концентрація виділеної ДНК знаходилась у межах 40–80 нг/мкл зі ступенем очищення 1,8–2 за співвідношення оптичних густин λ 260/280. Значно меншу кількість ДНК було отримано за використання фенол-хлороформного та СТАБ-методу. Середні значення концентрацій становили $22,00 \pm 4,27$ нг та $38,70 \pm 6,62$ нг, відповідно. Варто зазначити, що цієї кількості ДНК цілком достатньо для проведення аналізу, хоча вихід ДНК із зразків крові був значно більшим (250–500 нг/мкл) за збереження тієї самої чистоти препарату ДНК.

Таблиця 3.12

Порівняльна характеристика методів виділення ДНК з молока

№ зразка	Методи екстракції ДНК та її вихід, нг		
	СТАБ	Фенол-хлороформ	nSiO ₂ ·mH ₂ O
1	14	29	40
2	25	34	59
3	18	45	65
4	29	47	80
5	21	39	67
6	24	43	73
7	19	27	49
8	20	37	56
9	23	40	78
10	27	46	79
$\bar{X} \pm \sigma$	$22,00 \pm 4,27$	$38,70 \pm 6,62$	$64,70 \pm 12,67$

ПЛР-ампліфікацію у режимі реального часу проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ суміші, 10 пкМ кожного з праймерів, 5 пкМ зонду та 1 од. Taq-полімерази (Thermo Fisher Scientific, Литва). Олігонуклеотидні зонди було мічено флуоресцентними барвниками FAM і HEX. Як гасник флуоресценції використовували BHQ1. Синтез олігонуклеотидних праймерів та зондів, використаних для цього етапу досліджень, замовляли в компанії «Metabion international AG» (Німеччина).

Температурний режим складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 94°C та наступних 45 циклів: денатурації – 20 с за 95°C, гібридизації праймерів – 60 с за 60°C та синтезу – 30 с за 72°C. Флуоресцентний сигнал вимірювався на стадії синтезу у кожному циклі ампліфікації. Граничну лінію та базовий рівень флуоресценції прилад розраховував автоматично по завершенню реакції.

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 залежно від кількості матеріалу, взятого для виділення ДНК. Відповідно, пробу розглядали як негативну, якщо сигнал детектувався лише за каналом HEX (ендогенний контроль), що свідчило про коректне проведення всіх стадій аналізу та відсутність інгібіторів ферментативної реакції в пробі. Якщо флуоресценція була відсутньою за двома каналами (FAM і HEX), проводили повторне дослідження цієї проби зі збільшенням кількості вихідного матеріалу, взятого для виділення ДНК.

Проведений ПЛР-РЧ-аналіз ДНК, виділеної зі зразків крові, повністю підтвердив результати імунологічного тесту. Всі дев'ять ІФА-позитивних зразків показали наявність провірусної ДНК ВЛ ВРХ, десятий зразок виявився негативним як за імунологічним, так і за молекулярно-генетичним методами досліджень. Значення граничного циклу C_t за каналом FAM були в

межах від 26 до 34, за каналом HEX – від 23 до 25.

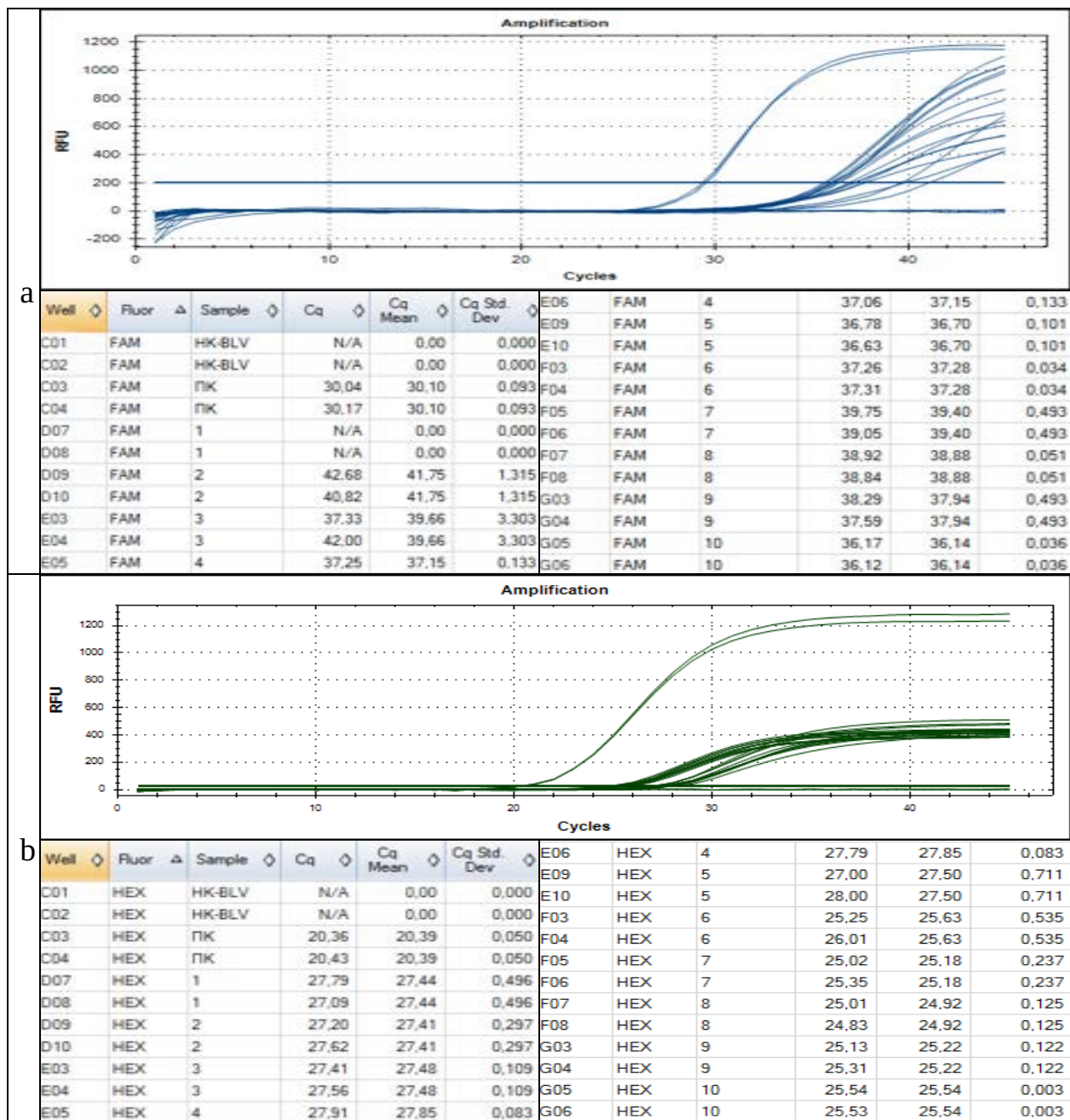


Рис. 3.3. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення величин C_t під час визначення ВЛ ВРХ у молоці: а – провірусна ДНК; б – внутрішній ендогенний контроль.

Для порівняльної оцінки використання альтернативного діагностичного матеріалу нами паралельно було проведено ПЛР-РЧ-аналіз ДНК, виділеної зі зразків молока від тих самих особин. Отримані результати підтвердили можливість використання молока для діагностики ВЛ ВРХ, однак з певними обмеженнями. 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. 3.3). 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. На жаль, за такої розбіжності в значеннях C_t з'являється ймовірність виникнення хибно-негативного сигналу у випадку низької концентрації вірусу. На нашу думку, вирішенням цієї проблеми було б збагачення досліджуваного зразку соматичними клітинами, наприклад, за рахунок збільшення об'єму дослідного матеріалу.

Таким чином, виконано порівняльну оцінку ефективності використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу для ідентифікації вірусу лейкозу у великої рогатої худоби. Встановлена можливість використання молока під час діагностики ВЛ ВРХ методом ПЛР у реальному часі.

3.1.4. Якісна та кількісна оцінка вмісту молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів у молочних продуктах

Розвиток світової харчової промисловості, з одного боку, та можливостей сучасної біології, зокрема молекулярної генетики, біотехнології та мікробіології, з іншого, сприяє динамічному росту колекції промислових мікроорганізмів, виділених методами селекції із різних джерел. Для їх ідентифікації та віднесення до певної таксономічної групи (ряду, родини, роду, виду, штаму) використовують традиційні мікробіологічні методи досліджень. Даний етап є важливим під час розроблення та виробництва якісних і безпечних бактеріальних заквасок, концентратів, бактеріологічних препаратів [420-422].

На жаль, як в Україні, так і в багатьох країнах ближнього зарубіжжя для контролю їхньої якості немає чітко розробленої схеми, за якою б

визначалася не тільки технологічна придатність, але й безпека використання чистих культур бактерій і бактеріальних заквасок. Досить актуальною залишається проблема виявлення та ідентифікації пробіотичних мікроорганізмів, що входять до складу молочної продукції, препаратів-пробіотиків та біологічно активних добавок (БАД). Дотепер ідентифікацію промислових бактерій і підтвердження їхньої видової належності здійснюють на основі вивчення морфологічних, фізіологічних і біохімічних ознак, що не завжди є ефективним, особливо під час роботи зі змішаними культурами. Крім того, даний процес потребує багато часу, оскільки передбачає етап виділення чистих культур. Все це разом створює певні труднощі для мікробіологічних лабораторій, а також не може задовольняти вимоги поточного оперативного контролю на виробництві [423–430].

Сьогодні дану проблему можна вирішити шляхом запровадження методу діагностики, засновану на різновидах полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Завдяки ПЛР можливою є точна ідентифікація мікроорганізмів, що входять до складу бактеріальних заквасок, бактеріальних концентратів та чистих культур, що використовують у виробництві кисломолочної продукції. Використання методу ідентифікації з застосуванням ПЛР ґрунтується на виборі специфічного гена мікроорганізму. Найпоширенішим геном як для молочнокислих бактерій, так і для біфідобактерій, є ген 16S рРНК. Він несе як консервативні, так і варіабельні ділянки послідовності ДНК, що дає змогу здійснювати ідентифікацію мікроорганізмів як на рівні роду, так і на рівні виду [431–436].

Як свідчать літературні джерела, запровадження методу ПЛР для видової ідентифікації молочнокислих і біфідобактерій високо оцінено світовими фахівцями. У нашій країні цей напрям тільки починає розвиватися. Для вирішення цієї проблеми необхідно є розроблення ефективних і адаптованих до різних об'єктів досліджень тест-систем для якісного та кількісного визначення складу молочнокислих бактерій [437–439].

Останніми роками в діагностичну практику активно впроваджують

ПЛР у реальному часі. Її принциповою особливістю є моніторинг і кількісний аналіз нагромадження продуктів полімеразної ланцюгової реакції, а також автоматична реєстрація та інтерпретація отриманих результатів. Ця технологія вже не потребує додаткової стадії електрофорезу, що суттєво полегшує вимоги, які висувуються до ПЛР-лабораторій. Завдяки економії виробничих площ, зменшенню кількості обслуговуючого персоналу та попиту на кількісне визначення (ДНК/РНК, вірусів, бактерій), цей метод успішно застосовують у провідних санітарно-епідемічних, діагностичних і науково-дослідних центрах розвинених країн світу, витісняючи «класичний» формат ПЛР [440].

Найбільш активно застосовують два основні підходи щодо детекції результатів ПЛР у реальному часі. Перший підхід є менш специфічним і його засновано на використанні інтеркалюючого барвника. Детекція продуктів ампліфікації відбувається за рахунок збільшення флуоресценції інтеркалюючого барвника при утворенні комплексу з дволанцюговою ДНК. Найбільш популярним барвником сьогодні є SYBR Green I. Розроблений для ідентифікації ДНК методом рутинного електрофорезу він активно використовується під час капілярного електрофорезу, в проточній цитометрії, проведенні ПЛР-РЧ та забарвленні вірусних часток [441–444].

SYBR Green I є високочутливим флуоресційним індикатором дволанцюгової ДНК. У комплексі з ДНК максимум флуоресценції становить 521 нм, перший та другий максимуми поглинання – 497 та 254 нм, відповідно. Квантовий вихід флуоресценції перевищує більш ніж в 5 разів квантовий вихід комплексу бромистий етидій / ДНК. Завдяки присутності додаткових спектрів поглинання (290 і 380 нм), SYBR Green I дуже легко детектується різними приладами – від УФ транслюмінаторів до лазерів з довжиною хвилі близько 500 нм [445].

Меншою мірою застосовують такі барвники як EVA Green, LC Green, Cyto9. Відносно низька специфічність інтеркалюючих барвників під час проведення ПЛР-РЧ обумовлена тим, що прилад реєструє флуоресценцію

будь-якого комплексу дволанцюгової ДНК з барвником, у тому числі і неспецифічних продуктів ампліфікації. Відтак, існує ймовірність виникнення хибно-позитивних результатів.

У другому підході використовують флуоресційно-мічені олігонуклеотидні зонди. Вища специфічність детекції продуктів ампліфікації під час проведення ПЛР-РЧ досягається шляхом введення в реакційну суміш додаткового олігонуклеотиду – гібридизаційного зонду. В процесі проходження реакції такий зонд приєднується до комплементарної ділянки амплікону між прямим та зворотнім праймерами. На різних кінцях зонда розташовані флуорофор та гасник флуоресценції даного флуоресційного барвника. За такої невеликої відстані між флуорофором і гасником спостерігається лише незначна флуоресцентна емісія. Під час ампліфікації за рахунок 5'-екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази, флуоресційна мітка переходить у реакційну суміш, звільняючись від сусідства з гасником, і генерує флуоресційний сигнал, що зростає в реальному часі пропорційно нагромадженню ПЛР-продукту [446].

За такого підходу поява хибно-позитивних результатів зводиться нанівець завдяки тому, що навіть у разі появи у реакційній суміші неспецифічних ПЛР-продуктів вони не будуть реєструватися приладом, оскільки не матимуть послідовностей, комплементарних гібридизаційному зонду. Крім того, даний варіант ПЛР-РЧ можна використовувати для проведення мультиплексної ПЛР шляхом введення зондів, мічених різними флуорофорами. Однак даний підхід має і свої недоліки. Так, *TaqMan*[®]-технологія є значно дорожчою і менш універсальною, ніж *SYBR*[®] *Green*.

3.1.4.1. Визначення бактеріальної ДНК за використання технології *SYBR*[®] *Green* методу ПЛР у реальному часі

SYBR Green I – чутливий і специфічний барвник для детекції дволанцюгової ДНК. Завдяки своїм властивостям він успішно

використовується як універсальний реагент для флуоресцентної детекції продуктів ампліфікації ПЛР у реальному часі. Для цього не потрібно використовувати флуоресційно мічені зонди, достатньо праймерів, підібраних для «класичного» ПЛР [241].

Сьогодні барвник найбільш інтенсивно використовують для забарвлення різних видів гелів (агарозні, поліакриламідні), під час електрофоретичного розділення дволанцюгової ДНК та візуалізації продуктів ампліфікації при проведенні ПЛР-РЧ. SYBR Green I має низку переваг. Висока чутливість дає змогу детектувати до 1–2 нг синтетичних олігонуклеотидів та до 20 пг високомолекулярної ДНК. Він характеризується більшою специфічністю по відношенню до ДНК-дуплексів, що сприяє його широкому застосуванню під час проведення ПЛР-РЧ. Сумісність з ферментами дає змогу проводити рестрикцію та лігування без додаткового етапу доочищення після елюції ДНК-фрагментів з гелів. І, що є досить суттєвим, він позбавлений високого рівня мутагенної дії [447].

Гени рибосомальної РНК, зокрема ген 16S рДНК, широко використовують для виявлення бактеріальних штамів у комплексних середовищах [448,449]. Серед методів, заснованих на використанні рДНК, як мішень у кількісному аналізі мікробіоти широко застосовують *SYBR[®]Green* – технологія ПЛР в реальному часі [450-454]. Цей метод є досить чутливим і точним, крім того, не вимагає наявності специфічних зондів і додаткової адаптації протоколу «класичної» ПЛР. Неспецифічне зв'язування флуоресційного барвника з дволанцюговою молекулою ДНК дає змогу контролювати процес ампліфікації у кожному циклі ПЛР.

Для розроблення системи визначення молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів, на основі літературних джерел було взято відповідні олігонуклеотидні праймери (табл. 3.13). Для визначення представників лактобацил та біфідобактерій було обрано праймери, специфічні до відповідних ділянок гена 16S рРНК [455,456]. Визначення ДНК ентерококів здійснювали за допомогою праймерів, підібраних до

фрагменту гена, що кодує фактор елонгації Tu [457].

Таблиця 3.13

Характеристика олігонуклеотидних праймерів, підібраних для визначення *Bifidobacterium* [455], *Lactobacillus* [456] і *Enterococcus* [457]

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина, п.н.	GC-склад, %	Tm, °C	Продукт, п.н.
BifB-F	gggtggtaatgccgatg	18	61	63	523
BifB-R	ccaccgttacaccggga	18	61	65	
LcB-F	ctcaaaactaaacaagtctc	21	29	55	209
LcB-R	ctgtacacaccgcccgtca	20	60	67	
EntC-F	tactgacaaaccattcatgatg	22	36	60	112
EntC-R	aacttcgtcaccacgcgaac	21	52	66	

Перевірку роботи праймерів здійснювали шляхом ампліфікації ДНК типових штамів *Bifidobacterium longum* CCM 4990, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088, *Enterococcus faecalis* CCM 7000. Для екстракції ДНК було використано комерційний набір «СОРБ-ГМО-Б» (Синтол, РФ). Якісну та кількісну оцінку препаратів ДНК здійснювали спектрофотометрично.

ПЛР проводили за допомогою приладу iCycler™ («Bio-Rad», США). Умови ампліфікації наведено у таблиці 3.14. Об'єм реакційної суміші становив 25 мкл, з яких 5 мкл припадало на розчин ДНК. Реакційна суміш містила 1x Taq-буфер (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 0,2 mM дНТФ суміш; 2,5 mM MgCl₂, 20 пкмоль праймерів; 100 нг ДНК та 1 од. Taq ДНК полімерази (Fermentas, Литва).

Таблиця 3.14

Протокол ампліфікації для перевірки роботи праймерів BifB / LcB / EntC.

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Цикл
1	Початкова денатурація		95	300	1x
2	Ампліфікація	Денатурація	95	30	30x
3		Гібридизація	66/55/63	45	
4		Синтез	72	60	
5	Кінцевий синтез		72	420	1x

Продукти ампліфікації розділяли шляхом електрофорезу у 1,7 % агарозному гелі, що містив 0,01 % бромистого етидію. Результати електрофорезу візуалізували в УФ-випромінюванні, отримані електро-

фореграми обробляли за допомогою програмного забезпечення Gel Imager («ДНК-технология», РФ).

У результаті ампліфікації з родоспецифічними праймерами та наступної детекції ПЛР-продуктів в агарозному гелі було ідентифіковано бактерії трьох родів – *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus*. Отримані результати збігалися з даними, наведеними у відповідних літературних джерелах. Диференціація цих мікроорганізмів ґрунтується на відмінності розмірів отриманих ампліконів (табл. 3.13, рис. 3.6). На жаль, даний підхід не дає змоги зробити висновки щодо кількісного складу бактерій кожної таксономічної групи в досліджуваних зразках молочної продукції.

Тому наступним етапом даної роботи було відпрацювання технології *SYBR[®]Green* ПЛР у реальному часі. Дослідження, проведені De Preter (2002) з підбору умов ампліфікації, демонструють, що підвищення специфічності реакції досягається шляхом емпіричного підбору температури гібридизації праймерів, температури аналітичного плавлення кінцевого продукту, а також застосуванням модифікації ПЛР з «гарячим стартом» (hot start PCR) [458]. В інших роботах було показано, що аналіз кривої плавлення кінцевого продукту дає змогу оцінити специфічність ампліфікації, відрізнити амплікон від праймер-димерів та виявити забруднення неспецифічними продуктами ампліфікації [459,460].

Таким чином, введення до складу ПЛР-суміші інтеркалюючого флуоресційного барвника SYBR Green I і модифікація температурного профілю реакції дали змогу розробити протокол для ампліфікації і аналізу продуктів ПЛР у форматі реального часу. Для цього було використано qPCR Master Mix («Fermentas», Литва), який містив у своєму складі інтеркалюючий барвник SYBR Green I.

ПЛР-ампліфікацію в режимі реального часу проводили за допомогою високошвидкісного термоциклера для ампліфікації нуклеїнових кислот C1000™ з оптичним модулем CFX96™ («Bio-Rad», США). В 25 мкл реакційної суміші містилось 5 мкл ДНК, 12,5 мкл Maxima SYBR Green/ROX

qPCR Master Mix та по 5 пкМ кожного з праймерів. Температурний режим процедури ампліфікації наведено у таблиці 3.15.

Таблиця 3.15

Протокол ампліфікації для відпрацювання SYBR® Green-технології ПЛР у реальному часі

Крок	Етап	Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація	95	600	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	15	ні
3		Гібридизація	55	30	ні
4		Синтез	72	30	так

Граничний цикл (Ct) для кожного зразка визначали циклом, за яким кінетична крива флуоресценції перетинала порогову лінію. Базова лінія, що представляє собою фоновий рівень флуоресценції, розраховувалась програмним забезпеченням приладу CFX Manager™. Специфічність цільового продукту визначали за допомогою аналітичного плавлення по завершенню процесу ампліфікації в діапазоні температур від 60 до 95°C, з інтервалом 0,5 °C / 0,05 сек.

На рисунку 3.4 (а-с) наведено результати первинної оцінки роботи трьох пар праймерів, підібраних для ідентифікації ДНК *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus*, за використання SYBR® Green-технології ПЛР у реальному часі. Кожну пару праймерів оцінювали одночасно за допомогою зразків ДНК, виділених з бактерій всіх трьох родів. Для всіх трьох пар праймерів спостерігали присутність кривих ампліфікації правильної сигмаподібної форми. Позитивний сигнал з праймерами BifB було отримано лише на зразку ДНК, виділеному з *Bifidobacterium*. Так само дві інші пари праймерів (LcB та EntC) спрацювали лише на ДНК бактерій, до яких вони були підібрані. Значення Ct, отримані з праймерами BifB та LcB, практично не різнилися – $15,64 \pm 0,026$ та $16,67 \pm 0,270$, відповідно. Дещо пізніше з'являлись криві ампліфікації для праймерів EntC ($24,11 \pm 0,026$). Стосовно показника ΔRn , значення коливалися в межах від 700 до 900 rfu.

Таким чином встановлено, що отримані результати ампліфікації за

двома досліджуваними показниками (C_t , ΔR_n) продемонстрували, що обрані праймери можуть бути використані для ідентифікації бактерій, що належать до родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Enterococcus*, у форматі SYBR® Green-технології ПЛР у реальному часі.

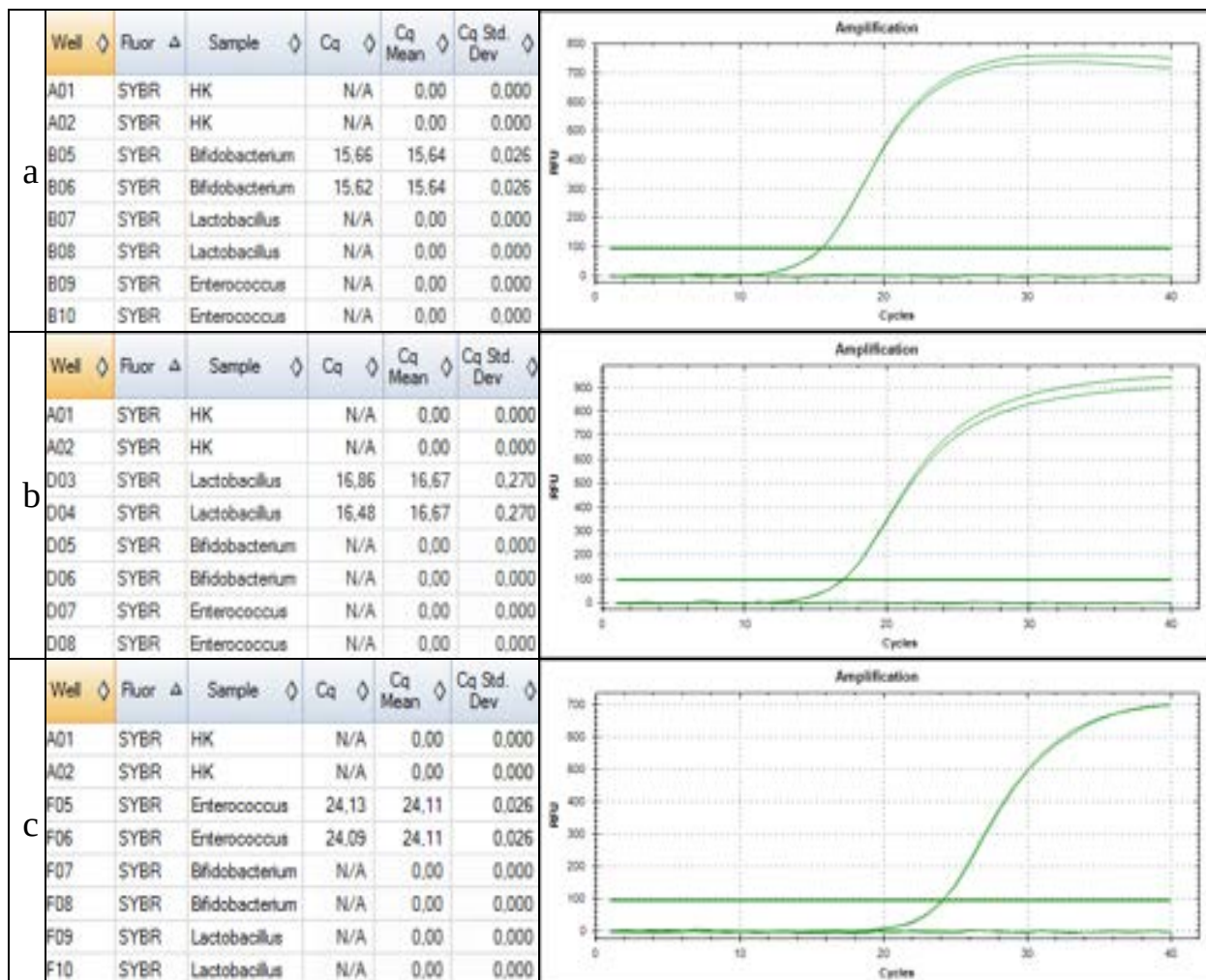


Рис. 3.4. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Оцінювання ефективності трьох пар праймерів, підібраних для визначення ДНК: а – *Bifidobacterium*; б – *Lactobacillus*; с – *Enterococcus*.

Ефективність роботи трьох пар праймерів перевіряли шляхом проведення ПЛР із серією десятикратних розведень ДНК. Кожна серія десятикратних розведень ДНК складалася з чотирьох точок. Для дослідження використовували свіжі препарати ДНК, виділені із заморожених клітин *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Enterococcus*. Ефективність ПЛР залежить від кута нахилу кривої, тому в абсолютних значеннях концентрацій ДНК немає потреби. На рисунку 3.5 наведено графіки стандартних кривих, побудовані в системі координат - $\log [N] / C_t$, де N – концентрація ДНК. Стандартні криві

описуються загальним лінійним рівнянням:

$$Y = -\alpha x + b, \quad (3.1)$$

яке дає змогу оцінити ефективність ампліфікації [241].

Для кожної пари праймерів за допомогою методу найменших квадратів було визначено кут нахилу кінетичної кривої (α , Slope), коефіцієнт кореляції (R^2) та ефективність реакції (E). Для всіх трьох пар праймерів значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон від $-2,5$ до $-4,5$, а показники R^2 були не нижчими за $0,98$. Розраховані значення ефективності ПЛР для праймерів BifB, LcB та EntC становили $80,8$, $67,2$ та $70,0$ % відповідно.

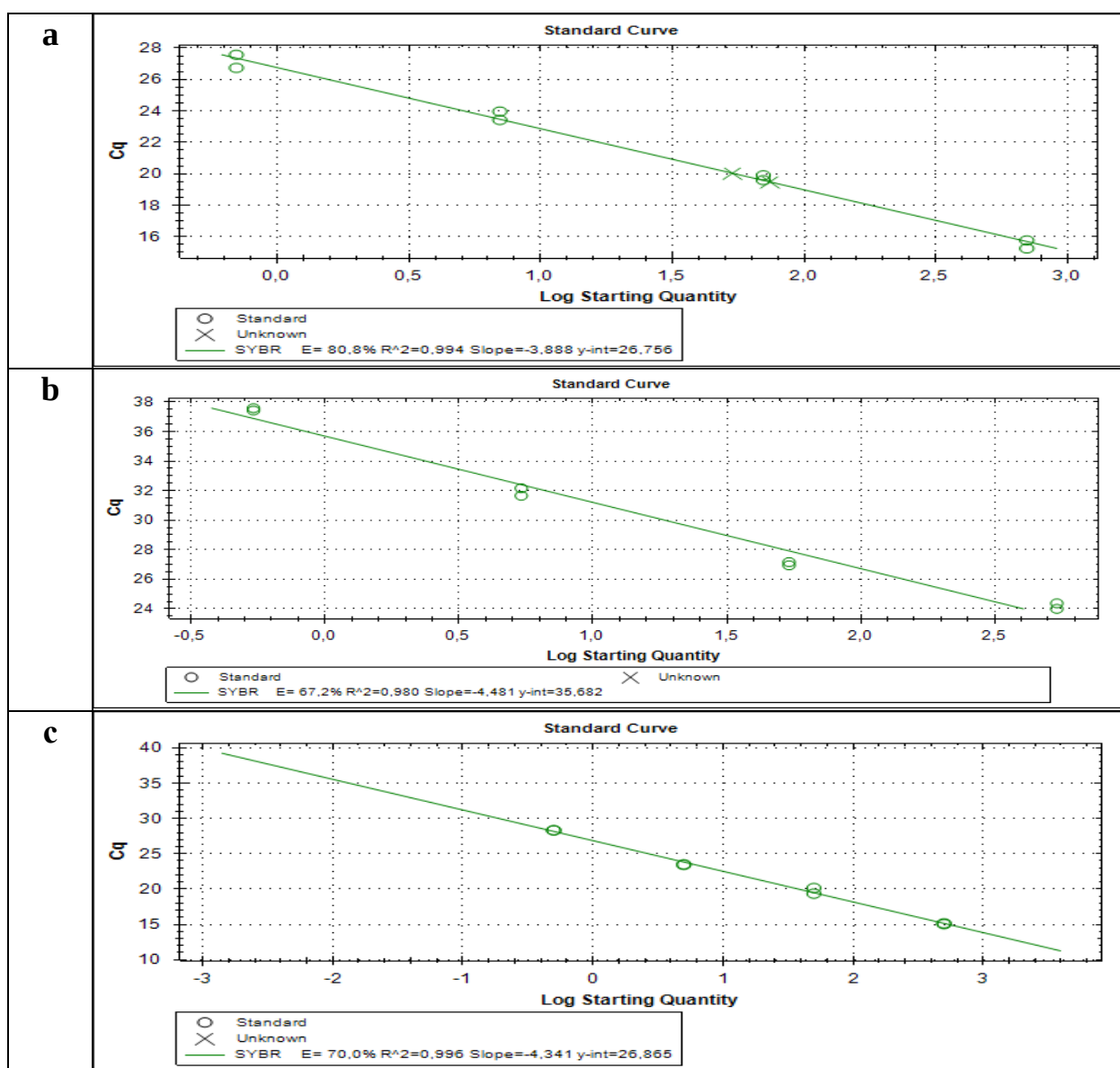


Рис. 3.5. Оцінювання ефективності роботи праймерів. Стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК з праймерами: а – BifB; б – LcB; с – EntC.

Оцінювання специфічності технології SYBR®Green методу ПЛР у реальному часі здійснювали за допомогою постампліфікаційного аналізу кривих плавлення. Результати досліджень показали, що кожен зразок характеризувався одним переважаючим піком, що відповідало єдиній смугі на електрофореграмі (рис. 3.3 а–с). Наявність одного чітко вираженого піка кривої плавлення свідчить про специфічність використаних праймерів для ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus*. Діапазон значень температур плавлення продуктів ампліфікації різнився у досліджених мікроорганізмів і становив 85–86 °С для *Bifidobacterium*, 80,5–81,5 °С для *Lactobacillus* та 78–79 °С для *Enterococcus*.

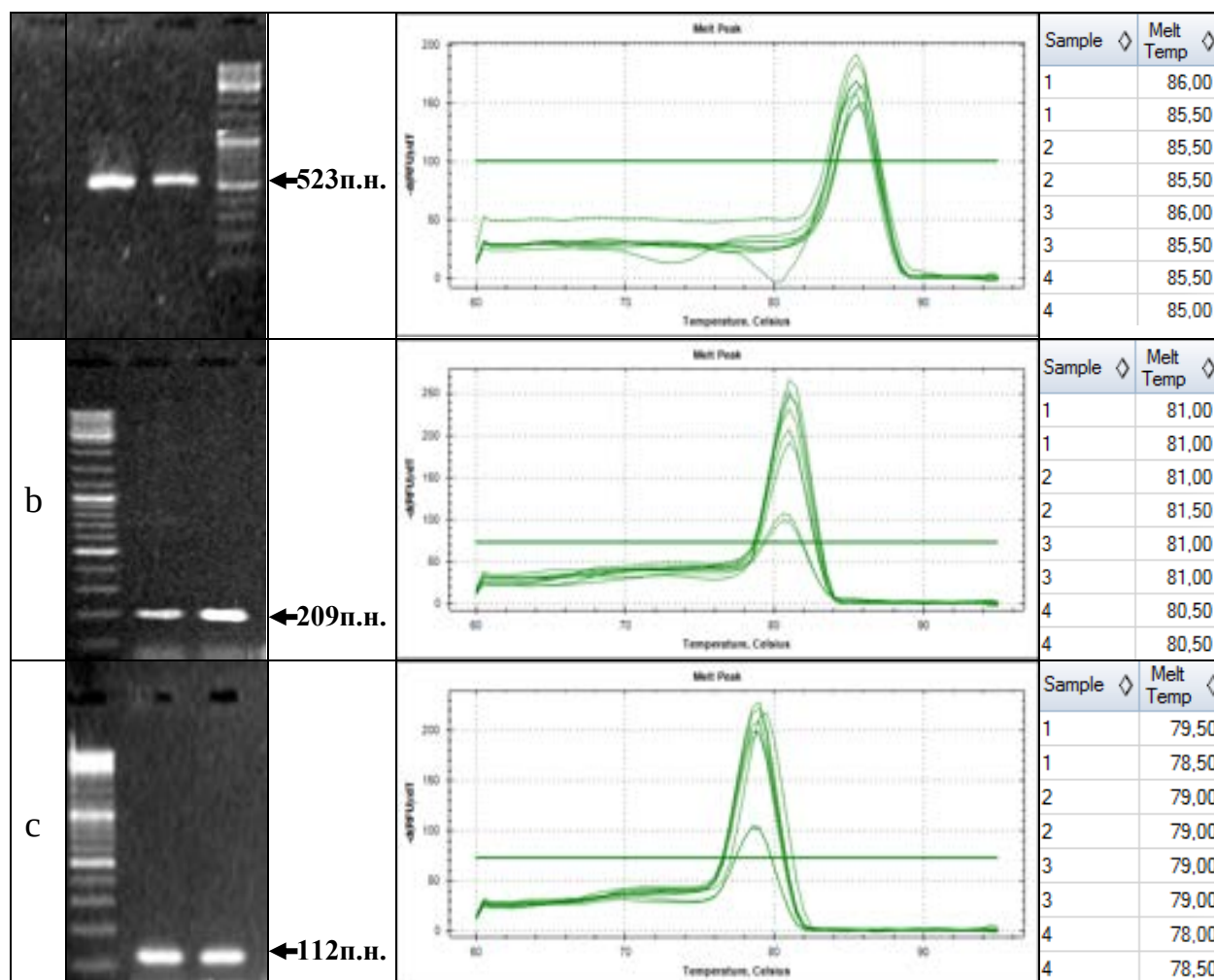


Рис. 3.6. Порівняння електрофореграм продуктів ампліфікації у 1,7 % агарозному гелі та постампліфікаційного аналізу кривих плавлення за SYBR®Green-технологією ПЛР-РЧ: а – *Bifidobacterium*; б – *Lactobacillus*; с – *Enterococcus*.

Таким чином встановлено, що аналіз кривих плавлення дає змогу

ідентифікувати кожен із трьох досліджених родів мікроорганізмів, оскільки вони характеризуються індивідуальними профілями плавлення.

3.1.4.2. Кількісна оцінка вмісту молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів у молочній продукції

Метод ПЛР у реальному часі як такий не є кількісним. Для забезпечення можливості здійснення кількісної оцінки присутності ДНК (РНК)-матриці у досліджуваному зразку, а також визначення ефективності перебігу ПЛР, додатково вводять стандартні і контрольні зразки. Існує два способи визначення початкової кількості матриці – відносний та абсолютний. Відносне визначення демонструє кількість початкової матриці по відношенню до кількості референтної матриці. Абсолютне визначення дає змогу обчислити кількість копій матриці, присутніх у вихідній реакційній суміші. Для проведення такого аналізу використовують спеціальні стандартні зразки. Так, наприклад, у випадку кількісного визначення вірусної НК (так зване вірусне навантаження) використовують абсолютне визначення, виражаючи кількість матриці у геномних копіях, геном-еквівалентах або вірусних частках на 1 мл досліджуваного зразка [461,462].

У більшості випадків для кількісного аналізу вірусів, бактерій та низки інших мішеней застосовують абсолютне визначення. Незважаючи на те, що даний підхід є більш трудомістким, він дає змогу отримати результати, які базуються на сталих величинах та виражені в певних стандартних одиницях [463]. В основу абсолютного визначення покладено побудову стандартної кривої. Для її одержання використовують серію десятикратних розведень стандартних зразків. Стандартна крива відображає лінійне співвідношення між значеннями C_t та початковою кількістю матриці, що була внесена у реакційну суміш. Точність результатів кількісного аналізу значною мірою залежить від якості стандартних зразків.

Для проведення кількісного аналізу корисної мікрофлори у молочній

продукції було приготовлено стандартні зразки шляхом десятикратних розведень ДНК *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus*. Кожна серія десятикратних розведень складалася з чотирьох точок з концентраціями ДНК від 0,25 до 250 нг/мкл. ПЛР-ампліфікацію стандартних зразків проводили разом з досліджуваними зразками молочної продукції. На основі отриманих значень C_t стандартних зразків було побудовано стандартні криві в системі координат - $\text{Log [N]} / C_t$, де N – концентрація ДНК стандартного зразка (рис. 3.7). За допомогою стандартних кривих було визначено початкову кількість ДНК досліджуваних зразків, внесену в реакційну суміш.

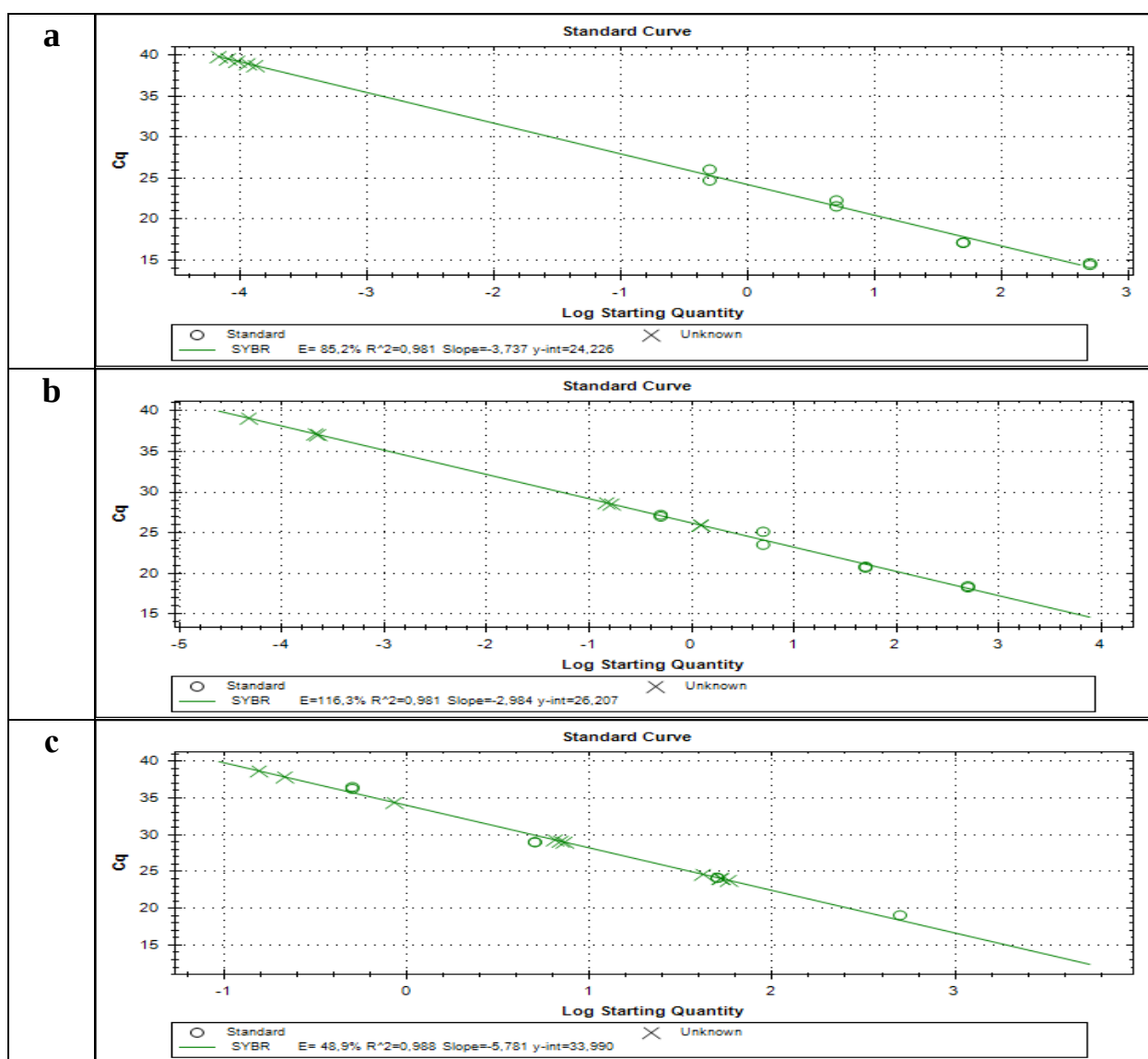


Рис. 3.7. Кількісне визначення *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* в зразках молочної продукції. Стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК: а – *Bifidobacterium longum* CCM 4990; б – *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088; в – *Enterococcus faecalis* CCM 7000.

Кількість геном-еквівалентів бактерій у досліджуваних зразках обчислювали як співвідношення середньої початкової кількості ДНК до кількості ДНК, що міститься у геномі типового штаму. Останній показник визначали за формулою [464]:

$$\text{кількість ДНК (пкг)} = \text{розмір геному (п.н.)} / (0,978 \times 10^9), \quad (3.2).$$

Всього було досліджено чотири види молочної продукції: коров'яче молоко, йогурт, сметана та м'який кисломолочний сир. Кожен вид продукції було представлено п'ятьма різними зразками. Результати ПЛР-РЧ-аналізу продемонстрували, що всі досліджені зразки молочної продукції містили в своєму складі ті чи інші мікроорганізми. Так, в зразках молока, сметани та кисломолочного сиру було виявлено представників всіх трьох груп бактерій. Тим часом у зразках йогуртів було виявлено лише ДНК біфідобактерій та молочнокислих бактерій. Відносна кількість виявлених мікроорганізмів була найбільшою в йогурті і найменшою в молоці. Відповідно до отриманих значень St для кожної групи бактерій, в досліджених зразках молочної продукції, за виключенням йогуртів, переважали ентерококи. В усіх зразках молочної продукції найменшою мірою були представлені біфідобактерії.

Отримані результати відповідають даним, описаним в літературних джерелах [465,466]. До найбільш чисельних груп мікроорганізмів, що становлять мікробіоту сирого молока, належать лактококи, ентерококи та лейконостоки [467,468]. Стосовно лактобацил, вони належать до вторинної мікрофлори молочної продукції [469]. Присутність ентерококів у молочній продукції певний час вважали наслідком антисанітарних умов виробництва. Однак пізніше було доведено, що ентерококи входять до складу нормальної мікробіоти багатьох харчових продуктів [470], більш того, вони відіграють важливу роль у формуванні органолептичних властивостей сирів [471].

У таблиці 3.16 наведено результати абсолютного визначення кількості бактерій кожного з досліджуваних родів у перерахунку на 1 мл/г зразка молочної продукції. Вміст біфідобактерій у зразках молока, сметани та сиру був незначним та практично однаковим, що може свідчити про їх випадкове

потрапляння у молочні продукти. Водночас у зразках йогурту його кількість сягала 10^5 генном-еквівалентів (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.

Таблиця 3.16

Кількісне визначення бактеріальної ДНК у кисломолочних продуктах за допомогою *SYBR*[®] Green-технології методу ПЛР-РЧ (ГЕ/мл (мг)).

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

Таким чином, застосування методу ПЛР у реальному часі для визначення корисної мікрофлори молочної продукції істотно скорочує тривалість і зменшує трудомісткість цього виду аналізів. Крім того, даний підхід повністю виключає ризик появи хибно-позитивних результатів за рахунок відсутності постаампліфікаційних маніпуляцій з продуктами ПЛР. *SYBR*[®] Green-технологія ПЛР-РЧ дає змогу чітко ідентифікувати групи молочнокислих бактерій та біфідобактерій у молочній продукції, що може бути використано під час контролю молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків та пробіотичних продуктів.

Висновки до розділу 3.1

1. Запропоновано методологію оцінювання деяких показників безпеки та якості продукції тваринництва за використання молекулярно-генетичних методів аналізу.

2. Встановлена генетична структура поголів'я української чорно-рябої молочної породи ВРХ методом ПЛР-ПДРФ за трьома генами кількісних ознак, пов'язаних з молочною продуктивністю.

3. Виявлено взаємозв'язок встановлених генотипів та комплексних

генотипів за генами *CSNK*, *BLG* та *PRL* зі складом (надій, % жиру та білка) та технологічними властивостями (сиропридатність) молока досліджених корів. Підтверджено доцільність використання ДНК-аналізу під час проведення селекційно-плеємної роботи з поголів'ям великої рогатої худоби з метою поліпшення кількісних та якісних характеристик молока;

4. Встановлено, що найкращими показниками молочної продуктивності характеризуються тварини з генотипами AA за локусом *BLG* та AG за локусом *PRL*;

5. Досліджено, що у корів української чорно-рябої молочної породи найвища молочна продуктивність спостерігається з комплексами генотипів *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* AG, *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* GG, *CSNK* AB / *BLG* AA / *PRL* AG. За показниками жирності молока перевагу мають тварини з генотипами *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* AG, *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* GG та *CSNK* AA / *BLG* AB / *PRL* GG. За вмістом білка в молоці домінують тварини з генотипами *CSNK* AB / *BLG* AA / *PRL* AG та *CSNK* AB / *BLG* BB / *PRL* AG.

6. Встановлено, що найкращі показники тривалості сичужного зсідання молока притаманні тваринам з комплексними генотипами *CSNK* AB / *BLG* BB / *PRL* GG та *CSNK* AB / *BLG* AB / *PRL* GG.

7. Проведена порівняльна діагностика поголів'я ВРХ на присутність провірусної ДНК BLV за допомогою методу ПЛР у реальному часі продемонструвала значно більшу його чутливість та специфічність порівняно з серологічними методами аналізу. Інфікованість дослідженого поголів'я ВРХ після додаткової перевірки становила 6,8 %, тимчасом за використання РІД було виявлено лише 2,4 %. З огляду на це, даний підхід може бути рекомендовано до системи протилейкозних заходів для своєчасного виявлення інфікованих BLV тварин.

8. Відпрацьовано ПЛР-РЧ методику визначення збудника ЛВРХ у коров'ячому молоці та доведено можливість її застосування як у комплексі протилейкозних заходів у господарствах, так і безпосередньо під час

контролю безпечності продукту.

9. Розроблено методологію визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології *SYBR[®]Green* методу ПЛР-РЧ.

10. 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.

Перелік наукових робіт, в яких опубліковані результати досліджень, представлених у розділі 3.1:

Мельничук М.Д., Новак Н.Б., **Облап Р.В.** Особливості генетичної структури української чорно-рябої худоби. *Вісник аграрної науки*. 2008. № 3. С. 42–46.

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.

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.

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

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

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.

Плівачук О.П., Димань Т.М., **Облап Р.В.** Сиропридатність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капазеїну, бета-лактоглобуліну та пролактину. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. Збірник наукових праць Білоцерківського національного аграрного університету*. 2016. Вип. 2(129). С. 116–121.

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.

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.

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.

3.2. Визначення видової належності м'яса домашніх тварин і птиці у складі сільськогосподарської сировини і харчової продукції методом ПЛР у режимі реального часу

Актуальність проблематики якісної та безпечної м'ясної продукції важко недооцінити, адже м'ясні продукти відносяться до переліку стратегічно важливих, оскільки являють собою основне джерело білка у раціоні людини. Крім білка, вони багаті на жири, вітаміни, мінеральні речовини та інші життєво важливі компоненти. Найбільш споживаними серед видів м'яса є яловичина, свинина, баранина та курятина, які мають бути отримані лише від здорових тварин, забитих з дотриманням санітарних вимог.

Але сьогодні існує низка проблем, пов'язаних з якістю м'ясної продукції. Це перед усім застосування під час виготовлення м'ясної продукції хімічних домішок (консервантів, стабілізаторів, антиокислювачів) та технологій теплової і радіаційної обробки, які покращують смакові якості і зовнішній вигляд, подовжують строк зберігання, підвищують вихід готової продукції у рази. Разом з тим, існує проблема вживання тваринницької продукції, яка була виготовлена за використання стимуляторів росту та кормів на основі генетично модифікованих рослин. Крім того дуже часто товари цієї групи фальсифікуються. Це пояснюється високими цінами на дану групу товарів та обмеженістю ресурсів. Слід зазначити, що для різних підгруп м'ясної продукції характерні різні види фальсифікації. Так, асортиментна фальсифікація здійснюється найчастіше шляхом заміни одного виду м'яса іншим, менш коштовним у харчовому відношенні видом, а також часткової підміни м'яса субпродуктами, молочними продуктами (сухим молоком) або рослинною сировиною (соєю, крохмалем, борошном, крупами, овочами) [472].

На сьогодні оцінку якості м'ясної продукції проводять за показниками органолептичного та фізико-хімічного стану. Перевагою органолептичного

методу є швидкість при отриманні даних, порівняно з використанням хімічного аналізу. Суттєвим недоліком є значна суб'єктивність та слабка верифікованість. У випадку, якщо для оцінки якості показників органолептичних та фізико-хімічних досліджень недостатньо застосовують імунологічні (РА, РП, РІД, ІФА) та молекулярно-генетичні (ПЛР, ПЛР-РЧ) методи аналізу. Результати таких досліджень можуть дозволити визначити наявність різного роду домішок рослинного походження та видову фальсифікацію м'яса. Подібні дослідження мають високу чутливість та здатні виявляти домішки в найменших кількостях. До недоліків можна віднести відносну дороговизну та необхідність придбання відповідного устаткування [473].

Незважаючи на те, що визначення фальсифікації м'ясної продукції методом ПЛР широко використовують у зарубіжних лабораторіях, в Україні цей напрям ще не набув широкого практичного застосування в галузі ветеринарно-санітарної експертизи. Частково це може бути пов'язано з відсутністю доступних та конкурентоспроможних діагностикумів вітчизняного виробництва. Тому для вирішення цієї проблеми необхідним є розроблення сучасних, високочутливих, адаптованих під різні прилади ПЛР тест-систем для можливості здійснення контролю видового складу м'ясної сировини та готової м'ясної продукції.

Тому одним із завдань дисертаційної роботи був пошук молекулярно-генетичних маркерів, які б давали змогу здійснювати ідентифікацію видової належності тваринних тканин у м'ясній сировині, подрібненій сировині у складі м'ясних напівфабрикатів та готових необроблених м'ясних виробів, та тих, що зазнали термічної обробки.

Для розроблення відповідної тест-системи необхідно було визначити ДНК-мішені. Для цього було проведено моніторинг м'ясного ринку країни та вибрано найбільш пріоритетні види м'яса. Оскільки планувалося розробляти діагностикум у форматі мультиплексу, необхідно було відібрати не більше трьох-чотирьох мішеней. У науковій літературі та на ринку тест-систем

представлено розробки, де в одній мультиплексній системі використовують більше ніж чотири мішені одночасно [474,475], однак такі дослідження потребують багато часу і пов'язані з великими фінансовими витратами.

Виходячи з отриманих даних, було обрано три основні види м'яса, які споживають українці – курятину, свинину та яловичину. Далі необхідно було встановити гени, за якими можна визначати присутність тканин різних видів м'яса в аналізованих зразках.

Для розроблення тест-системи з метою визначення видової належності тваринних тканин використовували технологію *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ).

3.2.1. Визначення молекулярних-генетичних маркерів та вибір праймерів з зондами для проведення ПЛР у реальному часі

Останнім часом під час проведення філогенетичних та арбітражних досліджень широкого застосування набув ПЛР-аналіз, за якого як ДНК-мішені використовують послідовності консервативних ділянок гена цитохрому b мітохондріальної ДНК (мтДНК). Використання мтДНК для ідентифікації видів тварин методом ПЛР має низку переваг. По-перше, ці гени є багатокопійними, що дає змогу отримувати досить сильний сигнал навіть у зразках, що зазнали впливу високих температур. По-друге, сучасні знання генної організації мтДНК, а також наявність подібних послідовностей у багатьох видів тварин дає змогу відносно легко підбирати олігонуклеотидні праймери. По-третє, мінливість мтДНК та наявність високополіморфних ділянок уможлиблює ідентифікацію тканин конкретних видів тварин у складі багатокомпонентних сумішей з високою часткою ймовірності. І, нарешті, внутрішньовидова мінливість мтДНК навіть дає змогу здійснювати ідентифікацію окремих порід свійських тварин [476,477].

У літературних джерелах наведено дані щодо використання методів прямого секвенування та ПДРФ-аналізу ПЛР фрагментів мтДНК для

ідентифікації різних видів консервованого тунця, сардин та равликів [478-480]. Крім того, застосування спеціально розроблених праймерів в ПЛР з обмежуючими умовами ампліфікації уможливило специфічну ідентифікацію ПЛР-фрагментів мтДНК без наступних процедур секвенування або ПДРФ-аналізу [481].

Саме тому як ДНК-мішені під час розроблення тест-системи «М'ясо-тест» було обрано послідовності генів цитохрому b (*cytb*) курки та свині, а також сателітної IV ДНК ВРХ (1.709 satellite IV DNA family) [482]. Самі нуклеотидні послідовності ДНК-мішеней для всіх трьох видів тварин представлено в інтернет-базі даних *GenBank*[®] серверу NCBI, яка є у відкритому доступі [324]. Номери доступу до послідовностей наступні: AY235571 (*Gallus gallus*), X56295 (*Sus scrofa*) та AF446392 (*Bos taurus*).

Праймери з зондами для трьох видів тварин було розроблено Jonker K. et al. (2008) за використання програмного забезпечення *Primer Express*[®] (Applied Biosystems, Великобританія) [483]. В таблиці 3.17 наведено характеристику обраних праймерів та зондів. Синтез олігонуклеотидів, використаних для розроблення діагностикуму, замовляли в компанії «Metabion international AG» (Німеччина). Зонди для визначення генів *cytb* курки та свині було мічено флуоресційними барвниками FAM і HEX відповідно. Для визначення послідовності сателітної ДНК ВРХ використовували зонд з барвником ROX. Кожному флуоресційному барвнику відповідав належний йому гасник флуоресценції – BHQ1-2. У таблиці 3.18 наведено їхні повні назви та фізичні характеристики.

У зв'язку з тим, що обрані нами праймери мали бути використані для розроблення тест-системи у форматі мультиплексу, їх додатково перевірили на теоретичну специфічність за допомогою алгоритму *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) серверу NCBI [325]. Даний комп'ютерний додаток дає змогу проводити порівняння бажаних послідовностей з усіма існуючими у базі даних ДНК-послідовностями на наявність гомології. Проведений BLAST-аналіз показав 100 % специфічність усіх обраних олігонуклеотидних

праймерів. За допомогою програми *Vector NTI Advance*TM 9.1.0 було також оцінено вторинну структуру олігонуклеотидів та відсутність здатності до утворення так званих шпильок та праймер-димерів [484,485].

Таблиця 3.17

Характеристика праймерів та зондів для ампліфікації та детекції ДНК послідовностей *Gallus gallus*, *Sus scrofa* та *Bos taurus*

Назва	Послідовність 3'→5'	Дов- жина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
Gall-F	tctcacttacactacttgccacatctt	27	41	67	82
Gall-R	cgtgtgtgtcctgtttggactag	23	52	66	
Gall-P	cactgcaacctacagcctccgcataac	27	56	72	
Var-F	caaagcaaccctcacacgatt	21	48	64	67
Var-R	tgcgagggcggtaatgat	18	56	64	
Var-P	ttcgcttccactttatcctgccattc	27	48	70	
BtSIV-F	ggcagcccttgcaaacc	17	65	64	76
BtSIV-R	cagttcacgggactctgacattc	23	52	66	
BtSIV-P	tgctccaataacaagaaaactttgacctcagg	32	41	70	

Таблиця 3.18

Характеристика флуорофорів та відповідних їм гасників флуоресценції

Флуорофор	λ макс. поглинан- ня, нм	λ макс. флуорес- ценції, нм	Гасник	λ макс. поглинан- ня, нм	λ діапазону гасіння, нм
FAM (50-6-carboxy- fluorescein)	495	520	BHQ-1 (30-Black Hole Quencher 1)	535	480-580
HEX (hexachloro- fluorescein)	535	556			
ROX (6-Carboxyl- X-Rhodamine)	576	601	BHQ-2 (30-Black Hole Quencher 2)	575	550-650

3.2.2. Проведення ПЛР-РЧ та оцінювання продуктивності обраних праймерів та зондів

У процесі розроблення тест-системи особливу увагу звертали на оцінювання низки аналітичних характеристик, зокрема ефективність перебігу

ПЛР, специфічність, чутливість, межу детектування, повторюваність та відтворюваність результатів аналізу. Оцінювання проводили відповідно до вимог, що встановлені до тест-систем, розроблених на основі методу ПЛР [486].

Підбір умов ампліфікації обраних праймерів та зондів здійснювали за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). У всіх дослідженнях з розроблення тест-системи кожену ПЛР проводили у двох повторностях.

Об'єм реакційної суміші обирали експериментально. Оптимальним виявився об'єм реакційної суміші в 20 мкл, з яких 2 мкл припадало на розчин ДНК. Реакційна суміш містила 1x Таq-буфер (75 мМ Тріс-НCl (pH 8,8); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 0,2 мМ дНТФ суміш; 2,5 мМ MgCl₂, 10 пкмоль праймерів; 5 пкмоль зонду; 50-500 нг ДНК та 1 од. Таq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Протокол приготування реакційної суміші для проведення ПЛР-РЧ

Компоненти	Кінцева концентрація в ПЛР-суміші	мкл/реакцію
Таq-буфер 10x	1x	2
дНТФ 2 мМ кожного	0,2 мМ кожного	2
MgCl ₂ (25 мМ)	2,5 мМ	2
Таq ДНК полімераза (5 од./мкл)	0,05 од./мкл	0,2
Зразок ДНК	50-500 нг	2
Праймер Gall-F (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Праймер Gall-R (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Зонд Gall-P (100 пкмоль)	5 пкмоль	1
або		
Праймер Var-F (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Праймер Var-R (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Зонд Var-P (100 пкмоль)	5 пкмоль	1
або		
Праймер BtSIV-F (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Праймер BtSIV-R (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Зонд BtSIV-P (100 пкмоль)	5 пкмоль	1
Деіонізована H ₂ O	-	до 20 мкл
Кінцевий об'єм:	20 мкл	

Первинне оцінювання роботи праймерів здійснювали за такими

критеріями як величина граничного циклу (C_t) та рівень репортерної флуоресценції (ΔR_n). Найкращі результати характеризувалися найменшими значеннями C_t та найбільшими – ΔR_n . На першому етапі досліджень перевіряли роботу окремо кожної пари праймерів з зондом.

Для проведення ампліфікації було використано двостадійний температурний профіль, притаманний методу ПЛР у реальному часі (табл. 3.20). Розрахунок температури гібридизації праймерів (T_a) здійснювали за допомогою формули $T_a \approx T_m - 5$, де T_m – температура плавлення праймерів [241].

Таблиця 3.20

Протокол ампліфікації для первинного оцінювання роботи праймерів

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація і синтез	60	40	так	

На рисунку 3.7 (а-с) наведено результати первинного оцінювання роботи всіх трьох пар праймерів, підібраних для ідентифікації тканин курки, свині та ВРХ. Оптимізуючи умови ампліфікації, використовували тотальну ДНК, виділену зі зразків м'яса курки, свині та корови. Для екстракції ДНК було використано тест-систему «ДНК-Экстран-2» (Синтол, РФ) з власними модифікаціями. Якість та кількість препарату ДНК оцінювали спектрофотометрично. Роботу кожної з пар праймерів із зондом оцінювали одночасно на всіх трьох зразках ДНК. Результати, отримані з праймерами Gall, показали, що всі три зразки ДНК дали позитивний сигнал ампліфікації. Найінтенсивніший сигнал було отримано зі зразком ДНК з курятини – $C_t=11,19$. Зразки ДНК зі свинини та яловичини також давали позитивні сигнали, хоча і набагато слабші – $C_t=23,85$ та $22,06$ відповідно. Значення ΔR_n практично не різнилися за усіма дослідженими зразками та знаходилися у межах 900 rfu. Слід зазначити, що показник C_t є важливішим для оцінювання продуктивності роботи праймерів, ніж ΔR_n .

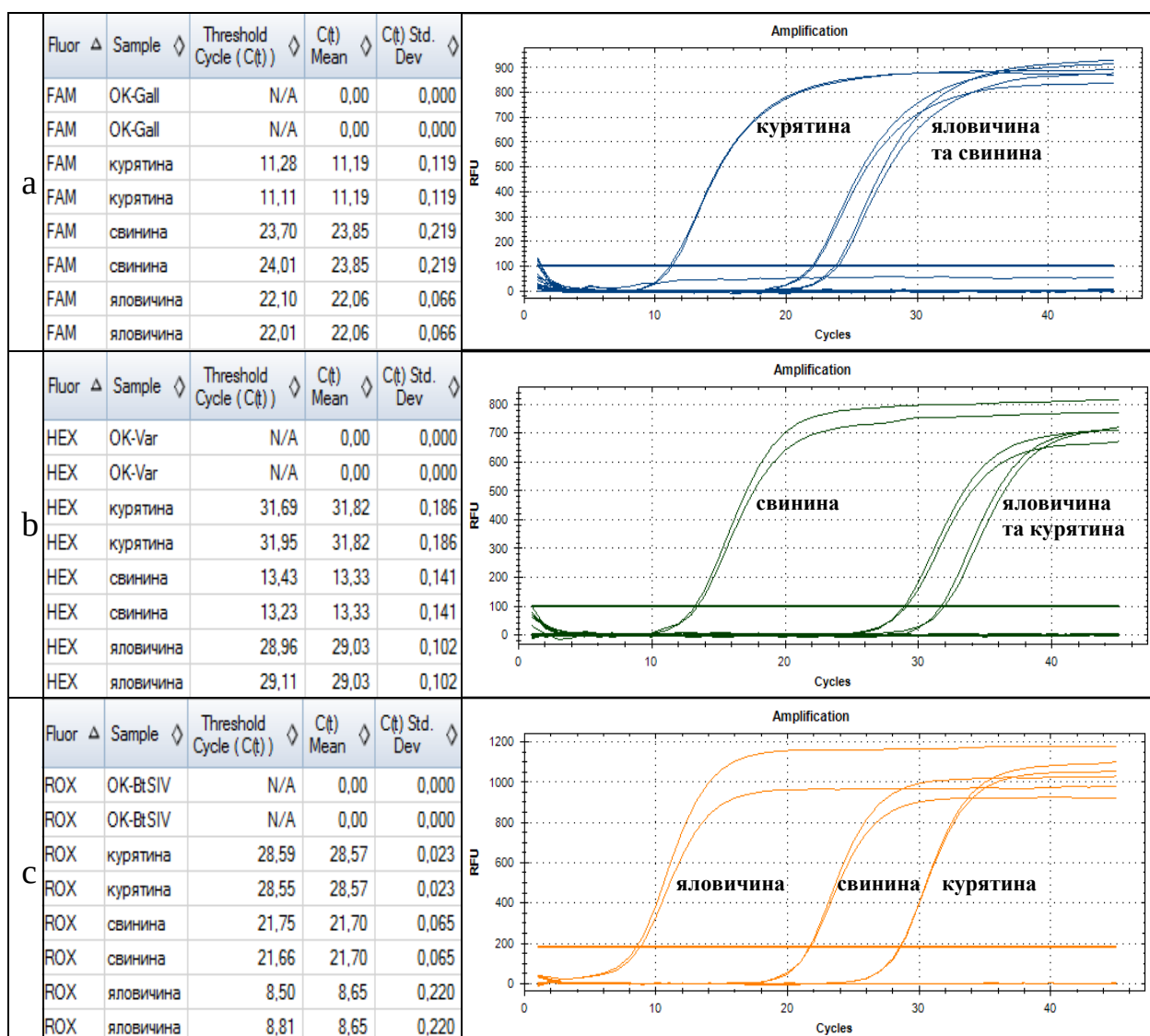


Рис. 3.7. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час оцінювання роботи трьох пар праймерів з зондами (Gall, Var, BtSIV), підібраних для визначення тканин курятини (а), свинини (b) та яловичини (с).

Схожі результати було отримано з праймерами Var та BtSIV. Так, з праймерами Var, специфічними до гена *cytb* свині, флуоресційні сигнали було отримано на зразках ДНК із свинини (Ct=13,33), курятини (Ct=29,03) та яловичини (Ct=31,82). Праймери BtSIV дали наступний результат: яловичина – Ct=8,65, свинина – Ct=21,70, курятини – Ct=28,57. Значення ΔRn лежали у межах 800 rfu для праймерів Var, та 100 rfu для BtSIV.

Отримані результати показали, що обрані нами праймери давали дуже сильний сигнал на ДНК відповідних їм видів тварин. Водночас спостерігали значно меншу неспецифічну ампліфікацію на зразках ДНК інших двох видів. Відтак, необхідно було провести процедуру оптимізації роботи праймерів

для досягнення 100 % специфічності під час визначення видової належності м'яса.

3.2.3. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу

Наступним етапом досліджень була оптимізація роботи всіх трьох пар праймерів та зондів до них (Gall, Var, BtSIV) у форматі мультиплексу. Оптимізацію умов ампліфікації мультиплексу проводили за такими параметрами як температура гібридизації праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів.

Початкові умови ампліфікації, концентрація та співвідношення праймерів і зондів були використані такі, як і в попередніх дослідженнях (табл. 3.19, 3.20).

Отримані результати продемонстрували, що в мультиплексній реакції праймери працюють більш специфічно, ніж поодиночі (рис. 3.8). Найменших змін зазнали результати ПЛР за каналом FAM з праймерами Gall. Неспецифічна ампліфікація зі зразками ДНК з мяса свині та ВРХ зменшилась не більше ніж на 2 цикли. Стосовно праймерів Var, специфічних до мтДНК свині (канал HEX), вони продемонстрували 100 % специфічність. Позитивний сигнал було отримано лише на ДНК свині ($C_t=13,06$), тимчасом з двома іншими матрицями ампліфікація була відсутня.

Позитивну тенденцію спостерігали також за каналом ROX. Праймери до сателітної ДНК ВРХ давали позитивні сигнали на матрицях з мяса яловичини ($C_t=8,51$) та свинини ($C_t=20,03$), однак ампліфікація на ДНК курятини була повністю відсутня. Дещо зменшилися значення ΔR_n за всіма трьома каналами. Специфічним продуктам за каналами FAM, HEX та ROX відповідали значення 800, 450 та 750 rfu.

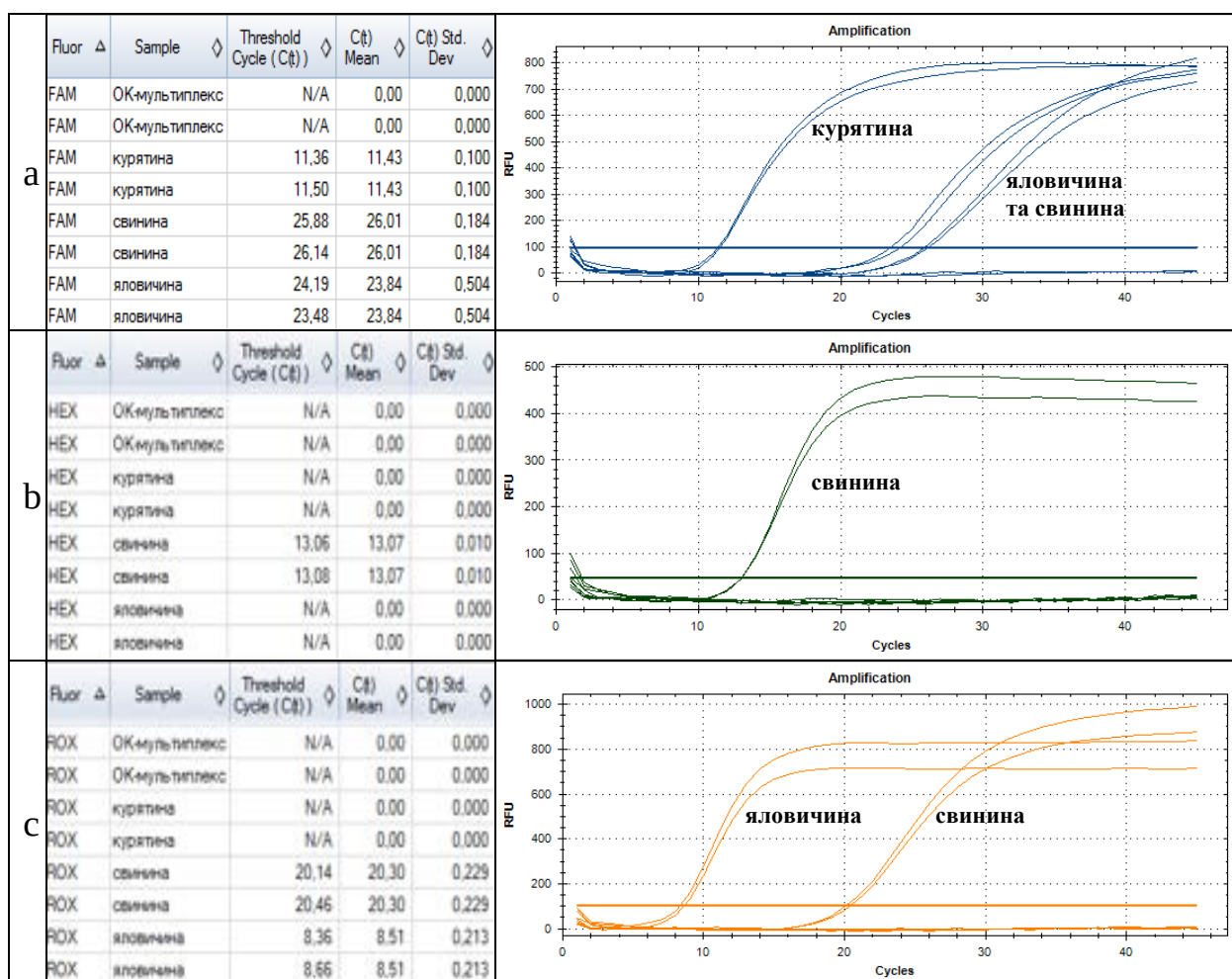


Рис. 3.8. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час оцінювання роботи трьох пар праймерів з зондами (Gall, Var, BtSIV) у форматі мультиплексу за температури гібридизації $T_a=60^\circ\text{C}$.

Таким чином, робота праймерів у форматі мультиплексу суттєво поліпшилась, однак для досягнення 100 % специфічності необхідно було провести подальшу оптимізацію умов ампліфікації.

Як відомо з літературних джерел, зниження температури гібридизації праймерів (T_m) призводить до збільшення місць посадки олігонуклеотидів на хибні ділянки ДНК та появи «неспецифічних» продуктів ампліфікації. Своєю чергою, занадто високі значення T_m призводять до поганого зв'язування праймерів з матрицею, відтак до зменшення або повної відсутності продукту ампліфікації [241,145]. Виходячи з того, що за температури 60°C досліджені пари праймерів давали неспецифічні продукти ампліфікації, наступну процедуру з оптимізації їх роботи треба було проводити у напрямі збільшення температури гібридизації праймерів.

Подальшу оптимізацію за гібридизацією праймерів проводили в діапазоні температурних значень 65, 68 та 70 °C (табл. 3.21). Результати підбору належної температури гібридизації праймерів наведено на рисунках 3.9–3.11.

Таблиця 3.21

Протокол оптимізації ПЛР-РЧ за температурної гібридизації праймерів

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація і синтез	від 65 до 70	40	так	

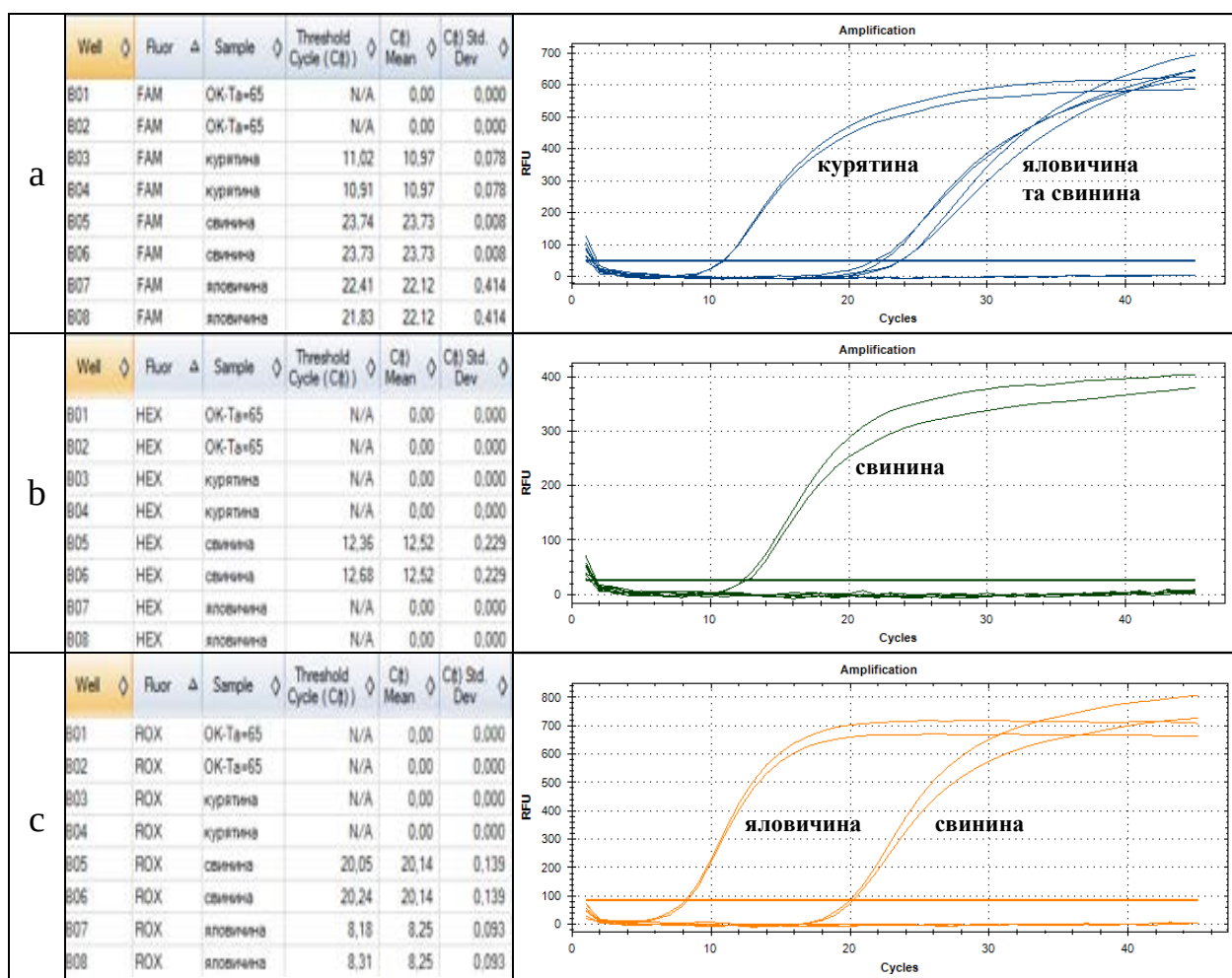


Рис. 3.9. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів за $T_a=65^{\circ}\text{C}$: а–с – канали флуоресценції FAM/синій/курятина, HEX/зелений/свинина, ROX/помаранчевий/яловичина, відповідно.

За температури гібридизації $T_a=65\text{ }^{\circ}\text{C}$ значних змін за всіма трьома каналами (FAM/синій/курятина, HEX/зелений/свинина, ROX/помаранчевий/яловичина) не спостерігали. Незначно зменшились показники ΔRn відносно $T_a=60\text{ }^{\circ}\text{C}$: 600 проти 800 rfu для каналу FAM, 400 проти 450 rfu для каналу HEX та 700 проти 800 rfu для каналу ROX.

Найкращі результати було отримано за температури гібридизації $68\text{ }^{\circ}\text{C}$. За каналом FAM/синій/курятина був присутній лише один сигнал, отриманий на ДНК з курятини зі значеннями $C_t=13,24$, ΔRn 500 rfu. Так само і за іншими каналами спостерігали ампліфікацію лише на відповідних зразках ДНК. Каналу HEX/зелений/свинина відповідали значення $C_t=16,98$, ΔRn 300 rfu, лише на зразку ДНК зі свинини, та відповідно каналу ROX/помаранчевий/яловичина – $C_t=8,47$, ΔRn 550 rfu на зразку яловичини.

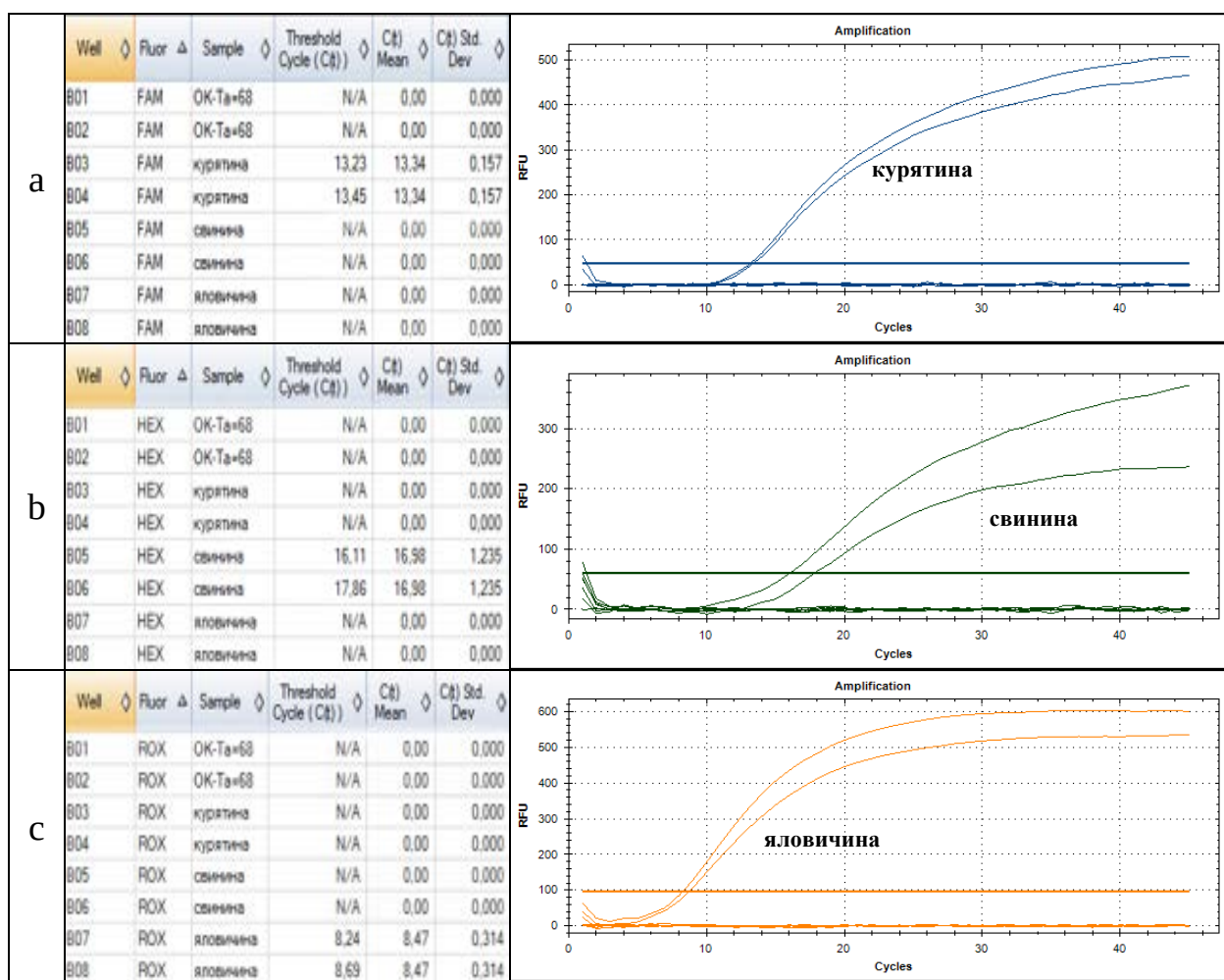


Рис. 3.10. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів за $T_a=68\text{ }^{\circ}\text{C}$: а-с – канали флуоресценції FAM/синій/курятина, HEX/зелений/свинина, ROX/помаранчевий/яловичина, відповідно.

Стосовно останньої з досліджених температур ($T_a=70\text{ }^{\circ}\text{C}$), вона виявилась завищеною. Якщо за каналами FAM та ROX ще спостерігали ампліфікацію, та за HEX вона була повністю відсутньою. Крім того, форма наявних графіків ампліфікації не мала характерної сигмовидної форми, що свідчило про пригнічення ПЛР.

Таким чином, низка проведених досліджень дала змогу встановити оптимальну температуру роботи праймерів у форматі мультиплексу. У всіх подальших дослідженнях з розроблення тест-системи використовували температуру гібридизації праймерів $T_a=68\text{ }^{\circ}\text{C}$.

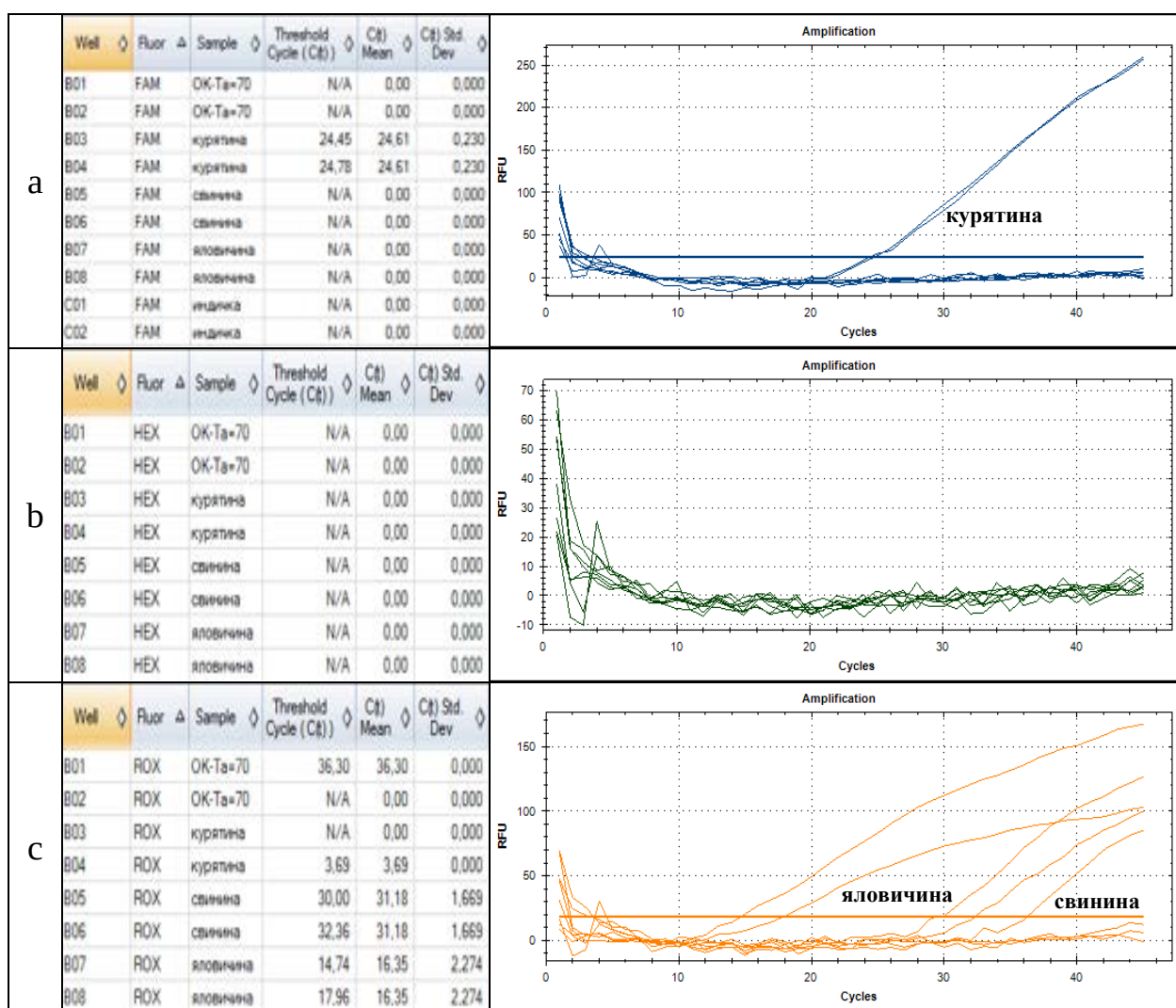


Рис. 3.11. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів за $T_a=70\text{ }^{\circ}\text{C}$: а-с – канали флуоресценції FAM/синій/курятина, HEX/зелений/свинина, ROX/помаранчевий/яловичина, відповідно.

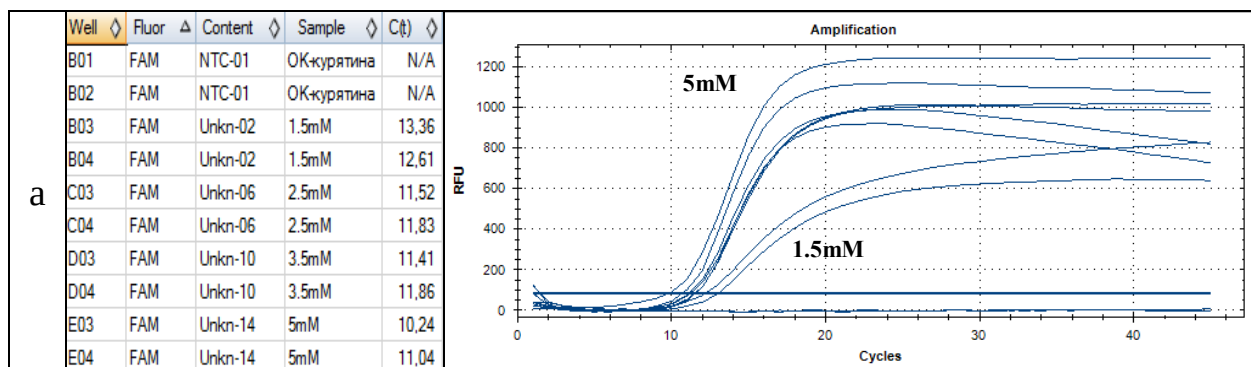
Наступним етапом з оптимізації умов ампліфікації мультиплексу був

підбір оптимальної концентрації MgCl_2 . Для проведення ПЛР рекомендують використовувати концентрацію MgCl_2 у межах від 1 до 6 мМ. Зміна концентрації йонів магнію (Mg^{2+}) у реакційній суміші здатна істотно впливати на специфічність гібридизації праймерів, відтак, вихід цільового ПЛР-продукту.

Для оптимізації умов ПЛР за даним показником було обрано чотири точки – 1,5; 2,5; 3,5 і 5 мМ MgCl_2 . За найкращу концентрацію вважали ту, за якої спостерігали найменше значення C_t та найбільше значення ΔR_n . Результати ампліфікації за даним показником відстежували одночасно за всіма трьома каналами.

На рисунку 3.12 а–с наведено дані з оптимізації умов ампліфікації мультиплексу за концентрацією йонів Mg^{2+} . Так, за каналом FAM, що відповідає праймерам Gall, специфічним до *cytb* курки, найменше середнє значення C_t було отримано за концентрації MgCl_2 5мМ і становило 10,64. При цьому значення нормованого сигналу ΔR_n становило 1175 rfu. Найбільше значення C_t та найменше значення ΔR_n було зафіксовано за концентрації MgCl_2 1,5 мМ (12,99; 700 rfu).

Подібні результати було отримано за двома іншими каналами – HEX (Var) і ROX (BtSIV). Найменші середні значення C_t було отримано за концентрації 5 мМ – 11,79 і 6,93, відповідно. Значення ΔR_n за даної концентрації були найбільшими і становили 1075 і 1300 rfu, відповідно. Як і у випадку з праймерами Gall, зі зниженням концентрації MgCl_2 спостерігали незначне збільшення C_t та суттєве зменшення величин ΔR_n .



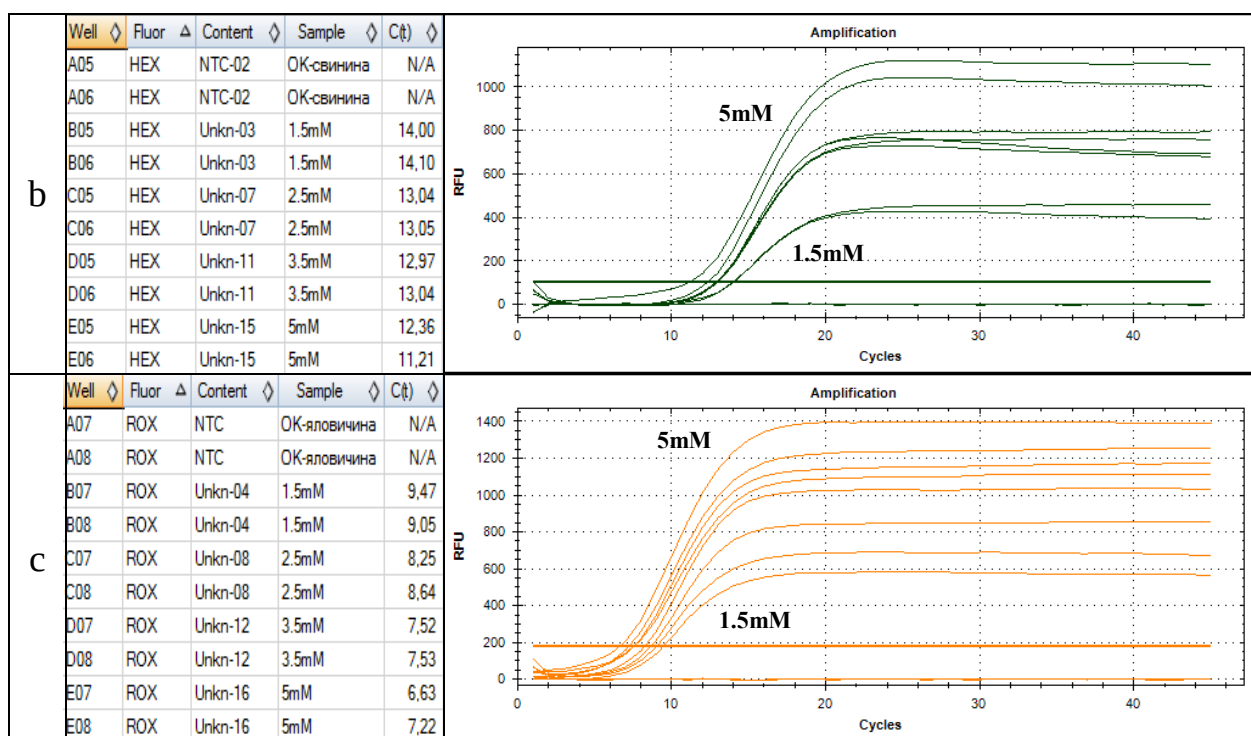


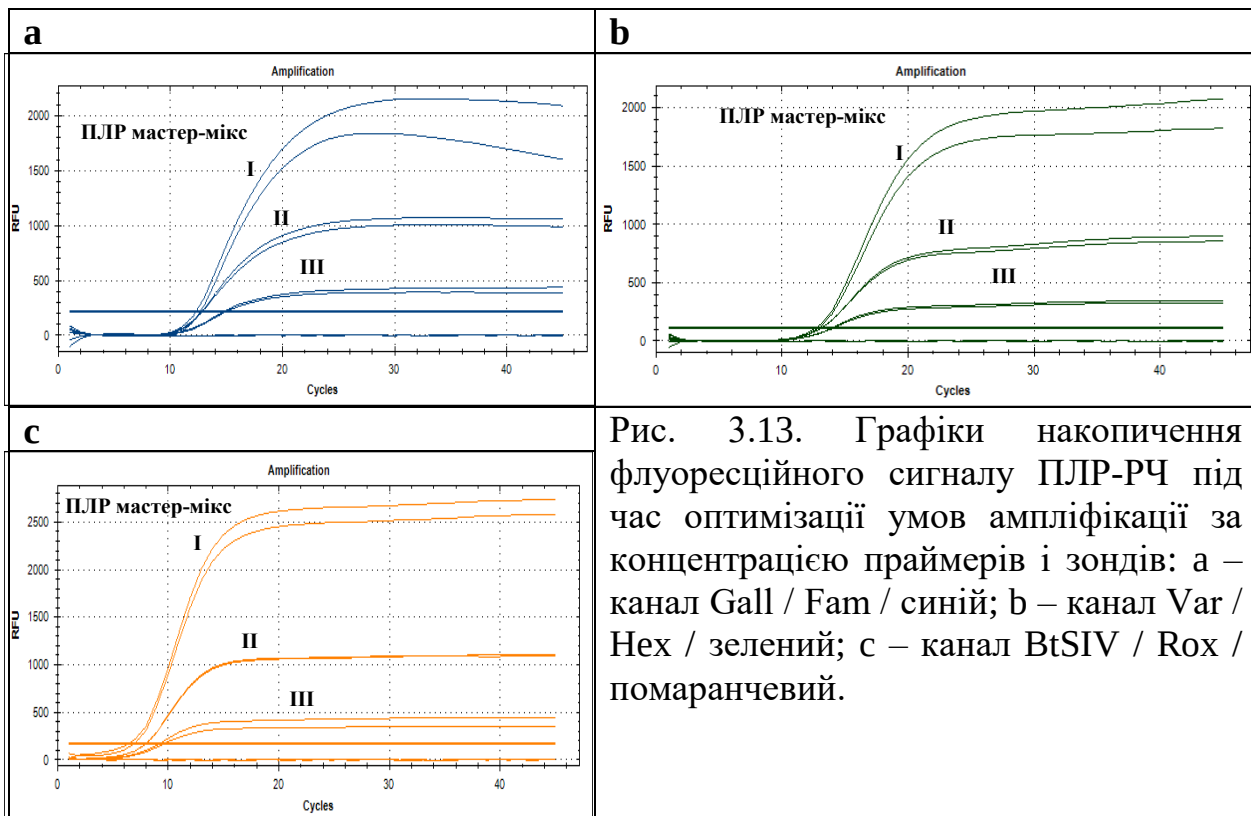
Рис. 3.12. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час оптимізації умов ампліфікації за концентрацією йонів Mg^{2+} : а-с – канали флуоресценції FAM / синій / курятина, HEX / зелений / свинина та ROX / помаранчевий / яловичина, відповідно.

Таким чином, експериментальним шляхом було встановлено, що найбільш оптимальною концентрацією $MgCl_2$ для проведення ПЛР мультиплексної системи з праймерами Gall, Var та BtSIV, є 5 мМ.

Для оптимізації умов роботи мультиплексу за таким параметром як концентрація праймерів та зондів було приготовлено три ПЛР мастер-мікси. Перший (I) містив найбільшу концентрацію усіх трьох пар праймерів (10 пкмоль/реакцію) і зондів (5 пкмоль/реакцію). Другий (II) та третій (III) – відповідно по 5 і 2,5 пкмоль/реакцію праймерів та 2,5 і 1,25 пкмоль/реакцію зондів. Для всіх трьох мастер-міксів співвідношення праймерів до зондів становило 2 : 1. ПЛР-РЧ проводили за $T_a=68\text{ }^{\circ}\text{C}$ та концентрацією $MgCl_2$ 5 мМ (рис. 3.13 а-с).

У таблиці 3.22 наведено результати підбору умов ампліфікації за всіма трьома каналами. Найбільші середні значення Ct було отримано з мастер-міксом III, який містив найменші концентрації праймерів та зондів (Fam – 14,79; Hex – 14,09; Rox – 9,34). Подібні між собою результати було отримано

з мастер-міксами I та II. За всіма трьома каналами графіки ампліфікації виходили раніше та практично збігалися за каналами Fam (12,76 / 12,43) і Hex (13,18 / 12,83). Стосовно величин ΔR_n , вони коливались від 500 rfu для мастер-міксу III до 2000 rfu для I. З огляду на те, що більш пріоритетним показником перебігу ПЛР-РЧ є величина C_t і те, що суттєвої різниці між значеннями C_t для мастер-міксів I та II не спостерігали, для подальших досліджень було обрано мастер-мікс II.



Таблиця 3.22

Оптимізація умов ампліфікації мультиплексу за концентрацією праймерів і зондів

Зонд \ Праймери		пкмоль / реакцію		
		2,5	5	10
пкмоль / реакцію	1,25	14,79 / 14,09 / 9,34	-	-
	2,5	-	12,76 / 13,18 / 7,94	-
	5	-	-	12,43 / 12,83 / 6,59

Примітка: наведено значення C_t для каналів FAM / HEX / ROX

Таким чином, проведення серії реакцій з різними розведеннями олігонуклеотидів дало змогу встановити, що найбільш оптимальною за всіма трьома каналами є концентрація праймерів 5 пкМ та зондів 2,5 пкМ.

3.2.4. Дослідження специфічності та ефективності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу

Специфічність методу характеризує його здатність виявляти саме ту речовину, для визначення якої даний метод дослідження призначено, у певному матеріалі, у присутності інших компонентів. Для методу ПЛР специфічність визначають його здатністю ідентифікувати наявність певних (специфічних) фрагментів ДНК обраного об'єкту (мікроорганізм, генно-інженерна конструкція, людина та ін.) у досліджуваному зразку. У даному випадку специфічність дає змогу довести, що ідентифіковано саме бажаний об'єкт. Для кількісної ПЛР специфічність дає змогу довести, що за використання методики можна точно та правильно визначити вміст саме аналізованої ділянки нуклеїнової кислоти у зразку [487,488].

Перевірку специфічності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованої з наступних організмів: курка (*Gallus gallus*), свиня (*Sus domesticus*), ВРХ (*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 праймерів. У таблиці 3.23 та на рисунку 3.14 наведено результати з перевірки

специфічності роботи праймерів (Gall, Var, BtSIV), підібраних для визначення видової належності тканин курки, свині та ВРХ. Видно, що всі три пари праймерів з зондами мають 100 % специфічність до обраної мішені таї можуть бути використані у розробленні тест-системи.

Таблиця 3.23

Перевірка специфічності роботи праймерів (Gall, Var, BtSIV), підібраних для визначення видової належності тканин курки, свині та ВРХ

№	Зразки ДНК	Праймери і зонди		
		Gall/Fam	Var/Hex	BtSIV/Rox
1	Курка / <i>Gallus gallus</i>	+	-	-
2	Свиня / <i>Sus domesticus</i>	-	+	-
3	ВРХ / <i>Bos taurus</i>	-	-	+
4	Вівця / <i>Ovis aries</i>	-	-	-
5	Індик / <i>Meleagris gallopavo</i>	-	-	-
6	Качка / <i>Anas platyrhynchos</i>	-	-	-
7	Гуска / <i>Anser domesticus</i>	-	-	-
8	Кінь / <i>Equus caballus</i>	-	-	-
9	Лосось / <i>Salmo salar</i>	-	-	-
10	Людина / <i>Homo sapiens</i>	-	-	-
11	Соя / <i>Glycine max</i>	-	-	-
12	Кукурудза / <i>Zea mays</i>	-	-	-
13	Ріпак / <i>Brassica napus</i>	-	-	-
14	Рис / <i>Oryza sativa</i>	-	-	-
15	Жито / <i>Secale cereal</i>	-	-	-
16	Пшениця / <i>Triticum aestivum</i>	-	-	-
17	Ячмінь / <i>Hordeum vulgare</i>	-	-	-
18	Овес / <i>Avena sativa</i>	-	-	-
19	Гречка / <i>Fagopyrum esculentum</i>	-	-	-
20	Томати / <i>Lycopersican esculentum</i>	-	-	-
21	Кортопля / <i>Solanum tuberosum</i>	-	-	-
22	Кишкова паличка / <i>Escherichia coli</i>	-	-	-

Ефективність роботи всіх трьох пар праймерів з зондами у форматі мультиплексу перевіряли шляхом проведення ПЛР з серією десятикратних розведень препаратів ДНК. Для екстракції ДНК використовували свіжі

тканини курки, свині та ВРХ. Якість зразків ДНК перевіряли спектрофотометрично. Оскільки ефективність ПЛР залежить тільки від кута нахилу кривої, абсолютні значення концентрації ДНК були непотрібні [241].

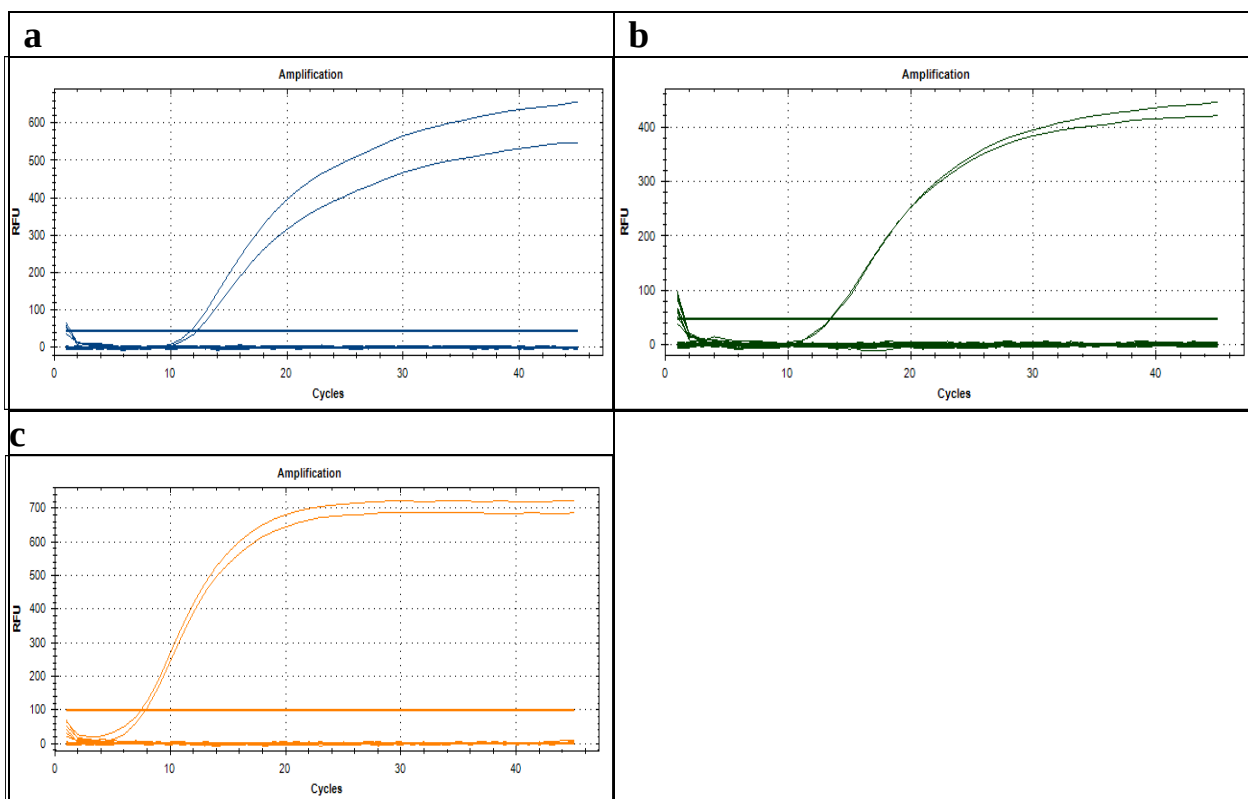


Рис. 3.14. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час перевірки специфічності роботи праймерів та зондів: а – Gall / Fam / синій; б – Var / Hex / зелений; с – BtSIV / Rox / помаранчевий

Кожна серія десятикратних розведень ДНК складалася з чотирьох точок. На рисунку 3.15 а–с наведено графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналами Fam, Hex та Rox. На основі отриманих значень C_t за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Manager (Version 1.6.541.1028) будували графіки стандартних кривих у системі координат $\text{Log}[N] / C_t$ (d). Стандартні криві описуються загальним лінійним рівнянням $y = -\alpha x + b$, де α виражає тангенс кута нахилу кривої, і дають змогу оцінити ефективність ампліфікації.

У таблиці 3.24 для кожної пари праймерів з зондом наведено розраховані дані щодо кута нахилу кінетичної кривої (α , Slope), коефіцієнта кореляції (R^2) та ефективності реакції (E). Отримані дані демонструють, що для всіх трьох пар праймерів значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон

від $-3,58$ до $-3,10$, а показники R^2 були не нижчими за $0,99$ [489]. Розраховані значення ефективності ПЛР для праймерів Gall, Var та BtSIV становили $103,2$, $100,0$ та $94,9\%$, відповідно, що є досить високим показником для діагностичних тест-систем.

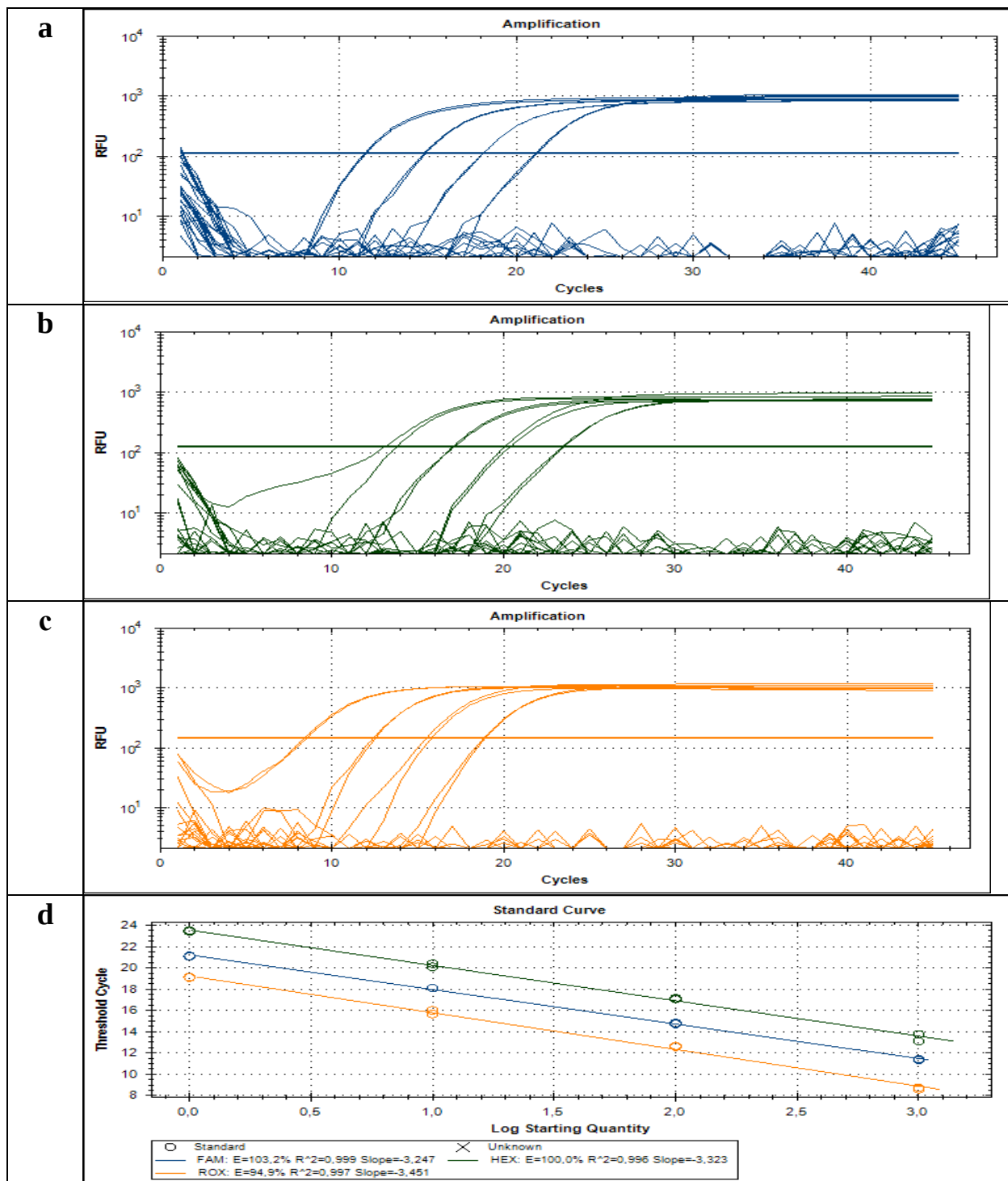


Рис. 3.15. Оцінювання ефективності роботи праймерів та зондів у мультиплексній реакції: а–с – графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналами Gall/Fam/синій, Var/Hex/зелений та BtSIV/Rox/помаранчевий, відповідно; d – стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК.

Таблиця 3.24

Ефективність проведення ПЛР з обраними олігонуклеотидними праймерами та зондами в системі мультиплексу

№	Назва	Е, %	R ²	α
1	Gall	103,2	0,999	-3,247
2	Var	100,0	0,996	-3,323
3	BtSIV	94,9	0,997	-3,451

Таким чином праймери, що входять до складу досліджуваного мультиплексу, забезпечують високу ефективність проведення ПЛР у реальному часі і можуть бути використані для розроблення тест-системи.

3.2.5. Визначення аналітичної чутливості мультиплексу

Чутливість методу в широкому розумінні визначається як можливість із застосуванням даного методу реєструвати невеликі зміни концентрації досліджуваної речовини. Для методу якісної ПЛР чутливість рівноцінна межі виявлення (LOD, limit of detection), тобто мінімальній концентрації ДНК у зразку, яку можна виявити. Для кількісної ПЛР чутливість методу порівнянна з межею кількісного визначення, тобто з мінімальною концентрацією ДНК у зразку, що може бути визначена з необхідною правильністю та прецизійністю під час виконання аналізу. Необхідно враховувати, що на межу виявлення як у разі якісної, так і кількісної ПЛР, передусім впливають метод виділення ДНК та ефективність її застосовування, чутливість ПЛР тест-системи, підхід щодо ідентифікації результату ампліфікації [488,490].

Під чутливістю розуміють ту мінімальну кількість ДНК, яку здатна виявляти дана тест-система. Під аналітичною чутливістю — мінімальну кількість мішені, за якої тест-система забезпечує 100 % відтворюваність результатів аналізу [491].

Визначення аналітичної чутливості тест-системи проводили за допомогою кількісно охарактеризованих препаратів ДНК, екстрагованих із м'яса курки, свині та ВРХ. 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. Це свідчило про відсутність у досліджуваній ДНК зайвих речовин, які б могли виступати як інгібітори перебігу ПЛР.

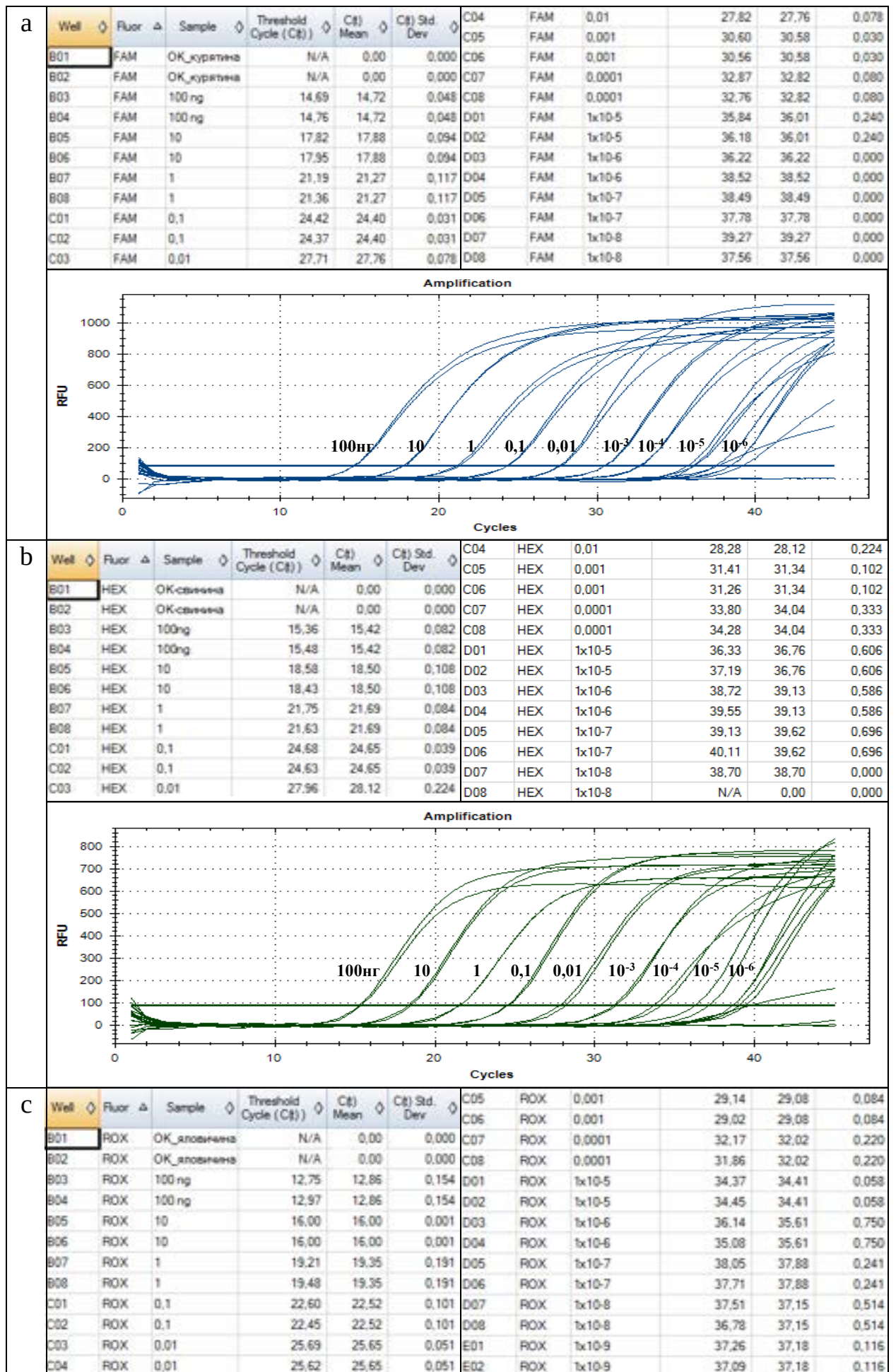
Для всіх досліджуваних препаратів ДНК було приготовлено серію десятикратних розведень. Кожна серія нараховувала від 11 до 12 точок, які лежали в діапазоні від $n \times 10^2$ до $n \times 10^{-9}$ нг ДНК. Кожну точку аналізували у 10 повторностях. На підставі отриманих даних (наявність-відсутність сигналу) було визначено межу виявлення та аналітичну чутливість мультиплексної системи (табл. 3.25).

Таблиця 3.25

Аналітична чутливість мультиплексної системи за використання десятикратних розведень ДНК (нг)

Мішені Розведення	Gall	Var	BtSIV
1×10^2	10	10	10
1×10^1	10	10	10
1×10^0	10	10	10
1×10^{-1}	10	10	10
1×10^{-2}	10	10	10
1×10^{-3}	10	10	10
1×10^{-4}	10	10	10
1×10^{-5}	10	10	10
1×10^{-6}	9	7	10
1×10^{-7}	5	3	6
1×10^{-8}	5	5	7
1×10^{-9}	-	-	3

Визначення чутливості праймерів Gall (канал Fam / синій) у мультиплексній системі проводили за допомогою десятикратних розведень препарату ДНК з м'яса курки. Всього було приготовлено 11 точок з концентраціями від 100 до 1×10^{-8} нг / реакцію (рис. 3.16 а). Сигнал ампліфікації спостерігали у всіх точках, а стабільні значення C_t коливались від $14,48 \pm 0,33$ до $36,20 \pm 0,23$. Треба зазначити, що за концентрації ДНК, меншої



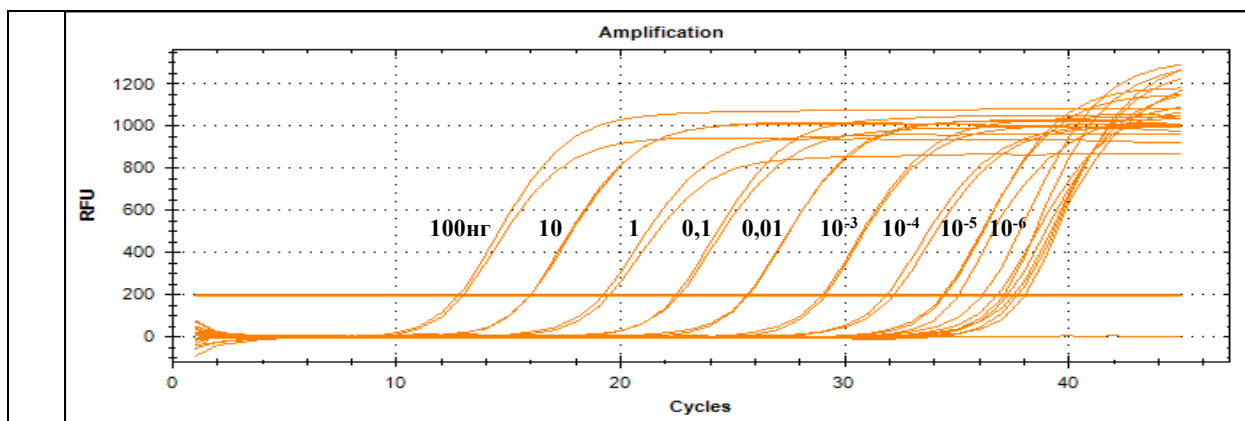


Рис. 3.16. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час визначення аналітичної чутливості мультиплексної системи: а канал – Gall / Fam / синій, b – Var / Hex / зелений, с – BtSIV / Rox / помаранчевий.

ніж 1×10^{-5} нг, починався дуже великий розмах значень між повторами, а сама ампліфікація була нестабільна та на рівні контамінації. Таким чином, отримані результати дали змогу встановити, що межа виявлення (LOD) для каналу Fam мультиплексної системи дорівнює 1×10^{-6} нг, а аналітична чутливість становить 1×10^{-5} нг.

Для дослідження роботи праймерів Var (канал Hex / зелений) у мультиплексній системі було також приготовлено 11 точок десятикратних розведень препарату ДНК з м'яса свині від 100 до 1×10^{-8} нг / реакцію (рис. 3.16 b). Сигнали ампліфікації було зафіксовано практично за всіма точками за винятком розведення 1×10^{-8} . Стабільні значення Ct коливались від $15,41 \pm 0,23$ до $36,46 \pm 0,25$. Для даного каналу було отримано схожі результати. Межа виявлення (LOD) та аналітична чутливість становили 1×10^{-6} і 1×10^{-5} нг, відповідно.

Для оцінювання роботи праймерів BtSIV (канал Rox / помаранчевий) було досліджено 12 точок десятикратних розведень препарату ДНК з м'яса яловичини з концентраціями від 100 до 1×10^{-9} нг / реакцію. (рис. 3.16 c). Сигнал ампліфікації був присутній за всіма точками, при цьому значення Ct лежали у межах від $12,85 \pm 0,17$ до $35,67 \pm 0,18$. Отримані результати дали змогу встановити значення LOD (1×10^{-7} нг) та аналітичної чутливості (1×10^{-6} нг) за даним каналом.

3.2.6. Комплектація тест-системи «М'ясо-тест»

Отже, було розроблено діагностичну тест-систему «М'ясо-тест», яка дає змогу ідентифікувати ДНК курки, свині та ВРХ з межею виявлення не менше ніж 1×10^{-6} нг (1фг). Специфічність розробленої тест-системи становить 100 %, аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг (0,1нг/мл). Визначення аналітичної чутливості проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК. Тест-систему характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу.

За допомогою розробленої тест-системи можна визначати видову належність м'яса таких свійських тварин, як кури, свині та ВРХ.

Таблиця 3.26

Приклад комплектації тест-системи «М'ясо-тест»

Складова частина	Зовнішній вигляд	pH
ПЛР-РЧ суміш	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
Taq-полімераза	Прозора безбарвна рідина	від 7,5 до 8,5
НКЗ (-)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
ПКЗ (+)	Прозора безбарвна	від 5,0 до 7,5

Таблиця 3.27

Вимоги щодо метрологічних показників тест-системи

Назва показника	Характеристика за показником
Чутливість	Межа відносної чутливості становить 1×10^{-6} нг
Специфічність	Специфічність - 100% при тестуванні панелі препаратів ДНК, отриманих з м'яса курки, свині та ВРХ
Достовірність	Тест-система повинна виявляти специфічні послідовності ДНК у концентрації $\geq 1 \times 10^{-5}$ нг

Тест-систему виготовляли у двох варіантах – на 50 та 100 реакцій. Комплектацію тест-системи «М'ясо-тест» виконано згідно з вимогами до ПЛР тест-систем (табл. 3.26, 3.27). До складу кожного ПЛР набору входять

суміш для проведення ПЛР у реальному часі, Taq ДНК-полімераза, позитивний (ПКЗ) та негативний (НКЗ) контрольні зразки. Позитивний контрольний зразок представляє собою суміш розчинів ДНК курки, свині та ВРХ у концентраціях від 250 до 500 нг/мкл.

3.2.7. Порівняльні випробування розробленої тест-системи

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 слугували харчові продукти з м'ясними складниками як напівфабрикатів, так і готових до споживання виробів, а також м'ясні консерви та корми для тварин. Усього було проаналізовано 33 найменування продукції, серед яких були моно- та багатокомпонентні зразки, охолоджене м'ясо та вироби, що зазнали термічної обробки.

Для порівняння чутливості та специфічності роботи тест-системи проводили паралельні дослідження за використання тест-системи «Sus scrofa Ident RT» (Синтол, РФ). Дана тест-система призначена для ідентифікації свинини у харчовій продукції. Результати досліджень наведено у таблиці 3.28. Каналам Fam, Hex і Rox тест-системи «М'ясо-тест» відповідали такі мішені як курятина, свинина та яловичина, відповідно. Каналу Fam тест-системи виробництва «Синтол» – свинина.

Проведений аналіз продемонстрував, що розроблена тест-система здатна ідентифікувати тканини курятини, свинини та яловичини не тільки у свіжій м'ясній сировині, а також у багатокомпонентній продукції, що зазнала термічної обробки. Результати, отримані за всіма трьома мішенями, збіглися з інформацією, зазначеною на пакуванні за винятком зразка №26. Відповідно до інформації виробника, його було вироблено винятково зі свинини. Результат ПЛР-аналізу цьому суперечив, у зразку було виявлено присутність ДНК курятини ($C_t=18,47$). Стосовно порівняльних випробувань, особливих

розбіжностей у результатах, а також значеннях C_t між розробленою та комерційною тест-системами не було, за винятком зразка №18. До складу зразка, згідно з описом, мала входити лише яловичина, однак тест-система «Sus scrofa Ident RT» дала позитивний сигнал за каналом Fam ($C_t=21,15$), який відповідає мішені свинина. В розробленій тест-системі «М'ясо-тест» за відповідним каналом (Hex) позитивного сигналу не спостерігали.

За результатами проведених досліджень харчової продукції та кормів для тварин за використання тест-системи «М'ясо-тест» встановлено, що значення C_t для каналів Fam і Hex знаходилися в межах 13,45–18,93 та 13,87–19,59, відповідно. Величини ΔR_n – 800–1000 та 600–800 rfu, відповідно. Для каналу Rox показники були наступними – $C_t = 8,06$ –13,54, $\Delta R_n = 900$ –1200 rfu.

Таблиця 3.28

Визначення видової належності м'яса у харчовій продукції та кормах за допомогою тест-систем «М'ясо-тест» і «Sus scrofa Ident RT» (Синтол, РФ)

№	Назва виробу	Склад виробу	«М'ясо-тест» (C_t)			Синтол (C_t)
			FAM	HEX	ROX	FAM
1	Сосиски з м'ясом птиці «Смакота»	Свинина, філе куряче, пряно-ароматичні добавки, меланж яєчний, молоко сухе, сіль, цукор, E451, E250, E300	13,45	16,46	N/A	15,39
2	Сосиски «Гурман»	Свинина, яловичина, молоко коров'яче, меланж яєчний, сухе молоко, E451, E300, E250, смако-ароматичні добавки	N/A	17,67	11,86	17,71
3	Сардельки «Традиційні»	Свинина, яловичина, м'ясо курки, білковий стабілізатор, крохмаль картопляний, E621, E451, E260, E300, прянощі, ароматизатори, мальтодекстрин, декстроза,	13,54	15,89	10,48	16,53
4	Сало селянське	Сало бокове, сіль	N/A	28,67	N/A	N/A
5	Сало домашнє солоне	Сало бокове, сіль, часник, перець	N/A	29,56	N/A	N/A
6	Сало копчене «Закарпатське»	Сало бокове, сіль, перець	N/A	31,56	N/A	N/A
7	Ковбаса варена «Молочна»	Свинина, яловичина, молоко сухе, меланж яєчний, E300, E250, Смако-ароматичні добавки	N/A	16,64	11,56	17,34
8	Ковбаса паштетна «Подомашньому»	Печінка свиняча або яловича, субпродукти I або II категорії (свинина та яловичина), цибуля, аромати	N/A	14,63	10,12	14,34
9	Ковбаса	Яловичина, сало бокове, свинина,	N/A	16,63	11,10	16,92

	напівкопчена «Сорочинська»	білковий стабілізатор свинячої шкіри, крупа манна, крохмаль картопляний, пряно-ароматична суміш, E621, E300, часник, цибуля, E451, E250				
10	Ковбаски напівкопчені «Шашличні»	Свинина, пряно-ароматична суміш, E450, E621, E316, рослинний гідролізат, ароматизатори (часник, цибуля, коріандр), E250	N/A	15,63	N/A	15,28
11	Ковбаса напівкопчена «Молодіжна»	Яловичина, свинина, сало бокове, білковий стабілізатор свинячої шкіри, крупа манна, крохмаль картопляний, E407, E451, E621, глюкоза, аромати ідентичні натуральним, часник, перець, кмін, імбир, E300, E250	N/A	16,23	12,13	17,34
12	Саламі «Святкова»	Свинина, яловичина, сало бокове, білковий стабілізатор свинячої шкіри, E451, E575, E621, спеції, E300, глюкоза, ароматизатори ідентичні натуральним, E250	N/A	15,99	13,54	16,34
13	Ковбаски гриль	Свинина, прянощі, E621, E451, сіль, перець, екстракти прянощів	N/A	13,87	N/A	13,45
14	Напівфабрикат зі свинини «М'ясо для шашлику»	Шийна частина свинини, цибуля, сіль, оцет, перець	N/A	14,26	N/A	13,78
15	Напівфабрикат зі свинини «Реберця свинячі»	Свинина	N/A	13,43	N/A	12,93
16	Напівфабрикат з яловичини «Філе пікантне»	Яловичина	N/A	N/A	8,06	N/A
17	Напівфабрикат зі свинини «Лопатка по-домашньому»	Свинина	N/A	13,66	N/A	12,87
18	Напівфабрикат м'ясний «Фарш свинячий»	Свинина	<u>18,47</u>	13,93	N/A	13,02
19	Напівфабрикат зі свинини «Биток»	Свинина	N/A	13,93	N/A	13,21
20	Ковбаса варено-копчена «Саламі посольська»	Яловичина, сало бокове та хребтове, свинина, сіль, цукор, перець, E451, глюкоза, E300, E250	N/A	15,93	11,07	15,85
21	Ковбаса варено-копчена «Саламі мисливська»	Яловичина, сало, свинина, сіль, пряно-ароматична суміш, регулятор кислотності, E621, E451, E300, E250	N/A	16,06	12,43	16,34
22	Консерви НЗ Каша перлова з м'ясом дикого кабана	М'ясо дикого кабана жиловане, крупа перлова, цибуля, вода, олія рафінована, сіль, перець	N/A	19,59	N/A	18,49
23	Консерви Каша ячнева з м'ясом курки	крупа ячна, м'ясо курки, цибуля, морква, вода, олія соняшникова, масло вершкове, сіль, перець, лавровий лист	14,67	N/A	N/A	N/A

24	Консерви Каша ячнева зі свининою	крупа рисова, свинина, цибуля, морква, вода, олія соняшникова, масло вершкове, сіль, перець, лавровий лист	N/A	16,88	N/A	16,34
25	Консерви Курка по-домашньому	М'ясо курки на кістці, цибуля, сіль, перець чорний, морква	15,51	N/A	N/A	N/A
26	Консерви Яловичина тушкована	Яловичина, жир яловичий, цибуля, сіль, лавровий лист, перець чорний	N/A	N/A	12,49	<u>21,15</u>
27	Корм для котів «Cat and Go»	М'ясо та субпродукти тваринного походження (телятина), борошно пшеничне, мінерали, гліцин, камедь, глютен, цукор, вітаміни, барвник, ароматизатор	N/A	19,46	11,63	16,16
28	Корм для котів «Мяу»	М'ясо та субпродукти тваринного походження (курятини), пшениця, екстракти рослинних білків, мінерали, продукти рослинного походження, вітаміни, камедь, барвник	17,76	14,56	N/A	13,09
29	Корм для котів Pro Plan	Куриця, пшениця, сухий білок птиці, рис, кукурудзяний та пшеничний глютен, тваринний жир, кукурудза, яєчний порошок, корінь цикорію, риб'ячий жир, смакоароматична добавка, дріжджі, консерванти, мінерали, вітаміни, пребіотики	16,34	N/A	N/A	N/A
30	Корм для котів Едванс (Advance) с куркою та рисом	Курка, рис, гідролізовані тваринні та рибні білки, дріжджі, тваринні жири, кукурудза, кукурудзяне борошно, обезводнені білки птиці, E450, плазматичні білки, риб'ячий жир, цитрусовий екстракт, яєчний порошок, вітаміни та мінерали	16,56	N/A	N/A	N/A
31	Корм для собак Роял Канин (Royal Canin Maxi Adult)	Кукурудза, м'ясо птаха, кукурудзяне борошно та глютен, тваринні жири, дегідратований білок свинини, буряк, гідролізати білків, хрящів та ракоподібних, мінерали, соєва олія, риб'ячий жир, дріжджі, яєчний порошок, таурин	18,93	N/A	N/A	N/A
32	Корм для собак Фест Чойс (1st Choice Adult All breed)	Борошно з м'яса ягняти та оселедця, рис, картопля, вівсяна і ячмінна крупа, рослинна олія, гідролізат курячої печінки, буряк, томати, льняне насіння, жир з оселедця, екстракти дріжджів, цикорію, юки та зеленого чаю, панцир ракоподібних, мідії, трепанг, морські водорості, м'ята, петрушка, імбир	N/A	N/A	15,63	N/A
33	Корм для собак Happy Dog NaturCroq Active	Пшениця, яловичина, кукурудза, яловичий жир, птах, пташиний жир, гемоглобін, буряк, риба, гідролізат печінки, соняшникова та ріпакова олії, дріжджі, солод, морква, сіль, зелений овес, соняшник, петрушка, крес	N/A	N/A	19,43	N/A

Отримані дані щодо порівняльних випробувань тест-системи «М'ясо-тест» на основі методу ПЛР в реальному часі під час визначення курятини,

свинини та яловичини у складі харчових продуктів і кормів для тварин дають змогу зробити висновок, що даний діагностикум є сучасним, високочутливим та специфічним і може бути рекомендований для проведення досліджень з визначення видової приналежності м'яса та м'ясних компонентів у харчовій продукції, в тому числі й тій, що зазнала термічної обробки, та у кормах для тварин.

Висновки до розділу 3.2

1. Розроблено методологію з визначення фальсифікації видової приналежності м'яса курятини, свинини та яловичини методом ПЛР у реальному часі у сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції;
2. Визначено видові молекулярно-генетичні маркери та обрано праймери з зондами для технології *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ;
3. Розроблено мультиплексну тест-систему «М'ясо-тест», яка дає змогу одночасної ідентифікації трьох різних мішеней – ДНК курки, свині та ВРХ, з межею виявлення не менше ніж 1×10^{-6} нг (1 фг). Специфічність розробленої тест-системи становить 100 %, аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг (0,1 нг/мл);
4. Розроблена тест-система дає змогу ідентифікувати тканини курятини, свинини та яловичини у багатокомпонентних сумішах та продукції, що зазнала термічної обробки;
5. Порівняльні випробування, проведені за використання комерційного діагностикуму, дали схожі результати за такими показниками як чутливість та специфічність;
6. Розроблена тест-система рекомендована випробувальним лабораторіям для здійснення контролю за фальсифікацією видової належності м'яса таких видів тварин, як кури, свині та ВРХ.

Перелік наукових робіт, в яких опубліковані результати досліджень, представлених у розділі 3.2:

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. Збірник наукових праць Білоцерківського національного аграрного університету*. 2014. Вип. 2 (112). С. 112–115.

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

3.3. Розроблення методології та підбір молекулярно-генетичних маркерів для визначення ГМР у сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції методом ПЛР-РЧ

Незважаючи на те, що жодну генетично модифіковану культуру в Україні офіційно не зареєстровано, на практиці вирощування ГМ сої, кукурудзи та ріпаку здійснюється. Підтвердженням цього є дані лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт» про наявність ГМ складників у численних зразках сільськогосподарської сировини і харчових продуктів [492]. Дані, опубліковані на офіційному сайті Державної санітарно-епідеміологічної служби України, також підтверджують присутність ГМО в країні. Так, у 2014 році установами, що знаходяться в управлінні Держсанепідслужби, було досліджено 6590 зразків харчових продуктів та продовольчої сировини, при цьому в 87 з них було виявлено присутність ГМО [493]. Моніторинг поширення ГМО рослинного походження у потенційній сировинній базі комбікормів полтавського регіону проводився протягом декількох років в Інституті свинарства і агропромислового виробництва НААН. У результаті проведених досліджень було виявлено присутність біотехнологічної сої, кукурудзи та ріпаку у потенційній комбікормовій сировині [494].

Таким чином на практиці система забезпечення безпеки ГМО та продукції з ГМО для населення фактично не діє. Державних реєстрів ГМО та продукції з ГМО не створено. Лабораторний контроль за обігом ГМО в країні здійснюється не належним чином, оскільки по-перше, є відсутньою уніфікація методології проведення досліджень, по-друге, не визначені вимоги до періодичності здійснення такого роду досліджень, по-третьє, відсутні сучасні, якісні та не дорогі діагностикуми вітчизняного виробництва.

Спираючись на діючі в Україні ДСТУ ISO щодо визначення ГМО та вимоги щодо розроблення ПЛР-діагностикумів, було розроблено серію тест-

систем (повний комплекс реагентів) для визначення якісного та кількісного вмісту ГМО в харчових, фармакологічних і косметичних продуктах, сільськогосподарській сировині рослинного походження та кормах. Розроблені тест-системи дають можливість здійснювати комплексний аналіз зразків щодо вмісту ГМО та проводити такі етапи аналізу, як скринінг за регуляторними та кодуючими послідовностями, ідентифікація видової належності рослинної складової, ідентифікація трансформаційної події та визначення вмісту ГМО у відсотках.

3.3.1. Методології визначення ГМО з застосуванням молекулярно-генетичних методів дослідження

Ефективність використання сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень для виявлення ГМО залежить від повноти та точності інформації щодо генно-інженерних конструкцій, використаних під час створення відповідних трансгенних культур. Детекція ГМО вимагає щонайменше часткового знання про послідовності цільових генів та типи генетичних модифікацій. На жаль, у більшості випадків ця інформація є комерційною власністю фірм-виробників, тому в наших розробках ми користувалися даними, опублікованими дослідницькими лабораторіями, зокрема JRC та BATS, представленими в міжнародних наукометричних базах даних (NCBI, GMDD) або отриманими безпосередньо шляхом секвенування ліній біотехнологічних культур [243, 495, 324, 496, 497].

У рамках інструкції 1829/2003 (EC) на базі Об'єднаного наукового центру ЄС (Joint Research Centre, JRC) було створено референтну лабораторію (Community Reference Laboratory, CRL) для підтримки мережі лабораторій з визначення ГМО (European Network of GMO Laboratories) [498]. Сферою діяльності Європейської мережі лабораторій, що займаються ГМО, є створення унікальної платформи для експертів, які займаються відбором проб, детекцією, ідентифікацією та кількісним визначенням ГМО у

навколишньому середовищі, харчових продуктах, кормах і насінні. Референтна лабораторія вирішує такі технічні проблеми, як розробка якісних і кількісних методів аналізу; підготовка персоналу та передача технологій; апробація і професійна оцінка методів; розробка стратегії відбору проб для аналізу; створення біоінформативних баз даних щодо ГМО. На базі Інституту еталонних матеріалів і вимірів (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM), який входить до складу JRC розробляються еталонні (стандартні) матеріали.

За основу під час розроблення тест-систем було обрано схему проведення досліджень щодо визначення ГМО (рис. 3.17), запропоновану Інститутом здоров'я і захисту споживачів (Health and Consumer Protection, IHCP) JRC з певними модифікаціями [499]. Відповідно до цієї схеми має бути розроблено чотири окремі панелі тест-систем: для якісного аналізу, кількісного аналізу, ідентифікації ГМ ліній та видової ідентифікації рослин.

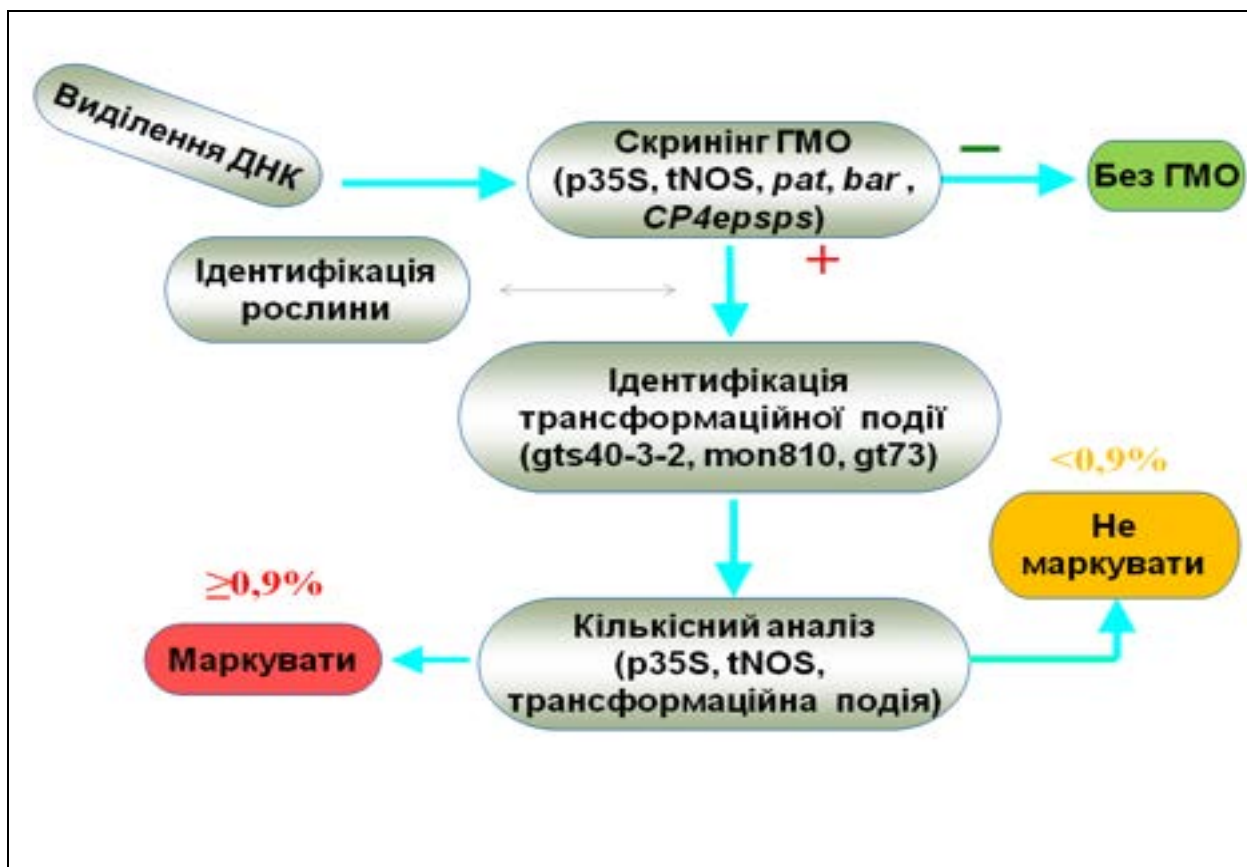


Рис. 3.17. Схема проведення досліджень щодо визначення ГМО

Існують різні стратегії та підходи методу ПЛР для виявлення дозволених ГМО. Специфічність методу ПЛР залежить від точності підбору праймерів.

Праймери для ПЛР можуть бути підібрані до різних елементів генно-інженерних конструктів, що використовуються під час створення ГМО. Розроблення так званих «скринінгових» методів, які дають змогу одночасно виявляти якомога більшу кількість відомих ГМ культур, досягається шляхом конструювання праймерів, специфічних до найчастіше використовуваних під час створення ГМО-послідовностей. Зазвичай це регуляторні послідовності, такі як промотори та термінатори. В наших розробках ми зупинилися на промоторі 35S з вірусу мозаїки цвітної капусти (cauliflower mosaic virus, CaMV) та термінаторі NOS з *Agrobacterium tumefaciens*. ГМ рослини також можна ідентифікувати за введеними структурними генами. Для того, щоб направити специфічність реакції у бажаному напрямі, необхідно підібрати праймери, специфічні до послідовностей конкретних генів (*CP4-epsps*, *pat*, *bar*) або локалізованих у різних генетичних елементах, наприклад, промотор-структурний ген чи структурний ген-термінатор. У випадку, коли доступна повна інформація щодо застосованого генно-інженерної конструкції та місця інтеграції у геномі трансформованої рослини, можливе розроблення «лінія-специфічної» системи шляхом підбору праймерів до унікальної послідовності ДНК, присутній лише в даній конкретній трансформованій лінії рослини. Зазвичай це досягається шляхом конструювання праймерів, що гібридизуються в місцях стиків введеної Т-ДНК і ДНК організму-господаря. Такі місця стиків являють собою унікальну нуклеотидну послідовність, що є ідеальною мішенню для високоспецифічного ПЛР-аналізу. В нашій роботі такий підхід було використано під час розроблення тест-систем серії «ГМ-ідентифікація» та «ГМ-кількість», що дають змогу ідентифікувати і визначати кількісний вміст ГМ ліній сої (GTS40-3-2, MON89788, A2704-12 та ін.), кукурудзи (MON810, MON863, BT176 та ін.), ріпаку (RF1, GT73, MS1 та ін.), рису (LLRICE62) та цукрового буряку (H7-1).

Необхідною передумовою розроблення будь-якого методу аналізу є наявність відповідного сертифікованого референтного зразка. У нашому випадку це були зразки сертифікованих еталонних матеріалів, виготовлених

інститутом еталонних матеріалів і вимірів IRMM (ЄС), американською асоціацією хіміків жиролійної промисловості AOCS (США), та стандартні зразки власного виробництва [500-503].

Таким чином, спираючись на діючі в Україні ДСТУ ISO щодо визначення ГМО, вимоги щодо розроблення ПЛР-діагностикумів та рекомендації референтної лабораторії ЄС, було розроблено серію тест-систем (повний комплекс реагентів) для визначення якісного та кількісного вмісту ГМО в харчових, фармакологічних і косметичних продуктах, сільськогосподарській сировині рослинного походження та кормах. Розроблені тест-системи дають можливість здійснювати комплексний аналіз зразків щодо вмісту ГМО та проводити такі етапи аналізу, як скринінг за регуляторними та кодуючими послідовностями, ідентифікація видової належності рослинної складової, ідентифікація трансформаційної події та визначення вмісту ГМО у відсотках.

3.3.2. Аналіз зареєстрованих та дозволених до використання ліній біотехнологічних сільськогосподарських культур

У процесі розроблення тест-систем для визначення ГМО ми орієнтувалися виключно на біотехнологічні рослини. Станом на початок 2019 року комерціалізовано та допущено до вирощування у світі 517 ліній трансгенних рослин. До найбільш поширених біотехнологічних культур можна віднести кукурудзу (237 ліній), бавовник (62 лінії), сою (41 лінія), ріпак (41 лінія), картоплю (49 ліній), томати (11 ліній), рис (8 ліній). На різних стадіях розгляду запитів на допуск до комерціалізації знаходяться ще приблизно 90 різних видів ГМ рослин, у тому числі слива, люцерна, квасоля, земляний горіх, гірчиця, цвітна капуста, перець чилі та ін. [504]. У переважній більшості існуючих нині ГМО рослинного походження чужорідна ДНК, введена в геном організму-реципієнта, являє собою касету на основі Ті-плазмиди агробактерій, рослинних вірусів або транспозонів.

Зазвичай така генно-інженерна конструкція складається з маркерного гена, цільового (структурного) гена та регуляторних елементів, таких як промотори, термінатори, енхансери та інші (Додаток Б). Найчастіше під час створення біотехнологічних ліній рослин використовують цільові гени, що надають таких ознак як стійкість до гербіцидів, комах і збудників захворювань, підвищують харчову цінність та стійкість до факторів навколишнього середовища тощо. До маркерних генів серед інших належать гени стійкості до антибіотиків та гербіцидів. За допомогою таких маркерних генів відбувається селекція трансформантів під час створення нових ГМО. Останнім часом під час розроблення біотехнологічних культур нового покоління фірми-виробники відмовляються від використання генів стійкості до антибіотиків як маркерних, щоб зменшити негативне ставлення громадськості до використання ГМО. До недавнього часу як регуляторні елементи використовували вірусні та бактеріальні промотори та термінатори. В ГМО другого покоління використовуються регуляторні елементи від близькоспоріднених видів рослин [505].

Таким чином, детальний аналіз всіх генетичних елементів, що входять до складу затверджених ГМ-культур, є запорукою розроблення ефективних діагностикумів на основі методів ДНК-аналізу. Елементи, які найчастіше застосовують під час створення ГМО, можуть використовуватись під час розроблення скринінгових методів аналізу, оскільки вони уможливлють виявлення ширшого спектру трансгенних ліній рослин без їхньої детальної ідентифікації. І навпаки, унікальні елементи та їх комбінації можуть бути використані для визначення конкретної трансформаційної події. Реєстри авторизованих у ЄС та світі ліній ГМ сої та кукурудзи, що дозволені до використання під час виробництва харчових продуктів та кормів станом на 2018 рік, та існуючі лінії біотехнологічного ріпаку наведено у Додатках В-Д.

3.3.3. Розроблення та виробництво тест-систем серії «ГМО скринінг»

В основу розробки серії тест-систем для визначення ГМО було

покладено технологію *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ. На сьогодні технологія *TaqMan*[®] вважається золотим стандартом кількісної ДНК/РНК-діагностики завдяки своїй 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.

Під час розроблення панелі скринінгових тест-систем в якості молекулярно-генетичних маркерів було обрано як регуляторні елементи, так і кодучі послідовності введених генів «нової ознаки» (рис. 3.18). З огляду на те, що в Україні ріпак є третьою олійною культурою після соняшника та сої за площею посівів і валовим збором, більш ніж 90 % врожаю якого реалізується на зовнішніх ринках, існує постійна необхідність в його перевірці щодо вмісту ГМО. На жаль, проведення скринінгових досліджень ріпаку лише на присутність регуляторних елементів (P-35S, T-nos), які широко використовують в генній інженерії, виявилось малоефективним. Дана культура є уразливою до вірусу CaMV, який несе в собі природний промотор P-35S. Тому ми провели дослідження ріпаку також за генами «нових ознак» – 5-енолпірувілшикимат-3-фосфат синтази (*epsps*) із *Agrobacterium tumefaciens* штаму CP4, фосфінотрицин N-ацетилтрасферази із *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*), фосфінотрицин N-ацетилтрасферази із *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*). Олігонуклеотидні праймери, підібрані для проведення ПЛР, локалізувалися або в самому гені нової ознаки, або в різних елементах генно-інженерного конструкту. В табл. 3.29 наведено ДНК-мішені, обрані для розроблення тест-систем серії «ГМО скринінг». Для видової ідентифікації біотехнологічних сільськогосподарських культур було запропоновано обрати гени лектину сої (*lel*), алкогольдегідрогенази кукурудзи (*adh1*), круцеферину ріпаку (*cruA*), глутамінсинтази цукрового буряку (*gs*) та фосфоліпази Д рису (*pld*). В якості універсального ендogenous контролю було обрано ген хлоропластної ДНК рослин, що кодує протеїн D 1

фотосистеми II (*psbA*).

Таблиця 3.29

ДНК-мішені, обрані для розроблення тест-систем серії «ГМО скринінг»

Різновид мішеней	Скорочена назва
Регуляторні елементи	P-35S, T-nos
Кодуючі послідовності генів	<i>CP4-epsps</i> , <i>pat</i> , <i>bar</i> , <i>bay TE</i> , <i>bxn</i>
Гени видової ознаки рослин	<i>le1</i> , <i>adh1</i> , <i>cruA</i> , <i>gs</i> , <i>pld</i> , <i>psbA</i>

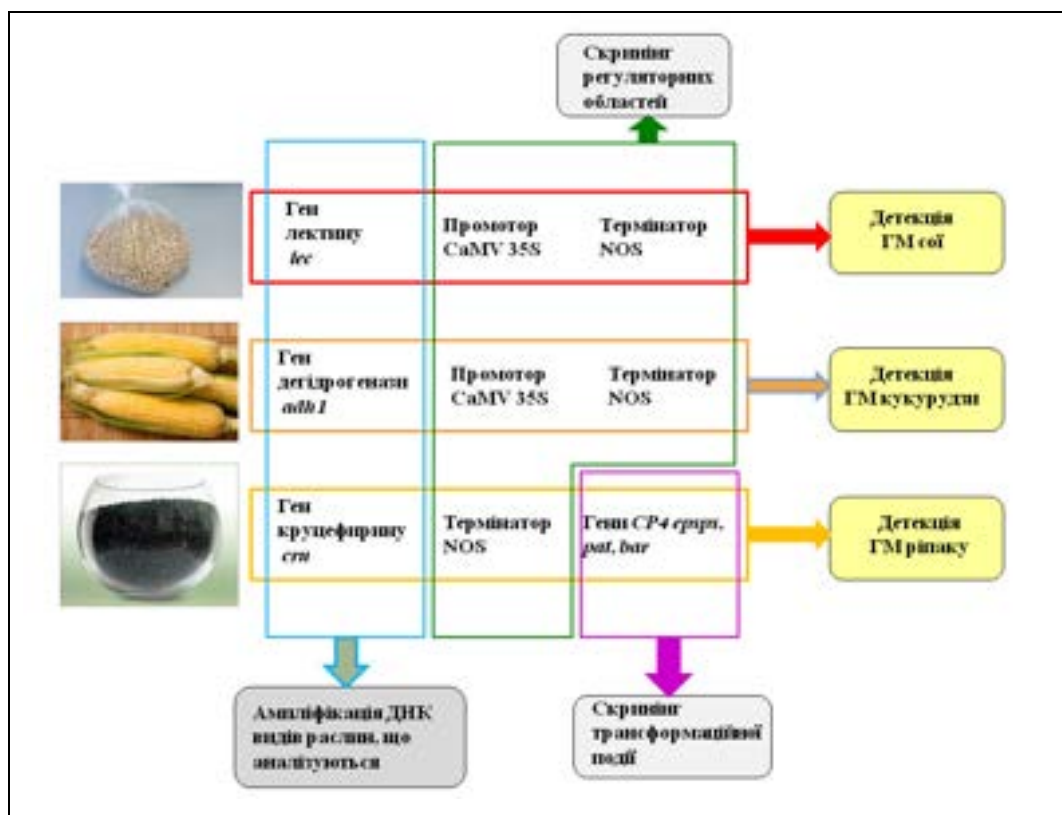


Рис. 3.18. Схема скринінгової панелі мультиплексних ПЛР-РЧ тест-систем для визначення ГМО в сої, кукурудзі та ріпаку

3.3.3.1. Визначення молекулярно-генетичних маркерів для проведення скринінгового аналізу на вміст ГМО за регуляторними та кодуючими елементами генно-інженерних конструктів

Для виявлення чужорідної ДНК у геномі рослини використовують декілька підходів та типів ДНК-мішеней, які характеризуються різним рівнем

інформативності (рис. 3.19). Виявлення в досліджуваному зразку регуляторного елементу, маркерного або цільового гена не завжди свідчить про присутність генно-інженерної конструкції. Ці послідовності ДНК взято з навколишнього середовища та їх присутність може бути результатом потрапляння в зразок природного носія даної послідовності, наприклад, вірусу чи бактерії. Пошук ДНК-мішеней, розташованих в місцях з'єднання регуляторних елементів та цільових генів значно підвищує достовірність аналізу, оскільки свідчить про присутність у зразку генно-інженерного конструкту. Існування таких комбінацій у природі є мало ймовірним. Однак такий підхід також не дає стовідсоткової гарантії інтеграції ДНК-касети в геном рослини, оскільки генно-інженерний конструкт може знаходитися у вільному стані. Найбільш достовірний результат щодо присутності ГМО у досліджуваному зразку можна отримати, якщо як мішені використовувати ділянки ДНК, що розташовані на стиках регуляторних елементів генно-інженерних конструктів та геномної ДНК рослин. Такі ділянки ДНК (місця інтеграції трансгенів) є унікальними для кожного ГМО, що додатково уможливорює ідентифікацію певної біотехнологічної лінії рослини. Цей підхід має певні недоліки, оскільки вимагає розроблення великої кількості індивідуальних тест-систем.

Упродовж останніх двох десятиріч під час розроблення різноманітних ліній біотехнологічних рослин було використано десятки цільових та маркерних генів, що значно ускладнює пошук та виявлення чужорідної ДНК у геномі ГМ рослини. Водночас більшість широко розповсюджених векторів, які використовують під час трансформації рослинних клітин, несуть в собі доволі обмежений спектр регуляторних елементів. До таких регуляторних елементів, широко представлених у більшості нині існуючих генно-інженерних конструкціях, можна віднести промотори та термінатори.

У процесі розроблення панелі тест-систем серії «скринінг» ми запинилися на регуляторних елементах (промотор і термінатор), а також деяких цільових генах. Джерело введеного генетичного матеріалу є

важливим фактором під час проведення досліджень з оцінювання безпеки новостворених біотехнологічних культур. Найбільш популярними регуляторними елементами, які використовують під час створення ГМО рослинного походження, є послідовності з рослинних патогенів, зокрема з *Agrobacterium tumefaciens* та вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV). З 66 досліджених трансгенних культур 62 містили щонайменше одну генетичну послідовність, яку було отримано з одного з цих двох організмів [495].



Рис. 3.19. Схема підходів та типів ДНК-мішеней, що використовуються під час виявлення генно-інженерних конструкцій трансгенних культур

3.3.3.2. Підбір праймерів з зондами до послідовності промотору 35S з вірусу CaMV

Промотор є одним із важливих елементів генно-інженерної конструкції, який регулює та забезпечує бажаний рівень експресії трансгена. До недавнього часу до найчастіше використовуваних у генній інженерії промоторів належав «сильний» конститутивний промотор 35s (P-35S). На

початку 80-х років цей промотор було виділено з вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), що належить до групи каулімовірусів. Його назва походить від значення коефіцієнту седиментації вірусного транскрипту, експресію якого він регулює. Промотор 35S відповідає за транскрипцію всього вірусного геному та має розмір 350 п.н. [506].

Промотор 35S має в 110 разів більшу ефективність, ніж його попередник, промотор нопалінсинтази з Т-ДНК агробактерій [507]. Однак останнім часом для вирішення деяких завдань під час розроблення трансгенних рослин нового покоління та забезпечення достатнього рівня експресії білкового продукту, експресійної ефективності Р-35S також виявилось недостатньо [508]. Крім того, він є малоефективним для однодольних рослин, особливо злакових культур. Нині гарною альтернативою Р-35S виявився промотор Р-FMV з вірусу мозаїки нарічника (ранника), який широко використовують у генній інженерії сільськогосподарських рослин. Р-FMV містить два енхансери, ефективність його роботи підтверджено в експериментах з трансформації тютюну, картоплі, сої, петунії, бавовнику, ріпаку, люцерни та інших рослин [509].

Як видно з таблиці 3.30 велика кількість затверджених біотехнологічних культур містять у своєму геномі копію конститутивного промотора 35S або похідну від цього промотора. Тому промотор Р-35S широко використовують як мішень під час проведення скринінгових аналізів з визначення ГМО. Порівняння послідовностей Р-35S, взятих з різних літературних джерел (бази даних, статті, патенти), засвідчує їхню різноманітність та існування різноманітних мутантних форм, використаних під час створення ГМ культур. Це дещо ускладнює підбір універсальних праймерів для визначення якомога більшої кількості існуючих ліній ГМ рослин. Крім того, в одному й тому самому генно-інженерному конструкті можуть бути присутніми більш ніж одна копія того самого промотора або декілька різних промоторів.

На основі даних літературних джерел та аналізу генно-інженерних

конструкцій, які було використано під час створення ГМ-культур рослинного походження, як першу мішень нами було обрано послідовність промотору 35S з вірусу CaMV (рис. 3.20). Для розроблення універсальних праймерів та зондів було проведено аналіз всіх нуклеотидних послідовностей P-35S, представлених у загальнодоступній інтернет-базі даних *GenBank*[®] серверу NCBI [324]. Аналіз варіабельності нуклеотидних послідовностей і пошук консервативних ділянок, необхідних для підбору специфічних олігонуклеотидних праймерів та зондів проводили за допомогою програмного забезпечення *Vector NTI Advance*[™] 9.1.0 (Invitrogen, США). Підбір праймерів та зондів для проведення ПЛР у реальному часі здійснювали за допомогою комп'ютерної програми *Primer Express*[®] 3.0 (Applied Biosystems, США). Специфічність обраних олігонуклеотидів вивчали за допомогою алгоритму *Blast* сервера NCBI [324,510].

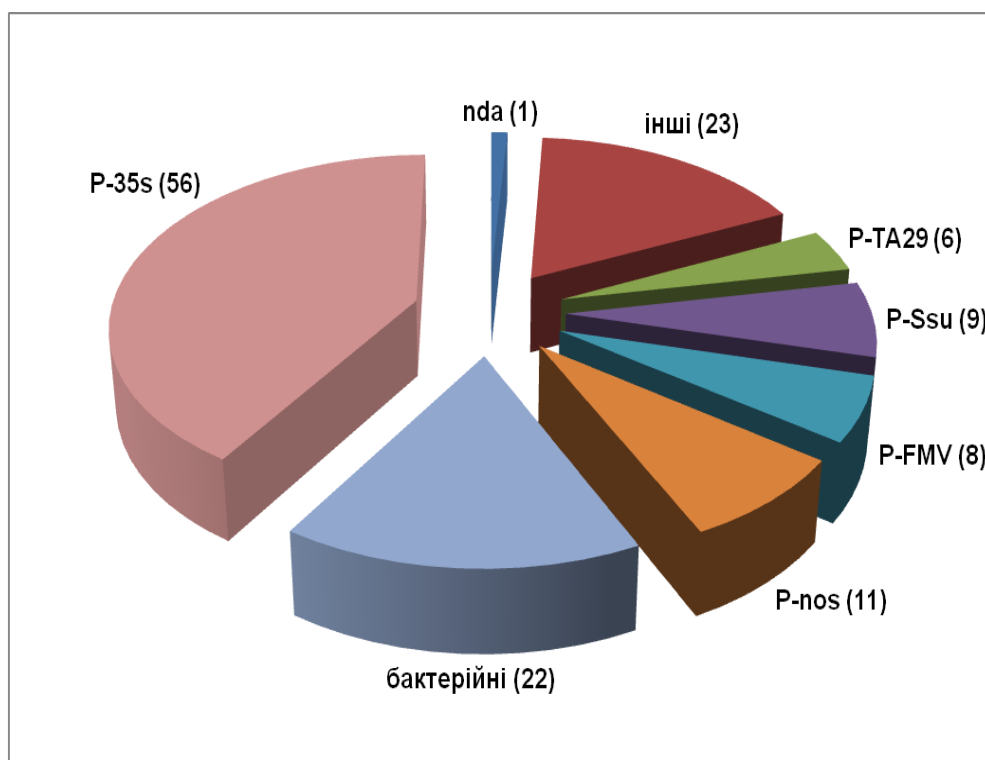


Рис. 3.20. Найчастіше використовувані промотори в затверджених біотехнологічних культурах. У групу P-35S входять: P-35S, P-E35S і dP-35S [495].

Таблиця 3.30

Походження та частота зустрічання промоторів у ГМ-культурах [495]

Промотори	Організм-донор	Частота зустрічання
Інші промотори		2
Бактеріальні		22
dP-35S	Cauliflower Mosaic Virus (вірус CaMV)	1
E-OCS	Agrobacterium tumefaciens (бактерія)	1
Nda		1
P-35S	Cauliflower Mosaic Virus	43
P-4AS1	Cauliflower Mosaic Virus	1
P-5126del	Zea mays (кукурудза)	1
P-ALS	Nicotiana tabacum (табак)	1
P-Als	Arabidopsis thaliana (резуховідка Талія)	1
P-CDPK	Zea mays	1
P-E35S	Cauliflower Mosaic Virus	12
P-E8	Lycopersicon esculentum (томати)	1
P-FMV	Figworth Mosaic Virus (вірус FMV)	8
P-HelSsu	Helianthus annuus (соняшник)	1
P-Kti3	Glycine max (соє)	1
P-mac	A. tumefaciens і CaMV	1
P-mas	Agrobacterium tumefaciens	1
P-napin	Brassica rapa (ріпа)	1
P-nos, 2xP-nos	Agrobacterium tumefaciens	11
P-NtQPT1	Nicotiana tabacum	1
P-OCS,35S	A. tumefaciens і CaMV	1
P-PCA55	Zea mays	1
P-PEPC	Zea mays	1
P-Ptac	Bacterial (бактерія)	1
P-ract	Oryza sativa (рис)	2
P-Ssu	Arabidopsis thaliana	9
P-TA29	Nicotiana tabacum	6
P-ubiZM1(2)	Zea mays	1
P-β-Conglycinin	Glycine max	1

Для успішного підбору універсальних праймерів та зонду, які б дали змогу ефективно ампліфікувати ДНК-послідовність промотора P-35S, необхідно було обрати консервативну ділянку цього регуляторного елемента. З цією метою провели вирівнювання максимально можливої кількості відомих послідовностей P-35S. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей

означає порівняння послідовностей між собою, пошук варіабельних ділянок, унікальних для конкретного генетично елемента і консервативних фрагментів з мінімальною кількістю мутацій. Для створення подібних вирівнювань можна користуватися різними комерційними комп'ютерними програмами (AlignX, Vector NTI; SeqMan, DNASTAR), або програмним забезпеченням, доступним в он-лайн режимі [324,325,510]. На даному етапі роботи обрали консервативну ділянку промотора Р-35S, яка підходила для того, щоб розташувати на ній універсальні праймери та зонд. З цією метою було проаналізовано 502 нуклеотидні послідовності з вірусу CaMV та 131 – з генно-інженерних конструкцій, які представлено у *GenBank*[®] (рис. 3.21).

	(7143)	7143	7150	7160	7170	7180	7190	7200	7210	7220	7230
MCACGDH (7069)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATTC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	CATCAT	GAGACASTAGAAAA			
MCACOMGEN (7091)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	CATC	GAAAGGACASTAGAGAA			
MCAMADCRI (7088)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	CATC	GAAAGGACASTAGAGAA			
NC_001497 (7091)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
MCAMATCAP (7088)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	CATG	GAAAGGACASTAGAGAA			
GQ497217 (609)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
p35s-2_LQ598241 (511)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
EF451822 (2728)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
GQ497217#2 (609)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
KJ608134 (991)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	CATC	GAAAGGACASTAGAGAA			
KJ608141 (486)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
KJ608147 (68)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
XXP35SGFP (511)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
KF357599 (7066)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	CATC	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
p35s (473)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
p35s#2 (473)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			
Consensus (7143)	TTGAGACTTT	CAACAAAGG	TAATATC	GGGAAACCTCCTCGGATTCCATT	GCCCAG	STATCTGTCACTT	TAT	TGTGAAGATAGTGGAAAA			

Рис. 3.21. Фрагмент вирівнювання нуклеотидних послідовностей промотора Р-35S, отриманих із різних ізолятів вірусу CaMV та генно-інженерних конструкцій, які було використано під час створення біотехнологічних рослин (жовтим кольором позначено консервативні ділянки ДНК).

На наступному етапі роботи за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення необхідно підбирали послідовності олігонуклеотидних праймірів для проведення ПЛР-реакції. Підбираючи універсальні праймери та зонди дотримувалися таких основних критеріїв: бажаний розмір праймерів та зондів має перебувати у межах 18–40 нуклеотидів; можливі мутації алельних варіантів гена-мішені не повинні локалізуватися в межах послідовностей обраних праймерів, оскільки такі нуклеотидні заміни можуть зашкодити перебігу ПЛР; конструюючи праймери не використовувати послідовності, здатні до утворення вторинних

структур у вигляді так званих "шпильок" або дуплексів; уникати наявності комплементарних послідовностей як в структурі самих праймерів, так і між ними; обирати праймери з мінімальною кількістю G/C-повторів на 3'-кінці та використовувати праймери з мінімальною різницею температур плавлення.

На обраній консервативній ділянці промотора P-35S за допомогою комп'ютерної програми *Primer Express*[®] підібрали пару олігонуклеотидних праймерів та зонд до них P35S1 (рис. 3.22). Підібрані олігонуклеотиди, виходячи з теоретичних обрахунків, повинні були мати 100 % специфічність. З літературних джерел підібрали додатково ще дві пари праймерів та зонди для них [511,512]. Одну з них (P35S3) було рекомендовано Інститутом здоров'я та захисту споживачів Центру об'єднаних досліджень Європейського союзу (ІНСР, JRC). В таблиці 3.31 наведено характеристику обраних праймерів та зондів. Всі зонди було мічено флуоресційним барвником FAM та гасниками флуоресценції BHQ1.

Таблиця 3.31

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та зондів для ампліфікації і детекції ДНК послідовності промотора 35S вірусу CaMV

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
P35S1-F	gacagtgggtcccaaatgatgga	21	52	65	69
P35S1-R	cgtggttggaacgtctctttt	22	45	65	
P35S1-P	ccccaccacgaggagcatcg	21	71	72	
P35S2-F*	gcctctgccgacagtgggt	18	67	67	82
P35S2-R	aagacgtggttggaacgtcttc	22	50	66	
P35S2-P	caaagatggacccccaccacg	22	64	71	
P35S3-F**	gtcttgcaaggatagtggga	21	52	64	69
P35S3-R	cacgtcttcaaagcaagtgga	21	48	64	
P35S3-P	tgcgtcatcccttacgtcagtggagat	27	52	72	

*[511], **[512].

Теоретичну специфічність всіх трьох пар праймерів і зондів було перевірено за допомогою комп'ютерного додатку Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI) шляхом порівняння з нуклеотидними послідовностями представленими у базі даних GenBank [325]. Отримані дані

показали 100 % ідентичність лише до очікуваних цільових послідовностей.

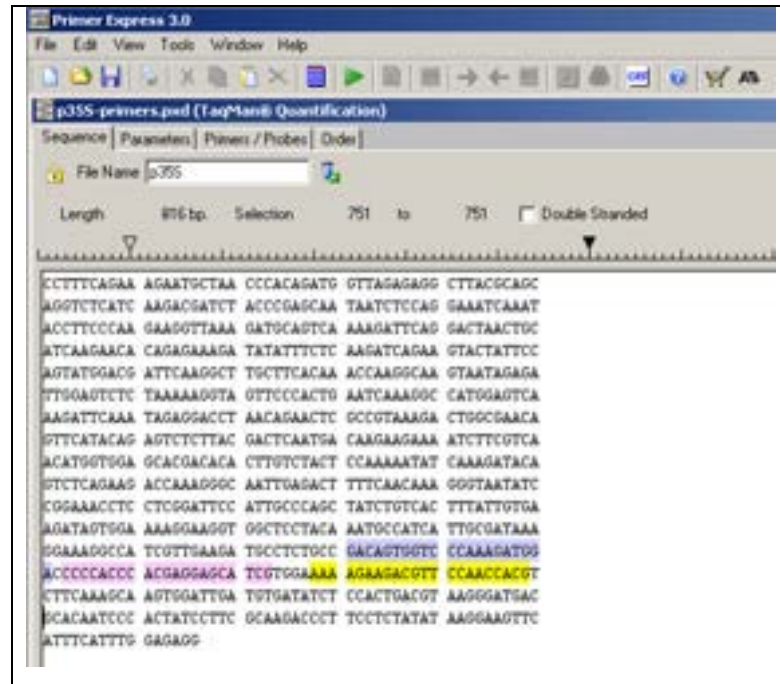


Рис. 3.22. Олігонуклеотидні праймери та зонд, підібрані для ампліфікації ділянки послідовності промотора P-35S CaMV.

3.3.3.3. Підбір праймерів з зондами до термінатора T-nos з *Agrobacterium tumefaciens*

Ще одним важливим компонентом генно-інженерних конструкцій є термінатор. До найбільш популярних термінаторів можна віднести термінаторний сигнал (T-nos) гена нопалінсинтази, виділений із *Agrobacterium tumefaciens*. Даний термінатор широко представлений у затверджених лініях біотехнологічних рослин (рис. 3.23). З таблиці 3.32 видно, що він зустрічається в 37 лініях. Також у таблиці наведено інші термінатори, які використовують під час створення ГМ культур, їх походження та частота трапляння в затверджених культурах.

Для успішного підбору універсальних праймерів та зондів, які б дали змогу ефективно ампліфікувати послідовність термінатора T-nos, було проведено аналіз нуклеотидних послідовностей T-nos, представлених в інтернет-базі даних GenBank®. Всього було виявлено 127 нуклеотидних послідовностей термінаторного сигналу T-nos. У більшості випадків це були вектори для молекулярного клонування та генно-інженерні конструкти, що

містили в своєму складі T-nos. За допомогою комп'ютерної програми *Vector NTI AdvanceTM 9.1.0* було здійснено вирівнювання всіх виявлених послідовностей (рис. 3.24). Комп'ютерний аналіз не виявив розбіжностей у досліджуваних ділянках ДНК, тому для підбору праймерів та зондів було використано цілу послідовність термінаторного сигналу розміром 256 п.н.

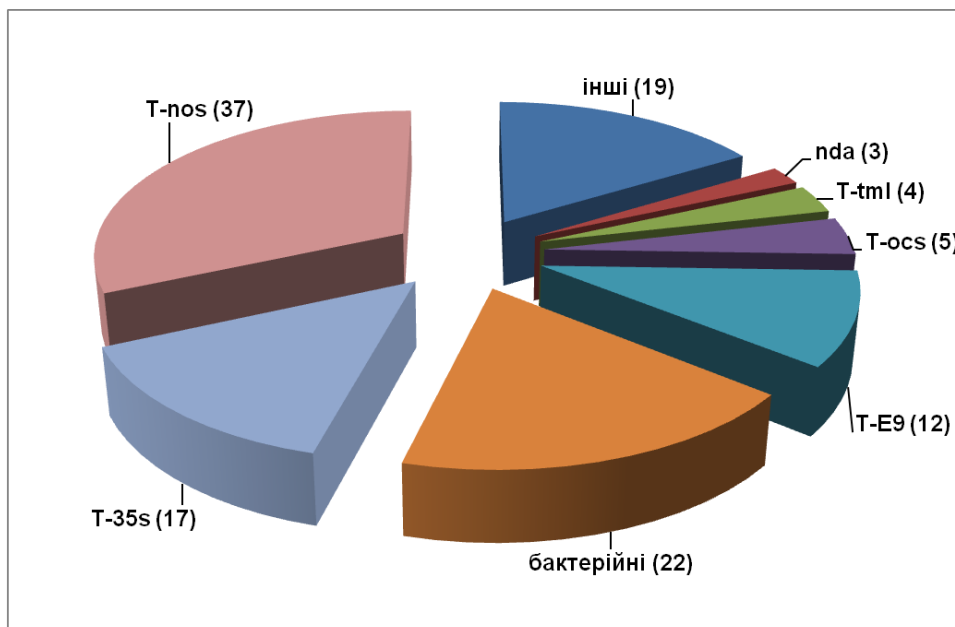


Рис. 3.23. Найчастіше використовувані термінатори в затверджених лініях генетично модифікованих сільськогосподарських рослин.

	(6686)	6686	6700	6710	6720	6730	6740	6750	6760
HV245498(6355)	GAATTTCC	---	CCGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
KP724690(5898)	GAATTTCC	---	CCGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
JX155386(6611)	CGCTACGC	---	GTGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
CS543090(2101)	GAATTTCC	---	CCGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
KF719012(3361)	GAGTCAAG	---	CAGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
DD460127(2613)	GAATTTCC	---	CCGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
AB209952(1913)	AA--TT--C	---	CCGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
AY346130 (737)	TAGGATCCGAAGC	---	CAGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
tNOS (1)	-----	---	-----	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					
Consensus(6686)	GA	TTTCC	CCGATCGTTCA	AACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT					

Рис. 3.24. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей термінатора T-nos із *Agrobacterium tumefaciens* (жовтим кольором позначено консервативні ділянки ДНК)

Підбір праймерів та зондів (Tnos1) для проведення ПЛР у реальному часі здійснювали за допомогою програми *Primer Express[®] 3.0* (рис. 3.25). Із літературних джерел було взято ще дві пари праймерів та зонди до них (Tnos2, Tnos3) [513,514]. Теоретичну специфічність обраних праймерів та зондів перевіряли в алгоритмі *BLAST*, NCBI. Підібрані олігонуклеотиди характеризувалися 100 % специфічністю. У таблиці 3.33 наведено

характеристику обраних праймерів та зондів. Всі зонди було мічено флуоресційним барвником ROX та гасниками флуоресценції BHQ2.

Таблиця 3.32

Перілік термінаторів, їх походження та частота використання в затверджених біотехнологічних культурах [495]

Промотори	Організм-донор	Частота трапляння
Бактеріальні		22
nda		3
T-35s	Cauliflower Mosaic Virus	17
T-7S	Glycine max (соя)	2
T-ALS	Nicotiana tabacum (тютюн)	1
T-Als	Arabidopsis thaliana (резуховідка Талія)	1
T-E9	Pea (горох)	12
T-g7	Agrobacterium tumefaciens	3
T-Kti3	Glycine max	1
T-mas	Agrobacterium tumefaciens	2
T-napin	Brassica rapa (піпа)	1
T-nos	Agrobacterium tumefaciens	37
T-ocs	Agrobacterium tumefaciens	5
T-ORF25	Agrobacterium tumefaciens	1
T-phaseolin	Phaseolus vulgaris (квасоля звичайна)	1
T-pinII	Solanum tuberosum (картопля)	2
T-SSU	Glycine max	1
T-tahsp17	Triticum aestivum (пшениця)	1
T-tml	Agrobacterium tumefaciens	4
T-Tr7	Agrobacterium tumefaciens	2

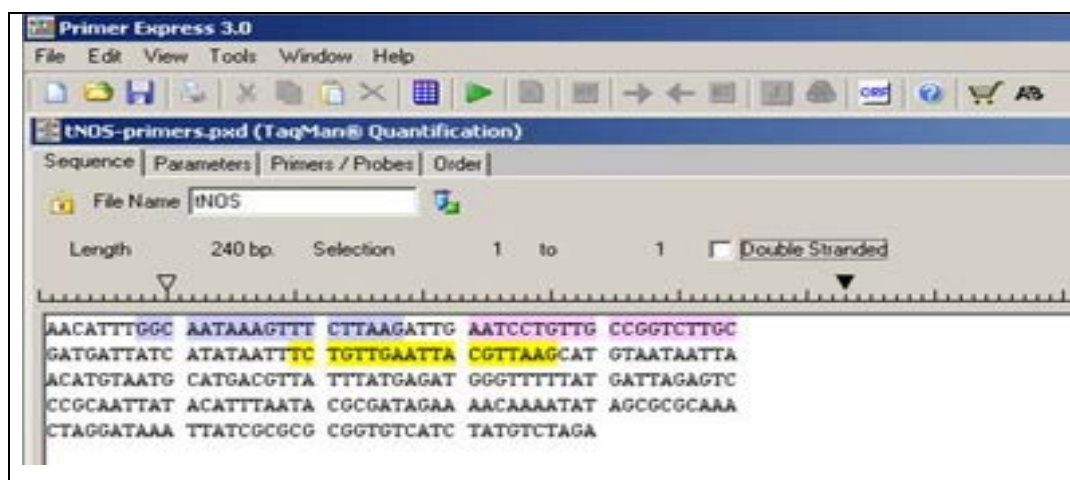


Рис. 3.25. Олігонуклеотидні праймери та зонд, підібрані для ампліфікації ділянки послідовності термінатора T-nos із *Agrobacterium tumefaciens*.

Таблиця 3.33

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та зондів для ампліфікації і детекції ДНК послідовності термінатора T-nos із *Agrobacterium tumefaciens*

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
Tnos1-F	ggcaataaagtttcttaag	19	32	52	80
Tnos1-R	cttaacgtaattcaacaga	19	32	53	
Tnos1-P	aatcctgttgccggtcttgc	20	55	66	
Tnos2-F*	tgacgttatttatgagatgggtttt	26	31	62	82
Tnos2-R	cgctatatattgtttctatcgctat	27	33	63	
Tnos2-P	tgattagagtcccgcaattatacattt	27	33	64	
Tnos3-F**	gtcttgcatgattatcatataatttctg	29	31	63	151
Tnos3-R	cgctatatattgtttctatcgct	25	36	61	
Tnos3-P	agatgggttttatgattagagtcccgcaa	30	40	68	

*[513], **[514].

3.3.3.4. Підбір праймерів з зондами до послідовностей генів «нової ознаки» – *CP4-epsps*, *pat*, *bar*

Під час розроблення біотехнологічних ліній рослин було використано більш ніж 40 різних генів (табл. 3.34). До найбільш популярних генів можна віднести *nptII*, що походить з п'ятого транспозону *E. coli*. Цей ген забезпечує стійкість до селективних аміноглікозидних антибіотиків. У деяких випадках *nptII* знаходиться під контролем бактерійних регуляторних елементів, що не дає змоги йому експресуватися у рослині. Якщо *nptII* буде знаходитися під контролем еукаріотичного промотора, його продукт почне експресуватися у рослині. Дослідження, проведені у 1996 році, виявили присутність послідовностей гена *nptII* серед 61 % проаналізованих ГМ культур. У 2003 році ця цифра зменшилася на 17 % [495]. Є сподівання, що під час створення біотехнологічних культур нового покоління дослідники відмовляться від використання генів стійкості до антибіотиків як селективних маркерів генно-інженерних конструкцій.

Таблиця 3.34

Перелік генів «нової ознаки» в затверджених лініях біотехнологічних культур з зазначенням організмів-донорів та частота їхнього зустрічання (множинні інсерції гена у геном рослини вважали як поодинокі події) [495]

Промотори	Організм-донор	Частота зустрічання
aad	<i>E. coli</i>	7
accd	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1
AccS	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1
ALS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1
bar	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	15
barnase	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	8
barstar	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	6
Bay TE	<i>Umbellularia californica</i>	1
bla	<i>E. coli</i>	6+ 7 часткових
Chimeric S4-HrA	<i>Nicotiana tabacum</i>	1
CMV cp	Cucumber Mosaic Virus strain C	1
CMV/PRV cp	Papaya Ringspot Virus, Cucumber Mosaic Virus	1
CMV/WMV2 cp	Watermelon Mosaic Virus 2 strain FL & Cucumber Mosaic Virus	2
CMV/ZYMV cp	Zucchini Yellow Mosaic Virus strain FL & Cucumber Mosaic Virus	2
CP4EPSPS	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> sp. strain CP4	12
cry1Ab	<i>B. thuringiensis</i> subsp. Kurstaki	6
cry1Ac	<i>B. thuringiensis</i> subsp. Kurstaki HD-73	5
cry1F	<i>B. thuringiensis</i> var. Aizawai	1
cry2Ab	<i>B. thuringiensis</i> subsp. Kurstaki	1
cry3A	<i>B. thuringiensis</i> subsp. Tenebrionis	6
cry3Bb1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. Kumamotoensis	1
cry9C	<i>B. thuringiensis</i> subsp. Tolworthi	1
dam	<i>E. coli</i>	1
dapA	<i>Corynebacterium</i>	1
gentR	<i>E. coli</i>	1
GmFAD2-1	<i>Glycine max</i>	1
gox	<i>Achromobacter</i> sp., strain LBAA	7
GUS	<i>E. coli</i>	5
mEPSPS	<i>Zea mays</i>	1
nitrilase	<i>Klebsiella ozaenae</i>	5
nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1
nptII	<i>E. coli</i>	29+1 часткова
NtQPT1	<i>Nicotiana tabacum</i>	1
pat	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	11
PG	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2
pinII	<i>Solanum tuberosum</i>	1
PLRVrep	Potato Leaf Roll Virus (PLRV)	2
PVYcp	Potato Virus Y (PVY) strain O	1
sam-k	<i>E. coli</i> bacteriophage T3	1
tetR	<i>E. coli</i>	1

Різновиди гена δ ендотоксину *Bacillus thuringiensis* посідають друге місце за частотою використання після *nptII*. На 2003 рік послідовності генів *cry* були присутніми у 20 біотехнологічних лініях. З найбільшою частотою застосовували два різновиди – *cry1Ab* та *cry3A*, у співвідношенні 6 з 20. Слід зазначити, що вирівнювання послідовностей генів *cry1Ab*, введених в Bt11, 176, Mon809 та Mon810, засвідчило їхню неідентичність. Послідовності генів *CP4-epsps* і *bar* було виявлено в 12 та 15 трансгенних культурах відповідно (рис. 3.26).

Зазвичай скринінговий аналіз щодо присутності ГМО в харчових продуктах та сільськогосподарській сировині проводять за найбільш поширеними регуляторними елементами генно-інженерних конструкцій, такими як промотор 35S вірусу CaMV та термінатор *nos* з *Agrobacterium tumefaciens*. Однак у випадку ГМ ріпаку така стратегія не спрацьовує. Вірус CaMV, з геному якого було запозичено P35S, уражає передусім представників родини капустяних (*Brassicaceae*), до якої належить і ріпак. Тому присутність послідовностей P35S у досліджуваних зразках ріпаку може бути результатом як присутності генно-інженерних конструкцій, так і генетичного матеріалу природного вірусу.

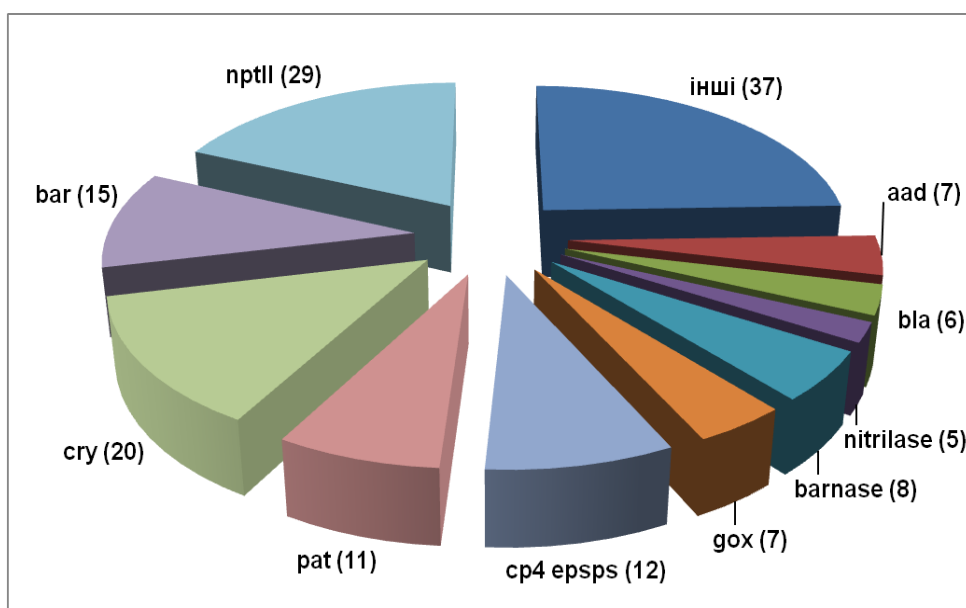


Рис. 3.26. Найчастіше використовувані гени у розробленні затверджених ліній біотехнологічних сільськогосподарських культур. Родина генів *cry* згрупована і включає в себе *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry3A*, *cry9C*, *cry1F*, *cry3Bb1*, *cry2Ab*.

Проведення аналізу лише за послідовністю T-nos є малоефективним. Нині зареєстровано приблизно 30 ліній біотехнологічного ріпаку (Додаток Д). Приблизно третина з них не містить у своєму складі послідовності T-nos, а деякі лінії отримано шляхом мутагенезу. Все це суттєво обмежує застосування скринінгового аналізу лише за регуляторними елементами. Відтак, постало питання розроблення іншої стратегії щодо визначення існуючих ліній трансгенного ріпаку.

Одним із підходів, які широко використовують під час визначення ГМО, є аналіз за структурними генами. При цьому додатковим способом направити специфічність реакції в потрібному напрямку є підбір праймерів, специфічних до ДНК послідовності, локалізованої в різних генетичних елементах, наприклад, промоторі – структурному гені або структурному гені – термінаторі. Такий тип аналізу дає змогу виявляти значно меншу кількість відомих ГМО порівняно з визначенням за регуляторними елементами, але є більш специфічним. У міжнародних електронних базах даних надано детальну інформацію стосовно зареєстрованих ліній біотехнологічних культур, зокрема ГМ ріпаку [515]. Проведений нами порівняльний аналіз генно-інженерних конструкцій, які використовують для створення трансгенних ліній ріпаку, уможливив виявлення низки унікальних послідовностей, що надаються до використання як мішені для проведення ПЛР-аналізу (рис. 3.27).

Всього було відібрано п'ять таких послідовностей. Перша послідовність лежить у межах гена 5-енолпірувілшикимат-3-фосфат синтази (*CP4-epsps*) із *Agrobacterium tumefaciens* штам CP4 та хлоропластного транзитного пептиду (СТР2) з *Arabidopsis thaliana* і дає змогу виявляти три лінії ГМ ріпаку – GT73, GT200 (Roundup Ready™), MON88302 (Roundup Ready 2™), а також гібридні комбінації, отримані за їхньої участі. Друга послідовність локалізована у межах P35S та гена фосфінотрицин N-ацетилтрансферази із *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*) і дає змогу ідентифікувати ще три лінії ГМ ріпаку, зокрема HCN10, HCN92 (Liberty

Link™) та T45 (InVigor™). Наступна послідовність лежить у межах гена фосфінотрицин N-ацетилтрасферази із *Streptomyces hygrosopicus* (*bar*) і дає змогу визначати ще 16 ліній біотехнологічного ріпаку. Останні дві послідовності належать генам тіоестерази (*bay TE*) з *Umbellularia californica* і нітрилази (*bxn*) з *Klebsiella pneumoniae* і уможливають визначення ліній 23-18-17, 23-198 (Laurical™) і OXY-235 (Navigator™) відповідно (табл. 3.35) [495].

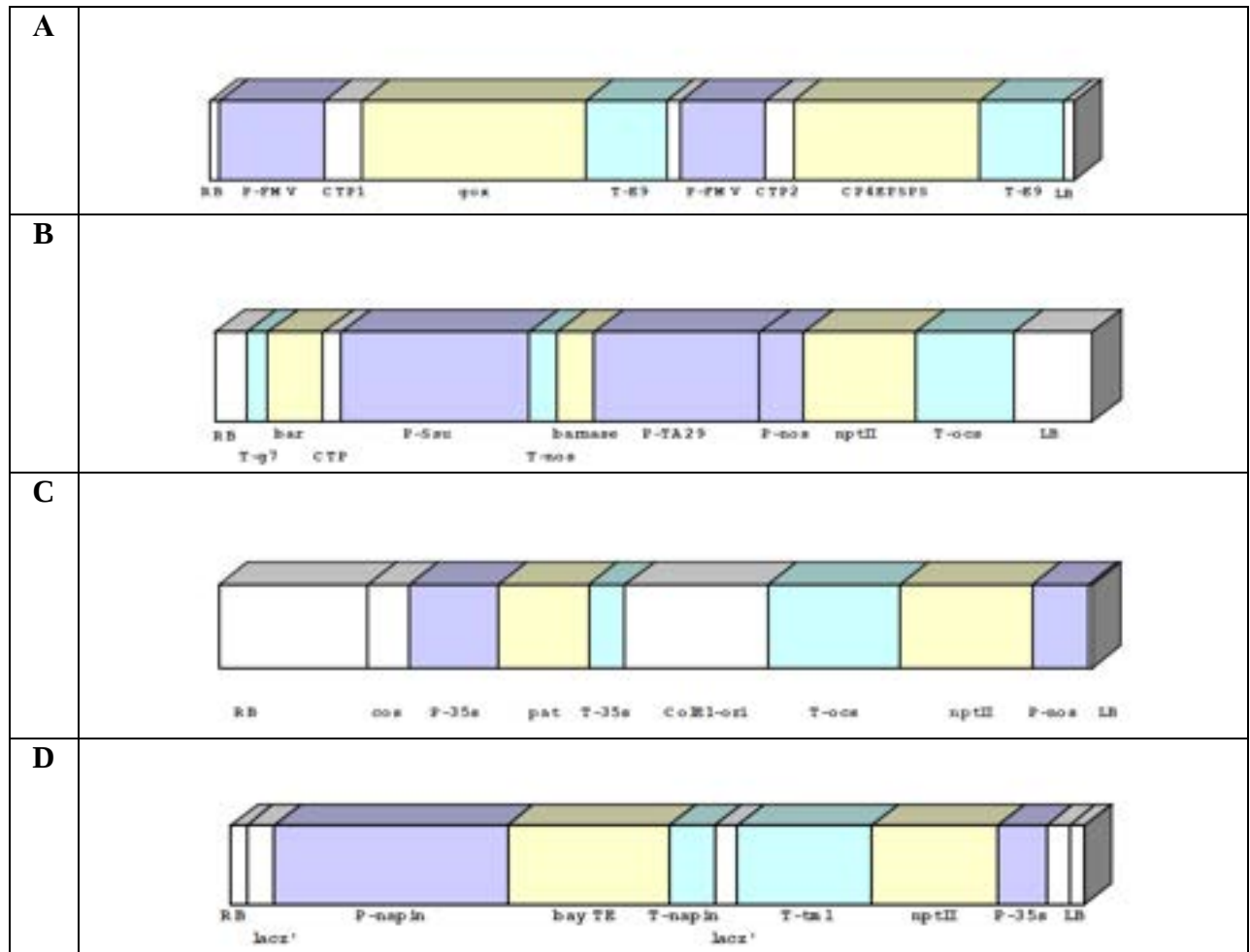


Рис. 3.27. Приклади лінійних схем деяких генно-інженерних конструкцій з генами *epsps*, *pat*, *bar*, *bay TE*, що були використані під час створення трансгенних ліній ріпаку. А – Т-ДНК-ділянка конструктору з геном *CP4 epsps* для ліній GT200, GT73; В – Т-ДНК-ділянка конструктору з геном *bar* для ліній MS1, RF1, RF2, MS8, RF3; С – ділянка конструктору з геном *pat* для ліній HCN10, HCN92; D – конструктор з геном *bay TE* для лінії 23-198 / 23-18-17 [507].

Праймери та зонди для проведення ПЛР у реальному часі підбирали за допомогою комп'ютерної програми Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Деякі послідовності було запозичено з літературних джерел (табл. 3.35). Для

Таблиця 3.35

Характеристика праймерів та зондів для ампліфікації і детекції ДНК-послідовностей генів *CP4 epsps*, *pat*, *bar*, *bay TE* і *bxn*

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
Epsps1-F*	gcaaatcctctggccttcc	20	55	64	146
Epsps1-R	cttgcccgtattgatgacgtc	21	52	64	
Epsps1-P	FAM-ttcattgttcggcggctctcg-BHQ1	21	62	70	
Epsps2-F**	gggatgacgttaattggctctg	22	50	64	88
Epsps2-R	ggctgcttgaccgtgaag	19	63	67	
Epsps2-P	FAM-cacgccgtggaacagaagacatgacc-BHQ1	27	56	72	
Pat1-F***	ggaagttcatttcattggagagg	24	42	63	85
Pat1-R	ggccatatcagctgctgtagc	21	57	65	
Pat1-P	ROX-gcctaattcactggctcctctccgga-BHQ2	29	55	73	
Pat2-F***	tagctggcctaattcactggctc	24	50	66	87
Pat2-R	atttcattggagaggacagggtagc	25	44	65	
Pat2-P	ROX-cctctccggagacatgtcgactctagaggat-BHQ2	31	55	73	
Bar1-F	actgggctccacgctctaca	20	60	56	75
Bar1-R	atgacagcgaccacgctctt	20	55	54	
Bar1-P	ROX-cacctgtgaagtccctggaggcac-BHQ2	25	60	63	
Bar2-F**	acaagcacgggtcaactcc	19	53	63	60
Bar2-R	gaggtcgtccgtccactc	18	67	65	
Bar2-P	Cy5-taccgagccgcaggaacc-BHQ2	18	67	67	
Bay1-F	tgcctgactggagcatgct	19	58	66	76
Bay1-R	tctagattgggtccactgcttctca	24	46	66	
Bay1-P	ROX-tgcagtgatcacacatcttttcggc-BHQ2	27	48	70	
Bay2-F	cacctttgccatcagatcttatgag	25	44	64	87
Bay2-R	agtgtagcctcctgcatgtgatt	23	48	66	
Bay2-P	ROX-acctgaccgtccacatctatactggctg-BHQ2	29	55	73	
Bxn1-F	gcagcaaagtactcgctcgat	21	52	65	64
Bxn1-R	tcgacacgctgaacacatcag	21	52	66	
Bxn1-P	FAM-ccacgggccactattcgcg-BHQ1	20	70	71	
Bxn2-F	atttcccgaattgtggattcc	21	43	62	72
Bxn2-R	aatggtaggggttcgggttgg	21	48	64	
Bxn2-P	FAM-accaggaattcatgctcacgcaca-BHQ1	24	54	71	

*[516], **[517], ***[518].

визначення гена *CP4-epsps* було обрано дві пари праймерів. Пара праймерів Epsps1 [516] локалізована винятково в ділянці самого гена, що входить до складу конструкту, тимчасом праймери Epsps2 [517] – у межах елементів CP4EPSPS – CTR2 (рис. 3.27). Пари праймерів Pat1 та Pat2 [518] для визначення гена *pat* було сконструйовано у такий спосіб, щоб один із праймерів знаходився в межах промотора P35S, а інший – в ділянці самого гена. З літературних джерел було взято також пару Bar2 [517], що

локалізована в ділянці гена *bar*. Решту праймерів було обрано самостійно в межах відповідних послідовностей генів. Теоретичну специфічність оцінювали за допомогою *BLAST*, NCBI. У таблиці 3.26 наведено характеристику всіх обраних праймерів та зондів. Треба зазначити, що всі праймери – і підібрані власноруч, і взяті з літератури, попередньо аналізували на можливість використання у форматі мультиплексу. Для цього використовували інтернет-ресурс SMS [519]. Зонди, специфічні до послідовностей *CP4 epsps*, *pat* і *bay TE*, було мічено флюоресційним барвником ROX, зонди до гена *bxn* – барвником FAM, до гена *bar* – барвником Cy5.

3.3.3.5. Підбір праймерів з зондами до генів видової ознаки деяких біотехнологічних культур

Для перевірки якості виділеної ДНК та забезпечення контролю перебігу ПЛР необхідно було ввести в мультиплексну систему внутрішній позитивний контроль (ВПК). Сьогодні в тест-системах, що базуються на різновидах методу ПЛР, використовують два загальновідомі підходи. Перший базується на введенні у реакційну суміш будь-якої природної або синтезованої ДНК та праймерів до неї. Послідовність введеної ДНК підбирається таким чином, щоб праймери на інші мішені не могли з нею гібридизуватися. Даний тип ВПК уможливорює контроль якості розчину ДНК, що вноситься в реакційну суміш. Відсутність позитивного сигналу за даною мішенню свідчатиме про некоректне проведення процедури екстракції ДНК та наявність інгібіторів реакції у привнесеному матеріалі. Головним недоліком цього типу ВПК є те, що за його допомогою неможливо оцінити наявність/відсутність самої ДНК у розчині, що вноситься у реакційну суміш. У разі використання цього типу ВПК бажано проводити попередній спектрофотометричний аналіз зразків екстрагованої ДНК.

У другому підході використовують додаткову мішень на ген,

притаманний організму, що аналізується. Наприклад, у дослідженнях зразків кукурудзи на вміст ГМО як мішені можуть виступати видоспецифічні гени кукурудзи зеїн (*ze1*) або алкогольдегідрогеназа (*adh1*). Такий підхід дає змогу контролювати як етап екстракції ДНК, так і перебіг самої ПЛР. Як і у випадку з попереднім ВПК, тут також є свої обмеження. Полягають вони у відсутності певної універсальності. Так, тест-систему на визначення ГМ кукурудзи буде не досить коректно застосовувати за аналізу ГМ сої, оскільки ВПК буде спрацьовувати тільки на ДНК кукурудзи. Однак цю проблему можна частково вирішити розробленням більш універсального контролю, який би спрацьовував на ДНК близькоспоріднених організмів.

У нашій роботі було використано такий підхід до ВПК, коли під кожну окрему ГМ культуру добирали видоспецифічні праймери і зонди, які слугували ендogenousним контролем проходження ПЛР. Всього таких культур було п'ять, зокрема соя, кукурудза, ріпак, рис та цукровий буряк. Як видоспецифічні мішені було обрано послідовності генів лектину сої (*le1*), зеїну (*ze1*) та алкогольдегідрогенази кукурудзи (*adh1*), круцеферину А ріпаку (*cruA*), глутамінсинтази цукрового буряку (*gs*) та фосфоліпази Д рису (*pld*).

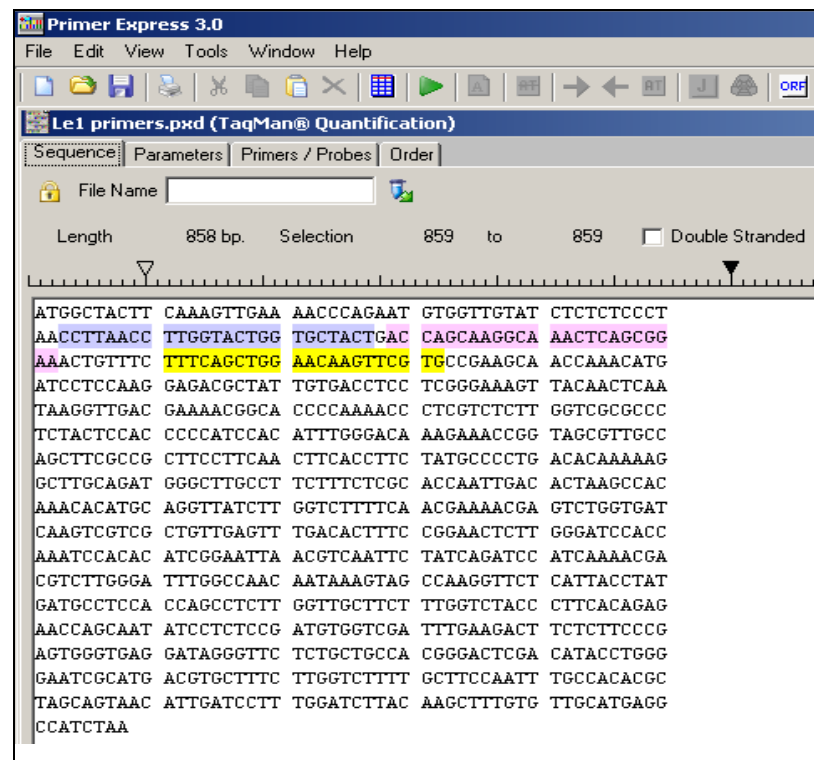


Рис. 3.28. Олігонуклеотидні праймери та зонд, підібрані для ампліфікації ділянки послідовності гена лектину (*le1*) сої

Частину праймерів для проведення ПЛР-РЧ було підібрано самостійно (рис. 3.28–3.30) за допомогою програми *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems), деякі послідовності взято з електронної бази даних JRC [520–525]. Теоретичну специфічність всіх обраних пар праймерів та зондів оцінювали за допомогою алгоритму *BLAST*, NCBI. У таблиці 3.36 наведено послідовності та характеристики обраних олігонуклеотидів.

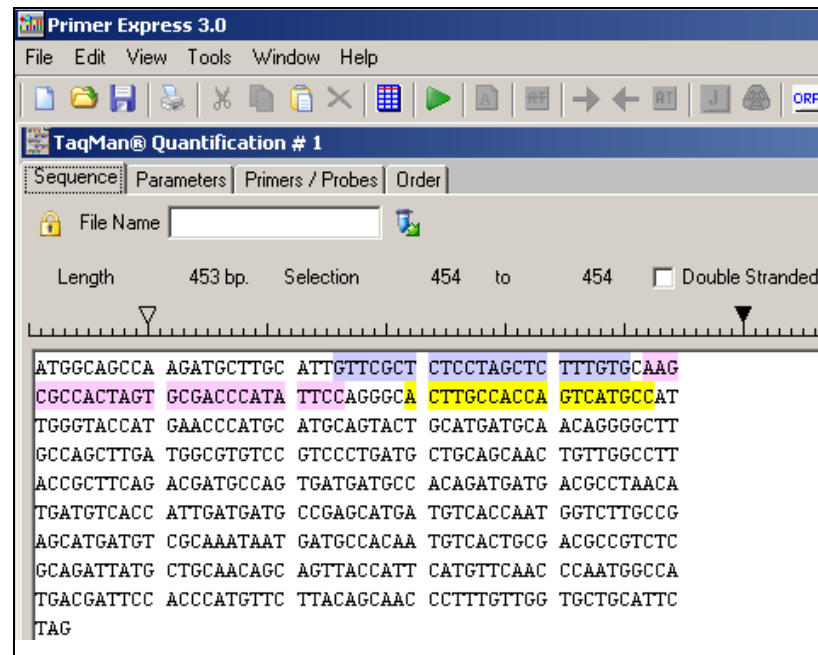


Рис. 3.29. Олігонуклеотидні праймери та зонд, підібрані для ампліфікації ділянки послідовності гена зеїну (*ze1*) кукурудзи

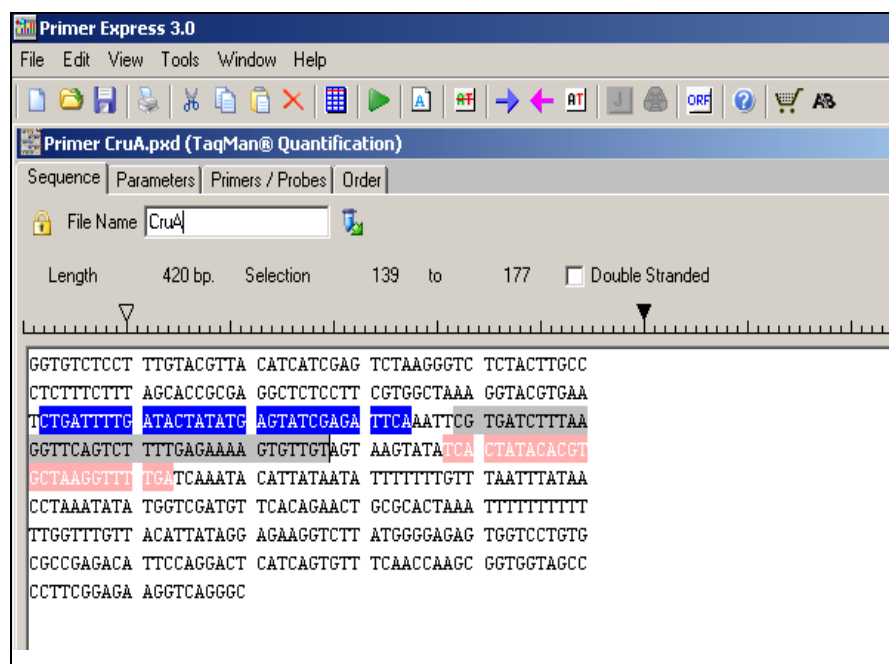


Рис. 3.30. Олігонуклеотидні праймери та зонд підібрані, для ампліфікації ділянки послідовності гена круцеферину А (*cruA*) ріпаку

Таблиця 3.36

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та зондів для визначення видоспецифічних генів рослин

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжи- на (п.н.)	ГС- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
Lec1-F*	tccacccccatccacattt	19	55	64	81
Lec1-R	ggcatagaaggtgaagttgaagga	24	52	64	
Lec1-P	aaccggtagcgttgccagcttcg	23	62	70	
Lec2-F	ccttaaccttggtactggtgctact	25	48	67	80
Lec2-R	cacgaactgttcagctgaaa	22	45	64	
Lec2-P	accagcaaggcaaaactcagcggaa	24	54	71	
Adh1-F**	ccagcctcatggccaaag	18	42	63	70
Adh1-R	ccttcttgccggcttatctg	20	57	65	
Adh1-P	cttaggggcagactccccgtgttcct	26	55	73	
Ze2-F	gttcgctctcctagctctttgtg	23	52	66	75
Ze2-R	ggcatgactggtggcaagt	19	58	65	
Ze2-P	aagcgccactagtgcgacccatattcc	27	56	73	
Cru1-F	ctgattttgatactatatgagtatcgagattca	33	30	64	111
Cru1-R	tcaaaaccttagcacgtgtatagtga	26	38	65	
Cru1-P	cgtgatctttaagggttcagctcttttgagaaagtgtgt	39	36	71	
Cru2-F***	ggccaggggttccgtgat	18	61	65	101
Cru2-R	ccgtcgtttagaaccattgg	21	52	64	
Cru2-P	agtccttatgtgctccactttctggtgca	29	48	72	
Gs-F****	gacctccatattactgaaaggaag	24	42	61	118
Gs-R	gagtaattgctccatcctgttca	23	43	63	
Gs-P	ctacgaagtttaaagtatgtgccgctc	27	44	67	
Pld-F*****	tggtgagcggtttgcagtct	20	50	65	68
Pld-R	ctgatccactagcaggaggtcc	22	59	66	
Pld-P	tgttgtgctgccaatgtggcctg	23	57	71	
Cox1-F*****	cgtcgcattccagattatcca	21	48	63	74
Cox1-R	caactacggatatataagagccaaaactg	29	38	65	
Cox1-P	tgcttacgctggatggaatgcctt	24	54	71	
Psb2-F	gtcaataaggtagggatcatcaaac	26	38	63	129
Psb2-R	catgactgcaattttagagagacg	24	42	63	
Psb2-P	tggggtcgcttctgtaactggataac	26	50	69	
Rbsl3-F	cttaccagtcttgatcgttataaa	24	38	62	111
Rbsl3-R	tcttcaaaaaggtctaattggataagctacata	32	31	65	
Rbsl3-P	attgattttctctccagcaacgggctcgatgtggttagca tcg	43	49	78	

*[520], **[521], ***[522], ****[523], *****[524], *****[525].

Також було розроблено універсальний ендogenous контроль на всі види рослинної ДНК. Для цього було підібрано три пари праймерів та зонди, специфічні до рослинної ДНК. Першу пару праймерів було запозичено з літературних джерел [526]. Вона давала змогу ампліфікувати ген

цитохромоксидази (*cox*) мітохондріальної ДНК. Дві наступні було підібрано до двох генів хлоропластної ДНК, зокрема гена, що кодує протеїн D1 фотосистеми II (*psbA*), та гена рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази (*rbcL*). Ці гени зазвичай розглядаються як універсальні референтні гени рослин. Дослідження нуклеотидних послідовностей генів *psbA* і *rbcL* різних видів рослин показало присутність достатнього рівня варіабельності (рис. 3.31, 3.32). З огляду на це, необхідно було підібрати праймери, що відповідають найбільш консервативним ділянкам обраних генів. Основою для пошуку місць посадок праймерів стало вирівнювання (зіставлення) нуклеотидних послідовностей всіх видів рослин за даними генами, що перебувають у базі даних. Усього було використано 58 послідовностей для гена *psbA* та 34 для *rbcL*.

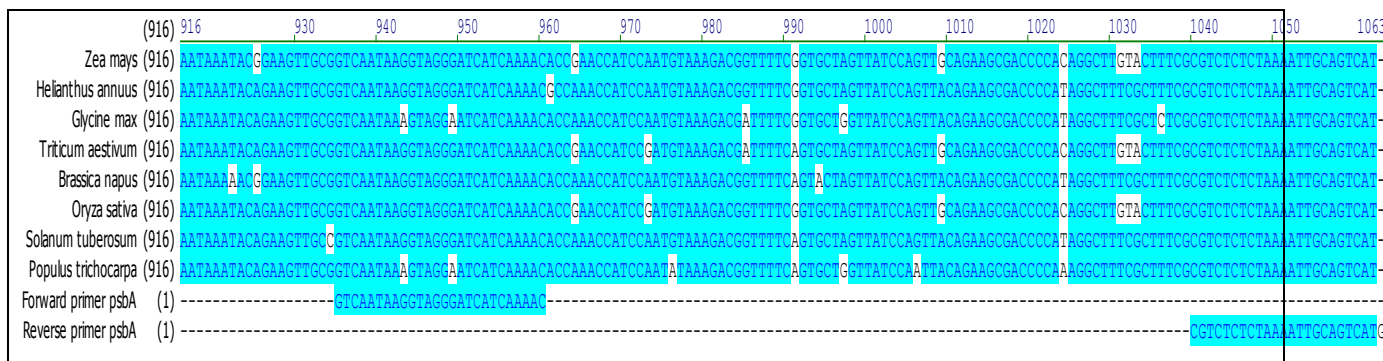


Рис. 3.31. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *PsbA* (D1) різних видів рослин. Наведено місця посадки універсальних олігонуклеотидних праймерів, обраних для проведення ПЛР

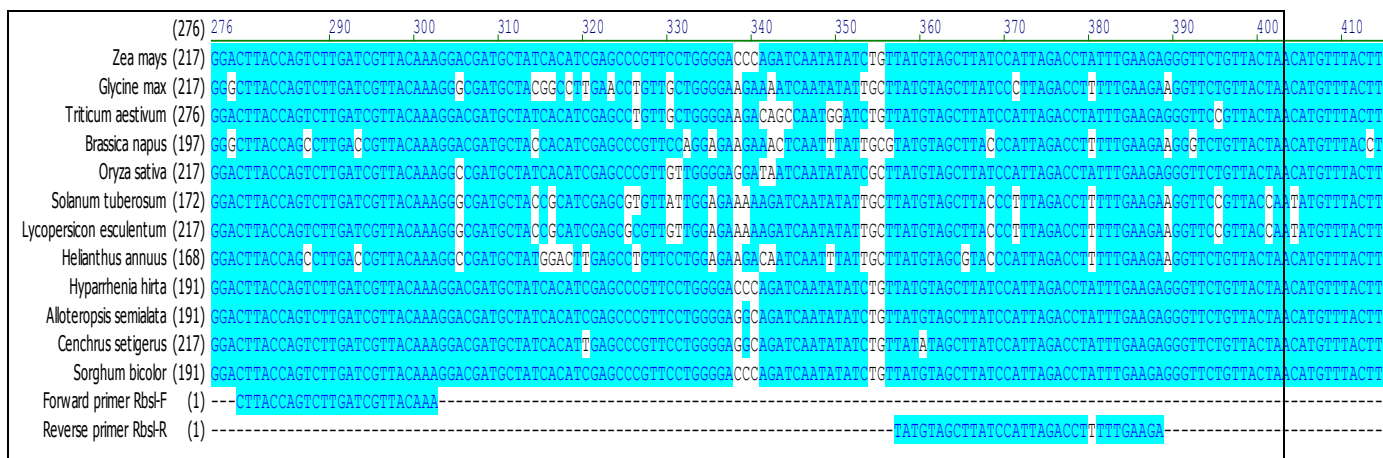


Рис. 3.32. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *rbcL* різних видів рослин. Наведено місця посадки універсальних олігонуклеотидних праймерів, обраних для проведення ПЛР.

Вибираючи місця посадки праймерів, враховували такі критерії, як специфічність до всіх відомих послідовностей генів *psbA* і *rbcL* та відсутність місць посадки на послідовностях інших організмів. Як додаткові критерії, що визначають придатність праймерів, враховували неспроможність до утворення дуплексів та гібридизації саму на себе. Таким критеріям відповідають всі підібрані праймери та зонди.

У процесі ампліфікації з обраними праймерами та зондами синтезуються фрагменти генів *psbA* і *rbcL* розміром 129 і 111 п.н. відповідно (табл. 3.36). Всі зонди було мічено флуоресційним барвником HEX та гасниками флуоресценції BNQ1 і RTQ-1.

3.3.3.6. Оптимізація умов проведення ПЛР у реальному часі з обраними праймерами і зондами

Оцінювання всіх аналітичних характеристик розроблюваних тест-систем, таких як ефективність, специфічність, чутливість, межа детектування, межа кількісного виміру, а також повторюваність та відтворюваність результатів аналізу проводили відповідно до вимог Об'єднаного Центру досліджень ГМО (JRC) Європейського Союзу.

Підбір умов ампліфікації обраних праймерів і зондів здійснювали за допомогою приладів iQCyler (BioRad, Франція) та CFX96 (BioRad, США).

Синтез праймерів та зондів, використаних у роботі, частково замовляли в науково-виробничій компанії «Синтол» (РФ), частково в компанії «Metabion international AG» (Німеччина). Обрані зонди було мічено флуоресційними барвниками FAM, HEX, ROX або Cy5 та гасниками флуоресценції BNQ1-3 або RTQ1-3. У таблиці 3.37 наведено повні назви та фізичні характеристики всіх використаних у роботі флуоресцентних барвників та гасників флуоресценції.

Таблиця 3.37

Характеристика використаних флуорофорів та гасників флуоресценції

Назва сполуки	λ макс. поглинання, нм	λ макс. флуоресценції / діапазон гасіння, нм
Флуоресцентні барвники		
FAM (50-6-carboxy-fluorescein)	495	520
R6G (carboxyrhodamine 6G)	520	560
HEX (hexachloro-fluorescein)	535	556
ROX (6-Carboxyl-X-Rhodamine)	576	601
Cy5 (Cyanine 5)	646	662
Гасники флуоресценції		
RTQ-1 (Real Time Quencher 1)	520	470-570
BHQ-1 (30-Black Hole Quencher 1)	535	480-580
BHQ-2 (30-Black Hole Quencher 2)	575	550-650
RTQ-2 (Real Time Quencher 2)	625	580-670
BHQ-3 (30-Black Hole Quencher 3)	670	620-730

Реакційна суміш містила 1x Taq-буфер (75 мМ Tris-HCl (pH 8,8); 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% Tween 20); 0,2 мМ дНТФ суміш; 50-500 нг ДНК; 1 од. Taq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США), а також різні концентрації MgCl_2 , праймерів та зондів (табл. 3.38).

Відповідно до рекомендацій JRC, а також вимог щодо методу ПЛР у реальному часі під час розроблення тест-систем кожену реакцію ампліфікації проводили у двох повторностях [527].

Об'єм реакційної суміші обирали експериментально, виходячи з певних критеріїв. По-перше, загальний об'єм ПЛР-суміші на 100 реакцій мав вміститись у 2 мл поліпропіленові пробірки. По-друге, це мали бути об'єми, з якими зручно працювати. Крім того, важливим був фінансовий аспект. Зменшення об'єму реакційної суміші знижує собівартість проведення однієї ПЛР та суттєво впливає на розрахунок кінцевої вартості тест-системи. Водночас необхідно враховувати, щоб зменшення об'єму реакційної суміші не призвело до погіршення якісних та кількісних характеристик самої тест-системи.

Таблиця 3.38

Протокол приготування реакційної суміші для проведення ПЛР-РЧ

Компоненти	Кінцева концентрація в ПЛР-суміші	мкл/реакцію
Тaq-буфер 10x	1x	2
дНТФ 2 мМ кожного	0,2 мМ кожного	2
Зразок ДНК	50-500 нг	2
Тaq ДНК полімераза (5 од./мкл)	0,05 од./мкл	0,2
MgCl ₂ (25 мМ)	1-5 мМ	XX
Праймер F1 (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Праймер R1 (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Зонд P1 (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Праймер F2 (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Праймер R2 (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Зонд P2 (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
...	...	...
Праймер Fn (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Праймер Rn (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Зонд Pn (XX мкМ)	0,1-1,0 мкМ	XX
Деіонізована H ₂ O	-	до 20 мкл
Кінцевий об'єм:	20 мкл	

За зазначеними вище критеріями було встановлено оптимальний об'єм реакційної суміші в 20 мкл, з яких 2 мкл припадало на розчин ДНК. На рисунку 3.33 наведено графіки ампліфікації з різними об'ємами реакційної суміші – 5, 10, 20, 50 мкл. Аналіз графіків ампліфікації проводили за каналами FAM, HEX і ROX. Оцінювали як коливання значень C_t (величина граничного циклу), так і ΔR_n (нормований сигнал репортерного барвника). Значення C_t за каналами FAM, HEX і ROX знаходилися у межах 29,02–35,74; 24,20–29,38 та 28,69–33,93 відповідно. Значення ΔR_n за каналами FAM, HEX і ROX коливалися в межах 391–4392, 289–2876 та 210–2079 відповідно.

Перевірку роботи олігонуклеотидних праймерів та зондів здійснювали в декілька етапів. На першому етапі досліджень аналізували роботу кожної з підібраних пар праймерів та зонду окремо. Потім перевіряли можливість їхньої роботи в мультиплексній реакції. І, нарешті, оптимізували умови ампліфікації для кожного з утворених мультиплексів.

Первинне оцінювання роботи праймерів здійснювали за такими критеріями, як значення C_t та ΔR_n . Найкращі результати характеризувалися найменшими значеннями величин граничного циклу та найбільшими значеннями рівня репортерної флуоресценції.

Для проведення ПЛР було використано «класичний» температурний профіль ампліфікації, який складається з трьох температурних інтервалів (табл. 3.39). Температуру гібридизації праймерів (T_a) обирали, виходячи з теоретично обчислених значень температур плавлення праймерів (T_m), використовуючи наступну формулу: $T_a \approx T_m - 5$ [241]. Так, наприклад, для групи праймерів, підібраних для визначення промотору 35S (табл. 3.32), було взято усереднене значення T_a , що відповідало 60 °C.

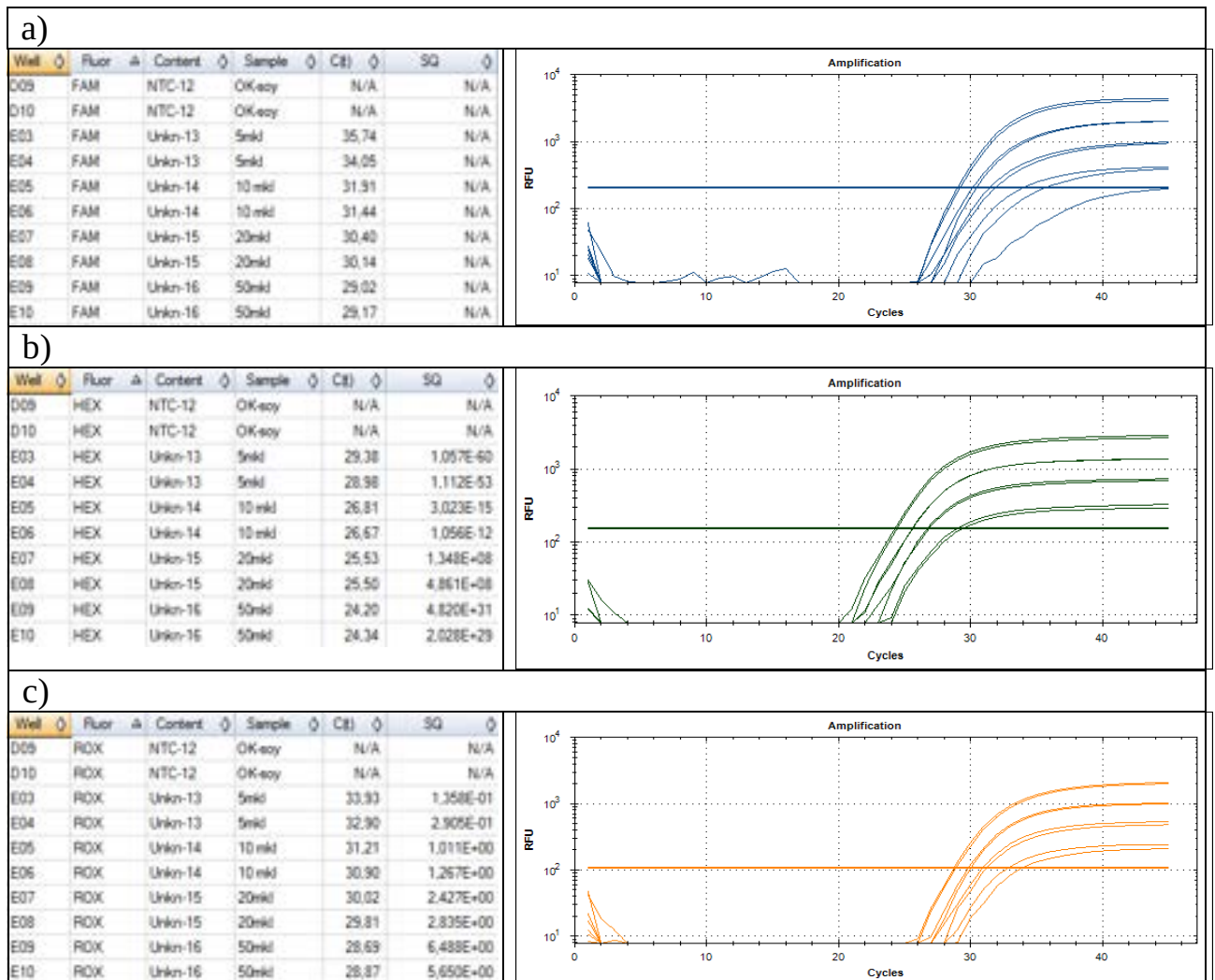


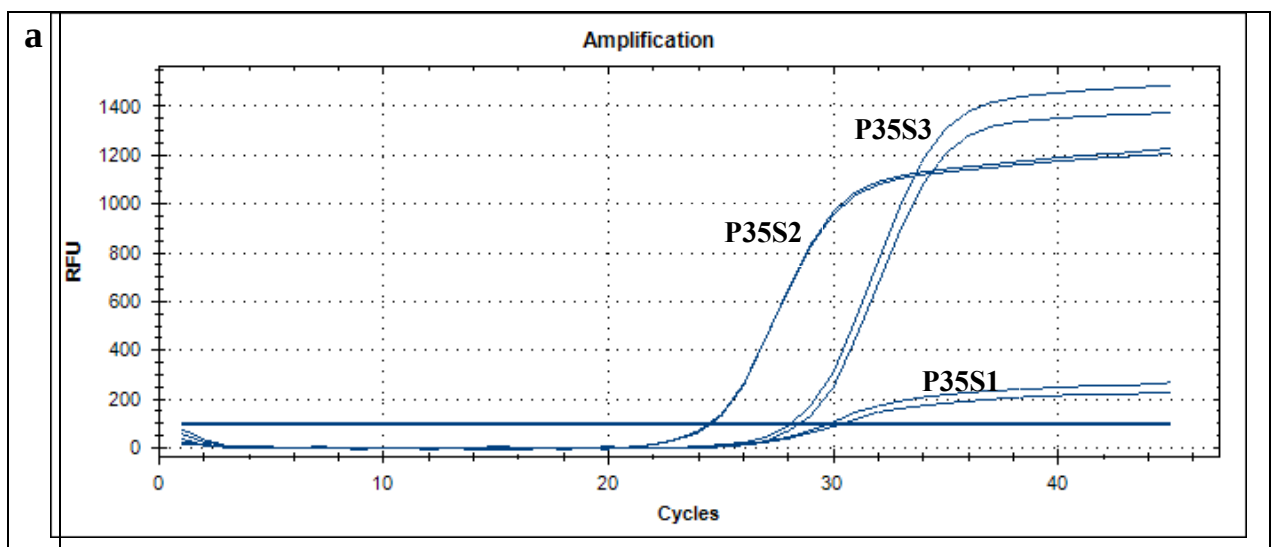
Рис. 3.33. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час визначення оптимального об'єму реакційної суміші: а – залежність флуоресційного каналу FAM від номеру циклу; б – залежність каналу HEX від номеру циклу; с – залежність каналу ROX від номеру циклу

Таблиця 3.39

Класичний трьохстадійний протокол проведення ПЛР-аналізу, що використовувався для первинного оцінювання роботи праймерів

Крок	Етап	Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація	94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні
3		Гібридизація	Та	60	ні
		Синтез	72	30	так
					45х

Як приклад на рисунку 3.34 (а, b) відображено процедуру оцінювання продуктивності роботи праймерів, підібраних до промотора 35S та термінатора NOS. Для промотора 35S найкращі результати було отримано з парою праймерів P35S2 зі значеннями $C_t=24,47$ та $\Delta R_n=1229$. Дві інші пари праймерів (P35S1 і P35S3) мали дещо гірші показники значень C_t (30,07 і 28,28) та різні ΔR_n (249 і 1430) відповідно. Перевірка роботи праймерів до термінатора NOS також визначила найкращу пару Tnos2 зі значеннями $C_t=25,19$ та $\Delta R_n=1392$. Іншим двом парам праймерів Tnos1 і Tnos3 відповідали значення C_t – 28,68 і 26,65 та ΔR_n – 2148 і 733 відповідно. Слід зазначити, що показник C_t є більш важливим для оцінювання продуктивності роботи праймерів, ніж ΔR_n . Для подальших досліджень можливості роботи праймерів у мультиплексній реакції з кожної з двох груп було відібрано по дві пари праймерів і зондів – P35S2, P35S3, Tnos1 та Tnos2.



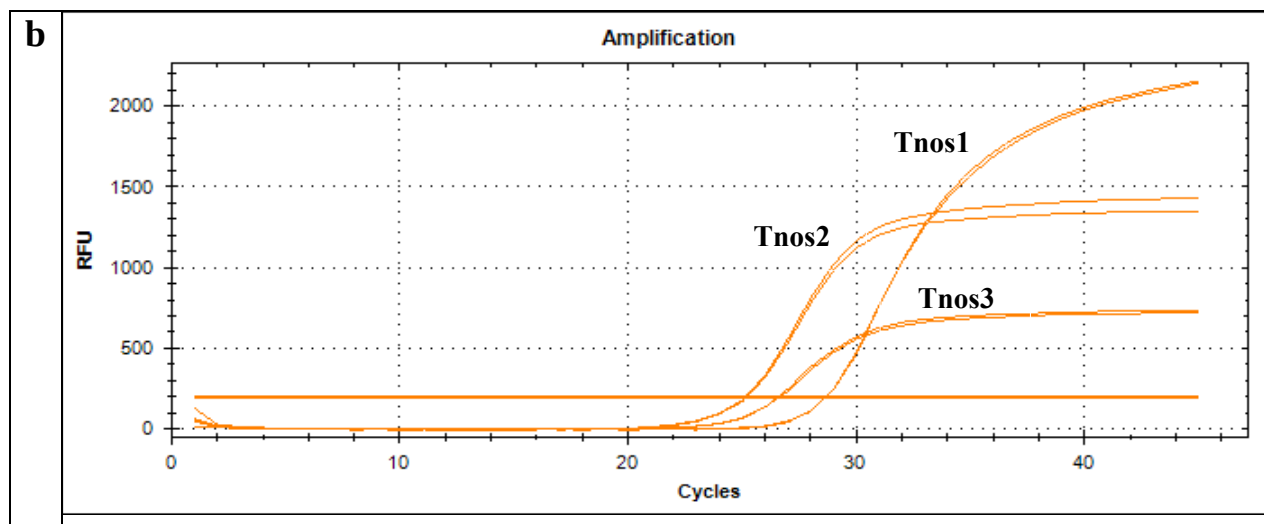


Рис. 3.34. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Порівняльна характеристика продуктивності роботи праймерів і зондів, підібраних для визначення P-35S (a) та T-nos (b).

3.3.3.7. Дослідження специфічності та ефективності роботи праймерів і зондів

Для оцінювання специфічності підібраних праймерів і зондів використовували сертифікований референтний матеріал, розроблений Бельгійським інститутом контрольних матеріалів і методів (IRMM, ЕС), Американською асоціацією хіміків нафтохімічної та масложирової промисловості (AOCS, США), комерційний набір «Qualitative GMO reference material set» (Sigma-Aldrich, США), а також польові зразки [528-530].

Зразки референтного матеріалу, який використовували під час дослідження специфічності роботи праймерів, були кількох типів. Одні були у вигляді борошна або насіння, отриманого з різних ліній ГМР, інші – вже у вигляді розчинів геномної ДНК (табл. 3.40).

Перевірку специфічності роботи праймерів, підібраних до регуляторних послідовностей (P-35S, T-nos) та генів (*CP4-epsps*, *pat*, *bar*, *bay TE*, *bxn*), здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованої з ГМ ліній сої (GTS40-3-2, A2704-12, MON89788), кукурудзи (Bt11, Bt176, MON810, MON863, NK603, GA21, T-25, TC1507, Mir162, Mir604), ріпаку (GT73, GS40/90, MS8xRf3, Оху235), рису (LL 62) та цукрового буряку (H7-1).

Також для тестування було використано ДНК традиційних організмів, зокрема рису (*Oryza sativa*), жита (*Secale cereal*), пшениці (*Triticum aestivum*), ячменю (*Hordeum vulgare*), вівсу (*Avena sativa*), гречки (*Fagopyrum esculentum*), томатів (*Lycopersican esculentum*), картоплі (*Solanum tuberosum*), ріпаку (*Brassica napus*), кукурудзи (*Zea mays*), лосося (*Salmo salar*), курки (*Gallus gallus*), яловичини (*Bos taurus*), свинини (*Sus domesticus*), людини (*Homo sapiens*).

Таблиця 3.40

Сертифікований референтний матеріал, використаний під час дослідження специфічності праймерів та зондів

№	Код	Назва	Виробник	Мішені
1	ERM-BF410k	борошно сої GTS 40-3-2 (Roundup Ready™)	IRMM	P-35S, T-nos, CP4 epsps, Le1
2	ERM-BF411	борошно кукурудзи Bt-176	IRMM	P-35S, Bar, Adh1
3	ERM-BF412	борошно кукурудзи Bt-11	IRMM	P-35S, T-nos, Pat, Adh1
4	ERM-BF413k	борошно кукурудзи MON810	IRMM	P-35S, T-nos, Adh1
5	ERM-BF414	борошно кукурудзи GA21	IRMM	T-nos, Adh1
6	ERM-BF415	борошно кукурудзи NK603	IRMM	P-35S, T-nos, CP4 epsps, Adh1
7	ERM-BF416	борошно кукурудзи MON863	IRMM	P-35S, T-nos, Adh1
8	ERM-BF423	борошно кукурудзи MIR604	IRMM	T-nos, Adh1
9	ERM-BF424	борошно кукурудзи 59122	IRMM	P-35S, Pat, Adh1
10	ERM-BF418	борошно кукурудзи 1507	IRMM	P-35S, Pat, Adh1
11	ERM-BF434	порошок ріпаку 73496	IRMM	Cru A
12	0304-A	насіння традиційного ріпаку	AOCS	Cru A
13	0304-B	насіння ріпаку GT73 (RT73)	AOCS	CP4 epsps, Cru A
14	55231	1% розчин ДНК ГМ ліній ріпаку: GT73, GS40/90, MS8xRf3 та Оху235	Fluka (Sigma-Aldrich)	P-35S, T-nos, CP4 epsps, Bar, Pat, Cru A
15	IRMM804	борошно рису	IRMM	Pld
16	ERM-BF419	порошок цукрового буряку H7-1	IRMM	CP4 epsps, Gs

Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Результати досліджень підтвердили 100 % специфічність більшості підібраних праймерів. Виняток становили праймери Epsps1, Pat2, Bay1 та Bar1. Перша пара праймерів з зондом не мала специфічності до ГМ ліній GTS40-3-2 та GA21, які містять у своєму складі ген *CP4-epsps*. Друга не дала позитивного сигналу з ГМ лініями кукурудзи Bt11 та TC1507, які містять ген *pat*. Пара

праймерів Bay1 не спрацювала на польовому зразку біотехнологічного ріпаку Laurical™. І, нарешті, остання пара праймерів Bar1 давала позитивний сигнал як з лініями, що містили в своєму складі ген *bar*, так і тими, що містили ген *pat*. Отримані результати є наслідком того, що під час підбору праймерів і зондів не була доступною повна інформація щодо генно-інженерних конструктів, які використовувалися під час створення ГМ ліній. На жаль, у більшості випадків доступ до такої інформації є обмеженим та становить комерційну таємницю компанії- виробника біотехнологічних культур.

У таблиці 3.41 наведено приклад результатів з перевірки специфічності роботи праймерів, підібраних для визначення промотора 35S. Видно, що всі три пари праймерів з зондами мають 100 % специфічність до обраної мішені і можуть бути використані у подальших дослідженнях.

Таблиця 3.41

Перевірка специфічності роботи праймерів і зондів (P35S1, P35S2, P35S3), підібраних до визначення регуляторної послідовності промотора 35S

№	Зразки ДНК та генетичні елементи	Праймери і зонди		
		P35S1	P35S2	P35S3
Соя / <i>Glycine max</i>				
1	GTS40-3-2 (P-35S, T-nos, CP4 epsps)	+	+	+
2	A2704-12 (P-35S, Pat)	+	+	+
3	MON89788 (CP4 epsps)	-	-	-
Кукурудза / <i>Zea mays</i>				
4	Bt11 (P-35S, T-nos, Pat)	+	+	+
5	Bt176 (P-35S, Bar)	+	+	+
6	MON810 (P-35S)	+	+	+
7	MON863 (P-35S, T-nos)	+	+	+
8	NK603 (P-35S, T-nos, CP4 epsps)	+	+	+
9	GA21 (T-nos, модифікований epsps)	-	-	-
10	T-25 (P-35S, Pat)	+	+	+
11	Mir162 (P-35S, T-nos)	+	+	+
12	Mir604 (T-nos)	-	-	-
Ріпак / <i>Brassica napus</i>				
13	GT73 (CP4 epsps)	-	-	-
14	GS40/90 (P-35S, синтетичний Pat)	+	+	+
15	MS8xRf3 (T-nos, Bar)	-	-	-

16	Оху235 (P-35S, T-nos)	+	+	+
Рис / <i>Oryza sativa</i>				
17	LL 62 (P-35S, Pat)	+	+	+
Цукровий буряк / <i>Beta vulgaris saccharifera</i>				
18	H7-1 (CP4 epsps)	-	-	-
Традиційні організми без ГМО				
19	Соя / <i>Glycine max</i>	-	-	-
20	Кукурудза / <i>Zea mays</i>	-	-	-
21	Ріпак / <i>Brassica napus</i>	-	-	-
22	Рис / <i>Oryza sativa</i>	-	-	-
23	Цукровий буряк / <i>Beta vulgaris saccharifera</i>	-	-	-
24	Жито / <i>Secale cereal</i>	-	-	-
25	Пшениця / <i>Triticum aestivum</i>	-	-	-
26	Ячмінь / <i>Hordeum vulgare</i>	-	-	-
27	Овес / <i>Avena sativa</i>	-	-	-
28	Гречка / <i>Fagopyrum esculentum</i>	-	-	-
29	Томати / <i>Lycopersican esculentum</i>	-	-	-
30	Кортопля / <i>Solanum tuberosum</i>	-	-	-
31	Лосось / <i>Salmo salar</i>	-	-	-
32	Курка / <i>Gallus gallus</i>	-	-	-
33	ВРХ / <i>Bos taurus</i>	-	-	-
34	Свиня / <i>Sus domesticus</i>	-	-	-
35	Людина / <i>Homo sapiens</i>	-	-	-

Ефективність роботи всіх пар праймерів і зондів перевіряли шляхом проведення ПЛР із серією десятикратних розведень ДНК стандартних зразків (табл. 3.42). Кожна серія десятикратних розведень ДНК складалася з чотирьох точок. На рисунку 3.35 наведено приклад побудови графіків стандартних кривих з праймерами до послідовності промотора 35S. У даному випадку було використано ДНК сої лінії GTS40-3-2. Графіки побудовано в системі координат $\text{Log}[N] / \text{Ct}$. Стандартні криві описуються загальним лінійним рівнянням $y = -\alpha x + b$, де α виражає тангенс кута нахилу кривої, та дають змогу оцінити ефективність ампліфікації. Ефективність ПЛР є величиною, яка демонструє, в скільки разів за один цикл змінюється кількість фрагментів ДНК та описується рівнянням $E = 10^{(-1/\alpha)} - 1$. За ефективності ПЛР 100 % за кожен цикл відбувається подвоєння продукту ампліфікації. У такому випадку кут нахилу кривої дорівнює $-3,322$, а величина

фактору ампліфікації – 2 [531]. Зменшення ефективності ПЛР, наприклад до 83 % ($\alpha = -3,800$), свідчить про необхідність подальшої оптимізації умов ампліфікації за рахунок зміни концентрації праймерів і зондів або $MgCl_2$. Своєю чергою, занадто високе значення E (143 %, $\alpha = -2,600$) може означати непропорційне розщеплення зонду по відношенню до напрацьованої кількості ампліконів.

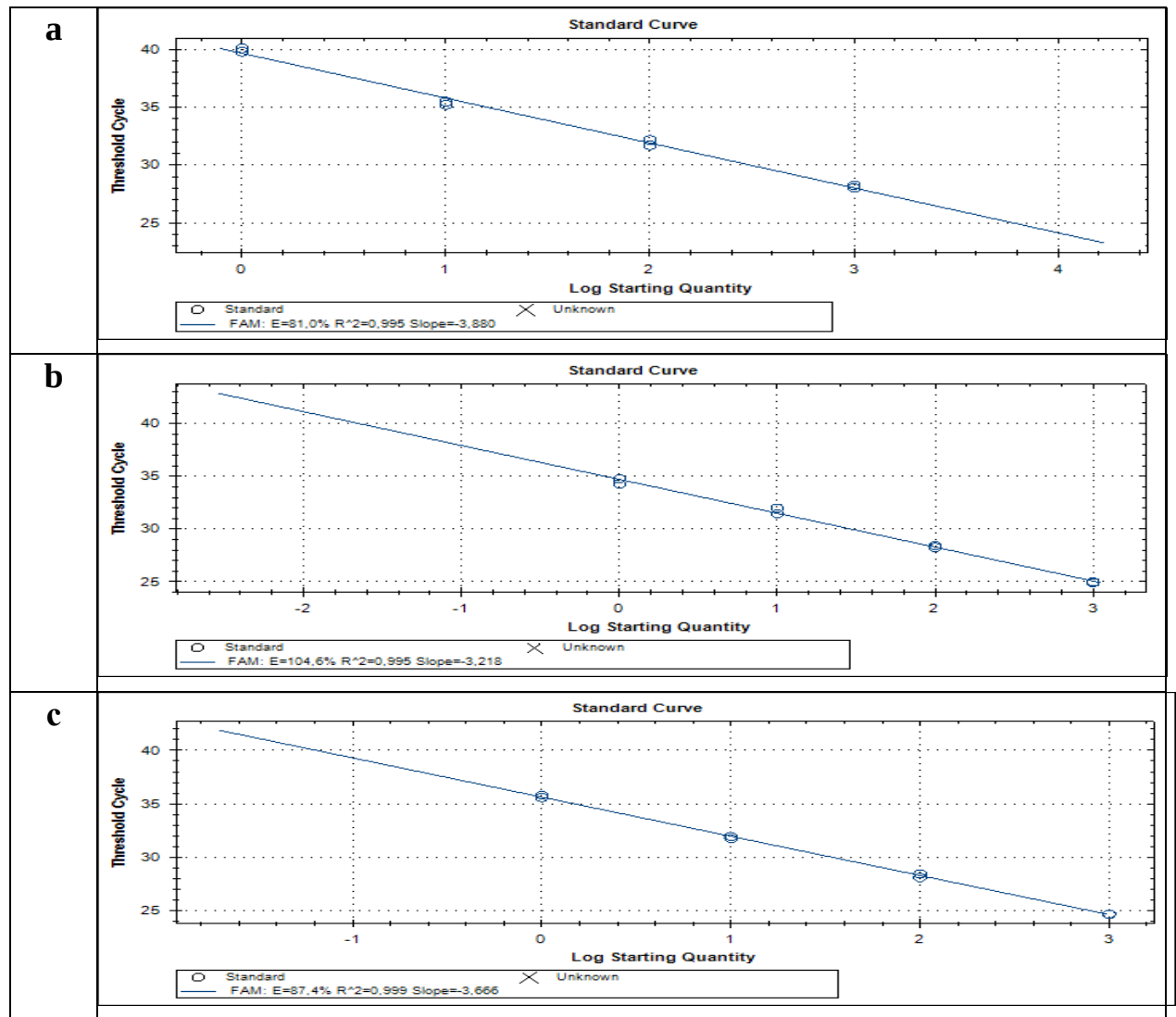


Рис. 3.35. Графіки стандартних кривих серії десятикратних розведень стандартних зразків, побудовані за результатами ПЛР у реальному часі для послідовності промотора 35S – праймери P35S1 (a), P35S2 (b), P35S3 (c).

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). Так, для всіх трьох пар праймерів значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон від $-2,5$ до $-4,5$, а показники R^2 були не нижчими за 0,995 [535,536]. Розраховані значення ефективності

ПЛР для праймерів P35S1, P35S2 та P35S3 становили 81, 104,6 та 87,4 % відповідно.

Таблиця 3.42

Оцінювання продуктивності роботи праймерів та зондів, підібраних для проведення скринінгового аналізу на вміст ГМО

№	Назва	Tm	Ta	Ct	ΔRn	R ²	α	E, %
1	P35S1	65	60	30,07±0,39	249	0,995	-3,880	81,0
2	P35S2	67	62	24,47±0,07	1229	0,995	-3,218	104,6
3	P35S3	64	59	28,28±0,12	1430	0,999	-3,666	87,4
4	Tnos1	53	48	28,68±0,12	2148	0,998	-3,242	103,4
5	Tnos2	63	58	25,19±0,13	1392	0,999	-3,296	101,1
6	Tnos3	62	57	26,65±0,05	733	0,999	-3,290	101,3
7	Epsps1	64	59	30,95±0,08	1267	0,989	-3,852	81,8
8	Epsps2	66	61	23,56±0,08	1501	0,991	-3,422	96,0
9	Pat1	64	59	25,95±0,01	1236	0,997	-3,396	97,0
10	Pat2	66	61	29,62±0,15	2045	0,991	-3,180	106,3
11	Bar1	55	49	29,31±0,23	2348	0,993	-3,427	95,8
12	Bar2	64	59	29,90±0,16	538	0,963	-3,033	113,6
13	Bay1	66	61	-	-	-	-	-
14	Bay2	65	60	29,71±0,00	2084	0,952	-3,490	93,4
15	Bxn1	66	61	27,08±0,11	1129	0,993	-3,306	100,7
16	Bxn2	63	58	25,93±0,05	1194	0,994	-3,458	94,6
17	Lec1	64	59	25,02±0,04	1034	0,996	-3,331	99,6
18	Lec2	66	61	25,05±0,00	967	0,999	-3,415	96,3
19	Adh1	64	59	27,32±0,03	1345	0,998	-3,179	106,3
20	Ze2	66	61	26,27±0,12	1108	0,994	-3,766	84,3
21	Cox1	64	59	18,03±0,14	1753	0,991	-3,234	103,8
22	Psb2	63	58	14,78±0,33	410	0,995	-3,134	108,5
23	Rbsl3	64	59	13,65±0,84	498	0,983	-3,343	99,1
24	Cru1	65	60	23,36±0,10	748	0,998	-3,408	96,5
25	Cru2	65	60	27,57±0,29	506	0,994	-4,028	77,1

У таблиці 3.42 наведено результати первинного оцінювання роботи всіх підібраних праймерів та зондів. Позитивні результати було отримано майже з усіма перевіреними праймерами, за винятком пари Bay1. Однак у ряді випадків продуктивність роботи різних пар праймерів, підібраних до однієї й тієї ж мішені, суттєво різнилися за показниками Ct, ΔRn та E. Тому для подальшої перевірки роботи праймерів у системі мультиплексу передусім відбиралися пари праймерів, які є кращими за всіма показниками.

3.3.3.8. Оптимізація умов ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу та комплектація тест-систем серії «ГМО скринінг»

Для перевірки роботи праймерів у форматі мультиплексу їх було розділено на окремі групи. До однієї з груп було віднесено праймери і зонди специфічні до регуляторних послідовностей генно-інженерних конструктів (P-35S, T-nos) та таксон-специфічних генів рослин (*lel*, *ze1*, *adh1*, *cruA* та ін.). Інша граппа складалася з праймерів і зондів до структурних генів (*CP4-epsps*, *pat*, *bar*, *bay TE*, *bxn*) та тих самих таксон-специфічних генів. Крім того, ще були групи, в яких перевіряли можливість спільної роботи у мультиплексній реакції обох типів праймерів – специфічних як до регуляторних послідовностей, так і до структурних генів. Також досліджували різні комбінації праймерів до послідовностей таксон-специфічних генів рослин. Така перевірка роботи різних комбінацій пар праймерів і зондів дала змогу підібрати оптимальні варіанти для створення мультиплексів.

На рисунку 3.36 (а-с) наведено кілька прикладів перевірки роботи праймерів у мультиплексній реакції. Так, наприклад, перевірка роботи двох мультиплексних систем з праймерами до промотора P-35S та різними типами видоспецифічних праймерів до кукурудзи показала деякі відмінності. В мультиплексній системі P35S2+Adh1 криві ампліфікації ендogenous контролю виходили раніше та мали значно вищі значення показника ΔR_n , ніж в системі – P35S2+Ze2 (рис. 3.20 а). Перевірка роботи комбінації праймерів P35S2 з двома парами видоспецифічних праймерів до гена *lel* сої показала, що дещо кращою є комбінація P35S2+Lec1 (рис. 3.20 б). На рисунку 4.20 с наведено порівняльні результати аналізу двох мультиплексних систем – P35S2+Lec1 та P35S2+Lec1+Tnos2. Як видно із зображень графіків ампліфікації, введення в систему третьої пари праймерів (Tnos2) суттєво погіршує вихід кінцевого продукту та потребує проведення додаткової процедури оптимізації умов ампліфікації.

Таким чином, у ході першого та другого етапу досліджень вдалося відібрати пари праймерів з зондами, які найбільшою мірою підходили до

роботи в системі мультиплексної реакції (табл. 3.43).

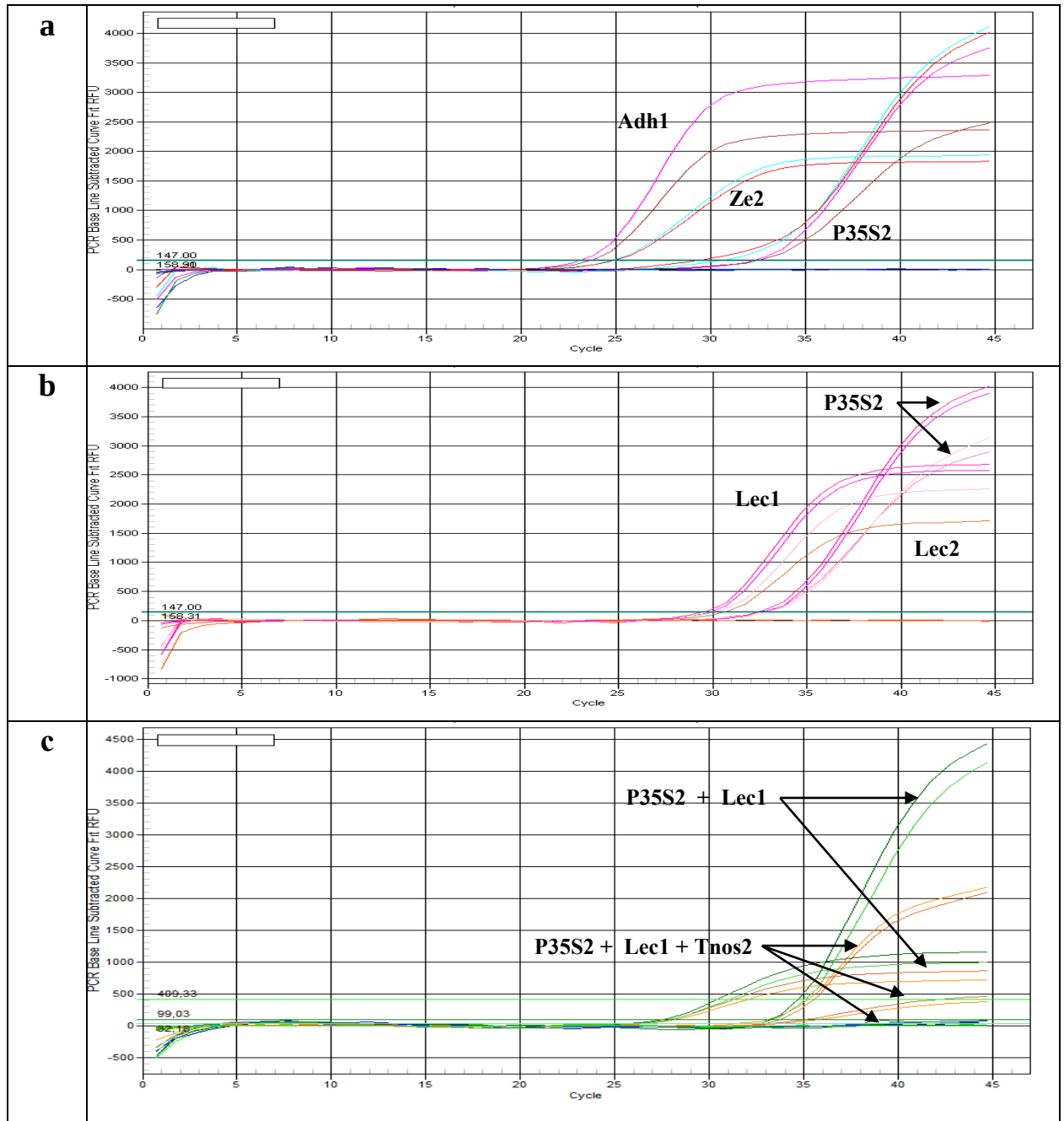


Рис. 3.36. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час перевірки роботи ПЛР-систем у форматі мультиплексу: а-с – різні комбінації праймерів і зондів.

З наведених вище праймерів та зондів було сформовано п'ять систем у форматі мультиплексу, які і лягли в основу тест-систем серії «ГМО скринінг». До складу тест-систем «ГМО соя (p35S/tNOS скринінг)», «ГМО кукурудза (p35S/tNOS скринінг)» та «ГМ рослина (p35S/tNOS скринінг)» увійшли пари праймерів і зонди (P35S2, Tnos2), специфічні до регуляторних елементів генно-інженерних конструктів. Третя пара праймерів

і зонд у кожному із мультиплексів виступала як ендogenousний контороль та була представлена Lec1 у системі «ГМО соя», Adh1 – в системі «ГМО кукурудза» та Psb1 – в «ГМ рослина». До складу четвертої тест-системи

Таблиця 3.43

Перелік пар праймерів та зондів, відібраний для створення мультиплексних тест-систем серії «ГМО скринінг»

№	Назва	Послідовність 3'→5'
1	P35S2-F P35S2-R P35S2-P	gcc tct gcc gac agt ggt aag acg tgg ttg gaa cgt ctt c FAM-caa aga tgg acc ccc acc cac g-BHQ1
2	Tnos2-F Tnos2-R Tnos2-P	tga cgt tat tta tga gat ggg ttt tt cgc tat att ttg ttt tct atc gcg tat ROX-tga tta gag tcc cgc aat tat aca ttt-BHQ2
3	Epsps2-F Epsps2-R Epsps2-P	ggg atg acg tta att ggc tct g ggc tgc ttg cac cgt gaa g FAM-cac gcc gtg gaa aca gaa gac atg acc-BHQ1
4	Bar1-F Bar1-R Bar1-P	act ggg ctc cac gct cta ca atg aca gcg acc acg ctc tt ROX-cac ctg ctg aag tcc ctg gag gca c-BHQ2
5	Bay2-F Bay2-R Bay2-P	cac ctt tgc cat cag atc tta tga g agt gta gcc tcc tgc atg tga tt ROX-acc tga ccg ctc cac atc tat act ggc tg-BHQ2
6	Bxn2-F Bxn2-R Bxn2-P	att tcc cga att gtg gat tcc aat ggt agg gtt tcg gtt tgg FAM-acc cag gat tca tgc tca cgc aca-BHQ1
7	Lec1-F Lec1-R Lec1-P	tcc acc ccc atc cac att t ggc ata gaa ggt gaa gtt gaa gga HEX-aac cgg tag cgt tgc cag ctt cg-BHQ1
8	Adh1-F Adh1-R Adht1-P	cca gcc tca tgg cca aag cct tct tgg cgg ctt atc tg HEX-ctt agg ggc aga ctc ccg tgt tcc ct-BHQ1
9	Psb2-F Psb2-R Psb2-P	gtc aat aag gta ggg atc atc aaa ac cat gac tgc aat ttt aga gag acg HEX-tgg ggt cgc ttc tgt aac tgg ata ac-BHQ1
8	Cru1-F Cru1-R Cru1-P	ctg att ttg ata cta tat gag tat cga gat tca tca aaa cct tag cac gtg tat agt ga HEX-cgt gat ctt taa ggt tca gtc ttt tga gaa aag tgt tgt-BHQ1

«ГМ ріпак (CP4 EPSPS/Pat-Bar/tNOS скринінг)» ввійшла пара праймерів і зонд Tnos2, специфічні до регуляторного елементу, дві пари праймерів та

зонди (Epsps2, Bar1), специфічні до генів «нової ознаки» та Cru1 як ендogenousний контроль. П'ята тест-система «ГМ ріпак 2 (Bay/Vxn скринінг» складалася з праймерів та зондів Bay2 і Vxn2, специфічних до відповідних генів (*bay TE*, *bxn*), а також Cru1 як ендogenousного контролю.

Оптимізацію умов ампліфікації мультиплексів проводили за такими параметрами як температура гібридизації праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів.

Для оптимізації умов ампліфікації за таким параметром, як температура гібридизації праймерів, використовували протокол, наведений у таблиці 3.44. Під температурою гібридизації або дисоціації олігонуклеотиду (melting temperature, T_m) слід розуміти температуру напівгібридизації з матрицею, коли половину місць посадки праймера вже зайнято, а половина ще вільна. Слід вирізняти розрахункову та істинну температури гібридизації олігонуклеотиду. Першу отримують за допомогою теоретичних розрахунків за використання певних формул [241], реальне ж значення можна отримати лише експериментальним шляхом. Температура гібридизації передусім залежить від GC-складу праймеру та, зазвичай, обирається відповідно до температури його плавлення. Неправильний вибір температури гібридизації призводить або до поганого зв'язування праймерів з матрицею (при завищеній температурі), або до зв'язування в хибному місці й появи так званих неспецифічних продуктів (за заниженої температури). Оптимізацію за гібридизацією праймерів проводили в діапазоні температурних значень від 50 до 65 °C з інтервалом в 5 °C. Результати підбору належної температури гібридизації праймерів наведено на рисунках 3.37 - 3.41.

Для мультиплексу системи «ГМО соя» найкращі результати було отримано за температури гібридизації 60 °C. За даної температури всі три графіки ампліфікації (канали FAM/синій, HEX/зелений, ROX/помаранчевий) були присутніми та практично накладалися один на одний (рис. 3.37 с). При цьому значення C_t були найменшими за приблизно однакових показників ΔR_n .

Таблиця 3.44

Базовий протокол проведення ПЛР у реальному часі

Крок	Етап		Т°С	Час (с)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація і синтез	від 50 до 65	40	так	

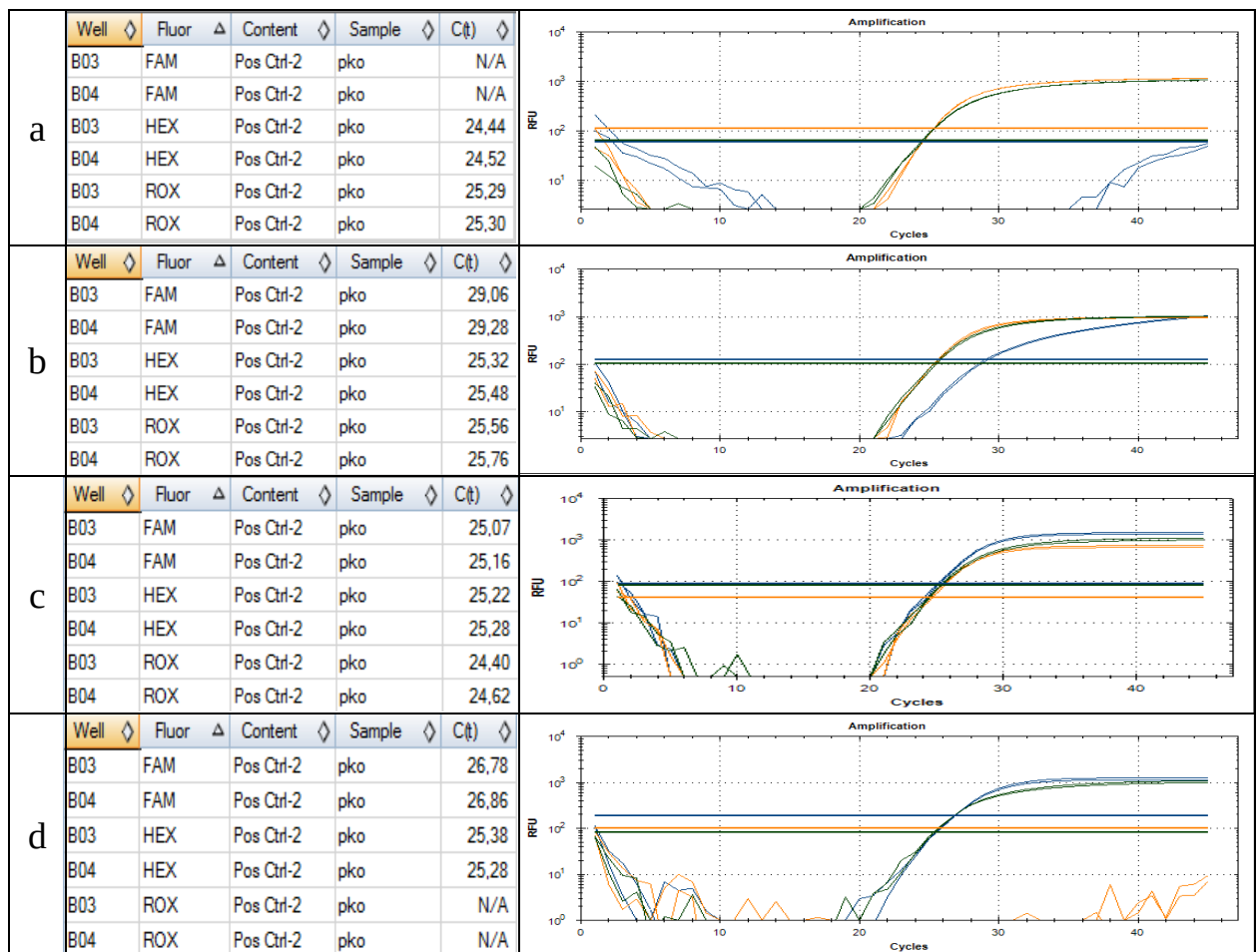


Рис. 3.37. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів у системі «ГМО соя»: а–d – різні температурні режими гібридизації праймерів: 50, 55, 60 та 65°C відповідно.

Оптимізація умов ампліфікації тест-системи «ГМО кукурудза» показала, що найкращими є результати за температурними режимами 55 та 60 С. Подальше зменшення температури призводило до більшого розмаху значень, тимчасом її збільшення – до суттєвого зменшення значень Ct суціль до їхнього повного зникнення (рис. 3.38).

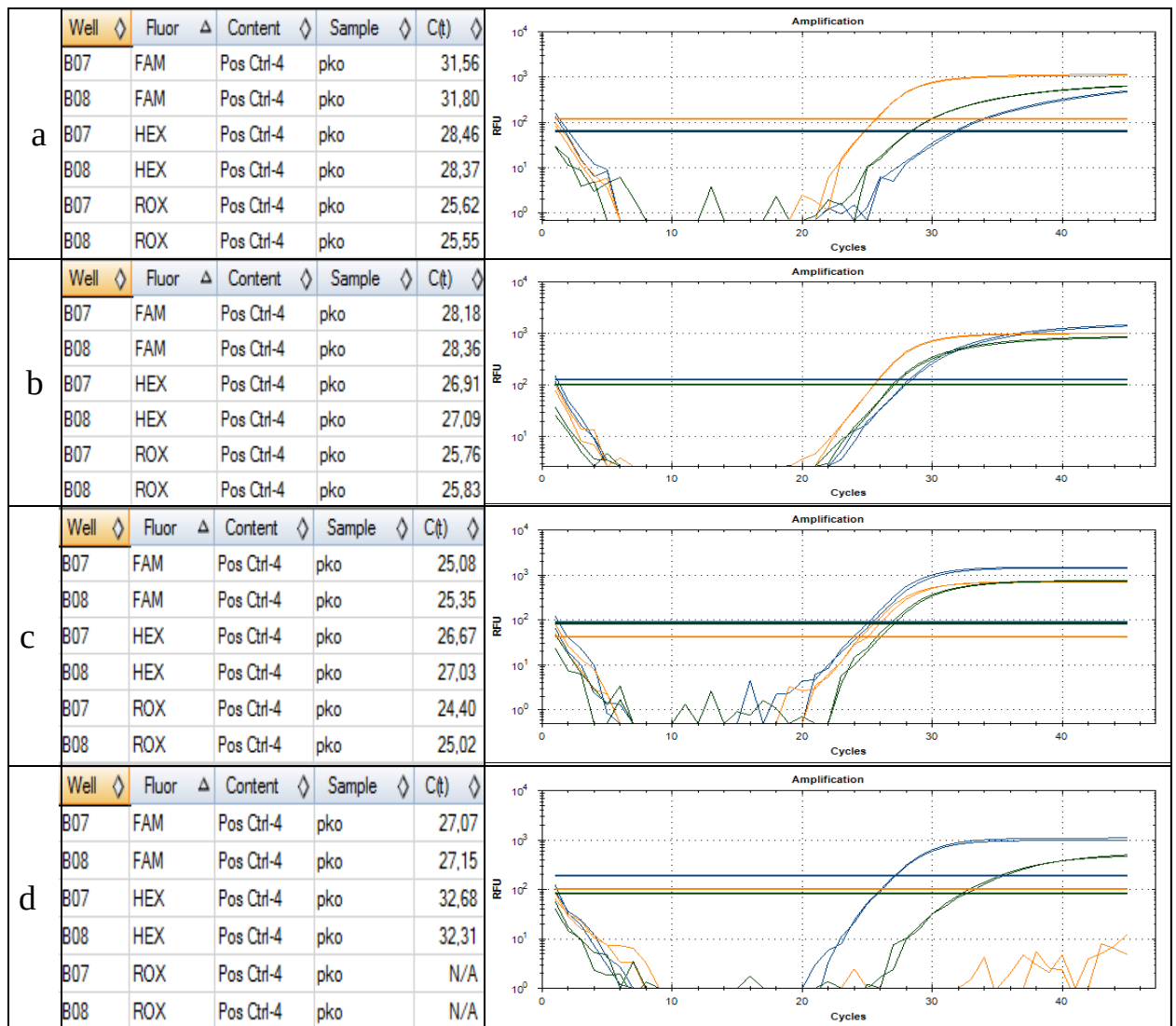


Рис. 3.38. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ піз час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів у системі «ГМО кукурудза». (a–d) – різні температурні режими гібридизації праймерів: 50, 55, 60 та 65°C відповідно

Під час оптимізації системи «ГМ рослина» найкращі результати було отримано також за температури 60°C. У даній системі ген *psbA*, який використовували як ендогенний контроль, є багатокопійним, тому відповідний йому графік накопичення флуоресценції з'являється набагато раніше, ніж інші. Йому також відповідають найменші значення Ct (канал HEX/зелений). Інші дві мішені представлено однією геномною копією в експериментальному зразку, тому відповідні їм графіки ампліфікації мають виходити приблизно однаково (рис. 3.39 с).

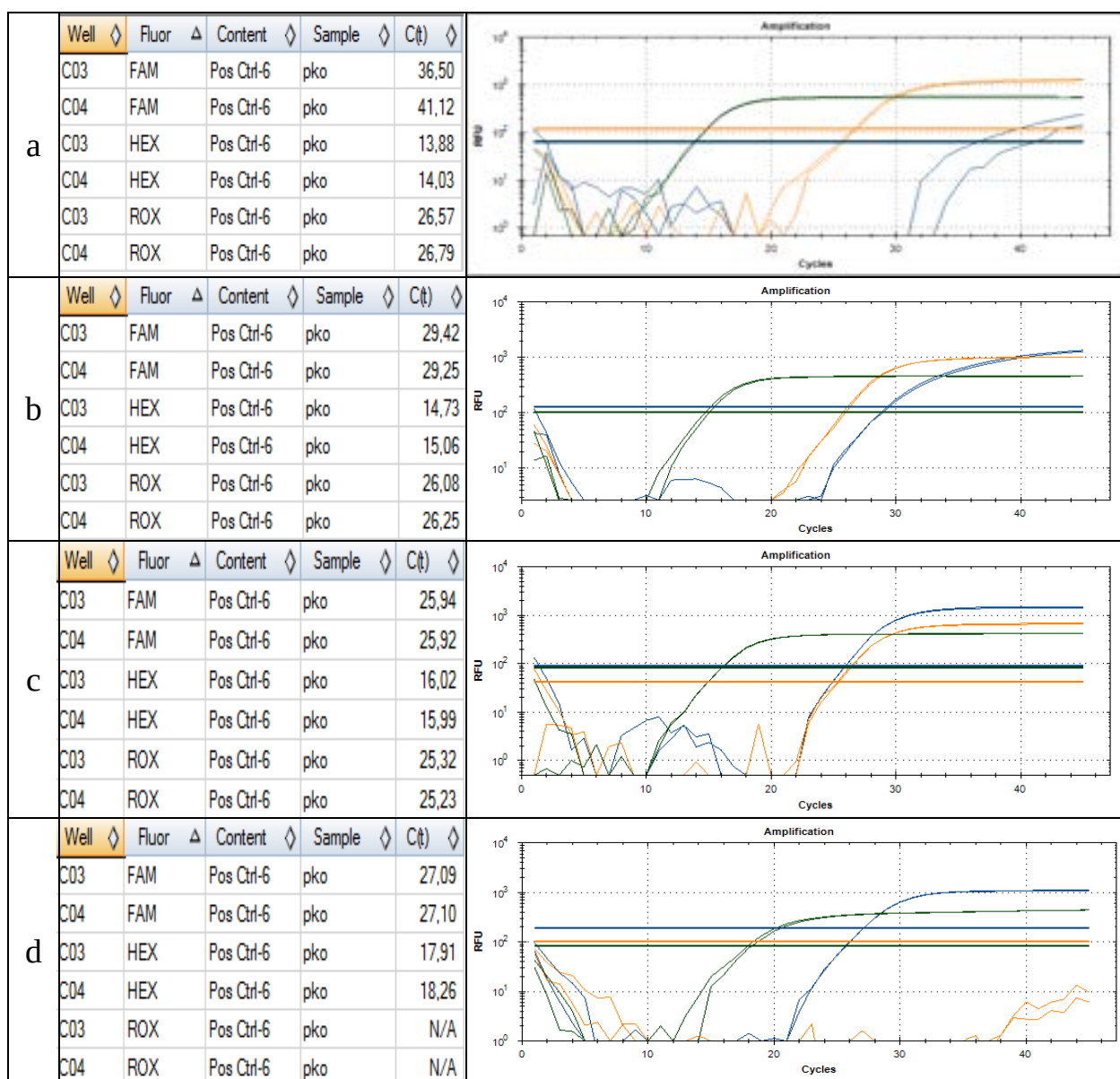


Рис. 3.39. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів к системі «ГМ рослина». (а–d) – різні температурні режими гібридизації праймерів: 50, 55, 60 та 65 °C відповідно

Найскладнішим завданням було оптимізувати роботу системи «ГМ ріпак» (рис. 3.40). Ця мультиплексна тест-система розрахована на виявлення одразу чотирьох мішеней – *CP4-epsps*/FAM/синій, *cruA*/HEX/зелений, *pat-bar*/ROX/помаранчевий та *T-nos*/Cy5/фіолетовий. Найгірші результати було отримано за температур гібридизації 50 та 65 °C. У першому випадку був відсутній сигнал за каналом ROX, в другому за – Cy5. Найкращий результат було отримано також за температури 60 °C. Слід зазначити, що сигнал флуоресценції за каналом Cy5 був дещо слабший за

інші. Якщо значення ΔR_n за каналами ROX, FAM та HEX коливалися в межах від 906–1320 rfu, то за Cy5 вони становили не більше 90 rfu. На жаль, це явище є притаманним таким барвникам, як Cy5, TAMRA та ін.

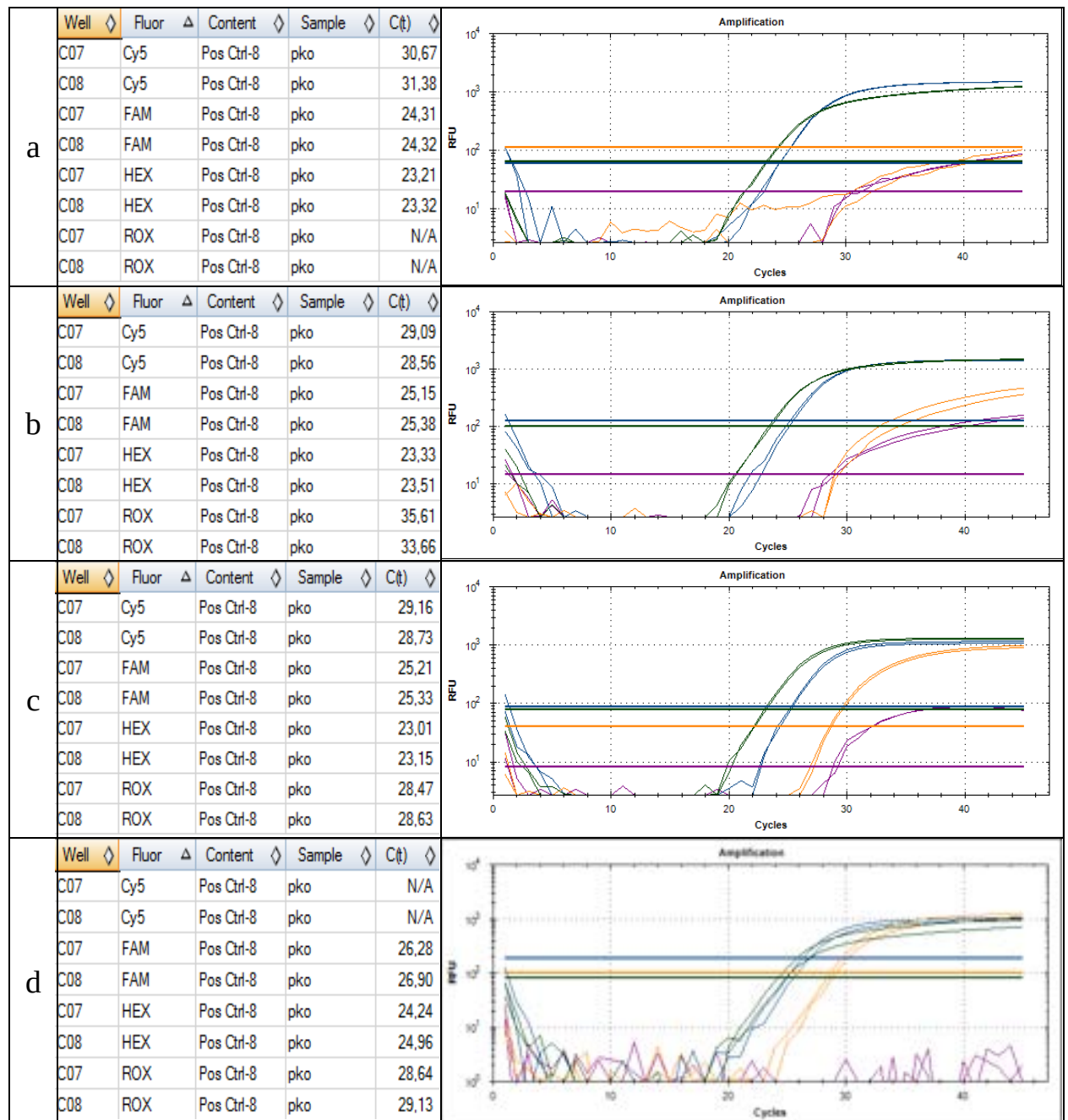


Рис. 3.40. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів у системі «ГМ ріпак». (а–d) – різні температурні режими гібридизації праймерів: 50, 55, 60 та 65°C відповідно.

Під час оптимізації роботи тест-системи «ГМ ріпак 2» найкращі результати було отримано також за температури 60°C (рис. 3.41 с). Слід зазначити, що хороші результати було отримано за $T_a=55^\circ\text{C}$, де значення

ΔR_n за всіма трьома каналами майже не відрізнялися (≈ 1000 rfu). Що стосується показника C_t , то за каналам HEX він був трохи кращий при $T_a=55^\circ\text{C}$, за каналом FAM набагато кращий при $T_a=60^\circ\text{C}$ та майже не відрізнявся за каналом ROX.

Таким чином, проведені дослідження з оптимізації умов ампліфікації за температурою гібридизації праймерів показали, що найбільш оптимальною температурою, за якою ефективно працювали всі чотири сформовані мультиплексні тест-системи, є 60°C .

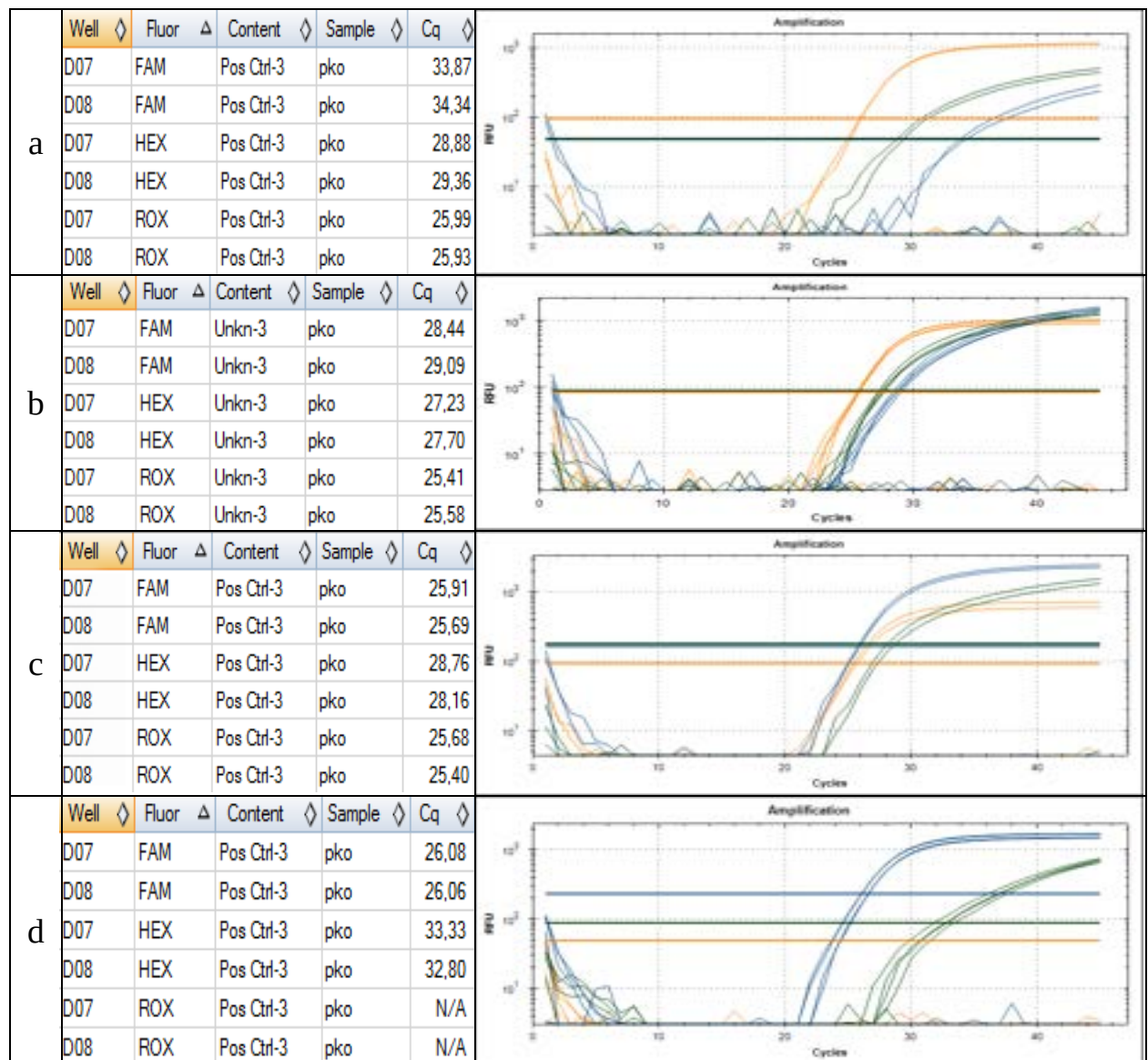


Рис. 3.41. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ піз час підбору оптимальної температури гібридизації праймерів у системі «ГМ ріпак 2». (а–d) – різні температурні режими гібридизації праймерів: 50, 55, 60 та 65°C відповідно.

Відомо, що концентрація йонів магнію (Mg^{2+}) у реакційній суміші

істотно впливає як на якісний, так і на кількісний вихід ПЛР-продукту. Йони Mg^{2+} утворюють розчинні комплекси з дезоксинуклеотидтрифосфатами (дНТФ), формуючи субстрат для ДНК-полімерази. Вільні йони Mg^{2+} суттєво збільшують температуру плавлення дволанцюгової ДНК, тому підвищена концентрація $MgCl_2$ збільшує ймовірність неспецифічної гібридизації праймерів. Для проведення ПЛР у реальному часі рекомендують використовувати концентрацію $MgCl_2$ в межах від 1 до 6 мМ. Найчастіше використовують концентрацію $MgCl_2$ 2 мМ за сумарної концентрації дНТФ приюлизно 0,2 мМ. У зв'язку з цим для оптимізації умов ампліфікації за різною концентрацією $MgCl_2$ було обрано шість точок – 1; 1,5; 2; 2,5; 3 і 4 мМ. Найкращою вважали ту концентрацію $MgCl_2$, за якої спостерігали найменше значення C_t та найбільше значення ΔR_n . Оптимізацію умов ампліфікації за концентрацією $MgCl_2$ проводили за всіма каналами флуоресценції для всіх п'яти мультиплексів.

На рисунку 3.42 а-с наведено приклад з оптимізації умов ампліфікації за концентрацією йонів Mg^{2+} для тест-системи «ГМО соя». Так, за каналом FAM, що відповідає промотору P-35S, найменше середнє значення C_t було отримано за концентрації $MgCl_2$ 3мМ та становило 26,46. За каналами HEX (*Lec1*) і ROX (T-nos) найменші середні значення C_t також було отримано за цієї концентрації і вони становили 26,18 та 26,14 відповідно. При цьому треба зазначити, що значення величин ΔR_n майже не різнялися в інтервалі концентрацій $MgCl_2$ від 2,5 до 4 мМ.

Схожі результати було отримано під час дослідження інших чотирьох мультиплексних тест-систем. Таким чином, експериментальним шляхом було встановлено, що найбільш оптимальною концентрацією $MgCl_2$ для проведення ПЛР розробленої серії тест-систем є 3 мМ.

Наступним етапом оптимізації умов ампліфікації був підбір оптимальної концентрації та співвідношення праймерів і зондів. Таблиця 3.45 та рисунок 3.43 демонструють результати, які було отримано під час апробації мультиплексів за цими параметрами.

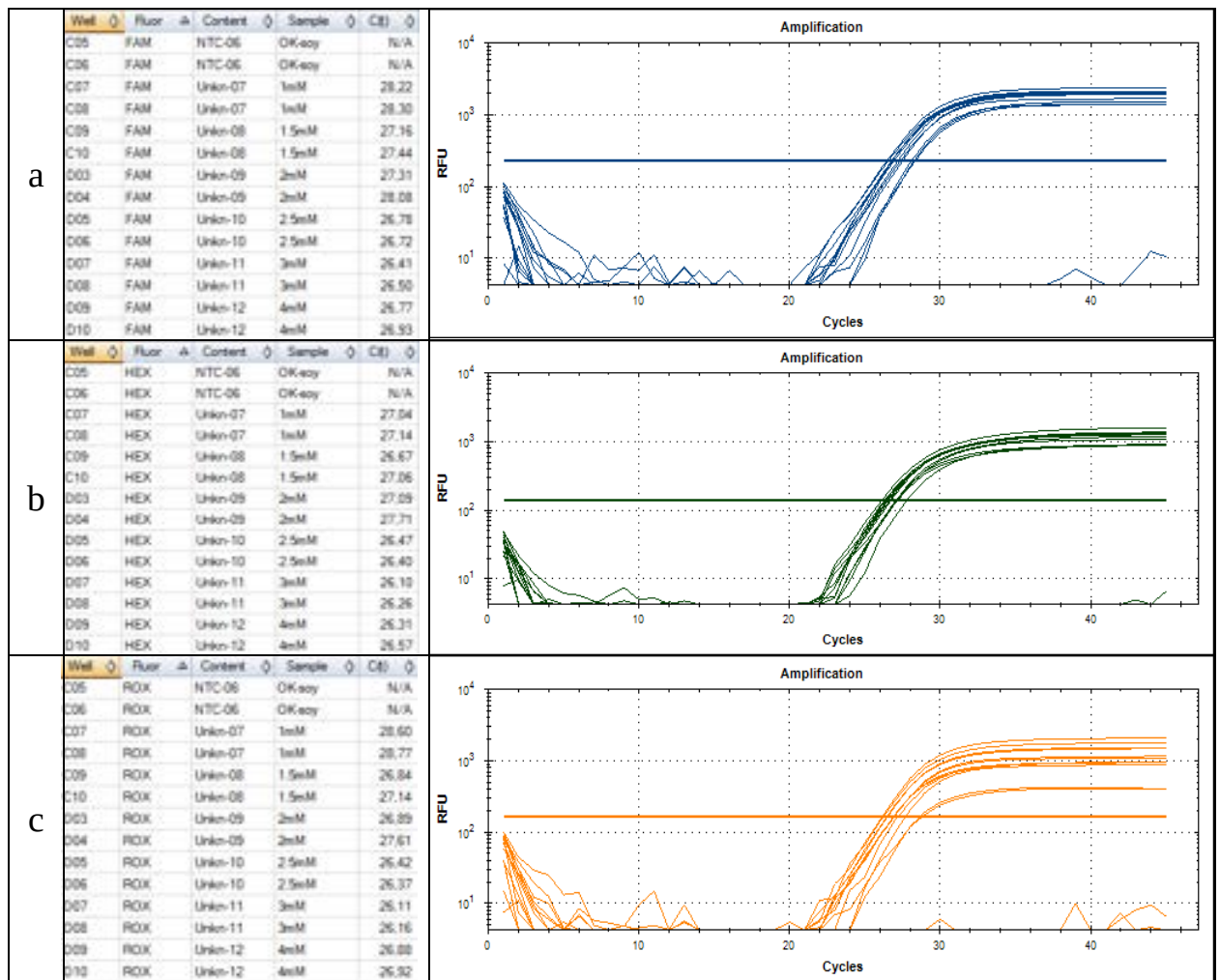


Рис. 3.42. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час оптимізації умов ампліфікації за концентрацією йонів Mg^{2+} . (а-с) – канали флуоресценції FAM, HEX та ROX відповідно.

Аналіз літературних джерел свідчить, що діапазон застосування концентрацій праймерів лежить у межах від 0,1 до 1 мкМ. Однак у більшості випадків оптимальна концентрація праймерів становить 0,2–0,5 мкМ. Підвищення концентрації праймерів збільшує ймовірність появи неспецифічних продуктів ампліфікації, тимчасом її зменшення призводить до утворення меншої кількості продукту реакції. Висока концентрація праймерів може також призводити до утворення «праймер-димерів».

Постачання олігонуклеотидних праймерів виробником зазвичай здійснюється в кількостях, що вимірюються в оптичних одиницях (OD) у ліофілізованому або розчиненому вигляді. Для розрахунку робочих концентрацій праймерів величину OD переводять в мкМ або пкмоль [534].

Визначають концентрацію праймера виходячи з того, що 1 OD олігонуклеотиду відповідає концентрації 37 мкг/мл. Визначення концентрації праймера (C) в мкМ здійснюють у наступний спосіб:

$$C \text{ (мкМ)} = (37 \times B \times 1000) / (330 \times A) \quad (3.3), \text{ де}$$

A – довжина праймера в п.н., B – кількість праймера в OD, виміряне за A_{260} .

Другий підхід полягає у визначенні кількості праймера, що береться в реакцію (D), в пкмоль. У цьому випадку розрахунок здійснюють наступним чином:

$$D \text{ (пкмоль)} = B / (0,01 \times A) \quad (3.4), \text{ де}$$

D – кількість праймера, що міститься в 1 мкл розчину, A – довжина праймера в п.н., B – кількість праймера в OD, виміряне за A_{260} .

Таблиця 3.45

Оптимізація умов ампліфікації за кількістю та співвідношенням праймерів і зонді

Праймера		пкмоль / реакцію			
Зонд		2,5	5	10	20
пкмоль / реакцію	2,5	44,06/35,08	-	35,89/28,36	-
	5	-	37,55/28,85	35,56/27,38	-
	7,5	-	-	35,44/27,50	-
	10	-	-	35,06/27,96	-
	20	-	-	-	35,09/26,75

Примітка: Наведено значення величини C_t , котрі були отримані для зразків ДНК з вмістом ГМО 0,1 та 10 %.

Для визначення оптимальної концентрації праймерів та зондів у мультиплексній реакції нами обрано чотири точки – 2,5; 5, 10 та 20 пкмоль/реакцію. Нижче наведено результати, які було отримано для каналу FAM, що відповідає промотору P-35S тест-системи «ГМО соя» (табл. 3.34). ПЛР-РЧ проводили за використання ДНК, ізольованої зі стандартних зразків біотехнологічної сої лінії GTS40-3-2 з вмістом ГМО 0,1 та 10 %. Найбільші середні значення C_t було отримано з кількістю праймерів та зонду 2,5 пкмоль/реакцію (44,07 – 0,1 %; 35,08 – 10 %). Найменші та практично однакові значення з кількістю 10 (35,07 – 0,1 %; 27,96 – 10 %) та 20 пкмоль/реакцію (35,09 – 0,1 %; 26,76 – 10 %). Значення величин ΔR_n при

цьому коливалися від 200 rfu для 2,5 пкмоль/реакцію до 6000 rfu для 20 пкмоль/реакцію (рис. 3.43 а). З огляду на те, що суттєвих змін у значеннях C_t за кількістю праймерів, вищих ніж 10 пкмоль/реакцію не спостерігали, цю величину ми обрали для подальших досліджень.

Щоб визначити оптимальну величину співвідношення праймерів і зондів, було обрано ще три точки – 2,5; 5 та 7,5 пкмоль/реакцію зонду. При цьому кількість обох праймерів становила 10 пкмоль/реакцію. Найкращий результат було отримано з кількостями зондів 5 (35,57 – 0,1 %; 27,38 – 10 %) та 7,5 пкмоль/реакцію (35,45 – 0,1 %; 27,51 – 10 %). Значення величин ΔR_n для них коливалися від 2000 до 3000 rfu (рис. 3.43 b).

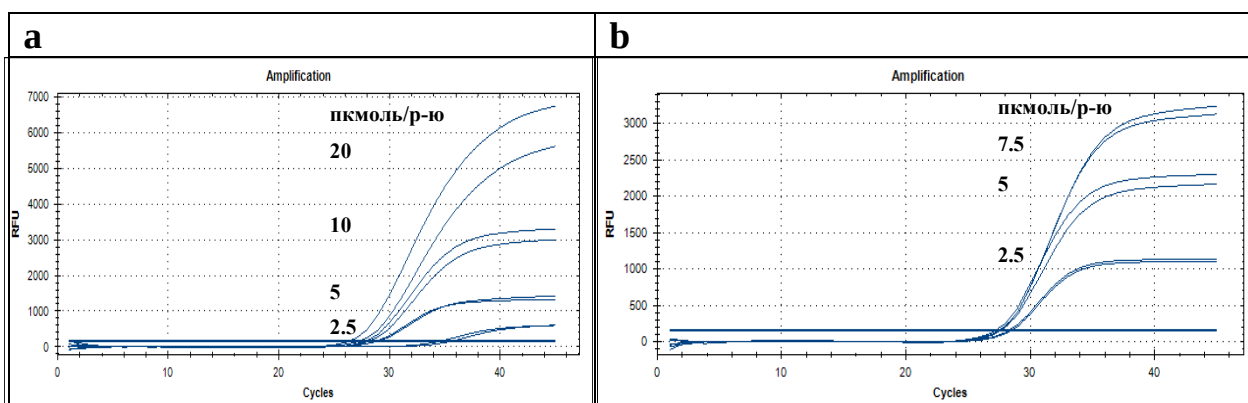


Рис. 3.43. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час оптимізації умов ампліфікації за концентрацією та співвідношенням праймерів і зондів: а – різні кількості праймерів, б – різні кількості зондів.

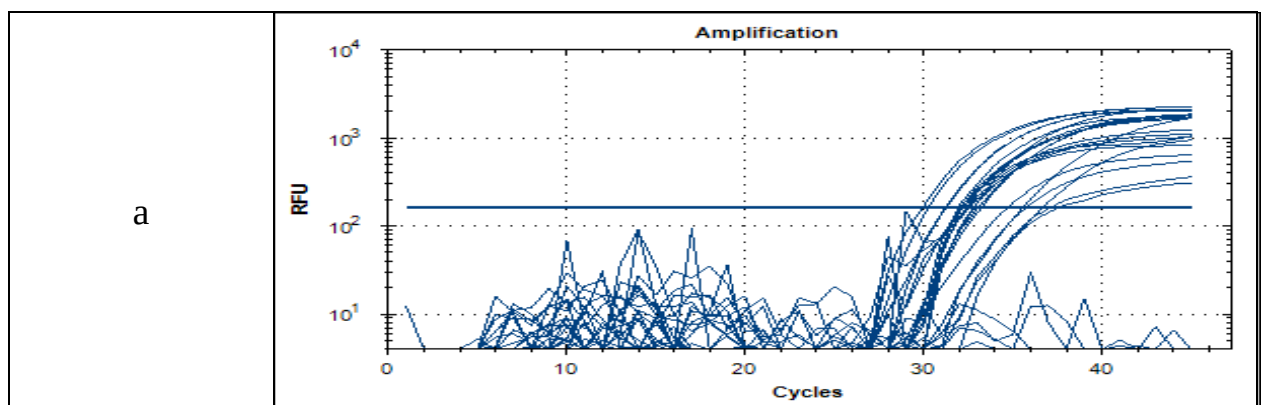
Враховуючи вплив концентрації олігонуклеотидів на чутливість роботи тест-системи та беручи до уваги економічну складову (собівартість кінцевого продукту), за результатами проведених досліджень встановили наступну формулу: 10 пкмоль/реакцію прямого (forward) праймера + 10 пкмоль/реакцію зворотного (reverse) праймера + 5 пкмоль/реакцію зонду (probe). В перерахунку на мкМ концентрація праймерів та зондів становить 0,2 та 0,1 мкМ відповідно.

Таким чином, проведення серії реакцій з різними комбінаціями концентрацій праймерів і зондів у межах від 2,5 до 20 пкмоль/реакцію дало змогу досягти мінімальної величини C_t і максимального значення ΔR_n за постійної концентрації матриці-мішені. Найбільш оптимальними величинами

виявились 10 пкМ для праймерів та 5 пкМ для зондів.

3.3.3.9. Дослідження специфічності та ефективності роботи тест-систем

Специфічність роботи сформованих тест-систем перевіряли методом ПЛР у реальному часі за використання ДНК, отриманої із сертифікованого референтного матеріалу (табл. 3.46) та традиційних організмів. Зразки ДНК були ізольовані із трьох ліній біотехнологічної сої (GTS40-3-2, A2704-12, MON89788), дев'яти ліній кукурудзи (Bt11, Bt176, MON810, MON863, NK603, GA21, T-25, Mir162, Mir604), чотирьох ліній ріпаку (GT73, GS40/90, MS8xRf3, Оху235), генно-модифікованого рису (LL 62) та цукрового буряку (H7-1). Також для тестування було використано ДНК традиційних організмів, зокрема рису (*Oryza sativa*), жита (*Secale cereal*), пшениці (*Triticum aestivum*), ячменю (*Hordeum vulgare*), вівса (*Avena sativa*), гречки (*Fagopyrum esculentum*), томатів (*Lycopersican esculentum*), картоплі (*Solanum tuberosum*), ріпаку (*Brassica napus*), кукурудзи (*Zea mays*), лосося (*Salmo salar*), курки (*Gallus gallus*), яловичини (*Bos taurus*), свинини (*Sus domesticus*), людини (*Homo sapiens*). Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. На рисунку 3.44 а-с наведено результати ампліфікації щодо визначення специфічності на прикладі праймерів P35S2, Tnos2 і Lec1, що входять до складу тест-системи «ГМО соя». Отримані результати (табл. 3.35) свідчать, що всі досліджені праймери мають 100 % специфічність до обраних мішеней.



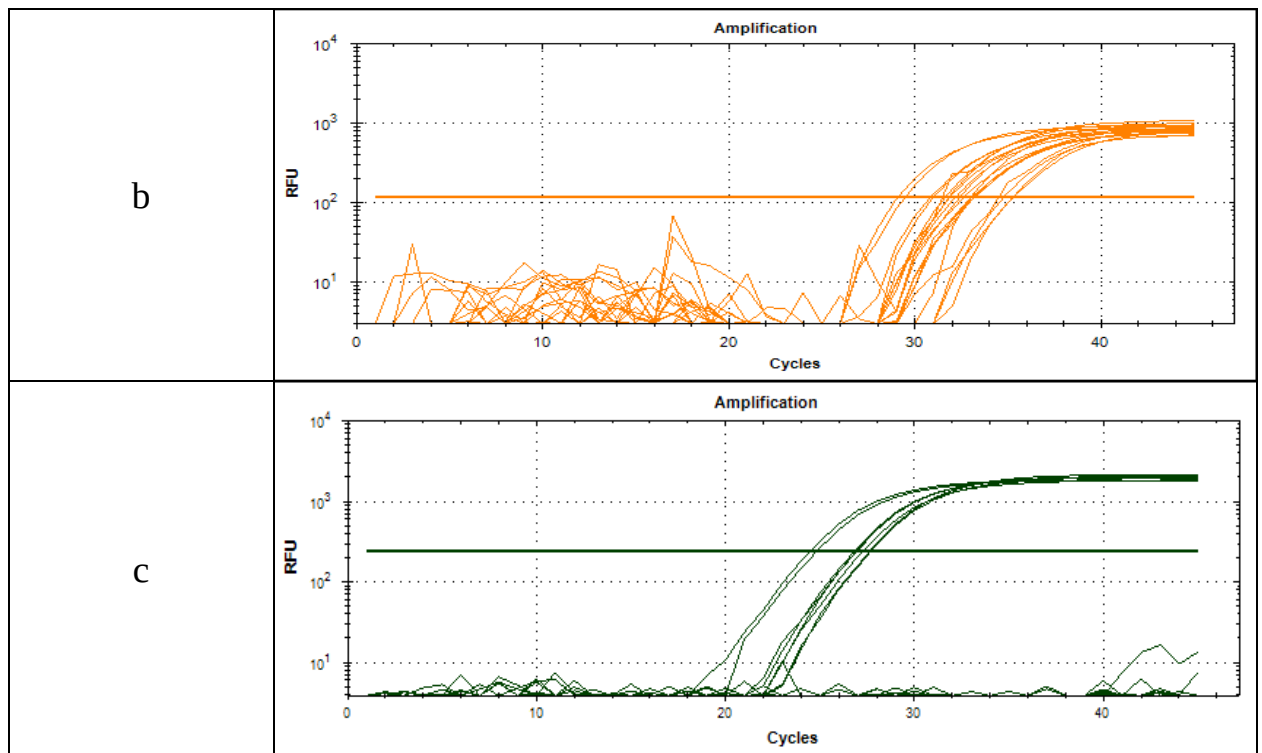


Рис. 3.44. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час визначення специфічності праймерів (P35S2, Tnos2 і Lec1) до регуляторних елементів P-35S (а) та T-nos (б), а також гена *lel* сої (в). Використано ДНК біотехнологічних та традиційних культур сої, кукурудзи, ріпаку, рису та цукрового буряку, а також ряду інших організмів.

Ефективність перебігу ПЛР у форматі мультиплексу також перевіряли методом побудови стандартної кривої. Для цього було використано серії десятикратних розведень препаратів ДНК, отриманих із стандартних референтних зразків таких культур як соя (*Glycine max*), кукурудза (*Zéa máys*) та ріпак (*Brássica nápus*). Чотири розведення кожного із зразків, що аналізувався, було протестовано в двох повторностях. Наступним кроком була побудова калібрувального графіку в координатах Ct/log. По осі "y" відкладають значення граничних циклів (Ct), по осі "x" – логарифми відносних концентрацій ДНК (копій геномів на реакцію). У цьому випадку ефективність ПЛР залежить тільки від кута нахилу кривої, тому абсолютні значення концентрації ДНК непотрібні [241]. На рисунку 3.45 наведено приклад розрахунку ефективності ПЛР з використанням програмного забезпечення Bio-Rad CFX Manager (Version 1.6.541.1028). Наведено дані щодо % ефективності ПЛР (E), достовірності апроксимації (R^2) та кута

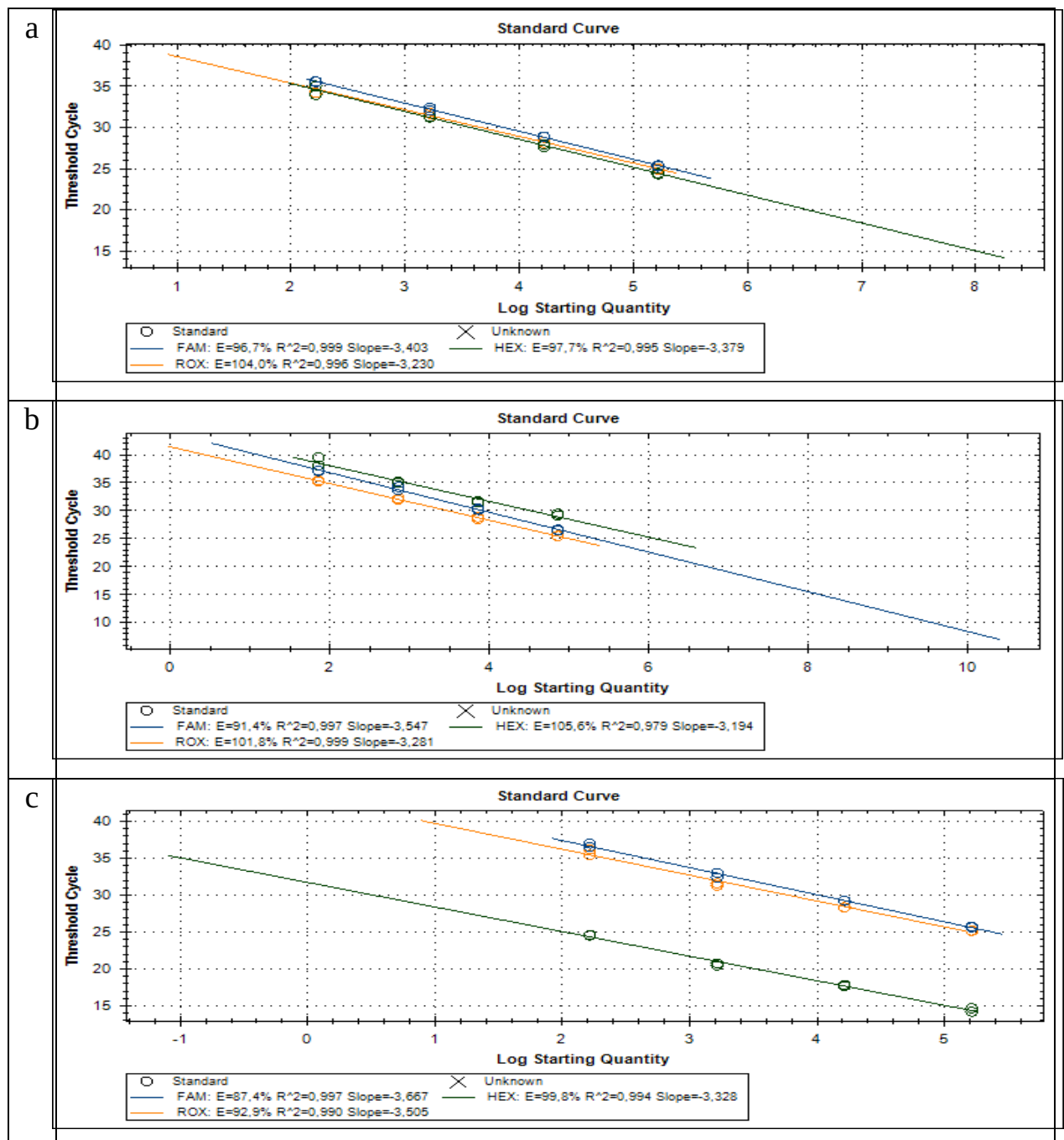
нахилу кінетичної кривої (α/slope).

Таблиця 3.46

Перевірка специфічності роботи праймерів та зондів, підібраних для визначення регуляторних послідовностей P-35S, T-nos та гена *lel* сої

№	Зразок ДНК	Середні значення Ct, σ		
		P-35S	T-nos	<i>lel</i>
1	Соя / <i>Glycine max</i> (GTS40-3-2)	31,27	29,25	27,05
2	Соя / <i>Glycine max</i> (A2704-12)	35,34	00,00	26,96
3	Соя / <i>Glycine max</i> (MON89788)	00,00	00,00	27,63
4	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (Bt11)	33,88	34,63	00,00
5	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (Bt176)	33,84	31,73	00,00
6	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (MON810)	31,46	00,00	00,00
7	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (MON863)	31,29	31,79	00,00
8	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (NK603)	30,13	34,76	00,00
9	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (GA21)	00,00	32,55	00,00
10	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (T-25)	29,21	00,00	00,00
11	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (Mir162)	00,00	32,80	00,00
12	Кукурудза / <i>Zea mays</i> (Mir604)	00,00	32,82	00,00
13	Ріпак / <i>Brassica napus</i> (GT73)	00,00	00,00	00,00
14	Ріпак / <i>Brassica napus</i> (GS40/90)	31,16	00,00	00,00
15	Ріпак / <i>Brassica napus</i> (MS8xRf3)	00,00	30,91	00,00
16	Ріпак / <i>Brassica napus</i> (Оху235)	31,04	31,68	00,00
17	Рис / <i>Oryza sativa</i> (LL 62)	30,69	00,00	00,00
18	Цукр. буряк / <i>Beta vulgaris saccharifera</i> (H7-1)	00,00	00,00	00,00
19	Соя / <i>Glycine max</i>	00,00	00,00	24,66
20	Кукурудза / <i>Zea mays</i>	00,00	00,00	00,00
21	Ріпак / <i>Brassica napus</i>	00,00	00,00	00,00
22	Рис / <i>Oryza sativa</i>	00,00	00,00	00,00
23	Цукр. буряк / <i>Beta vulgaris saccharifera</i>	00,00	00,00	00,00
24	Жито / <i>Secale cereal</i>	00,00	00,00	00,00
25	Пшениця / <i>Triticum aestivum</i>	00,00	00,00	00,00
26	Ячмінь / <i>Hordeum vulgare</i>	00,00	00,00	00,00
27	Овес / <i>Avena sativa</i>	00,00	00,00	00,00
28	Гречка / <i>Fagopyrum esculentum</i>	00,00	00,00	00,00
29	Томати / <i>Lycopersican esculentum</i>	00,00	00,00	00,00
30	Кортопля / <i>Solanum tuberosum</i>	00,00	00,00	00,00
31	Лосось / <i>Salmo salar</i>	00,00	00,00	00,00
32	Курка / <i>Gallus gallus</i>	00,00	00,00	00,00
33	ВРХ / <i>Bos taurus</i>	00,00	00,00	00,00
34	Свиня / <i>Sus domesticus</i>	00,00	00,00	00,00
35	Людина / <i>Homo sapiens</i>	00,00	00,00	00,00

Нижче наведено дані (табл. 3.47) щодо ефективності ПЛР з усіма обраними праймерами. Ефективність роботи праймерів оцінювали в мультиплексних реакціях, які відповідали розробленим тест-системам серії «ГМО скринінг». Отримані дані свідчать, 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.



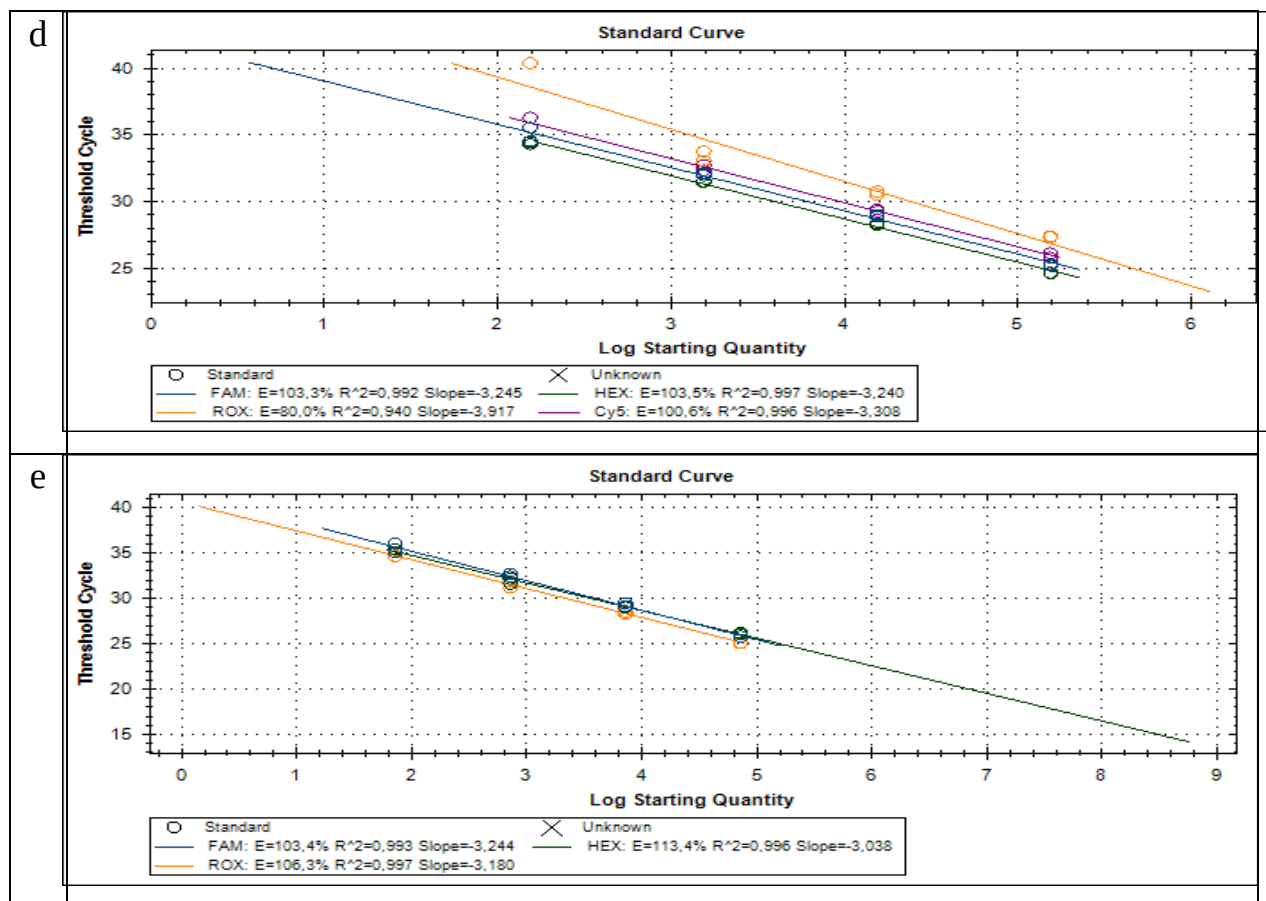


Рис. 3.45. Графіки стандартних кривих серії десятикратних розведень стандартних зразків, побудовані за результатами ПЛР у реальному часі для тест-систем «ГМО соя» (а), «ГМО кукурудза» (б), «ГМ рослина» (с), «ГМ ріпак» (д), «ГМ ріпак 2» (е).

Таблиця 3.47

Дані щодо оцінювання ефективності проведення ПЛР з усіма обраними олігонуклеотидними праймерами та зондами в системі мультиплексу

№	Назва	Е, %	R ²	α
1	P35S2	87,4 – 96,7	0,997 – 0,999	-3,667 – -3,403
2	Tnos2	92,9 – 104,0	0,990 – 0,999	-3,505 – -3,230
3	Epsps2	103,3	0,992	-3,245
4	Bar1	80,0	0,940	-3,917
5	Bay2	106,3	0,997	-3,180
6	Bxn2	103,4	0,993	-3,244
7	Lec1	97,7	0,995	-3,379
8	Adh1	105,6	0,979	-3,194
9	Psb2	99,8	0,994	-3,328
10	Cru1	103,5 – 113,4	0,996 – 0,997	-3,240 – -3,038

Таким чином праймери, що ми взяли до складу тест-систем серії «ГМО скринінг», забезпечують високу ефективність проведення ПЛР у

реальному часі.

3.3.3.10. Конструювання генно-інженерних позитивних контролів та визначення аналітичної чутливості розроблених тест-систем

Для проведення будь-якого різновиду ПЛР необхідна наявність позитивних контролів. Так само для здійснення кількісного аналізу за використання ПЛР-РЧ, для визначення вихідної кількості матриці необхідними є позитивні стандарти, які містять відому концентрацію ДНК [535]. Сьогодні відомі ПЛР-стандарти, що використовуються у медицині для кількісного оцінювання вмісту вакцинних штамів різних вірусів (кору, краснухи, паротиту) [536]; оцінювання вірусного навантаження цитомегаловірусу, вірусів герпесу людини 6 типу, гепатиту та СНІДу [537,538]; визначення кількості антигенів під час культивування певних вірусів *in vitro* у культурах клітин [539]. Також розроблено стандартні зразки для визначення кількісного вмісту ГМО у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині [540].

Існує декілька підходів для отримання позитивних контролів або позитивних стандартних зразків. Це може бути застосування ДНК або РНК ідентичного дослідного матеріалу, безпосереднє використання амплікону після проведення ПЛР або отримання генно-інженерного конструкту з клонованим у плазмідний вектор ПЛР-продуктом [238,541]. Останній метод заслуговує особливої уваги, оскільки дає змогу отримувати довготривалі та стабільні продуценти позитивних стандартних зразків.

У зв'язку з цим наступним етапом роботи було створення низки продуцентів позитивних контролів шляхом отримання рекомбінантної плазмідної ДНК та трансформацію нею клітин *E. coli*.

Всього було створено п'ять рекомбінантних молекул ДНК. Це рекомбінантні плазмідні р35S та рNOS, в які було клоновано фрагменти послідовностей промотора вірусу CaMV та термінатора з *Agrobacterium*

tumefaciens. Та ще три – pPat-Bar, pBay, pVxp, з клонованими фрагментами генів *pat/bar*, *bay TE* та *bxp* відповідно. У таблиці 3.48 наведено послідовності праймерів, які ми використали для напрацювання фрагментів-мішеней для клонування. Розміри отриманих продуктів наведено в п.н. Як Т-вектор для клонування було використано плазмиду pBluescript II SK(+) («Stratagene», США).

Таблиця 3.48

Перелік праймерів, використаних під час конструювання генно-інженерних позитивних контролів

№	Назва	Послідовність 3'→5'	GC-склад (%)	Tm (°C)	Розмір п.н.
1	CP35S-F CP35S-R	gcc tct gcc gac agt ggt aag acg tgg ttg gaa cgt ctt c	67 50	67 66	82
2	CPNOS-F CPNOS-R	gaa tcc tgt tgc cgg tct tg tta tcc tag ttt gcg cgc ta	55 45	64 61	180
3	CPPtBr-F CPPtBr-R	cct tcg caa gac cct tcc tct ata aga tca tca atc cac tct tgt ggt g	50 44	66 65	172
4	CPBTE-F CPBTE -R	cac ctt tgc cat cag atc tta tga g agt gta gcc tcc tgc atg tga tt	44 48	64 66	87
5	CPBXN-F CPBXN-R	att tcc cga att gtg gat tcc aat ggt agg gtt tcg gtt tgg	43 48	62 64	72

Об'єм реакційної суміші для напрацювання фрагментів ДНК під клонування становив 100 мкл та містив 1x Taq-буфер (75 мМ Tris-HCl (pH 8,8); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 0,2 мМ дНТФ суміш; 2,5 мМ MgCl₂; 20 пкмоль кожного з праймерів; 1 од. Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) та 400 нг ДНК. Умови ампліфікації наведено у таблиці 3.49.

Стандартні процедури з проведення електрофорезу, очищення ПЛР-продуктів з гелю, клонування у вектор Т-pBluescript II SK(+) та проведення процедури трансформації описано у підрозділі 2.7 розділу «Матеріали і методи досліджень». Для трансформації отриманими рекомбінантними плазмідами було використано штам *Escherichia coli* DH5. На твердому живильному середовищі LB з ампіциліном, IPTG та X-Gal бактерії утворювали округлі гладкі колонії діаметром від 1,5 до 3,0 мм. Для пошуку рекомбінантів використовували «біло-блакитну» селекцію. Білі бактеріальні

колонії відбирали, пересівали в рідке живильне середовище LB з ампіциліном та інкубували упродовж ночі. Нічну культуру використовували для виділення плазмідної ДНК. Пошук та перевірку рекомбінантних плазмідних ДНК здійснювали шляхом ПЛР та рестрикційного аналізу (рис. 3.46).

Таблиця 3.49

Протокол проведення ПЛР аналізу, що використовувався для напрацювання фрагментів ДНК під клонування

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	35х
3		Гібридизація	55-65	60	
		Синтез	72	30	

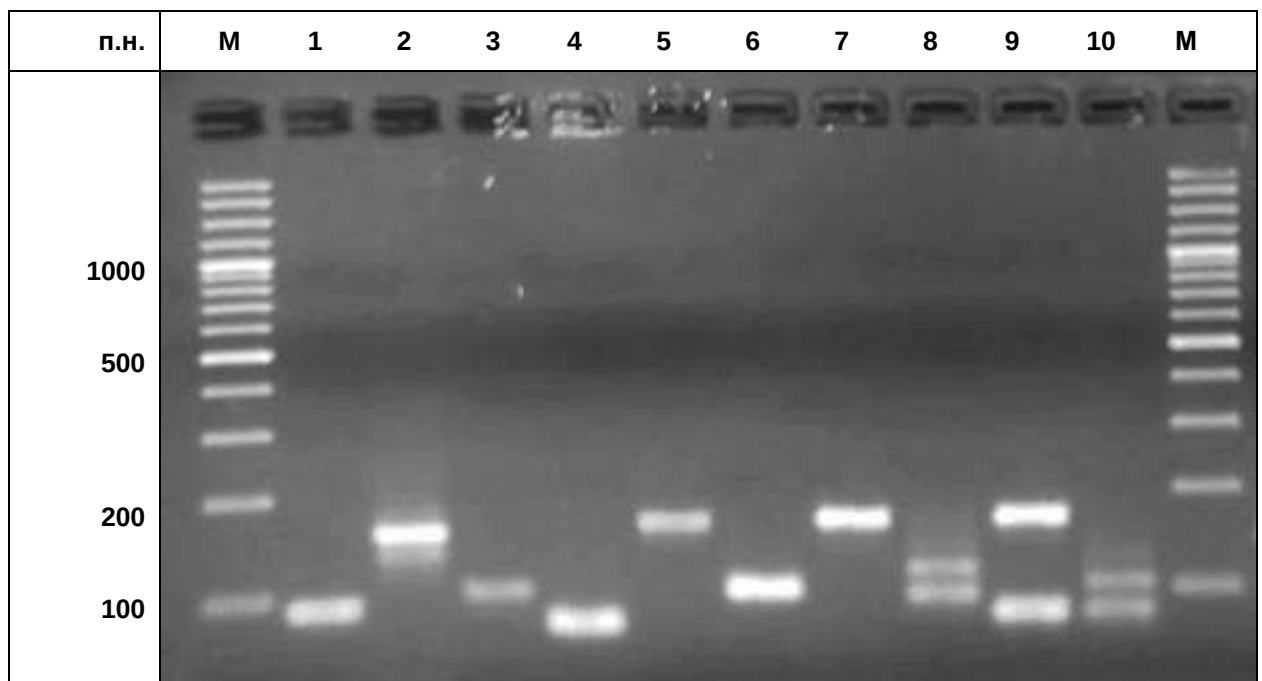


Рис. 3.46. Електрофореграма продуктів ампліфікації рекомбінантних клонів у 2% агарозному гелі. (М) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Літва).

Концентрацію отриманих рекомбінантів визначали методом спектрофотометрії для подальшого перерахунку в геном-еквіваленти (ГЕ) на 1 мл. Співвідношення показників $A_{260/280}$ знаходилося у межах 1,8–2,0, що

свідчило про чистоту отриманих препаратів ДНК. Наступним етапом було приготування десятикратних розведень плазмідної ДНК. Для кожної рекомбінантної плазмиди було приготовлено по п'ять точок у діапазоні концентрацій від $n \times 10^5$ до $n \times 10^1$ ГЕ/мл.

Отримані розведення було використано для визначення аналітичної чутливості розроблених тест-систем, а самі рекомбінантні плазмиди – як позитивні контролю у деяких із них. Для визначення аналітичної чутливості тест-систем було також використано ДНК, ізольовану із сертифікованого референтного матеріалу, зокрема сої лінії GTS40-3-2, кукурудзи Mon810 та ріпаку GT73 в тих самих розведеннях. Кожен зразок ДНК аналізували у 10 повторностях. На підставі отриманих даних (наявність-відсутність сигналу) нами визначено аналітичну чутливість тест-систем (табл. 3.50).

Таблиця 3.50

Аналітична чутливість тест-систем за використання десятикратних розведень плазмідної та геномної ДНК (ГЕ/мл) з сертифікованого референтного матеріалу

Розведення Мішені	$n \times 10^5$	$n \times 10^4$	$n \times 10^3$	$n \times 10^2$	$n \times 10^1$
P-35S	10	10	10	10	10
T-nos	10	10	10	10	10
CP4-epsps	10	10	10	9	4
Pat/Bar	10	10	10	10	10
Bay TE	10	10	10	10	9
Bxn	10	10	10	10	9
Le1	10	10	10	10	7
Adh1	10	10	10	10	5
CruA	10	10	10	10	8

Аналіз чутливості тест –систем, наведений у таблиці 3.50, засвідчує, що межа їх коливається в межах від $n \times 10^1$ до $n \times 10^2$ ГЕ/мл. Це стосується як тест-систем укомплектованих позитивними контрольними зразками (ПКЗ) на

основі плазмідної ДНК, так і геномної ДНК, отриманої із референтного матеріалу.

3.3.3.11. Комплектація тест-систем серії «ГМО скринінг»

Тест-системи серії «ГМО скринінг» дають змогу провести повний якісний аналіз зразку на присутність ГМО. У тест-системах цієї серії одночасно виявляються регуляторні послідовності (промотор 35S і термінатор NOS), специфічні для широкого кола біотехнологічних культур або найбільш поширені гени-мішені генно-інженерних конструкцій (*cp4 epsps*, *pat*, *bar*) та рослинні гени як ендogenousний контроль перебігу ПЛР-РЧ і перевірки наявності рослинної ДНК. Це особливо важливо для високорафінованих продуктів та продуктів, що зазнали сильної теплової або хімічної обробки.

Перелік розроблених тест-систем серії «ГМО скринінг» складається з п'ятих діагностикумів для визначення ГМО сої, кукурудзи та ріпаку за регуляторними елементами. Також розроблено універсальну тест-систему «ГМ рослина» для визначення ГМО в багатокомпонентних зразках з невідомим складом. Всі тест-системи виконано у форматі мультиплексу та всі вони містять внутрішній ендogenousний контроль перебігу ПЛР. Тест-системи виробляються у двох виконаннях – на 50 та 100 реакцій (табл. 3.51). Розроблені діагностикуми характеризуються 100 % специфічністю, з межею детектування не менш ніж 0,01 %.

Комплектацію серії тест-систем «ГМО скринінг» виконано відповідно до вимог до ПЛР-тест-систем та відповідно до інформації, наведеної у технічних умовах ТУ У 24.6-02568182-001:2011 (табл. 3.52, 3.53) [542]. До складу кожного ПЛР-набору входять суміш для проведення ПЛР у реальному часі, Taq ДНК-полімераза, позитивний (ПКЗ) та негативний (НКЗ) контрольні зразки. Позитивний контрольний зразок представляє собою відповідну суміш розчинів плазмідної та геномної ДНК.

Таблиця 3.51

Перелік розроблених тест-систем серії «ГМО скринінг», що виробляються в ДП «Укрметртестстандарт» станом на початок 2019 р.

Кат. №	Назва	Кількість реакцій
GMO/SS-1-50	ГМО соя (p35S/tNOS скринінг)	50
GMO/SS-1-100		100
GMO/SM-2-50	ГМО кукурудза (p35S/tNOS скринінг)	50
GMO/SM-2-100		100
GMO/SP-3-50	ГМ рослина (p35S/tNOS скринінг)	50
GMO/SP-3-100		100
GMO/SC-4-50	ГМ ріпак (CP4 epsps/Pat-Bar/tNos скринінг)	50
GMO/SC-4-100		100
GMO/SC-5-50	ГМ ріпак 2 (Bay/Vхп скринінг)	50
GMO/SC-5-100		100

Таблиця 3.52

Приклад комплектації тест-систем серії «ГМО скринінг»

Складова частина	Зовнішній вигляд	pH
ПЛР-РЧ суміш	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
Тақ-полімераза	Прозора безбарвна рідина	від 7,5 до 8,5
НКЗ (-)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
ПКЗ (+)	Прозора безбарвна	від 5,0 до 7,5

Таблиця 3.53

Вимоги щодо метрологічних показників тест-систем

Назва показника	Норма
Чутливість	Межа відносної чутливості становить 0,1 %
Специфічність	Специфічність - 100% при тестуванні панелі сертифікованих стандартних зразків CRM з IRMM, що містили від $\leq 0,02$ до 5 або 10% відповідного генетично модифікованого матеріалу
Достовірність	Тест-система повинна виявляти специфічну послідовність для регуляторного елементу або гену у концентрації $\geq 0,1$ %

3.3.4. Розроблення та виробництво тест-систем серії «ГМО ідентифікація»

Обов'язкове маркування харчової продукції, що вироблена з ГМО або містить у своєму складі ГМО, діє в країнах ЄС з 1997 року. Тим не менш, Інструкція (ЄС) 1830/2003 посилила існуючі правила маркування харчової продукції, виготовленої за використання ГМО. Необхідність маркування було поширено на всі типи харчових продуктів і кормів незалежно від наявності чи відсутності в них ГМО, і поняття простежування було визначено як можливість простежити ГМО і продукти, вироблені за їх участі на всіх етапах розміщення на ринку мережею виробників або дистриб'ютерів.

Таким чином з'явилася необхідність у розробленні методів, що дають змогу виявляти не тільки присутність будь-якого випадкового ГМО (скринінговий аналіз), але й методів ідентифікації специфічних ГМО за трансформаційною подією (визначення лінії), а також оцінювання кількісного вмісту ГМО в різних інгредієнтах харчового продукту.

Для ідентифікації специфічної генетичної конструкції, вбудованої в

геном рослини, використовують праймери, специфічні для цієї генетичної конструкції. Це високоспецифічний підхід, і виявлення рекомбінантної ДНК за його допомогою однозначно засвідчує той факт, що даний продукт було виготовлено за використання генно-інженерних технологій. Однак варто враховувати, що ту саму конструкцію може бути використано для трансформації різних рослин. Так, наприклад, генетична конструкція pV-ZMVKO7 присутня у геномі кукурудзи ліній MON 809 і MON 810, а pV-ZMGT10 – у лініях MON 809 і MON 832 [541].

Виявлення конкретної трансформаційної події (ГМ-лінії) передбачає ампліфікацію послідовності ДНК, що включає як послідовність ДНК вбудованої генно-інженерної конструкції, так і ДНК самої рослини (рис. 4.3). У країнах ЄС і РФ уніфіковано та затверджено методи, основані на ПЛР, які дають змогу ідентифікувати і здійснювати контроль за всіма зареєстрованими та дозволеними для використання у харчовій промисловості і реалізації населенню ГМО. Оскільки в Україні сьогодні відсутні зареєстровані і дозволені до використання ГМ-лінії (виняток – шрот для виробництва кормів, отриманий із сої лінії GTS 40-3-2, термін реєстрації до 22.07.18) [543], а розроблення діагностиків під відомі біотехнологічні культури не представляється можливим, завданням було розробити тест-системи, які дозволяють ідентифікувати ГМ-культури, що найчастіше зустрічаються на світовому продовольчому ринку.

3.3.4.1. Визначення ДНК-маркерів для проведення аналізу з ідентифікації біотехнологічних сільськогосподарських культур за трансформаційними подіями

Розроблена панель тест-систем для ідентифікації певних біотехнологічних ліній рослин орієнтована на визначення трансформаційних подій. Кожну тест-систему виконано у форматі мультиплексу, що дозволяє одночасне проведення двох незалежних ПЛР. Одна реакція направлена на

виявлення відповідної трансформаційної події, інша виступає внутрішнім ендогенним контролем перебігу ампліфікації. Загальна кількість тест-систем становить 31 найменування (табл. 3.54). За допомогою розроблених тест-систем можна виявляти 5 ліній біотехнологічної сої, 14 ліній кукурудзи, 8 ліній ріпаку, 1 лінію рису, 1 лінію цукрового буряку. До цієї панелі входять також діагностикуми, які уможливають видову ідентифікацію рослинних компонентів, що входять до складу готової харчової продукції, і виявляти такі рослини як сою, кукурудзу, ріпак, пшеницю, рис, томати, картоплю та цукровий буряк. Для запобігання отриманню хибно-позитивних результатів під час проведення скринінгових аналізів за регуляторними елементами ми розробили тест-систему для ідентифікації природного вірусу CaMV та бактерії *Agrobacterium tumefaciens*.

Таблиця 3.54

Панель тест-систем для ідентифікації ліній ГМ рослин та видової ідентифікації сільськогосподарських культур, вірусів і бактерій

№	Назва тест-системи	№	Назва тест-системи
виконання – ідентифікація ГМ сої			
1	Соя лінія GTS40-3-2	4	Соя лінія A5547-127
2	Соя лінія MON89788	5	Соя лінія DP356043
3	Соя лінія A2704-12		
виконання – ідентифікація ГМ кукурудзи			
1	Кукурудза лінія MON810	8	Кукурудза лінія T1507
2	Кукурудза лінія MON863	9	Кукурудза лінія MIR162
3	Кукурудза лінія BT176	10	Кукурудза лінія MIR604
4	Кукурудза лінія BT11	11	Кукурудза лінія DAS-59122-7
5	Кукурудза лінія GA21	12	Кукурудза лінія MON87460
6	Кукурудза лінія NK603	13	Кукурудза лінія MON88017
7	Кукурудза лінія T25	14	Кукурудза лінія MON89034
виконання – ідентифікація ГМ ріпаку			
1	Ріпак лінія RF1	5	Ріпак лінія MS8
2	Ріпак лінія RF2	6	Ріпак лінія RT73
3	Ріпак лінія RF3	7	Ріпак лінія T45
4	Ріпак лінія MS1	8	Ріпак лінія HCN92
виконання – ідентифікація інших ГМ культур			
1	Рис лінія LLRICE62	3	Цукровий буряк лінія H7-1
виконання – ідентифікація видова рослин			
1	Соя / кукурудза / ріпак	3	Рис / пшениця
2	Цукровий буряк / томати / картопля	4	Вірус CaMV / бактерія <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Як зазначалось вище, в більшості випадків доступ до інформації щодо нуклеотидних послідовностей генно-інженерних конструкцій, які були використані під час створення біотехнологічних культур, є обмеженим, і права на її використання належать компаніям-розробникам та виробникам. Тому не завжди є можливість самостійного підбору ДНК-маркерів для визначення тієї чи іншої трансформаційної події, відтак, ГМ-лінії.

Під час розроблення мультиплексних ПЛР тест-систем для ідентифікації біотехнологічних сільськогосподарських культур за трансформаційними подіями було використано базу даних Об'єднаного наукового центру Європейського Союзу [520].

3.3.4.2. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації ліній ГМ сої

Трансгенну сою лінії GTS 40-3-2 (Roundup Ready®) було розроблено фірмою Монсанта (Monsanto Canada Inc.) з метою використання гербіциду гліфосату (Roundup®) як альтернативної системи боротьби з бур'янами за промислового вирощування сої. Створення лінії GTS 40-3-2 базується на технології рекомбінантних ДНК і здійснено шляхом введення гена толерантної до гліфосату форми фермента 5-енолпірувілшікімат-3-фосфат синтази (EPSPS), виділеного зі штаму CP4 *Agrobacterium tumefaciens*, у комерційний сорт сої A5403 (Asgrow Seed Company).

У таблиці 3.55 наведено праймери, підібрані для ідентифікації трансформаційної події GTS 40-3-2. Праймери дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 74 п.н., який поєднує послідовності промотора P-35S CaMV та хлоропластного транзитного пептиду (СТР) з гена *epsps Petunia hybrida* [544].

Лінія сої MON 89788 (Roundup Ready 2 Yield®) належить до другого покоління трансгенних рослин, розроблених Монсанта для забезпечення стійкості до гербіциду Roundup®. Лінія MON 89788, так само як і GTS 40-3-2, продукує білок CP4 EPSPS завдяки наявності гена *cp4 epsps*, отриманого із

Agrobacterium sp. штаму CP4. Однак, на відміну від неї, має химерний промоторний регіон, який складається з конститутивного промотора гена *tsf1* *Arabidopsis thaliana* та енансерної послідовності з 35S промотора вірусу FMV. Сою лінії MON 89788 характеризується поліпшеними характеристиками врожайності.

Праймери, підібрані для ідентифікації трансформаційної події MON 89788 (табл. 3.55), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 139 п.н., який розташований у межах з'єднання 5'-кінцевої частини конструкту (integration border region, IBR) та геномної ДНК сої [545].

Лінію сої A2704-12 (LibertyLink®) було розроблено компанією Bayer CropScience LP для експресії ферменту фосфінотріцин-N-ацетилтрансферази (PAT), який забезпечує толерантність до гербіциду гліфосату. Лінію отримано шляхом біобалістичної трансформації. Перенесення генетичного матеріалу здійснено за допомогою плазмиди pB2/35SAcK. Геном A2704-12 містить 4 інтактні копії або фрагменти гена *pat* та 4 фрагменти гена *bla*.

Праймери, підібрані для ідентифікації трансформаційної події A2704-12 (табл. 3.55), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 64 п.н., який розташований у межах 3' *bla* та інвертованої 5' *bla* послідовностей [546].

Сою лінії A5547-127 (ACS-GM006-4) було розроблено з метою використання глюфосинату амонію (гербіциди Basta®, Ignite®, Rely®, Liberty®, Harvest® і Finale®), з активним складником фосфінотрицином для здійснення контролю за бур'янами. Для цього в рослину було введено шляхом біолістики (балістична трансформація) ген *pat*, виділений із ґрунтового грибка *Streptomyces viridochromogenes*. Продукт цього гена – фермент фосфінотріцин-N-ацетилтрансфераза (PAT) – перетворює L-фосфінотрицин (PPT) в неактивну форму і тим самим забезпечує стійкість до гербіциду. Фосфінотріцин у рослинному організмі блокує діяльність глютамін-синтетази, за відсутності активності якої рослина гине від нестачі глютаміну та накопичення амоніаку. Сам фермент PAT не має токсичних властивостей.

Праймери, підібрані для ідентифікації трансформаційної події A5547-

127 (табл. 3.55), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 75 п.н., який розташований у межах з'єднання 5'-кінцевої частини конструкту (integration border region, IBR) та геномної ДНК сої [547].

Таблиця 3.55

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та зондів, підібраних для ідентифікації ліній біотехнологічної сої

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)
GTS40-3-2-F	catttgagaggacacgctga	21	52	65
GTS40-3-2-R	gagccatgttgtaatttggtcc	23	43	64
GTS40-3-2-P	ROX-caagctgactctagcagatctttc-BHQ2	24	46	64
MON89788-F	tcccgtctagcgcttcaat	20	55	66
MON89788-R	tcgagcaggacctgcagaa	19	58	66
MON89788-P	FAM-ctgaaggcgggaaacgacaatctg-BHQ1	24	54	69
A2704-12-F	gcaaaaaagcggtagctcct	21	48	64
A2704-12-R	attcaggctgcgcaactgtt	20	50	66
A2704-12-P	ROX-cggctctccgatcgcccttcc-BHQ2	21	71	72
A5547-127-F	gctatttggtggcattttcca	22	41	63
A5547-127-R	cactcggccaacttacttct	21	52	65
A5547-127-P	FAM-ccgcaatgtcataccgtcatcggtgt-BHQ1	26	50	70
DP356043-F	gtcgaataggctaggttacgaaaaa	26	38	64
DP356043-R	tttgatattcttgagtagacgagagtgt	29	38	66
DP356043-P	FAM-ctctagagatccgtcaacatggtggagcac-BHQ1	30	53	72

Генетично модифіковану сою DP356043-5 було отримано шляхом введення модифікованих генів гліфосат ацетилтрансферази (GAT4601) та ацетолактат-синтази (GMA-HRA). Експресія білка GAT4601 забезпечує стійкість до гліфосату, а GMA-HRA – толерантність до гербіцидів, що інгібують ацетолактат-синтазу (сульфонілсечовина та імідазолінон).

Праймери, підібрані для ідентифікації трансформаційної події DP356043-5 (табл. 3.55), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 99 п.н., який розташований у межах з'єднання 5'-кінцевої частини конструкту та геномної ДНК сої [548].

3.3.4.3. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації ліній ГМ кукурудзи

Трансгенну кукурудзу, трансформаційна подія MON810 (YieldGard®),

було розроблено Монсанто з ціллю отримання специфічної стійкості до кукурудзяного метелика в умовах відсутності традиційних пестицидів. Отримано MON810 за використання технології рекомбінантних ДНК шляхом мікроін'єкції в рослинні клітини методом біолістики. Введений ген кодує природний інсектицидний білок CRYIA(B) δ -ендотоксин, виділений із *Bacillus thuringiensis ssp.* штаму Kurstaki, який є активним по відношенню до лускокрилих (Lepidoptera) та захищає рослини кукурудзи від ушкоджень листя та стебел, яких завдають личинки кукурудзяного метелика.

Праймери, підібрані для ідентифікації MON810 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 113 п.н., який розташований у межах з'єднання інтрону 1 гена *hsp70* (IVS-HSP) кукурудзи та синтетичного гена *cry1A(b)* [549].

Лінію кукурудзи MON863 (MON-00863-5) було отримано шляхом трансформації рослинного геному плазмідним вектором PV-ZMI13 за використання техніки біолістики. Геном MON863 містить синтетичний варіант гена *cry3Bb1*, отриманого з *Bacillus thuringiensis* штаму Kumamotoensis. Продукт даного гена забезпечує стійкість до комах-шкідників з ряду твердокрилих (Coleoptera), зокрема одного з основних шкідників кукурудзи у США – західного кукурудзяного кореневого хробака (*Diabrotica virgifera virgifera*), щорічні втрати та витрати на боротьбу з яким становлять приблизно 1 млрд доларів.

Праймери, підібрані для ідентифікації MON863 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 84 п.н., який розташований у межах з'єднання 5'-кінцевої частини події MON 863 та геномної ДНК кукурудзи [550].

Трансформаційну подію BT176 (SYN-EV176-9), що забезпечує стійкість до кукурудзяного метелика, було розроблено Ciba Seeds та Mucogen Corporation. Дана лінія кукурудзи була трансформована шляхом мікроін'єкції в ембріональні клітини з метою продукування природного інсектициду – CRYIA(B) δ -ендотоксину, виділеного із *Bacillus thuringiensis ssp.* штаму

Kurstaki. На додаток, лінію BT176 було ко-трансформовано геном, який забезпечує толерантність до гербіциду глюфосинату амонію, який використовують для селекції трансформованих рослин на ранніх стадіях розвитку.

Праймери, підібрані для ідентифікації BT176 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 100 п.н., який розташований у межах з'єднання синтетичного гена *cry1A(b)* та інтрону 9 гена фосфоенолпіруват-карбоксилази (*PEPC*) [544].

Лінію кукурудзи BT11 (SYN-BT011-1) було отримано шляхом введення плазмиди pZO1502, з якої попередньо було вилучено ген стійкості до ампіциліну. Геном BT11 містить модифіковану послідовність гена *cry1Ab* з *Bacillus thuringiensis* штаму Kurstaki та ген *pat* з бактерії *Streptomyces viridochromogenes*. Це забезпечує стійкість даної ГМ-лінії кукурудзи до комах-шкідників, зокрема кукурудзяного метелика (*Ostrinia nubilalis*), а також толерантність до застосування гербіцидів на основі глюфозинату амонію.

Праймери, підібрані для ідентифікації BT11 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 70 п.н. 3'-межі ділянки інтеграції, між трансформаційною подією BT11 та основним геномом кукурудзи [551].

Лінію кукурудзи GA21 (MON-00021-9) було отримано шляхом введення за допомогою біолістики генно-інженерного конструкту з модифікованою версією гена *epsps* (*terpsps*). Геном рослин лінії GA21 характеризується наявністю трьох повних та трьох неповних копій *terpsps*. Як наслідок, GA21 виробляє модифікований фермент mEPSPS, який забезпечує толерантність до гербіцидів на основі амоній-гліфосату.

Праймери, підібрані для ідентифікації GA21 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 133 п.н., розташований у межах послідовності, що кодує оптимізований проміжний пептид (ОТР) та модифікованого гена *terpsps* [544].

Лінію кукурудзи NK603 (MON-00603-6) було отримано шляхом

трансформації ядерного геному традиційної лінії кукурудзи за допомогою біоістики, що ґрунтується на використанні генної гармати та бомбардуванні мікрочастинками важких металів, вкритих бажаними фрагментами ДНК. Лінія NK603 містить рестрикційні фрагменти плазмідного вектора PV-ZMGT32 та ген *cp4 epsps*. Даний ген експресує у рослині фермент CP4 EPSPS, який не інгібується гліфосатом. Як наслідок, ГМ-рослина набуває стійкості до гербіцидів на основі гліфосату.

Праймери, підібрані для ідентифікації NK603 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 108 п.н. 3'-межі ділянки інтеграції, між трансформаційною подією NK603 та основним геномом кукурудзи [552].

Кукурудзу T25 (ACS-ZM003-2) було отримано шляхом хімічно-опосередкованої трансформації культивованих протопластів з очищеною ДНК, яка містила ген *pat* з *S. viridochromogenes*. Таким чином, геном лінії T25 несе копію гена *pat* і усічений неактивний варіант гена *bla*. Наявність ферменту PAT (фосфінотрицин-N-ацетилтрансфераза) забезпечує рослині стійкість до глюфосинату амонію.

Праймери, підібрані для T25 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 149 п.н., розташований у межах гена *pat* з *S. viridochromogenes* та термінатора T-35S з CaMV [544].

Лінію кукурудзи TC1507 (DAS-01507-1) було отримано за допомогою техніки біоістики. TC1507 містить дві касети, що експресуються. Перша з них містить ген, що кодує ендотоксин Cry1F із *Bacillus thuringiensis* серотипу *azaiwaii* 494, експресія якого регулюється конститутивним промотором *ubiZM1* з кукурудзи. Друга касета несе ген, що кодує фермент PAT із *Streptomyces viridochromogenes*, регульований конститутивним промотором P-e35S з CaMV. Токсичність білку Cry1F дає змогу рослині протистояти шкідникам комах, зокрема *Lepidoptera*, тимчасом фермент PAT забезпечує стійкість до гербіцидів на основі глюфосинату амонію.

Праймери, підібрані для TC1507 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 58 п.н., розташований між вставкою, що

відповідає події TC1507, та основним геномом кукурудзи [553].

Лінію кукурудзи MIR162 (SYN-IR162-4) було сконструйовано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації незрілих ембріонів плазмідним вектором pNOV1300. Лінія MIR162 містить два трансгени: копію послідовності *vip3Aa20*, яка походить від *Bacillus thuringiensis* та кодує клас білків Vip3Aa, токсичних для *Lepidoptera* та ген *pmi* (*manA*) з *Escherichia coli*, який кодує фермент PMI (фосфоманоз-ізомераза), що забезпечує клітинам можливість використовувати манозу як ексклюзивне джерело вуглецю.

Праймери, підібрані для MIR162 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 92 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MIR162, та основного геному кукурудзи [554].

Лінію кукурудзи MIR604 (SYN-IR604-5) було сконструйовано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації незрілих ембріонів із інбредної кукурудзи лінії A188. MIR604 містить два трансгени: модифікований ген *cry3A* (*mcry3A*), що походить від *B. thuringiensis* та кодує білок mCry3A, токсичний для *Coleoptera*, а також ген *pmi* (*manA*) з *E. coli*, який забезпечує можливість використання манози як джерело вуглецю.

Праймери, підібрані для MIR604 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 76 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MIR604, з основним геномом кукурудзи [555].

Лінію кукурудзи DAS-59122-7 було отримано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації гібридної кукурудзи лінії Hi-II. Лінія DAS-59122-7 містить гени *cry34Ab1* і *cry35Ab1* з *B. thuringiensis* та ген *pat* з *S. viridochromogenes*. Обидва білки Cry34Ab1 та Cry35Ab1 є дуже токсичними для комах ряду *Coleoptera* і захищають рослину від їхньої інвазії. Фермент PAT інактивує глюфосинат амонію і надає рослині стійкості проти гербіцидів на основі цієї діючої речовини.

Праймери, підібрані для DAS-59122-7 (табл. 3.56), дають змогу

ампліфікувати фрагмент розміром 86 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події 59122, з основним геномом кукурудзи [556].

Лінію кукурудзи MON87460 (MON-87460-4) було отримано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації ембріональних клітин звичайного сорту кукурудзи. Геном трансгенної кукурудзи містить копію гена *cspB*, що кодує білок холодного шоку В та надає рослинні стійкості до посухи, а також копію гена *nptII*.

Праймери, підібрані для MON87460 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 82 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MON87460 [557].

Лінію кукурудзи MON88017 (YieldGard VT Rootworm) було отримано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації незрілих ембріонів сорту кукурудзи А х Ні-ІІ. Геном MON88017, серед інших послідовностей, містить ген *cp4 epsps* з *Agrobacterium spp.* штаму CP4 та синтетичний варіант гена *cry3Bb1* з *B. thuringiensis* штаму Kumamotoensis. Фермент CP4 EPSPS забезпечує стійкість до гліфосату, а білок Cry3Bb1 дає змогу рослині протистояти комахам ряду *Coleoptera*.

Праймери, підібрані для MON88017 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 95 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MON88017 [558].

Лінію кукурудзи MON89034 (MON-89034-3) було сконструйовано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації клітин кукурудзи плазмідним вектором PVZMIR245. Геном MON89034, серед інших, містить послідовності генів *cry1A.105* та *cry2Ab2* з *B. thuringiensis*. Продукти цих генів забезпечують рослині здатність протистояти ураженню комахами-шкідниками ряду *Lepidoptera*.

Праймери, підібрані для MON89034 (табл. 3.56), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 77 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MON89034 [559].

Таблиця 3.56

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та зондів, підібраних для ідентифікації ліній біотехнологічної кукурудзи.

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	ГС- склад (%)	Tm (°C)
MON810-F	gatgccttctccctagtgtga	22	50	64
MON810-R	ggatgcactcgttgatgttg	21	48	63
MON810-P	FAM-agataccaagcggccatggacaacaa-BHQ1	26	50	72
MON863-F	gtaggatcggaagcttggtac	22	50	63
MON863-R	tggtacggcctaaatgctgaact	23	43	65
MON863-P	FAM-tgaacacccatccgaacaagtaggggtca-BHQ1	28	50	72
BT176-F	tggtcaccagcagcaaccag	20	55	66
BT176-R	actccactttgtgcagaacagatc	24	46	66
BT176-P	ROX-ccgacgtgaccgactaccacatcga-BHQ2	25	60	73
BT11-F	gcggaaccctattgttta	20	45	61
BT11-R	tccaagaatccctccatgag	20	50	62
BT11-P	ROX-aaatacattcaaatatgtatccgctca-BHQ2	27	30	62
GA21-F	gaagcctcggcaacgtca	18	61	65
GA21-R	atccggttggaagcgactt	20	50	65
GA21-P	FAM-aaggatccggtgcatggccg-BHQ1	20	65	70
NK603-F	atgaatgacctcgagtaagctgttaa	27	37	65
NK603-R	aagagataacaggatccactcaaacact	28	39	67
NK603-P	FAM-tggtaccacgcgacacacttccactc-BHQ1	26	58	73
T25-F	gccagttaggccagttaccca	21	57	67
T25-R	tgagcgaaacctataagaaccct	24	46	66
T25-P	ROX-tgcaggcatgcccgtgaaatc-BHQ2	22	59	70
T1507-F	tagtcttcggccagaatgg	19	53	62
T1507-R	ctttgccaagatcaagcg	18	50	59
T1507-P	FAM-taactcaaggccctcactccg-BHQ1	21	57	66
MIR162-F	gcgccgtgtcatctatgttactag	24	50	66
MIR162-R	tgccttatctgttgcttcaga	22	45	64
MIR162-P	FAM-tctagacaattcagtagataaaaaacgtccgcca-BHQ1	34	38	70
MIR604-F	gcgcacgcaattcaacag	18	56	63
MIR604-R	ggtcataacgtgactcccttaattct	26	42	65
MIR604-P	FAM-aggcgggaaacgacaatctgatcatg-BHQ1	26	50	70
DAS591227-F	gggataagcaagtaaaagcgctc	23	48	64
DAS591227-R	ccttaattctccgctcatgatcag	24	46	64
DAS591227-P	ROX-tttaaactgaaggcgggaaacgacaa-BHQ2	26	42	68
MON87460-F	cacgttgaaggaaaatggattg	22	41	61
MON87460-R	tcgcgatcctcctcaaagac	20	55	65
MON87460-P	FAM-agggagtagtagataaaatttcaaagcgtagacggc-BHQ1	38	39	72
MON88017-F	gagcaggacctgcagaagct	20	60	67
MON88017-R	tccggagttgaccatcca	18	56	63
MON88017-P	ROX-tcccgccttcagtttaaacagagtcgggt-BHQ2	29	52	74
MON89034-F	ttctcatattgaccatcatactcatt	27	33	63
MON89034-R	cggtagctataataccgtggttttaaa	28	32	63
MON89034-P	FAM-atccccggaaattatgtt-BHQ1	18	39	56

3.3.4.4. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації ліній ГМ ріпаку

Лінію ріпаку RF1 (B93-101) було отримано за використання *Agrobacterium*-опосередкованої техніки, шляхом трансформації оригінального сорту “Drakkar” плазмідним вектором, до складу якого входили гени *barstar* від *Bacillus amyloliquefaciens*, *bar* від *Streptomyces hygroscopicus* та *nptII* (неоміцин фосфотрансфераза II). Продукт гена *barstar* інгібує барназу (бактеріальна рибонуклеаза) та експресується лише в клітинах тапетуму пилкових гнізд. Фермент *barstar* гібриду RF1 x MS1 пригнічує активність рибонуклеази та відновлює як правильний розвиток пиляку, так і фертильність рослини. Ця лінія також є толерантною до глюфосинату і стійкою до таких антибіотиків, як неоміцин і канаміцин.

Праймери, підібрані для RF1 (табл. 3.57), уможливають ампліфікацію фрагменту розміром 113 п.н., розташованого в межах з’єднання вставки, що відповідає події RF1, з основним геномом ріпаку [560].

Лінію ріпаку RF2 (B94-2) було отримано шляхом трансформації традиційного сорту плазмідним вектором, до складу якого входили гени *barstar*, *bar* та *nptII*. Дану лінію було виготовлено для відновлення фертильності під час схрещування з чоловічою лінією стерильного ріпаку MS1 та забезпечення стійкості до гербіцидів на основі глюфосинату амонію.

Праймери, підібрані для RF2 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 104 п.н., розташований у межах з’єднання вставки, що відповідає події RF2, з основним геномом ріпаку [561].

Лінію ріпаку RF3 (ACS-BN003-6) отримано шляхом трансформації традиційного сорту плазмідним вектором, до складу якого входили гени *barstar* та *bar*. Дану лінію було виготовлено для відновлення фертильності під час схрещування з чоловічою лінією стерильного ріпаку MS8 та забезпечення стійкості до гербіцидів на основі глюфосинату амонію.

Праймери, підібрані для RF3 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати

фрагмент розміром 139 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події RF3, з основним геномом ріпаку [562].

Лінія ріпаку MS1 (B91-4) була отримано шляхом трансформації сорту "Drakkar" плазмідним вектором, до складу якого входили гени *barnase*, *bar* та *nptII*. Експресія гена *barnase*, що кодує рибонуклеазу, у клітинах тапетуму пилкових гнізд викликає порушення розвитку пиляку та призводить до чоловічої стерильності трансгенної рослини. Також лінія MS1 є толерантною до глюфосинату та має стійкість до таких антибіотиків як неоміцин та канаміцин.

Праймери, підібрані для MS1 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 187 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MS1, з основним геномом ріпаку [563].

Лінію ріпаку MS8 (ACS-BN005-8) було отримано шляхом трансформації традиційного сорту плазмідним вектором, до складу якого входили гени *barnase* та *bar*. Ген *barnase* кодує рибонуклеазу, фермент, який порушує вироблення РНК у клітинах та поставлений під контроль тканино-специфічного промотора. Активність рибонуклеази гальмує вироблення пилку та призводить до чоловічої стерильності. Ця лінія також є толерантною до глюфосинату завдяки конститутивному виробництву фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази, що кодується геном *bar*.

Праймери, підібрані для MS8 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 130 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події MS8, з основним геномом ріпаку [564].

Лінію ріпаку RT73/GT73 (MON-00073-7) отримано за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації оригінального сорту "Westar". Геном RT73 містить частину плазмідного вектору PV-NGT04, яка несе гени *cp4epsps* та *gox*. Перший ген експресує варіант фермента EPSPS та забезпечує стійкість до гліфосату, тимчасом другий – фермент GOX (гліфосат-оксидаза), який прискорює нормальну деградацію гербіциду.

Праймери, підібрані для RT73 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати

фрагмент розміром 108 п.н., розташований у межах з'єднання вставки, що відповідає події RT73, з основним геномом ріпаку [565].

Лінію ріпаку T45/HCN28 (ACS-BN008-2) було сконструйовано за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації оригінального сорту "АС Excel". Геном T45 містить частину плазмідного вектору рНое4/Ас, яка несе ген *pat*. Завдяки цьому гену ГМ-рослина виробляє фермент РАТ, який забезпечує її толерантність до гербіцидів на основі глюфосинату амонію.

Праймери, підібрані для T45 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 108 п.н. 5'-межі ділянки інтеграції, між трансформаційною подією T45 та основним геномом ріпаку [566].

Таблиця 3.57

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та зондів, підібраних для ідентифікації ліній біотехнологічного ріпаку

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)
RF1-F	ctaaggagggtcaagatgtagc	22	50	63
RF1-R	cgggcctaacttttggtgtg	20	55	64
RF1-P	FAM-ctccatcatcctcaccagtcagcatca-BHQ1	28	54	72
RF2-F	gggtgagacaatatatcgacg	21	48	61
RF2-R	gggcatcgaccgggtgag	18	72	68
RF2-P	ROX-caccggccaattcgctcttagccgt-BHQ21	26	58	73
RF3-F	cataaaggaagatggagactgag	24	42	62
RF3-R	agcatttagcatgtaccatcagaca	25	40	65
RF3-P	FAM-cgcacgcttatcgaccataagccca-BHQ1	25	56	71
MS1-F	acgctgcggacatctacatt	20	50	65
MS1-R	ctagatcggaagctgaagatgg	22	50	63
MS1-P	FAM-ctccattgctgatccacctagccgactt-BHQ1	28	54	72
MS8-F	gtagaaaaagtaaacaattaatagccgg	31	29	63
MS8-R	ggagggtgttttggtatc	20	45	59
MS8-P	ROX-aatataatcgacggatccccgggaattc-BHQ2	28	46	69
RT73-F	ccatattgaccatcatactcattgct	26	38	64
RT73-R	gcttatacgaaggcaagaaaagga	24	42	64
RT73-P	FAM-ttcccggacatgaagatcatcctcctt-BHQ1	27	48	70
T45-F	caatggacacatgaattatgc	21	38	58
T45-R	gactctgtatgaactgttcgc	21	48	62
T45-P	FAM-tagaggacctaacagaactcgccgt-BHQ1	25	52	69
HCN92-F	gttgcggttctgtcagttcc	20	55	64
HCN92-R	cgaccggcgctgatatatga	20	55	64
HCN92-P	ROX-tcccgcgtcatcggcgg-BHQ2	17	76	70

Лінію HCN92 (ACS-BN007-1), комерційна назва Liberty Link Innovator, було отримано шляхом традиційного схрещування звичайного сорту ріпаку з трансгенною лінією ріпаку Topas19/2. В свою чергу, ГМ-лінію Topas19/2 було вироблено за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації звичайного сорту "Topas" плазмідним вектором pOCA/As з генами *pat* і *nptII*. Присутність цих генів надає рослині стійкості до глюфосинату амонію та неоміцину.

Праймери, підібрані для HCN92 (табл. 3.57), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 95 п.н. 3'-межі ділянки інтеграції, між трансформаційною подією Topas19/2 та основним геном ріпаку [567].

3.3.4.5. Підбір праймерів з зондами для ідентифікації інших ГМ-ліній, традиційних культур, а також вірусу CaMV і бактерії *Agrobacterium tumefaciens*

Генномодифікований рис LLRice62 (ACS-OS002-5) було отримано із батьківського рису сорту Bengal за допомогою прямого перенесення ДНК. Вектор pB5/35Sbar, що використовувався для трансформації, містив копію гена *bar*. Лінія LLRice62 несе одну повну та одну часткову копії гену *bar*, який кодує фермент PAT та забезпечує рослині стійкість до гербіцидів на основі глюфосинату амонію. Праймери, підібрані для LLRice62 (табл. 3.58), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 88 п.н. 3'-межі ділянки інтеграції, між відповідною трансформаційною подією та основним геном рису [568].

Цукровий буряк лінії H7-1 (KM-000H71-4) було отримано за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації оригінального сорту 3S0057 бінарним плазмідним вектором PV-BVGT08. Одним із введених генів був *cp4 epsps*. Даний сорт є толерантним до впливу гліфосату завдяки активності ферменту CP4 EPSPS. Праймери, підібрані для H7-1 (табл. 3.58), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 108 п.н. 5'-межі

ділянки інтеграції, між відповідною трансформаційною подією та основним геномом цукрового буряку [569].

Як видоспецифічний ендогенний референтний контроль для визначення ДНК томатів було обрано ген LAT52. У геномі томату він представлений одиничною копією. Доведено, що LAT52 кодує теплостійкий, глікозильований білок, подібний за своїми функціями до інгібітора трипсину Куніца (KTI) та протеїнів пилку кукурудзи, рису та оливкового дерева. Праймери, підібрані для визначення LAT52 гена томатів (табл. 3.58), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 92 п.н. [570].

Як мішень для визначення присутності пшениці у досліджуваних зразках використовували ДНК-послідовність ω -гліадину пшениці. Праймери, підібрані для визначення гена запасного білка ω -гліадину пшениці (omega gliadin storage protein gene) (табл. 3.58), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 73 п.н. [571].

Як референтний ген для визначення ДНК картоплі було обрано УДФ-глюкозу-пірофосфорилазу (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase). Послідовність 2 інтрону було обрано як цільову ділянку для створення видоспецифічної ПЛР-системи внаслідок вищої мінливості інтронних послідовностей відносно послідовностей екзонів і, як результат, кращих шансів розрізнення картоплі серед інших представників *Solanaceae*. Праймери, підібрані для визначення UGPase гена картоплі (табл. 3.58), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 88 п.н. [572].

Визначення присутності ДНК нативного вірусу CaMV здійснювали шляхом підбору праймерів до 4 відкритої рамки зчитування (ORF IV, open reading frame VI) геному вірусу. Продукт цього гена Р6 (62кДа) є багатофункціональним вірусним білком, який відіграє велику роль у життєвому циклі вірусу. Серед багатьох функцій Р6 найбільш відома його здатність до трансактивації трансляції від ORF I до ORF V і тим самим активації процесу синтезу вірусних білків [573]. Праймери, підібрані для визначення ДНК ORF IV CaMV (табл. 3.58) ампліфікують фрагмент 76 п.н.

Таблиця 3.58

Характеристика праймерів та зондів, підібраних для ідентифікації інших ГМ-ліній, традиційних культур, CaMV та *A. tumefaciens*

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	ГС- склад (%)	Tm (°C)
LLRICE62-F	agctggcgtaatagcgaagagg	22	55	67
LLRICE62-R	tgctaacgggtgcatcgtcta	21	52	66
LLRICE62-P	FAM-cgcaccgattattttatatttagtccacct-BHQ1	31	39	68
H7-1-F	tgggatctgggtggctctaact	22	56	68
H7-1-R	aatgctgctaaatcctgag	19	42	57
H7-1-P	ROX-aaggcgggaaacgacaatct-BHQ2	20	50	65
LAT52-F	agaccacgagaacgatatttgc	22	45	64
LAT52-R	ttcttgcctttcatatccagaca	24	38	63
LAT52-P	FAM-ctctttgcagtcctcccttgggct-BHQ1	24	58	71
WhOmGl-F	tttgagtagggaggcgacaaat	22	45	65
WhOmGl-R	ttgcgtcgactttgggaatt	21	43	63
WhOmGl-P	Cy5-ttcccgcgcacaaccagtttgat-BHQ3	23	52	70
UGP-F	ggacatgtgaagagacggagc	21	57	66
UGP-R	cctacctctacccctccgc	19	68	66
UGP-P	HEX-ctaccaccattacctcgacacctctca-BHQ1	27	56	72
ORFIV-F	aatagccaaggagttaatccgaaa	24	38	63
ORFIV-R	cgcacgatcacctgttctatg	22	50	64
ORFIV-P	ROX-acaagatggaaccgcactaccggagac-BHQ2	27	56	73
AgTmChvA-F	gagttccgcaacatcaatttc	21	43	61
AgTmChvA-R	cgtaaacgagacgtcgtgaa	20	50	63
AgTmChvA-P	ROX-ttcgccaacaccaagcagggc-BHQ2	21	62	71

Для детекції бактерій *Agrobacterium tumefaciens* у досліджуваних зразках було підібрано праймери з зондом до гена *chvA* (chromosomal virulence genes) [574]. Продукт даного гена забезпечує вірулентність *A. tumefaciens* та можливість приєднання бактерій до клітин рослини. Праймери, підібрані для визначення *A. tumefaciens* (табл. 3.58), дають змогу ампліфікувати фрагмент розміром 66 п.н.

Праймери, підібрані для визначення традиційної сої, кукурудзи, ріпаку, рису та цукрового буряку, наведено у підрозділі 3.3.3.5. та таблиці 3.36.

3.3.4.6. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ з обраними праймерами і зондами та комплектація тест-систем серії «ГМО ідентифікація»

ПЛР з обраними праймерами та зондами проводили за допомогою приладів iQCyler (BioRad, Франція) та CFX96 (BioRad, США).

Оптимізацію умов ампліфікації мультиплексів здійснювали за такими параметрами, як температура гібридизації праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Детальний опис наведено у підрозділі 3.3.3.6.

Реакційна суміш містила 1x Taq-буфер (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,01% Tween 20); 0,2 mM дНТФ суміш; 2,5 mM $MgCl_2$, 5 пкмоль праймерів; 2,5 пкмоль зонду; 50-500 нг ДНК та 1 од. Taq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США).

Температурний профіль, що був використаний для проведення ПЛР, наведено у таблиці 3.59. Для зручності користування тест-системами всі розроблені мультиплекси було адаптовано під один і той самий протокол ампліфікації.

Специфічність обраних праймерів та зондів визначали методом ПЛР-РЧ зі зразками ДНК, які було виділено із відповідних ліній біотехнологічних культур та традиційних організмів. Результати перевірки специфічності показали, що для всіх розроблених мультиплексів та дослідженої вибірки зразків вона становить 100 %. Позитивні сигнали було отримано лише з праймерами до відповідних ГМ ліній, з усіма іншими ГМ лініями та традиційними організмами флюоресційний сигнал був відсутнім. Всі дослідження з підтвердження специфічності роботи праймерів і зондів проводили у трьох повторностях за концентації ДНК від 10 до 500 нг/мкл.

Таблиця 3.59

Протокол ПЛР-РЧ для тест-систем серії «ГМО ідентифікація»

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1x
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45x
3		Гібридизація і синтез	60	40	так	

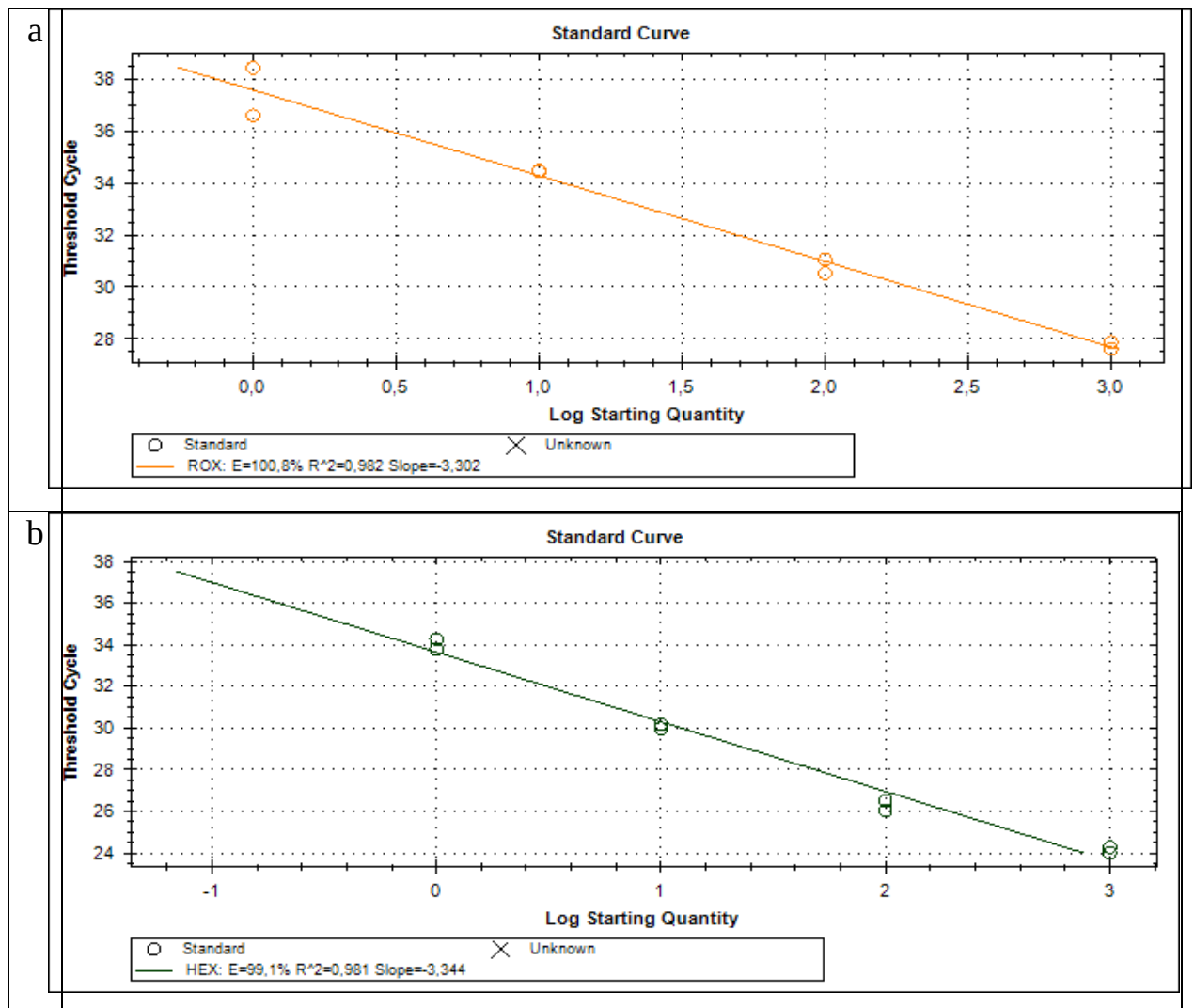


Рис. 3.47. Графіки стандартних кривих серії десятикратних розведень стандартних зразків, побудовані за результатами ПЛР у реальному часі для тест-систем «Соя лінія GTS40-3-2». а, б – канали флуоресценції ROX (GTS40-3-2) та HEX (*le1*) відповідно.

Оцінювання ефективності реакції ампліфікації для кожної пари праймерів з зондами у складі мультиплексів здійснювали методом ПЛР з наступною побудовою стандартної кривої. Для цього використовували серію десятикратних розведень препаратів ДНК, отриманих із стандартних референтних зразків відповідних ГМ та традиційних культур, а також вірусу СаMV та бактерії *A. tumefaciens*. Приклад оцінювання ефективності реакції, нахилу кінетичної кривої та коефіцієнту кореляції R^2 , розраховані за допомогою методу найменших квадратів під час дослідження серії чотирьох десятикратних розведень для тест-системи «Соя лінія GTS40-3-2 (ГМО ідентифікація)», наведено на рисунку 3.47 та таблиці 3.60.

Таблиця 3.60

Ефективність проведення ПЛР-РЧ для двох мішеней мультиплексної тест-системи «Соя лінія GTS40-3-2»

№	Назва мішені	Е, %	R ²	α
1	GTS40-3-2	100,8	0,982	-3,302
2	le1	99,1	0,981	-3,344

Визначення аналітичної чутливості проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК, отриманих із сертифікованого референтного матеріалу відповідних ГМ ліній. Отримані дані показали, що аналітична чутливість для тест-систем серії «ГМО ідентифікація» коливалась у межах 1×10^2 - 1×10^3 ГЕ/мл.

Таким чином, тест-системи серії «ГМО ідентифікація» дають змогу вирішити найбільш важливі та складні завдання з ідентифікації конкретних ГМ ліній рослинного походження, що зареєстровані на території ЄС та РФ. Тест-системи «ГМО ідентифікація» уможливають 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, вірус CaMV та бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Всі тест-системи виконано у форматі мультиплексу та укомплектовано внутрішнім ендогенним контролем перебігу ПЛР. Тест-системи виробляються у двох виконаннях – на 50 та 100 реакцій (табл. 3.61). Розроблені діагностикуми характеризуються 100 % специфічністю, достатньо високим рівнем аналітичної чутливості, повторюваністю та відтворюваністю результатів.

Комплектацію серії тест-систем «ГМО ідентифікація» виконано згідно з вимогами до ПЛР тест-систем та відповідно до інформації, наведеної у технічних умовах (табл. 3.62, 3.63) [542]. До складу кожного ПЛР-набору входять суміш для проведення ПЛР у реальному часі, Taq ДНК-полімераза, позитивний (ПКЗ) та негативний (НКЗ) контрольні зразки. Позитивний контрольний зразок представляє собою розчин ДНК відповідної ГМ лінії або традиційної сільськогосподарської культури.

Таблиця 3.61

Перелік розроблених тест-систем серії «ГМО ідентифікація», що виробляються в ДП «Укрметртестстандарт» станом на початок 2018 р.

Кат. №	Назва	Кількість реакцій
ГМО/IS-1-50	Соя лінія GTS40-3-2 (ГМО ідентифікація)	50
ГМО/IS-1-100		100
ГМО/IM-1-50	Кукурудза лінія MON810 (ГМО ідентифікація)	50
ГМО/IM-1-100		100
ГМО/IS-1-50	Ріпак лінія RT73 (ГМО ідентифікація)	50
ГМО/IS-1-100		100
ГМО/IP-1-50	Соя / кукурудза / ріпак (Ідентифікація)	50
ГМО/IP-1-100		100
ГМО/IP-4-50	Вірус CaMV / бактерія <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Ідентифікація)	50
ГМО/IP-4-100		100

Таблиця 3.62

Приклад комплектації тест-систем серії «ГМО ідентифікація»

Складова частина	Зовнішній вигляд	pH
ПЛР-РЧ суміш	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
Тақ-полімераза	Прозора безбарвна рідина	від 7,5 до 8,5
НКЗ (-)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
ПКЗ (+)	Прозора безбарвна	від 5,0 до 7,5

Таблиця 3.63

Вимоги щодо метрологічних показників тест-систем

Назва показника	Норма
Чутливість	Межа відносної чутливості становить 0,1 %
Специфічність	Специфічність – 100 % під час тестування панелі сертифікованих стандартних зразків CRM з IRMM та AOCS, що містили від 0 до 100 % генетично модифікованого матеріалу (5 ліній ГМ сої, 14 ліній ГМ кукурудзи, 8 ліній ГМ ріпаку, 1 лінія ГМ рису, 1 лінія цукрового буряку) та 8 традиційних сільсько-господарських культур, ДНК вірусу CaMV та бактерії <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Достовірність	Тест-система повинна виявляти послідовність, специфічну для відповідної ГМ конструкції або генуамішені у концентрації $\geq 0,1$ %

3.3.5. Розроблення та виробництво тест-систем серії «ГМО кількість»

Якщо якісний аналіз забезпечує можливість виявлення будь-якого ГМО з його наступною ідентифікацію, то тільки кількісний тест дає змогу визначити % вмісту ГМО у досліджуваному зразку і дати остаточну відповідь щодо необхідності маркування продукції.

Кількісний аналіз оснований на ампліфікації / визначенні кількості контрольного гена рослини та будь-якого елементу генно-інженерної конструкції, введеної до трансгенної рослини, за допомогою мультиплексної ПЛР, що включає дві незалежні реакції в одній пробірці [575]. *TaqMan*-зонди, специфічні по відношенню до двох мішеней, мічені різними барвниками, що дає змогу в процесі ампліфікації визначити більш ніж одну цільову послідовність в одній пробірці. Один репортерний барвник можна відрізнити від іншого на підставі різниць у довжині хвилі їхніх максимумів емісії. Сучасні прилади (CFX-96, QuantStudio 5 Real-Time PCR System) здатні детектувати одночасно до п'яти / шести барвників, що різняться за довжинами хвиль емісій.

Для проведення кількісного аналізу використовують метод порівняльного C_t або ΔC_t . Значення ΔC_t отримують шляхом нормалізації кількості репортерної флюоресценції трансгена до флюоресценції рослинного матеріалу. Далі усереднена величина ΔC_t аналізується на підставі калібрувальної кривої, побудованої за величинами ΔC_t стандартних референсних зразків з відомим % вмісту ГМО. Дана процедура досить добре себе зарекомендувала як у дослідженнях непереробленої рослини сировини, так і борошна, лецитину, кормів для тварин і харчових продуктів, і її було рекомендовано Об'єднаним науковим центром Європейської Комісії. Аналітичну ефективність цього методу було успішно перевірено за допомогою декількох схем кваліфікаційних випробувань (FAPAS[®], GIPSA).

Під час розроблення тест-систем серії «ГМО кількість» було

використано ті ж самі молекулярно-генетичні маркери, що й для тест-систем серій «ГМО скринінг» та «ГМО ідентифікація». Три тест-системи дають змогу визначати кількісний вміст за регуляторними елементами, тимчасом 10 інших – за трансформаційними подіями. Тест-системи укомплектовано стандартними референтними зразками виробництва бельгійського Інституту Еталонних Матеріалів і Вимірювань. Умови ампліфікації адаптовано до протоколу, який наведено у таблиці 3.59.

3.3.5.1. Підготовка референтних стандартних зразків для проведення кількісного аналізу з визначення ГМО

Для проведення кількісного аналізу з визначення % вмісту ГМО у досліджуваному зразку необхідна наявність контрольних стандартних зразків (КСЗ). Для укомплектації тест-систем серії «ГМО кількість» як КСЗ було використано сертифікований референтний матеріал виробництва Інституту Еталонних Матеріалів і Вимірювань (IRMM, Бельгія).

Референтний матеріал виробництва IRMM було представлено зразками висушеного борошна сої та кукурудзи, які містили різні за масами фракції (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 %) генно-модифікованих ліній сої та кукурудзи (табл. 3.29). Його було виготовлено разом з фірмою Fluka Chemie AG (Бухс, Швейцарія) у рамках співробітництва з Інститутом Здоров'я та Захисту Споживачів (ІНСР), Об'єднаним науковим центром Європейської Комісії (Іспра, Італія).

Референтний матеріал призначено для атестації методів виявлення генетично модифікованих харчових продуктів. З огляду на те, що кількісне визначення ДНК і/або білка може залежати від сорту, необхідною є особлива уважність під час кількісних розрахунків на основі аналізу невідомих проб. Так, наприклад, висушений соєвий порошок, що містить ГМ сою Roundup Ready®, було отримано із цільного насіння немодифікованої лінії сої (Asgrow A1900) і генетично модифікованої лінії 40-3-2 сої Roundup Ready® (Asgrow line AG5602 RR). Висушений кукурудзяний порошок, що містить ГМ

кукурудзу MON810, було отримано із цільних зерен немодифікованого сорту DK512 і лінії MON810 сорту DK513 [576,577].

Для приготування КСЗ, якими комплектувались тест-системи, проводили виділення ДНК із сертифікованого референтного матеріалу відповідної ГМ лінії. В залежності від наявності референтного матеріалу, що пропонувався IRMM, брали від трьох до п'яти точок з різним % вмісту ГМО. Для екстракції ДНК брали наважки борошна вагою 50–100 мг. З них за методикою, наведеною у розділі 2.3.5, виділяли препарати ДНК. Кінцевий об'єм препарату ДНК становив 400 мкл. Якість і концентрацію ДНК перевіряли методом спектрофотометрії за співвідношенням довжин хвиль A260/A280 та A260/A230. Після цього розбавляли ДНК до кінцевої концентрації 100–250 нг/мкл.

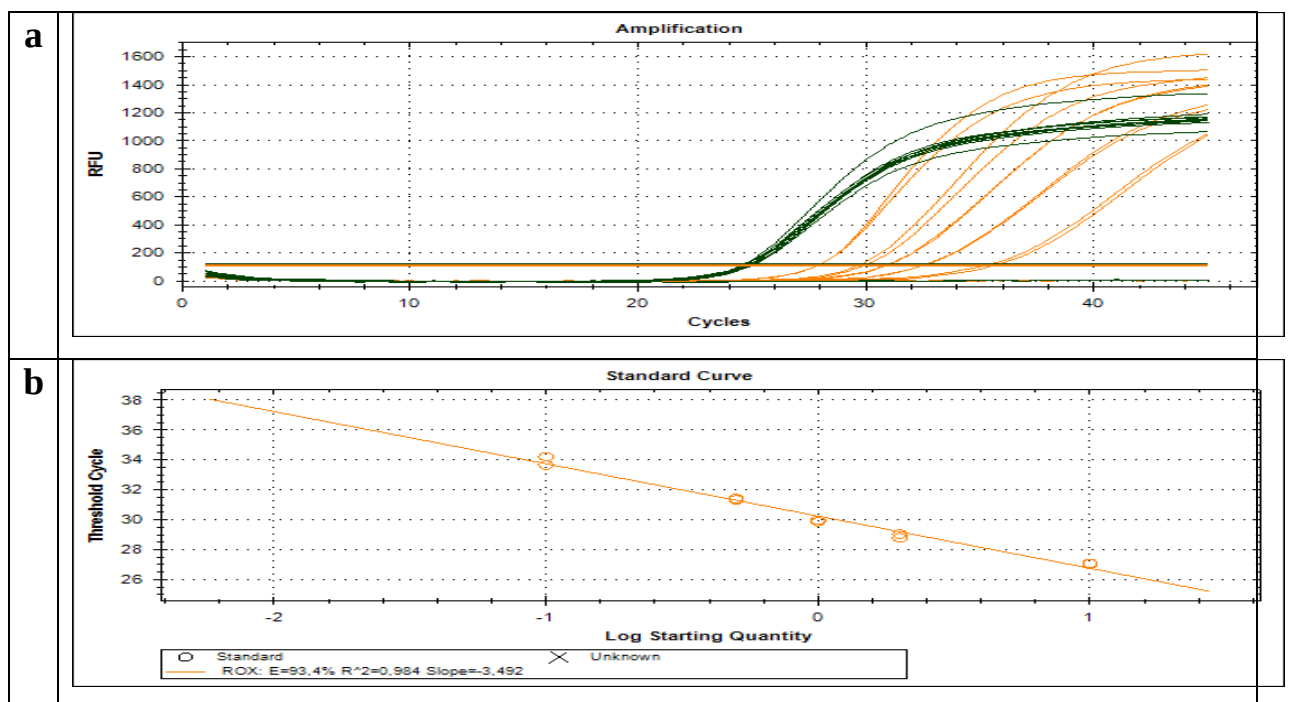


Рис. 3.48. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та стандартна крива під час перевірки якості препарату ДНК, виділеного з сертифікованого референтного матеріалу ГМ сої лінії GTS 40-3-2. (a) – сигнали флуоресценції за каналами ROX (GTS40-3-2) та HEX (*le1*); (b) – стандартна крива, побудована за п'ятьма точками контрольних стандартних зразків (0,1; 0,5; 1; 2; 10% ГМО).

Наступним етапом була перевірка виділених препаратів ДНК шляхом проведення ПЛР-РЧ з побудовою калібрувальної кривої. На рисунку 3.48 продемонстровано результати ампліфікації КСЗ, отриманих із референтного

матеріалу сої лінії GTS 40-3-2. Отримані результати демонструють, що кут нахилу α відповідає $-3,492$ та вкладається у діапазон від $-2,5$ до $-4,5$, а показник R^2 дорівнює $0,984$. Розраховане значення ефективності ПЛР становить $93,4\%$.

Після перевірки КСЗ фасували по одноразових поліпропіленових пробірках об'ємом $0,5$ мл і зберігали за $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж року.

3.3.5.2. Валідація та комплектація тест-систем для проведення кількісного аналізу вмісту ГМО за регуляторними елементами та трансформаційними подіями

Кількісне визначення ГМО рослинного походження базується на розрахунку відношення кількості ДНК певної лінії ГМ рослини до загальної кількості ДНК аналізованої рослини, вираженої у відсотках. Для кількісного визначення ГМО одночасно проводять дві незалежні реакції в одній пробірці. Одна реакція дає змогу виявити ДНК аналізованої рослини (соя, кукурудза, ріпак і т. ін.), а інша – послідовність, специфічну для генно-інженерного конструкту (P-35S, T-nos, CP4 EPSPS, вектор PV-ZMI13 (MON-00863-5) / рослинний геном і т. ін). Визначення відсоткового вмісту ГМО відбувається за використання не менш ніж трьох стандартних зразків, які являють собою суміші борошна рослини дикого типу та ГМ рослини у певному відсотковому співвідношенні. Наприклад, для лінії сої GTS 40-3-2 це були стандарти $0,1$; $0,5$; 1 ; 2 та 5% (ERM-BF410k). Різницю значень граничних циклів двох реакцій для стандартних зразків використовують для побудови калібрувальної прямої. За допомогою калібрувальної прямої розраховують відсотковий вміст ДНК ГМО в аналізованих зразках (рис. 3.49, 3.50).

Калібрувальний графік характеризують такі статистичні дані, як кут нахилу прямої (відповідає ефективності реакції ампліфікації) та значення коефіцієнта кореляції R^2 . За цими параметрами оцінюють якість результатів кількісного аналізу. За 100% ефективності реакції ампліфікації кут нахилу дорівнює $-3,33$. Допустимі значення коефіцієнта кореляції знаходяться в

інтервалі $1 > R^2 > 0,98$. Результати аналізу зразків приймають, якщо коефіцієнт кореляції калібрувальної кривої, побудованої за сертифікованими стандартними зразками за методом найменших квадратів, $R^2 > 0,98$. Межі інтервалу, в якому похибка визначення перебуває з довірчою ймовірністю $P=0,95$, становлять від 0,1 до 5 %. Нижню й верхню межі похибки визначають доступними сертифікованими контрольними зразками, а стандартні відхилення повторюваності результатів (d) становлять від 0,067 (для стандарту 0,1%) до 0,540 (для стандарту 5%), що відповідає похибці сертифікованих контрольних зразків.

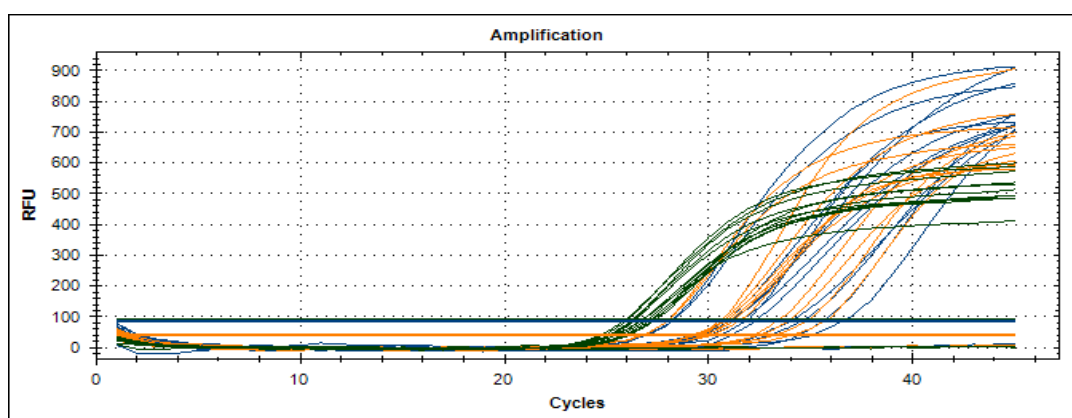


Рис. 3.49. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час проведення кількісного аналізу за використання тест-системи «ГМО соя (p35S кількість)».

Таким чином, тест-системи серії «ГМО кількість» призначені для проведення двох типів кількісного аналізу. Перший тип дає змогу визначити загальний вміст ГМО в аналізованому зразку за регуляторними елементами, такими як P-35S та T-pos. Другий тип кількісного аналізу є більш специфічним і дає змогу визначити вміст конкретної ГМ лінії за трансформаційною подією (GTS 40-3-2, MON810, RT73). Розроблені тест-системи «ГМО кількість» дають змогу визначати кількісний вміст біотехнологічної сої та кукурудзи за промотором 35S CaMV та термінатором NOS з *A. tumefaciens*, 1 лінії ГМ сої та 9 ліній ГМ кукурудзи за трансформаційними подіями. Всі тест-системи виконано у форматі мультиплексу і містять внутрішній ендогенний контроль перебігу ПЛР. Тест-системи виробляються у виконанні на 100 реакцій (табл. 3.64). Розроблені

діагностикуми характеризуються 100 % специфічністю та межею кількісного визначення не менш ніж 0,1 %.

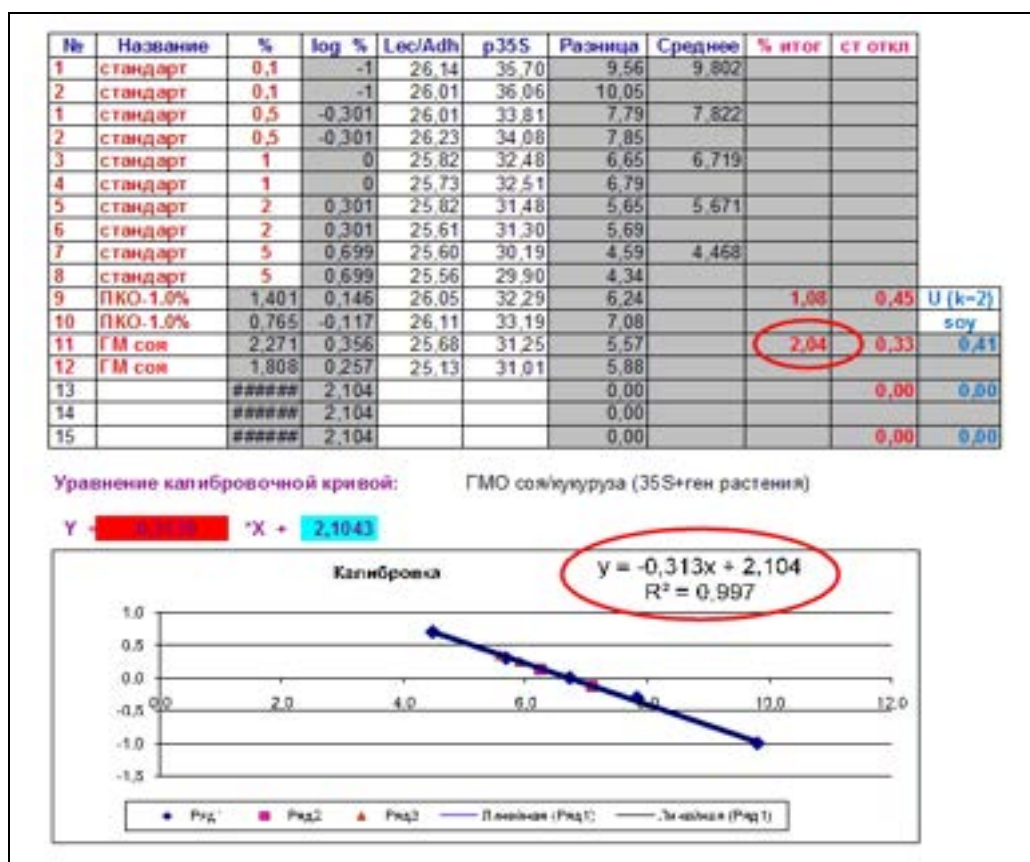


Рис. 3.50. Приклад розрахунку кількісного вмісту ГМО в досліджуваному зразку сої за використання шаблону документу Microsoft Excel

Таблиця 3.64

Перелік розроблених тест-систем серії «ГМО кількість», що виробляються в ДП «Укрметртестстандарт» станом на початок 2019 р.

Кат. №	Назва	Кількість реакцій
ГМО/QS-1-100	ГМО соя (p35S кількість)	100
ГМО/QS-2-100	Соя лінія GTS40-3-2 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-1-100	ГМО кукурудза (p35S кількість)	100
ГМО/QM-2-100	ГМО кукурудза (tNOS кількість)	100
ГМО/QM-3-100	Кукурудза лінія MON810 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-4-100	Кукурудза лінія MON863 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-5-100	Кукурудза лінія BT176 (ГМО кількість)	100

ГМО/QM-6-100	Кукурудза лінія BT11 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-7-100	Кукурудза лінія GA21 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-8-100	Кукурудза лінія NK603 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-9-100	Кукурудза лінія T25 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-10-100	Кукурудза лінія MIR604 (ГМО кількість)	100
ГМО/QM-11-100	Кукурудза лінія T1507 (ГМО кількість)	100

Комплектацію серії тест-систем «ГМО кількість» виконано згідно з вимогами до ПЛР-тест-систем та відповідає інформації, наведеній у технічних умовах (табл. 3.65, 3.66) [542]. До складу кожного ПЛР-набору входять суміш для проведення ПЛР у реальному часі, Таq ДНК-полімераза, позитивний (ПКЗ) та негативний (НКЗ) контрольні зразки, контрольні стандартні зразки (КСЗ). Позитивний контрольний зразок та контрольні стандартні зразки представляють собою розчини ДНК відповідної біотехнологічної лінії з відомим вмістом (%) ГМО. Кількість точок КСЗ, що входять до складу тест-системи, може різнитися, але не має бути меншою ніж три.

Таблиця 3.65

Приклад комплектації тест-систем серії «ГМО ідентифікація»

Складова частина	Зовнішній вигляд	pH
ПЛР-РЧ суміш	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
Таq-полімераза	Прозора безбарвна рідина	від 7,5 до 8,5
НКЗ (-)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
ПКЗ (+)	Прозора безбарвна	від 5,0 до 7,5
КСЗ (0,1%)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
КСЗ (0,5%)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
КСЗ (1%)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
КСЗ (2%)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
КСЗ (5 або 10%)	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5

Таблиця 3.66

Вимоги щодо метрологічних показників тест-систем

Назва показника	Норма
Чутливість	Межа відносної чутливості становить 0,1 %
Межа кількісного визначення	Абсолютна межа кількісного аналізу становить десять копій цільової послідовності, відносна межа кількісного аналізу становить 0,1 %
Специфічність	Специфічність – 100 % під час тестування панелі сертифікованих стандартних зразків CRM з IRMM, що містили від $\leq 0,02$ до 5 або 10 відповідного генетично модифікованого матеріалу
Достовірність	Тест-система повинна виявляти специфічну послідовність для регуляторного елемента або конструкції у концентрації $\geq 0,1$ %

3.3.6. Проведення комісійних випробувань та апробація розроблених тест-систем шляхом участі у міжнародних раундах порівняльних випробувань

Комісійні випробування всього спектру розроблених тест-систем було проведено у 2011 році на базі Державного підприємства «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л. І. Медведя» Міністерства охорони здоров'я України. За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво тест-систем у 2012 році було отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011 «Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови». Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 05.03.02-07/8620 від 09.02.2012 р. (Додаток Е).

Також у 2012 р. отримано патент на корисну модель №72083 «Тест-система для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) в харчових продуктах методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ)» (Україна : МПК

2012.01, C12N 15/00. u 2011 15202 ; заявл. 22.12.2011; опубл. 10.08.2012, Бюл. № 15. 4 с.) (Додаток Є).

З огляду на те, що в нормативній документації з визначення ГМО (ДСТУ ISO) були відсутні положення щодо визначення біотехнологічних культур за низкою генів «нової ознаки» на базі НВЛ молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт» у 2011 році було розроблено і затверджено Методику виконання вимірювань MBV 081/12-12-0227-05 «Методика выполнения измерений ДНК последовательностей (CP4 EPSPS / PAT / BAR / 35S / NOS скрининг) генетически модифицированных организмов в пищевых, фармакологических и косметических продуктах, пищевом сырье растительного происхождения и кормах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (Додаток Ж).

Продуктивність та надійність тест-систем було перевірено впродовж 2011–2018 років як випробувальною лабораторією ДП «Укрметртестстандарт», так і іншими лабораторіями країни [576,577]. Час від часу компанії-експортери зернових, які користуються послугами лабораторії ДП «Укрметртестстандарт», перевіряють компетентність лабораторії та достовірність результатів, отриманих за використання тест-систем виробництва ДП «Укрметртестсандарт», шляхом перевірки у провідних європейських лабораторіях (Додаток З).

Контроль якості тест-систем та оцінювання достовірності результатів випробувань харчової продукції та сільськогосподарської сировини здійснювали шляхом участі в міжнародних раундах порівнювальних випробувань: FAPAS®GeMMA Scheme (Великобританія), EU-RL GMFF (Італія), KOOMET (РФ) протягом 2007–2015 років (Додаток И).

Впродовж 2011–2015 рр. лабораторією молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт» було організовано та проведено міжлабораторні порівняльні випробування за програмою «Харчова продукція та продовольча сировина. Генетично модифіковані організми»: Раунд № 01/11-ГМО, Detection and Quantification Roundap Ready Soya in 100% Soya

Flour; Раунд № 02/13-ГМО, Detection and Quantification GM Maize line MON810 in 100% Maize Flour; 3. Раунд № 04/15-ГМО, Detection and Quantification Roundap Ready Soya in 100% Soya Flour. У випробуваннях брали участь лабораторії Мінекономрозвитку, Держсанепідслужби, Держветфітослужби, науково-дослідних установ, інші державні та комерційні лабораторії. Максимальна кількість лабораторій, що брала участь у раундах, становила 25. З них 8 лабораторій під час порівняльних випробувань використовували тест-системи виробництва ДП «Укрметртестстандарт» (Додаток І).

3.3.7. Економічна ефективність виробництва тест-систем

Будівництво потужностей під виробництво тест-систем на базі ДП «Укрметртестстандарт» було розпочато влітку 2010 року. Загальні капітальні вкладення в технологію та обладнання склали 195 тис. грн., у тому числі 170,3 тис. грн. у перший рік реалізації проекту. Витрати на підготовку виробництва - ще 51 тис. грн. Прибуток від продажу готової продукції за весь період реалізації склав 2 200,9 тис. грн. при середній ціні одиниці продукції в 3 764,2 грн. (табл. 3.67). У таблиці 3.68 наведено розрахунки економічної ефективності створення технології виробництва тест-систем. Індекс дохідності (ІД) дорівнює 16,8%. Тобто рентабельність реалізації проекту становить 16,8 відсотків, а проект слід визначити прибутковим. Витрати на проект приблизно мають бути окупленими за шість років ($T=5,9$). Точка беззбитковості проекту знаходиться в межах 75 відсотків номінального обсягу виробництва, що підтверджує надійність проекту (Додаток І).

На сьогоднішній день ринок тест-систем для *in vitro* діагностики в Україні представлено виробами виключно іноземного виробництва. Серія тест-систем виробництва ДП «Укрметртестстандарт» є чи не єдиним національним продуктом, який дозволяє визначати ГМО в харчовій продукції та сільськогосподарській сировині. У таблиці 3.69 наведено дані щодо

цінової політики виробів ДП «Укрметртестсандарт». Представлені дані дуже добре демонструють, що тест-системи вітчизняного виробництва у 2,2 та 4 рази дешевші за діагностикуми виробництва РФ та ЄС відповідно. Середню вартість одиниці продукції виводили за цінами подібних між собою тест-систем.

Таблиця 3.67.

Розрахунок економічної ефективності створення технології виробництва тест-системи

Вихідні дані:	
Загальні капітальні вкладення в технологію та обладнання	195,0 тис. грн.
у тому числі в першому році реалізації проекту	170,3 тис. грн.
Витрати на виготовлення зразків	17,8 тис. грн.
Витрати на підготовку виробництва	33,2 тис. грн.
Дохід (прибуток від продажу продукції, виготовленої за новою технологією) за весь період реалізації	2 200,9 тис. грн.
Ставка дисконтування	0,14
Термін реалізації інноваційно-інвестиційного проекту	7 років
Середня ціна одиниці продукції в періоді реалізації технології	3 764,20 грн.
Постійні витрати на виробництво продукції	1 129,26 грн.
Змінні витрати на виробництво одиниці продукції	2 258,52 грн.

З огляду на це у 2019 році на базі ТОВ «Біокор Текнолоджі ЛТД» було затверджено ТУ У 20.1-40719638-001:2019 «Серія тест-системи для визначення генетично модифікованих організмів (ГМО) в продуктах харчування, харчовій сировині та кормах. Технічні умови» та розпочато виробництво тест-систем (Додаток Й). Таким чином, ТОВ «Біокор Текнолоджі ЛТД» стала другим виробничим майданчиком з виробництва вітчизняних діагностикумів для визначення ГМО в сільськогосподарській

сировині, кормах та харчовій продукції.

Таблиця 3.68.

Чистий дисконтований дохід від використання нової технології виробництва тест-системи за роками її життєвого циклу

	Будівництво необхідних потужностей та освоєння виробництва		Використання технологій виробництва тест-системи до повної потужності виробництва					Всього
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Чистий грошовий потік	-170,3	6,0	48,7	-15,8	-9,2	105,7	298,0	
Кумулятивний грошовий потік	-170,3	-164,3	-115,6	-131,4	-140,6	34,9	332,9	
Чистий дисконтований дохід	-149,4	4,6	32,9	-9,3	-4,7	48,2	119,1	41,4

Таблиця 3.69.

Виробники тест-систем для визначення ГМО та середня вартість одиниці продукції у грн. за цінами 2016 року.

Назва	ДП“Укрметртестстандарт” (Україна)	ЗАТ“Синтол” (РФ)	R-Biopharm (Німеччина)
Тест-системи для визначення ГМО	3 601,70	7950,17	14601,46

3.3.8. Моніторинг сільськогосподарської сировини, кормів для тварин та харчової продукції в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів

Моніторинг сільськогосподарської сировини, кормів та харчової продукції, проведений впродовж 2007 – 2017 рр., виявив присутність в Україні біотехнологічних рослин (табл. 3.70). Всього за цей період лабораторією було досліджено 17 636 зразків, дві третини з яких становила

харчова продукція. Сільськогосподарська сировина здебільшого була представлена такими культурами як соя, кукурудза, ріпак, пшениця, рис та продукти їхньої переробки.

У 2007 році лабораторією було здійснено 413 аналізів продуктів харчування, кормів для тварин та сільськогосподарської сировини, представлених на внутрішньому ринку України щодо вмісту ГМ інгредієнтів. Результати випробувань були вражаючими. В 22 % випадків зразки містили у своєму складі ГМО. Причому, у 36 зразках харчової продукції (15,5 % від загальної кількості випробуваних зразків) та 7 зразках кормів і сировини (6,3 %) вміст ГМО виявився більшим за 0,9 % (рис. 3.51). Найчастіше ГМО виявляли у ковбасних виробках та м'ясних напівфабрикатах, до складу яких входив соєвий білок. Також ГМ інгредієнти зустрічались у кондитерській та іншій харчовій продукції, яку було виготовлено з використанням соєвих бобів та кукурудзи. Таким чином, відсутність законодавчих актів та контролю за обігом ГМО в країні призвела до несанкціонованого завезення та вирощування в Україні посівного матеріалу трансгенних культур, а також їхнього використання у харчовій промисловості.

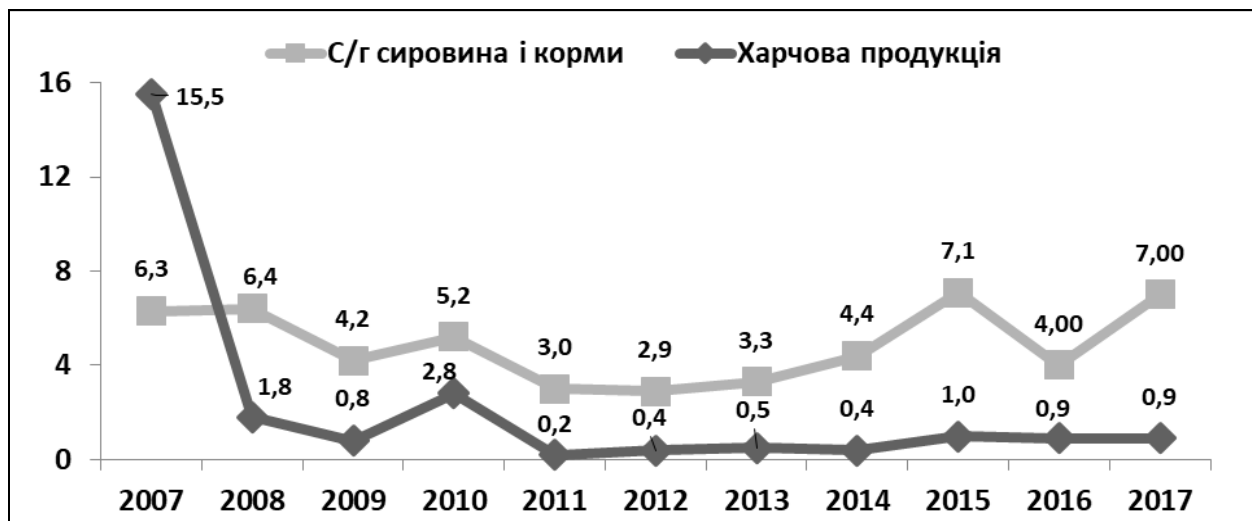


Рис. 3.51. Результати випробувань за 2007–2017 роки та динаміка виявлення % ГМО в сільськогосподарській сировині, кормах та харчовій продукції.

У 2008 році зріс обсяг випробувань та спектр продукції. Значну частку складала продовольча сировина. З 1177 зразків 1080 (92 %) виявились такими, що не містять ГМО. ГМО було виявлено у 21 зразку харчової продукції, з

яких у 13 вміст виявився більшим за 0,9%. Гіршою ситуація була серед зразків с/г сировини, де ГМО було виявлено у 70 зразках. Причому 21 з них містили ГМО у кількості вищій за 0,9 %. Що стосується кормів, то ГМО було виявлено в 6 зразках, в 1 зразку кількість перевищувала 0,9%.

У зв'язку з прийняттям постанови Кабінету Міністрів України № 468 від 13.05.2009 “Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг”, у 2009 зріс обсяг аналізів [578]. Загальна кількість перевірених зразків склала 2126. ГМО було виявлено у 107 зразках, що становило 5 %. В сільськогосподарській сировині ГМО було виявлено у 77 зразках, в 36 вміст перевищував 0,9 %. Також ГМО було виявлено в 13 зразків кормів для тварин, що містили в своєму складі сою або кукурудзу. В той же час в продуктах харчування ГМО було виявлено у 17 зразках, в 13 з них концентрація перевищувала 0,9 %.

У 2010 році кількість перевірених зразків ще збільшилась та досягла 2570. ГМО було виявлено у 204 випадках, що склало 8 %. Серед продуктів харчування ГМО було виявлено у 71 зразку, з яких лише у 9 вміст перевищував 0,9 %. ГМО було виявлено в 5 зразках кормів, в 2 вміст перевищував 0,9 %. Покращився стан і з сировиною. Зі 128 зразків у 29 уміст ГМО перевищував 0,9 %, тобто співвідношення близьке до 1 : 3. В той же час у попередні роки воно наближалось до 1 : 1.

У 2011 році кількість зразків, що надішли до лабораторії, значно зменшилась. З 1866 зразків, які було проаналізовано, ГМО виявлено у 59, що склало 3 %. Водночас серед досліджених продуктів харчування ГМ інгредієнти містилися лише у 3 зразках, в кількостях понад 0,9 %. Що стосується кормів та сировини, то кількість зразків з ГМО становила 56, з них 27 - в кількості більшій 0,9 %.

Протягом 2012 року було перевірено вже 2001 зразок сільськогосподарської сировини та харчової продукції. ГМ складову було виявлено у 67 зразках, 57 з яких становила сировина, 2 – корми для тварин та

8 – готова продукція. У 33 зразках сільськогосподарської сировини, 1 – кормів та у 3 зразках харчової продукції, кількість ГМО перевищувала 0,9 %. У цілому загальна картина за 2011 та 2012 роки дуже подібна. Кількість виявлених ГМО склала 3 %, значно зменшилась кількість готової продукції, в якій було виявлено ГМО (відповідно 0,2 та 0,4 %) та сировини з вмістом ГМО більше 0,9 % (відповідно 1,4 та 1,7 %).

Впродовж 2013 – 2014 рр. було проаналізовано 6040 зразків сільськогосподарської сировини, кормів та харчової продукції. Приблизно половину з них становила рослинна сировина, зокрема соя, кукурудза, ріпак, пшениця, ячмінь та рис, а також продукти їх переробки. Як у сировині, так і в харчовій продукції було виявлено присутність біотехнологічних культур. У сільськогосподарській сировині виявляли переважно ГМ сою, кукурудзу та ріпак, у харчовій продукції та кормах – ГМ сою та кукурудзу. У 2013 та 2014 рр. було виявлено 66 (4 %) та 77 (5 %) зразків відповідно, що містили у своєму складі ГМ рослини. З них у 47 зразках ГМО були присутні у кількостях, що перевищували 0,9 %.

У 2015 році кількість виявлених зразків з ГМО зросла до 8 %. Між тим, переважна більшість зразків, що містили у своєму складі ГМО, була представлена сільськогосподарською сировиною. Протягом 2016 року у лабораторії було виявлено 5 % зразків з ГМ інгредієнтами. Переважна більшість виявлених зразків була представлена соєвими бобами та зерном кукурудзи. Що стосується 2017 року, то відсоток виявлених ГМО знов збільшився до восьми. Всього було виявлено 95 зразків, що містили в своєму складі ГМО, з них 70 серед зразків сільськогосподарської сировини, 14 у кормах та 11 у харчовій продукції.

Такими чином, виявлені біотехнологічні культури були представлені соєю, кукурудзою на ріпаком. На жаль, цілісну картину розповсюдження ГМ рослин у масштабах всієї країни відстежити неможливо, оскільки в більшості лабораторій України доступ до цієї інформації є обмеженим.

Таблиця 3.70

Моніторинг сільськогосподарської сировини, кормів для тварин та харчової продукції на вміст ГМО

Рік	Кількість зразків	Виявлено ГМО	Сільськогосподарська сировини		Корми		Харчова продукція	
			< 0.9%	> 0.9%	< 0.9%	> 0.9%	< 0.9%	> 0.9%
2007	413	90 (22%)	11	4	8	3	28	36
2008	1177	97 (8%)	49	21	5	1	8	13
2009	2126	107 (5%)	41	36	7	6	4	13
2010	2570	204 (8%)	99	29	3	2	62	9
2011	1866	59 (3%)	21	24	8	3	0	3
2012	2001	67 (3%)	24	33	1	1	5	3
2013	1769	66 (4%)	31	20	5	2	2	6
2014	1609	77 (5%)	29	28	8	5	1	6
2015	1545	126 (8%)	56	37	11	6	10	6
2016	1360	66 (5%)	19	22	9	4	7	5
2017	1200	95 (8%)	47	23	8	6	7	4

Висновки до розділу 3.3

1. Розроблено методологію з визначення ГМО методом ПЛР-РЧ з врахуванням типу сільськогосподарських культур, що вирощуються в Україні.
2. Визначено ДНК-мішені для підбору олігонуклеотидних праймерів і зондів до різних елементів генно-інженерних конструкцій, що були використані під час створення трансгенних сільськогосподарських культур.
3. Розроблено серію тест-систем «ГМО скринінг» з 5 найменувань, які дають змогу проводити якісний аналіз з визначення ГМО у харчових, фармакологічних, косметичних продуктах, харчовій сировині рослинного походження та кормах за регуляторними елементами та генами «нової ознаки».
4. Розроблено серію тест-систем «ГМО ідентифікація» з 33 найменувань, які дають змогу визначати лінії трансгенних сільськогосподарських культур за трансформаційною подією, а також здійснювати видову ідентифікацію рослинної сировини в багатокомпонентній харчовій продукції.
5. Розроблено серію тест-систем «ГМО кількість» з 13 найменувань, які дають змогу визначати кількісний вміст ГМО у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині за регуляторними елементами та трансформаційними подіями.
6. За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво ряду тест-систем отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011 та патент на корисну модель.
7. Якість розроблених тест-систем підтверджено шляхом успішної участі у вітчизняних та міжнародних раундах порівнювальних випробувань.
8. Упродовж 2007–2017 рр. за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні шляхом перевірки харчової продукції та сільськогосподарської сировини.

Перелік наукових робіт, в яких опубліковані результати досліджень, представлених у розділі 3.3:

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.

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.

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. Збірник наукових праць Білоцерківського національного аграрного університету*. 2012. Вип. 7(90). С. 78–81.

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

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.

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. К.: ЦП «Компринт», 2013. 204 с.

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.

Димань Т.М., Козловська М.В., **Облап Р.В.**, Дубін О.В., Кравченко

О.І. Генетично модифіковані сільськогосподарські культури: прогрес, проблеми, перспективи. Монографія. / передмова та ред. Т.М. Димань, Л.Г.Шморгун // Серія: Імплементация європейських норм і практик. Регулювання ринків та дослідництво в умовах СОТ. К.: Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. 158 с.

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.

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. Збірник наукових праць Білоцерківського національного аграрного університету*. 2013. Вип. 9(103). С. 8–11.

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.

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.

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

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

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

Облап Р., Новак Н., Димань Т. Дослідження меду на вміст пилку з

генетично модифікованих рослин методом ПЛР у реальному часі інгредієнтів. *Науковий вісник НУБіП України. Серія «Лісництво та декоративне садівництво»*. 2017. Вип. 278. С. 216–223.

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.

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

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.

3.4. Визначення присутності глютену злакових культур у харчовій продукції

Сьогодні як в Україні, так і в інших країнах світу актуальним є розроблення сучасних технологій виробництва харчових продуктів спеціалізованого призначення, спрямованих на профілактику та лікування аліментарно-залежних захворювань. До таких видів продуктів можна віднести передусім безглютенові вироби, які призначені для людей, хворих на целиацію [579,580].

Єдиним дієвим методом лікування та профілактики ускладнень, спричинених целиацією, є дотримання впродовж всього життя безглютенової дієти [581]. Однак уникнути глютену у разі дієтичного харчування досить складно, оскільки злаки застосовують у виробництві багатьох найменувань харчових продуктів. Крім того, низка продуктів містить «прихований» глютен, і навіть безглютенова продукція може бути забруднена в процесі технологічного циклу. Згідно з міжнародними нормами (харчові стандарти міжнародної комісії Кодекс Аліментаріус/Codex Alimentarius), вміст глютену в усіх без винятку безглютенових продуктах (gluten-free foods) не має перевищувати 20 ppm (20 мг/кг) з врахуванням різної чутливості до глютену та різних харчових уподобань. Також регламентується друга категорія безглютенових виробів – це спеціально оброблені для зменшення вмісту глютену продукти. В них вміст глютену коливається від 20 до 100 ppm (20–100 мг/кг) [582,583].

Проблема целиації має велике медико-соціальне значення для здоров'я всієї нації, тому її вирішення неможливе без відповідної вчасної діагностики, обліку хворих та забезпечення їм можливості дотримання спеціальної безглютенової дієти. Нормативно-законодавча база щодо харчових алергенів в Україні тільки починає формуватися, тому, як правило, посилаються на законодавство ЄС: Директиву 41/2009, Директиву ЄК 2003/89, Директиву ЄК 2006/142, Директиву ЄК 2007/68, Регламент ЄК 828/2014, Регламент ЄК

1169/2011, стандарт Codex Alimentarius (Codex Stan 118-1979) [584]. Зараз як ніколи актуальною є проблема розробки та запровадження нормативно-законодавчих актів, які б регламентували контроль алергенів у харчовій продукції та їх маркування. Деякі зрушення у цьому напрямку вже відбуваються. Так, 6 серпня 2019 р. набрав чинності Закон України № 2639-VIII від 06.12.2018 “Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів”. В даному документі крім іншого йдеться про необхідність позначення на етикетці речовин або продуктів, що спричиняють алергічні реакції або непереносимість. Закон визначає, що інгредієнти-алергени, які можуть входити до складу харчового продукту, мають бути виділені кольором або шрифтом і візуально відрізнятися від інших інгредієнтів. Харчові продукти які містять глютен у кількостях, що не перевищують 20 міліграмів на 1 кілограм та не більше ніж 100 міліграмів на 1 кілограм від загальної маси харчового продукту мають позначатися відповідно як ті що "без глютену" та "з дуже низьким вмістом глютену". Крім того, такі продукти можуть супроводжуватися позначенням "підходить для осіб з непереносимістю глютену" або "підходить для осіб, хворих на целиацію" [585].

Однак наявність лише нормативно-законодавчої бази не вирішує даного питання. Зважаючи на актуальність та важливість даної проблеми, потрібна організація ефективного лабораторного контролю харчових продуктів на предмет вмісту глютену та інших харчових алергенів і розробка та впровадження Програми їхнього моніторингу в харчових продуктах, спеціальному дієтичному та дитячому харчуванні, коректного маркування цих продуктів та гармонізації українського законодавства до європейських вимог. В свою чергу забезпечення належного рівня лабораторного контролю неможливе без наявності недорогих сучасних високочутливих діагностичних наборів. На вітчизняному ринку представлено обмежений спектр діагностиків, які б уможливлювали проведення таких досліджень. Крім того, це тест-набори винятково іноземного виробництва, що, відповідно,

позначається на вартості аналізу. З огляду на це, розроблення вітчизняних тест-систем для визначення вмісту глютену в харчових продуктах, які б відповідали європейським стандартам, є актуальним і своєчасним завданням.

3.4.1. Розроблення методології визначення глютенів пшениці, жита, ячміню та вівса на основі технології *TaqMan*[®] ПЛР-РЧ

Єдиним методом лікування целіакії та інших форм несприйнятності глютену (алергія та неасоційована з целіакією чутливість до глютену) є дотримання суворої довічної безглютенової дієти. В основі такої елімінаційної дієтотерапії лежить повне виключення з раціону продуктів, що містять глютен або його слідові кількості. Принципово важливим є відмова від споживання не тільки тих продуктів, які містять явний глютен – хліба, хлібобулочних, кондитерських і макаронних виробів; пшеничної, манної, ячневої, перлової круп; булгуру, кус-куса, полби, спельти, трітікале, камута; напівфабрикатів м'ясних, рибних та овочевих страв у паніруванні; пельменів, вареників та ін., але й тих, що містять «прихований» глютен у вигляді харчових добавок або контамінацій у разі перехресного забруднення. До нетоксичних щодо целіакії злаків відносять рис, гречку, кукурудзу, пшоно, а також більш екзотичні – амарант, кіноа, монтіна, чуміза, саго, сорго. Безпечними також вважають борошно та крохмалі, виготовлені з коренеплодів, бобових і горіхів. Наведені вище злаки і бобові використовуються у промисловому виробництві безглютенової продукції, здатної частково замінити звичайні борошняні і кондитерські вироби, виготовлені з пшениці [586].

Відтак, до найбільш алергенних злакових культур, які призводять до розвитку целіакії, належать пшениця та її різновиди (камут, полба), жито, ячмінь та меншою мірою овес. З огляду на це, в якості молекулярно-генетичних маркерів для визначення глютенів зазвичай використовують гени запасних білків зерна зазначених вище культур.

ДНК-маркерами для розроблення діагностиків на основі методу ПЛР-РЧ було обрано послідовності генів запасних білків насіння таких злакових культур як пшениця, полба, камут, рис, ячмінь і овес. Дані про послідовності генів бралися із загальнодоступної бази даних GenBank® серверу NCBI [324,587]. Рослинні накопичувальні протеїни відомі своєю високою специфічністю. Цільові послідовності, що кодують високомолекулярні глютеніни (HMW) пшениці (B1-1) та жита (1-R) було обрано для детекції пшениці, камута, полби і жита через їхню високу гомологію та специфічність. Для детекції ячменю тестувалося дві системи. Перша система була заснована на ідентифікації гена *Hov3*, як альтернативну було обрано систему праймерів з зондами, розроблену Hernandez та ін. [280]. Для вівса було обрано ген 12S SSP [588].

3.4.1.1. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до пшениці (*Triticum aestivum*)

Пшениця є одним із основних зернових злаків, що належать до родини злакові (*Gramineae*) або тонконогові (*Poaceae*) і є основним харчовим продуктом по всьому світу. Незважаючи на це, пшениця дуже часто спричиняє харчові алергії у людей. За статистикою, алергія на злакові культури різного ступеня вираженості є приблизно у однієї людини з двохсот. Алергія на пшеницю виникає в результаті підвищеної чутливості організму до пшеничного білка, досить часто може бути спричинена вдиханням її пилку. У разі гіперчутливості до пшениці організм так само гостро реагує на продукти, що містять її похідні.

гТгі а19 омега-5 гліадин – мажорний алерген пшениці, маркер істинної сенсibilізації до пшениці, яка асоційована з миттєвою алергією на пшеницю. Не варто плутати алергію на глютен з целиакією. Целиакія – генетичне захворювання, за якого в організмі відсутній фермент, що розщеплює білок клейковини. У хворих на целиакію продукти з вмістом глютену

пошкоджують ворсинки тонкої кишки, що призводить до зниження всмоктувальної здатності кишківника. Однак найкращий профілактичний захід як для одного, так і для другого захворювання – обмеження контакту з продуктами, що спричиняють таку реакцію [589].

Білки зерна пшениці інтенсивно досліджують більш як два століття, починаючи з роботи Бекари (1745) з виділення клейковини пшениці [590]. Ці білки умовно поділяють на 4 типи за розчинністю: альбуміни – розчинні у воді; глобуліни – в розчинах солей; проламіни – в 70 %-му етанолі; глютеліни – в розчинах лугів. Кожна з фракцій представляє собою складну суміш різних білків з переважанням того чи іншого складника. Звичайно, поділ білків лише на основі їх розчинності – не самий надійний критерій для їх класифікації, однак він залишається актуальним донині.

Альбуміни і глобуліни в зерні пшениці становлять 15–20 % загального білка і є фракцією легкорозчинних білків. Це функціонально активні сполуки: ферменти, інгібітори, нуклеопротеїди, глікопротеїди, пуротіоніни, лектини, тіоніни та ін. При цьому найбільший відсоток серед ферментів належить β -амілазі та α -протеазі. Приблизно 20 % усіх альбумінів у зерні *Triticum aestivum* L. – це головний альбумін, бідний на фенілаланін, гістидин, без вільних SH-груп, але містить багато дисульфідних зв'язків. Запасні білки в зерні пшениці представлено гліадинами і глютенінами і становлять 80–85% від загального білка ендосперму. В своєму складі вони містять 50 % гліадину, 10 % високомолекулярного глютеніну і 40 % низькомолекулярного глютеніну [591,592]. Гліадини є сумішшю індивідуальних поліпептидів, тоді як глютеніни це не індивідуальний білок, а продукт агрегації різнорідних молекул проламіну, що включає також альбумін-глобулінові білки. Глютеніни впливають на пружність, еластичність, в'язкість і розтяжність тіста (реологічні властивості).

Запасні білки – основний складник білків зерна пшениці. Синтезуються запасні білки на полісомах, зв'язаних з мембранами ендоплазматичного ретикулуму і відкладаються в білкових тілах [593]. У пшениці білкові тіла

виявив Мортон та співавт. [594]. Закономірності їх накопичення вивчено недостатньо. За допомогою двовимірного ПААГ-електрофорезу гліадини і глютеніни можна розділити на субодиниці. При цьому гліадини фракціонуються на 40–50 індивідуальних компонентів. Більшість гліадинових фракцій – α , β , ω -гліадини, залежно від їх рухливості в спектрі, складаються з поліпептидів з молекулярною масою 32–44 кД. Найменшу рухливість у кислому ПААГ гелі мають ω -гліадини з молекулярною масою 50–70 кД. Внаслідок редукції дисульфідних зв'язків під впливом 2-меркаптоетанолу утворюються дві групи поліпептидів, які класифікують як високомолекулярні глютеніни (ВМГ) з молекулярною масою 80–150 кД та низькомолекулярні субодиниці з молекулярною масою 40–70 кД. До вільних, або мономерних, S-багатих проламінів належать α , β , ω -гліадини з молекулярною масою 27–44 кД, які містять 2,5–3,5 % цистеїну та метіоніну; ω -гліадини належать до збіднених на сірку проламінів з молекулярною масою 45–80 кД, що практично не містять цистеїну й метіоніну, однак мають високий відсоток глютаміну, проліну, фенілаланіну [595].

В якості молекулярно-генетичних маркерів для визначення ДНК пшениці (*Triticum aestivum*), а також деяких інших представників родини *Triticum* (полба, спельта) нами розроблено два варіанти. В першому випадку було обрано праймери з зондом (Tri) до гена запасного білка ω -гліадину, розроблені К. Björklund [571]. Праймери з зондам підбирали за використання програмного забезпечення Primer Express[®], software v2.0 (Applied Biosystems) та нуклеотидної послідовності гена ω -гліадину пшениці (№ доступу AF280605), представлений в GenBank[®] серверу NCBI [324]. Другу пару праймерів з зондом (Glu) було запропоновано D. Zeltner et al. (2009) [588]. Їх було підібрано до консервативної ділянки гомологічних послідовностей, що кодують глютенін *Glu B1-1* різних видів пшениці та *Glu 1-R* жита з високою молекулярною масою (HMW). Теоретичну гомологію обраних послідовностей перевіряли за допомогою комп'ютерного додатку ClustalW [596]. Для підбору праймерів використовували програмне забезпечення

Primer Express® (Applied Biosystems) та нуклеотидні послідовності *Triticum aestivum* (GenBank № AJ 567980.1; AJ 567959.1), *Triticum durum* (GenBank № AJ 567953), *Triticum spelta* (№ AJ 567953.1). Послідовність обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.71.

Таблиця 3.71

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондами Tri [571] і Glu [588] для визначення *Triticum aestivum*.

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина, п.н.	ГС- склад, %	Tm, °C	Розмір продукту, п.н.
Tri-F	tttgagtagggaggcgacaaat	22	45	65	73
Tri-R	ttgcgtcgactttgggaatt	21	43	63	
Tri-P	Cy5-ttcccgcgcacaaccagtttgat-BHQ2	23	52	70	
Glu-F	cctctttgcggcagtagtygt	21	52/57	65/67	85
Glu-R	ctcgcrctcacabtgtagttg	21	48/57	62/66	
Glu-P	FAM-cctcgtggctctcaccrycgct-BHQ1	22	64/73	71/75	

Синтез олігонуклеотидів замовляли в компанії «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення ω-гліадину пшениці було мічено флуоресційними барвниками Cy5 та гасником флуоресценції BHQ2, для визначення глютеніну *Glu B1-1* – FAM та BHQ1, відповідно. Основні фізико-хімічні характеристики барвників, важливі під час підбору відповідних їм гасників та приладу для детекції флуоресценції, наведено у таблиці 3.75.

3.4.1.2. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до жита (*Secale cereale*)

Жито також відноситься до найбільш алергенних злаків. До її основних алергенів відносяться Sesc1 (інгібітор трипсину / амілази), Sesc 12 (профілін), Sesc 20 (секалін) і гліадин. За алергії на жито можливий розвиток перехресних реакцій на пшеницю, ячмінь, овес і рис. Алергія на пилок жита під час його цвітіння може виникати у пацієнтів з сенсibiliзацією до

житнього борошна, і навпаки. Крім того, у пацієнтів з алергічною реакцією на жито нерідко виявляється підвищення специфічних IgE до горіхів, маку, кунжуту, сої та ківі [597].

В якості молекулярно-генетичних маркерів для визначення ДНК жита (*Secale cereale*) було обрано гени запасного білка ω -секалін жита та глютенін *Glu 1-R* жита з високою молекулярною масою (HMW). Першу пару праймерів з зондом (Sec) було розроблено К. Björklund (2008), для підбору праймерів використовували нуклеотидну послідовність гена ω -секаліну жита (GenBank № AF000227) [571]. Для детекції гена *Glu 1-R* жита було використано пару праймерів з зондом Glu, описану в підрозділі 3.4.1.1. та табл. 3.2 [588]. Для підбору праймерів було використано нуклеотидні послідовності *Secale cereale* (GenBank № AJ 314782.1; AJ 314776.1; AJ 314769.1). Послідовність обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.72.

Таблиця 3.72

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондами Sec [571] і Glu [588] для визначення *Secale cereale*.

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина, п.н.	GC- склад, %	Tm, °C	Розмір продукту, п.н.
Sec-F	cagacgctcgcccgatt	17	65	65	93
Sec-R	acgttctcggaagccaatt	21	43	64	
Sec-P	HEX-cggccaagcaacacgcctctctc-BHQ1	23	65	72	
Glu-F	cctctttgcggcagtagtygt	21	52/57	65/67	85
Glu-R	ctcgcrctcacabtgtagttg	21	48/57	62/66	
Glu-P	FAM-cctcgtggctctcaccrycgct-BHQ1	22	64/73	71/75	

Синтез олігонуклеотидів здійснювався компанією «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення ω -гліадину жита було мічено флуоресційними барвниками HEX та гасником флуоресценції BHQ1. Фізико-хімічні характеристики барвника наведено у таблиці 3.75.

3.4.1.3. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до ячменю (*Hordeum vulgare*)

Під час проведення сортової ідентифікації злакових культур найбільше поширення отримали запасні білки насіння. Тому до комплексу ознак, за якими оцінюють сортовий матеріал, було введено офіційний контроль за гліадинами та глютелінами всієї зернової продукції, як під час закупівлі у виробників, так і в процесі міжнародної торгівлі. Запасні білки є множинними, поліморфними та локалізовані в морфогенетично однорідних тканинах. Спирторозчинні білки зерна ячменю (гордеїни) є однією з найбільш поліморфних систем у даній культурі. Тому гордеїни використовують для швидкої ідентифікації самої культури, а також визначення чистоти та справжності сортів [280,598].

Ячмінь являє собою диплоїдну злакову культуру, білки ендосперму якої поділяються на альбуміни, глобуліни, проламіни (гордеїни) і глютеліни, залежно від їхньої розчинності в різних середовищах (воді, сольових розчинах, спирті). Приблизно половина запасних білків ячменю присутня у проламіновій фракції. Гордеїни становлять приблизно 40 % білка зерна ячменю. У ячменю виділяють чотири класи проламінів – В-, С-, D- і γ -гордеїни, які кодуються локусами *Hor2*, *Hor1*, *Hor3* і *Hor5*, відповідно, на хромосомі 1Н. Зазначені вище локуси кодують білки, які варіюють від одного проламіну (наприклад, D-гордеїн) до родини білків, що містять 20–30 членів (наприклад, В- і С-гордеїни). В- і С-гордеїни зустрічаються відносно частіше, представлені 70 % та 24 % від загальної кількості гордеїнів, відповідно. D- і γ -гордеїни представляють собою мінорні компоненти, приблизно по 2–4 % кожний. Молекулярна маса гордеїнів змінюється приблизно від 35 кДа до 100 кДа [599,600].

Будь-яких проламінів ячменю, які мають близьку гомологію з α -гліадинами пшениці, не виявлено, але загальновідомо, що гордеїни також становлять небезпеку для хворих на целиацію [601].

Тому в якості молекулярно-генетичних маркерів для визначення ДНК ячменю (*Hordeum vulgare*) було обрано гени *B1 hordein* та *γ-hordein*. Перша пара праймерів з зондом (Hor) була розроблена К. Björklund (2008), для підбору праймерів використовували нуклеотидну послідовність гена *B1* гордеїну ячменю (GenBank № X03103) [571]. Для детекції гена *γ-hordein* було використано пару праймерів з зондом (Brl), запропоновану М. Hernandez et al. (2005) [602]. Їх було підібрано до консервативної ділянки гена, що кодує запасний поліпептид ендосперму ячменю за допомогою Primer Express v1.5 (Applied Biosystems). Для підбору праймерів також було використано нуклеотидну послідовність гена *γ-hordein* (GenBank № M36378). Послідовність обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.73.

Таблиця 3.73

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондами Hor [571] і Brl [602] для визначення *Hordeum vulgare*.

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжи- на, п.н.	GC- склад, %	Tm, °C	Розмір продук- ту, п.н.
Hor-F	tggtgtacatccaccccttg	22	45	64	81
Hor-R	caggaacttgacggcagattct	22	50	65	
Hor-P	ROX-tgtccagcaaaagaacgccatttcg-BHQ2	25	48	69	
Brl-F	agacaaggcgtgcagatcg	19	58	65	73
Brl-R	gaccctggacgagcacacat	20	60	67	
Brl-P	ROX-cctcagccgcaacaggtgggtc-BHQ2	22	68	72	

Синтез олігонуклеотидів здійснювався компанією «Metabion international AG» (Німеччина). Зонди для визначення генів *B1 hordein* та *γ-hordein* було мічено флуоресційними барвниками ROX та гасником флуоресценції BHQ2. Фізико-хімічні характеристики барвника наведено у таблиці 3.75.

3.4.1.4. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондами до вівса (*Avena sativa*)

Целіакія виникає через негативну реакцію організму людини на гліадин

(клейковинний білок), що перешкоджає засвоєнню поживних речовин. Науково підтверджено, що найбільш токсичними для хворих на целиацію є такі проламіни, як гліадин пшениці, секалін жита та хордеїн ячменю.

Щодо овеніну вівса дані дещо суперечливі. Сучасні сорти вівса містять від 9 до 19,5 % білка в складі зерна, в деяких сортах ця цифра може сягати 24 %. За складом білків зерно вівса істотно відрізняється від пшениці, жита та ячменю. У складі вівса в кількісному співвідношенні переважають глютеліни (43–80 %), потім слідує проламіни (12–58 %) і глобуліни (17–55 %). Білки вівса містять в 2–2,5 рази менше глютамінової кислоти та значно більше аргініну, ніж білки зерен пшениці і ячменю. Овес не містить білків глютенної групи, характерних для пшениці. Однак серед проламінів вівса зустрічається білок авенін, який за своїми властивостями близький до гліадину, що міститься у пшениці [603].

Австралійські вчені стверджують, що до 20 % хворих на целиацію реагують на авенін так само, як і на гліадин пшениці. Інші джерела вказують на те, що чутливість до авеніну має лише 1 % пацієнтів з діагностованою целиацією. Крім того, є дані, що авенін вівса взагалі не спричиняє атрофії слизової оболонки тонкої кишки і підвищення аутоантитіл, але неможливо виключити контамінацію продуктів з вівса іншими злаками, тому його також не рекомендується вживати за целиакії [604-606].

Як мішень для визначення ДНК вівса (*Avena sativa*) було обрано гени запасних білків вівса – *avenin* та *12S seed storage protein*. Першу пару праймерів з зондом (Ave) було розроблено К. Björklund (2008), для підбору праймерів використовували нуклеотидну послідовність гена запасного білка насіння вівса (seed storage protein genes of oats) (GenBank № J05486) [571]. Для детекції гена *12S* було використано пару праймерів з зондом (Oat), запропоновану D. Zeltner et al. (2008) [588]. Для підбору праймерів ми використали нуклеотидні послідовності *Avena sativa* (GenBank № J05686.1; X17637). Послідовність обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.74.

Таблиця 3.74

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондами Ave [571] і Oat [588] для визначення *Avena sativa*

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина, п.н.	GC- склад, %	Tm, °C	ПЛР продукт, п.н.
Ave-F	gagtaagaaccaggtgcagatgatag	26	46	65	81
Ave-R	atccaatgcatgtcagccaata	22	41	63	
Ave-P	FAM-aggtcacaaactcacaaagcctcaccattaaaga-BHQ1	32	44	72	
Oat-F	agccagatcgaggaaagac	20	55	65	64
Oat-R	atgcattggcgaggacatc	19	53	63	
Oat-P	Cy5-tccatcctacgtgcattgcccgt-BHQ2	23	57	71	

Синтез олігонуклеотидів здійснювався компанією «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення гена *avenin* вівса було мічено флуоресційними барвниками ROX та гасником флуоресценції BHQ2, для визначення гена *12S* – Cy5 та BHQ2, відповідно. Фізико-хімічні характеристики флуоресційних барвників наведено у таблиці 3.75.

Таблиця 3.75

Характеристика флуорофорів індодікарбоціанину (Cy5), 6-карбокси-флуоресцеїну (FAM), 6-карбокси-X-родаміну (ROX), 4,7,2',4',5',7'-гексахлоро-6-карбокси-флуоресцеїну (HEX), використаних під час розроблення тест-системи

Назва	Mr	λ макс. поглинання, нм	λ макс. флуоресценції, нм	λ макс. мол. коефіцієнт поглинання, M ⁻¹ *cm ⁻¹	квантовий вихід
Cy5	431,0	646	662	250,000	~ 0,7
FAM	376,3	495	520	75,000	~ 0,8
ROX	534,68	576	601	82,000	~ 0,8
HEX	390,26	535	556	98,000	~ 0,75

Оскільки обрані нами праймери мали бути використані для розроблення тест-системи у форматі мультиплексу, їх додатково було перевірено на теоретичну специфічність за допомогою алгоритму *BLAST* серверу NCBI

[325]. Проведений *BLAST*-аналіз показав 100 % специфічність обраних олігонуклеотидних праймерів. Крім того, за допомогою програми *Vector NTI AdvanceTM* 9.1.0 було оцінено вторинну структуру всіх обраних олігонуклеотидів та відсутність здатності до утворення так званих «шпильок» та праймер-димерів [484].

3.4.2. Проведення ПЛР-РЧ та оцінювання продуктивності обраних праймерів та зондів

Підбір умов ампліфікації обраних праймерів та зондів здійснювали за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). У всіх дослідженнях з розроблення тест-системи кожену ПЛР-реакцію проводили у двох повторностях.

Об'єм реакційної суміші обирали експериментально. Оптимальним виявився об'єм реакційної суміші в 20 мкл, з яких 2 мкл – розчин ДНК. Реакційна суміш містила 1x Taq-буфер (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 0,2 mM дНТФ суміш; 2,5 mM MgCl₂, 20 пкмоль праймерів; 10 пкмоль зонду; 50-500 нг ДНК та 1 од. Taq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) (табл. 3.76).

Таблиця 3.76

Протокол приготування реакційної суміші для проведення ПЛР-РЧ

Компоненти	Кінцева концентрація в ПЛР-суміші	мкл/реакцію
Taq-буфер 10x	1x	2
дНТФ 2 mM кожного	0,2 mM кожного	2
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2
Taq ДНК полімераза (5 од./мкл)	0,05 од./мкл	0,2
Зразок ДНК	50–500 нг	2
Праймер F (100 пкмоль)	20 пкмоль	4
Праймер R (100 пкмоль)	20 пкмоль	4
Зонд Р (100 пкмоль)	10 пкмоль	2
Деіонізована H ₂ O	-	до 20 мкл
Кінцевий об'єм:	20 мкл	

Первинне оцінювання роботи праймерів здійснювали за величинами граничного циклу (C_t) та рівнем репортерної флуоресценції (ΔR_n). Найкращим результатам відповідають найменші значення C_t та найбільші – ΔR_n . На першому етапі досліджень перевіряли роботу кожної пари праймерів з зондом окремо.

Для проведення процедури ампліфікації було використано двохстадійний температурний профіль, притаманний ПЛР у реальному часі (табл. 3.77). Розрахунок температури гібридизації праймерів (T_a) здійснювали за допомогою формули $T_a \approx T_m - 5$, де T_m – температура плавлення праймерів [241].

Таблиця 3.77

Протокол підбору умов ампліфікації для первинного оцінювання роботи праймерів

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація і синтез	60	40	так	

На рисунках 3.52–3.54 представлено результати первинного оцінювання роботи семи пар праймерів з зондами, підібраних для ідентифікації ДНК чотирьох злакових культур. Під час оптимізації умов ампліфікації використовували тотальну ДНК, виділену із зерен пшениці, жита, вівса та ячменю. Для екстракції ДНК було використано набір власного виробництва «ГМО ДНК №1 (ЦТАБ)», а також комерційний набір «СОРБ-ГМО-Б» (Синтол, РФ). Якісне та кількісне оцінювання препаратів ДНК здійснювали спектрофотометрично (див. розділ 2.4). Роботу кожної з пар праймерів з зондом оцінювали одночасно на ДНК всіх чотирьох злаків.

За результатами досліджень, як видно з рисунка 3.52 (а), з праймерами Tr1 було отримано два позитивних сигнали. Сильніший сигнал ($C_t=24,96 \pm 0,279$; $\Delta R_n=250$) було отримано на ДНК із пшениці, до якої і було

підбрано ці праймери, та значно слабший сигнал ($C_t=31,66\pm0,228$; $\Delta Rn=125$) – на ДНК з ячменю. Подібну ситуацію спостерігали і з праймерами Sec. Вони спрацювали не тільки на тій культурі, до якої підбиралися, – житі ($C_t=24,07\pm0,074$; $\Delta Rn=300$), але, крім того, дали неспецифічний сигнал на ДНК із пшениці ($C_t=28,94\pm3,522$; $\Delta Rn=75$). Стосовно праймерів Glu, підібраних для визначення ДНК пшениці і жита, вони давали позитивний сигнал з усіма чотирма культурами

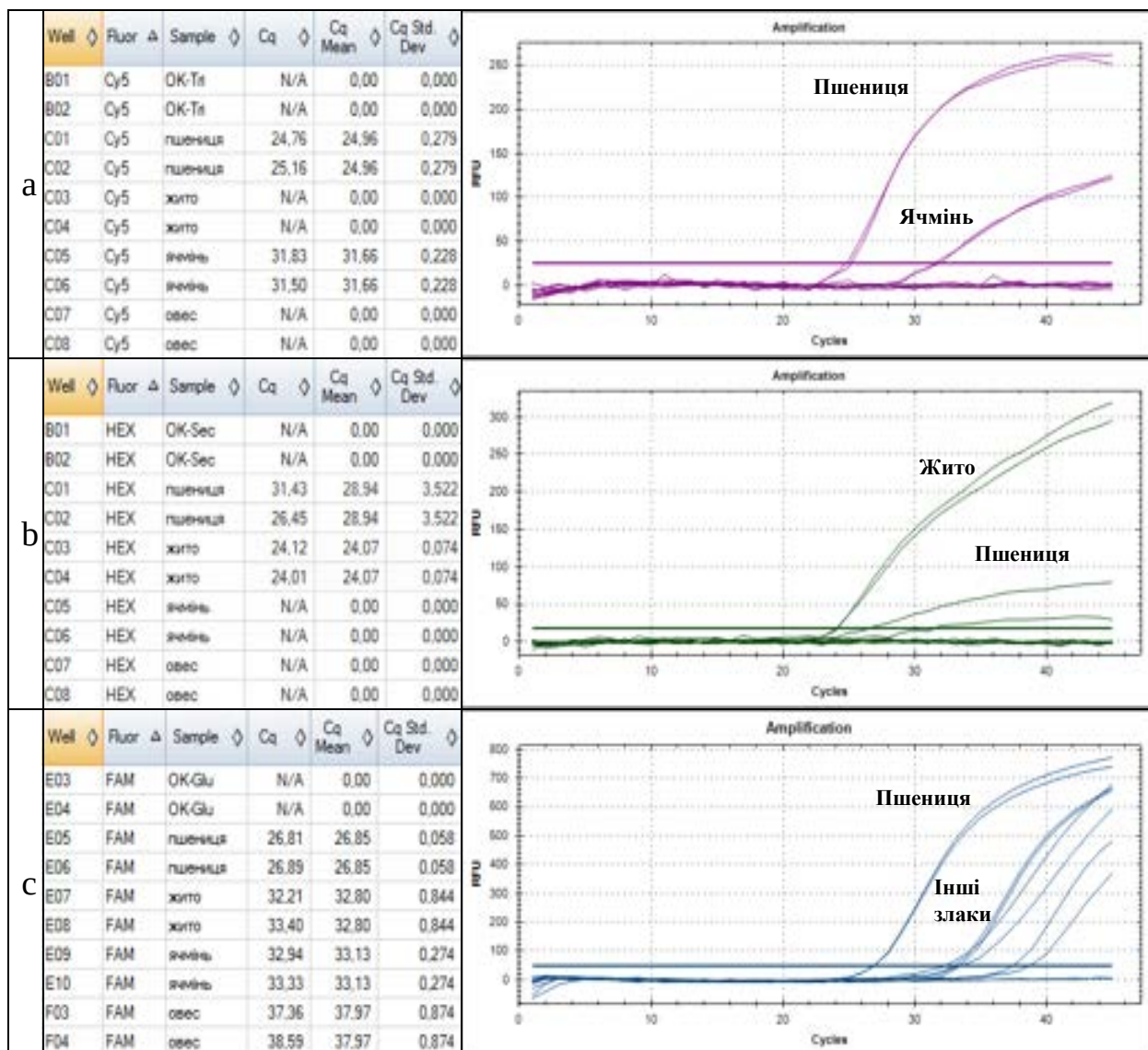


Рис. 3.52. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Оцінювання роботи трьох пар праймерів з зондами, підібраних для визначення ДНК пшениці та жита: а – праймери Tri, б – праймери Sec, с – праймери Glu.

Порівняльні дослідження двох пар праймерів з зондами, підібраних для виявлення ДНК вівса, представлено на рисунку 3.53 (а, б). Видно, що більша

специфічність притаманна парі Ave – $C_t=27,99\pm0,142$; $\Delta R_n=600$. Друга пара олігонуклеотидів (Oat) давала позитивний сигнал не тільки на ДНК вівса ($C_t=24,98\pm0,075$; $\Delta R_n=140$), але також неспецифічний сигнал на ДНК пшениці ($C_t=37,86\pm0,540$; $\Delta R_n=40$). Треба зауважити, що значення C_t для пари праймерів Oat, отримане на ДНК вівса, було дещо меншим, ніж для пари Ave, хоча і за меншої ΔR_n .

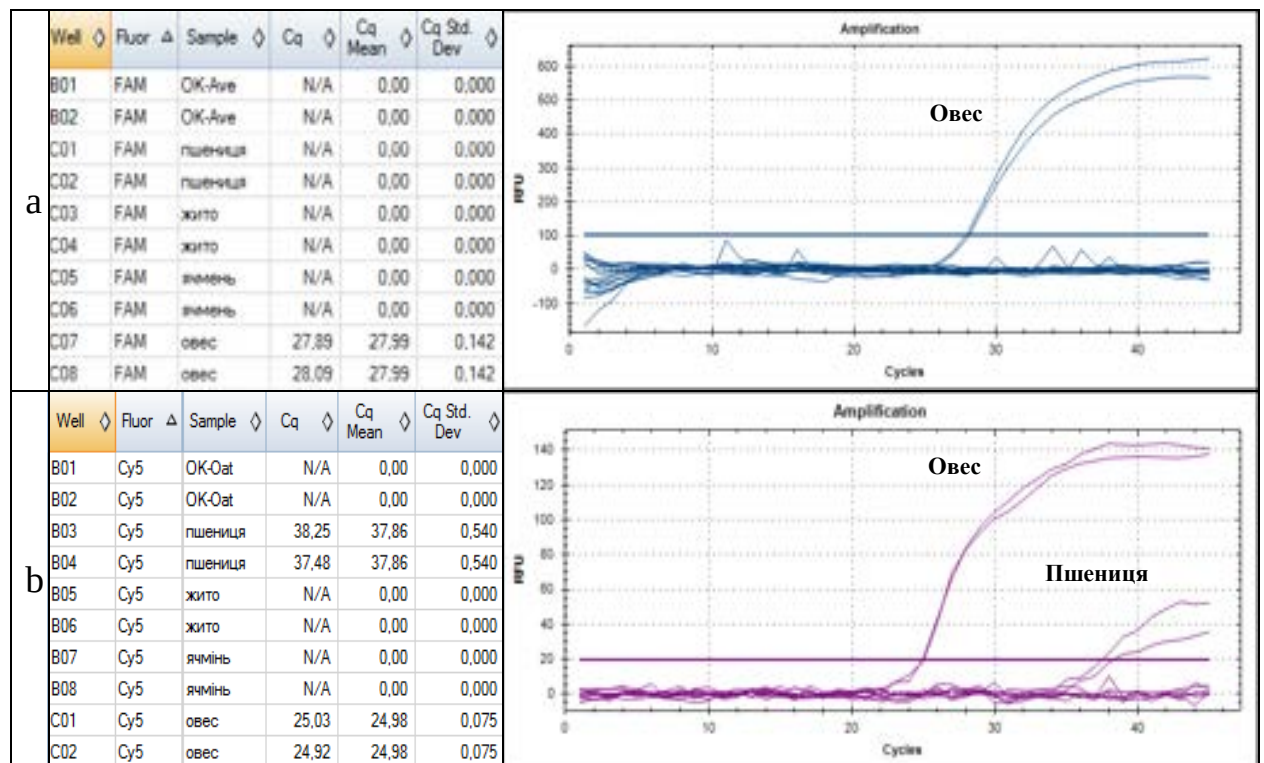


Рис. 3.53. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Оцінювання роботи двох пар праймерів з зондами, підібраних для визначення ДНК вівса: а – праймери Ave, b – праймери Oat.

Стосовно двох останніх пар праймерів (Hog, Brl), підібраних для визначення ячменю, вони також потребували доопрацювання умов ампліфікації (рис. 3.54). Пара праймерів Hog давала два позитивних сигнали, більший – специфічний на ДНК ячменю ($C_t=23,38\pm0,097$; $\Delta R_n=800$), та менший – неспецифічний на ДНК жита ($C_t=28,13\pm0,111$; $\Delta R_n=750$). Стосовно пари Brl, було отримано сигнали за всіма чотирма культурами з перевагою специфічного сигналу на ДНК ячменю – $C_t=23,94\pm0,043$; $\Delta R_n=450$.

Первинний аналіз обраних праймерів показав, що більшість із них потребує подальшої оптимізації за умовами ампліфікації. Порівнюючи та співставляючи такі показники, як C_t та ΔR_n , а також наявність та рівень

неспецифічних сигналів ампліфікації, для подальших досліджень було відібрано лише чотири пари праймерів з такими зондами: Trі – для визначення пшениці, Sec – для визначення жита, Ave – для вівса та Ног – для ячменю.

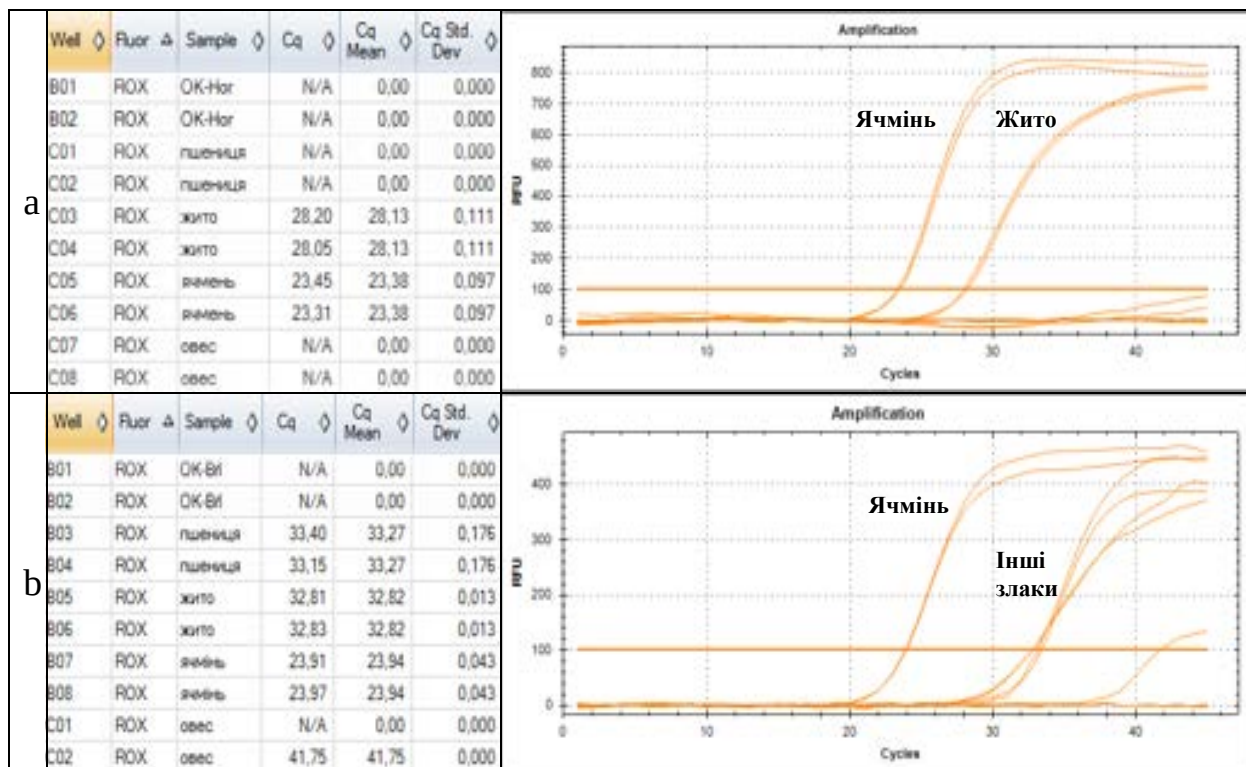


Рис. 3.54. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Оцінювання роботи двох пар праймерів з зондами, підібраних для визначення ДНК ячменю: а – праймери Ног, b – праймери Brl.

3.4.3. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу

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. Оцінювання проводили згідно з вимогами до тест-систем, розроблених на основі методу ПЛР [306].

Наступну оптимізацію роботи обраних праймерів проводили у форматі мультиплексу. Для цього було сформовано дві мультиплексні системи (табл.

3.78), які в подальшому лягли в основу тест-системи «Глютен-скринінг». 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. Детальну інформацію щодо цієї пари праймерів наведено у розділі 3.3.3.5.

Таблиця 3.78

Характеристика сформованих мультиплексних систем для визначення глютену чотирьох злакових культур

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

Оптимізацію умов ампліфікації двох мультиплексних систем проводили за такими параметрами як температура гібридизації праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів.

Для оптимізації ПЛР за температурою гібридизації праймерів було обрано чотири температурних значення – 55, 60, 63 та 65/66 °C. Формат процедури ампліфікації не змінювали (табл. 3.77). Концентрацію йонів магнію (Mg^{2+}), концентрацію та співвідношення праймерів і зондів було використано такі, як і в попередніх дослідженнях (табл. 3.76). Результати підбору оптимальної температури гібридизації праймерів у форматі мультиплексів наведено на рисунках 3.55–3.58.

Під час оптимізації двох мультиплексних систем було також використано ДНК чотирьох культур – пшениці, жита, вівса та ячменю. Для спрощення подання результатів у таблицях наведено значення St лише тих культур, до яких було підібрано праймери. Дослідження мультиплексної системи №1 показало, що збільшення температури T_a по-різному впливає на кожну окрему пару праймерів. Так, для пари праймерів Tri, підібраної для

визначення гена ω -гліадину пшениці (канал Cy5), найкращі результати було отримано за двома температурами – 60 та 63°C. За температури 55 °C ще спостерігали незначну неспецифіку зі зразками ДНК інших злаків, тимчасом за $T_a=66^\circ\text{C}$ вже значно збільшувалося значення C_t та зменшувалося ΔR_n (рис. 3.55 a–d).

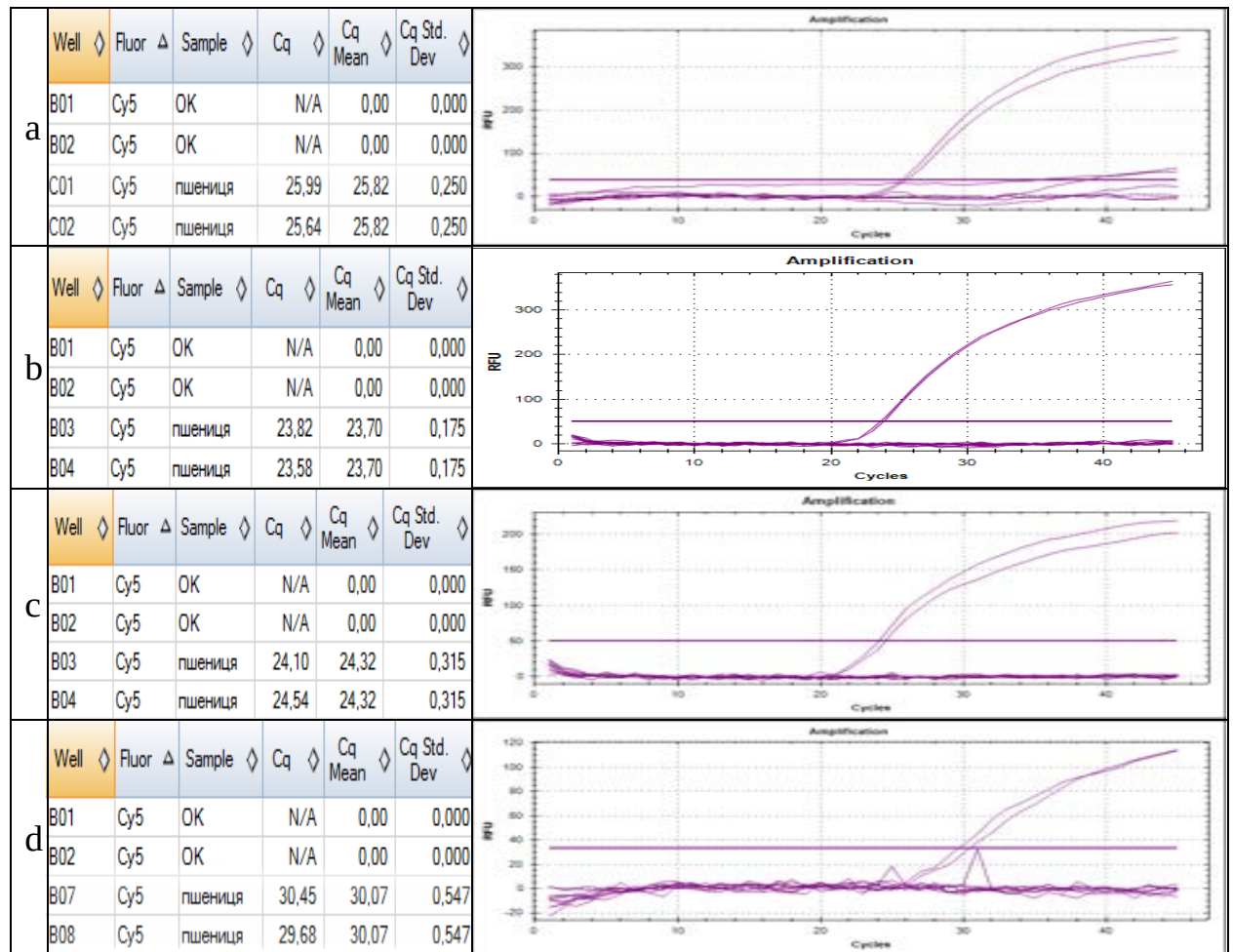


Рис. 3.55. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення величин C_t під час підбору умов ампліфікації з праймерами Tr1 за температурою гібридизації T_a : а – $T_a=55^\circ\text{C}$; б – $T_a=60^\circ\text{C}$; в – $T_a=63^\circ\text{C}$; д – $T_a=66^\circ\text{C}$.

Для наступної пари праймерів Sec (канал Hex), підібраної для визначення ДНК жита, також найбільш оптимальними виявилися температури 60 та 63°C. За даними температурами значення C_t практично не різнилися – $22,55 \pm 0,034$ та $22,80 \pm 0,188$, відповідно. Стосовно показника ΔR_n , зі збільшенням T_a на 3 °C його значення зменшувалося з 1075 до 790 rfu. Подальше збільшення T_a призводило до суттєвого збільшення C_t та зменшення ΔR_n (рис. 3.56 a–d).

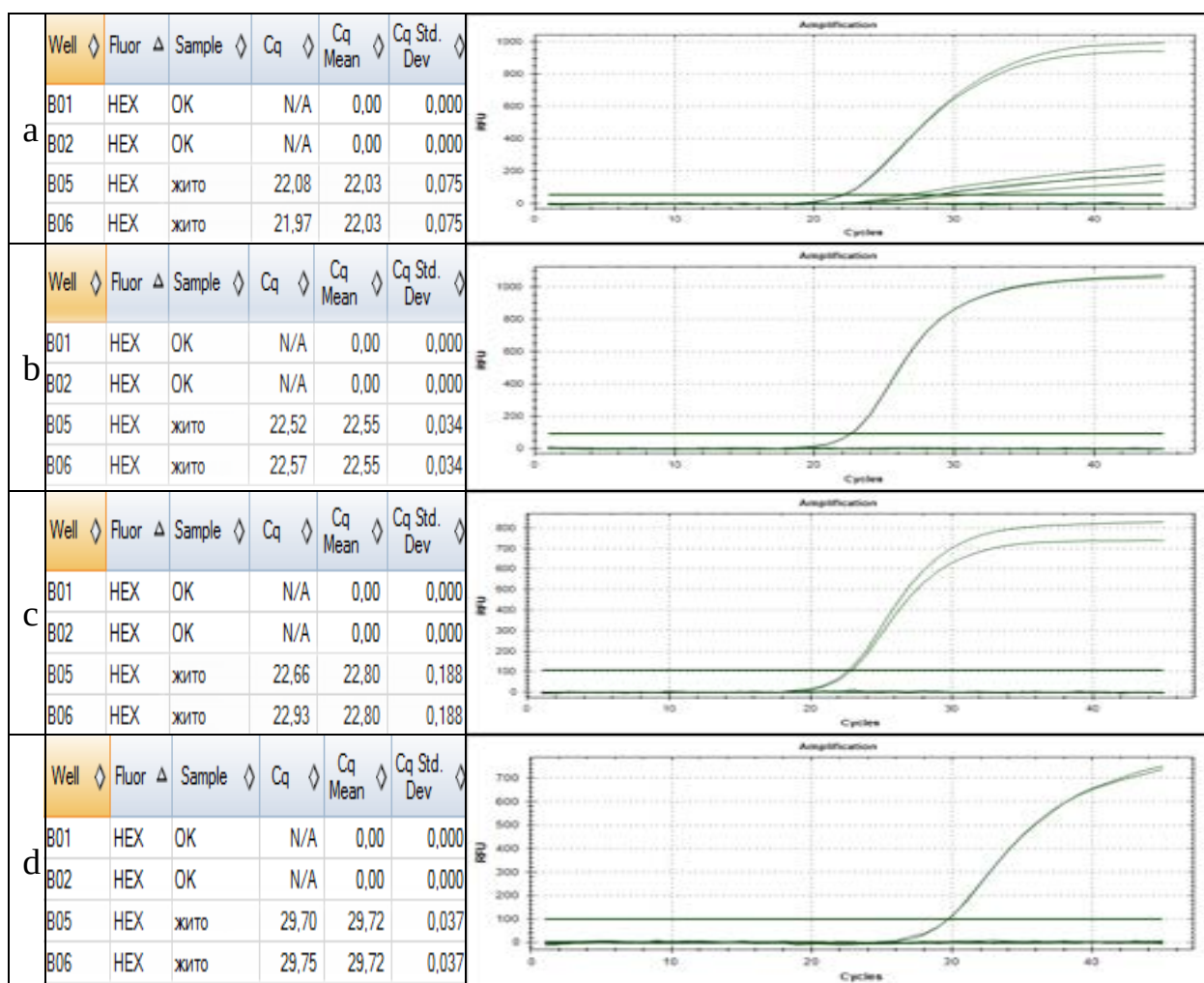


Рис. 3.56. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення величин C_t під час підбору умов ампліфікації з праймерами Sec за температурою гібридизації T_a : а – $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$; б – $T_a = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$; с – $T_a = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$; д – $T_a = 66\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Схожу ситуацію спостерігали з праймерами Ave, підібраними для визначення ДНК вівса (канал Fam). Вже за $T_a = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ повністю зникли неспецифічні продукти ампліфікації. Подальше підвищення температури гібридизації до $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ призводило до збільшення значення C_t з $28,16 \pm 0,080$ до $35,14 \pm 0,089$ за незначних коливань показника ΔR_n (рис. 3.57 а–д).

Оптимізацію мультиплексу №2 також проводили зі зразками ДНК всіх чотирьох культур. За спектром температур гібридизації від 55 до $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ для праймерів Hor, підібраних для визначення ячменю, спостерігали присутність неспецифічних графіків ампліфікації (рис. 3.58 а–с). Значення C_t за каналом Rox при цьому коливалися в межах від $22,65 \pm 0,012$ до $24,70 \pm 0,274$, а ΔR_n – 1440 – 600 rfu . За підвищення T_a до $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ спостерігали лише специфічну

ампліфікацію на ДНК ячменю. Значення C_t та ΔR_n за даної температури становили $26,00 \pm 0,054$ та 600 rfu, відповідно.

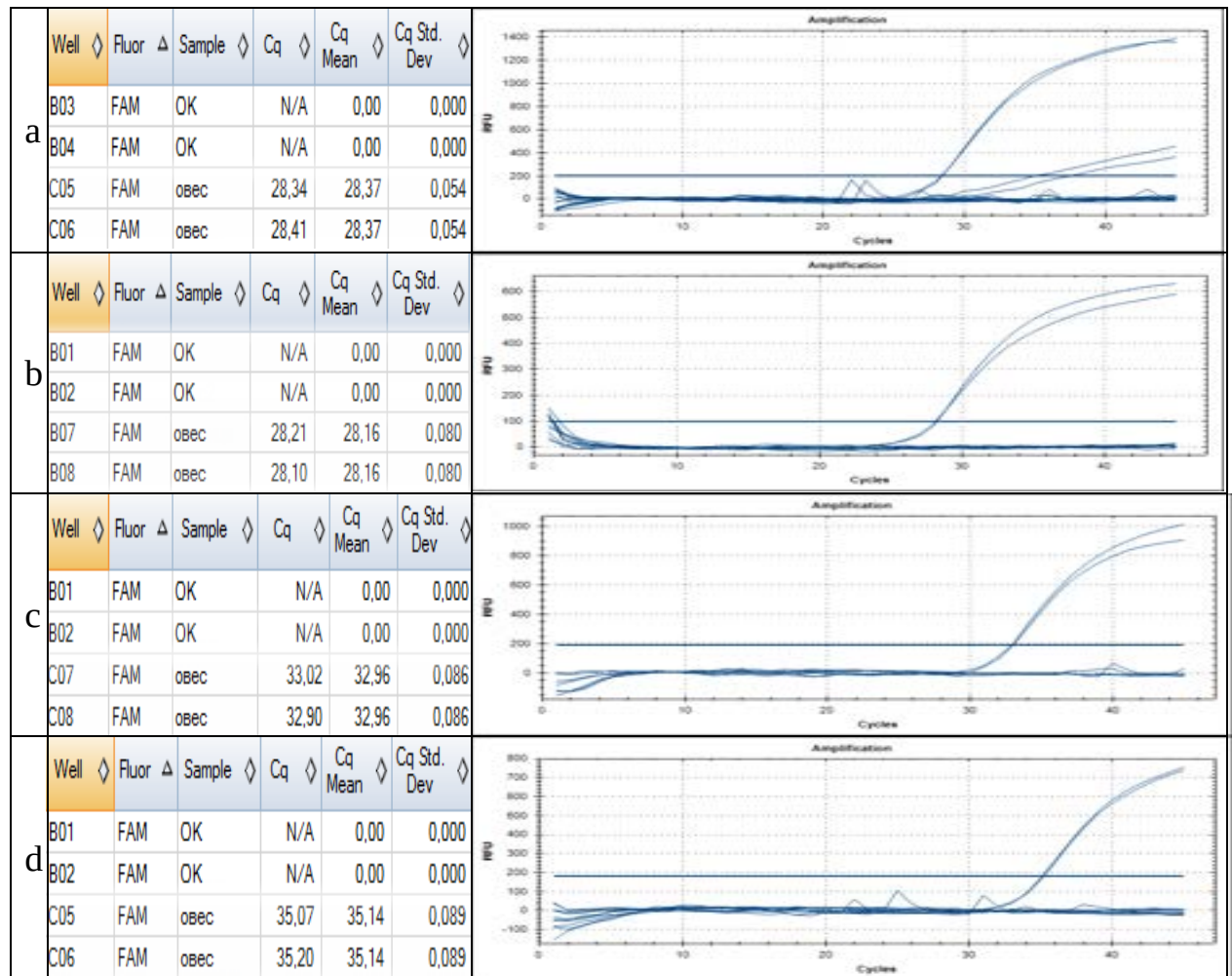


Рис. 3.57. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення величин C_t під час підбору умов ампліфікації з праймерами Ave за температурою гібридизації T_a : а – $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$; б – $T_a = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$; в – $T_a = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$; д – $T_a = 66\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Стосовно внутрішнього ендогенного контролю перебігу ПЛР (ген *psbA* хлоропластної ДНК), якому відповідає канал Нех, специфічну ампліфікацію спостерігали за всіма досліджуваними температурами, а значення C_t для зразка ДНК ячменю коливалось від $18,31 \pm 0,068$ до $22,59 \pm 1,142$. З підвищенням T_a відбувалося зменшення значення ΔR_n з 600/500 до 300/200 rfu, а також з'являлися розбіжності в профілях ампліфікації досліджуваних зразків (рис. 3.59 д).

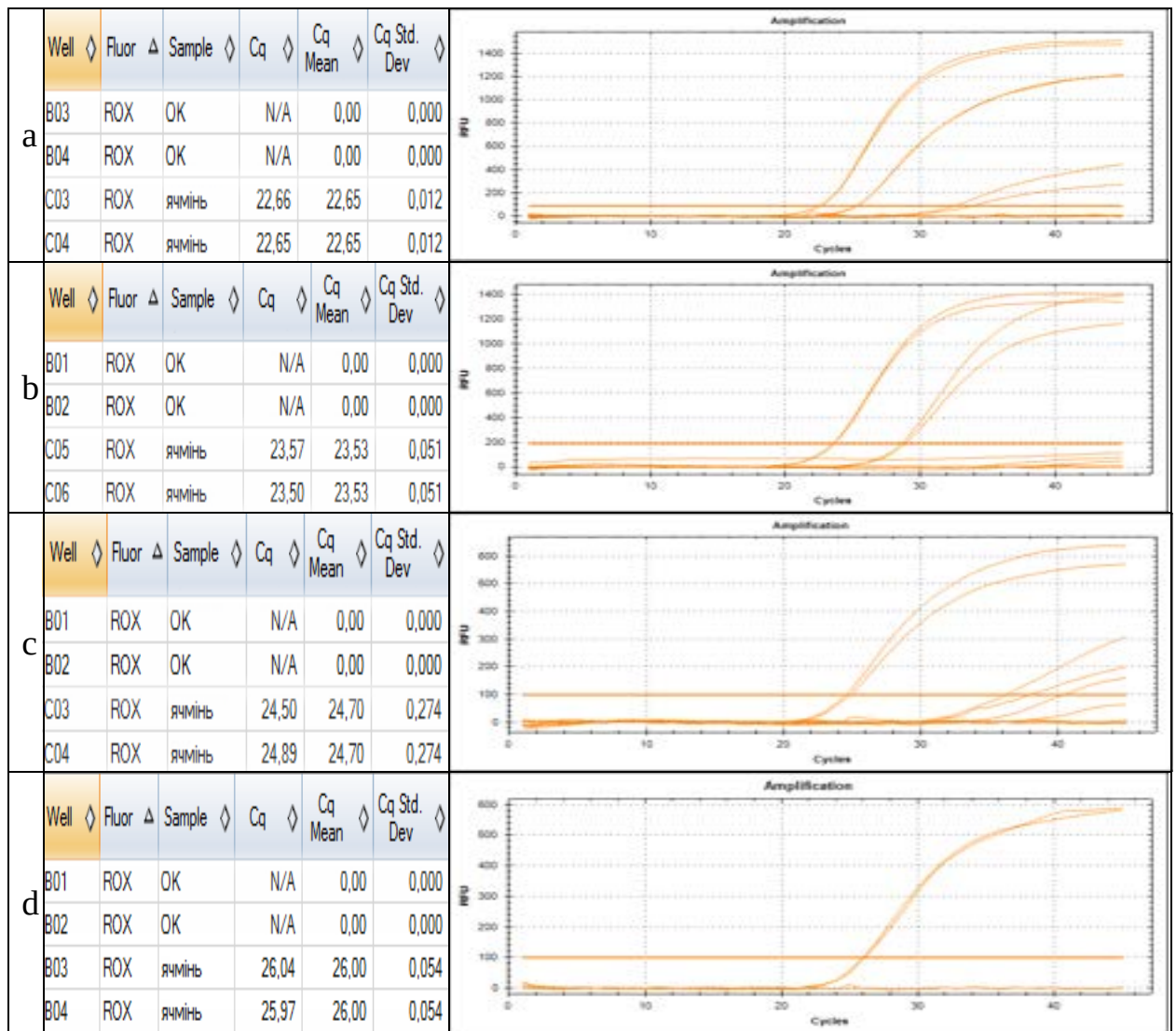


Рис. 3.58. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення величин C_t під час підбору умов ампліфікації з праймерами Ног за температурою гібридизації T_a : а – $T_a=55\text{ }^{\circ}\text{C}$; б – $T_a=60\text{ }^{\circ}\text{C}$; с – $T_a=63\text{ }^{\circ}\text{C}$; д – $T_a=65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Таким чином, проведені дослідження з оптимізації умов ампліфікації дали змогу встановити оптимальну температуру роботи праймерів за цим показником. У мультиплексній системі №1 для праймерів Trі, Sec та Ave оптимальною виявилась температура 60°C . Стосовно мультиплексу №2, оптимальна температура гібридизації праймерів становила 65°C .

Наступним етапом з оптимізації умов ампліфікації мультиплексів був підбір оптимальної концентрації MgCl_2 . Для оптимізації ПЛР за даним показником було обрано від чотирьох до п'яти точок – 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 та 5,5 мМ MgCl_2 . За найкращу концентрацію вважали ту, за якої спостерігалось найменше значення C_t та найбільше значення ΔR_n .

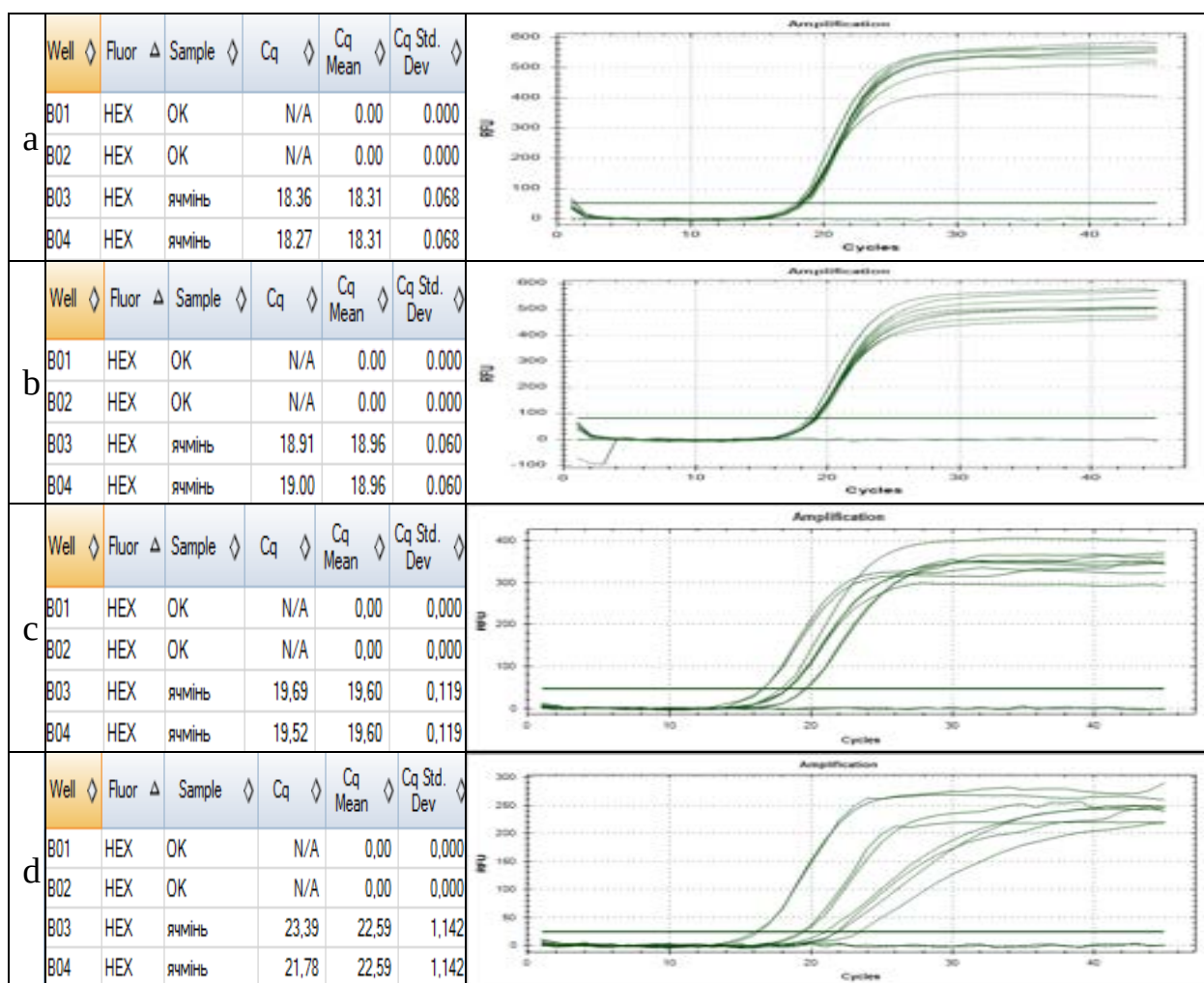


Рис. 3.59. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ та значення величин C_t під час підбору умов ампліфікації з праймерами *Psb2* за температурою гібридизації T_a : а – $T_a=55\text{ }^{\circ}\text{C}$; б – $T_a=60\text{ }^{\circ}\text{C}$; с – $T_a=63\text{ }^{\circ}\text{C}$; д – $T_a=65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

На рисунках 3.60 (а–с) наведено дані дослідження з оптимізації умов ампліфікації мультиплексу №1 за концентрацією іонів Mg^{2+} від 1,5 та 4,5 мМ. Для каналу $\text{Trf/Cy5/фіолетовий}$, який відповідає пшениці, середнє значення C_t практично не змінювалось та знаходилось у межах від $25,60 \pm 0,055$ до $25,15 \pm 0,161$. Стосовно нормованого сигналу ΔR_n , зі збільшенням концентрації MgCl_2 його значення зростало з 265 до 415 rfu. Подібну картину спостерігали за каналом Sec/HEX/зелений , що відповідає житу. Значення C_t лежали в межах $23,43 \pm 0,032$ – $23,51 \pm 0,055$, тимчасом значення ΔR_n зростало з 588 до 973 rfu. За збільшення концентрації іонів Mg^{2+} за каналом Ave/FAM/синій (овес) відбувалося зменшення значення C_t на один цикл, з $28,12 \pm 0,602$ до $27,15 \pm 1,303$. Значення ΔR_n , як і за іншими

каналами, за збільшення концентрації $MgCl_2$, зростало (377–685 rfu).

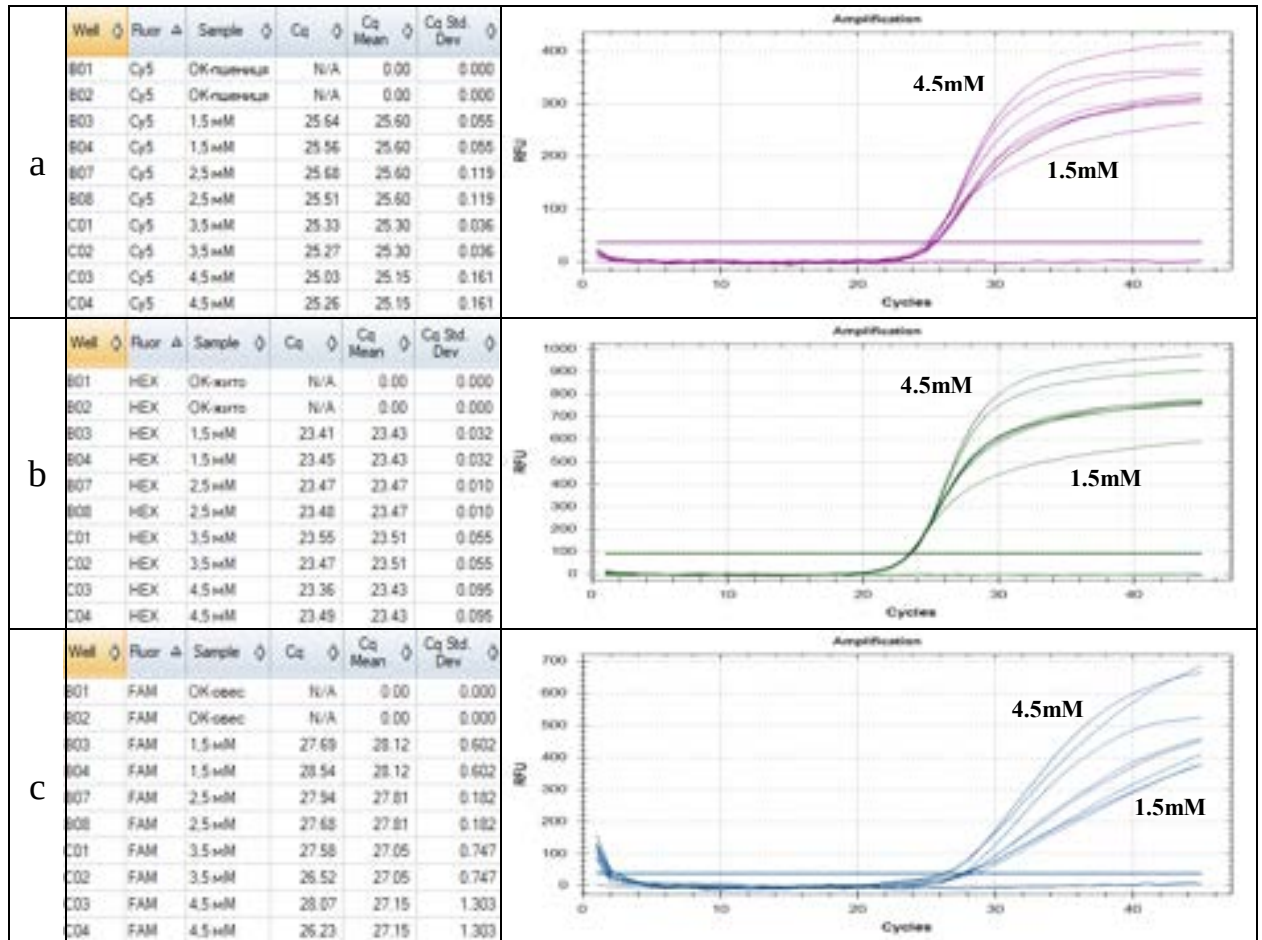


Рис. 3.60. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ при оптимізації умов ампліфікації за концентрацією йонів Mg^{2+} : а – канал флуоресценції Trf/Cy5/фіолетовий; б – канал Sec/HEX/зелений; с – канал Ave/FAM/синій.

Праймери, що входили до складу мультиплексу №2, дещо сильніше реагували на зміни концентрації йонів Mg^{2+} (рис. 3.61 а–б). У даному випадку було використано п'ять точок концентрацій від 1,5 до 5,5 мМ. Так, для каналу Hor/ROX/помаранчевий, що відповідає ячменю, середні значення St зменшувалися зі зростанням концентрації $MgCl_2$ від $26,58 \pm 0,637$ до $23,89 \pm 0,033$. Стосовно показника ΔRn , як і у випадку мультиплексу №1, зі збільшенням концентрації $MgCl_2$, його значення зростали з 517 до 1072 rfu. За каналом Psb2/HEX/зелений (внутрішній ендогенний контроль) значення St зменшувалися з $20,79 \pm 0,058$ по $18,44 \pm 0,034$, а значення ΔRn збільшувалися з 283 до 677 rfu.

За результатами проведених досліджень з оптимізації умов ампліфікації

за концентрацією MgCl_2 було обрано найбільш прийнятну величину для двох мультиплексних систем, яка становила 3,5 mM.

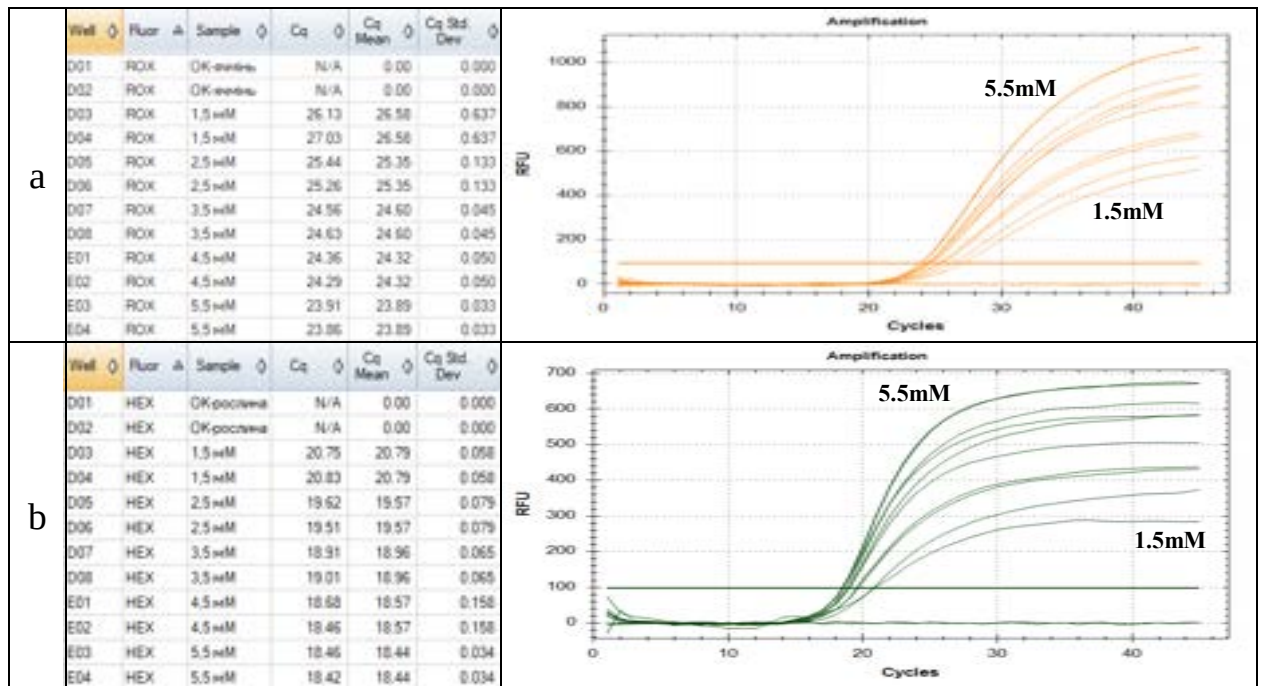


Рис. 3.61. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ при оптимізації умов ампліфікації за концентрацією йонів Mg^{2+} : а – канал флуоресценції Nor/ROX/помаранчевий; б – канал Psb2/HEX/зелений.

Попередньо проведена оптимізація роботи праймерів за температурою гібридизації та концентрацією йонів Mg^{2+} в двох мультиплексних системах дала змогу досягти оптимальних результатів ампліфікації ДНК-мішеней. Тому з фінансово-економічних міркувань було вирішено не проводити подальшу оптимізацію мультиплексів за таким параметром як концентрація праймерів та зондів, а залишити ті концентрації, які було використано під час проведення попередніх досліджень – 20 пкмоль/реакцію для праймерів та 10 пкмоль/реакцію для зондів.

3.4.3.1. Дослідження специфічності та ефективності роботи 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*), ячміннь (*Hordeum vulgare*), просо (*Panicum miliaceum*), амарант (*Amaranthus caudatus*), рис (*Oryza sativa*), кукурудза (*Zea mays*), гречка (*Fagopyrum esculentum*), томати (*Lycopersican esculentum*), картопля (*Solanum tuberosum*), ріпак (*Brassica napus*), соя (*Glycine max*), ковила (*Stipa*), пирій повзучий (*Elymus repens*), тимофіївка лучна (*Phléum pratense*).

У таблиці 3.79 наведено результати перевірки специфічності роботи праймерів, підібраних для визначення пшениці, жита, вівса та ячменю. Видно, що всі чотири пари праймерів з зондами мають 100 % специфічність до обраних мішеней та можуть бути використані у подальших дослідженнях.

Таблиця 3.79

**Перевірка специфічності роботи праймерів (Tri, Sec, Ave, Hor),
підібраних для визначення ДНК пшениці, жита, вівса та ячменю**

№	Зразки ДНК	Праймери з зондами			
		Tri/Cy5	Sec/ Hex	Ave/Fam	Hor/Rox
1	<i>Triticum aestivum</i>	+	—	—	—
2	<i>Triticum dicoccum</i>	+	—	—	—
3	<i>Triticum spelta</i>	+	—	—	—
4	<i>Secale cereal</i>	—	+	—	—
5	<i>Avena sativa</i>	—	—	+	—
6	<i>Hordeum vulgare</i>	—	—	—	+
7	<i>Panicum miliaceum</i>	—	—	—	—
8	<i>Amaranthus caudatus</i>	—	—	—	—
9	<i>Oryza sativa</i>	—	—	—	—
10	<i>Zea mays</i>	—	—	—	—
11	<i>Fagopyrum esculentum</i>	—	—	—	—
12	<i>Lycopersican esculentum</i>	—	—	—	—
13	<i>Solanum tuberosum</i>	—	—	—	—
14	<i>Brassica napus</i>	—	—	—	—
15	<i>Glycine max</i>	—	—	—	—
16	<i>Stipa</i>	—	—	—	—
17	<i>Elymus repens</i>	—	—	—	+
18	<i>Phléum pratense</i>	—	—	—	+

Під час проведення перевірки на специфічність перехресних реакцій виявлено не було. Позитивні сигнали з праймерами Tri, Sec, Ave, Hor було отримано лише на ДНК тих культур, до яких вони підбиралися. Слід

зазначити, що праймери Tri спрацювали на всіх трьох культурах, які належать до роду Пшениця – пшениця м'яка, або звичайна; полба; спельта. На рисунку 3.62 наведено результати ПРЧ-РЧ аналізу з перевірки специфічності роботи праймерів, підібраних для ідентифікації ДНК пшениці, жита, вівса та ячменю. Видно, що всі чотири пари праймерів з зондами мають 100 % специфічність до обраної мішені та можуть бути використані під час розроблення тест-системи.

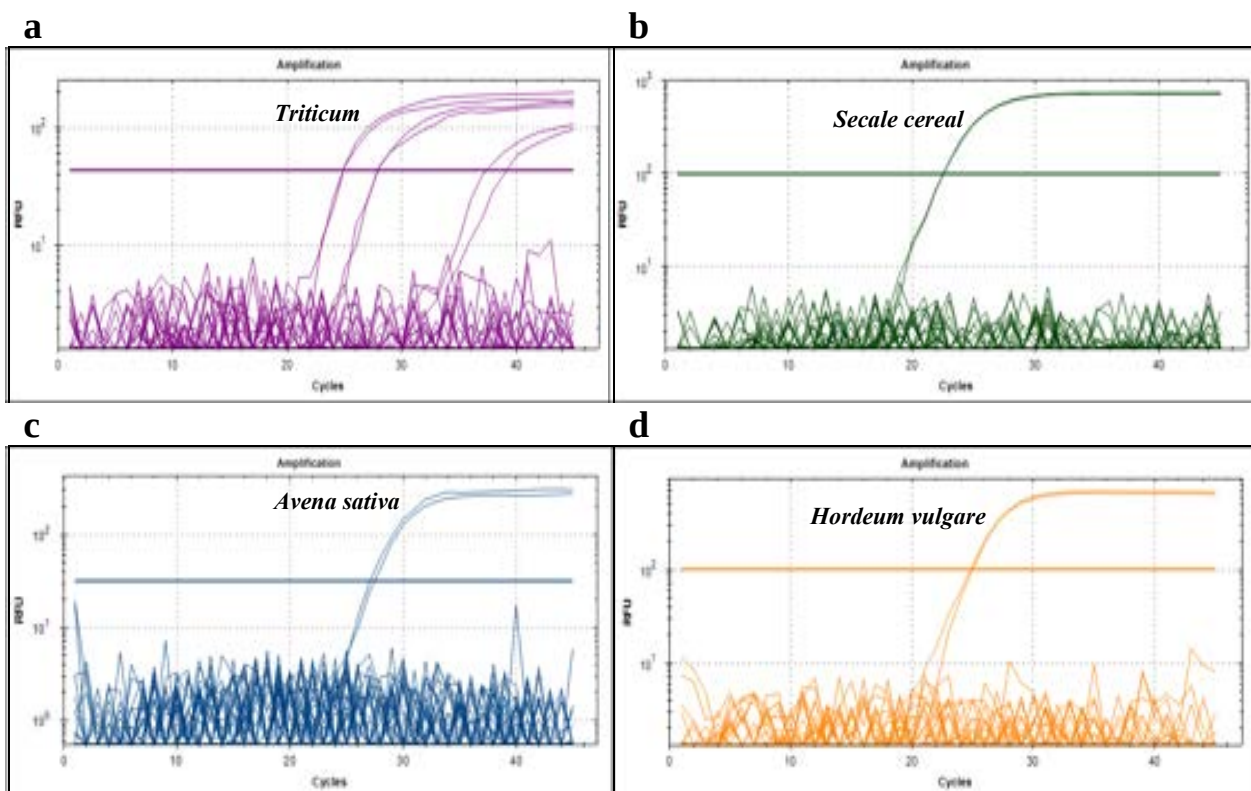


Рис. 3.62. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час перевірки специфічності роботи праймерів та зондів: а – Tri / Cy5 / фіолетовий; б – Sec / Hex / зелений; с – Ave / Fam / синій; d – Hor / Rox / помаранчевий.

Ефективність роботи праймерів з зондами 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. Для дослідження використовували свіжовиділену ДНК пшениці, жита, вівса та ячменю. Якість зразків ДНК перевіряли спектрофотометрично. З огляду на те, що ефективність ПЛР залежить тільки від кута нахилу кривої, абсолютні значення концентрації ДНК були

непотрібними [241]. Кожна серія десятикратних розведень ДНК складалася з чотирьох точок. На рисунках 3.63 і 3.64 наведено графіки стандартних кривих, побудованих для оцінювання ефективності роботи праймерів за результатами ПЛР-РЧ. Графіки стандартних кривих будувалися в системі координат $\text{Log}[N] / C_t$ (d) на основі отриманих значень C_t за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Maestro™ 1.0 (Version 4.0.2325.0418). Стандартні криві описуються загальним лінійним рівнянням $y = -\alpha x + b$, де α виражає тангенс кута нахилу кривої. Вони уможливають оцінювання ефективності ампліфікації.

У таблиці 3.80 для кожної пари праймерів з зондом, що входять до складу двох мультиплексних систем, наведено розраховані дані щодо кута нахилу кінетичної кривої (α , Slope), коефіцієнта кореляції (R^2) та ефективності реакції (E). Отримані результати демонструють високий рівень точності розробленої тест-системи.

Таблиця 3.80

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 [489]. Розраховані значення ефективності перебігу ПЛР становили 105,4 % для каналу Tri / Cy5 / фіолетовий, 91,1% – для каналу Sec / Hex / зелений та 96,3 % – для Ave / Fam / синій.

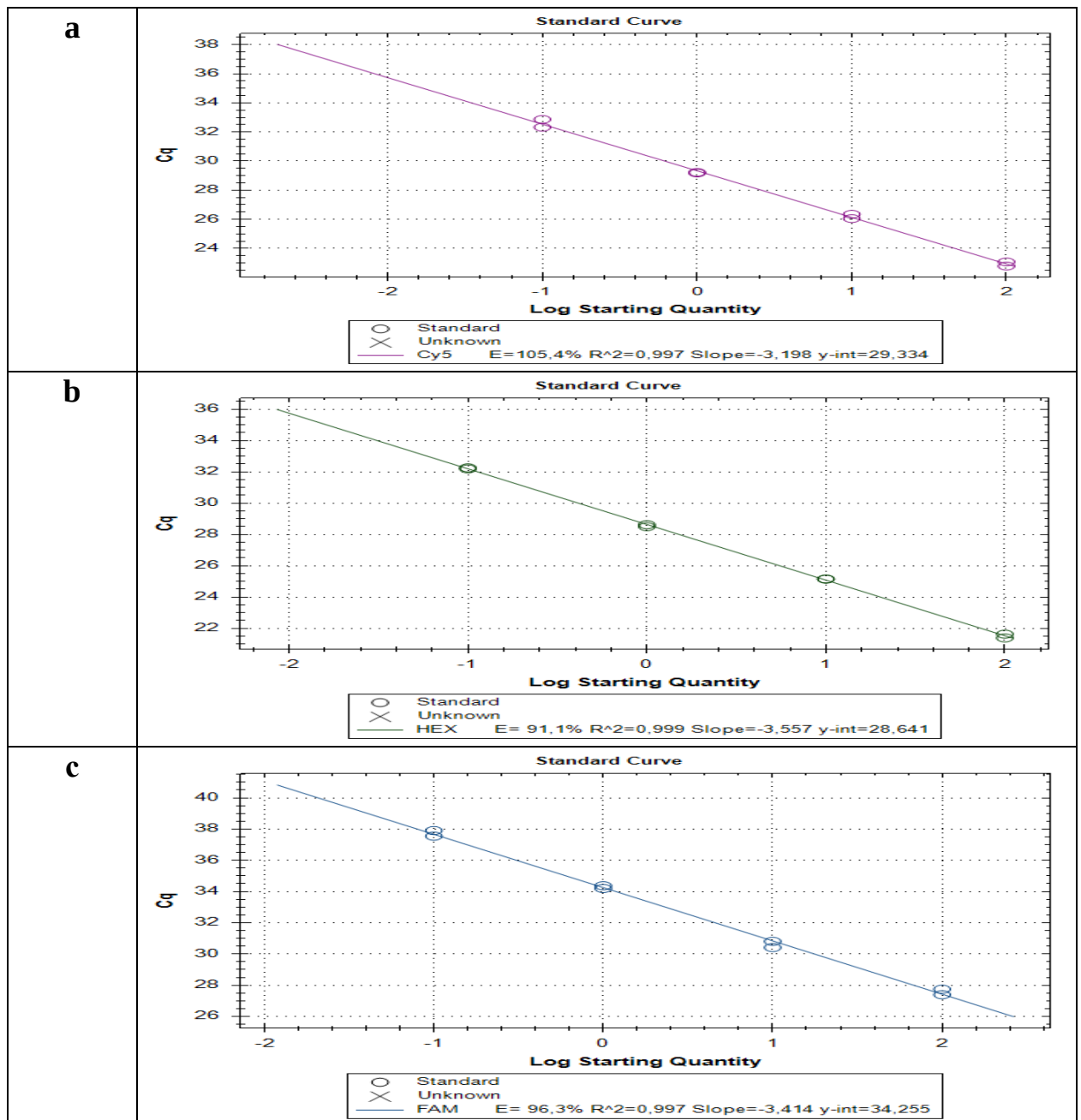


Рис. 3.63. Оцінювання ефективності роботи праймерів та зондів у мультиплексній системі №1: а – стандартна крива, побудована за результатами ПЛР-РЧ серії десятикратних розведень ДНК для каналу Tri/Cy5/фіолетовий; б – для каналу Sec/HEX/зелений; с – для каналу Ave/FAM/синій.

Для мультиплексу №2 було отримано наступні результати (рис. 3.64 а–б). Значення кутів нахилу α для праймерів Hox (-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, та були не нижчими за 0,99. Розраховані значення ефективності перебігу ПЛР становили 97,7 % для каналу Hox / Rox / помаранчевий та 97,4 % – для Psb2 / Hex / зелений.

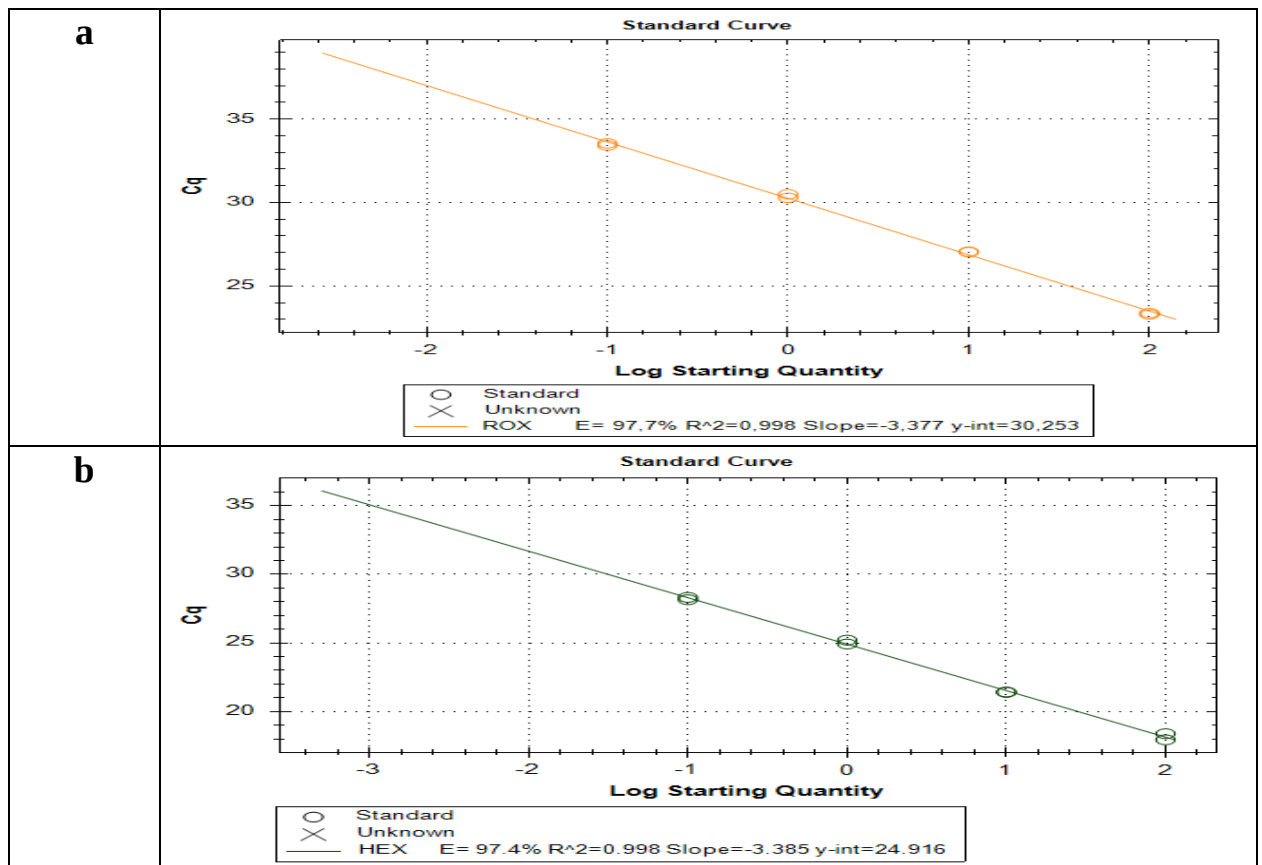


Рис. 3.64. Оцінювання ефективності роботи праймерів та зондів у мультиплексній системі №2: а – стандартна крива, побудована за результатами ПЛР-РЧ серії десятикратних розведень ДНК для каналу Nor/ROX/помаранчевий; б – для каналу Psb2/HEX/зелений.

В цілому, оцінюючи роботу двох мультиплексних систем, можна зробити висновок, що праймери і зонди, які їх формують, забезпечують високу точність проведення ПЛР у реальному часі. Таким чином, у даних комбінаціях вони можуть бути використані як діагностична тест-система для визначення ДНК чотирьох злакових культур (пшениці, жита, вівса, ячменю), які є небезпечними для здоров'я людей, хворих на целиакію.

3.4.3.2. Визначення аналітичної чутливості тест-систем

Наступним етапом перевірки роботи розробленої тест-системи було оцінювання одного з найважливіших метрологічних показників – чутливості. Для визначення межі виявлення (LOD) та аналітичної чутливості двох мультиплексних систем №1 та №2 готували серії десятикратних розведень препаратів ДНК. Під час проведення ПЛР позитивними вважали всі зразки зі

значенням $Ct \leq 45$.

Для приготування десятикратних розведень використовували кількісно охарактеризовані свіжовиділені препарати ДНК пшениці, жита, вівса та ячменю. Якісний та кількісний склад ДНК перевіряли спектрофотометрично за допомогою приладу BioPhotometer® (Eppendorf, Німеччина). У подальшу роботу бралися 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. Це свідчило про відсутність у досліджуваних ДНК зайвих речовин, які б могли виступати як інгібітори перебігу ПЛР.

Для всіх досліджуваних препаратів ДНК готували серію десятикратних розведень. 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 (наявність-відсутність сигналу) було визначено межу виявлення та аналітичну чутливість двох мультиплексів, що входять до складу тест-системи (табл. 3.81).

Таблиця 3.81

Аналітична чутливість мультиплексних систем №1 та №2 за використання десятикратних розведень ДНК (нг)

Розведення \ Мішені	Мультиплекс №1			Мультиплекс №2	
	Tri	Sec	Ave	Hor	Psb2
1×10^2	10	10	10	10	10
1×10^1	10	10	10	10	10
1×10^0	10	10	10	10	10
1×10^{-1}	10	10	10	10	10
1×10^{-2}	-	10	6	10	10
1×10^{-3}	-	-	4	-	10

Визначення чутливості праймерів Tri (канал Cy5 / фіолетовий), Sec (канал Hex / зелений) і Ave (канал Fam / синій) у складі мультиплексної системи №1 проводили за допомогою десятикратних розведень ДНК відповідно з пшениці, жита та вівса. Було приготовлено 6 точок з концентраціями від 100 до 1×10^{-3} нг / реакцію (рис. 3.65).

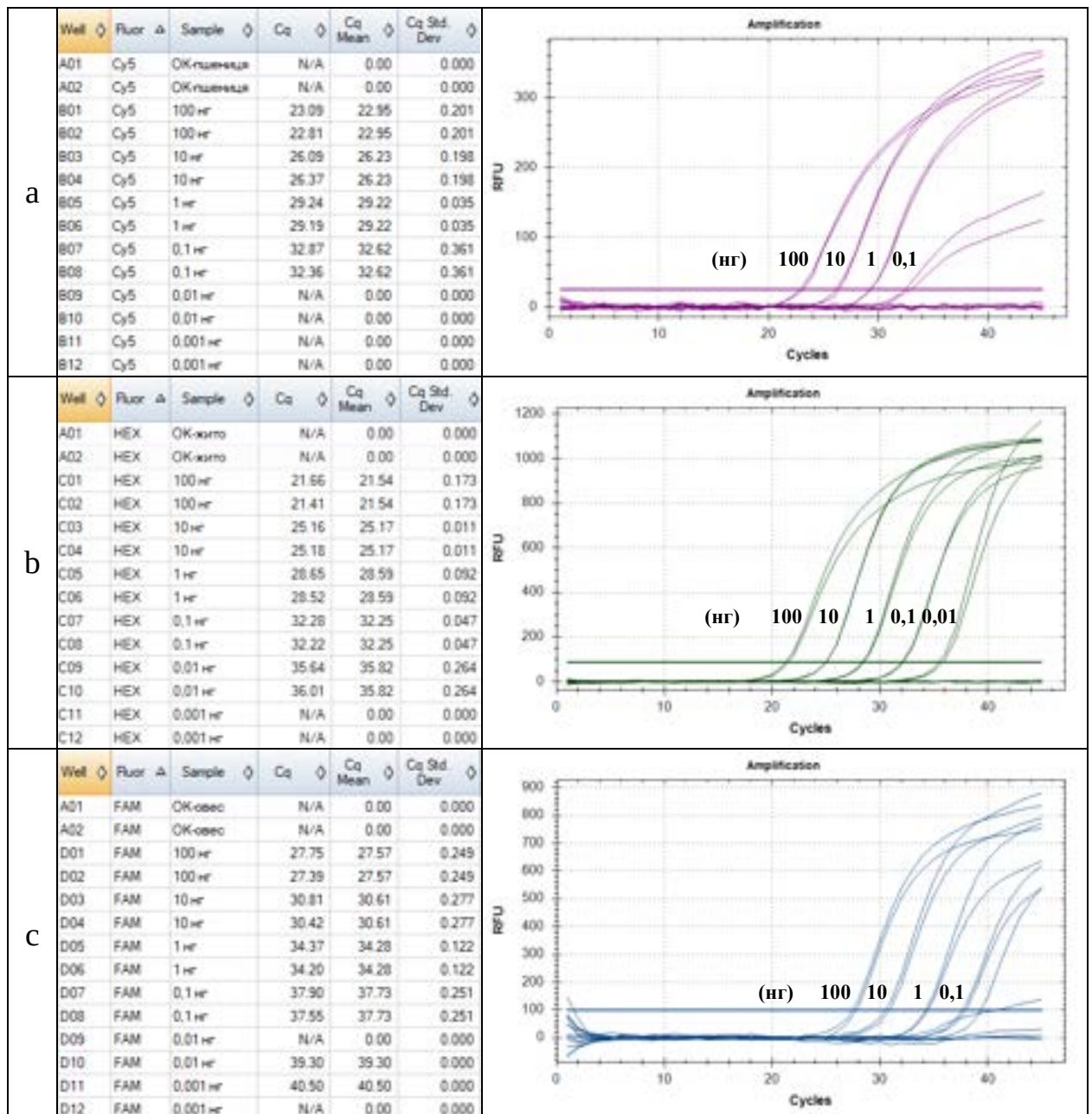


Рис. 3.65. Приклад визначення чутливості мультиплексу №1 тест-системи «Глютен-скринінг»: а – значення S_t та графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ для серії десятикратних розведень ДНК пшениці; б – ДНК жита; с – ДНК вівса.

Для праймерів T_{ri} , специфічних до пшениці, сигнал ампліфікації спостерігали за концентрації ДНК від 100 до 0,1 нг, а значення S_t коливались від $22,95 \pm 0,201$ до $32,62 \pm 0,361$. Дещо більшу чутливість спостерігали за каналом Sec / Hex / зелений, що відповідав ампліфікації ДНК жита. Позитивний сигнал був присутній від 100 до 0,01 нг, а значення S_t коливались від $21,54 \pm 0,173$ до $35,82 \pm 0,264$. Стосовно третього каналу Ave / Fam / синій, сигнал ампліфікації спостерігали за всіма шістьма точками, але

стабільні значення C_t починалися лише з точки 0,1 нг та лежали у межах від $27,57 \pm 0,249$ до $37,73 \pm 0,251$. Таким чином, отримані результати дали змогу встановити, що для каналу $Su5$ межа виявлення (LOD) та аналітична чутливість становлять 1×10^{-1} нг, а для каналу Hex – 1×10^{-2} нг. Найнижча межа виявлення відповідала каналу Fam – 1×10^{-3} нг за аналітичної чутливості 1×10^{-1} нг.

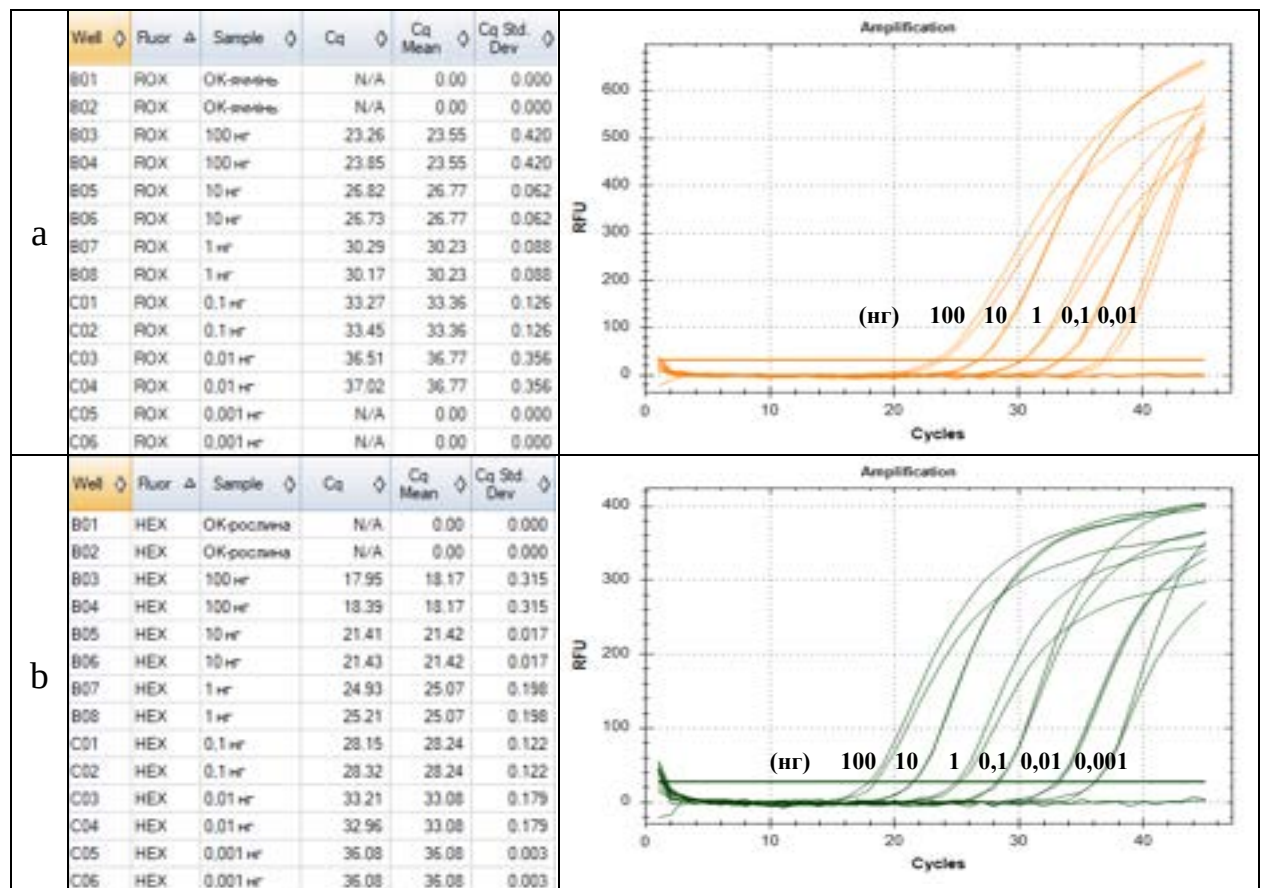


Рис. 3.66. Приклад визначення чутливості мультиплексу №2 тест-системи «Глютен-скринінг»: а – значення C_t та графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ для серії десятикратних розведень ДНК ячменя; b – ДНК рослини.

Дослідження роботи праймерів Hor (канал ROX / помаранчевий) та $Psb2$ (канал Hex / зелений) у мультиплексній системі №2 проводили за допомогою десятикратних розведень ДНК з ячменю. Було приготовлено 6 точок з концентраціями від 100 до 1×10^{-3} нг / реакцію (рис. 3.66). Сигнал ампліфікації з праймерами Hor , специфічними до ячменю, було зафіксовано від 100 до 0,01 нг. Значення C_t при цьому коливалися від $23,55 \pm 0,420$ до $36,77 \pm 0,356$. Стосовно праймерів $Psb2$, специфічних до будь-якої хлоропластної ДНК,

позитивний сигнал апліфікації спостерігали за всіма точками, а значення St змінювалися від $18,17 \pm 0,315$ до $36,080 \pm 0,003$.

Аналіз отриманих результатів показав, що за каналом Rox мультиплексної системи №2 значення межі виявлення та аналітичної чутливості збігалися і становили 1×10^{-2} нг. За каналом Hex значення межі виявлення та аналітичної чутливості становили 1×10^{-3} нг.

У таблиці 3.82 наведено узагальнені результати визначення чутливості тест-системи «Глютен-скринінг». В цілому отримані результати за даним показником виявились подібними до описаних іншими авторами та отриманих за використання комерційних наборів [588,607].

Таблиця 3.82

Межі 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}

3.4.4. Комплектація тест-системи «Глютен-скринінг»

Проведені дослідження уможливили розроблення тест-системи для виявлення та ідентифікації у харчових продуктах та продовольчій сировині чотирьох злакових культур (пшениці, жита, вівса і ячменю), присутність глютену в яких призводить до виникнення у людини захворювання на целиацію. Тест-система дозволяє аналізувати продукти, які піддавались термічній обробці, ферментації, гідролізу, її рівень чутливості достатній для виявлення так званого прихованого глютену. Специфічність розробленої тест-системи «Глютен-скринінг» становить 100 %, аналітична чутливість знаходиться у межах від 1×10^{-2} до 1×10^{-1} нг. Визначення аналітичної чутливості ми проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК відповідних злаків. Тест-систему характеризує високий рівень

повторюваності та відтворюваності результатів аналізу (табл. 3.83).

Таблиця 3.83

Вимоги щодо метрологічних показників тест-системи

Назва показника	Характеристика за показником
Чутливість	Межа відносної чутливості становить 1×10^{-1} нг для суміші №1 та 1×10^{-2} нг для суміші №2
Специфічність	Специфічність - 100% при тестуванні панелі препаратів ДНК мікроорганізмів
Достовірність	Діагностикум має виявляти специфічні послідовності ДНК у концентрації $\geq 1 \times 10^{-2}$ - 1×10^{-1} нг

Розроблені тест-системи виробляються у виконанні на 100 реакцій. Комплектацію тест-систем виконано згідно з вимогами до ПЛР тест-систем. До складу кожного ПЛР-набору входять дві суміші для проведення ПЛР у реальному часі, Таq ДНК полімераза, позитивний (ПКЗ) та негативний (НКЗ) контрольні зразки. Позитивний контрольний зразок являє собою суміш ДНК чотирьох злакових культур у концентраціях від 50 до 250 нг/мкл (табл. 3.84).

Таблиця 3.84

Приклад комплектації тест-системи

Складова частина	Зовнішній вигляд	pH
ПЛР-РЧ суміш №1 1800 мкл	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
ПЛР-РЧ суміш №2 1800 мкл	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
Таq-полімераза 40 мкл	Прозора безбарвна рідина	від 7,5 до 8,5
НКЗ (-) 200 мкл	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
ПКЗ (+) 200 мкл	Прозора безбарвна	від 5,0 до 7,5

За допомогою розробленої тест-системи можна проводити скринінговий аналіз будь-якої харчової продукції та продовольчої сировини на вміст глютену пшениці, жита, ячменю та вівса, а також здійснювати контроль «безглютенової» продукції.

3.4.5. Порівняльні випробування тест-системи «Глютен-скринінг»

Апробацію тест-системи проводили впродовж 2013–2015 рр. шляхом порівняльних випробувань харчової продукції з відомим складом. Для порівняння результатів було використано комерційні ІФА та ПЛР тест-набори – RIDASCREEN® Gliadin та SureFood® ALLERGEN ID Gluten (R-Biopharm, Німеччина) відповідно. Всього було досліджено 53 зразки харчових продуктів та продовольчої сировини (табл. 3.85).

Таблиця 3.85

Результати порівняльних випробувань визначення глютену в харчовій продукції за використання тест-наборів SureFood® ALLERGEN ID Gluten (ПЛР) та RIDASCREEN® Gliadin (ІФА)

№	Назва продукту, виробник, країна	«Глютен - скринінг»		ПЛР	ІФА
		БК	Глютен		
1	Органічні мюслі "Яблуко-Груша", Familia, Швейцарія	+	+	+	72,8
2	Картопляний крохмаль, Nordic, Фінляндія	+	-	-	<5,0
3	Пшенична крупа, Хуторок, Україна	+	+	+	>80,0
4-8	Суміші молочні сухі "Малютка швидкого приготування", Хорольський молококонсервний комбінат дитячих продуктів, Україна	+	-	-	<5,0
9	Суміш молочна суха "Малютка швидкого приготування" з вівсяним борошном, Хорольський молококонсервний комбінат дитячих продуктів, Україна	+	+	+	<5,0
10	Вівсяні мюслі без глютену, ТМ "Provena", Raisio Nutrition Ltd., Фінляндія	+	+	+	<5,0
11-17	Борошно (рисове, кукурудзяне, просяне, соргове, льняне, гарбузове, з виноградних кісточок) повноцінне аглютенове "Ан-нушка®", НВ ТОВ «Житомирбіопродукт», Україна	+	-	-	<5,0
18	Борошно амарантове повноцінне аглютенове "Ан-нушка®", НВ ТОВ «Житомирбіопродукт», Україна	+	+	+	39,7
19	Борошно гречане повноцінне аглютенове "Ан-нушка®", НВ ТОВ «Житомирбіопродукт», Україна	+	+	+	39,3

20	Дитяче розчинне печиво Бебик «Преміум» без глютену, "Quality food group", Італія	+	-	-	<5,0
21	Дитяче розчинне печиво Бебик «6 злаків», "Quality food group", Італія	+	+	+	>80,0
22	Паста сиркова "Груша-кукурудза" 4.2% жиру, ТМ "Яготинське для дітей", Філія ПАТ "Яготинський маслозавод", Україна	+	-	-	<5,0
23	Крупа гречана ядриця, КП Білоцерківхлібопродукт, Україна	+	-	-	<5,0
24	Крупа манна, КП Білоцерківхлібопродукт, Україна	+	+	+	>80,0
25-26	Продукти для дієтичного харчування: сирок 3.9% жиру, йогурт 2.7% жиру з наповнювачем "Злаки", ПАТ «ВБД Україна», Україна	+	-	-	<5,0
27-31	Пиво та квас, ПАТ "Оболонь", Україна	-	-	-	<5,0
32-33	Концентрати квасного сусла, ТОВ "Квас Бевериджиз", Україна	+	+	+	>80,0
34-35	Ячмінно-солодові екстракти, ТОВ "Квас Бевериджиз", Україна	+	+	+	>80,0
36	Борошно гречане, ТОВ «Фільварок», Україна	+	+	+	10,0
37	Борошно рисове, ТОВ «Фільварок», Україна	+	+	+	16,0
38-39	Сири кисломолочні безлактозні 0 та 5% жирності, Дочірнє підприємство (ДП) "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
40	Кефір безлактозний 2.5%, ДП "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
41	Йогурт по-грецьки безлактозний, ДП "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
42	Молоко сухе знежирене, ДП "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
43-44	Сири кисломолочні 0 та 9% жирності, ДП "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
45-48	Сири м'які з різним % жирності, ДП "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
49	Масло солодковершкове екстра 82,5%, ТМ Добряна, ДП "Мілкіленд-Україна", Україна	-	-	-	<5,0
50-52	Корми для собак, Hill's™, США-Нідерланди	+	-	-	<5,0
53	Хлібці хрусткі рисові "Крекерси", ТМ Жменька, ТОФ Фабрика бакалійних продуктів, Україна	+	-	-	<5,0

За результатами досліджень, як свідчать дані, наведені у табл. 3.73, розроблена тест-система за своїми характеристиками не поступається

комерційним наборам. У всіх без винятку випадках результати аналізів, отримані за використання трьох різних тест-систем, були ідентичні. Серед 53 досліджених зразків 43 (81 %) виявилися такими, що не містять глютен (< 5 мг/кг). У решті 10 (19 %) зразків глютен було виявлено в кількостях від 10 мг/кг і більше. Переважна більшість досліджених зразків не була маркована як безглютенова продукція, тому наведена інформація носить винятково інформативний характер.

Проведені дослідження і випробування довели, що розроблена тест-система «Глютен-скринінг» дає змогу виявляти та ідентифікувати присутність пшениці, жита, ячменю та вівса як у продовольчій сировині (крупа, борошно), так і в продуктах, що піддавались термічній обробці, ферментації або гідролізу (сухі сніданки, печиво, солодові екстракти). Крім того, рівня чутливості тест-системи достатньо для виявлення так званого прихованого глютену, який може бути присутнім у складі продуктів промислового виробництва у вигляді добавок-загусників, формоутворювачів, стабілізаторів, пшеничного борошна, крохмалю та ін. 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» (Додаток К) [608]. Розроблена МВВ складається з двох етапів. На першому етапі проводиться скринінговий ПЛР-аналіз за використання тест-системи «Глютен-скринінг» для виявлення присутності у досліджуваних зразках ДНК пшениці, жита, вівса та ячменю. В разі виявлення ДНК хоча б однієї з культур, проводиться наступний етап – з визначення кількісного вмісту глютену за допомогою комерційного ІФА-діагностикуму. Дана схема дає змогу прискорити час проведення досліджень, і, найголовніше, значно здешевити аналіз.

Висновки до розділу 3.4

1. Розроблено методологію з виявлення та ідентифікації у сільськогосподарській сировині та харчовій продукції злакових культур, глютен у складі яких пов'язаний з виникненням захворювання на целіакію у людей;
2. Визначено міжродові молекулярно-генетичні маркери та підібрано праймери з зондами для ідентифікації ДНК пшениці, жита, вівса і ячменю методом ПЛР у реальному часі;
3. Розроблено мультиплексну тест-систему «Глютен-скринінг» на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ, яка уможливорює ідентифікацію навіть слідових кількостей пшениці, жита, вівса і ячменю у сільськогосподарській сировині та харчовій продукції;
4. Апробація роботи тест-систем на контрольних зразках показала високу специфічність, чутливість та відтворюваність результатів аналізу. Специфічність розробленого діагностикума становить 100 %, аналітична чутливість знаходиться у межах від 1×10^{-2} до 1×10^{-1} нг.;
5. Затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою розробленої тест-системи. Розроблені тест-системи можуть бути рекомендовані для здійснення контролю харчової продукції на вміст глютену.

Перелік наукових робіт, в яких опубліковані результати досліджень, представлених у розділі 3.4:

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.

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. Збірник наукових праць Білоцерківського національного аграрного університету*. 2015. Вип. 1(116). С. 111–116.

3.5. Діагностика бактеріальних патогенів з аліментарним шляхом передачі за використання молекулярно-генетичних маркерів

В Україні, на жаль, донині відсутнє власне виробництво діагностичних тест-систем для *in vitro* діагностики харчових патогенів, а законодавча база обмежується постановою №139 від 07.11.2001 «Про затвердження Державних санітарних правил і норм ДСП 4.4.5.078-2001 «Мікробіологічні нормативи та методи контролю продукції громадського харчування» та наказом Міністерства охорони здоров'я України №26 від 24.01.2008 щодо Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» [609,610].

Розроблення діагностиків вітчизняного виробництва на основі методу ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR) дасть можливість значно зменшити собівартість проведення досліджень, вчасно та повною мірою задовольняти потреби у сучасних та високочутливих тест-системах як діагностичних лабораторій країни, так і, можливо, країн ближнього зарубіжжя, поліпшить імідж країни у сфері *in vitro* діагностики.

3.5.1. Застосування *TaqMan*-технології методу ПЛР у реальному часі для ідентифікації харчових патогенів

Сьогодні для нашої країни найбільш перспективною у діагностичній практиці можна вважати *TaqMan*-технологію методу ПЛР-РЧ. Це пов'язано передусім з парком приладів (термоциклерів для проведення ПЛР-РЧ), якими оснащено українські діагностичні лабораторії, а також можливістю застосування мультиплексних реакцій для зниження собівартості проведення досліджень та прискорення часу їх проведення. *TaqMan*-технологія ПЛР-РЧ дає такі можливості, оскільки базується на використанні флуоресційно мічених зондів та 5'-екзонуклеазній активності *Taq*-полімерази, а сучасні

прилади дають змогу одночасно детектувати сигнал від різних типів флуоресційних барвників [241,611].

Визначення харчових патогенів базується на виявленні за допомогою методу ПЛР із гібридизаційно-флуоресцентною детекцією (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR) суто специфічних до бактеріального геному фрагментів ДНК. В основі методу ПЛР-РЧ лежить багаторазове збільшення кількості копій (ампліфікація) бажаних фрагментів ДНК за допомогою ферменту термостабільної ДНК-залежної-ДНК-полімерази (*Taq*-полімерази) у присутності синтетичних олігонуклеотидних праймерів і дНТФ. Гібридизація флуоресційно-мічених олігонуклеотидних зондів, які присутні у складі реакційної суміші, з комплементарними ділянками ДНК, що ампліфікуються, зумовлює збільшення рівня флуоресценції. Вимірювання інтенсивності флуоресційного сигналу дає змогу реєструвати накопичення специфічного продукту ампліфікації [241,489].

Проведення ПЛР-РЧ аналізу передбачає попередній висів певних кількостей досліджуваних зразків харчових продуктів у відповідні неселективні та селективні живильні середовища з метою накопичення відповідного збудника, подальшу екстракцію ДНК із культуральної рідини, ампліфікацію специфічної ділянки ДНК цільових бактерій та детекцію ампліконів. Це може бути здійснено як у режимі "реального часу", так і за допомогою детекції флуоресценції за "кінцевою точкою". ПЛР може проводитися як у синглплекс (singleplex)-варіанті, так і у форматі мультиплексу (multiplex), коли разом зі специфічною мішенню ампліфікується внутрішній ендogenous контроль. У такому випадку детекція продуктів ампліфікації відбувається за різними каналами.

До найбільш актуальних харчових патогенів, швидкість та точність визначення яких має першочергове значення, можна віднести *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* та *Shigella spp.* [21, 307].

3.5.1.1. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для *Listeria monocytogenes*

Лістеріоз – сапрозоонозна інфекційна хвороба, яка характеризується численними джерелами збудника, різноманітністю шляхів і чинників його передачі, поліморфізмом клінічного перебігу та високою летальністю. За лістеріозу уражається переважно нервова тканина, захворювання у тварин перебігає з явищами гострого сепсису, абортами та маститами. Природним резервуаром збудника можуть слугувати як дикі (птахи, гризуни), так і свійські (вівці, ВРХ, свині, коні) тварини [612].

Захворювання у людини спричиняє факультативний анаероб *Listeria monocytogenes*, який належить до родини *Listeriaceae* роду *Listeria*. Цей рід представлено шістьма видами грам-позитивних паличкоподібних бактерій, два з яких патогенні (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*). Лістерії здатні до внутрішньоклітинного паразитування, що обумовлює затяжні хронічні або безсимптомні форми перебігу хвороби [613].

До недавнього часу лістеріоз вважали проблемою суто ветеринарної служби. Випадки інфікування людини реєстрували зрідка, переважно після безпосереднього контакту з тваринами. Однак в останні десятиліття почали спостерігати численні епідемічні спалахи лістеріозу з високим відсотком летальних випадків, обумовлених споживанням харчових продуктів, передусім промислового виробництва [614,615]. Тому у 1987 р. ВОЗ віднесла лістеріоз до важливих інфекцій харчового походження [616].

У практиці вітчизняної охорони здоров'я лістеріоз наразі є маловідомим захворюванням, хоча історія його вивчення розпочалась понад 100 років тому. Аварія на Диканівських очисних спорудах в м. Харкові стала підставою для включення лістеріозу, згідно з наказом МОЗ України № 133 від 19 липня 1995 р., до групи особливо небезпечних захворювань. Запроваджено його обов'язкову реєстрацію, визначено необхідність епідеміологічного розслідування випадків захворювання і проведення первинних

профілактичних та протиепідемічних заходів в осередках захворювань [617].

Нині проблема харчового лістеріозу, крім медичного, набуває значного соціально-економічного значення. Вилучення заражених партій продуктів, обмеження їхнього обігу, зупинення виробництва призводять до колосальних збитків підприємств. У 2002 р. ВООЗ визначила безпеку харчових продуктів пріоритетним питанням для споживачів, виробників і державних органів. Вже сьогодні в багатьох розвинутих країнах прийнято державні системи контролю за харчовими продуктами з великим ризиком зараження збудниками харчових інфекцій [618].

Розробленню сучасних високочутливих методів діагностики харчових патогенів приділяється велика увага. Проблема детекції лістерій становить певні труднощі і потребує подальшого вивчення. Широкий спектр сучасних методичних підходів намагались використати для виявлення збудника лістеріозу: імуофлюоресценцію, ІФА, РІА, проточну цитометрію, ДНК-гібридизацію, ПЛР та ін. [619]. Однак і надалі у вітчизняній клінічній діагностиці лістеріозу пріоритет належить класичній бактеріології.

З огляду на це, розроблення сучасного діагностичного методу ПЛР-РЧ для виявлення та ідентифікації *L. monocytogenes* у харчових продуктах та продовольчій сировині рослинного і тваринного походження є актуальним і своєчасним науковим завданням.

Застосування молекулярно-генетичних підходів до розроблення прискорених процедур діагностики широкого спектру інфекцій центральної нервової системи шляхом ампліфікації нуклеїнових кислот успішно використовують вже тривалий час [620-622]. Зазначені підходи використовують і в харчовій промисловості [623-627] для підбору та ампліфікації низки генів (*iap*, *hly*, *prfA*, *actA*), специфічних до *L. monocytogenes* [631-634]. Деякі з цих розробок є достатньо чутливими, щоб їх можна було використати для виявлення та кількісного оцінювання присутності *L. monocytogenes* у навколишньому середовищі та харчових продуктах [628]. Однак отримані дані показують, що кінцевий результат значною мірою

залежить від використаного методу, обраної ДНК-мішені та складності харчової матриці. Тому важливо не тільки вдало підібрати праймери для визначення певної ДНК-мішені, а також грамотно та повною мірою провести процедуру валідації розробленого методу під конкретні цілі та завдання.

Як ДНК-маркеру для визначення представників *Listeria monocytogenes* запропоновано видоспецифічну ділянку гена *hly*. Цей ген кодує бактеріальний білок лістеріолізін О, який виконує функцію лізису первинної і вторинної фагосом [618,634]. Праймери з зондами для ампліфікації фрагменту однокопійного гена *hly* було розроблено LeMonnier A. et al. (2011) за використання програмного забезпечення Primer Express Software, версія 1.5 (Perkin-Elmer, Foster City, CA) [634]. Підбір праймерів було здійснено після проведення 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) *Listeria ivanovii* та селегеріолізином О (LSO) *Listeria seeligeri*. Послідовності обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.86.

Таблиця 3.86

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондом для визначення представників *Listeria Monocytogenes*

Назва	Послідовність 3'→5'	Розмір (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
hly-F	tttcatccatggcaccacc	19	53	63	71
hly-R	atccgcgtgtttctttcga	20	45	63	
hly-P	ROX-cgcctgcaagtcctaagacgcca-BHQ2	23	61	71	

Синтез олігонуклеотидів замовляли в компанії «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення гена *hly* *L. monocytogenes* було мічено флуоресційними барвниками ROX та гасником флуоресценції BHQ2. Основні фізико-хімічні характеристики барвника, важливі під час підбору відповідного йому гасника та приладу для детекції флуоресценції, наведено у

таблиці 3.87.

Таблиця 3.87

Характеристика флуорофору 6-карбокси-X-родаміну (ROX)

Mr	λ макс. поглинання, нм	λ макс. флуоресценції, нм	λ макс. молярний коефіцієнт поглинання, М⁻¹*см⁻¹	кван- товий вихід
534,68	576	601	82,000	~ 0,8

Теоретичну специфічність олігонуклеотидів було перевірено за використання алгоритму *BLAST*-серверу NCBI [325]. Проведений *BLAST*-аналіз показав 100 % специфічність обраних олігонуклеотидних праймерів.

3.5.1.2. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для *Salmonella spp.*

До найбільш небезпечних широко розповсюджених кишкових інфекцій людини та сільськогосподарських тварин належить сальмонельоз. У людини сальмонельоз проявляється у вигляді харчових токсикоінфекцій, які характеризуються значним поліморфізмом клінічного перебігу з переважним ураженням шлунково-кишкового тракту і різним ступенем прояву симптомів загальної інтоксикації та зневоднення. Основними джерелами та факторами передачі збудника є забруднені харчові продукти, сировина та вода [635].

Сальмонельоз спричиняють бактерії роду сальмонела (*Salmonella spp.*). Згідно з сучасною класифікацією, основою на аналізі ДНК, рід *Salmonella* належить до родини *Enterobacteriaceae*, представлений двома видами (*S. enterica* і *S. bongori*), шістьма підвидами (*Enterica*, *Salamae*, *Arizonae*, *Diarizonae*, *Houtenae* і *Indica*) і нараховує більш ніж 2500 серотипів. Інфекційна доза сальмонел, за різними даними, може становити від 10 до 10⁹ колонієтвірних одиниць та залежить передусім від особливостей організму господаря (імунітет, стан шлунково-кишкового тракту, вік), способу введення патогену, його серотипу та фізіологічного статусу бактерій

[636,637].

Сальмонельоз залишається однією з найпоширеніших форм захворювань у світі, які пов'язані з вживанням харчових продуктів. Згідно з інформацією ВООЗ, у світі щорічно реєструють до 1,3 млрд випадків сальмонельозу, при цьому динаміка захворюваності населення має тенденцію до зростання. За відсутності ефективного лікування сальмонельозу частота летальних випадків у людей становить від 1–3 до 10–15 %. Останнім часом набули поширення серотипи сальмонел, що вирізняються резистентністю до багатьох сучасних поширених антибіотиків і дезінфікуючих засобів, а також підвищеною термостійкістю [638,639].

У США сальмонельоз становить майже 9 % від усіх харчових інфекцій. Щорічно це захворювання реєструють у 1,4 млн мешканців США, а матеріальні витрати, пов'язані з його наслідками та профілактикою, оцінюють у 1–2,3 млрд доларів на рік. В Україні випадки сальмонельозу реєструють майже на всіх адміністративних територіях. За даними МОЗ України, найвищі рівні захворюваності на сальмонельози з тенденцією до зростання реєструють у Харківській, Черкаській, Хмельницькій, Чернігівській, Житомирській, Волинській областях та в місті Київ. Загальний показник захворюваності в країні у 2015 р. становив приблизно 20 осіб на 100 тис. населення [640-642].

Ефективність заходів щодо профілактики та контролю сальмонельозів залежить від раннього розпізнавання спалахів та їх локалізації. У різних країнах використовують різні схеми виділення і визначення сальмонел. Для цього обирають високочутливі і досить специфічні методи діагностики. Водночас ці методи мають бути простими, швидкими та недорогими. Використання методу ПЛР у діагностиці інфекційних захворювань як бактеріальної, так і вірусної природи має велике значення для вирішення багатьох мікробіологічних і епідеміологічних проблем. Однак метод ПЛР лише доповнює спектр традиційних методів, які використовують у мікробіологічній діагностиці [307].

Сучасна діагностика сальмонельозу також базується на бактеріологічних, серологічних та молекулярно-генетичних методах аналізу [637,643]. До недавнього часу міжнародні рекомендації та правила щодо діагностики *Salmonella spp.* у харчовій продукції передусім базувалися на традиційних методах культивування в поживних середовищах. Це досить тривала процедура, коли для підтвердження результатів аналізу доводилось очікувати до 5–7 робочих днів [644]. Відносно недавно набули популярності та добре себе зарекомендували молекулярно-генетичні методи дослідження. Вони дали змогу значно скоротити час проведення аналізу за значно більшою чутливістю та специфічністю. У літературних джерелах широко висвітлено дані щодо можливості застосування для детекції сальмонел у харчових продуктах як класичного ПЛР з наступним електрофоретичним аналізом [645-647], так і процедуру ПЛР в реальному часі [648-651]. Можливість застосування двох цих різновидів ПЛР-аналізу для ідентифікації бактерій роду сальмонела в харчовій продукції було підтверджено шляхом проведення міжлабораторних порівнянь, що дало підстави затвердити їх як міжнародні стандартні методи [652,653].

Рядом авторів було описано можливості одночасної детекції двох або більше патогенів у їжі за рахунок проведення мультиплексного ПЛР-РЧ, наприклад, *Salmonella* і *Campylobacter* або *Salmonella* і *Listeria* [654,655].

Найчастіше як ДНК-маркеру для виявлення збудників сальмонельозу методом ПЛР використовують ген *invA*. Разом з тим, ряд інших генів-мішеней, таких як *ttrRSBCA*, *sipBC* і *stn*, було успішно використано під час перевірки харчових продуктів на вміст *Salmonella spp.* [656-658].

Дуплексний ПЛР-РЧ-аналіз для виявлення *Salmonella enteritidis* в м'ясі птиці та курячих яйцях було проведено з праймерами і *TaqMan* зондами, специфічними до генів *invA* *Salmonella spp.* та *prot6e* *S. enteritidis*, який локалізовано на 60 кб вірулентній плазміді [650]. Сьогодні традиційний мультиплексний ПЛР використовують також для серотипування клінічних ізолятів за локусом *rfb* та флагелярними алелями як гени-мішені, однак дані

щодо можливості використання на зразках харчової продукції відсутні [659-661].

У даній роботі в якості молекулярно-генетичних маркерів 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 [662]. Праймери з зондами для ампліфікації фрагменту *invA* було розроблено N. Gonzalez-Escalona et al. (2009) за використання комп'ютерної програми *Primer Express*[®], версія 1.5 та нуклеотидної послідовності гена *invA* (№ доступу DQ644631), представлений в *GenBank*[®] серверу NCBI [324,663]. Послідовність обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.88.

Таблиця 3.88

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондом для визначення представників *Salmonella spp.*

Назва	Послідовність 3'→5'	Розмір (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
invA -F	caacgtttcctgcggtactgt	21	52	66	116
invA -R	cccgaacgtggcgataatt	19	53	63	
invA -P	FAM-tctttcgtctggcattatcgatcagtagca -BHQ1	31	45	70	

Синтез олігонуклеотидів здійснювався компанією «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення гену *invA* було мічено флуоресційними барвниками FAM та гасником флуоресценції BHQ1. Фізико-хімічні характеристики барвника, важливі під час підбору відповідного йому гасника та приладу для детекції флуоресценції, наведено у таблиці 3.89.

Теоретичну специфічність олігонуклеотидів було перевірено за використання алгоритму *BLAST*-серверу NCBI [325]. Проведений *BLAST*-аналіз показав 100 % специфічність обраних олігонуклеотидних праймерів.

Таблиця 3.89

Характеристика флуорофору 6-карбоксифлуоресцеїну (FAM)

Mr	λ макс. поглинання, нм	λ макс. флуоресценції, нм	λ макс. молярний коефіцієнт поглинання, М⁻¹*см⁻¹	кван- товий вихід
376,3	495	520	75,000	~ 0,8

3.5.1.3. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для *Shigella spp.*

Нині епідеміологічна безпека харчової продукції оцінюється, насамперед, за мікробіологічними показниками. Це й не дивно, оскільки із всіх агентів, що викликають харчові отруєння в людей, 70% припадає на патогенні мікроорганізми. Яскравий представник - бактерії роду *Shigella*, що викликають шигельоз. Шигельоз – гостре інфекційне захворювання, що характеризується симптомами загальної інтоксикації, переважно з ураженням товстого кишечника. Дане захворювання широко поширене у світі і становить 75 % всіх харчових інфекцій. Виділяють 4 серогрупи роду *Schigella* – *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* і *S. sonnei* [305].

Представники *Shigella spp.* є високо адаптованими та господар-специфічними патогенами людини, які спричиняють бацилярну дизентерію – гостре інфекційне захворювання, що супроводжується сильною діареєю з виділенням слизу та свіжої крові. Інфекційна доза шигелли доволі низька і становить менш ніж 10 клітин. Збудники шигельозу можуть передаватися через різні салати, сирі овочі, молоко, молочні продукти та м'ясо. Забруднена фекаліями вода та відсутність належної обробки харчової продукції є найбільшими причинами поширення патогену. Зростання попиту на свіжу городину підвищує небезпеку виникнення харчових інфекцій, зокрема таких як шигельоз. Прикладом можуть бути сильні спалахи шигельозу, зафіксовані на півдні Каліфорнії у 2007 р., та пов'язані з потраплянням *Shigella Sonnei* у міні-моркву. Це ще раз демонструє нагальну потребу у розробленні швидких

скринінгових діагностикумів для визначення патогена у свіжих овочах та інших харчових продуктах [664–666].

У низці публікацій зазначається, що метод традиційного ПЛР має нижчу межу виявлення *Shigella*, ніж звичайні культуральні методи аналізу [667, 668]. Hale et al. (2009) було досліджено численні гени, що відповідають за вірулетність патогену, та розроблено методи детекції видів *Shigella* на основі ПЛР [669]. Нині відомо кілька *Shigella spp.* специфічних генів, таких як *ial* (invasion associated locus) [670,671], гени *virA* [672], *set1A* та *set1B* [673], а також *ipaH* [673,674]. Всі вони можуть бути використані для визначення даного патогену. Більш сучасний метод кількісної ПЛР (qPCR) може бути використаний як частина досліджень з визначення *Shigella*. Введення флуоресційно міченого зонду дає змогу значно прискорити проведення аналізу з визначення збудника шигельозу, збільшити межу визначення, знизити ризики контамінації та забезпечити більшу специфічність, ніж у методу на основі традиційного ПЛР [675,676].

Опубліковано результати досліджень щодо використання qPCR для детекції *Shigella*, де як ген-мішень використано *ipaH*. Методи детекції збудника шигельозу було оснований на технологіях *TaqMan*[®] [677] та *FRET* (Fluorescence resonance energy transfer – резонансне перенесення енергії флуоресценції) [678].

Отже, попередні дослідження генетичної структури *Shigella spp.* показали, що найбільш прийнятним кандидатом на роль гена-маркеру під час розроблення діагностичної тест-системи може бути ДНК-послідовність гена *ipaH*, який кодує інвазивний плазмідний антиген. Н. Venkatesan et al. (1991) було показано що *ipaH* є унікальним для *Shigella spp.* мультикопійним геном, який присутній як в складі інвазивної плазмиди, так і хромосомній ДНК [679]. Праймери з зондом для ампліфікації фрагменту гена *ipaH* було розроблено W.S. Lin et al. (2009) за використання комп'ютерної програми Primer3 та послідовності гена *ipaH* (№ доступу M76445), представлений в *GenBank*[®] серверу NCBI [680,324]. Послідовність обраних праймерів та зондів наведено

у таблиці 3.90.

Таблиця 3.90

Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондом для визначення представників *Shigella spp.*

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	GC- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продук- ту (п.н.)
ipaH-F	accatgctcgcagagaaact	20	50	64	181
ipaH-R	tacgcttcagtagcatgc	20	50	63	
ipaH-P	HEX-tggcgtgtcgggagtgacagc-BHQ1	21	67	72	

Синтез олігонуклеотидів здійснювався компанією «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення гену *ipaH* було мічено флуоресційними барвниками HEX та гасником флуоресценції BHQ1. Фізико-хімічні характеристики барвника HEX, важливі під час підбору відповідного йому гасника та приладу для детекції флуоресценції, наведено у таблиці 3.91.

Таблиця 3.91

Характеристика флуорофору 4,7,2',4',5',7'-гексахлоро-6-карбокси-флуоресцеїну (HEX).

Mr	λ макс. поглинання, нм	λ макс. флуоресценції, нм	λ макс. молярний коефіцієнт поглинання, М ⁻¹ *см ⁻¹	кван- товий вихід
390,3	535	556	98,000	~ 0,75

Теоретичну специфічність олігонуклеотидів було перевірено за використання алгоритму *BLAST* серверу NCBI [325]. Проведений *BLAST*-аналіз показав 100 % специфічність обраних олігонуклеотидних праймерів.

3.5.1.4. Визначення ДНК-маркерів та підбір олігонуклеотидних праймерів з зондом для створення внутрішнього ендогенного контролю перебігу ПЛР-РЧ

Під час розроблення будь-якої діагностичної ПЛР-системи бажано мати механізм, який би давав змогу контролювати процес перебігу реакції для

запобігання хибнонегативним результатам. Для цього зазвичай використовують внутрішній ендегенний контроль перебігу ПЛР. З огляду на те, що мішенню всіх трьох розроблених тест-систем були винятково бактерії, необхідно було підібрати універсальні олігонуклеотидні праймери, які б були специфічними для широкого кола бактерій.

Молекулярно-генетичні підходи вже давно використовуються для швидкого визначення різних штамів мікроорганізмів [681,682]. Праймери з широкою міжвидовою специфічністю було розроблено для ампліфікації 16S рДНК за допомогою ПЛР і використано для визначення кількості бактерій у складних спільнотах мікроорганізмів [683,684]. Однак у більшості з цих досліджень для визначення бактеріальної ДНК застосовували більш ніж одну пару праймерів. Інші методи, такі як конкурентна ПЛР [685], є трудомісткими і вимагають проведення більш ніж однієї реакції для дослідження кожного конкретного зразка. На відміну від них *TaqMan*-технологія методу ПЛР у реальному часі, розроблена компанією Applied Biosystems, дає змогу проводити мультиплексні реакції в одній реакційній суміші [686]. Тому ПЛР-РЧ найбільше з усіх різновидів ПЛР підходить не тільки для ідентифікації, а й для кількісного визначення бактерій у мультивидових популяціях. Як мішень для цього зазвичай використовують консервативні ділянки 16S рДНК [687].

Nadkarni M.A. et al. (2002) було розроблено та запропоновано для ідентифікації та кількісного визначення бактеріальної ДНК широкого кола бактерій універсальні праймери з зондом для *TaqMan*-технології методу ПЛР-РЧ [688]. Праймери було підібрано для ампліфікації 16S рДНК домену бактерії (*Bacteria*, *Eubacteria*). Широку специфічність універсальної системи детекції було підтверджено шляхом тестування зразків ДНК, виділених з 34 видів бактерій, що охоплюють більшість груп бактерій, описаних в *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [689].

Праймери з зондом (b16S) було підібрано за використання програмного забезпечення GCG Pileup (Wisconsin Package Version 8, 1994), Primer Express

Software (Applied Biosystems) та послідовностей 16S rDNA таких мікроорганізмів як *Bacteroides forsythus* (AB035460), *Porphyromonas gingivalis* (POYRR16SC), *Prevotella melaninogenica* (PVORR16SF), '*Cytophaga baltica*' (CBA5972), *Campylobacter jejuni* (CAJRRDAD), *Helicobacter pylori* (HPU00679), *Treponema denticola* (AF139203), *Treponema pallidum* (TRPRG16S), *Leptothrix mobilis* (LM16SRR), *Thiomicrospira denitrificans* (TDE243144), *Neisseria meningitidis* (AF059671), *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *actinomycetemcomitans* (ACNRRNAJ), *Haemophilus influenzae* (HIDNA5483), *Escherichia coli* (ECAT1177T), *Salmonella typhi* (STRNA16), *Vibrio cholerae* (VC16SRRNA), *Coxiella burnetii* (D89791), *Legionella pneumophila* (LP16SRNA), *Pseudomonas aeruginosa* (PARN16S), *Caulobacter vibrioides* (CVI009957), *Rhodospirillum rubrum* (RR16S107R), *Nitrobacter winogradskyi* (NIT16SRA), *Wolbachia* sp. (WSP010275), *Myxococcus xanthus* (MXA233930), *Corynebacterium diphtheriae* (CD16SRDNA), *Mycobacterium tuberculosis* (MTRRNOP), *Streptomyces coelicolor* (SC16-SRNA), *Actinomyces odontolyticus* (AO16SRD), *Bacillus subtilis* (AB016721), *Staphylococcus aureus* (SA16SRRN), *Listeria monocytogenes* (S55472), *Enterococcus faecalis* (AB012212), *Lactobacillus acidophilus* (LBARR16SAZ), *Streptococcus mutans* (SM16SRNA), *Clostridium botulinum* (CBA16S), *Peptostreptococcus* (*Micromonas*) *micros* (PEP16SRR8), *Veillonella dispar* (VDRRNA16S), *Fusobacterium nucleatum* (X55401), *Chlamydia trachomatis* (D89067) та *Mycoplasma pneumoniae* (AF132741), що представлено в GenBank® серверу NCBI [324].

У нашій роботі як ендогенний контроль перебігу ПЛР ми також використовували послідовність бактеріального гена 16S рДНК та універсальні праймери b16S. Послідовність обраних праймерів та зондів наведено у таблиці 3.92.

Синтез олігонуклеотидів здійснювався компанією «Metabion international AG» (Німеччина). Зонд для визначення гена 16S рДНК було мічено флуоресційними барвниками Cy5 та гасником флуоресценції BHQ1. Фізико-хімічні характеристики Cy5, важливі під час підбору відповідного йому

гасника та приладу для детекції флуоресценції, наведено у таблиці 3.93.

Таблиця 3.92

**Характеристика олігонуклеотидних праймерів з зондом внутрішнього
ендогенного контролю**

Назва	Послідовність 3'→5'	Довжина (п.н.)	ГС- склад (%)	Tm (°C)	Розмір продукту (п.н.)
b16S-F	tcctacgggaggcagcagt	19	63	68	466
b16S-R	ggactaccagggtatctaactctgtt	26	46	66	
b16S-P	Cy5-cgtattaccgcggctgctggcac- BHQ3	23	65	72	

Таблиця 3.93

Характеристика флуорофору індодікарбоціаніну (Cy5)

Mr	λ макс. поглинання, нм	λ макс. флуоресценції, нм	λ макс. молярний коефіцієнт поглинання, M ⁻¹ *см ⁻¹	кван- товий вихід
431,0	646	662	250,000	~ 0,7

З огляду на те, що обрані нами праймери мали бути використані для розроблення тест-системи у форматі мультиплексу, їх додатково було перевірено на теоретичну специфічність за допомогою алгоритму *BLAST*-серверу NCBI [325]. Проведений *BLAST*-аналіз показав 100 % специфічність обраних олігонуклеотидних праймерів.

Крім того, за допомогою програми *Vector NTI AdvanceTM* 9.1.0 було оцінено вторинну структуру всіх обраних олігонуклеотидів та відсутність здатності до утворення так званих «шпильок» та праймер-димерів [484].

3.5.2. Проведення ПЛР-РЧ та оцінка продуктивності обраних праймерів та зондів

Підбір умов ампліфікації обраних праймерів та зондів здійснювали за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). У всіх дослідженнях з розроблення тест-системи кожен ПЛР-реакцію проводили у двох

повторностях.

Об'єм реакційної суміші обирали експериментально. Оптимальним виявився об'єм реакційної суміші в 20 мкл, з яких 2 мкл припадало на розчин ДНК. Реакційна суміш містила 1x Таq-буфер (75 мМ Тріс-НCl (рН 8,8); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 0,2 мМ дНТФ суміш; 2,5 мМ MgCl₂, 5 пкмоль праймерів; 2,5 пкмоль зонду; 50-500 нг ДНК та 1 од. Таq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) (табл. 3.94).

Таблиця 3.94

**Протокол приготування реакційної суміші для проведення
ПЛР у реальному часі**

Компоненти	Кінцева концентрація в ПЛР-суміші	мкл/реакцію
Таq-буфер 10x	1x	2
дНТФ 2 мМ кожного	0,2 мМ кожного	2
MgCl ₂ (25 мМ)	2,5 мМ	2
Таq ДНК полімераза (5 од./мкл)	0,05 од./мкл	0,2
Зразок ДНК	50–500 нг	2
Праймер F (100 пкмоль)	5 пкмоль	1
Праймер R (100 пкмоль)	5 пкмоль	1
Зонд Р (100 пкмоль)	2.5 пкмоль	0,5
Деіонізована Н ₂ О	-	до 20 мкл
Кінцевий об'єм:	20 мкл	

Первинне оцінювання роботи праймерів здійснювали за величинами граничного циклу (Ct) та рівнем репортерної флуоресценції (ΔRn). Найкращим результатам відповідають найменші значення Ct та найбільші ΔRn . На першому етапі досліджень перевіряли роботу кожної пари праймерів з зондом окремо.

Для проведення ампліфікації було використано класичний трьохстадійний температурний профіль (табл. 3.95). Розрахунок температури гібридизації праймерів (T_a) здійснювали за допомогою формули $T_a \approx T_m - 5$, де T_m – температура плавлення праймерів [241].

Таблиця 3.95

**Протокол підбору умов ампліфікації, що використовувався для
первинного оцінювання роботи праймерів**

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація	60	60	ні	
		Синтез	72	30	так	

На рисунках 3.67 (a-d) наведено результати первинного оцінювання роботи всіх чотирьох пар праймерів, підібраних для ідентифікації бактеріальної ДНК. Під час оптимізації умов ампліфікації використовували тотальну ДНК, виділену з культуральної рідини, що містила штами: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*. Для екстракції ДНК було використано тест-системи «СОРБ-ГМО-А», «S-Сорб» (Синтол, РФ), а також методи фенольно-хлороформної екстракції та температурного лізису з власними модифікаціями (см. розділ 2.3.3, 2.3.3). Якість та кількість препарату ДНК оцінювали спектрофотометрично (див. розділ 2.4). Роботу кожної з пар праймерів із зондом оцінювали одночасно на всіх виділених зразках ДНК. Позитивний сигнал з праймерами hly було отримано лише на зразку ДНК, виділеному з *L. monocytogenes* (Ct=24,95). Так само праймери invA та iraH спрацювали лише на ДНК тих видів бактерій, до яких вони були підібрані. Праймери invA дали позитивний сигнал на ДНК *S. typhimurium* (Ct=17,05), праймери iraH - на ДНК *S. flexneri* (Ct=13,81), *S. sonnei* (Ct=14,09). Хибнопозитивних сигналів виявлено не було. Значення ΔR_n практично не різнилися за всіма дослідженими зразками та знаходилися у межах 250–500 rfu. Слід зазначити, що показник Ct є більш важливим для оцінювання продуктивності роботи праймерів, ніж ΔR_n .

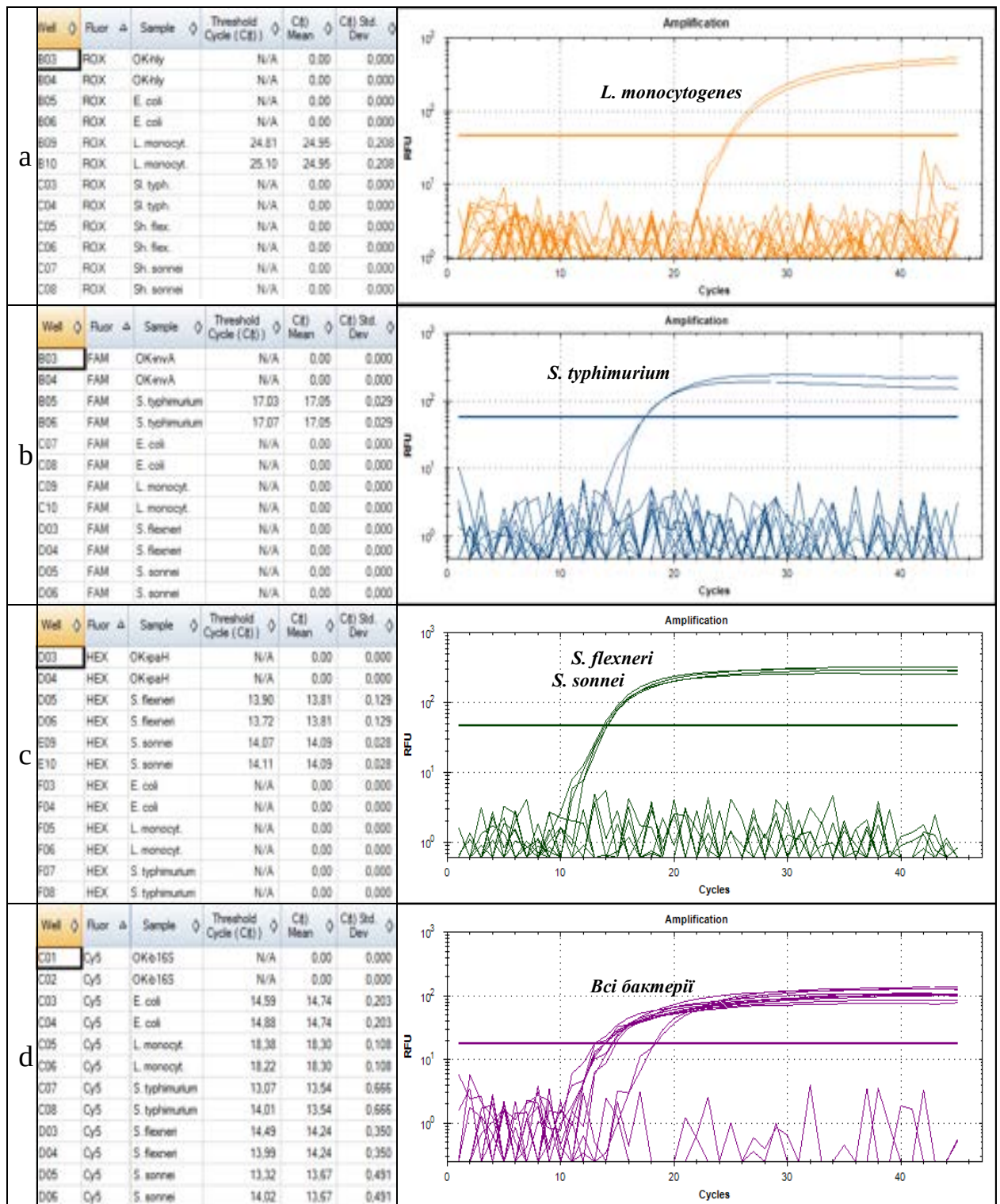


Рис. 3.67. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ. Оцінювання роботи всіх чотирьох пар праймерів з зондами (hly, invA, ipa, b16S), підібраних для визначення ДНК *L. monocytogenes* (а), *Salmonella* spp. (b), *Shigella* spp. (c) широкого кола бактерій (d).

Стосовно універсальних праймерів b16S, підібраних для виявлення широкого кола бактерій, вони спрацювали на всіх без винятку зразках. Значення C_t коливалися від 13,54 до 18,30. «Найпізнішим» вийшов графік

ампліфікації, отриманий на ДНК з *L. monocytogenes*, але це може бути пов'язано з початково низькою концентрацією бактерій у культуральному середовищі. Значення ΔRn лежали у межах від 80 до 140 rfu.

Отримані результати показали, що обрані нами праймери давали дуже сильний сигнал на відповідній їм бактеріальній ДНК. Дещо занижким виявився рівень нормованого сигналу ΔRn . Для перевірки можливості покращення роботи праймерів необхідно було провести подальшу процедуру оптимізації.

3.5.3. Оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу

У процесі розроблення тест-систем особливу увагу приділяють оцінюванню аналітичних характеристик, таких як ефективність перебігу ПЛР, специфічність, чутливість, межа детектування, повторюваність та відтворюваність результатів аналізу. В даній роботі оцінювання проводили відповідно до вимог, що пред'являються до тест-систем, розроблених на основі методу ПЛР [306].

Наступним етапом досліджень була оптимізація роботи всіх чотирьох пар праймерів та зондів до них (*hly*, *invA*, *iraH*, *b16S*) у форматі мультиплексу. Оптимізацію умов ампліфікації мультиплексу проводили за такими параметрами, як температура гібридизації праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів.

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».

Оптимізацію за гібридизацією праймерів проводили в діапазоні температурних значень від 60 до 68 °C, у форматі двостадійного та трьохстадійного ПЛР (табл. 3.95, 3.96). Концентрацію йонів магнію (Mg^{2+}),

концентрацію та співвідношення праймерів і зондів було використано такі, як і в попередніх дослідженнях. Результати підбору належної температури гібридизації праймерів наведено на рисунках 3.68–3.70.

Таблиця 3.96

Базовий двостадійний протокол проведення ПЛР у реальному часі

Крок	Етап		Т°С	Час (сек)	Збір даних	Цикл
1	Початкова денатурація		94	180	ні	1х
2	Ампліфікація	Денатурація	95	20	ні	45х
3		Гібридизація і синтез	60	40	так	

a	Well	Fluor	Content	Sample	C(t)	b	Well	Fluor	Content	Sample	C(t)
	B01	ROX	NTC-01	OK-60C	N/A		B01	ROX	NTC-01	OK-63C	N/A
	B02	ROX	Unkn-02	LM1	18,92		B02	ROX	Unkn-02	LM1	18,96
	B03	ROX	Unkn-03	LM2	24,02		B03	ROX	Unkn-03	LM2	23,40
	B04	ROX	Unkn-04	LM3	27,37		B04	ROX	Unkn-04	LM3	28,28
	C03	ROX	Unkn-11	mix1	23,03		C03	ROX	Unkn-11	mix1	27,04
	C04	ROX	Unkn-12	mix2	33,07		C04	ROX	Unkn-12	mix2	40,85
c	C05	ROX	Unkn-13	mix3	43,28	d	C05	ROX	Unkn-13	mix3	N/A
	Well	Fluor	Content	Sample	C(t)		Well	Fluor	Content	Sample	C(t)
	B01	ROX	NTC-01	OK-65C	1,55		B01	ROX	NTC-01	OK-68C	N/A
	B02	ROX	Unkn-02	LM1	17,47		B02	ROX	Unkn-02	LM1	20,86
	B03	ROX	Unkn-03	LM2	20,25		B03	ROX	Unkn-03	LM2	25,90
	B04	ROX	Unkn-04	LM3	31,21		B04	ROX	Unkn-04	LM3	N/A
	C03	ROX	Unkn-11	mix1	39,02		C04	ROX	Unkn-12	mix1	33,36
e	C04	ROX	Unkn-12	mix2	N/A		C05	ROX	Unkn-13	mix2	N/A
	C05	ROX	Unkn-13	mix3	N/A		C06	ROX	Unkn-14	mix3	N/A
	Well	Fluor	Content	Sample	C(t)	f	Well	Fluor	Content	Sample	C(t)
	B01	ROX	NTC-01	OK	N/A		B01	Cy5	NTC	OK	N/A
	B02	ROX	Unkn-02	LM1	18,89		B02	Cy5	Unkn-02	LM1	17,99
	B03	ROX	Unkn-03	LM2	23,01		B03	Cy5	Unkn-03	LM2	21,84
	B04	ROX	Unkn-04	LM3	26,97		B04	Cy5	Unkn-04	LM3	20,72
	C03	ROX	Unkn-11	mix1	21,90		C03	Cy5	Unkn-11	mix1	14,92
	C04	ROX	Unkn-12	mix2	35,37		C04	Cy5	Unkn-12	mix2	16,67
	C05	ROX	Unkn-13	mix3	39,47		C05	Cy5	Unkn-13	mix3	15,64

Рис. 3.68. Значення величин граничного циклу (Ct) під час підбору умов ампліфікації мультиплексу (hly+b16S) за температурою гібридизації праймерів: (a) – праймери hly, Ta=60°C; (b) – hly, Ta=63°C; (c) – hly, Ta=65°C; (d) – hly, Ta=68°C; (e) – hly за двостадійної ПЛР, Ta=60°C; (f) – праймери b16S за двостадійної ПЛР, Ta=60°C.

Для оптимізації першого мультиплексу (hly+b16S), спрямованого на визначення збудника лістеріозу, було використано ДНК з трьох різних

ізолятів *L. monocytogenes*, а також три різні зразки сумішей ДНК *Listeria*, *Salmonella* та *Shigella*. Отримані результати продемонстрували, що найкращі результати в мультиплексній реакції було отримано за $T_a=60^{\circ}\text{C}$ як за трьохстадійної, так і двостадійної ПЛР. З підвищенням температури гібридизації значення C_t починали збільшуватися та поступово зникати. Для зразків сумішей ДНК це спостерігали вже за 63°C , для ДНК з монокультури – 68°C . Слід зазначити, що для праймерів b16S коливання значень C_t були неістотними, у межах двох-трьох циклів (рис. 3.68 а–f). Значення ΔR_n за каналом hly/ROX/помаранчевий коливалися в межах 200–1400 rfu, за каналом b16S/Cy5/фіолетовий – 50–200 rfu. Найкращий результат за цим показником було зафіксовано за $T_a=60^{\circ}\text{C}$ двохстадійної ПЛР.

a	Well	Fluor	Content	Sample	C_t	b	Well	Fluor	Content	Sample	C_t
	B01	FAM	NTC-01	OK-60C	N/A		B01	FAM	NTC-01	OK-63C	N/A
	B05	FAM	Unkn-05	Salm1	18,17		B05	FAM	Unkn-05	Salm1	18,49
	B06	FAM	Unkn-06	Salm2	18,65		B06	FAM	Unkn-06	Salm2	19,10
	B07	FAM	Unkn-07	Salm3	17,81		B07	FAM	Unkn-07	Salm3	18,89
	C03	FAM	Unkn-11	mix1	19,57		C03	FAM	Unkn-11	mix1	19,88
	C04	FAM	Unkn-12	mix2	19,68		C04	FAM	Unkn-12	mix2	20,61
	C05	FAM	Unkn-13	mix3	19,15		C05	FAM	Unkn-13	mix3	19,89
c	Well	Fluor	Content	Sample	C_t	d	Well	Fluor	Content	Sample	C_t
	B01	FAM	NTC-01	OK-65C	N/A		B01	FAM	NTC-01	OK-68C	N/A
	B05	FAM	Unkn-05	Salm1	17,79		B05	FAM	Unkn-05	Salm1	18,67
	B06	FAM	Unkn-06	Salm2	19,92		B06	FAM	Unkn-06	Salm2	18,61
	B07	FAM	Unkn-07	Salm3	N/A		B07	FAM	Unkn-07	Salm3	N/A
	C03	FAM	Unkn-11	mix1	22,38		C04	FAM	Unkn-12	mix1	N/A
	C04	FAM	Unkn-12	mix2	21,13		C05	FAM	Unkn-13	mix2	22,55
	C05	FAM	Unkn-13	mix3	N/A		C06	FAM	Unkn-14	mix3	N/A
e	Well	Fluor	Content	Sample	C_t	f	Well	Fluor	Content	Sample	C_t
	B01	FAM	NTC-01	OK	N/A		B01	Cy5	NTC	OK	N/A
	B05	FAM	Unkn-05	Salm1	16,55		B05	Cy5	Unkn-05	Salm1	15,75
	B06	FAM	Unkn-06	Salm2	16,47		B06	Cy5	Unkn-06	Salm2	15,93
	B07	FAM	Unkn-07	Salm3	17,51		B07	Cy5	Unkn-07	Salm3	14,79
	C03	FAM	Unkn-11	mix1	17,36		C03	Cy5	Unkn-11	mix1	15,09
	C04	FAM	Unkn-12	mix2	18,48		C04	Cy5	Unkn-12	mix2	16,68
	C05	FAM	Unkn-13	mix3	18,56		C05	Cy5	Unkn-13	mix3	15,84

Рис. 3.69. Значення величин граничного циклу (C_t) під час підбору умов ампліфікації мультиплексу (invA+b16S) за температурою гібридизації праймерів: (a) – праймери invA, $T_a=60^{\circ}\text{C}$; (b) – invA, $T_a=63^{\circ}\text{C}$; (c) – invA, $T_a=65^{\circ}\text{C}$; (d) – invA, $T_a=68^{\circ}\text{C}$; (e) – invA за двостадійної ПЛР, $T_a=60^{\circ}\text{C}$; (f) – праймери b16S за двостадійної ПЛР, $T_a=60^{\circ}\text{C}$.

Оптимізацію мультиплексу (invA+b16S) проводили за використання ДНК різних ізолятів *Salmonella* та зразків сумішей ДНК *Listeria*, *Salmonella*,

Shigella. Найбільш оптимальні результати було отримано за $T_a=60^{\circ}\text{C}$ під час проведення двостадійної ПЛР. Стосовно праймерів b16S, коливання значень C_t , як і в попередньому мультиплексі, були незначними (рис. 3.69 a–f). Значення ΔR_n за каналом invA/FAM/синій коливалися в межах 300–600 rfu, за каналом b16S/Cy5/фіолетовий – 50–200 rfu. Найкращий результат за цим показником було зафіксовано за $T_a=60^{\circ}\text{C}$ трьохстадійного ПЛР.

a	Well	Fluor	Content	Sample	C_t	b	Well	Fluor	Content	Sample	C_t
	B01	HEX	NTC-01	OK-60C	N/A		B01	HEX	NTC-01	OK-63C	N/A
	B08	HEX	Unkn-08	Shig1	13,53		B08	HEX	Unkn-08	Shig1	13,46
	C01	HEX	Unkn-09	Shig2	14,44		C01	HEX	Unkn-09	Shig2	14,33
	C02	HEX	Unkn-10	Shig3	15,82		C02	HEX	Unkn-10	Shig3	16,01
	C03	HEX	Unkn-11	mix1	14,75		C03	HEX	Unkn-11	mix1	14,46
	C04	HEX	Unkn-12	mix2	16,02		C04	HEX	Unkn-12	mix2	15,89
	C05	HEX	Unkn-13	mix3	17,77		C05	HEX	Unkn-13	mix3	17,59
c	Well	Fluor	Content	Sample	C_t	d	Well	Fluor	Content	Sample	C_t
	B01	HEX	NTC-01	OK-65C	N/A		B01	HEX	NTC-01	OK-68C	N/A
	B08	HEX	Unkn-08	Shig1	13,30		C01	HEX	Unkn-09	Shig1	13,44
	C01	HEX	Unkn-09	Shig2	14,08		C02	HEX	Unkn-10	Shig2	14,53
	C02	HEX	Unkn-10	Shig3	15,55		C03	HEX	Unkn-11	Shig3	16,25
	C03	HEX	Unkn-11	mix1	14,57		C04	HEX	Unkn-12	mix1	14,57
	C04	HEX	Unkn-12	mix2	16,21		C05	HEX	Unkn-13	mix2	16,71
	C05	HEX	Unkn-13	mix3	17,57		C06	HEX	Unkn-14	mix3	18,27
e	Well	Fluor	Content	Sample	C_t	f	Well	Fluor	Content	Sample	C_t
	B01	HEX	NTC-01	OK	N/A		B01	Cy5	NTC	OK-60C	N/A
	B08	HEX	Unkn-08	Shig1	13,51		B08	Cy5	Unkn-08	Shig1	14,57
	C01	HEX	Unkn-09	Shig2	14,57		C01	Cy5	Unkn-09	Shig2	15,53
	C02	HEX	Unkn-10	Shig3	16,02		C02	Cy5	Unkn-10	Shig3	16,21
	C03	HEX	Unkn-11	mix1	14,48		C03	Cy5	Unkn-11	mix1	15,51
	C04	HEX	Unkn-12	mix2	16,11		C04	Cy5	Unkn-12	mix2	16,56
	C05	HEX	Unkn-13	mix3	17,73		C05	Cy5	Unkn-13	mix3	15,91

Рис. 3.70. Значення величин граничного циклу (C_t) під час підбору умов ампліфікації мультиплексу (ірaН+b16S) за температурою гібридизації праймерів: (a) – праймери ірaН, $T_a=60^{\circ}\text{C}$; (b) – ірaН, $T_a=63^{\circ}\text{C}$; (c) – ірaН, $T_a=65^{\circ}\text{C}$; (d) – ірaН, $T_a=68^{\circ}\text{C}$; (e) – ірaН за двостадійної ПЛР, $T_a=60^{\circ}\text{C}$; (f) – праймери b16S за двостадійної ПЛР, $T_a=60^{\circ}\text{C}$.

Оптимізацію мультиплексу (ірaН+b16S) проводили за використання ДНК трьох різних ізолятів *Shigella* та сумішей ДНК *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*. За всім спектром температур гібридизації, що аналізувався, значних змін не спостерігалось (рис. 3.70 a–f). Значення C_t коливалися в межах 13,30–16,25 для зразків ДНК з монокультури та 14,46–18,27 для зразків сумішей ДНК. Це було характерно як для каналу ірaН/HEX/зелений, так і для

b16S/Cy5/фіолетовий. Значення ΔR_n за каналом HEX коливалися в межах 3–500 rfu, за каналом Cy5 – 50–200 rfu. Найкращий результат за цим показником було зафіксовано за $T_a=60^\circ\text{C}$ двостадійної ПЛР.

Отже, проведені дослідження з оптимізації умов ампліфікації дали змогу встановити оптимальну температуру роботи праймерів для всіх трьох мультиплексів. У подальших дослідженнях з розроблення тест-систем використовувалася температура гібридизації праймерів $T_a=60^\circ\text{C}$ та двостадійний протокол ампліфікації для ПЛР у реальному часі.

Концентрація MgCl_2 , KCl і рН буфера значною мірою визначають специфічність і чутливість ПЛР. Зміна складу буферу за концентрацією будь-якого з них призводить до зміни якісних та/або кількісних характеристик кінцевого продукту – ампліфікату. Концентрація MgCl_2 впливає на гібридизацію праймерів, денатурацію зразка та, крім того, активність *Taq*-полімерази. Надлишок Mg^{2+} може призводити до отримання неспецифічного ампліфікату. Tris-HCl і KCl забезпечують необхідну йонну силу та рН суміші. KCl є активатором ПЛР і його додають для поліпшення гібридизації праймерів. Концентрація KCl у 50 мМ є граничною величиною, а подальше її збільшення призводить до інгібування роботи полімерази. Оптимізуючи ПЛР-суміш за концентрацією MgCl_2 , KCl і рН буферу, можна досягти зменшення виходу неспецифічного продукту та збільшення специфічного ампліфікату [690].

Наступним етапом з оптимізації умов ампліфікації мультиплексу був підбір оптимальної концентрації MgCl_2 . Для оптимізації ПЛР за даним показником було обрано три точки – 1,5; 2,5 та 3,5 мМ MgCl_2 . За найкращу концентрацію вважали ту, за якої спостерігали найменше значення C_t та найбільше значення ΔR_n .

За результатами досліджень на рисунку 3.71 (a–d) наведено дані з оптимізації умов ампліфікації мультиплексів за концентрацією іонів Mg^{2+} . Для мультиплексу hly+b16S, за каналом ROX, який відповідає *L. monocytogenes*, найменше середнє значення C_t було отримано за

концентрації MgCl_2 3,5мМ і становило $17,53 \pm 0,104$. Значення нормованого сигналу ΔRn становило 1800 rfu. Найбільше значення Ct та найменше значення ΔRn було зафіксовано за концентрації MgCl_2 1,5 мМ ($19,09 \pm 0,005$; 1250 rfu).

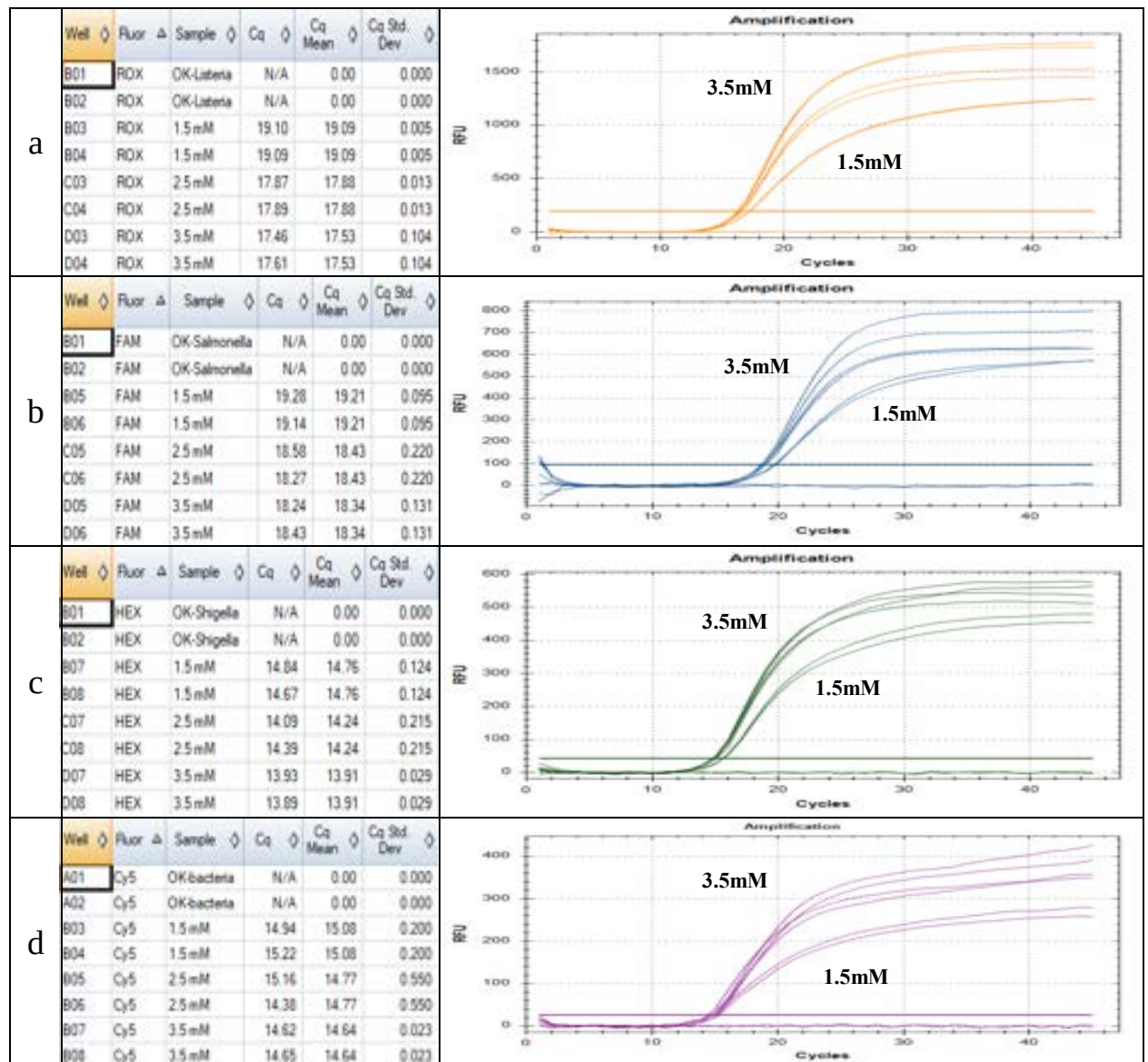


Рис. 3.71. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за оптимізації умов ампліфікації за концентрацією йонів Mg^{2+} : (a) – канал флуоресценції hly/ROX/помаранчевий; (b) – канал invA/FAM/синій; (c) – канал iraH/HEX/зелений.

Схожі результати було отримано для двох інших мультиплексних реакцій invA+b16S та iraH+b16S. Так, для мультиплексу invA+b16S за каналом FAM, який відповідає *Salmonella*, найкращі результати було отримано за концентраціями MgCl_2 3,5мМ ($\text{Ct}=18,34 \pm 0,131$) та 2,5мМ ($\text{Ct}=18,43 \pm 0,220$). Тим часом MgCl_2 1,5мМ відповідало $\text{Ct}=19,21 \pm 0,095$. Стосовно показника ΔRn , концентраціям MgCl_2 3,5мМ, 2,5мМ та 1,5мМ

відповідали значення 750, 600 та 580 rfu.

За каналом HEX (*Shigella*) мультиплексу ipaH+b16S найкращий результат також було отримано за концентрації 3,5мМ ($C_t=13,91\pm0,029$, $\Delta R_n=590$). Зі зниженням концентрації $MgCl_2$ спостерігали незначне збільшення C_t та зменшення величини ΔR_n . Концентрації 2,5мМ відповідали $C_t=14,24\pm0,215$, $\Delta R_n=510$, та концентрації 1,5мМ – $C_t=14,76\pm0,124$, $\Delta R_n=470$. Подібну тенденцію спостерігали і за каналом Cy5 у всіх трьох мультиплексних системах (рис. 3.71 d).

Отже, експериментальним шляхом нами встановлено, що 3,5 мМ є найбільш оптимальною концентрацією $MgCl_2$ для всіх трьох розроблених мультиплексних систем.

Попередньо проведена оптимізація роботи праймерів за температурою гібридизації та концентрацією йонів Mg^{2+} у всіх трьох мультиплексних системах дала змогу досягти оптимальних результатів ампліфікації ДНК-мішеней. Тому з фінансово-економічних міркувань було вирішено не проводити подальшу оптимізацію мультиплексів за таким параметром, як концентрація праймерів та зондів, а залишити ті концентрації, що було використано під час проведення попередніх досліджень – 5 пкмоль/реакцію для праймерів та 2,5 пкмоль/реакцію для зондів.

3.5.4. Дослідження специфічності та ефективності роботи тест-систем у форматі мультиплексу

Молекулярно-генетичні методи досліджень характеризуються високим рівнем специфічності. Висока специфічність методу ПЛР обумовлена тим, що в досліджуваному матеріалі виявляється унікальний, характерний тільки для даного збудника фрагмент ДНК, що виключає можливість одержання помилкових результатів, на відміну від методу імуноферментного аналізу, де часто мають місце помилки у зв'язку з перехресно-реагуючими антигенами. Відповідно до літературних джерел, специфічність ПЛР-аналізу під час

визначення патогенів багатьох інфекційних захворювань сягає 95–99 % [306].

Перевірку специфічності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованої з наступних організмів: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella umbilo*, *Shigella dysenteriae* 1, *Shigella dysenteriae* 2, *Shigella sonnei*, *Shigella sonnei* 1a, *Shigella flexneri* 1a, *Shigella flexneri* 1b, *Shigella boydii* 1, *Shigella boydii* 2, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morganii*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Glycine max*, *Salmo salar*, *Gallus gallus*, *Bos taurus* і *Homo sapiens*.

Зразки для відпрацювання умов ампліфікації, а також перевірки специфічності розроблених тест-систем було люб'язно надано у вигляді ДНК Державним Закладом «Український центр з контролю та моніторингу захворювань МОЗ України».

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 Ct для праймерів hly коливалися у межах 19,41–24,95, у поодиноких випадках – 34,88–35,13. Для праймерів invA та iraH значення Ct знаходилися в межах 16,72–19,67 та 13,04–16,35, відповідно. Стосовно праймерів b16S, специфічних до ДНК широкого кола бактерій, тут значення Ct варіювало від 16,79 до 24,95. Результати досліджень підтвердили 100 % специфічність всіх обраних праймерів. У таблиці 3.97 та на рисунку 3.72 наведено результати з перевірки специфічності роботи праймерів (hly, invA, iraH, b16S), підібраних для ідентифікації *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, а також бактеріальної ДНК. Видно, що всі чотири пари праймерів з зондами мають 100 % специфічність до обраної мішені та можуть бути використані під час розроблення тест-систем.

Ефективність роботи праймерів з зондами у форматі мультиплексу перевіряли шляхом проведення ПЛР 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.

Таблиця 3.97

Перевірка специфічності роботи праймерів (hly, invA, ipaH, b16S), підібраних для визначення ДНК *L.cytogenes*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*.

№	Зразки ДНК	Праймери з зондами			
		hly/Rox	invA/Fam	ipaH/Hex	b16S/Cy5
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	-	+
2	<i>Listeria ivanovii</i>	-	-	-	+
3	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	+	-	+
4	<i>Salmonella typhi</i>	-	+	-	+
5	<i>Sapmonella paratyphi B</i>	-	+	-	+
6	<i>Sapmonella typhimurium</i>	-	+	-	+
7	<i>Sapmonella umbilo</i>	-	+	-	+
8	<i>Shigella dysenteriae 1</i>	-	-	+	+
9	<i>Shigella dysenteriae 2</i>	-	-	+	+
10	<i>Shigella sonnei</i>	-	-	+	+
11	<i>Shigella sonnei 1a</i>	-	-	+	+
12	<i>Shigella flexneri 1a</i>	-	-	+	+
13	<i>Shigella flexneri 1b</i>	-	-	+	+
14	<i>Shigella boydii 1</i>	-	-	+	+
15	<i>Shigella boydii 2</i>	-	-	+	+
16	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+
19	<i>Proteus morgani</i>	-	-	-	+
20	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+
21	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	+
22	<i>Glycine max</i>	-	-	-	-
23	<i>Salmo salar</i>	-	-	-	-
24	<i>Gallus gallus</i>	-	-	-	-
25	<i>Bos taurus</i>	-	-	-	-
26	<i>Homo sapiens</i>	-	-	-	-

Оскільки ефективність ПЛР залежить тільки від кута нахилу кривої, абсолютні значення концентрації ДНК були непотрібними [241]. Кожна серія

десятикратних розведень ДНК складалася з чотирьох точок. На рис. 3.73–3.75 наведено графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналами Fam, Hex, Rox та Cy5. На основі отриманих значень Ct за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Manager (Version 1.6.541.1028) будували графіки стандартних кривих в системі координат $\text{Log}[N] / C_t$ (d). Стандартні криві описуються загальним лінійним рівнянням $y = -\alpha x + b$, де α виражає тангенс кута нахилу кривої, та дають змогу оцінити ефективність ампліфікації.

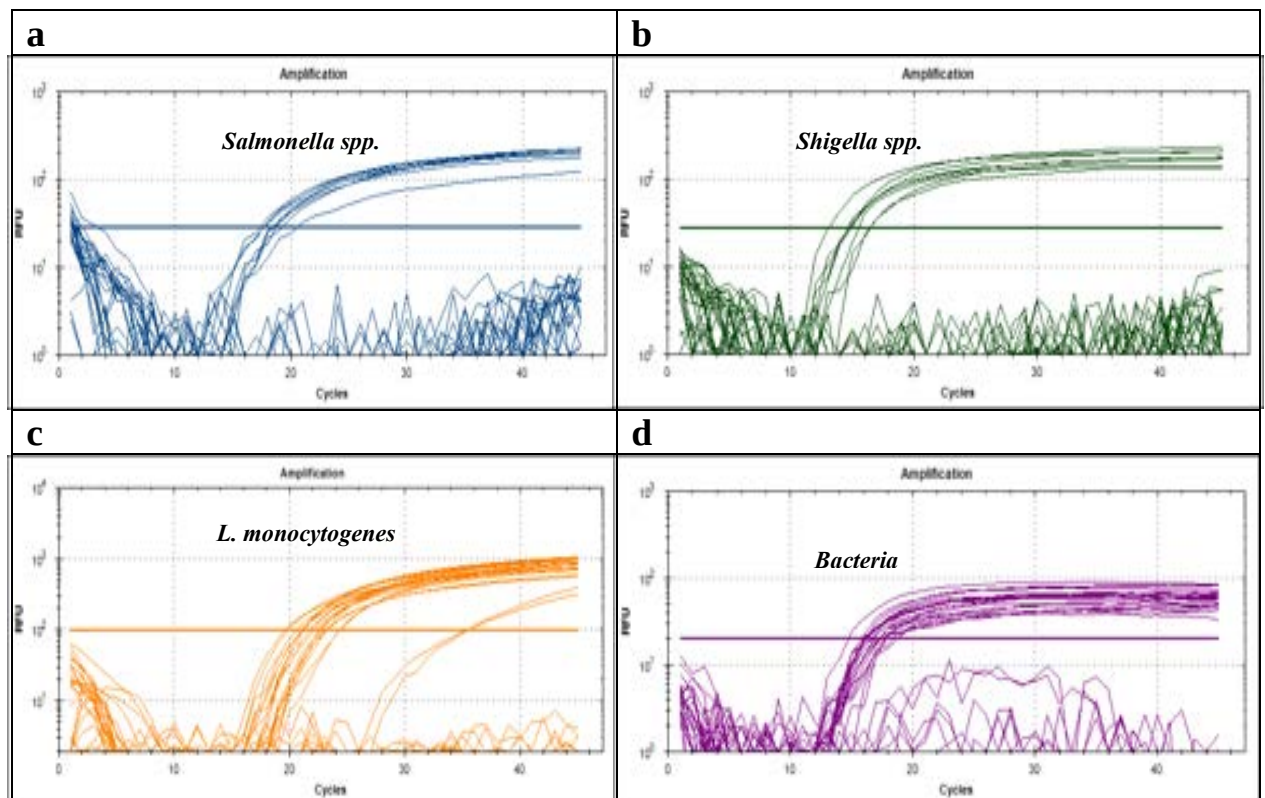


Рис. 3.72. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час перевірки специфічності роботи праймерів та зондів: (a) – hly / Rox / помаранчевий, (b) – invA / Fam / синій, (c) – ipaH / Hex / зелений, (d) – b16S / Cy5 / фіолетовий.

У таблиці 3.98 для кожної пари праймерів з зондом, що входять до складу трьох різних мультиплексних систем, наведено розраховані дані щодо кута нахилу кінетичної кривої (α , Slope), коефіцієнта кореляції (R^2) та ефективності реакції (E). Отримані результати демонструють високий рівень розроблених тест-систем.

Таблиця 3.98

Ефективність проведення ПЛР трьох мультиплексних тест-систем

№	Назва	Е, %	R²	α
1	« <i>L. monocytogenes</i> -ідентифікація»			
	hly	95,1	0,980	-3,445
	b16S	92,0	0,980	-3,530
2	« <i>Salmonella</i> spp.-ідентифікація»			
	invA	99,7	0,992	-3,330
	b16S	96,0	0,996	-3,422
3	« <i>Shigella</i> spp.-ідентифікація»			
	ipaH	94,6	0,999	-3,457
	b16S	92,5	0,998	-3,517

Так, значення кутів нахилу α для праймерів hly (-3,445) та b16S (-3,530), що входять до складу мультиплексу «*L. monocytogenes*-ідентифікація» (рис. 3.73 а–с), вкладалися в бажаний діапазон від –3,58 до –3,10, а показники R² були не нижчими за 0,98 [241]. Розраховані значення ефективності перебігу ПЛР становили 95,1 % для каналу hly / ROX / помаранчевий та 92,0 % – для b16S / Cy5 / фіолетовий.

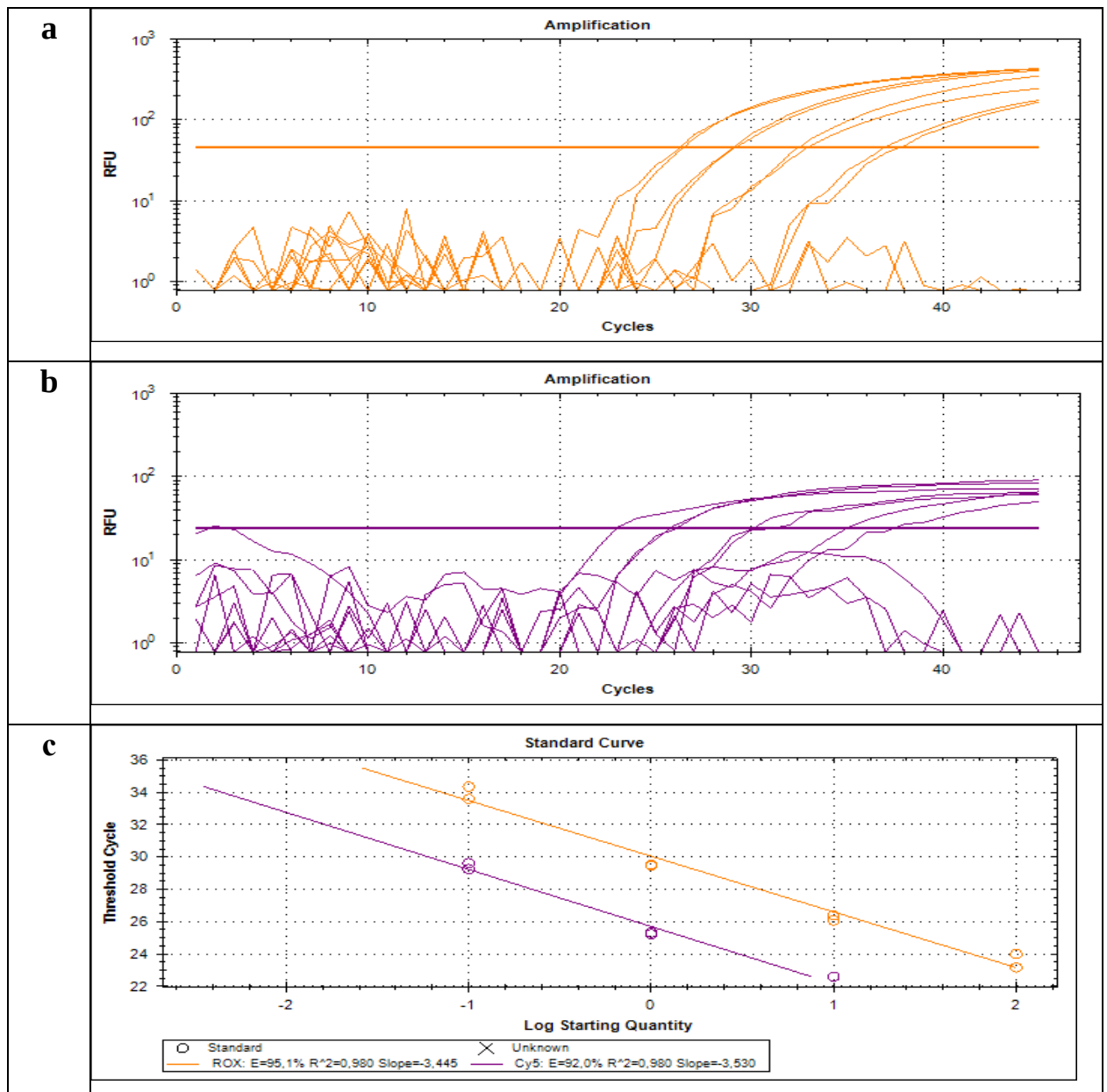


Рис. 3.73. Оцінювання ефективності роботи праймерів та зондів у мультиплексній реакції: (а) – графік накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналом hly/ROX/помаранчевий; (б) – за каналом b16S/Cy5/фіолетовий; (с) – стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК.

Для мультиплексу «*Salmonella* spp.-ідентифікація» було отримано наступні результати (рис. 3.74 а–с). Значення кутів нахилу α для праймерів invA (-3,330) та b16S (-3,422) вкладалися в рекомендований діапазон від -3,58 до -3,10. Показники R^2 дорівнювали 0,992 та 0,996, відповідно, та були не нижчими за 0,98. Розраховані значення ефективності проходження ПЛР склали 99,7% для каналу invA / FAM / синій та 96,0 % – для b16S / Cy5 / фіолетовий.

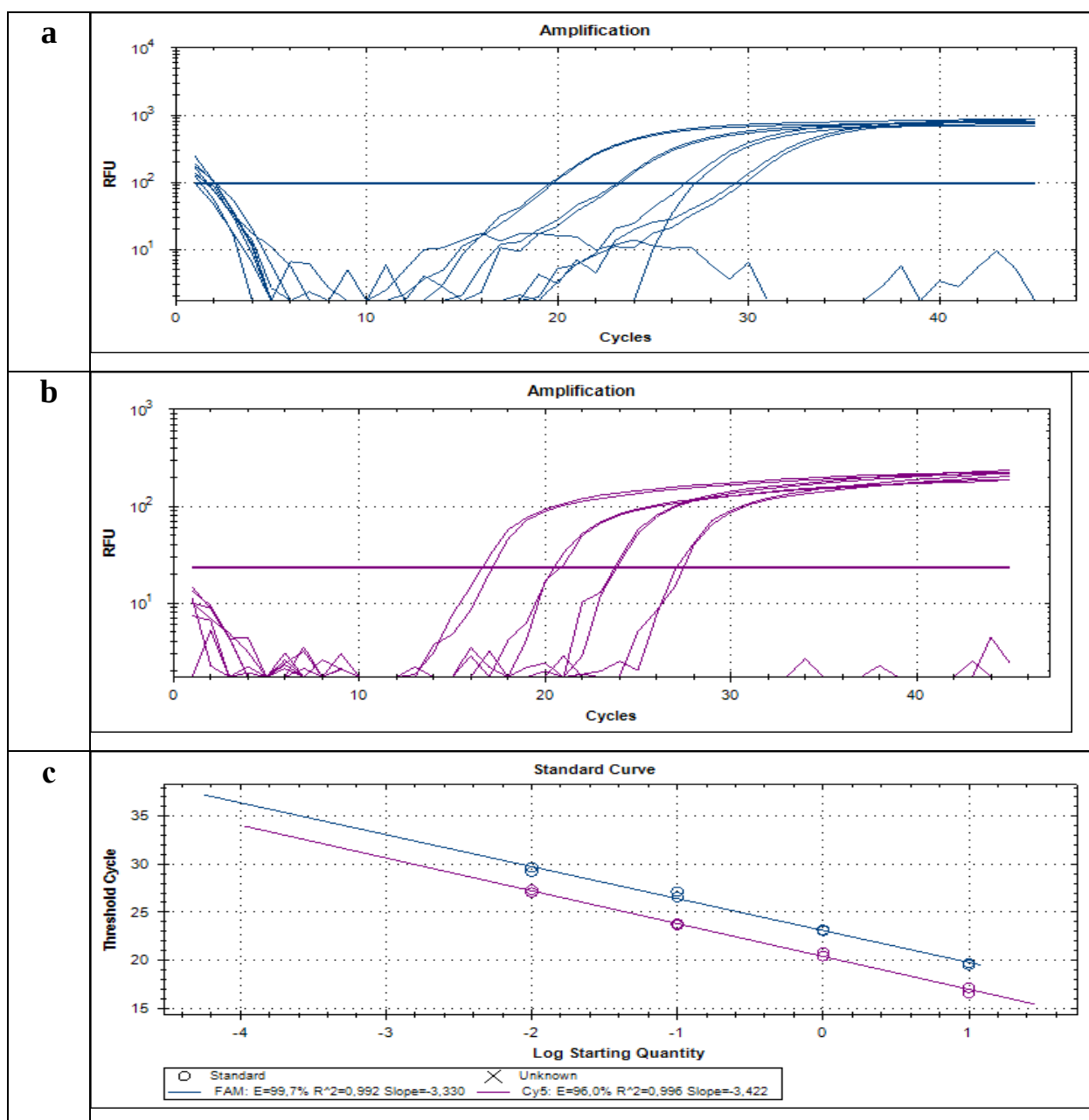


Рис. 3.74. Оцінювання ефективності роботи праймерів та зондів у мультиплексній реакції: (а) – графік накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналом *invA*/FAM/синій; (б) – за каналом *b16S*/Cy5/фіолетовий; (с) – стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК.

Схожі результати було отримано також для мультиплексу «*Shigella* spp.- ідентифікація» (рис. 3.75 а–с). Значення кутів нахилу α для праймерів *iraN* (-3,457) та *b16S* (-3,517) вкладалися в рекомендований діапазон від -3,58 до -3,10. Показники R^2 були найвищими та дорівнювали 0,999 та 0,998, відповідно. Розраховані значення ефективності перебігу ПЛР становили 94,6 % для каналу *iraN* / HEX / зелений та 92,5 % – для *b16S* / Cy5 / фіолетовий.

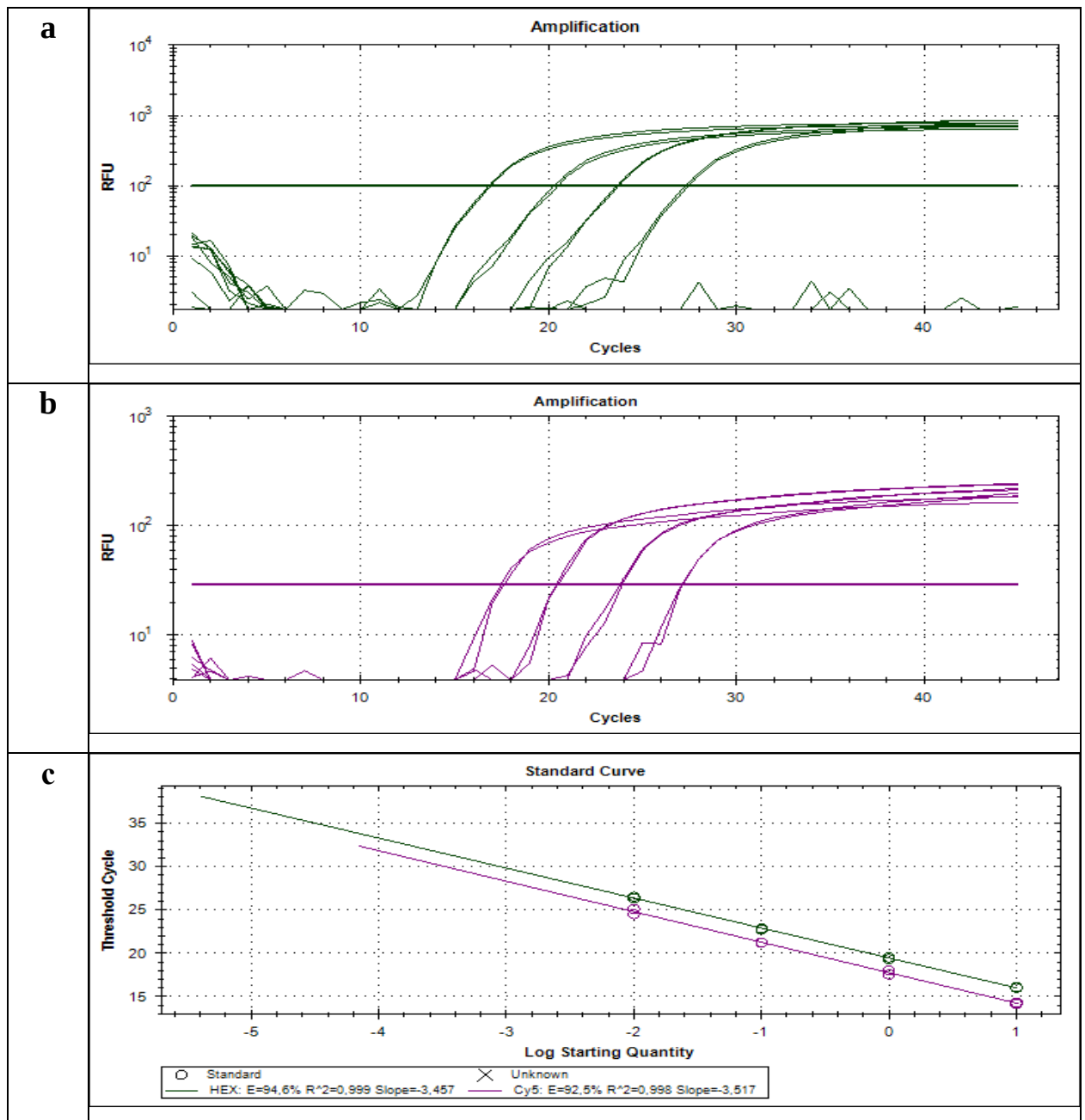


Рис. 3.75. Оцінювання ефективності роботи праймерів та зондів у мультиплексній реакції: (а) – графік накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналом іраН/HEX/зелений; (б) – за каналом b16S/Cy5/фіолетовий; (с) – стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК.

Проведені дослідження трьох мультиплексних систем показали, що праймери з зондами, які входять до їхнього складу, забезпечують високу ефективність проведення ПЛР у реальному часі. Таким чином, в даних комбінаціях вони можуть бути використані як діагностичні тест-систем для визначення ДНК збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу.

3.5.5. Визначення аналітичної чутливості тест-систем

Одним із найважливіших метрологічних показників роботи тест-системи є її чутливість. Під чутливістю розуміють ту мінімальну кількість ДНК, яку здатна виявляти дана тест-система. Під аналітичною чутливістю – мінімальну кількість мішені, за якої тест-система забезпечує 100 % відтворюваність результатів аналізу [488]. Для визначення межі виявлення (LOD) та аналітичної чутливості розроблених тест-систем готували серії десятикратних розведень препаратів ДНК. Під час проведення ПЛР позитивними вважалися всі зразки зі значенням $Ct \leq 45$.

Для приготування десятикратних розведень використовували кількісно охарактеризовані препарати ДНК, що були виділені із свіжорозморожених клітин *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*. Якісний та кількісний склад ДНК перевіряли спектрофотометрично за допомогою приладу BioPhotometer® (Eppendorf, Німеччина). У подальшу роботу брали 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. Це свідчило про відсутність у досліджуваних ДНК зайвих речовин, які б могли бути інгібіторами перебігу ПЛР.

Таблиця 3.99

Результати визначення аналітичної чутливості мультиплексних тест-систем за використання десятикратних розведень ДНК (нг)

Розведення \ Мішені	<i>L. monocytogenes</i>		<i>Salmonella spp.</i>		<i>Shigella spp.</i>	
	hly	b16S	invA	b16S	ipaH	b16S
1×10^2	10	10	10	10	10	10
1×10^1	10	10	10	10	10	10
1×10^0	10	10	10	10	10	10
1×10^{-1}	10	10	10	10	10	10
1×10^{-2}	10	10	10	10	10	10
1×10^{-3}	10	10	10	10	10	10
1×10^{-4}	9	10	10	10	10	10
1×10^{-5}	7	8	8	9	4	8
1×10^{-6}	-	-	-	-	-	-

Для всіх досліджуваних препаратів ДНК було приготовлено серію десятикратних розведень. Кожна серія нараховувала дев'ять точок, які лежали в діапазоні від 1×10^2 до 1×10^{-6} нг ДНК. Кожна точка аналізувалася у 10 повторностях. На підставі отриманих даних (наявність-відсутність сигналу) було визначено межу виявлення та аналітичну чутливість мультиплексних тест-систем (табл. 3.99).

Визначення чутливості праймерів hly (канал Rox / помаранчевий) та b16S (канал Cy5 / фіолетовий) у мультиплексній системі проводили за допомогою десятикратних розведень ДНК *L. monocytogenes*. Було приготовлено 9 точок з концентраціями від 100 до 1×10^{-6} нг / реакцію (рис. 3.76). Сигнал апліфікації за каналом hly / Rox / помаранчевий спостерігли за концентрації ДНК від 100 до 1×10^{-5} нг, а значення C_t коливались від $16,29 \pm 0,104$ до $37,61 \pm 0,163$. Стосовно каналу b16S / Cy5 / фіолетовий, сигнал апліфікації також був присутнім до точки 1×10^{-5} включно, а значення C_t лежали у межах від $16,65 \pm 0,140$ до $35,25 \pm 0,129$. Таким чином, отримані результати дали змогу встановити, що межа виявлення (LOD) для каналів Rox та Cy5 мультиплексної системи «*L. monocytogenes*-ідентифікація» становить 1×10^{-5} нг, а аналітична чутливість – 1×10^{-3} та 1×10^{-4} нг, відповідно.

	Well	Fluor	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.		Well	Fluor	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.
a	B01	ROX	OK-hly	N/A	0.00	0.000		B01	Cy5	OK-hly	N/A	0.00	0.000
	B02	ROX	OK-hly	N/A	0.00	0.000		B02	Cy5	OK-hly	N/A	0.00	0.000
	B03	ROX	100 ng	16.10	16.18	0.105		B03	Cy5	100 ng	16.96	16.83	0.179
	B04	ROX	100 ng	16.25	16.18	0.105		B04	Cy5	100 ng	16.70	16.83	0.179
	B05	ROX	10 ng	19.71	19.70	0.017		B05	Cy5	10 ng	20.79	20.87	0.113
	B06	ROX	10 ng	19.69	19.70	0.017		B06	Cy5	10 ng	20.95	20.87	0.113
	B07	ROX	1 ng	23.33	23.39	0.085		B07	Cy5	1 ng	23.36	23.57	0.302
	B08	ROX	1 ng	23.45	23.39	0.085		B08	Cy5	1 ng	23.79	23.57	0.302
	C01	ROX	0.1 ng	26.33	26.26	0.096		C01	Cy5	0.1 ng	27.12	27.29	0.249
	C02	ROX	0.1 ng	26.19	26.26	0.096		C02	Cy5	0.1 ng	27.47	27.29	0.249
	C03	ROX	0.01 ng	29.63	29.73	0.138		C03	Cy5	0.01 ng	30.10	30.40	0.419
	C04	ROX	0.01 ng	29.82	29.73	0.138		C04	Cy5	0.01 ng	30.69	30.40	0.419
	C05	ROX	0.001 ng	33.10	33.34	0.334		C05	Cy5	0.001 ng	32.94	33.45	0.717
	C06	ROX	0.001 ng	33.57	33.34	0.334		C06	Cy5	0.001 ng	33.95	33.45	0.717
	C07	ROX	1×10^{-4} ng	37.23	37.83	0.855		C07	Cy5	1×10^{-4} ng	33.93	34.48	0.780
	C08	ROX	1×10^{-4} ng	38.44	37.83	0.855		C08	Cy5	1×10^{-4} ng	35.04	34.48	0.780
	D01	ROX	1×10^{-5} ng	38.22	37.66	0.794		D01	Cy5	1×10^{-5} ng	34.47	35.00	0.739
	D02	ROX	1×10^{-5} ng	37.10	37.66	0.794		D02	Cy5	1×10^{-5} ng	35.52	35.00	0.739
	D03	ROX	1×10^{-6} ng	N/A	0.00	0.000		D03	Cy5	1×10^{-6} ng	N/A	0.00	0.000
	D04	ROX	1×10^{-6} ng	N/A	0.00	0.000		D04	Cy5	1×10^{-6} ng	N/A	0.00	0.000

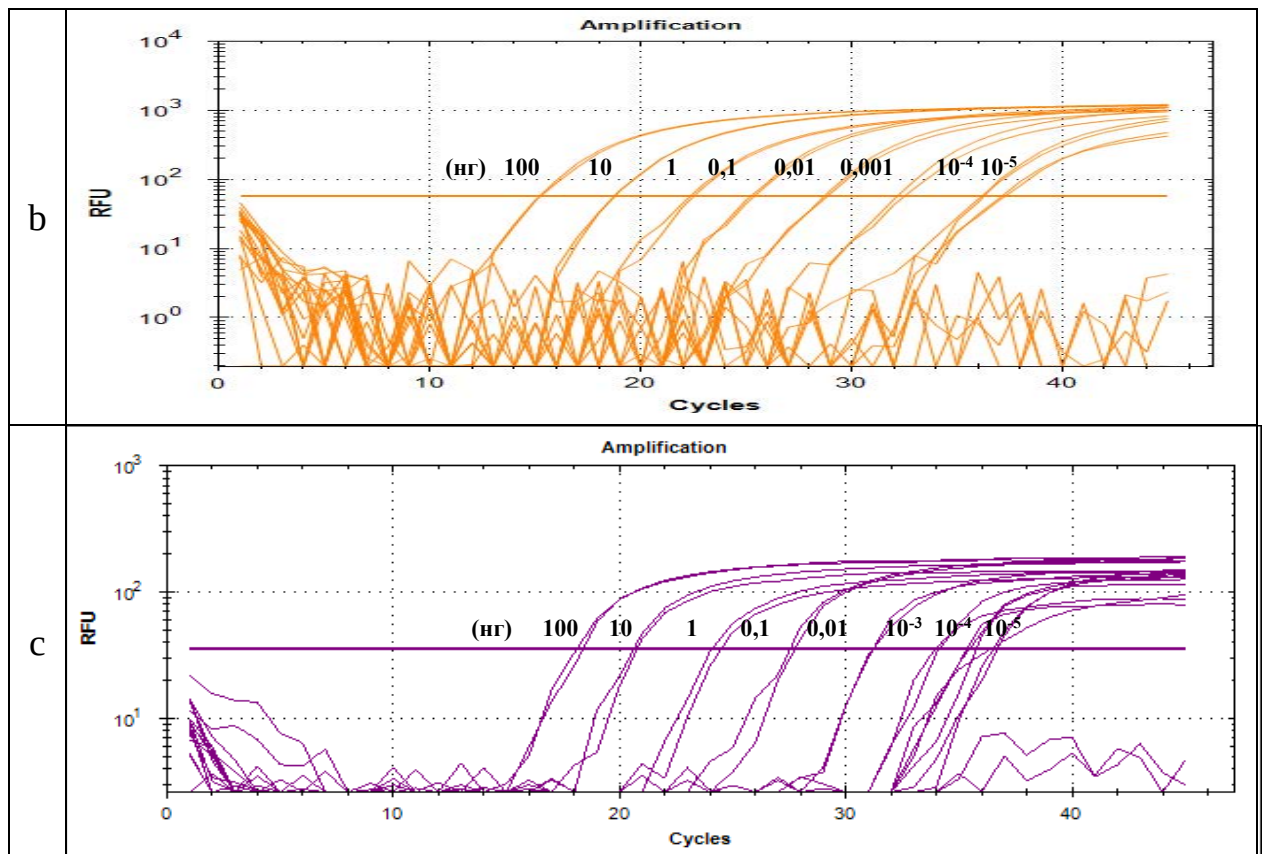


Рис. 3.76. Приклад визначення чутливості тест-системи «*L. monocytogenes*-ідентифікація»: (а) – значення S_t для серії десятикратних розведень ДНК з праймерами *hly* і *b16S*; (б) – графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналом *hly* / Rox / помаранчевий; (с) – за каналом *b16S* / Cy5 / фіолетовий.

Для дослідження роботи праймерів *invA* (канал Fam / синій) та *b16S* (канал Cy5 / фіолетовий) у мультиплексній системі «*Salmonella* spp.-ідентифікація» було приготовлено 9 точок десятикратних розведень препарату ДНК з *S. typhimurium* від 100 до 1×10^{-6} нг / реакцію (рис. 3.77 а–с). Сигнали апліфікації було зафіксовано за точками 100– 1×10^{-5} , за двома каналами. Стабільні значення S_t для каналу *invA* / Fam / синій коливались від $16,14 \pm 0,096$ до $36,88 \pm 0,098$, в той час як для каналу *b16S* / Cy5 / фіолетовий – від $13,65 \pm 0,147$ до $32,10 \pm 0,200$. Аналіз отриманих результатів показав, що обидва канали мультиплексної системи «*Salmonella* spp.-ідентифікація» мають схожі значення межі виявлення та аналітичної чутливості – 1×10^{-5} та 1×10^{-4} нг, відповідно.

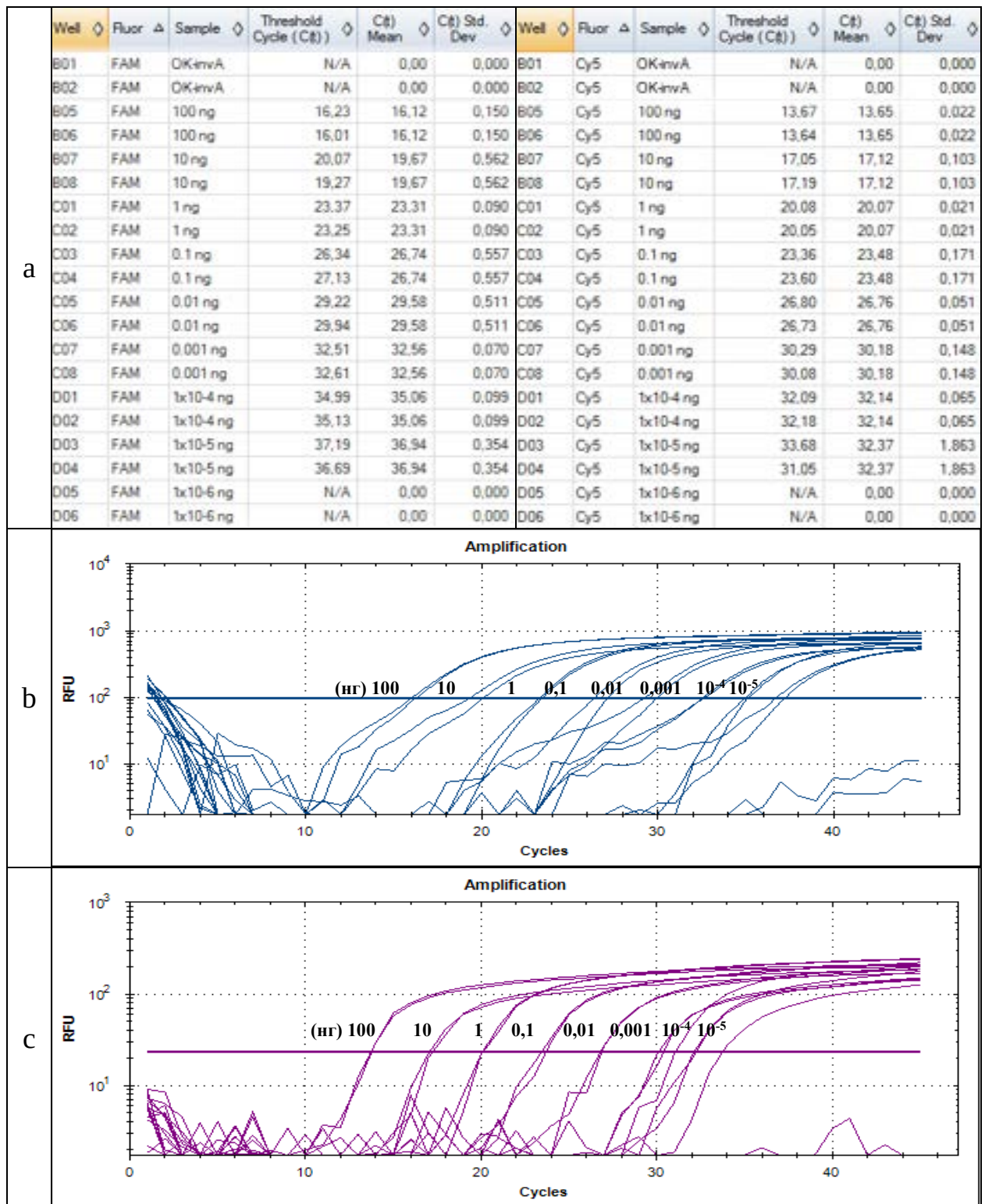


Рис. 3.77. Приклад визначення чутливості тест-системи «Salmonella spp.-ідентифікація»: (а) – значення C_t для серії десятикратних розведень ДНК з праймерами *invA* і *b16S*; (б) – графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналом *invA* / Fam / синій; (с) – за каналом *b16S* / Cy5 / фіолетовий.

Для оцінювання роботи праймерів *iraN* (канал Hex / зелений) та *b16S* (канал Cy5 / фіолетовий) у мультиплексній системі «Shigella spp.-

ідентифікація» було також досліджено 9 точок десятикратних розведень ДНК з концентраціями $100\text{--}1\times 10^{-6}$ нг / реакцію (рис. 3.78 а–с). Для розведення використовували ДНК ізольовану з *S. sonnei*. Стабільний сигнал ампліфікації за каналом іраН / Нех / зелений спостерігали до концентрації 1×10^{-4} нг / реакцію включно, при цьому значення C_t лежали у межах від $13,54\pm 0,090$ до $33,89\pm 0,100$. Стосовно каналу b16S / Cy5 / фіолетовий, сигнал ампліфікації був присутнім до точки 1×10^{-5} нг / реакцію, а значення C_t лежали у межах від $12,03\pm 0,083$ до $34,85\pm 0,116$.

Отримані результати дали змогу встановити, що LOD для каналів Нех та Cy5 мультиплексної системи «*Shigella* spp.-ідентифікація» становить 1×10^{-4} та 1×10^{-5} нг, відповідно, а аналітична чутливість для обох – 1×10^{-4} нг.

У медичній, ветеринарній та фітосанітарній службах під час проведення молекулярно-генетичних досліджень прийнято величину чутливості діагностичних тест-систем виражати в ДНК/РНК копіях (копії/мл) або геномних еквівалентів (ГЕ/мл) на одиницю об'єму (мілілітр). Для визначення інфекційного агента (вірус гепатиту) та розрахунку його кількісного вмісту в біологічному матеріалі вживають термін «вірусне навантаження», яке виражається в МО/мл (міжнародні одиниці на мілілітр або кубічний сантиметр) [691]. З огляду на це отримані значення межі виявлення та аналітичної чутливості (нг) розроблених тест-систем було перераховано в ГЕ/мл. Для розрахунків було використано комп'ютерний додаток «dsDNA copy number calculator» [692]. Розмір геномів бактерій у п.н. брали з літературних джерел [693–695]. Розрахунок здійснювався за формулою:

$$N = (A \times 6.022 \times 10^{23}) / (B \times 1 \times 10^9 \times 650) \quad (3.5), \quad \text{де}$$

N – кількість копій досліджуваної мішені,

A – вихідна концентрація ДНК (нг),

B – довжина молекули (п.н.).

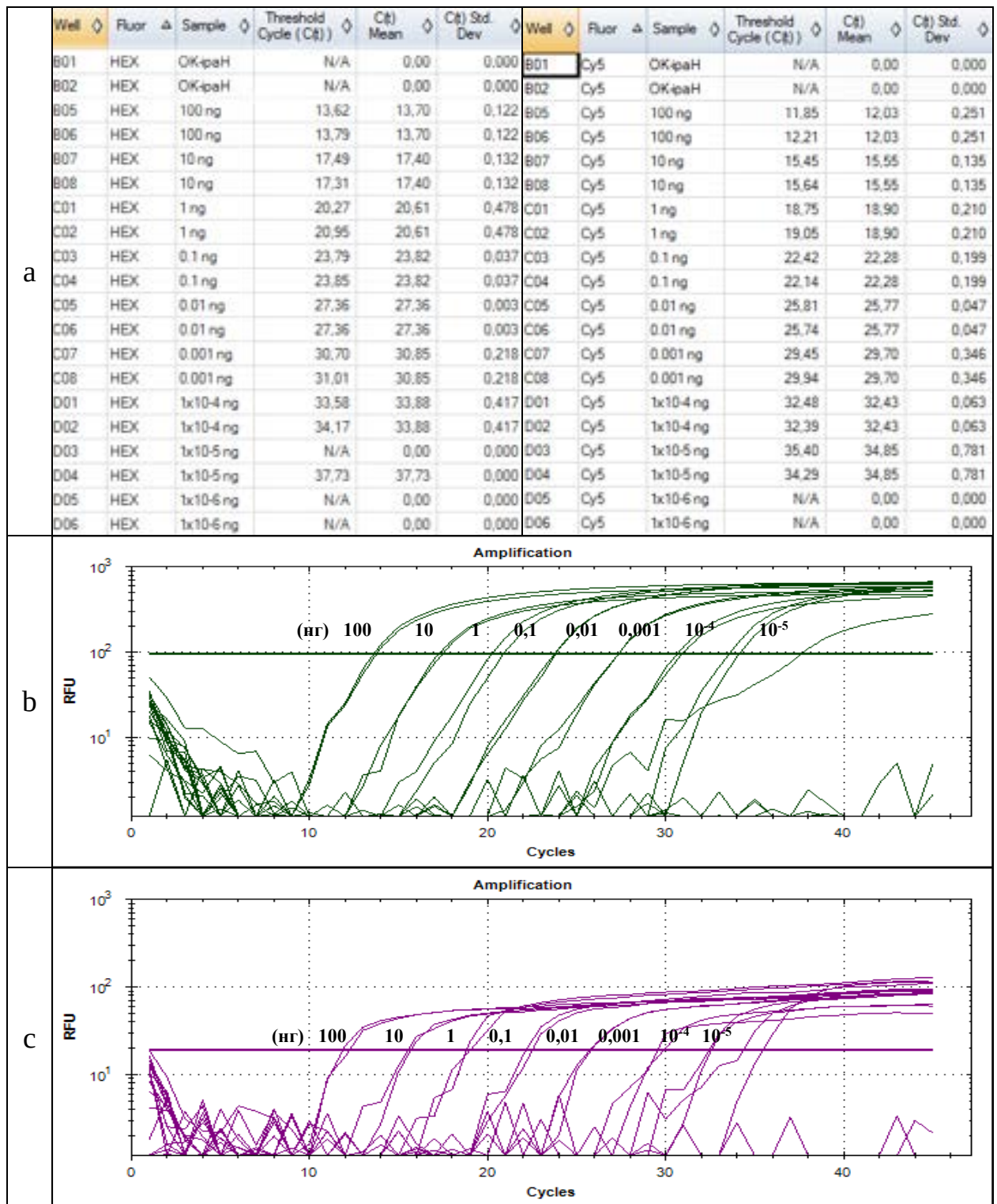


Рис. 3.78. Приклад визначення чутливості тест-системи «Shigella spp.-ідентифікація»: (а) – значення C_t для серії десятикратних розведень ДНК з праймерами *iraH* і *b16S*; (б) – графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналом *iraH* / Hex / зелений; (с) – за каналом *b16S* / Cy5 / фіолетовий.

Отримані результати наведено у таблиці 3.100. Видно, що аналітична чутливість системи для ідентифікації *L. Monocytogenes* є дещо меншою за дві

інші. Але в цілому за даним показником тест-системи є співставними з зарубіжними аналогами [697–699].

Таблиця 3.100

**Отримані значення межі виявлення (LOD) та аналітичної чутливості
розроблених тест-систем**

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

3.5.6. Комплектація тест-систем

Проведені дослідження дали змогу розробити три діагностичні тест-системи для ідентифікації збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині тваринного та рослинного походження. Специфічність розроблених тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація», «*Shigella spp.*-ідентифікація» становить 100 %, аналітична чутливість знаходиться у межах $n \times 10^3$ ГЕ/мл. Визначення аналітичної чутливості проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК відповідних патогенів. Тест-систему характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу (табл. 3.101).

За допомогою розроблених нами тест-систем можливо здійснювати державний санітарно-епідеміологічний нагляд, проводити скринінгові дослідження для санітарно-гігієнічного моніторингу, санітарно-епідеміологічних експертиз, здійснювати розслідування спалахів харчових отруєнь та інфекцій з харчовим шляхом передачі, а також проводити виробничий контроль продовольчої сировини та готової до споживання продукції.

Розроблені нами тест-системи виробляються у виконанні на 100 реакцій. Комплектацію тест-систем виконано згідно з вимогами до ПЛР тест-систем. До складу кожного ПЛР-набору входять суміш для проведення ПЛР у реальному часі, Таq ДНК-полімераза, позитивний (ПКЗ) та негативний (НКЗ) контрольні зразки. Позитивний контрольний зразок представляє собою розчин ДНК відповідного патогена у концентраціях від 50 до 250 нг/мкл (табл. 3.102).

Таблиця 3.101

Вимоги щодо метрологічних показників тест-системи

Назва показника	Характеристика за показником
Чутливість	Межа відносної чутливості становить не менш ніж $n \times 10^3$ ГЕ/мл
Специфічність	Специфічність – 100 % за тестування панелі препаратів ДНК мікроорганізмів
Достовірність	Діагностикум має виявляти специфічні послідовності ДНК у концентрації $\geq 1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ нг

Таблиця 3.102

Приклад комплектації тест-системи

Складова частина	Зовнішній вигляд	pH
ПЛР-РЧ суміш 1800 мкл	Прозора безбарвна або світло-рожевого кольору рідина	від 7,0 до 8,8
Таq-полімераза 20 мкл	Прозора безбарвна рідина	від 7,5 до 8,5
НКЗ (-) 100 мкл	Прозора безбарвна рідина	від 5,0 до 7,5
ПКЗ (+) 100 мкл	Прозора безбарвна	від 5,0 до 7,5

3.5.7. Апробація роботи розроблених тест-систем

Для оцінювання можливості використання розроблених тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація» та «*Shigella spp.*-ідентифікація» для визначення відповідних патогенів у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині було проведено серію досліджень на попередньо охарактеризованих зразках патогенних

мікроорганізмів. Зразки ДНК мікроорганізмів з паспортами культур, з яких її було ізольовано, було люб'язно надано Державним закладом «Український центр з контролю та моніторингу захворювань Міністерства охорони здоров'я України». Всього було перевірено 24 зразки ДНК штамів *L. monocytogenes* та 23 зразки інших мікроорганізмів (табл. 3.103).

Таблиця 3.103

**Апробація роботи тест-систем за використання попередньо
охарактеризованих зразків ДНК мікроорганізмів**

Інв. №	Назва штаму	Метод характеристики	ПЛР-аналіз			
			hly	invA	ipaH	b16S
262	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	23,07	N/A *	N/A	23,48
258	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний	22,36	N/A	N/A	22,40
261	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний	22,94	N/A	N/A	23,35
246	<i>L. monocytogenes</i>	Культуральний, біохімічний, біо-логічний, чутливість на антибіотики	21,58	N/A	N/A	21,88
276	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, біологічний	34,88	N/A	N/A	22,46
236	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	19,41	N/A	N/A	19,06
271	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	19,67	N/A	N/A	19,92
249	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	20,96	N/A	N/A	21,53
287	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	21,65	N/A	N/A	21,85
283	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	24,18	N/A	N/A	24,95
278	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, біологічний	22,45	N/A	N/A	22,42
324	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний,	20,85	N/A	N/A	20,77

		культуральний, біохімічний, біологічний				
372	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	21,90	N/A	N/A	22,60
312	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, біологічний	22,86	N/A	N/A	23,50
333	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	35,13	N/A	N/A	22,43
314	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний (негативний результат)	<u>N/A</u>	N/A	N/A	20,41
319	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	21,14	N/A	N/A	21,06
341	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, біологічний	24,15	N/A	N/A	24,79
302	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний	22,60	N/A	N/A	23,21
378	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, чутливість на антибіотики	21,12	N/A	N/A	21,11
388	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний	20,88	N/A	N/A	20,53
423	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, біологічний, чутливість на антибіотики	20,42	N/A	N/A	19,89
473	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний	18,82	N/A	N/A	23,64
485	<i>L. monocytogenes</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний	18,35	N/A	N/A	22,88
190	<i>L. weshimeri</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний	N/A	N/A	N/A	16,89
1	<i>S. dysenteriae</i> 1	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	N/A	14,73	20,63
2	<i>S. sonnei</i>	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	N/A	13,04	24,78

3	<i>S. flexneri</i> 1a	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	N/A	14,53	20,20
4	<i>S. flexneri</i> 1b	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	N/A	16,40	23,14
7	<i>S. boydii</i> 2	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	N/A	14,66	23,88
9	<i>S. sonnei</i> 1a	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	N/A	16,35	19,44
11	<i>S. boydii</i> 1	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	N/A	15,39	23,11
12	<i>S. dysenteriae</i> 2	Морфологічний, культуральний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	N/A	14,91	20,13
23	<i>S. enteritidis</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	17,89	N/A	17,93
34	<i>S. typhi</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	18,31	N/A	19,20
36	<i>S. paratyphi B</i>	Морфологічний, біохімічний	N/A	18,11	N/A	22,10
42	<i>S. paratyphi B</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	19,67	N/A	18,06
43	<i>S. typhimurium</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики	N/A	17,80	N/A	17,86
47	<i>S. typhi</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	17,20	N/A	17,70
62	<i>S. umbilo</i>	Морфологічний, біохімічний	N/A	16,72	N/A	18,00
112	<i>C. freundii</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	N/A	N/A	15,81
118	<i>P. mirabilis</i>	Морфологічний, біохімічний	N/A	N/A	N/A	16,79
121	<i>P. morganii</i>	Морфологічний, біохімічний	N/A	N/A	N/A	17,12
124	<i>K. pneumoniae</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний, чутливість на антибіотики, фаголізіс	N/A	N/A	N/A	18,35

126	<i>E. cloacae</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	N/A	N/A	17,77
166	<i>S. typhimurium</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	17,11	N/A	18,81
211	<i>E. coli</i>	Морфологічний, біохімічний, серологічний	N/A	N/A	N/A	17,64

* Дані відсутні (N/A, not available)

Результати досліджень, отримані за використання розроблених тест-систем, повністю збіглися з даними, підтвердженими іншими методами аналізу. Виняток становив зразок 314, який, за результатами морфологічних, культуральних та біохімічних досліджень, давав позитивний сигнал на *L. monocytogenes*, але був негативним за біологічним методом. Таким чином, розроблені нами тест-системи продемонстрували високу специфічність та відтворюваність результатів аналізу.

Крім того, було проаналізовано 26 зразків харчової продукції, попередньо досліджених на присутність збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу мікробіологічними методами досліджень. Попередню інкубацію досліджуваних зразків у поживних середовищах проводили згідно з МУК 4.2.2872-11 (РФ). Для культивування патогенних бактерій, присутніх у харчовій продукції, і накопичення їхньої біомаси, підготовлені відповідним чином зразки засівали в рідкі поживні середовища та інкубували відповідно до процедур збагачення, які передбачено під конкретні мікроорганізми. Біоматеріалом для подальшого дослідження методом ПЛР слугували проби культуральної рідини, що містили напрацьовану біомасу мікроорганізмів разом з продуктами їхнього метаболізму [308].

Проведені дослідження продемонстрували, що розроблені тест-системи здатні ідентифікувати ДНК *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* та *Shigella spp.* зі специфічністю 100 % та можуть бути рекомендовані до використання у лабораторній практиці. Нині тест-системи проходять подальшу апробацію на базі лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестсандарт».

Висновки до розділу 3.5

1. Розроблено методологію з визначення патогенної мікрофлори у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині рослинного та тваринного походження;
2. Визначено видові та родові молекулярно-генетичні маркери та підібрано праймери з зондами для ідентифікації представників родів *Listeria*, *Salmonella* та *Shigella*;
3. Розроблено три мультиплексні тест-системи «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація» та «*Shigella spp.*-ідентифікація», які уможливають ідентифікацію збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу за допомогою технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі;
4. Апробація роботи тест-систем на контрольних зразках показала високу специфічність, чутливість та відтворюваність результатів аналізу. Специфічність розробленого діагностикума становить 100 %, аналітична чутливість знаходиться у межах $n \times 10^3$ ГЕ/мл.;
5. Розроблені тест-системи можуть бути рекомендовані для здійснення контролю сільськогосподарської сировини та харчової продукції на вміст патогенів.

Перелік наукових робіт, в яких опубліковані результати досліджень, представлених у розділі 3.5:

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.

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

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.

Облап Р. В., Гриневич Н. Є., Новак Н. Б., Димань Т. М.. 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.

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.

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 безпека продуктів тваринництва*: всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція. Полтава, Україна, 2014. С.154–157.

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.

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 науково-практична конференція. Київ, Україна, 2017. С. 117–118.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Будь-яке наукове дослідження базується на методології, яка визначає послідовність залучення різних форм знань і дає змогу здійснити основні принципи наукових досліджень, які базуються на об'єктивності, відтворюваності, доказовості і точності отриманих результатів. Дослівний переклад терміну «методологія» з грецької мови (methodos – шлях, logos – слово, вчення) — «вчення про методи», однак під цим терміном розуміють як вчення про науковий метод пізнання, так і сукупність методів, що застосовуються в будь-якій галузі науки. Методологія як спосіб вивчення будь-якої реальності багатовимірна і, так само як підходи до наукових досліджень, може бути класифікована за використання різних ознак [700].

У даній роботі було систематизовано знання щодо можливостей застосування молекулярно-генетичних методів аналізу спадкового матеріалу (ДНК) для визначення низки молекулярно-генетичних маркерів, які б уможлилювали контроль за безпечністю та якістю сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження, а також готової до використання харчової продукції.

Проблеми безпечності харчової продукції носять комплексний характер, а її вирішення потребує численних зусиль як з боку вчених, виробників, санітарно-епідеміологічних служб, державних органів, так і споживачів. Актуальність цієї проблеми зростає з кожним роком, оскільки безпека харчової продукції безпосередньо впливає не тільки на здоров'я людей, але і на збереження генофонду людства в цілому [21]. Безпечність харчової продукції – це передусім відсутність безпосередньої небезпеки для здоров'я людини під час вживання їжі (харчові отруєння, харчові інфекції), а також відсутність небезпеки віддалених наслідків (канцерогенна, мутагенна та тератогенна дія). Таким чином, безпечними можна вважати харчові

продукти, які не шкодять здоров'ю не тільки нинішнього покоління, але й майбутнього [701, 702].

З харчовими продуктами в організм людини можуть в значній кількості надходити речовини, небезпечні для здоров'я. Сьогодні гостро постає питання підвищення відповідальності виробників щодо забезпечення ефективних механізмів контролю якості харчової продукції та гарантування їх безпеки для здоров'я споживача. Безпечність харчової продукції оцінюється за санітарно-гігієнічними нормами, які включають біологічні об'єкти, потенційно небезпечні хімічні сполуки, радіонукліди та шкідливі рослинні домішки. Присутність їх у харчових продуктах повинна регламентуватися та не перевищувати допустимих норм. Більше половини шкідливих речовин, що регулярно потрапляють в організм людини, надходять з їжею. Тому забезпечення екологічної безпеки харчової продукції є вкрай важливим. В останні роки актуальність цієї проблеми зросла у зв'язку з широким застосуванням різних харчових добавок та нових пакувальних матеріалів. Безпека харчової продукції може також зменшитись у разі застосування нових технологій виробництва, таких як генна інженерія або радіаційне опромінення. Крім того, з'явилася велика кількість малих підприємств, на яких недостатньо контролюється технологічний процес виготовлення харчової продукції [703–706].

З огляду на різноманітність сільськогосподарської сировини харчова промисловість випускає продукцію різного асортименту з урахуванням галузевого характеру. Сільськогосподарська сировина, яка використовується для приготування харчової продукції, різниться за хімічним складом, структурно-механічними властивостями, галузями застосування, характером та інтенсивністю мікробіологічного, біохімічного, фізичного та хімічного впливу. Структура харчової продукції, її хімічні властивості, впливають на вибір методів контролю, нормованих показників якості, на підготовку проб до аналізу [707].

Безпечність та якість харчової продукції оцінюють за такими основними

показниками як органолептичні, фізико-хімічні, біологічні, а також токсикологічні. В залежності від характеру параметрів показників застосовують органолептичні або вимірювальні методи дослідження. Оцінювання якості продукції органолептичним методом виконується за визначеними якісними показниками (зовнішній вигляд, консистенція, запах, смак). Оцінювання показників якості вимірювальними методами виконують за використання технічних засобів. За своїми властивостями вимірювальні методи умовно поділяють на фізичні (спектральні, реологічні), хімічні (титрометричний, гравіметричний), фізико-хімічні (оптичні, електрохімічні, хроматографічні) та біологічні (імунологічні, молекулярно-генетичні) [708, 709].

Останні десятиріччя ознаменувалися помітним прогресом у розробленні та застосуванні підходів щодо визначення поліморфізму ДНК та підбору відповідних систем молекулярно-генетичних маркерів, які б сприяли ширшому впровадженню сучасних молекулярно-генетичних методів та технологій оцінювання та поліпшення безпечності та якості продукції у аграрному секторі. Сьогодні виділяють такі основні напрями розвитку: розроблення молекулярних методів діагностики та контролю безпечності і якості сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження; діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських видів тварин та фітосанітарний карантинний контроль; виявлення генетичних захворювань тварин на ранніх стадіях розвитку; генотипування організмів для створення генетичних паспортів порід, видів, таксономічних груп; маркер-асоційована селекція (MAS) [710].

В Україні упродовж останніх двадцяти років проводилися численні дослідження з застосування сучасних досягнень молекулярної генетики та різновидів молекулярно-генетичних маркерів у найрізноманітніших галузях вітчизняного тваринництва, рослинництва та харчової мікробіології [711-717]. Незважаючи на це, спостерігається значний дефіцит робіт з практичного застосування сучасних досягнень генетики та напрацювань під

час селекції високопродуктивних порід тварин, отримання сортів рослин з покращеними властивостями, розроблення систем моніторингу показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини та харчової продукції на всіх етапах її виробництва [718–720].

У виконаній роботі вперше запропоновано методологію молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження за допомогою сучасних методів молекулярно-генетичного аналізу. Дана методологія полягає у тому, що послідовності ДНК як основи спадкового матеріалу живих організмів (вірусів, бактерій, рослин, тварин) можуть бути використані як молекулярно-генетичні маркери, що уможливають контроль низки показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції (рис. 4.1).

Для розроблення та відпрацювання 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 потенційними генами-маркерами молочної продуктивності, зокрема κ -казеїну (*CSNK*), β -лактоглобуліну (*BLG*) та пролактину (*PRL*).

Дослідження взаємозв'язків між виявленими генотипами та основними параметрами молочної продуктивності (загальний надій, вміст % жиру та білка) показало, що найвищою молочною продуктивністю характеризувалися тварини з генотипами *BLG* AA (4435 кг) та *PRL* AG (4216 кг), найвищий % жиру в молоці мали корови з генотипом *BLG* AA (3,40 %), найвищий % білка у молоці мали тварини з генотипами *BLG* BB (3,13 %) та *PRL* AG (3,14 %). Оцінювання генетичної структури двох популяцій БРХ за трьома локусами одночасно (комплекси генотипів) дало змогу встановити наступне: найвища продуктивність (4413–5537 кг) спостерігалась у корів з генотипами *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* AG, *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* GG та *CSNK* AB / *BLG* AA / *PRL* AG; найвищі показники жирності молока у тварини з генотипами *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* AG (3,47 %), *CSNK* AA / *BLG* AA / *PRL* GG (3,48

%) та CSNK AA / BLG AB / PRL GG (3,45 %); найвищий вміст білка у тварин – CSNK AB / BLG AA / PRL AG (3,26 %), CSNK AB / BLG BB / PRL AG (3,27 %). За результатами досліджень впливу комбінацій генетичних варіантів CSNK, BLG та PRL на сиропридатність молока найкращі показники тривалості сичужного зсідання молока було встановлено для тварин з комплексними генотипами CSNK AB / BLG BB / PRL GG та CSNK AB / BLG AB / PRL GG.



Рис. 4.1. Загальна схема застосування методології молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції.

Для удосконалення методології ідентифікації небезпечних чинників у харчовій продукції тваринного походження було проведено порівняльну діагностику поголів'я ВРХ на присутність провірусної ДНК вірусу ВЛ ВРХ (BLV) за допомогою технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі. Як молекулярно-генетичний маркер було використано консервативну ділянку гена ЕпV, який кодує поверхневий вірусний глікопротеїд gp51. Отримані результати продемонстрували значно більшу чутливість та специфічність ПЛР-РЧ порівняно з методом РІД-аналізу, при цьому рівень інфікованості дослідженого поголів'я за двома методами становив відповідно 6,8 та 2,4 %. За результатами оцінювання ефективності використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу для ідентифікації збудника лейкозу було запропоновано застосування тест-системи як додаткового інструменту під час проведення протилейкозних заходів у господарствах та під час перевірки молока на молокопереробних підприємствах країни.

Розроблено методологію визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі SYBR[®]Green-технології 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. В якості молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* було обрано ділянки генів 16S рРНК та фактору елонгації Tu.

Запропоновано методологію визначення фальсифікації видової належності м'яса курятини, свинини та яловичини методом ПЛР-РЧ у харчовій продукції та кормах для тварин. В якості молекулярно-генетичних маркерів видової ідентифікації тваринної ДНК визначено послідовності, локалізовані в межах мітохондріальних генів цитохрому b (*cytb*) курки і свині та сателітної IV ДНК ВРХ (1.709 satellite IV DNA family). До визначених послідовностей обрано праймери з зондами для розроблення мультиплексної тест-системи на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі.

Розроблена діагностична тест-система «М'ясо-тест» уможлиблює ідентифікацію ДНК птиці, свині та ВРХ з межею виявлення не менш ніж 1×10^{-6} нг (1фг). Специфічність тест-системи становить 100 %, аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг (0,1нг/мл). Діагностикум характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу. Розроблена тест-система може бути рекомендована випробувальним лабораторіям для здійснення контролю фальсифікації видової належності м'яса у складі м'ясних продуктів.

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 прайсерів 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 ДНК самої рослини. Кожну розроблену тест-систему було виконано в форматі мультиплексу, що

уможливорює одночасне проведення двох, трьох або навіть чотирьох незалежних реакцій. Одна реакція направлена на виявлення внутрішнього ендогенного контролю перебігу ПЛР (ген рослини), інші – відповідного елемента генно-інженерного конструкту. Загальна кількість розроблених діагностиків – 51 найменування і включено тест-системи серії «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація». Якість розроблених тест-систем підтверджено під час вітчизняних та міжнародних раундів порівнювальних випробувань. 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 та патент на корисну модель (Додаток Л).

Вивчено питання присутності у харчовій продукції та продовольчій сировині злакових культур, що містять у своєму складі глютен та пов'язані з виникненням захворювання на целиацію у людей. Визначено молекулярно-генетичні маркери (*ω-гліадини* пшениці та жита, *B1 hordein* ячменю, *avenin* вівсу) даних культур та розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «Глютен-скринінг», яка уможливорює ідентифікацію навіть слідових кількостей пшениці, жита, вівса і ячменю у харчових продуктах. Валідаційні характеристики тест-системи перевірено шляхом порівняльних випробувань з комерційними ІФА- та ПЛР-діагностикумами. За отриманими результатами затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою ПЛР-РЧ тест-системи «Глютен-скринінг».

За аналізом літературних джерел та вивченням поліморфізму окремих генів було визначено молекулярно-генетичні маркери (гени *hly*, *invA*, *ipaH*) для ідентифікації збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу за допомогою *TaqMan*-технології ПЛР-РЧ. Проведені дослідження дали змогу розробити три діагностичні мультиплексні ПЛР-РЧ тест-системи для ідентифікації *L. Monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині тваринного та рослинного

походження. Специфічність розроблених тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp*-ідентифікація», «*Shigella spp.*- ідентифікація» становить 100 %, аналітична чутливість знаходиться у межах $n \times 10^3$ ГЕ/мл. Визначення аналітичної чутливості проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК відповідних патогенів. Тест-системи характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, що є підставою рекомендувати їх для здійснення контролю продовольчої сировини та харчових продуктів на вміст патогенів.

Результати дисертаційної роботи використовуються в освітньому процесі Білоцерківського національного аграрного університету на біолого-технологічному факультеті під час викладення дисциплін «Генетика з біометрією» і «Розведення сільськогосподарських тварин» та агробіотехнологічному факультеті під час викладання дисциплін «Спеціальна генетика» і «Біотехнологія в рослинництві» (Додаток М).

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 AB / 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 уможливило 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 уможливорює 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 уможливорює 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 сільсько-господарській 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ільченко Н. В., Кошеленко С. В., Одінцов О.М. Забезпечення розвитку системи управління якістю і безпечністю харчових продуктів регіонального агропромислового кластеру. *Збірник наукових праць ЧДТУ*. 2019. Вип. 53. С. 23–35.
2. Ковальчук С.Я. Європейські орієнтири аграрної сфери України: перспективи та можливості. *Економіка і суспільство*. 2016. № 2. С. 54–60.
3. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. ФАО. Москва : ВИЖ РАСХН, 2010. URL: <http://www.fao.org/3/a1250r/a1250r.pdf>. (дата звернення: 23.12.2020).
4. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Календарь Р. Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Монография. Одесса : Астропринт, 2011. 236 с.
5. Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи удосконалення і збереження генофонду порід сільсько-господарських тварин (монографія) / за ред.: М. В. Гладій, Ю. П. Полупан. Полтава: ТОВ «Фірма Техсервіс», 2018. 791 с.
6. Жукова Я. Ф., Петров П. І., Даниленко С. Г., Шугай М. О., Чорна Н. А., Вакуленко М. М. ПЛР-скринінг заквашувальних культур для підвищення вмісту есенціальних нутрієнтів у органічному кисломолочному продукті. *Продовольчі ресурси*. 2019. № 12. С. 94–112.
7. Ершов Ю. А. Основы молекулярной диагностики. Метабомика. М. : Гэотар-Медиа, 2016. 336 с.
8. Гуліч М. П., Онопрієнко О. М., Ольшевська О. Д. Харчування – вагомий фактор збереження здоров'я населення. *Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України (до 120-річчя з дня народження академіка О.М. Марзеєва)*: тези доп. наук.-практ. конф., м. Київ, 25 квіт. 2003 . Вип. 524. С. 34–38.
9. Кошкалда І. В. Актуальні питання продовольчого забезпечення. *Вісник*

Сумського національного аграрного університету. 2017. Вип. 4 (71). С. 207–212.

10. Урядовий кур'єр. 13 квітня, 2017. URL: <https://ukurier.gov.ua/uk/articles/yakist-zhittya-v-ukrayini-ocinki-ekspertiv> (дата звернення: 23.12.2020).

11. *World health statistics*. World Health Organization. 2015. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/170250/9789240694439_eng.pdf?sequence=1. (дата звернення: 23.12.2020).

12. Статистичний бюлетень. Таблиці народжуваності, смертності та очікуваної тривалості життя : збірник. Київ : Державна служба статистики України, 2017. 167 с.

13. Nolte E., C. M. McKee. Does health care save lives? Avoidable mortality revisited. London: The Nuffield Trust, 2004. 138 p.

14. Castelli A., Nizalova O. Avoidable Mortality: What It Means And How It Is Measured. Vol. 63. York: University of York Centre for Health Economics Research Paper, 2011. 44 p.

15. Єгоров Б., Мардар М. Стан харчування населення України. *Товари і ринки*, 2011. № 1. С. 140–147.

16. Штанько Л. Проблеми здорового харчування в Україні. *Electronic National University of Food Technologies Institutional Repository*. URL: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/18574/1/98.pdf>. (дата звернення: 23.12.2020).

17. Регулювання продовольчої безпеки у законодавстві Європейського союзу та України. URL: <http://old.minjust.gov.ua/file/23479.docx>. (дата звернення: 23.12.2020).

18. Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини : Закон України від 06.09.2005 № 2809-IV. URL: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/2809-15>. (дата звернення: 23.12.2020).

19. Микитюк В. М., Скидан О. В. Загальнодержавні та регіональні аспекти проблеми продовольчої безпеки в контексті європейської інтеграції та вступу України до СОТ. *Збірник наукових праць Луганського національного*

аграрного університету. Луганськ: ЛНАУ, 2004. - № 34 (46). С. 64-68.

20. Угода про асоціацію між Україною, з одного боку, та Європейським Союзом, Європейським співтовариством з атомної енергії і їхніми державами-членами, з іншого боку. URL: Режим доступу:

https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_011 (дата звернення: 24.12.2020).

21. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів / за ред. Т. М. Димань, Т. Г. Мазур. Київ : ВЦ «Академія», 2011. 520 с.

22. Варченко О. М., Крисанов Д. Ф., Артимонова І. В. Формування європейської моделі безпечності харчових продуктів та її впровадження на підприємствах аграрного сектору України. *Економіка та управління АПК*. 2016. № 1–2. С. 15-29.

23. Гаряча Ю. П. Правові засади внутрішнього ринку Європейського Союзу. *Стратегічні пріоритети*. 2009. №1 (10). С. 275-279.

24. Fact Sheets on the European Union URL: www.europarl.eu.int/facts/3_1_0_en.htm (дата звернення: 24.12.2020).

25. Право Європейського Союзу : в 2 т. Т. 2. Москва : Юрайт, 2015. 1023 с.

26. Green Papers. *Official website Euroglossary 2006*. URL: http://europa.dovidka.com.ua/b.html#_Toc90362090. (дата звернення: 24.12.2020)

27. White Papers. *Official website Euroglossary 2006*. URL: http://europa.dovidka.com.ua/b.html#_Toc90362090. (дата звернення: 24.12.2020).

28. Про встановлення загальних принципів і вимог законодавства про харчові продукти, створення Європейського органу з безпеки харчових продуктів і встановлення процедур у питаннях, пов'язаних із безпекою харчових продуктів: Регламент (ЄС) Європейського парламенту і Ради від 28.01.2002 № 178/2002. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es178-2002.pdf> (дата звернення: 24.12.2020).

29. Щодо гігієни харчової продукції: Постанова (ЄС) Європейського Парламенту та Ради від 29 квіт. 2004 р. № 852/2004. URL: www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es852-2004.pdf (дата звернення: 24.12.2020).

30. Галкіна О. М. Сучасний стан нормативно-правового забезпечення безпечності та якості харчових продуктів в Україні. *Науковий вісник публічного та приватного права*. 2017. С. 60-64.
31. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів: Закон України від 23.12.1997 № 771/97-ВР. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/771/97-%D0%B2%D1%80#Text> (дата звернення: 27.12.2020).
32. Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів: Закон України від 04.04.2018 № 1602-VII URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1602-18#Text>. (дата звернення: 27.12.2020).
33. Recommended International Code of Practice. General principles of food hygiene. Codex Alimentarius Commission CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Annex: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system and guidelines for its application. FAO/WHO. 1969. URL: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en (дата звернення: 27.12.2020).
34. Кодекс Алиментариус. Гигиена пищевых продуктов. Базовые тексты: пер. с англ. Москва.: Весь Мир, 2006. 36 с.
35. Плахотін В. Я. Проблеми розробки і впровадження системи HACCP та шляхи їх вирішення. *Наукові праці ОНАХТ*. 2009. Вип. 36.(2). С. 220-224.
36. Кантере В. М., Матисон В. А., Хангажеева М. А., Сазонов Ю. С. Система безопасности продуктов питания на основе принципов HACCP: монографія. Москва: Типографія РАСХН, 2004. 462 с.
37. Cato J. C. Economic values associated with seafood safety and implementation of seafood Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programmes. *FAO Fisheries Technical Paper*. 1998. № 381. 70 p.
38. Впровадження систем управління безпечністю харчових продуктів на українських підприємствах харчової промисловості. *Аналіз витрат і вигід*. 2011. URL: https://www.ecolabel.org.ua/images/page/vprovadjennya_systemy_nassr.pdf. (дата звернення: 20.05.2019).

39. Satin Miriam.(2005). Quality Enhancement in Food Processing Through HACCP. *Quality Enhancement in Food Processing Through HACCP*. Tokyo: Asian Productivity Organization, 2005. 184 p.
40. Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and Application Guidelines, The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food (NACMCF). *Journal of Food Protection*. 1998. Vol. 61. No 9.
41. HACCP Seven Principles. Inspection Methods. URL: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/9bef6a34-d7ef-441e-8478-f431aee441cf/16_IM_HACCP_Principles.pdf?MOD=AJPERES (дата звернення: 20.05. 2019).
42. Бочарова О. В. HACCP і системи управління безпечністю харчової продукції : навч. посіб. / за ред. О. В. Бочарової. Одеса: Атлант, 2019. 376 с.
43. Дунченко Н. И., Магомедов М. Д., Рыбин А. В. Управление качеством в отраслях пищевой промышленности: навч. посіб. Москва: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К^о», 2008. 212 с.
44. Сурак Джон Г. Рецепт безопасной пищевой продукции: ИСО 22000 и HACCP. *Стандарты и качество*. 2008 . №2. С. 96-99.
45. Курцева В. Г. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: науч. пособ. / под ред.: В. Г. Курцева, З. Э.Гарш. Барнаул: АлтГТУ, 2007. 97 с.
46. Никифорова Т.Е. Биологическая безопасность продуктов питания: науч. пособ. / под ред.Т. Е. Никифорова. Иваново, 2009. 179 с.
47. Нечаев А.П. Безопасность продуктов питания: науч. пособ. / под ред.: А. П.Нечаева, И. С. Витола. Москва: МГУПП, 1999. 87 с.
48. Кантере В. М., Матисон В.А., Хангажеева М.А., Сазонов Ю.С. Качество и безопасность продуктов питания: монографія. Москва: МГУПП, 2003. 398 с.
49. Майстренко В. Н., Хамитов Р. З., Будников Г. К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. Москва: Химия, 1996. 319 с.
50. Позняковский В. М. Гигиенические основы питания, качество и безопасность пищевых продуктов. / под ред. В. М. Позняковского. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 2005. 521 с.

51. Гофман В.Р. Экологические и социальные аспекты безопасности продовольственного сырья и продуктов питания: навч. посіб. Челябинск: ЮУрГУ, 2004. 551 с.
52. Технология пищевых производств / под ред. А. П. Нечаева. Москва: Колос, 2005. 767 с.
53. Гофман В. Р. Экологические основы безопасности продовольственного сырья и товаров. Челябинск: ЮУрГУ, 2002. 83 с.
54. Безопасность пищевой продукции / под ред.: Л. В. Донченко, В. Д. Надыкта. Москва: Пищепромиздат, 2001. 528 с.
55. Гофман В. Р. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: тест–контроль. Челябинск: ЮУрГУ, 2002. 47 с.
56. Wilmes, P., Bond, P.L. Microbial community proteomics: elucidating the catalysts and metabolic mechanisms that drive the Earth's biogeochemical cycles. *Current Opinion in Microbiology*. 2009. Vol.12. P. 310-317.
57. Salmonellosis. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases. DFBMD. 2009. URL: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html#8 (дата звернення:20.05.2019).
58. Позняковский В.М. Гигиенические основы питания, безопасность и экспертиза пищевых продуктов. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2002. 556 с.
59. Литвинов В. Ф., Шатуров А. А. Техногенные системы и экологический риск. Новгород: НГУ, 1999. 134 с.
60. Росивал Л. Посторонние вещества и пищевые добавки в продуктах. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 264 с.
61. Ефремов М. И. Осторожно! Вредные продукты: Не все вкусное полезно. СПб.: Невский проспект, 2003. 160 с.
62. Витол И. С. Экологические проблемы производства и потребления пищевых продуктов: навч. посіб. Москва: Издательский комплекс МГУПП, 2000. 93 с.

63. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / под ред.: И. М. Скурихина. Москва: Медицина, 2001. 340 с.
64. Закревский В. В. Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок в пище: практическое руководство по сан. эпид. надзору / под ред. В. В. Закревского. СПб.: ГИОРД, 2004. 280 с.
65. Рогов И. А. Химия пищи. Москва: Колос, 2007. 853 с.
66. Общая токсикология / под ред.: Б. А. Курляндского, В. А. Филова. Москва: Медицина, 2002. 608 с.
67. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / под ред. И. М. Скурихина. Москва: Брандес, Медицина, 2001. 340 с.
68. Темербаева М. В. Безопасность пищевых продуктов: Учеб. пособ. Павлодар : Инновац. Евраз. ун-т, 2012. 268 с.
69. Олейник К. Экологические риски хозяйственной деятельности: сущность. *Управление риском*. 2000. №3. С. 3–21.
70. Остаточное содержание пестицидов и радионуклидов. Безопасность мясных продуктов. *Новое мясное дело*. 2006. №3. С. 55-56.
71. А. П. Нечаев. Пищевая химия / под ред. А. П. Нечаева. СПб.: ГИОРД, 2004. 640 с.
72. D. M. Bianchi, A. Barbaro, S. Gallina, N. Vitale, L. Chiavacci, and M. Caramelli. Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont. *Food Control*. 2013. Vol.32. P. 435–439.
73. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series. № 14. Rome: FAO/WHO, 2008. 151 p.
74. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078.2001. Москва, 2001.
75. Микробиология и санитария: учеб. пособ / под ред. И. Ю. Ухарцева. Минск: ИВЦ Минфина, 2006. 332 с.

76. F. Berthiller, C. Brera, M.H. Iha, R. Krska, V.M.T. Lattanzio et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin Journal*. 2017. Vol. 10 (1). P. 5-29.
77. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series. № 13. Rome: FAO/WHO, 2008. 58 p.
78. Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 2002. Vol. 108. P. 597–609.
79. Bennett W., Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*. 2003. Vol. 16. № 3. P. 497–516.
80. Еремін Ю.Н. Чужеродні речовини в продуктах харчування (к проблеме продовольственої безпеки). *Ізвестия УрГЕУ*. 2008. № 22. С. 170-176.
81. Амелін В. Г., Лаврухіна О. І. Обеспечение безопасности пищевых продуктов средствами химического анализа. *Журнал аналитической химии*. 2017. Т. 72. № 1. С. 3–49.
82. Балджи Ю. А., Адильбеков Ж. Ш. Современные аспекты контроля качества и безопасности пищевых продуктов: Монография. СПб.: Лань, 2019. 216 с.
83. 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.
84. Т. М. Димань, М. В. Козловська, Р. В. Облап, О. В. Дубін, О. І. Кравченко. Генетично модифіковані сільськогосподарські культури: прогрес, проблеми, перспективи: монографія. Серія «Імплементація європейських норм і практик. Регулювання ринків та дослідництво в умовах СОТ». Спецвипуск від 03-04-2013. Київ: Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. 158 с.

85. Глазко В. И., Шульга Е. В., Дымань Т. Н., Глазко Г. В. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. Белая Церковь: БГАУ, 2001. 487 с.
86. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1054.
87. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. *Генетика*. 2002. Т. 38. С. 1173–1195.
88. Банникова А. А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих. *Журнал общей биологии*. 2004. Т. 65. С. 278–305.
89. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Успехи современной биологии*. 2004. Т. 124. С. 260–271.
90. Смарагдов М. Г. Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции. *Генетика*. 2009. Т. 45. С. 725–728.
91. Матвеева Т. В., Павлова О. А., Богомаз Д. И. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. *Экологическая генетика*. 2011. Т. 9. С. 32–43.
92. Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15. № 4. С. 757–768.
93. Тарасюк С. І. Актуальність молекулярно-генетичних досліджень в аквакультурі. *Проблеми екологічної біотехнології*. 2018. № 1. С. 12. URL: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/12877/17713> (дата звернення: 27.03.2020)
94. Глазко В. И. Агроэкологический аспект биосферы: проблема генетического разнообразия / под ред. В. И. Глазко Киев.: Нора-принт, 1998. 209 с.

95. Глазко В. И. Генетика изоферментов животных и растений / под ред. А.А. Созинова. Киев: Урожай, 1993. 528 с.
96. Хлесткина Е. К., Салина Е. А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы. *Генетика*. 2006. Т. 42. С. 725–736.
97. Landjeva S., Korzun V., Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica*. 2007. Vol. 156. P. 271–296.
98. Blencowe B.J., Ahmad S., Lee L. J. Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes. *Genes and Development*. 2009. Vol. 23. P. 1379–1386.
99. Айбазов М. М. Современные биотехнологические методы и приемы интесификации воспроизводства овец и коз. *Овцы, козы, шерстяное дело*. 2007. № 4. С. 54–56.
100. Зиновьева Н. Методы маркер-зависимой селекции. *Животноводство России*. 2006. № 3. С. 29–31.
101. Кузнецов В. М. Ассоциации групп крови с количественными признаками. *Мас и геномная селекция*. 2010. URL: http://www.vm-kuznetsov.ru/files/etude/13_blood_gs.pdf (дата звернения: 27.03.2020).
102. Завертяев Б. П. Маркерная селекция в животноводстве: современное состояние и перспективы. *Практик*. 2006. № 2. С. 32–37.
103. Димань Т.М. Поліморфна система капа-казеїну, її зв'язок із продуктивними якостями великої рогатої худоби // Вісник аграрної науки. – 1998. – №12. – С.33–35.
104. Кийко Е. И. Принципы маркерной селекции в молочном скотоводстве. *Вестник ТГУ*. 2010. Т.15. Вып.1. С. 134–136.
105. Botstein D., White R. L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage maping man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*. 1980. Vol. 32. P. 314–331.

106. Liu Y. G., Tsunewaki K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat. *The Japanese Journal of Genetics*. 1991. Vol. 66. P. 617–634.
107. Moore G., Devos K. M., Wang Z., Gale M. D. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology*. 1995. Vol. 5. P. 737–739.
108. Martin G. B., Brommonschenkel S. H., Chunwongse J.. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 1993. Vol. 262. P. 1432–1436.
109. Beckmann J. S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*. 1983. Vol. 67. P. 35–43.
110. Burr B., Evola S.V., Burr F.A., Beckmann J.S. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. “Genetic engineering” series. New York: Plenum Press, 1983. P. 45–59.
111. Tanksley S. D. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983. Vol. 1. P. 3–8.
112. Глазко, В. И. Введение в ДНК-технологии. Москва: Росинформагротех, 2001. 436 с.
113. Алтухов Ю. П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. *Генетика*. 2002. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
114. Багиров, В.А. Сохранение и рациональное использование генофонда животных. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2010. № 2. С. 37.
115. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 1989. Vol. 17. P. 6463–6471.
116. Charmet G., Storlie E. Implementation of genome-wide selection in wheat. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012. Т. 16. С. 61–68.
117. ДНК-маркирование продуктивности крупного рогатого скота по полиморфным генам соматотропинового каскада (bPit-1, bGH, bGHR, bIGF-

- 1): учеб.-метод. пособ. / под ред.: И. С. Бейшовой, Е. В. Белой, Т. В. Поддудинской. Костанай, 2016. 88 с.
118. Свиноводство. Технология производства свинины: учебник для студентов высших учебных заведений по специальности "Зоотехния" / под ред.: Н. В. Михайлова, А. И. Бараникова, И. Ю. Свинаярева. Ростов-на-Дону : Юг, 2009. 417 с.
119. Генетика : учебник для студентов высш. учеб. заведений / под ред.: В. Л. Петухова, О. С. Короткевича, С. Ж. Стамбекова. Новосибирск: СемГПИ, 2007. 628 с.
120. Н. П. Иванов, К. А. Тургенбаев, А. Н. Кожаев. Инфекционные болезни животных. 2012. Том 3. Алматы: Казахский национальный аграрный университет. 319 с.
121. Сидорчук В. А. Инфекционные болезни животных: учеб. пособ. / общая редакция В. С. Воронина. Москва: КолосС, 2009. 816 с.
122. Макаров В.В. Эпизоотологическая методология. Москва : РУДН, 2010. 254 с.
123. Эпизоотология и инфекционные болезни: Краткий курс лекций для студентов 4, 5 курсов. Специальность 36.05.01. «Ветеринария» / Сост. В.А. Агольцов. Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2017. 131 с.
124. Потоцкий М. К., Тютюн А. І., Колганов О. В. Інфекційні хвороби промислових диких тварин. *Ветеринарна медицина України*. 2014. Вип. 6(220). С. 11–18.
125. Галатюк О. Є., М. Л. Радзиховський. Організація профілактичних та оздоровчих заходів при інфекційних хворобах тварин: метод. посіб. Житомир, 2013. 456 с.
126. World Organisation for Animal Health and Food and Agriculture Organization of the United Nations (OIE and FAO) The Global Foot and Mouth Disease Control Strategy: Strengthening Animal Health Systems Through Improved Control of Major Diseases. 2016. URL: <http://www.oie.int/esp/>

[E_FMD2012/Docs/Altogether%20FMDcontrol_strategy27June.pdf](http://www.fao.org/docrep/018/i2592e/FMD2012/Docs/Altogether%20FMDcontrol_strategy27June.pdf) (дата звернення: 25.03.2020).

127. Клестова З. С. Ящур – як фактор ризику для сучасного тваринництва . *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. Вип. 32(1). С. 466–477.

128. О. А. Голубовська, М. А. Андрейчин, А. В. Шкурба. Інфекційні хвороби : підручник /за ред. О. А. Голубовської. Київ: ВСВ «Медицина», 2018. 688 с.

129. Ярчук Б. М., Довгаль О. В., Тирсін Р. В., Тирсіна Ю. М. Епізоотична ситуація та епізоотологічні особливості зі сказу тварин на території Білоцерківського району. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2015. № 1. С. 63–67.

130. Food and Agriculture Organization (FAO). Чума скота уничтожена – что дальше? URL: <http://www.fao.org/news/story/ru/item/80946/icode/> (дата звернення: 20.03.2020).

131. M. V. Borca, E. Ramirez-Medina, E. Silva, E. Vuono, A. Rai, S. Pruitt, L.G. Holinka, L. Velazquez-Salinas, J. Zhu, D.P. Gladue (2020). Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *Journal of Virology*. 2020. doi:10.1128/JVI.02017-19.

132. Африканська чума свиней. Державний НДІ з лабораторної діагностики та ветсанекспертизи URL: <https://www.asf.vet.ua> (дата звернення: 20.03.2020).

133. Акимова Т. П., Семакина В. П. Эпизоотическая ситуация по оспе овец и коз в мире. *Ветеринарный врач*. 2019. № 3. С. 3–8.

134. Чемич М. Д., Ільїна Н. І., Ільїна В. В. Бруцельоз у сучасних умовах. *Інфекційні хвороби*. 2017. № 4(90). С. 55–61.

135. Enzootic bovine leucosis. Disease timelines. Disease information. World Organisation for Animal Health (OIE) URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines (дата звернення: 20.03.2020).

136. Мандигра С. С. Закономірності поширення лейкозу великої рогатої худоби в Україні та фактори, що його обумовлюють. *Ветеринарна біотехнологія*. 2016. Вип. 28. С. 173–181.
137. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / общая редакция Дж. Пастернака. Москва: Мир, 2002. 589 с.
138. Госманов Р. Г. Ветеринарная вирусология. Учеб. и учеб. пособ. для студ. ВУЗов / под ред.: Р. Г. Госманова, Н.М. Колычева. Москва: КолосС, 2006. 279 с.
139. Dhama Kuldeep, Wani M. Yaqoob, Tiwari Ruchi, Kumar D. Molecular diagnosis of animal diseases: the current trends and perspectives. *Livestock Sphere*. 2012. Vol.1. P. 6–10.
140. Rosalyn S. Yalow, Solomon A. Berson. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Journal of Clinical Investigation*. 1960. Vol. 39 (7). P. 1157–1175.
141. A. H. Coons, M. H. Kaplan, Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine*. 1950. Vol. 91 (1): P. 1–13.
142. Галина Я. С., Николаева О.Н. ДНК-зонды и их использование в вирусологии. URL: <https://files.scienceforum.ru/pdf/2017/36059.pdf> (дата звернення: 15.03.2020).
143. Белоусова Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии : учеб. пособ. / под ред.: Р. В. Белоусовой, Н.И. Троценка, Э.А. Преображенской. Москва: КолосС, 2006. 150–153 с.
144. Пиневиц А. В. Вирусология: учеб. Москва : СПбГУ, 2014. 301с.
145. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. Москва: ООО «ДНК-Технология», 2019. 150 с.
146. О.М. Андрійчук, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна. Вірусні інфекції людини та тварин: епідеміологія, патогенез, особливості противірусного імунітету, терапія а профілактика: навч. посіб. / за ред. В. П. Поліщука. Київ, 2012. 484 с.

147. Власенко І., Власенко В., Лояніч Г.. Стан виробництва і споживання м'яса в Україні. *Товари і ринки*. 2016. №2. С. 21–31.
148. Мясной рынок Украины: цифры и факты. URL: <https://koloro.ua/blog/issledovaniya/analiz-mjasnogo-rynka.html> (дата звернення: 31.05.18).
149. Украинский рынок мяса и колбасы: анализ. URL : <https://koloro.ua/blog/issledovaniya/ukrainskiy-rynok-myasa-i-kolbasy-analiz.html> (дата звернення: 31.05.18).
150. Родіна О. В. Ринок м'яса птиці: світові тенденції та стан в Україні. *Інфраструктура ринку*. 2017. Вип. 7. С.218–223.
151. Виробництво промислової продукції за видами у 2017 році. Державна служба статистики України. URL: <http://www.ukrstat.gov.ua/> (дата звернення: 31.05.18).
152. Олійник Л.В. Ветеринарно-санітарний контроль харчових токсико-інфекцій. Київ: Аграрна наука, 2004. С. 24–37.
153. Pawsey Rosa K. Food and its safety. *Medicine, Conflict and Survival*. 2010. Vol. 10. № 2. P. 156–163.
154. Положення про державну лабораторію ветеринарно-санітарної експертизи на ринку: затв. наказом Державного департаменту ветеринарної медицини від 15.квіт.2002 р. № 16.
155. Про ветеринарну медицину: Закон України. Верховна Рада України. офіц. вид. Київ: Парламентське вид-во, 2002. 43 с.
156. Про безпечність та якість харчових продуктів: Закон України. Верховна Рада України. офіц. вид. Київ: Парламентське. вид-во, 2005. 28 с.
157. Правила передзабійного ветеринарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів: затв. наказом Голови Держдепартаменту ветеринарної медицини від 07.лип.2002 р. № 28. *Мінюст України*. 2002. № 524/6812. 77 с.
158. Регламент Європейського Парламенту і Ради ЄС що встановлює загальні принципи і вимоги законодавства щодо харчових продуктів, створює

Європейський Орган з безпеки харчових продуктів і що встановлює процедури у питаннях, пов'язаних із безпекою харчових продуктів від 28.січ.2002 р. № 178/2002.

159. І. Я. Коцюмбас, Г. І. Коцюмбас, О.М. Щебенцовська, М.І. Пелешак. Оцінка якості та методи виявлення фальсифікацій м'ясних виробів. *Наук.-техн. бюлетень інституту біології тварин та ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок*. 2011. Вип.12. № 1, 2. С. 282–287.

160. І.Я. Коцюмбас, Г.І. Коцюмбас, О. М. Щебенцовська. Якість, безпека і фальсифікація м'ясної продукції. Практичне застосування мікроструктурного методу контролю. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін.-ту ветпрепаратів та корм. добавок*. 2010. Вип. 11. № 1. С. 166–170.

161. Коцюмбас Г. І., Щебенцовська О.М Нормативно-правові підстави щодо контролю м'ясних напівфабрикатів. *Ветеринарна медицина України*. 2012. № 6 (196). С. 31–35.

162. О. С. Гайдей, В. О. Загребельний, Ю. М. Новожицька, Н. В. Усаченко Гайдей О. С. Визначення видової приналежності (фальсифікації) продуктів харчування та комбікормів для тварин за допомогою ПЛР-РЧ. *Ветеринарна біотехнологія*. 2014. Вип. 25. № 1. С. 18–20.

163. Berger, R; Mageau, K; Schwab, B.; Johnston, R. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays.: *Association Of Official Analytical Chemists Journal*. 1988.Vol. 71. P. 406–409.

164. King, N. L.; Kurth, L. Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. *Food Science journal*. 1982. Vol.47 (5). P. 1608–1612.

165. Ansfield M, Reaney SD, Jackamn R. Production of a sensible immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to >130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuff. *Food and Agriculture Immunology*. 2000. № 12. P. 273–84.

166. Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR assay for the identification of animal

- species in cooked sausages. *Meat Science*. 2007. Vol. 77(4). P. 649–53.
167. Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, Yetim H.. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*. 2009. № 82. P. 444–449.
168. Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M., and Sharma, B. Meat species identification by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. 2005. *Meat Science*. №70. P. 107-112.
169. Hird, H., Chisholm, J., Sanchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., Popping, B. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*. 2006. № 23. P. 645–650.
170. Farouk, A., Batcha, M.F., Greiner, R., Salleh, H.M., Salleh, M.R. and Sirajudin, AR.. The use of a molecular technique for the detection of porcine ingredients in the Malaysian food market. *Saudi Medical Journal*. 2006. № 27. P. 1397–1400.
171. Meyer R., Höfelein C., Lüthy J. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Association Of Official Analytical Chemists Journal*. 1995. № 78. P. 1542–1551.
172. Комаров А. А., Обухов И.Л., Сорокина М.Ю., Панин А.Н., Шипулин Г.А. Определение видовой принадлежности тканей жвачных животных. *Ветеринария*. 2000. № 3. С. 25–28.
173. Коновалова Е.Н., Гладырь Е.А., Зиновьева Н. А. Мультиплексная ДНК-идентификация видового происхождения животноводческой продукции. *Сельскохозяйственная биология*. 2011. № 6. С. 80–83.
174. Klaas Jonker, Jeroen Tilburg, Geke Hagele, Enne De Boer. Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminants*. 2008. Vol. 25 (05). P.527–533.

175. Iwobi A.N., Huber I., Hauner G., Miller A., Busch U. Biochip Technology for the Detection of Animal Species in Meat Products. *Food Analytical Methods*. 2011. №4. P. 389–398.
176. Расолько Л. А. Качество как фактор предпочтений потребителя. *Молочный продукт: специализированный информационно-аналитический журнал*. 2008. № 2. С. 26.
177. Шаулина Л. П., Корсун Л. Н. Контроль качества и безопасности пищевых продуктов и продовольственного сырья. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2011. 111 с.
178. Просеков А. Ю., Бабич О. О., Сухих С. А. Современные методы исследования сырья и биотехнологической продукции. Кемерово, 2013. 183 с.
179. Лукашов В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. Москва: Бином, 2009. 256 с.
180. Дышлюк Л. С., Голубцова Ю. В., Новоселова М. В., Шевякова К. А. Исследование методов экстракции ДНК из объектов растительного происхождения и продуктов питания на их основе. *Вестник ВГУИТ*. 2014. № 3. С. 142–145.
181. United Nations. Food URL: <http://www.un.org/ru/sections/issues-depth/food/index.html> (дата звернення: 15.03.2020).
182. Хорев Б.С. Прогнозные оценки роста мирового населения. *Общественные науки и современность*. 1999. №1. С. 115–124.
183. Global Report on Food Crises 2019. URL: <https://www.fsinplatform.org/report/global-report-food-crisis-2019/> (дата звернення: 15.03.2020)
184. Про Основні засади (стратегію) державної екологічної політики України на період до 2030 року: Закон України від 28.лют.2019 р. № 2697-VIII URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2697-19> (дата звернення: 18.03.2020).
185. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Сибирское университетское издание, 2004. 496 с.
186. Игнатъев И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение

биологической безопасности. Бендеры: Экоспектр, 2007. 60 с.

187. Ермишин А. П. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика. Минск: Тэхналогія, 2005. 430 с.

188. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. ISAAA. 2018. Brief № 54, 2018. URL: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/executivesummary/default.asp> (дата звернення: 17.03.2020).

189. М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. Біотехнологія рослин : підр. Київ: Вища освіта, 2003. 520 с.

190. Генетически модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / под ред. В.А. Тутельяна. Москва: РАМН, 2007. 444 с.

191. Дубініна А.А. Товарознавство. Харчові продукти з генетично модифікованої сировини: навч. посіб. Харків: ХДУХТ, 2015. 267 с.

192. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биология / под ред. В. С. Шевелухи. Москва: Высшая школа, 2008. 710 с.-вторая на с.53раздел 3.3.2

193. Баласинович Б. ГМО: виклики сьогодення та досвід правового регулювання. Інститут економічних досліджень та політичних консультацій. Київ : Видавничий дім “АДЕФ-Україна”, 2010. 256 с.

194. Cartagena Protocol on biosafety to the bonvention on biological diversity: text and annexes. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Montreal, 2000. 19 p.

195. Кузнецов В. В. Возможные биологические риски при использовании генетически модифицированных сельскохозяйственных культур. *Вестник ДВО РАН*. 2005. №3. С. 40–54.

196. Carpenter J. Impact of GM crops on biodiversity. *Nature Biotechnology*. 2010. Vol. 16(4). P. 46–51.

197. Regulation (EC) of 22 September 2003 N 1829/2003 of the European Parliament and of the Council on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union*. 2003. L. 268. P.1-23.

198. M. Qaim, S. Khouser. Genetically Modified Crops and Food Security. *PLoS ONE*. 2013. № 8(6). e64879.
199. A Decade of EU-Funded GMO Research 2001–2010. European Commission. 2010. Luxembourg : Publications Office of the European Union. 2010. 264 p.
200. Сорочинський Б. В. Генетично модифіковані рослини. Київ: Фітосоціоцентр, 2005. 204 с.
201. Сорочинський Б. В., Данильченко О. О., Кріпка Г. В.. Біотехнологічні (генетично модифіковані) рослини. Київ: КВІЦ, 2007. 220 с.
202. Закревский В. В. Генетически модифицированные источники пищи растительного происхождения: Руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору. Спб. : Диалект, 2006. 152 с.
203. Сільське господарство України: статистичний збірник 2015. Київ: Державна служба статистики України, 2016. 360 с.
204. Волков О. Державне регулювання обігу ГМО в Україні: поточний стан та концепція реформування. Київ : USAID Агроінвест. 2014. 37 с.
205. Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів: Закон України від 31 трав. 2007 № 1103-V. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/1103-16>. (дата звернення: 17.03.2020).
206. Про охорону навколишнього природного середовища: Закон України від 25 черв.1991 № 1264-XII. URL: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/1264-12>. (дата звернення: 17.03.2020).
207. Про захист прав споживачів: Закон України від 12 трав. 1991 № 1023-XII. URL: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/1023-12> (дата звернення: 17.03.2020).
208. Про дитяче харчування: Закон України від 14 вер.2006 № 142-V. URL: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/142-16> (дата звернення: 17.03.2020).
209. Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини: Закон України від 06 вер. 2005 № 2809-IV. URL: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/2809-15> (дата звернення: 17.03.2020).

210. Про затвердження тимчасових критеріїв безпеки поводження з генетично модифікованими організмами та провадження генетично-інженерної діяльності у замкненій системі: Постанова Кабінету Міністрів України від 16 жовт. 2008 № 922-2008-п. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/922-2008-%D0%BF> (дата звернення: 17.03.2020).

211. Про затвердження порядку видачі дозволу на ввезення на митну територію України незареєстрованих генетично модифікованих організмів для науково-дослідних цілей або державних апробацій (випробувань): Постанова Кабінету Міністрів України від 20 серп. 2008 № 734-2008-п. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/734-2008-%D0%BF> (дата звернення: 17.03.2020).

212. Про затвердження Порядку видачі дозволу на транзитне переміщення незареєстрованих в Україні генетично модифікованих організмів: Постанова Кабінету Міністрів України від 21 жовт. 2011 № 423-2009-п. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/423-2009-%D0%BF> (дата звернення: 17.03.2020).

213. Про затвердження Порядку видачі дозволу на проведення державної апробації (випробування) генетично модифікованих організмів у відкритій системі, із змінами, внесеними згідно з Постановами КМ № 1048 (1048-2011-п): Постанова Кабінету Міністрів України від 02 квіт. 2009 № 308-2009-п URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/308-2009-%D0%BF> (дата звернення: 18.03.2020).

214. Про затвердження Порядку державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням: Постанова Кабінету Міністрів України від 18 лют. 2009 № 114-2009-п. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/114-2009-%D0%BF> (дата звернення: 18.03.2020).

215. Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням

та вводяться в обіг», із змінами, внесеними згідно з Постановами КМ № 661 (661-2009-п) від 01.07.2009 і № 1408 (1408-2011-п) від 26.12.2011: Постанова Кабінету Міністрів України від 13 трав.2009 № 468-2009-п. URL: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/468-2009-%D0%BF> (дата звернення: 18.03.2020).

216. Гайдей О.С., Загребельний В.О., Новожицька Ю.М., Усаченко Н.В., Данильченко Н.Л. Нормативно-технічні вимоги до проведення досліджень на наявність ГМО методом полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу. *Ветеринарна біотехнологія*. 2015. № 26. С. 27–32.

217. Commission Regulation (EC) of the European Parliament and Council of 22 September 2003 № 1829/2003 on genetically modified food and feed.

218. Про внесення змін до Закону України «Про безпечність та якість харчових продуктів. Щодо інформування громадян про наявність у харчових продуктах генетично модифікованих організмів (ГМО) : Закон України від 17 груд.2009 № 1778-VI. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1778-17> (дата звернення: 19.03.2020).

219. Про затвердження Переліку харчових продуктів, щодо яких здійснюється контроль вмісту генетично модифікованих організмів: нааз Міністерства охорони здоров'я України від 09 лист. 2010 № 971 URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1248-10> (дата звернення: 19.03.2020).

220. ДСТУ ISO/IES 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій. Київ : Держспоживстандарт України, 2007. 26 с.

221. ДСТУ ISO 24276:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Основні вимоги, терміни та визначення понять. Київ : Держспоживстандарт України, 2009. 17 с.

222. ДСТУ-П CEN/TS 15568:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Відбирання проб. Київ : Держспоживстандарт України, 2009. 10 с.

223. ДСТУ ISO 13690:2003. Зернові, бобові та продукти їхнього помелу. Відбирання проб. Київ : Держспоживстандарт України, 2005. 9 с.
224. ДСТУ 5021.1:2008. Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Частина 1. Методи відбирання та правила готування проб. Київ : Держспоживстандарт України, 2010. 10 с.
225. ДСТУ 5021.1:2008. Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Частина 2. Метод визначення генетично модифікованих організмів. Київ : Держспоживстандарт України, 2010. 18 с.
226. ДСТУ ISO 21572:2006. Продукти харчові. Методи аналізу для визначення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів. Методи, які ґрунтуються на аналізі білків. Київ : Держспоживстандарт України, 2007. 20 с.
227. ДСТУ ISO/TS 21098:2009. Продукти харчові. Методи виявлення ГМО і продуктів з їхнім вмістом. Додаткові процедури та інформація щодо методів аналізування на основі нуклеїнової кислоти, описаних в ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571. Київ : Держспоживстандарт України, 2010. 16 с.
228. ДСТУ ISO 21571:2008. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти. Київ : Держспоживстандарт України, 2009. 31 с.
229. ДСТУ ISO 21569:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти. Київ: Держспоживстандарт України, 2009. 48 с.
230. ДСТУ ISO 21570:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти. Київ: Держспоживстандарт України, 2009. 82 с.
231. 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.

232. Trapmann S. The certification of reference materials of dry-mixed soya powder with different mass fractions of Roundup Ready™ soya. Certified reference materials IRMM-410S. 2002. URL: <http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-410S.pdf> (дата звернення: 14.01.2015).
233. Trapmann S. The certification of reference materials of dry mixed maize powder with different mass fractions of MON810 maize. Certified reference materials IRMM-413. 2001. URL: <http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-413.pdf> (дата звернення: 14.01.2015).
234. Lipp M. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*. 1999. Vol. 82. P. 923–928.
235. Lipp M. Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*. 2000. Vol. 83. P. 919–927.
236. Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology*. 2001. Vol. 212. P. 497-504.
237. Marmiroli N. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008. Vol. 392. P. 369–384.
238. Stave J.W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs. *Food Control*. 1999. Vol.10. P. 367–374.
239. МР 02.028-08. Качественное и количественное определение генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем и оборудования производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»: Методические рекомендации. Москва: ЗАО «НПФ ДНК-Технология», 2008. 22 с.
240. Егоров А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. Москва: Высш. шк., 1991. 288 с.

241. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с.
242. Malik K., Sadia H., Hamza Basit M. Protein-Based Detection Methods for Genetically Modified Crops. URL: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75520> (дата звернення: 20.03.2019).
243. European union reference laboratory for GM food and feed (EURL-GMFF), European network of GMO laboratories (ENGL). Compendium of reference methods for GMO analysis: Luxembourg: Publications office of the European Union. 2010. 259 p.
244. Антонова О.С. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик. *Научное приборостроение*. 2011. Том 21. № 4. С. 5–21.
245. Sicherer S.H. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001. Vol. 108. № 6. P. 881–890.
246. Лусс Л.В. Пищевая аллергия и пищевая непереносимость: подходы к диагностике, терапии и профилактике. *Аллергология и иммунология*. 2012. №2. С. 48–56.
247. Cotran R. S. Robbins. Pathology basis of disease. Pennsylvania, Philadelphia : Saunders, 2000. 624 p.
248. Воробьева О. В., Гущин И. С. Молекулярно-биологические основы аллерген-специфической иммунотерапии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2011. Т. 7. № 3. С. 54–71.
249. Cooke R. A., Vander Veer A., Jr. Human sensitization. *Immunology Journal*. 1916. Vol.1. P. 201–205.
250. Gell P.G.H., Coombs R.R.A. The classification of allergic reactions underlying disease / In: P.G.H. Gell and R.R.A. Coombs (Eds.). *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1963. P 317–337.
251. Алергія: метод. вказ. з дисципліни "Патологічна фізіологія" для студентів-бакалаврів. Спеціальність "Сестринська справа". Харків : ХНМУ, 2016. 11 с.

252. Johansson SGO et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, 2004. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol.113 (5). P. 832–836.
253. Opinion of the Scientific Panel of Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *The EFSA Journal*. 2004. № 32. P.1–197 URL: http://www.efsa.eu.int/science/nda/nda_opinions/341_en.html (дата звернення: 22.03.2020).
254. Пищевые стандарты ФАО/ВОЗ. Кодекс алиментариус: Общий стандарт на маркировку расфасованных пищевых продуктов. Codex Stan 1–1985 (Rev.1-1991) URL: <http://www.codexalimentarius.net> (дата звернення: 22.03.2020).
255. U.S. Food and Drug Administration. Center for food safety and applied nutrition. Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food: Draft report of the threshold working group. 2005. URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/alrgn.html> (дата звернення: 22.03.2020).
256. Гайдей О.С., Гаркавенко Т.О., Піщанський О.В. Харчові алергени. Актуальність і проблеми в Україні. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. № 32 (1). С. 453–458.
257. Katz D.L., Friedman R.S.C. Food allergy and intolerance. In *Nutrition in Clinical Practice*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008. P. 275–280.
258. Groetch M.E., Nowak-Wegrzyn A.H., Quann E., Boccell J., Czerkies L., Nutten S. et al. Introduction of Allergen-Containing Foods: Feeding Infants and Toddlers Study (FITS). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016. Vol. 141 (2). P. 401.
259. Lundin K.E., Wijmenga C. Celiac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*. 2015. Vol. 12 (9). P. 507–515.
260. Fasano A. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the

- United States: a large multicenter study. *Archives of Internal Medicine*. 2003. Vol. 163(3). P. 286–92.
261. Горгун Ю.В. Диагностика и лечение целиакии. Минск, 2006. 35 с.
262. Julio C. Celiac disease: World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. World Gastroenterology Organisation, 2012. URL: <http://www.worldgastroenterology.org> (дата зверення: 22.03.2020).
263. Samsel A., Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdisciplinare toxicology*. 2013. Vol. 6(4). P. 159–184.
264. Greer F.R., Sicherer S.H., Burks A.W. The Effects of Early Nutritional Interventions on the Development of Atopic Disease in Infants and Children: The Role of Maternal Dietary Restriction, Breastfeeding, Hydrolyzed Formulas, and Timing of Introduction of Allergenic Complementary Foods. *Pediatrics*. 2019. Vol. 143(4). e20190281.
265. Боярская Л.Н. Решенные и нерешенные проблемы диагностики и лечения целиакии у детей. *Перинатология и педиатрия*. 2013. № 2 (54). С.113–119.
266. Fasano A., Catassi C. Clinical practice. Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*. 2012. Vol. 367(25). P. 2419–2426.
267. Analytical Methods for Detection of Gluten in Food-Method Developments in Support of Food Labeling Legislation. *Journal of AOAC International*. 2011. Vol. 94. № 4. P. 1006–1024.
268. Morón B., Bethune M.T., Comino I., Manyani H., Ferragud M., López, M.C., Cebolla A., Khosla C., Sousa C. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS ONE*. 2008. Vol. 3(5). e2294.
269. Morón B., Cebolla A., Manyani H., Alvarez-Maqueda M., Megías M., Del Carmen Thomas M., López M.C., Sousa C. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008.

Vol. 87(2). P.405–14.

270. Sapone A., C Bai J.C., Ciacci C. et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*. 2012. № 10. 13 p.

271. Shan L., Molbergv O., Parrot I., Hausch F. et al. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science*. 2002. Vol. 297(5590). P. 2275–2279.

272. Halbmayer-Jech E., Hammer E., Fielder R., Coutts J., Rogers A., Cornish M. Characterization of G12 Sandwich ELISA, a Next-Generation Immunoassay for Gluten Toxicity. *Journal of AOAC International*. 2012. Vol. 95 (2). P. 372–376.

273. Arentz-Hansen H., Fleckenstein B., Molberg O., Scott H. et al. The Molecular Basis for Oat Intolerance in Patients with Celiac Disease. *PLoS Medicine*. 2004. URL: <http://www.medicine.plosjournals.org> (дата звернення: 22.03.2020)

274. Romer Labs. URL: <http://www.romerlabs.com/ru/knowledge/gluten/> (дата звернення: 22.03.2020)

275. Методы определения глютена в продовольственном сырье и пищевых продуктах: Методические указания (МУК 4.1.2880–11). Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 32 с

276. Dahinden I, von Büren M, Lüthy J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for celiac patients. *European Food Research and Technology*. 2001. Vol. 212(2). P. 228–233.

277. Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., Malmheden Yman, I. Real-time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research and Technology*. 2003. Vol.217. P. 344–349.

278. Dahinden I., von Buren M., Luthy J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for celiac patients // *Eur Food Res Technol* (2001) 212 :228–233.

279. EN ISO 22174: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: General requirements and definitions. Geneva: ISO, 2005.

280. Hernandez M., Esteve T., Pla M. Real-Time Polymerase chain reaction

based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005. Vol.53. P. 7003–7009.

281. R-Biopharm AG. SureFood®/SureFast® набори для проведення ПЛР в реальному часі: Каталог продукції. URL: http://biolab.com/content/pages/files/2014-05_surefood_Продукти_2014.pdf (дата звернення: 27.03.2020).

282. Рейли А. Определение функций и задач различных субъектов деятельности в рамках национальной стратегии контроля качества пищевых продуктов. Второй глобальный форум ФАО/ВОЗ сотрудников органов по обеспечению продовольственной безопасности. Бангкок, Таиланд, 12-14 октября 2004 г. URL: <http://www.fao.org/3/j2825r/j2825r.htm> (дата звернення: 27.03.2020)

283. Guo, X., van Iersel, M. W., Chen, J., Brackett, R. E., & Beuchat, L. R. Evidence of association of *Salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol. 68(7). P. 3639–3643.

284. Hillborn, E. D. et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce: *Archives of Internal Medicine*. 1999. № 159. P. 1758–1764.

285. Solomon, E. B., Yaron, S. & Matthews, K. R.(2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol.68. P. 397–400.

286. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1 (дата звернення: 27.03.2020).

287. On official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules : EU Regulation (EC) of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. No 882/2004. URL:

http://europa.eu.int/eur-lex/en/archive/2004/1_16520040430en.html (дата звернення: 27.03.2020).

288. European Commission. URL: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/index_en.html (дата звернення: 27.03.2020).

289. World Health Organization. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000–2011. Global Health Estimates Technical Paper. 2013. URL: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalCOD_method_2000-2011.pdf?ua=1 (дата звернення: 27.03.2020).

290. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов: санитарно-эпидемиологические правила и нормативы от 01.сент. 2002 г. URL: https://mibio.ru/docs/110/sanpin_2.3.2.1078-01_gigienicheskie_trebovaniya_bezopasnosti.pdf (дата звернення: 28.03.2020).

291. Литвин В.Ю. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. Москва : Фармарус-принт, 1998. 246 с.

292. Pires, S.M. Assessing the applicability of currently available methods for attributing foodborne disease to sources, including food and food commodities. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2013. Vol.10(3). P. 206–213.

293. Ezzati, M., Lopez, A.D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S. & Murray, C.J.L. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002. Vol. 360(9343). P. 1347–1360.

294. Havelaar, A.H., Galindo, A.V., Kurowicka, D. & Cooke, R.M. Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2008. Vol. 5(5). P. 649–659.

295. Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. & Griffin, P.M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 2011. Vol.17(1). P. 7–15.

296. Havelaar, A.H., Braunig, J., Christiansen, K., Cornu, M., Hald, T., Manges, M.J.J., Molbak, K., Pielaat, A., Snary, E., Van Pelt, W., Velthuis, A. & Wahlstrom,

- H. Towards an integrated approach in supporting microbiological food safety decisions. *Zoonoses and Public Health*. 2007. Vol.54(3-4). P. 103–117.
297. Ao T.T., Feasey N.A., Gordon M.A., Keddy K.H., Angulo F.J. & Crump J.A. Global Burden of Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease, 2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2015. Vol. 21(6). P. 941–949.
298. Pires, S.M., Vieira, A.R., Hald, T. & Cole, D. Source attribution of human salmonellosis: An overview of methods and estimates. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2014. Vol.11(9). P. 667–676.
299. Малиш Н. Г. Сальмонельози в Україні: проблемні питання епідеміологічного нагляду. *Профілактична медицина*. 2016. №1-2. С. 33–40.
300. Maertens de Noordhout, C., Devleesschauwer, B., Angulo, F.J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., Havelaar, A. & Speybroeck, N. The global burden of listeriosis: a systematic review and metaanalysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2014. Vol. 14(11). P. 1073–1082.
301. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Москва: Медицина для всех, 2002. 200 с.
302. Дуда О.К. Лістеріоз – сучасний погляд на захворювання. *Здоров'я жінчини*. 2011. №2 (58). С. 79–82.
303. Андрейчин М.А., Козько В.М., Копча В.С. Шигельоз. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. 362 с.
304. Возіанова Ж. І. Інфекційні і паразитарні хвороби: в 3 т. Т. 1. Київ: Здоров'я, 2008. 884 с.
305. Ветеринарна санітарна мікробіологія : навч. посіб / за ред. А. М. Головка, І. О. Рубленка. Київ: Аграрна освіта, 2010. 284 с.
306. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): метод. пособ. Москва: ДНК-технология, 2012. 80 с.(вместо нее Чеснокова поставит)вторая Зорина-в разделе 3.2.2.с.50
307. Е.А. Бородин. ИФА и ПЦР - современные методы клинической лабораторной диагностики. Поликлиника №2. 2012. С.16–22.

308. Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией: Методические указания (МУК 4.2.2872-11). Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 47 с.
309. Кутлунина, Н. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие / под. ред. Н. А. Кутлуниной, А. А. Ермошина. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. 142 с.
310. Выделение и очистка продуктов биотехнологии: метод. пособ. / авт.-сост.: Д. А. Новиков. Минск.: БГУ, 2014. 70 с.
311. Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes. *Nucleic Acids Research*. 1976. Vol. 3. P. 2303–2308.
312. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J.A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley and Sons., 1987.
313. Kawasaki E. S. Sample preparation from blood, cells and other fluids: PCR protocols, a guide to methods and applications. N.-Y., San Diego: Academic Press, 1990. P.146–152.
314. Попов А. Н., Зиновьева Н. А., Брем Г. Экспресс-метод тестирования новорожденных поросят на интеграцию в геном чужеродных генов. *Сельскохозяйственная биология*. 1995. №6. С.136–138.
315. Васильев В. П., Алексеев В. В., Антонов В. А., Замараев В.С., Пивень Н.Н., Ткаченко Г.А., Алтухова В.В., Ломова Л.В., Зинченко О.В., Голосеев Ю.А. Сравнительная оценка способов выделения ДНК для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью ПЦР. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008. №1. С.55–60.
316. Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных: Школа-практикум. Москва: ВНИИ животноводства, 2002. 78 с.
317. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen

- P. M. E., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990. Vol.28. №3. P.495–503.
318. Murray M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980. Vol.8. P. 4321–4325.
319. Wagner D. B. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids . *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1987. Vol.84. P. 2097–2100.
320. Poms, R.E. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research and Technology*. 2001. Vol. 213. P. 361–365.
321. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. 1989. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 2230 p.
322. Metabion international AG URL: <http://www.metabion.com/> (дата звернення: 28.05.2019).
323. ЗАО "Синтол" URL: <https://www.syntol.ru/>(дата звернення: 28.05.2019).
324. National Center for Biotechnological Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дати звернення: 18.01.2017;01.06.2018; 28.05.2019).
325. Basic Local Alignment Search Tool. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дати звернення: 15.02.2016;04.06.2018; 28.05.2019).
326. Молоко, молочные продукты и консервы молочные: государственный стандарт Союза ССР. Москва : Издательство стандартов, 1989. 448 с.
327. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*. 1970. №53. P.159–162.
328. Weng-Tat Chan, Chandra S. Verma, David P. Lane, Samuel Ken-En Gan. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Bioscience Reports*. 2013. Vol. 33(6). e00086.
329. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. Москва: Мир, 1984. 479 с.

330. Wright S. Variability within and among natural populations. *The University Of Chicago Press*. 1978. Vol. 4. P. 77–82.
331. Guo S. W. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992. Vol.48(2). P.361–372
332. Животовский Л. А. Популяционная биометрия / под ред. Л. А. Животовского. Москва: Наука, 1991. С. 10–14.
333. Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів: Закон України від 22 лип. 2014 № 1602-VII. URL: <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1602-18> (дата звернення: 20.04.2020)
334. Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин: Закон України від 18 трав. 2017 № 2042-VIII URL: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/2042-19> (дата звернення: 20.04.2020)
335. Амелин В.Г., Лаврухина О.И. Обеспечение безопасности пищевых продуктов средствами химического анализа. *Журнал аналитической химии*. 2017. Том 72. № 1. С. 3–49.
336. Попова Н. В., Арсеньєва Л. Ю., Мисюра Т. Г. Контроль якості та безпечності продукції галузі: Курс лекцій для студ. напряму 6.051701 "Харчові технології та інженерія" ден. та заоч. форм навч. Київ: НУХТ, 2012. 175 с.
337. Глазко, В.И. Молекулярная биология для животноводства / В.И. Глазко. *Farm Animals*. 2012. №1(1). С. 24–29.
338. Глазко, В.И. Гены-кандидаты контроля характеристик молочной продуктивности крупного рогатого скота. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2016. № 5. С.45–50
339. Weller, J.I. Invited review: quantitative trait nucleotide determination in the era of genomic selection. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol.94. №3. P.1082–1090.
340. Parmentier, I. Candidate gene markers associated with somatotrophic axis and milk selection. *Domestic Animal Endocrinology*. 1999. Vol.17. P.139–148.
341. Зиновьева, Н. Методы маркер-зависимой селекции. *Животноводство*

России. 2006. №3. С. 29–31.

342. Смарагдов М.Г. Геномная селекция молочного скота в мире. Пять лет практического использования. *Генетика*. 2013. Т.49.

343. Смарагдов М.Г. Геномная селекция молочного скота в мире. Пять лет практического использования. *Генетика*. 2013. Т.11. С.1251–1260.

344. Haley, C.S. Strategies to utilize marker – quantitative trait loci associations. *Journal of Dairy Science*. 1998. Vol. 81. № 2. С. 85–97.

345. Hu, Z.L. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol.41. P.D871–879.

346. Bagnato A., F. Schiavini, A. Rossoni. Et al. Quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in a three-country brown swiss population. *Journal of Dairy Science*. 2008. Vol. 91. №2. P. 767–783.

347. Dybus A., W. Grzesiak, Kamieniecki H. et al. Assotiation of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle. *Archive fur Tierzucht*. 2005. Vol. 48 № 2. P 149–156.

348. Sirja Viitala., Joanna Szyda et al. The Role of the Bovine Growth Hormon Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics*. 2006. Vol. 173. P. 2151–2164.

349. Sitkowska, B. Effect of the polymorphic composite forms of beta-lactoglobulin on the milk yield and chemical composition in maximum lactation/ed.by W. Neja, E. Wiśniewska, S. Mroczkowski, et al. *Journal of Central European Agriculture*. 2009. Vol.10(3). P. 251–254.

350. Селионова, М.И. Геномные технологии в селекции сельскохозяйственных животных / под ред. М.И. Селионовой, А.-М.М. Айбазова. *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. 2014. №7(1). 6 с.

351. Плівачук О.П., Димань Т.М. Взаємозв'язок комплексних генотипів альфа-лактальбуміну та бета-лактоглобуліну зі складом та технологічними

- властивостями молока корів української чорно-рябої молочної породи. *Розведення і генетика тварин*. 2016. №51. С.124–131.
352. Елишко О.А., Танана Л.А., Пешко В.В., Трахимчик Р.В. Полиморфизм генов молочной продуктивности в популяции крупного рогатого скота Республики Беларусь. *Сборник научных трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства*. 2014. №1 (3). 41–46.
353. Ильясов, А. Влияние различных сочетаний полиморфных вариантов генов каппа – казенна, пролактина и соматотропина на молочную продуктивность крупного рогатого скота. Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии : сборник. Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. С. 148–155.
354. Ларкин Д.М. Генетика домашних и сельскохозяйственных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т.8. №1. С. 53–60.
355. Т.Н. Дымань, В.И. Глазко. Полиморфизм гена каппа-казеина, его связь с хозяйственно ценными признаками у крупного рогатого скота. *Цитология и генетика*. 1997. Т. 31. №4. С.114–119.
356. Калашникова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий. Московская обл., Лесные Поляны: ВНИИплем, 2000. 31 с.
357. Зиновьева Н.А., Кленовицкий П.М., Гладырь Е.А., Никишов А.А. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: учеб. пособ. Москва: РУДН, 2008. 329 с.
358. Лазебная И.В., Лазебный О.Е., Рузина М.Н., Бадин Г.А., Сулимова Г.Е. Полиморфизм генов гормона роста bGH и пролактина bPRL и изучение его связи с процентным содержанием жира в молоке у коров костромской породы. *Сельскохозяйственная биология*. 2011. №4. - С.46–51.
359. Michalova A., Krupova Z. Influence of composite k-casein and β -lactoglobulin genotypes on composition, rennetability and heat stability of milk of cows of Slovak Pied breed. *Czech Journal of Animal Science*. 2007. Vol. 52 (9). P. 292–298.

360. Ильясов, А. Влияние различных сочетаний полиморфных вариантов генов каппа-казеина, пролактина и соматотропина на молочную продуктивность крупного рогатого скота. Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии: сборник. Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. С. 148–155.
361. В.Л. Ялуга, В.П. Прожерин, Я.А. Хабибрахманова, Л.А. Калашникова, И.Е. Багаль. Полиморфизм генов CSN3, LGB, PRL, GH, LEP у холмогорских коров. *Молочное и мясное скотоводство*. 2018. № 4. С. 5–8.
362. Alexander L.J. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *European Journal of Biochemistry*. 1988. № 178. P. 395–401.
363. A. L. Van Eenennaam, J. F. Medrano. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous κ -casein cows. *Journal of Dairy Science*. 1991. № 74. P. 1491–1496.
364. Л.А. Калашникова, В.Г. Труфанов. Влияние генотипа каппа-казеина на молочную продуктивность и технологические свойства молока коров холмогорской породы. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2006. № 4. С. 43–44.
365. Djedović R. Relationship between genetic polymorphism of κ -casein and quantitative milk yield traits in cattle breeds and crossbreds in Serbia. *Genetika*. 2015. Vol 47. № 1. P. 23–32.
366. Тельнов Н. О. Влияние генотипа каппа-казеина на молочную продуктивность и технологические свойства молока коров красно-пестрой породы в республике Мордовия. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2016. Вып. № 2 (34). С. 160–163.
367. Kaminski S., Figiel L. Kappa-casein genotyping of Polish Black-and-White x Holstein-Friesian bulls by polymerase chain reaction. *Genetica Polonica*. 1993. Vol. 34. P. 65–72.
368. A. Eggen, R. Fries An integrated cytogenic and meiotic map of the bovine genome. *Animal Genetics*. 1995. №26. P. 216–236.
369. A. Matejicek, J. Matejickova, E. Nemcova, J. Frelich. Joint effect of CSN3 and LGB genotypes and their relation to breeding values of milk production

parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science*. 2007. Vol.52. P. 83–87.

370. Зиновьева Н.А. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: учеб.пособ. / под ред. Н.А. Зиновьевой, П.М. Кленовицкого, Е.А. Гладыря, А.А. Никишова. Москва: РУДН, 2008. 329 с.

371. S. Rachagani, I.D. Gupta, N. Gupta, S.C. Gupta. Genotyping of β -lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC Genetics*. 2006. Vol.7. P.31–34.

372. A. Wedholm, L.B. Larsen, H. Lindmark-Mansson, A.H. Karlsson, A. Andren. Effect of protein composition on the cheesemaking properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2006. Vol.89. P.3296–3305.

373. R.K. Patel, J.B. Chauhan, K.M. Singh, K.J. Soni. Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (*Bos taurus* $\times$ *Bos indicus*) Dairy Bulls. *Veterinary and Animal Sciences Journals*. 2007. Vol.31(6). P.399–402.

374. B. Sitkowska, W. Neja, E. Wisniewska, S. Mroczkowski, A. Sawa. Effect of the polymorphic composite forms of betalactoglobulin on the milk yield and chemical composition in maximum lactation. *Central European Agriculture Journal*. 2009. Vol.10(3). P.251–254.

375. Рачкова Е.Н. Наследуемость молочной продуктивности в зависимости от полиморфизма гена бета-лактоглобулина. Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2016. №226. С.209–213.

376. A.M. Tsiaras, G.G. Bargouli, G. Banos, C.M. Boscov. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 2005. Vol.88. P.327–334.

377. Medrano J. F., Aguilar-Cordova E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*. 1990. №1. P.73–77.

378. N.E. Cooke, D. Coit, J. Shine, J.D. Baxter, J.A. Martial. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *Journal of Biological Chemistry*. 1981. Vol.25. №256(8). P.4007– 4016.
379. Camper, S.A. Characterization of the bovine prolactin gene. *DNA*. 1984. Vol.3(3). P.237–249.
380. P. Brym, S. Kamiński, E. Wójcik. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. *Journal of Applied Genetics*. 2005. Vol.46(2). P.179–185.
381. P. Brym, S. Kamiński, A. Ruść. .New SSCP polymorphism within bovine STAT5A gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. *Journal of Applied Genetics*. 2004. Vol.45(4). P.445–452.
382. N.L Sasavage, J.H. Nilson, S. Horowitz, F.M. Rottman. Nucleotide sequence of bovine prolactin messenger RNA. Evidence for sequence polymorphism. *Journal of Biological Chemistry*. 1982. Vol.257. P.678–681.
383. Lewin, H.A. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics*. 1992. Vol.13. P.44–48.
384. Skinkyte, R. Distrubition of allele frequencies important to milk production traits in Lithuanian Black and White and Lithuanian Red cattle. *Veterinarija ir Zootechnika*. 2005. Vol.31. P.93–97.
385. Dybus, A., Grzesiak, W., Kamieniecki, H., Szatkowska, I., Sobek, Z., Błaszczyk, P., Czerniawska-Piątkowska, E., Zych, S., and Muszyńska, M. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle. *Archives Animal Breeding*. 2005. Vol.48, 149–156. URL: <https://doi.org/10.5194/aab-48-149-2005>.(дата звернення: 15.10.2018).
386. G.L. Hart, J. Bastiaansen, M.R. Dentine, B.W. Kirkpatrick. Detection of a four-allele single strand conformation polymorphism (SSCP) in the bovine prolactin gene 5' flank. *Animal Genetics*. 1993. Vol.24 P.149.
387. Dybus, A. Association of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes

- polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 2002. Vol.20. P.203–212.
388. Часовщикова, М.А. Генетические варианты пролактина в связи с продуктивностью коров черно-пестрой породы. *Вестник ИрГСХА*. 2012. №53(12). С.105–109.
389. Boleckova J. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle. *Czech Journal of Animal Science*. 2012. Vol. 57(2). P. 45–53.
390. Погорельский И.А. Полиморфизм генов бета-лактоглобулина, гормона роста и пролактина и влияние их генотипов на молочную продуктивность. *Молочное и мясное скотоводство*. 2014. №6. С. 9–13.
391. Р.В. Облап, Н.Б. Новак, М.Д. Мельничук, Т.М. Димань, О.В. Дубін. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві: метод. реком./ за ред. Т.М. Димань. Біла Церква: Видавництво БНАУ, 2010. 68 с.
392. K.G.M. Mahmoud, M.F. Nawito, A.M.H. Abdel. Sire selection for milk production traits with special emphasis on kappa casein (CSN3) gene. *Global journal of molecular sciences*. 2010. Vol. 5 (2). P. 68–73.
393. A.M. Caroli, S. Chessa, G.J. Erhardt. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 92 (11). P. 5335–5352.
394. A. Żukiewicz, W. Grzesiak, I. Szatkowska et al. Genetic factors of milk yield in dairy cattle – advances in the quest for universal markers. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 2012. Vol. 67 (2). P.82–91. URL: http://www.ijvm.org.il/sites/default/files/zukiewicz_2.pdf. (дата звернення: 20.10.2018)
395. A. Michalova, Z. Krupova. Influence of composite κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on composition, rennetability and heat stability of milk of cows of Slovak Pied breed. *Czech Journal of Animal Science*. 2007. Vol. 52 (9). P. 292–298.

396. Burny A. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leucosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1985. №52. P. 133–144.
397. Мальцева Н.А. Лейкоз крупного рогатого скота – пути решения проблемы. Электронный журнал «Исследовано в России». URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2000/102.pdf> (дата звернення: 15.10.2018)
398. Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота. СПб.: Петролазер, 2005. 105 с.
399. Верховский О.А., Алипер Т.И. Лейкоз крупного рогатого скота: Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / под ред. Д.К. Львова. Москва: Медицинское информационное агентство, 2013. С.869–873.
400. О безопасности пищевой и молочной продукции: технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 от 09.окт.2013г. №67.
401. Смирнов П.Н., Храмцов В.В., Смирнова В.В. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 1998. №8. С.6–8.
402. Смирнова В.Н. К вопросу о токсичности молока коров, больных лейкозом. Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц: сборник. Екатеринбург, 2000. С. 240 – 242.
403. Мадисон В., Мадисон Л. Лейкоз: пустые страшилки или общегосударственная проблема?. *Животноводство России*. 2006. №9. С. 2–8.
404. Gagnon C.A. Detection of bovine lymphotropic herpesvirus DNA in Tissues of bovine fetus. *Canadian Veterinary Journal*. 2010. Vol.51. P.1021–1022.
405. С.В. Аранчій, Д.О. Рудяшко. Епізоотологічний моніторинг лейкозу ВРХ в Україні, починаючи з 2000 року по осінь 2012 року. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2013. № 1. С.94–96.
406. А. В. Абрамов, Д. М. Король, С. Д. Мельничук. Порівняльна ефективність діагностики лейкозу ВРХ при використанні різних методів дослідження. *Ветеринарна медицина України*. 2007. № 2. – С. 33–34.
407. В.А. Мищенко, О.Н. Петрова, А.К. Караулов, А.В. Мищенко. Проблема

- лейкоза крупного рогатого скота. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2018. 38 с.
408. Стародуб М.Ф., Пирогова Л.В. Спосіб неінвазійної діагностики лейкозу великої рогатої худоби шляхом визначення антитіл до вірусу у молоці корів імуносенсором поверхневого плазмонного резонансу: пат. 12689 Україна. № 3730; опубл. 23.11.2007. №12689/3730.
409. Якупов Т. Р., Хазипов Н. З., Алимов А. М., Камалов Б. В. Возможности ИФА молока в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2010. №. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vozmozhnosti-ifa-moloka-v-diagnostike-leykoza-krupnogo-rogatogo-skota> (дата звернення: 02.12.2018).
410. Christopher J. Kuckleburg, Christopher C. Chase, Eric A. Nelson, Salvatore A. E. Marras, Matthew A. Dammen, Jane Christopher-Hennings. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2003. № 15. P. 72–76.
411. С.Н.Боровиков, В.С. Киян, А.О. Агмашев Использование моноклональных антител в ИФА для обнаружения специфических антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота в молоке. *Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина*. 2011. №2 (69). С. 45–49.
412. Tagrowski S.P. Role of immune factors in protection of mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 1983. Vol.66. P.1781–1787.
413. A.E. Lew, R.E. Bock, J.B. Molloy et. al. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *Journal of virological methods*. 2004. Vol. 115. № 2. P. 167–175.
414. Н.Б. Новак, Р.В. Облап, М.Д. Мельничук. Діагностика провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби. *Вісник аграрної науки*. 2008. №11. С.22–24.
415. Новак Н. Б. Біотехнологічні аспекти генетичного вдосконалення показників молочної продуктивності великої рогатої худоби : дис. ...канд. с.-г. наук: 03.00.20. Київ, 2010. 211 с.

416. Н.Ф. Стародуб, В.Н. Стародуб. Инфекционный лейкоз крупного рогатого скота и его диагностика. *Біополімери і клітина*. 2003. Т.19. № 11. С. 307–316.
417. Ковалюк Н.В., Якушева Л.И. Методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота: учеб. пособ. Краснодар: СКНИИЖ, 2012. 39 с.
418. Rola-Łuszczak M1, Finnegan C, Olech M, Choudhury B, Kuźmak J. Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *Journal of Virological Methods*. 2013. Vol.189(2). P. 258–264.
419. M.K. Nishiguchi, P. Doukakis, M. Egan et al. DNA Isolation Procedures. URL: <http://labs.medmicro.wisc.edu/mcfall-ngai/papers/2002nish3.pdf> (дата звернення: 04.06.2018).
420. Лысак В.В. Микробиология : учеб. пособ. / под ред. В.В. Лысака. Минск : БГУ, 2005. 261 с.
421. М.В, Штерншис, А.А. Беляев, В.П. Цветкова, Т.В. Шпатова и др. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений : учеб. пособ. Новосибирск : гос. аграрный ун-т, 2016. 337 с.
422. С.Г. Ботина, Ю.Д. Цыганков, В.В. Суходолец. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования. *Генетика*. 2006. Т. 42. № 12. С. 1621–1635.
423. Ботина С.Г. Видовая идентификация и генетическая паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования. *Молочная промышленность*. 2008. №3. С.50–52.
424. Т. М. Лясковський. Ідентифікація пробіотичних штамів молочнокислих бактерій. *Мікробіологічний журнал*. 2008. Т.70. № 6. С. 3–9.
425. ГОСТ 10444.11-89 Продукты харчові. Методи визначення молочнокислих мікроорганізмів.
426. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб. Сергиев Посад: ООО "Все для Вас -Подмосковье", 1999. 415 с.
427. Aswathy R.G., Ismail B., John R.P., Nampoothiri K.M. Evaluation of the

- probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008. Vol.151. №2. P.244–255.
428. Holton J. B. Galactose disorder: an overview. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1990. Vol.13. №3. P.476–486.
429. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002. Vol.26. №2. P.163–171.
430. Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешин. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики: научное издание. Ульяновск : НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. 98 с.
431. А. Г. Точилина и др. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2008. № 3 С. 69–73.
432. І. М. Сливка, О. Й. Цісарик, Т. Боцер. Виділення та ідентифікація молочнокислих бактерій за допомогою методу RFLP-PCR гену 16S рРНК. *Біологія тварин*. 2015. Т. 17 (1). С. 109–117.
433. Джобулаева А.К. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014. № 8. – С. 63–67.
434. T. Aymerich, B. Martin, M. Garriga, M. Hugas. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 69. № 8. P. 4583–4594.
435. F. Berthier, S.D. Ehrlich. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999. Vol. 49. P. 997–1007.
436. G. Blaiotta, A. Casaburi, F. Villani. Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR

- assays of *sodA* genes. *Systematic and Applied Microbiology*. 2005. Vol. 28 (6). P. 519–526.
437. Т. М. Лясковский, В. С. Подгорский. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO). *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т.67. № 6. С. 104–112.
438. Terzik-Vidojevic A., Mihailovic S., Uzelac G. and Topisirovic L. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golia cow's milk cheeses. *Archives of Biological Science Belgrade*. 2014. Vol. 66 (1). P. 179–192.
439. Kovalenko N. K., Lashevskyy V. V. Application of the polymerase chain reaction (PCR) for identification of lactic acid bacteria. *Dairy Industry*. 2003. Vol.1. № 4. P. 24–25.
440. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): метод. пособ. Москва: ООО «ДНК-Технология», 2019. С. 150.
441. Skeidsvoll J, Ueland PM. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR-Green I. *Analytical Biochemistry Journal*. № 231. P. 359–365.
442. Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Analytical Biochemistry*. 1999. Vol.276. P.59–64.
443. Konnai S., Usui T., Ohashi K., Onuma M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Veterinary Microbiology*. 2003. Vol.94. P. 283–294.
444. Rinta-Kanto J.M., Lehtola M.J., Vartiainen T., Martikainen P.J. Rapid enumeration of virus-like particles in drinking water samples using SYBR green I-staining. *Water Research Journal*. 2004. Vol.38. P. 2614–2618.
445. Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии /под ред. Д.Э. Коржевского. Litres, 2014. 194 с.
446. Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H.. Detection of

specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991. Vol. 88 (16). P. 7276–7280.

447. Zipper H; Brunner H; Bernhagen J; Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol.32 (12). e103.

448. Theron J, Cloete TE. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*. 2000. Vol. 26. P. 37–57

449. Rudi K, Nørgaard HK, Moen B, Nissen H, Bredholt S, Moretro T, Naterstad K, Holck A . Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2002. Vol.78. P.171–180.

450. Hein I, Lehner A, Rieck P, Klein K, Brandl E, Wagner M. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001.Vol. 67. P.3122–3126.

451. Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection. *Journal of Microbiological Methods*. 2002. Vol.50. P. 155–164.

452. Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5' exonuclease, and hybridization probe assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol.69. P.4753–4759.

453. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetem comitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*.2003. Vol.38. P.518–524.

454. De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L.

- Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol.69. P. 3456–3461.
455. Kok R.G., De Wall A., Schut F. et al. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. Vol.62. P. 3668–3672.
456. Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002. №214. P. 271–275.
457. Ke D., Picard F.J., Martineau F. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. Vol.37. P. 3497–3503.
458. De Preter K., Speleman F., Combaret V. et al. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Modern Pathology*. 2002. №15. – P. 159–166.
459. Pietila J., He Q., Oksi J., Viljanen M.K. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by Lightcycler fluorescence melting curve analysis of PCR product of the *recA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. № 38. P. 2756–2759.
460. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product differentiation by analysis of DNA melt curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997. №245. P. 154–160.
461. Schutten M., Niesters H.G.M. Clinical utility of viral quantification as a tool for disease monitoring. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2001. Vol.1. P.153–162.
462. Schutten M., van den Hoogen B., van der Ende M.E., Gruters R.A., Osterhaus A.D., Niesters H.G. Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *Journal of Virological Methods*. 2000. Vol.88. P. 81–87.
463. Peirson S.N., Butler J.N., Foster R.G. Experimental validation of novel and

conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol.31. e73.

464. Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H., Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*. 2003. Vol. 51. №2. P. 127–128.

465. Ercolini D., Frisso G., Mauriello G. et al. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2008. Vol.124. № 2. P. 164–170.

466. Ladero V., Fernández M., Cuesta I., Alvarez M.A. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*. 2010. Vol.27. №7. P. 933 – 939.

467. Oudghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P. et al. Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk “Iben”. *Journal of Applied Microbiology*. 2009. № 106. P. 486–495.

468. Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L. et al. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*. 2006. Vol.29. № 6. P. 487–495.

469. Casalta E., Sorba J.-M., Aigle M., Ogier J.-C. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2009. Vol.133. P. 243–251.

470. Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Stiles M.E. Enterococci at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 1999. Vol.47. P. 1–24.

471. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 2003. Vol. 88. P. 215–222.

472. Назаренко Л.О. Ідентифікація та фальсифікація продовольчих товарів: навч. посіб. / за ред. Л.О. Назаренка. Київ: Центр учбової літератури, 2014. 248 с.

473. Любчик О.С., Микийчук М.М., Гонсьор О.В. Аналіз шляхів удосконалення методів ідентифікації видів м'яса.. *Вісник НУ «Львівська політехніка»*. Серія «Вимірювальна техніка та метрологія». 2014. №75. С.

63.

474. M. Lo'pez-Andreo, L. Lugo, A. Garrido-Pertierra, M.I. Prieto, A. Puyeta. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 2005. № 339. P.73–82.

475. Z.A. Spiegelberg, A. Butschke, L.W. Kroh, H. Broll. Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods. *International Journal of Food Science and Technology*. 2007. № 42. P. 9–17.

476. J. F. Montiel-Sosa, E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, P. Roncale's, M. J. Lo'pez-Pe'rez, A. Pe'rez-Martos. Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. № 48. P. 2829–2832

477. Коновалова Е.Н., Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А. Мультиплексная ДНК-идентификация видового происхождения животноводческой продукции. *Сельскохозяйственная биология*. 2011. № 6. С. 83–88.

478. Quintero, J.; Sotelo, C. G.; Rehbein, H.; Pryde, S. E.; Medina, I.; Pe'rez-Martin, R. I.; Rey-Me'ndez, M.; Mackie, I. M. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998. № 46. P. 1662–1669.

479. Ram, J. L.; Ram, M. L.; Baidoun, F. F. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996. № 44. P. 2460–2467.

480. Borgo, R.; Souty-Grosset, C.; Boucho, D.; Gomot, L. PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal of Food Science*. 1996. № 61. P. 1–4.

481. Matsunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R; Muroya, S.; Shibata, K.; Yamada, J.; Shinmura, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*. 1999. № 51. P. 143–148.

482. F. Adeg, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, J.S. Heslop-Harrison. Physical organization of the 1.709 satellite IV DNA family in Bovini and Tragelaphini tribes of the Bovidae: sequence and chromosomal evolution. *Cytogenetic and Genome Research*. 2006. № 114. P. 140–146.
483. Klaas Jonker, Jeroen Tilburg, Geke Hagele, Enne De Boer. Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminants*. 2008. Vol.25 (05). P.527–533.
484. Хмельков И. Обзор программы Vector NTI Suite. URL: <http://molbiol.edu.ru/review/index.html> (дата звернення: 04.06.2018.)
485. Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ. / под. ред. О.Ш. Карапетяна, Е.М. Вечканова, И.А. Сорокиной. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2015.100с.
486. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. Москва: ДНК-технология, 2012. 80 с.
487. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 800 с.
488. Костюк С.А. Валидация молекулярно-биологических методов лабораторной диагностики. *Медицинские Новости*. 2012. №4. С. 16–19.
489. Basics of real-time PCR. Real-time PCR handbook. Life Technologies Corporation. 2012 URL: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> (дата звернення: 11.06.2018.).
490. J. Vovelgesang, J. Hadrich. Limit of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accreditation and Quality Assurance*. 1998. Vol. 3. P. 242–255.
491. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория и практика. Часть 1. №10. / под. ред. П. Носырева, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. Ремедиум, 2003. С. 69–71.
492. Облап Р. В. Моніторинг продуктів харчування та сільськогосподарської сировини в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів. *Вісник*

аграрної науки. 2014. № 1. С. 59 – 63.

493. Офіційний сайт державної санітарно-епідеміологічної служби України. URL: <http://dsesu.gov.ua> (дата звернення: 12.01.2021).

494. С. О. Семенов та ін. Моніторинг наявності генетичних модифікацій та зоотехнічний склад зернової сировини Полтавського регіону. *Свинарство*. 2014. Вип. 65. С. 216–224.

495. Bruderer S. Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details. BATS GM-crops database. 2003. URL: <http://www.bats.ch/gmo-watch/GVO-report140703.pdf> (дата звернення: 24.12.2016.).

496. GMO Detection method Database. URL: <http://gmdd.shgmo.org> (дата звернення: 18.01.2017).

497. М.В. Патрушев, М.В. Возняк. Генетически модифицированные источники: характеристика некоторых ГМ-линий, их детекция. *Партнеры и конкуренты*. 2004. № 10. С. 19–26.

498. European union reference laboratory for GM food and feed. *Joint research centre* : веб-сайт. URL: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/> (дата звернення: 12.01.2021).

499. Querci M. Manual presentation, working methods and course introduction. Session 2. Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. 2006. URL: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/documentation.htm> (дата звернення: 19.01.2017).

500. S. Trapmann et al. The certification of reference materials of dry-mixed soya powder with different mass fractions of Roundup Ready™ soya: certified reference materials IRMM-410S .2002. URL: <http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-410S.pdf> (дата звернення: 14.01.2015).

501. S. Trapmann et al. The certification of reference materials of dry mixed maize powder with different mass fractions of MON810 maize: certified reference materials IRMM-413.2001. URL: <http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-413.pdf> (дата звернення: 14.01.2015).

502. Харчова продукція та продовольча сировина. Генетично модифіковані організми: звіт про проведення міжлабораторних порівнянь результатів вимірювань. Раунд № 02/13-ГМО. Київ: ДП Укрметртестстандарт, 2013. 20 с.
503. Харчова продукція та продовольча сировина. Генетично модифіковані організми: звіт про проведення міжлабораторних порівнянь результатів вимірювань. Раунд № 04/15-ГМО. Київ: ДП Укрметртестстандарт, 2015. 20 с.
504. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) URL: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp> (дата звернення: 19.01.2017).
505. Т.М. Димань, М.В. Козловська, Р.В. Облап, О.В. Дубін, О.І. Кравченко 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». Спецвипуск від 03 квіт.2013. Київ: Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. 158 с.
506. J.T. Odell, S. Knowlton, W. Lin, C.J. Mauvais. Properties of an isolated transcription stimulating sequence derived from the Cauliflower mosaic-virus 3ks promoter. *Plant Molecular Biology*. 1988. Vol.10. P. 263–272.
507. P.R. Sanders, J.A. Winter, AR. Barnason, S.G. Rogers, R.T. Fraley. Comparison of cauliflower mosaic virus 35s and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research*. 1987. Vol.15. P. 1543–1558.
508. D.A. Samac, M. Tesfaye, M. Dornbusch, P. Saruul, S.J. Temple. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*. 2004. Vol. 13. P. 349–361.
509. Алексеев Я.И. Хотяинцева Т.В., Боровская С.В., Колобова О.С., Варламов Д.А., Харченко П.Н. 35S промотор вируса мозаики наричника (Р-FMV) – новая мишень для анализа на содержание генетически модифицированных организмов. *Известия ТСХА*. 2011. Вып. 6. С. 156-159.
510. J. Zhang, T.L. Madden. Power BLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Research*.

1997. Vol.7. P.649–656.

511. Waiblinger H.-U., Ernst B., Anderson A., Pietsch K. Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. *European Food Research and Technology*. 2008. Vol.226. P.1221–1228.

512. S. Trapmann et al. The Certification of Reference Materials of Dry-Mixed Maize Powder with different Mass Fractions of Bt-176 Maize. Luxembourg: EUR 20988 Office for Official Publications of the European Communities, 2004 13 p.

513. Kuribara H. et al. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *Journal of AOAC International*. 2002. Vol.85. P. 1077–1089.

514. Katarina Cankar, Dejan Štebih, Tanja Dreo, Jana Žel1, Kristina Gruden. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*. 2006. Vol.6. P.37

515. The Center for Environmental Risk Assessment (CERA) URL: <http://www.cera-gmc.org/GMCropDatabase> (дата звернення: 16.05.2017).

516. Terry C.F. et al. Real-Time Detection of Genetically Modified Soya Using Lightcycler and ABI 7700 Platforms with TaqMan, Scorpion, and SYBR Green I Chemistry. *Journal of AOAC International*. 2002. Vol 85. № 4. P. 938–944.

517. L. Grohmann, C. Brunen-Nieweler, A. Nemeth, and H.-U. Waiblinger (2009) Collaborative Trial Validation Studies of Real-Time PCR-Based GMO Screening Methods for Detection of the bar Gene and the ctp2-cp4epsps Construc. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 57. P. 8913–8920.

518. Annette Block, Gerhard Schwarz. Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed by real-time PCR. *European Food Research and Technology*. 2003. Vol.216. P. 421–427.

519. Sequence Manipulation Suite (SMS). URL: <http://www.bioinformatics.org/sms2/> (дата звернення: 31.05.2017).

520. JRC GMO-Matrix URL: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full> (дата звернення: 07.06.2017).
521. Terry C Pauli U., Liniger M., Schrott M., Schouwey B., Huebner P., Brodmann P., Eugster A. Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: method evaluation in a swiss ring trial. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 2001. Vol.92. P. 145–158.
522. Paoletti C., Mazzara M., Puumalaainen J., Rasulo D., Van Den Eede G. Validation of an Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line GA21 Using Real-Time PCR Validation Report and Protocol. 2005. URL: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&nr=199> (дата звернення: 07.02.2017).
523. Mazzara M, Bogni A, Savini C, Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line Ms8 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol- Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape. EUR 22917 EN. Luxembourg: OPOCE, 2007. JRC37545 (ISBN 978-92-79-06934-5)
524. Mazzara M, Foti N, Savini C, Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Sugarbeet Line H7-1 Using Real-Time PCR: 5 Validation Report and Protocol. 2006. EUR 22134 EN. JRC32190 (ISBN 92-79-01536-2)
525. Mazzara M., Cordeil S., Van den Eede G. Report on the Verification of an Event-specific Detection Method for Identification of Rice GM-event LLRICE601 Using a Real-time PCR Assay. 2006. URL: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/LLRice601update.htm> (дата звернення: 07.06.2017).
526. Weller, S A; Elphinstone, J G; Smith, N C; Boonham, N; Stead, D E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol.66. P. 2853–2858.
527. Nosyrev, P., Nosyreva, M., Rasskazova, T. & Korneyeva, N. Validation of analytical methods: theory and practice: Workshop on GMP. Ремедиум, 2003. Vol.10. P. 69–71.
528. Certified reference materials 2015. Institute for Reference Materials and

- Measurements (IRMM). URL: https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/rm_catalogue_0.pdf (дата звернення: 06.02.2017).
529. Certified Reference Materials (CRMs). American Oil Chemists' Society (AOCS) URL: [https://www.aocs.org/attain-lab-services/certified-reference-materials-\(crms\)](https://www.aocs.org/attain-lab-services/certified-reference-materials-(crms)) (дата звернення: 06.02.2017).
530. GMO genomic DNA standard set for canola DNA LibertyLink® Falcon GS40/90, GT73 Roundup Ready™, MS8xRf3 and OXY235. Sigma-Aldrich GmbH. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/55231?lang=en&region=UA> (дата звернення: 07.02.2017).
531. Real-Time PCR: Understanding Ct. Thermo Fisher Scientific (US). URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf> (дата звернення: 14.03.2018).
532. Burmeister T., Marschalek R., Schneider B. et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia*. 2006. Vol.20. P.451–7.
533. Velden van der V., Cazzaniga G., Schrauder A. et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007. Vol.21. P.604–11.
534. МУК 4.2.2029-05. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-вирусологический контроль водных объектов: методические указания: утв. Роспотребнадзором от 18.ноября 2005). 24 с.
535. Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M.W. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer – linked amplification efficiency. *Biotechnology Letters*. 2002. Vol. 24. P. 2053–2056.
536. Аммур, Ю.И. Разработка методов количественного определения вакцинных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.02.02. Москва, 2012. 24 с.

537. A. Radonic, S. Thulke, H. Bae et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cameplox virus and Cytomegalovirus infections. *Virology Journal*. 2005. № 2. P. 2–7.
538. M. Schutten, B. van den Hoogen, M.E. van der Ende et al. Development of real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *Journal of Virological Methods*. 2000. Vol. 88. P. 81–87.
539. О.В. Морозова, А.Е. Гришечкин, В.Н. Бахвалова и др. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток. *Вопросы вирусологии*. 2012. № 2. С. 40–43.
540. N.D. Borson, M.A. Strausbauch, P.J. Wettstein et al. Direct quantitation of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis. *Biotechniques*. 1998. Vol. 25. P. 130–137.
541. Holst-Jensen A., Ronning S.B., Lovseth G., Berdal K.G. PCR technology for screening and Quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003. Vol. 375. № 8. P. 985–993.
542. ТУ У 24.6-02568182-001:2011.Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах: технічні умови. Київ: ДП Укрметртестстандарт, 2012. 52 с.
543. Державна служба України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. URL: <https://dpss.gov.ua/storage/app/sites/12/uploaded-files/reestruvidkrutidanni/genetichno-modifikovanikh-organizmiv-dzherel-kormiv2-1.pdf> (дата звернення: 15.03.2017).
544. ISO 21570:2005: Foodstuffs. Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products. Quantitative nucleic acid based methods.
545. Charles Delobel C., Bogni A., Pinski G., Mazzara M., Van Den Eede G.; Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON 89788 Using Real-time PCR v 1.01: validation report and validated method. 2013. Online

Publication. DOI 10.2788/20464

546. Mazzara M., Charles Delobel C., Grazioli E., Larcher S., Savini C., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantification of Soybean Line A2704-12 Using Real-Time PCR. Soybean Seeds Sampling and DNA Extraction: validation report and protocol. 2007. Online Publication. DOI 10.2788/28149
547. Charles Delobel C., Bogni A., Mazzara M., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line A5547-127 Using Real-time PCR: validation report and protocol. 2009. Online Publication. DOI 10.2788/60083
548. Mazzara M., Munaro B., Grazioli E., Savini C., Charles Delobel C., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-356043-5 Using Real-time PCR v.1.01 : validation report and validated method.2013. Online Publication. DOI 10.2788/16469
549. Shindo Y, Kuribara H, Matsuoka T, Futo S, Sawada C, Shono J, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. Journal of AOAC International. 2002. Vol.85. P.1119–1126.
550. Mazzara M., Foti N., Price S., Paoletti C., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line MON 863 Using Real-Time PCR: validation report and protocol. 2005. Online Publication.
551. Mazzara M., Puumalaainen J., Van Den Eede G. Validation of the GMO Specific Detection Method Developed by NVI/INRA for Bt11 in Sweet Corn Maize: validation report and protocol. 2005. Online Publication.
552. Mazzara M., Paoletti C., Puumalaainen J., Rasulo D., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line NK603 Using Real-Time PCR: validation report and protocol. 2005. Online Publication.
553. Mazzara M., Foti N., Price S., Paoletti C., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line TC1507 Using Real-Time PCR. Sampling and DNA Extraction of Maize TC1507: validation report and protocol. 2005. Online Publication.
554. Charles Delobel C., Mazzara M., Bevilacqua A., Van den Eede G. Event-

specific Method for the Quantification of Maize MIR162 by Real-time PCR: validation report and protocol. 2011. Online Publication.

555. Mazzara M., Munaro B., Foti N., Savini C., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MIR604 Using Real-time PCR. Maize Seeds Sampling and DNA Extraction: validation report and protocol. 2007. Online Publication.

556. Mazzara M., Grazioli E., Larcher S., Savini C., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line DAS-59122-7 Using Real-Time PCR: validation report and protocol. 2006. Online Publication.

557. Savini C., Mazzara M., Pinski G., Van den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Maize MON87460 Using Real-time PCR: validation report and validated method. 2012. Online Publication.

558. Charles Delobel C., Foti N., Grazioli E., Mazzara M., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON 88017 Using Real-time PCR: validation report and protocol. 2008. Online Publication.

559. Savini C., Bogni A., Grazioli E., Munaro B., Mazzara M., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON89034 Using Real-time PCR: validation report and protocol. 2008. Online Publication.

560. Mazzara M. In-house Validation of an Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape RF1 Using Real-time PCR: validation report and protocol. 2011. Online Publication.

561. Mazzara M. In-house Validation of an Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape RF2 Using Real-time PCR: validation report and protocol. 2011. Online Publication.

562. Savini C., Bogni A., Mazzara M., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line Rf3 Using Real-time PCR. Seeds Sampling and DNA Extraction: validation report and protocol. 2007. Online Publication.

563. Savini C. In-house Validation of an Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape MS1 Using Real-time PCR : validation report and

protocol. 2011. Online Publication.

564. Mazzara M., Bogni A., Savini C., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line Ms8 Using Real-time PCR. Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape: validation report and protocol. 2007. Online Publication.

565. Mazzara M., Grazioli E., Savini C., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RT73 Using Real-Time PCR. Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape: validation report and protocol. 2007. Online Publication.

566. Charles Delobel C., Bogni A., Mazzara M., Savini C., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line T45 Using Real-time PCR. Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape: validation report and protocol. 2006. Online Publication.

567. Mazzara M. In-house Validation of an Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Topas 19/2 Using Real-time PCR: validation report and protocol. 2011. Online Publication.

568. Mazzara M., Grazioli E., Savini C., Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantitation of Rice Line LLRICE62 Using Real-time PCR. Sampling and DNA Extraction of Rice: validation report and protocol. 2006. Online Publication.

569. Mazzara M., Foti N., Savini C., Van Den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Sugarbeet Line H7-1 Using Real-Time PCR: validation report and protocol. 2006. Online Publication.

570. Yang L., Zhang H., Guo J., Pan L., Zhang D. International Collaborative Study of the Endogenous Reference Gene LAT52 Used for Qualitative and Quantitative Analyses of Genetically Modified Tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008.Vol.56. P.3438–3443.

571. Björklund K. Evaluation and optimization of four real-time PCRs, using TaqMan-probes, for detection of and discrimination between barley, oat, rye and wheat. Independent thesis Basic level (degree of Bachelor). Uppsala: Universitetsbiblioteket , 2008. , p. 25.

572. Savini C., Foti N., Mazzara M., Charles Delobel C., Van Den Eede G.; Event-specific Method for the Quantification of Event EH92-527-1 Potato Using Real-time PCR. Sampling and DNA Extraction of Potato: validation report and protocol. 2006. Online Publication.
573. Кулуев Б.Р. Каулимовирусы и их полногеномные промоторы. *Биомика*. 2012. Том 4. №1. С. 1–19
574. K. Suzuki, K. Iwata, K. Yoshida. Genome Analysis of *Agrobacterium tumefaciens*: Construction of Physical Maps for Linear and Circular Chromosomal DNAs, Determination of Copy Number Ratio and Mapping of Chromosomal Virulence Genes. *DNA Research*. 2001. Vol. 8. P. 141–152.
575. Foti, N., Onori, R., Donnarumma, E., De Sanctis, B., and Miraglia, M. Real-Time PCR multiplex method for the quantification of Roundup Ready soybean in raw material and processed food. *European Food Research and Technology Journal*. 2006. Vol. 222. P. 209–216
576. N.B. Novak, R.V. Oblap. Studies of food production and raw materials' content relatively to genetically modified ingredients. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2014. Т. 12. № 1. С.52–57.
577. Ф.А. Чмиленко, Н.П. Минаева, Л.П. Сидорова. Определение ГМО в продуктах питания. Сравнение методик выделения ДНК. *Методы и объекты химического анализа*. 2011. Т. 6. №1. С. 28–37.
578. Про затвердження порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг: постанова Кабінету Міністрів України від 13 трав.2009 № 468 URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/468-2009-%D0%BF#Text>. (дата звернення: 16.03.2017).
579. Л.А. Козубаева, С.С. Кузьмина, Э.П. Могучева. Разработка рецептур безглютеновых кондитерских изделий. *Ползуновский вестник*. 2011. № 3/2. С.117–121.
580. И.Ю. Резниченко, Ю.А. Алешина. Современные требования к качеству и безопасности безглютеновой продукции в Великобритании,

- информационное обеспечение потребителей. *Ползуновский вестник*. 2011. № 3/2. С.219–222.
581. М.О. Ревна, И. Э. Романовская. Целиакия: болезнь или образ жизни. Санкт-Петербург. 2006. 144 с.
582. Codex Alimentarius: Revised Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. ALINORM 08/31/26. Appendix III. 2008 URL: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf (дата звернення:01.06.2018.)
583. Concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten: Commission Regulation (EC) No 41/2009. 16/09 21. *Official Journal EURO-Lex*. 2009.
584. Гайдей О.С., Гаркавенко Т.О., Піщанський О.В. Харчові алергени. Актуальність і проблеми в Україні. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. № 32 (1). С. 453–458.
585. Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів: Закон України від 06 груд. 2018 № 2639-VIII URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2639-19> (дата звернення: 01.06.2018).
586. Всероссийский консенсус по диагностике и лечению целиакии у детей и взрослых: принят на 42-й научной сессии ЦНИИГ (2–3марта 2016 г.). Consilium Medicum. *Педиатрия*: прил. 2016. № 01. С. 6–19.
587. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2007. Vol.35 (Database issue). D21–D25.
588. D. Zeltner, M.A. Glomb, D. Maede. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research and Technology*. 2009. Vol. 228. P. 321–330.
589. Calamelli E., Ricci G., Pession A. Evaluation of IgE sensitization profiles in a pediatric population with wheat allergy. *Austin Journal Of Allergy*. 2014. Vol.1 (2). P.4.
590. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. Москва: Наука, 1985. 272 с.

591. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Литвиненко М.А. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за алельним складом Gli/Glu-локусів. *Вісник аграрної науки*. 2008. № 2. С. 54–59.
592. Payne P.J., Jackson E.A., Holf C.M. Genetic linkage between endosperm storage proteins on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 1984. Vol.67. P. 235–243.
593. Соболев А.М. Запасание белка в семенах растений. Москва: Наука, 1985. 112 с.
594. Morton R. Intracellular components associated with protein synthesis in developing wheat endosperm. *Biochemical Journal*. 1964. Vol.91. P. 522–528.
595. В.М. Починок, О.М. Радченко. Сучасний стан досліджень запасних білків пшениці. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2011. № 3. Т. 43. С.255–266.
596. Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol.31(13). P. 3497–500.
597. Пищевая аллергия: клинические рекомендации. Союз педиатров России. Министерство здравоохранения РФ. 2016. 50 с.
598. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Ладогина М.П., Калабушкин Б.А. Полиморфизм гордеинов у сортов ярового ячменя. *Генетика*. 1994. Т. 31. С. 604–614.
599. Shewry P.R., Tatham A.S., Field J.M., Forde B.G., Clark J., Gallois P., Marris C., Halford N., Forde J., Kreis M. The structures of barley and wheat prolamins and their genes. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1988. Vol.183. P. 117–127.
600. Cameron-Mills V., Brandt A. A γ -hordein gene. *Plant molecular biology*. 1988. Vol.11. P. 449–461.
601. Williamson D., Marsh MN. Celiac disease. *Molecular Biotechnology*. 2002. Vol.22(3). P. 293–299.
602. Hernandez M, Esteve T, Pla M (2005) Real-time polymerase chain reaction

based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower and wheat. *J Agric Food Chem* 53:7003-7009.

603. И.Г.Лоскутов. Овес (*Avena L.*). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. СПб: ГНЦ РФ ВИР, 2007. 336 с.

604. Боярский Л.Н., Иванова Е.А. Решенные и нерешенные проблемы диагностики и лечения целиакии у детей. *Перинатология и педиатрия*. 2013. Вип.2 (54). С. 113–119.

605. Ярославцева Е. Непереносимість глютену. *Хлібопекарська і кондитерська промисловість України*. 2011. № 1. С. 36–37.

606. Бельмер С.В., Гасилина Т.В. Целиакия: от патогеназа к лечению. *Вопросы современной педиатрии*. 2013. №3. Т.12. С. 12–17.

607. Sandberg M., Lundberg L., Ferm M.. Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research and Technology*. 2003.Vol. 217. P. 344–349.

608. Методика выполнения измерений массовой доли глиадина и родственных проламинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом иммуноферментного анализа после предварительного скрининга методом ПЦР в реальном времени. Київ: ДП Укрметртестстандарт, 2012. 46 с.

609. Про затвердження Державних санітарних правил і норм ДСП 4.4.5.078-2001 «Мікробіологічні нормативи та методи контролю продукції громадського харчування»: постанова Головного Державного Санітарного Лікаря України від 07лист.2001 №139. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/view/moz11041?an=841> (дата звернення: 19.06.2018).

610. Про затвердження Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами»: наказ Міністерства охорони здоров'я України від 24 січ. 2008 №26. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0088-08#Text> (дата звернення: 19.06.2018).

611. Real-time PCR. Методы: веб-сайт. MolBiol.ru URL: http://molbiol.ru/protocol/12_07_01.html (дата звернення: 19.06.2018).
612. Бакулов И.А. Листерии и листериоз. / Под ред. И.А. Бакулова, Д.А. Васильева, Д.В. Колбасова и др. Ульяновск: УГСХА, 2008. 168 с.
613. Цаканян А.В. Листериоз. *Мед. наука Армении НАН РА*. 2009. № 2. С. 11–22.
614. L. M.Crawford, SachSharin. New approaches to control foodborne diasease. *Yearbook of Agriculture And Environment*. Washington, 1991. P. 246–254.
615. Листериоз, передаваемый через продукты питания. *Бюлетень ВОЗ*. 1988. № 4. Т. 66. С. 1–10.
616. Волянский Ю. Л. К проблеме листериоза в Украине. URL: <http://www.provisor.com.ua> (дата звернення: 10.01.2018).
617. Зайцева Е., Федянина Л. та ін. *Listeriamonocytogenes* – новий мікробіологічний показник безпеки харчових продуктів URL: <http://www.tharnica.ru/clients/clients/rticles.asp?idp=rus&idd=/clients/&id=2006-11-27> (дата звернення: 12.01.2018).
618. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000. №10. Т. 2. С. 11–15.
619. Corless, C. E., et al. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. Vol.39. P.1553–1558.
620. Espy, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. Vol.19. P.165–256.
621. Taha, M. K., and P. Olcen. Molecular genetic methods in diagnosis and direct characterization of acute bacterial central nervous system infections. *APMIS*. 2004. Vol.112. P. 753–770.
622. D'Agostino, M. et al. A validated PCR-based method to detect Listeria

- monocytogenes using raw milk as a food model—towards an international standard. *Journal of Food Protection*. 2004. Vol.67. P.1646–1655.
623. Gouws, P. A., and I. Lidedemann. Evalution of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technology and Biotechnology*.2005. Vol.43. P.201–205.
624. Guilbaud, M., et al. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol.71. P. 2190–2194.
625. Norton, D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *Journal of AOAC International*. 2002. Vol.85. P. 505–515.
626. Somer, L., and Y. Kashi. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. *Journal of Food Protection* 2003. Vol.66. P. 1658–1665.
627. Hein, I., et al. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Research in Microbiology*. 2001. Vol.152. P.37–46.
628. Longhi, C., et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology*. 2003. Vol.94. P.879–885.
629. Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, and D. Lillehaug. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66. P. 4266–4271.
630. Rossmanith, P., M. Krassnig, M. Wagner, and I. Hein. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment: real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology*. 2006. Vol.157. P.763–771.
631. A. LeMonnier, E. Abachin, J.L. Berettiet et al. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the *hly* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. Vol.49(11). P. 3917–23.

632. В.М. Подборнов, А.М. Подборнов. Бактерии сальмонеллы и сальмонеллезы. Москва: БИНОМ, 2010. 117 с.
633. C. F. Pui, W.C.Wong, L.C. Chai et al. Salmonella: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*. 2011. №18. P. 465–473.
634. Д.М. Соколов, М.С. Соколов. Ускоренные методы выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах и сырье. *Вопросы питания*. 2013. № 1. Т. 82. С. 33–40.
635. Д.Г. Ахметова, Ж.А. Бердыгулова, Е.Б. Евтыхова, А.В. Шустов. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности. *Биотехнология. Теория и практика*. 2012. №1. С. 3–24.
636. D.G. Newell, M.Koopmans, L. Verhoefetal. Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. 2010. Vol.139(1). P.3–15.
637. Якубчак О.М., Обштат С.В., Муковоз В.М., Карпуленко М.С. Підходи до оцінки ризиків виникнення токсикоінфекцій, спричинених сальмонелами в Україні. *Вісник ЖНАЕУ*. 2014. №2(42). Т. 1. Р.172–177.
638. А.М. Зарицький, Т.Г. Глушкевич, В.О. Бубало. Актуальність сальмонельозу в Україні і перспектива боротьби з ним. *Інфекційні хвороби*. 2016. Вип.3(85). С. 5–9.
639. Н.Г. Малиш, А.М. Зарицький, Т.Г. Глушкевич. Сальмонельози в Україні: проблемні питання епідеміологічного нагляду. *Профілактична медицина*. 2016. № 1-2. С. 33–40.
640. Postollec F., Falentin H., Pavanetal S. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*. 2011. Vol.28(5). P. 1–14.
641. Horizontal Method for the Detection of Salmonella (EN ISO 6579:2002). International Organization for Standardization. Switzerland: Geneva, 2002.
642. Moreira AN, Conceicao FR, Conceicao Rde C, Ramos RJ, Carvalhal JB, Dellagostin OA, Aleixo JA. Detection of Salmonella typhimurium in raw meats using in-house prepared monoclonal antibody coated magnetic beads and PCR

- assay of the *fimA* gene. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2008. Vol.29(1). P.58–69.
643. Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, Gormley. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Veterinary Microbiology*.2002. Vol. 89(1). P.53–60.
644. Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. The effect of preenrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*. 2006. Vol. 23(6). P.599–604.
645. Nam HM, Srinivasan V, Gillespie BE, Murinda SE, Oliver SP. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*.2005. Vol.102(2). P.161–171
646. Josefsen MH, Krause M, Hansen F, Hoorfar J. Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol.73(9). P.3040–3048.
647. Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol.70(12). P. 7046–7052.
648. Ellingson J.L., Anderson J.L., Carlson S.A., Sharma VK. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Molecular and Cellular Probes*. 2004. Vol.18(1). P.51–57.
649. Malorny B, Made D, Teufel P, Berghof-Jager C, Huber I, Anderson A, Helmuth R. Multicenter validation study of two blockcyclerand one capillary-based real-time PCR methods for the detection of *Salmonella* in milk powder. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol.117(2). P.211–218.
650. Malorny B, Hoorfar J, Hugas M, Heuvelink A, Fach P, Ellerbroek L, Bunge C, Dorn C, Helmuth R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*.2003.

Vol.89(2–3). P.241–249.

651. Wang X, Jothikumar N, Griffiths MW. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *Journal of Food Protection*. 2004. Vol. 67(1). P.189–192.

652. Malorny B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*. 2007. Vol.70(2). P.245–251.

653. Wolffs PF, Glencross K, Thibaudeau R, Griffiths MW. Direct quantitation and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol.72(6). P. 3896–3900.

654. Wolffs PF, Glencross K, Norling B, Griffiths MW. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol.117(1). P. 50–54

655. Perelle S, Dilasser F, Malorny B, Grout J, Hoorfar J, Fach P. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Molecular and Cellular Probes*. 2004. Vol.18(6). P. 409–420.

656. Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. Vol.42(6). P. 2581–2586.

657. Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Research in Microbiology*. 2007. Vol.158(2). P.122–127.

658. Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Gautom R, Boyle DS. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella*

- enterica subsp. enterica. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006. Vol.44(10). P. 3608–3615.
659. Galán J., Curtiss R. III Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1989. Vol. 86. P. 6383–6387.
660. N.Gonzalez-Escalona, T.S.Hammack, M.Russell et al. Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting *invA* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. Vol.75. P.3714–3720.
661. K.B. Jiménez, C.B. McCoy, R. Achi. Detection of *Shigella* in lettuce by the USE of rapid molecular assay with increased sensitivity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010. Vol. 41. P. 993–1000
662. K.W. Soli, T. Maure, M.P. Kas, G. Bande, S. Bebes, D. Luang-Suarkia, P.M. Siba, A. Morita, M. Umezaki, A.R. Greenhill, P.F. Horwood. Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhoea in Goroka, Papua New Guinea. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014. Vol. 27. P. 54–58.
663. E. Villalobo, A. Torres. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. *Applied and environmental microbiology*. 1998. Vol. 64. №. 4. P. 1242–1245.
664. Dutta, S., A. Chatterjee, P. Dutta, K. Rajendran, S. Roy, K. C. Pramanik, and S. K. Bhattacharya. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhea in Calcutta, India. *Journal of Medical Microbiology*. 2001. Vol.50. P.667–674.
665. Lindqvist, R. Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method—sensitivity and performance compared with a conventional culture method. *Journal of Applied Microbiology*. 1999. Vol. 86. P. 971–978.
666. Hale, T. L. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiology and*

Molecular Biology Reviews. 1991. Vol.55. P. 206–224.

667. Islam, D., and A. A. Linderg. Detection of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri* in feces by immunomagnetic isolation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992. Vol.11. P. 2801–2806.
668. Phantouamath, B., N. Sithivong, S. Insisiengmay, Y. Ichinose, N. Higa, T. Song, and M. Iwanaga. Pathogenicity of *Shigella* in healthy carriers: a study of Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2005. Vol. 58. P. 232–234.
669. Vantarakis, A., G. Komninou, D. Venieri, and M. Papapetropoulou. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. *Letters in Applied Microbiology*. 2000. Vol.31. P.105–109.
670. Thong, K. L., S. L. Hoe, S. D. Puthucheary, and R. M. Yasin. Detection of virulence gene in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. *BMC Infectious Diseases*. 2005. Vol.5. P. 8–14.
671. Kong, R. Y. C., S. K. Y. Lee, T. W. F. Law, S. H. W. Law, and R. S. S. Wu. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research*. 2002. Vol.36. P. 2802–2812.
672. Lampel, K. A., P. A. Orlandi. Polymerase chain reaction detection of invasive *Shigella* and *Salmonella enterica* in food. *Methods in Molecular Biology*. 2002. Vol.179. P. 235–244.
673. Bischoff, C., J. Lüthy, M. Altwegg, and F. Baggi. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2005. Vol. 61. P. 335–341.
674. Thiem, V. D., O. Sethabutr, L. V. Seidlein, T. V. Tung, D. G. Canh, B. T. Chien, L. H. Tho, H. Lee, H. Houn, T. L. Hale, J. D. Clemens, C. Mason, and D. D. Trach. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. Vol.42. P. 2031–2035.
675. Yang, J., F. Wu, J. Tsai, J. Mu, L. Lin, K. Chen, S. H. Kuo, C. Chiang, and H. Wu. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to

- identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. Vol.45. P. 3620–3625.
676. Venkatesan, M.M., Buysse, J.M. and Hartman, A.B. Sequence variation in two *ipaH* genes of *Shigella flexneri* 5 and homology to the LRG-like family of proteins. *Molecular Microbiology*. 1991. Vol.5. P. 2435–2445.
677. Wen S. Lin, Chorng-Ming Cheng, Khanh T. Van. A Quantitative PCR Assay for Rapid Detection of *Shigella* Species in Fresh Produce. *Journal of Food Protection*. 2010. Vol.73(2).P.221-233.
678. Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 1995. Vol.59. P.143–169.
679. Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. 1998. Vol.180. P.4765–4774.
680. Klauegger, A., Hell, M., Berger, A., Zinober, K., Baier, S., Jones, N., Sperl, W. & Kofler, B. Gram type specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. Vol. 37. P. 464–466.
681. Suzuki, M. T., Taylor, L. T. & DeLong, E. F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol.66. P. 4605–4614.
682. Blok, H. J., Gohlke, A. M. & Akkermans, A. D. Quantitative analysis of 16S rDNA using competitive PCR and the QPCR system 5000. *Biotechniques*. 1997. Vol.22. P. 700–704.
683. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996. Vol. 6. P. 986–994.
684. Farelly, V., Rainley, F. A. & Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. Vol. 61. P. 2798–2801.

685. Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002. Vol. 148(1). P. 257–66.
686. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 1994. 9th edn. Baltimore: Williams & Wilkins.
687. Чужебаева Г.Д. Диагностика пастереллеза крупного рогатого скота методом ПЦР: монография. Костанай. : Костанайский государственный университет имени Ахмета Байтурсынова, 2017. 106 с.
688. Способы диагностики Гепатита С: тесты на вирусную нагрузку URL: http://www.hcv.ru/information/facts/htm/diag_virload.html (дата звернения: 15.07.2018).
689. dsDNA copy number calculator. URL: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> – (дата звернения: 17.12.2015).
690. A. Casey, O. McAuliffe, A. Coffey, K. Hunt, S. Fanning, E. Fox., K. Jordana. Complete genome sequence of *Listeria monocytogenes* strain DPC6895, a serotype 1/2b isolate from bovine raw milk. *Genome Announcements*. 2015. Vol. 3(3). P.1–2. web-site: genomea.asm.org. (e00629-15).
691. M. McClelland, K.E. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, Ph. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, Sh. Hou, D. Layman, Sh. Leonard, Ch. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, El. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Floreack, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, R.K. Wilson. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001. Vol. 413. P. 852-856.
692. Q. Jin, Zh. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, Sh. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Qiang, Y. Wen, Y. Hou, J. Yu. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30. № 20. P.

4432–4441.

693. I. Ben Salem, M. Aouni, R. Mzoughi. Specific detection of salmonella spp. in food by multiplex polymerase chain reaction. *Advanced Studies in Biology*. 2010. Vol. 2. № 2. P.73 – 88.

694. Rantsiou K., Alessandria V., Urso R., Dolci P., Cocolin L. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2008. Vol.121. P. 99–105.

695. Warren B.R.. Comparison of conventional culture methods and the polymerase chain reaction for the detection of *Shigella* spp. on tomato surfaces: A thesis presented to the Graduate School of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. University of Florida, 2003. 92 p.

696. Завьялова Н.Б., Головина А.Н., Завьялов Д.В., Дьяконова Л.П., Мельников М.С. и др. Методология и методы научных исследований в экономике и менеджменте: пособие для вузов / под ред. Н. Б. Завьяловой, А.Н. Головиной. Москва- Екатеринбург, 2014. 282 с.

697. Курцева В.Г. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: учеб. пособие / В.Г. Курцева, З.Э.Гарш. Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2007. 97с.

698. Дымань Т.Н., Шевченко С.И., Берзина С.В. Новые тенденции в питании человека. – К.: Гнозис, 2007. – 76 с.

699. Витол И.С. Экологические проблемы производства и потребления пищевых продуктов: учеб. пособ. Москва: издательский комплекс МГУПП, 2000. 93 с.

700. Росивал Л., Энгст Р., Соколай А.. Посторонние вещества и пищевые добавки в продуктах. М. : Легкая и пищевая промышленность, 1982. 264 с.

701. Ловкис З.В., Почицкая И.М., Мельситова И.В., Литвяк В.В.. Качество и безопасность продуктов питания: учеб. пособ. Минск: РУП «Научно-

- практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»; Белорусский государственный университет, 2008. 336 с.
702. Никифорова Т.Е. Биологическая безопасность продуктов питания: учеб. пособ. / под ред. Т.Е. Никифоровой. Иваново, 2009. 179 с
703. Сурак Джон Г. Рецепт безопасной пищевой продукции: ИСО 22000 и НАССР. *Стандарты и качество*. 2008. №2. С. 96–99
704. Попова Н. В., Арсеньєва Л. Ю., Мисюра Т. Г. Контроль якості та безпечності продукції галузі: курс лекцій для студ. напряму 6.051701. Київ: НУХТ, 2012. 175 с.
705. Руководство по методам анализа качества безопасности пищевых продуктов / под ред. И.М.Скурихина, В. А. Тутельяна. Москва: Брандес: Медицина, 1998. 342 с
706. Глазко В.И., Шульга Е.В., Дымань Т.Н., Глазко Г.В. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. Белая Церковь.: Изд. БГАУ, 2001. 487 с.
707. О. В. Березовський, Ю. П. Полупан, С. Ю. Рубан, К. В. Копилов. Зв'язок поліморфізму за генами κ-CN, TG5, LEP з молочною продуктивністю корів українських молочних порід: збірник. *Розведення і генетика тварин*. 2015. Вип.49. Київ: Аграрна наука. С. 154–164.
708. Войтенко С.Л., Метлицька О.І., Почерняєв К.Ф., Вишневський Л.В., Петренко С.М. Використання ДНК-технологій для оптимізації селекційного процесу в малочисельних популяціях свиней. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2007. Вип.2(45). С.92–95.
709. О. І. Метлицька, С. І. Ковтун, М. Д. Палькіна. ДНК-паспортизація порід бджіл України в системі збереження і вдосконалення їх генофонду. *Вісник аграрної науки*. 2015. № 7. С. 39–43.
710. Тарасюк С.І., Грициняк І.І. Молекулярно-генетичні методи в рибництві: монографія. Київ: Аграрна наука, 2013. 312 с.

711. Бальвинская М.С., Ланцман И.В., Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. Создание ДНК-маркеров хозяйственно-ценных генов ячменя на основе ПЦР-анализа. *Збірник наукових статей «Геном рослин»*. 2008. С. 48–51.
712. Кожухова Н. Е. Добір за допомогою молекулярних маркерів в селекції рослин. *Вісник Харківського національного аграрного університету*. 2011. Вип. 1. С. 35–43.
713. Герілович А.П., Стегній Б.Т., Барановський Д.І. Мандигра М.С., Лиманська О.Ю., Болотін В.І. Молекулярно-генетичні методи досліджень у ветеринарній медицині та біотехнології в контексті вирішення проблем біобезпеки. *Ветеринарна медицина*. 2016. Вип. 102. С. 19–25.
714. К.В. Копилов. Стан та перспективи використання генотипного маркування в селекції тварин. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2010. Т. 8. № 1. С. 91–98.
715. А. И. Метлицкая, К. В. Копылов, А. В. Березовский. Современные молекулярно-генетические подходы для повышения эффективности селекционного процесса в животноводстве Украины. *Разведение и генетика животных*. 2016. Вып. 51. С. 193–200.
716. Жукова Я.Ф., Петров П.І., Даниленко С.Г., Шугай М.О., Чорна Н.А., Вакуленко М.М. ПЛР-скринінг заквашувальних культур для підвищення вмісту есенціальних нутрієнтів у органічному кисломолочному продукті. *Продовольчі ресурси*. 2019. № 12. С. 94–112.

ДОДАТКИ

Додаток А

Перелік сировини рослинного походження та харчових продуктів які можуть містити ГМО (за даними, що наведено на офіційному сайті Верховної Ради України <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1248-10#Text>).

№	Назва сировини та харчового продукту, який з неї виготовлений
Соя	
1	Соєві боби
2	Соєві проростки
3	Концентрат соєвого білка і його текстуровані форми
4	Гідролізат соєвого білка
5	Ізолят соєвого білка
6	Соєве борошно і його текстуровані форми
7	Замінник молока (соєве молоко)
8	Замінник сухого молока (сухе соєве молоко)
9	Консервована соя
10	Варені соєві боби
11	Смажені соєві боби
12	Смажене соєве борошно
13	Продукти, отримані з використанням ізоляту соєвого білка, концентрату соєвого білка, гідролізату соєвого білка, соєвого борошна, сухого соєвого молока
14	Ферментовані соєві продукти
15	Соєва паста і продукти з її використання
16	Соєвий соус
17	Продукти, отримані або які містять соєве молоко (тофу, квашені напої, морозиво, майонез)
18	Соєва олія нерафінована
19	Соєва олія рафінована*
20	Соєвий лецитин
21	Продукти, отримані або виготовлені з використанням продуктів, зазначених у пунктах 1-20
Кукурудза	
1	Кукурудза для безпосереднього вживання в їжу
2	Борошно кукурудзяне
3	Крупа кукурудзяна
4	Борошно змішане, утримуюче кукурудзяне борошно
5	Кукурудза заморожена та консервована
6	Попкорн із кукурудзи
7	Кукурудзяні чіпси
8	Кукурудзяна олія нерафінована
9	Кукурудзяна олія рафінована*
10	Кукурудзяний крохмаль *
11	Мальтодекстрини, вироблені з кукурудзи*
12	Сиропо, вироблені з кукурудзяного крохмалю*
13	Глюкоза, вироблена з кукурудзи*
14	Фруктоза, вироблена з кукурудзи*
15	Патока, вироблена з кукурудзи*
Картопля	
1	Картопля (для безпосереднього споживання в їжу)
2	Напівфабрикати з картоплі швидкозаморожені
3	Пюре картопляне сухе
4	Пластівці картопляні
5	Картопляні чіпси
6	Крекери картопляні (напівфабрикати)
7	Продукти з картоплі смажені: хмиз картопляний, у скибочках, соломкою
8	Концентрат з картоплі, у тому числі: борошно для оладків, вареники з картоплею (напівфабрикати), пюре картопляне, що не потребує варки
9	Продукти з картоплі швидкого приготування, у тому числі картопля сушена
10	Консерви з картоплі, або ті, що містять картоплю
11	Меляса

Продовж. додатку А

12	Картопляний крохмаль
13	Глюкоза, вироблена з картоплі*
14	Патока, вироблена з картоплі*
Томати	
1	Томати для безпосереднього вживання в їжу (у тому числі консервовані)
2	Томатна паста
3	Томатне пюре
4	Томатний сік, напої
5	Томатні соуси, кетчупи
6	Продукти, що містять компоненти з пунктів 1-5
Кабачки	
1	Кабачки у натуральному вигляді
2	Продукти, отримані або вироблені з використанням кабачків
Диня	
1	Диня у натуральному вигляді
2	Продукти, отримані або вироблені з використанням дині
Папайя	
1	Папайя у натуральному вигляді
2	Продукти, отримані або вироблені з використанням папайї
Цикорій	
1	Продукти, що містять цикорій
Цукровий буряк	
1	Меласа
2	Цукор, глюкоза, фруктоза, отримані або вироблені із цукрового буряку*
Ріпак	
1	Ріпак і продукти його переробки, у тому числі: ріпакова олія нерафінована ріпакова олія рафінована* ріпакова олія та продукти, що її містять* насіння ріпаку дроблене, недроблене
Льон	
1	Льняна олія та продукти, що її містять*
Бавовна	
1	Бавовняна олія та продукти, що її містять*
Пшениця	
1	Пшениця у натуральному вигляді
2	Продукти, отримані або виготовлені з пшениці, у тому числі, хліб і хлібобулочні вироби
Рис	
1	Продукти, що містять рис, у тому числі: рис подрібнений борошно рисове гранули із зерна рису пластівці рисові, чіпси рисові
2	Інші готові харчові продукти, вироблені із додаванням рису як інгредієнту
інше	
1	Продукти дитячого харчування та сировина для їх виготовлення
2	Харчові продукти для спеціального дієтичного споживання, функціональні харчові продукти, дієтичні добавки, виготовлені з використанням харчових продуктів, зазначених у цьому переліку
3	Харчові добавки, виготовлені з використанням харчових продуктів, зазначених у цьому Переліку.
4	Закваски, дріжджові культури та продукти, що їх містять.

* - харчові продукти, що не містять ДНК, однак, підлягають обов'язковому стандартному санітарному контролю: перевірка документів та відповідність маркування.

Додаток Б

Регуляторні послідовності та гени, використані під час створення ГМО, які дозволено до застосування у харчовій продукції і кормах на території Європейського Союзу та Російської Федерації [505,508,509].

Культура	Лінія, виробник	Країна	Промотор	Ген	Термінатор
Соя	GTS4032, Monsanto	ЄС Росія	E35S CaMV	CP4 epsps	nos
	A2704-12, Bayer CropScience	ЄС Росія	35S CaMV	pat	35S CaMV
	A5547-127, Bayer CropScience	ЄС Росія	35S CaMV	pat	35S CaMV
	CV127, BASF	ЄС Росія	—	csr1-2	—
	SYHTØH2, Bayer Crop Science, Syngenta	Росія	SMP	pat, avhppd-03	nos
	DP305423, DuPont	ЄС	KTi3, SAMS	gm-hra, gm-fad2-1	KTi3, als
	DP356043, DuPont	ЄС	SCP1, SAMS	gat4601, gm-hra	pinII, als
	MON87701, Monsanto	ЄС Росія	RbcS4	cry1Ac	7S α'
	MON87705, Monsanto	ЄС	FMV / Tsf1	CP4 epsps, fad2-1a, fatb1-a	E9
	MON87708, Monsanto	ЄС	PCSV	CP4 epsps, DMO	E9
	MON87769, Monsanto	ЄС	7S, 7S α	CP4 epsps, PjD6D, NcFad3	E9
	MON89788, Monsanto	ЄС Росія	FMV / TSF1	CP4 epsps	T-E9
Кукурудза	MON810, Monsanto	ЄС Росія	E35S CaMV	cry1Ab	—
	MON863, Monsanto	ЄС Росія	E35S CaMV, 4AS1	cry3Bb1, nptII	nos, tahsp17
	MON88017, Monsanto	ЄС Росія	35S CaMV, ract1	CP4 epsps, cry3Bb1	nos, tahsp 17
	MON87460, Monsanto	ЄС	35S CaMV, ract1	cspB, nptII	nos, Tr7
	MON89034, Monsanto	ЄС Росія	E35S CaMV, FMV	cry2Ab2, cry1A.105	nos
	NK603, Monsanto	ЄС Росія	35S CaMV, ract1	CP4 epsps	nos
	GA21, Monsanto	ЄС Росія	ract	mEPSPS	nos
	BT11, Syngenta	ЄС Росія	35S CaMV	pat, cry1Ab	nos
	MIR162, Syngenta	ЄС Росія	ZmUbiInt	vip3Aa20, pmi	nos, 35S CaMV
	MIR604, Syngenta	ЄС Росія	MTL UbiZm1	mCry3A, pmi	nos
	T25 Bayer CropScience	ЄС Росія	35S CaMV	pat	35S CaMV
	3272 Syngenta	Росія	Gzein, UbiZm1	amy797E, pmi	35S CaMV, nos

Продовж. додатку Б

	5307, Syngenta	Росія	CmYLCV, UbiZm1	eCry3.1Ab, pmi	nos
	DAS-59122-7, Dow AgroSciences LLC / DuPont	ЄС	35S CaMV, UbiZm1, TAperox	pat, cry34Ab1, cry35Ab1	35S CaMV, pinII
	TC1507, Dow AgroSciences LLC / DuPont	ЄС	E35S CaMV, UbiZm1	pat, cry1Fa2	35S CaMV, Orf25polyA
Ріпак	GT73 (RT73), Monsanto	ЄС	CMoVb,	CP4 epsps, goxv247	E9
	HCN28 (T45), Bayer CropScience	ЄС	E35S CaMV	pat	35S CaMV
	MON88302, Monsanto	ЄС	FMV / Tsfl	CP4 epsps	E9
	MS8, Bayer CropScience	ЄС	SsurAra, TA29	bar, barnase	nos, g7
	RF1 (B93-101), Bayer CropScience	ЄС	SsurAra, TA29, NOS	bar, barnase, nptII	nos, g7, ocs
	RF3, Bayer CropScience	ЄС	SsurAra, TA29	bar, barnase, barstar	nos, g7
Картопля	EH92-527-1, BASF	ЄС	NOS, gbss	anti-gbss, nptII	nos
	Луговской 1210 амк Центр Биоинженерии РАН	Росія	FMV	cry3A, nptII	E9, nos
	Елизавета 2904/1 kgs Центр Биоинженерии РАН	Росія	FMV	cry3A, nptII	E9, nos
Цукровий буряк	H7-1, Monsanto	ЄС Росія	CMoVb FMV	CP4 epsps	E9
Рис	LLRICE62, Bayer CropScience	Росія	35S CaMV	bar	35S CaMV

Гібриди: соя - MON87701 x MON89788, MON87708 x MON89788 ; кукурудза - 59122 x MON88017, 59122 x NK603, Bt11 x GA21, Bt11 x MIR604, BT11 x MIR604 x GA21, MIR604 x GA21, MON810 x MON88017, MON863 x MON810, MON863 x MON810 x NK603, MON863 x NK603, MON89034 x 59122, MON89034 x 59122 x MON88017, MON89034 x MON88017, MON89034 x NK603, MON89034 x TC1507, MON89034 x TC1507 x 59122, MON89034 x TC1507 x MON88017, MON89034 x TC1507 x MON88017 x 59122, MON89034 x TC1507 x NK603, NK603 x MON810, NK603 x T25, TC1507 x 59122, TC1507 x 59122 x MON88017, TC1507 x 59122 x NK603, TC1507 x MON88017, TC1507 x NK603, ріпак - MS8 x RF3;

Додаток В

Реєстр авторизованих у ЄС ліній ГМ сої, що дозволені до використання під час виробництва харчових продуктів та кормів станом на 2017 рік (за даними, що наведено на офіційному сайті європейської комісії http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm).

№	Лінія ID код компанія	Введені гени та їх опис	Дозвіл на використання	Термін закінчення авторизації
1	A2704-12 <i>ACS-GM005-3</i> [Bayer]	<i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicide	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from ACS-GM005-3 soybean (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from ACS-GM005-3 soybean (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of ACS-GM005-3 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	07/09/2018
2	MON89788 <i>MON-89788-1</i> [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glyphosate	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-89788-1 soybean (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-89788-1 soybean (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-89788-1 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	03/12/2018
3	MON40-3-2 <i>MON-04032-6</i> [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glyphosate	Food containing, consisting of, or produced from MON 40-3-2 soybean (including food additives) Feed containing or consisting of MON 40-3-2 soybean Feed produced from MON 40-3-2 soybean (feed materials and feed additives) Other products containing or consisting of MON 40-3-2 soybean with the exception of cultivation	09/02/2022
4	MON87701 <i>MON-87701-2</i> [Monsanto]	<i>cry1Ac</i> gene inserted to confer protection against certain lepidopteran pests	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-87701-2 soybean (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-87701-2 soybean (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-87701-2 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	09/02/2022
5	356043 <i>DP-356043-5</i> [Pioneer]	<i>gat</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glyphosate <i>gm-hra</i> gene inserted to confer	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from DP-356043-5 soybean (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from DP-356043-5 soybean (feed materials and feed additives)	09/02/2022

Продовж. додатку В

		tolerance to the ALS-inhibiting herbicide	Products other than food and feed containing or consisting of DP-356043-5 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	
6	A5547-127 <i>ACS-GM006-4</i> [Bayer]	<i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicide	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from ACS-GM006-4 soybean (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from ACS-GM006-4 soybean (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of ACS-GM006-4 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	09/02/2022
7	MON87701 x MON89788 <i>MON-87701-2 x MON-89788-1</i> [Monsanto]	<i>cry1Ac</i> gene inserted to confer protection against certain lepidopteran pests <i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glyphosate	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-87701-2 x MON-89788-1 soybean (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-87701-2 x MON-89788-1 soybean (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-87701-2 x MON-89788-1 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	27/06/2022
8	MON 87705 <i>MON-87705-6</i> [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to glyphosate herbicides fragments of FAD2-1A and FATB1-A genes resulting in inhibition of the expression of the FAD2-1A and FATB1-A genes by RNA interference (RNAi), which leads to an increased oleic acid and reduced linoleic acid	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MON-87705-6 soybean Feed containing, consisting of, or produced from MON-87705-6 soybean Products other than food and feed containing or consisting of MON-87705-6 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation.	26/04/2025
9	MON 87708 <i>MON-87708-9</i> [Monsanto]	<i>DMO</i> gene which confers tolerance to dicamba-based herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MON-87708-9 soybean Feed containing, consisting of, or produced from MON-87708-9 soybean Products other than food and feed containing or consisting of MON-87708-9 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	26/04/2025
10	MON 87769 <i>MON-87769-7</i>	<i>Pj.D6D</i> gene which results in conversion of	Food containing, consisting of, or produced from MON-87769-7 soybean	26/04/2025

Продовж. додатку В

	[Monsanto]	linoleic acid to α -linolenic acid <i>Nc.Fad3</i> gene which results in conversion of α -linolenic acid to stearidonic acid	Feed containing, consisting of, or produced from MON-87769-7 soybean Products other than food and feed containing or consisting of MON-87769-7 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	
11	305423 <i>DP-305423-1</i> [Pioneer]	a fragment of the <i>fad2-1</i> gene resulting, through RNA interference, in the silencing of the endogenous <i>fad2-1</i> gene, which leads to an increased oleic acid and reduced linoleic acid Glycine max - <i>hrra</i> gene which confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from DP-305423-1 soybean Feed containing, consisting of, or produced from DP-305423-1 soybean Products other than food and feed containing or consisting of 305423-1 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	26/04/2025
12	BPS-CV127-9 <i>BPS-CV127-9</i> [BASF]	<i>acetohydroxyacid synthase</i> large subunit of Arabidopsis thaliana gene inserted to confer tolerance to the imidazolinone herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from BPS-CV127-9 soybean Feed containing, consisting of, or produced from BPS-CV127-9 soybean with the exception of forage Products other than food and feed containing or consisting of BPS-CV127-9 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	26/04/2025
13	FG 72 <i>MST-FG072-2</i> [Bayer]	<i>hppdPf336</i> gene inserted to confer tolerance to the isoxaflutole herbicides <i>2mepsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MST-FG072-2 soybean Feed containing, consisting of, or produced from MST-FG072-2 soybean Products other than food and feed containing or consisting of MST-FG072-2 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	25/07/2026
14	MON 87705 × MON 89788 <i>MON-87705-6 × MON-89788-1</i> [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to glyphosate herbicides fragments of <i>FAD2-1A</i> and <i>FATB1-A</i> genes resulting in inhibition of the expression of these genes by RNA interference	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MON-87705-6 × MON-89788-1 soybean Feed containing, consisting of, or produced from MON-87705-6 × MON-89788-1 soybean Products other than food and feed containing or consisting of MON-87705-6 × MON-89788-1 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation.	25/07/2026

Продовж. додатку В

15	MON 87708 × MON 89788 <i>MON-87708-9 × MON-89788-1</i> [Monsanto]	<i>dmo</i> gene inserted to confer tolerance to dicamba-based herbicides <i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MON-87708-9 × MON-89788-1 soybean Feed containing, consisting of, or produced from MON-87708-9 × MON-89788-1 soybean Products other than food and feed containing or consisting of MON-87708-9 × MON-89788-1 soybean for the same uses as any other soybean with the exception of cultivation	25/07/2026

Додаток Г

Реєстр авторизованих у ЄС ліній ГМ кукурудзи, що дозволені для використання під час виробництва харчових продуктів та кормів станом на 2017 рік (за даними, що наведено на офіційному сайті європейської комісії http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

№	Лінія ID код компанія	Введені гени та їх опис	Дозвіл на використання	Термін закінчення авторизації
1	Maize (Bt11) <i>SYN-BT 011-1</i> [Syngenta]	Genetically modified maize that contains: the <i>cry1A (b)</i> gene inserted to confer insect-resistance the <i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from SYN-BT011-1xMON-00021-9 Feed containing, consisting of, or produced from SYN-BT011-1xMON-00021-9 Products other than food and feed containing or consisting of SYN-BT011-1xMON-00021-9	27/07/2020
2	Maize (DAS59122) <i>DAS-59122-7</i> [Pioneer and Dow AgroSciences]	the <i>cry34Ab1</i> and <i>cry35Ab1</i> genes inserted to confer protection against certain coleopteran pests such as corn rootworm larvae (<i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicide	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from DAS-59122-7 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from DAS-59122-7 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of DAS-59122-7 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	Renewal ongoing
3	Maize (DAS1507) <i>DAS-01507-1</i> [Pioneer and Dow AgroSciences]	<i>cry1F</i> gene inserted to confer resistance to the European corn borer and certain other lepidopteran pests <i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium	Foods and food ingredients containing, consisting or produced from DAS-01507-1 maize (including food additives) Feed containing or consisting of DAS-01507-1 maize Feed produced from DAS-01507-1 maize (feed materials and feed additives) Other products containing of DAS-01507-1 maize with the exception of cultivation	Renewal ongoing
4	Maize (DAS1507xNK6 03) <i>DAS-01507-1xMON-00603-6</i> [Pioneer and Dow AgroSciences]	<i>cry1F</i> gene inserted to confer protection against certain lepidopteran pests such as the European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>) and species belonging to the genus <i>Sesamia</i> , <i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicide <i>cp 4epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicide	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from DAS-01507-1xMON-00603-6 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from DAS-01507-1xMON-00603-6 maize (feed materials and feed additives) Products, other than food and feed, containing or consisting of DAS-01507-1xMON-00603-6 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	Renewal ongoing

Продовж. додатку Г

5	Maize (GA21) MON-00021-9 [Syngenta]	<i>mepsps</i> gene inserted to confer tolerance to herbicide glyphosate	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-00021-9 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-00021-9 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-00021-9 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	Renewal ongoing
6	Maize (MON810) MON-00810-6 [Monsanto]	<i>ry1A (b)</i> gene inserted to confer resistance to lepidopteran pests	Foods and food ingredients produced from MON810 (including food additives) Pollen produced from MON810 maize Feed containing or consisting of MON810 maize Feed produced from MON810 maize (feed materials feed additives) Seeds for cultivation	03/07/2027 05/11/2023 03/07/2027 03/07/2027 Renewal of authorisation ongoing
7	Maize (NK603) MON-00603-6 [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-00603-6 maize Feed containing, consisting of, or produced from MON-00603-6 maize Products other than food and feed containing or consisting of MON-00603-6 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	26/04/2025 26/04/2025 26/04/2025
8	Maize (NK603 x MON810) MON-00603-6 x MON-00810-6 [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to glyphosate herbicides and the <i>cry1Ab</i> gene inserted to confer protection against certain lepidopteran insect pests (<i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Sesamia</i> spp.)	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-00603-6xMON-00810-6 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-00603-6xMON-00810-6 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-00603-6xMON-00810-6 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	Renewal ongoing
9	Maize (T25) ACS-ZM003-2 [Bayer]	<i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from ACS-ZM003-2 maize Feed containing, consisting of, or produced from ACS-ZM003-2 maize Products other than food and feed containing or consisting of ACS-ZM003-2 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	26/04/2025 26/04/2025 26/04/2025
10	Maize (MON88017) MON-88017-3 [Monsanto]	modified <i>cry3Bb1</i> gene inserted to confer protection to certain coleopteran pests and <i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-88017-3 maize (including food additives)	29/10/2019

Продовж. додатку Г

		glyphosate herbicides	Feed containing, consisting of, or produced from MON-88017-3 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-88017-3 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	
11	Maize (MON89034) <i>MON-89034-3</i> [Monsanto]	<i>cry1A.105</i> and <i>cry2Ab2</i> genes inserted to confer protection to certain lepidopteran pests	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-89034-3 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-89034-3 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of MON-89034-3 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	29/10/2019
12	Maize (59122xNK603) <i>DAS-59122-7xMON-00603-6</i> [Pioneer]	<i>cry34Ab1</i> and <i>cry35Ab1</i> genes inserted to confer protection against certain coleopteran pests <i>pat</i> genes inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicides <i>cp4 epsps</i> genes inserted to confer tolerance to glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from DAS-59122-7xMON-00603-6 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from DAS-59122-7xMON-00603-6 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of DAS-59122-7xMON-00603-6 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	29/10/2019
13	Maize (MIR604) <i>SYN-IR604-5</i> [Syngenta]	modified <i>cry3A</i> gene inserted to confer protection against certain coleopteran pests <i>pmi</i> gene inserted as selection marker	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from SYN-IR604-5 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from SYN-IR604-5 maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of SYN-IR604-5 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	29/11/2019
14	Maize (MON88017xMON810) <i>MON-88017-3xMON-00810-6</i> [Monsanto]	the <i>cry1Ab</i> gene which confers protection against certain lepidopteran pests the <i>cry3Bb1</i> gene which provides protection to certain coleopteran pests the <i>cp4 epsps</i> gene which confers tolerance to glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-88017-3xMON-00810-6 Feed containing, consisting of, or produced from MON-88017-3xMON-00810-6 Products other than food and feed containing or consisting of MON-88017-3xMON-00810-6	27/07/2020
15	Maize (MON89034 xNK603)		Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-89034-3x MON-00603-6	27/07/2020

Продовж. додатку Г

	<i>MON-89Ø34-3x</i> <i>MON-ØØ6Ø3-6</i> [Monsanto]	the <i>cry1A.105</i> and <i>cry2Ab2</i> genes which provide protection to certain lepidopteran pests the <i>cp4 epsps</i> gene which confers tolerance to glyphosate herbicides	Feed containing, consisting of, or produced from <i>MON-89Ø34-3x MON-ØØ6Ø3-6</i> Products other than food and feed containing or consisting of <i>MON-89Ø34-3x MON-ØØ6Ø3-6</i>	
16	Maize (59122x1507xN K603) <i>DAS-59122-7x</i> <i>DAS-Ø15Ø7xMON-ØØ6Ø3-6</i> [Pioneer]	the <i>cry1F</i> gene which confers protection against certain lepidopteran pests the <i>cry34Ab1</i> and <i>cry35Ab1</i> genes which provide protection to certain coleopteran pests the <i>pat</i> gene which confers tolerance to the glufosinate-ammonium herbicides the <i>cp4 epsps</i> gene which confers tolerance to glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from <i>DAS-59122-7x</i> <i>DAS-Ø15Ø7xMON-ØØ6Ø3-6</i> Feed containing, consisting of, or produced from <i>DAS-59122-7x</i> <i>DAS-Ø15Ø7xMON-ØØ6Ø3-6</i> Products other than food and feed containing or consisting of <i>DAS-59122-7x</i> <i>DAS-Ø15Ø7xMON-ØØ6Ø3-6</i>	27/07/2020
17	Maize (1507x59122) <i>DAS-Ø15Ø7x</i> <i>DAS-59122-7</i> [Pioneer]	the <i>cry1F</i> gene which confers protection against certain lepidopteran pests the <i>cry34Ab1</i> and <i>cry35Ab1</i> genes which provide protection to certain coleopteran pests the <i>pat</i> gene which confers tolerance to the glufosinate-ammonium herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from <i>DAS-Ø15Ø7x DAS-59122-7</i> Feed containing, consisting of, or produced from <i>DAS-Ø15Ø7x DAS-59122-7</i> Products other than food and feed containing or consisting of <i>DAS-Ø15Ø7x DAS-59122-7</i>	27/07/2020
18	Maize (MON89034 xMON88017) <i>MON-89Ø34-3x</i> <i>MON-88Ø17-3</i> [Monsanto]	<i>cry1A.105</i> and <i>cry2Ab2</i> genes which provide protection to certain lepidopteran pests <i>cry3Bb1</i> gene which provides protection to certain coleopteran pests <i>cp4 epsps</i> gene which confers tolerance to glyphosate herbicides	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from <i>MON-89Ø34-3x MON-88Ø17-3</i> maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from <i>MON-89Ø34-3x MON-88Ø17-3</i> maize (feed materials and feed additives) Products other than food and feed containing or consisting of <i>MON-89Ø34-3x MON-88Ø17-3</i> maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	16/06/2021
19	Maize (Bt11 × MIR162 × MIR604 × GA21) <i>SYN-BTØ11-1</i> ×	<i>cry1Ab</i> and <i>vip3Aa20</i> genes inserted to confer protection against certain lepidopteran pests, <i>cry3A</i> gene inserted to confer	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from the GMOs, specified in column 1 (including food additives)	15/09/2026

Продовж. додатку Г

	<i>SYN-IR162-4</i> × <i>SYN-IR604-5</i> × <i>MON-00021-9</i> and four related GM maizes combining three different single GM events: Bt11 × MIR162 × MIR604 Bt11 × MIR162 × GA21 Bt11 × MIR604 × GA21 MIR162 × MIR604 × GA21 and six related GM maizes combining two different single GM events: Bt11 × MIR162 Bt11 × MIR604 Bt11 × GA21 MIR162 × MIR604 MIR162 × GA21 MIR604 × GA21 [Syngenta]	protection against certain coleopteran pests, <i>mepsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicide, <i>pmi</i> gene inserted as selection marker	Feed containing, consisting of, or produced from the GMOs, specified in column 1 (feed materials and feed additives) Products, other than food and feed, containing or consisting of the GMOs, specified in column 1, for the same uses as any other maize, with the exception of cultivation	
20	Maize (MIR162) <i>SYN-IR162-4</i> [Syngenta]	<i>vip3Aa20</i> gene inserted to confer insect- resistance	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from SYN-IR162- 4 Feed containing, consisting of, or produced from SYN-IR162-4 Products other than food and feed containing or consisting of SYN-IR162-4	18/10/2022
21	Maize (MON 89034×1507× MON88017×591 22) <i>MON-89034- 3xDAS-01507- 1xMON-88017- 3xDAS-59122-7</i> and four related GM maizes combining three different single GM events: MON89034×1507× MON88017 MON89034×1507×		Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from the GMOs, specified in column 1 (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from the GMOs, specified in column 1 (feed materials and feed additives) Products, other than food and feed, containing or consisting of the GMOs, specified in column 1, for the same uses as any other maize, with the exception of cultivation	05/11/2023

Продовж. додатку Г

	59122 MON89034×MON88017×59122 1507×MON88017×59122 and four related GM maizes combining two different single GM events: MON89034×1507 MON89034×59122 1507×MON88017 MON88017×59122 [Monsanto and Dow AgroSciences]	<i>Cry1A.105</i>, <i>Cry2Ab2</i>, <i>Cry1F</i> genes inserted to confer protection against certain lepidopteran pests such as the European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>) and species belonging to the genus <i>Sesamia</i>, <i>Cry3Bb1</i>, <i>Cry34Ab1</i> and <i>Cry35Ab1</i> genes inserted to confer protection against certain coleopteran pests such as corn rootworm larvae (<i>Diabrotica</i> spp.) <i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicide <i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicide		
22	Maize (MON89034×1507×NK603) <i>MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-00603-6</i> [Monsanto and Dow AgroSciences]	<i>Cry1A.105</i>, <i>Cry2Ab2</i>, <i>Cry1F</i> genes inserted to confer protection against certain lepidopteran pests such as the European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>) and species belonging to the genus <i>Sesamia</i>, <i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium herbicide <i>cp4 epsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicide	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-00603-6 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-00603-6 maize (feed materials and feed additives) Products, other than food and feed, containing or consisting of MON-89034-3×DAS-01507-1×MON-00603-6 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	05/11/2023
23	Maize (MON 87460) <i>MON 87460-4</i> [Monsanto]	<i>cspB</i> gene inserted to reduce yield loss caused by drought stress <i>nptII</i> gene inserted as selection marker	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MON 87460-4 maize Feed containing, consisting of, or produced from MON 87460-4 maize Products other than food and feed containing or consisting of MON 87460-4 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	26/04/2025
24	Maize (NK603 × T25) <i>MON-00603-6 × ACS-ZM003-</i>	<i>cp4 epsps</i> gene which confers tolerance to glyphosate herbicides <i>pat</i> gene which confers	Foods and food ingredients containing, consisting of or produced from MON-00603-6 × ACS-ZM003-2 maize	03/12/2025

Продовж. додатку Г

	2 [Monsanto]	tolerance to the glufosinate-ammonium herbicides	Feed containing, consisting of, or produced from MON-00603-6 × ACS-ZM003-2 maize Products other than food and feed containing or consisting of MON-00603-6 × ACS-ZM003-2 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	
25	Maize MON 87427 MON-87427-7 [Monsanto]	<i>cp4 epsps</i> gene which confers tissue-selective tolerance to glyphosate herbicides the <i>cp4 epsps</i> expression is absent or limited in male reproductive tissues, which eliminates or reduces the need for detasseling when MON-87427-7 is used as female parent in hybrid maize seed production.	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from MON-87427-7 maize Feed containing, consisting of, or produced from MON-87427-7 maize Products other than food and feed containing or consisting of MON-87427-7 maize for the same uses as any other maize with the exception of cultivation	03/12/2025
26	Maize (DAS-40278-9) DAS-40278-9 [Dow AgroSciences]	<i>aad-1</i> gene inserted to confer tolerance to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and aryloxyphenoxypropionate (AOPP) herbicides.	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from DAS-40278-9 maize (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from DAS-40278-9 maize (feed materials and feed additives) Products, other than food and feed, containing or consisting of DAS-40278-9 maize, for the same uses as any other maize, with the exception of cultivation	03/07/2027
27	Maize (Bt11 × 59122 × MIR604 × 1507 × GA21) SYN-BT011-1 × DAS-59122-7 × SYN-IR604-5 × DAS-01507-1 × MON-00021-9 and five related GM maizes combining four different single GM events: Bt11 × MIR604 × 1507 × GA21 Bt11 × 59122 × 1507 × GA21 Bt11 × 59122 × MIR604 × GA21 Bt11 × 59122 × MIR604 × 1507 59122 × MIR604 × 1507 × GA21 and nine related GM	<i>cry1Ab</i> and <i>cry1F</i> genes inserted to confer protection against certain lepidopteran pests, <i>cry3A</i> , <i>cry34Ab1</i> and <i>cry35Ab1</i> genes inserted to confer protection against certain coleopteran pests, <i>mepsps</i> gene inserted to confer tolerance to the glyphosate herbicides, <i>pat</i> gene inserted to confer tolerance to the glufosinate-ammonium based herbicides, <i>pmi</i> gene inserted as selection marker	Foods and food ingredients containing, consisting of, or produced from the GMOs, specified in column 1 (including food additives) Feed containing, consisting of, or produced from the GMOs, specified in column 1 (feed materials and feed additives) Products, other than food and feed, containing or consisting of the GMOs, specified in column 1, for the same uses as any other maize, with the exception of cultivation	03/07/2027

Продовж. додатку Г

	maizes combining three different single GM events: Bt11 × 59122 × MIR604 Bt11 × 59122 × 1507 Bt11 × 59122 × GA21 Bt11 × MIR604 × 1507 Bt11 × 1507 × GA21 59122 × MIR604 × 1507 59122 × MIR604 × GA21 59122 × 1507 × GA21 MIR604 × 1507 × GA21 and six related GM maizes combining two different single GM events: Bt11 × 59122 Bt11 × 1507 59122 × MIR604 59122 × GA21 MIR604 × 1507 1507 × GA21 [Syngenta]			

Додаток Д

Лінії біотехнологічного ріпаку за даними The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)

№	Лінії ГМ ріпаку та їх код	Комерційна назва, компанія-розробник та рік виходу на ринок	Введений ген	Регуляторні елементи		Набуті ознаки
				P-35S	T-nos	
1	GT73 (RT73), Пн-00073-7	Roundup Ready™, Monsanto Company, 1994	CP4 epsps	-	-	Стійкість до гербіциду гліфосату
2	GT200 (RT200), Пн-89249-2	Roundup Ready™, Monsanto Company, 1997	CP4 epsps	-	-	
3	MON88302, Пн-88302-9	TruFlex / Roundup Ready 2™, Monsanto Company, 2012	CP4 epsps	-	-	
4	HCN10 (Topas 19/2), відсутній	Liberty Link / Independence™, Aventis CropScience, 1995	pat	+	-	Стійкість до фосфіно-трицинових гербіцидів (PPT), зокрема амоній глюфозинату
5	HCN92 (Topas 19/2), ACS-BN007-1	Liberty Link / Innovator™, Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo)), 1995	pat	+	+	
6	T45 (HCN28), ACS-BN008-2	InVigor™, Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo)), 1996	pat (syn)*	+	-	
7	MS1 (B91-4), ACS-BN004-7	InVigor™, Bayer CropScience (Aventis (AgrEvo (Plant Genetic Systems))), 1995	bar	-	+	Стійкість до глюфозинату амонію, система контролю запилення - чоловіча стерильність
8	MS8, ACS-BN005-8	InVigor™, Bayer CropScience (Aventis (AgrEvo (Plant Genetic Systems))), 1996	bar	-	+	
9	RF1 (B93-101), ACS-BN001-4	InVigor™, Bayer CropScience (Aventis (AgrEvo (Plant Genetic Systems))), 1994	bar	-	+	
10	RF2 (B94-2), ACS-BN002-5	InVigor™, Bayer CropScience (Aventis (AgrEvo (Plant Genetic Systems))), 1995	bar	-	+	Стійкість до глюфозинату амонію, система контролю запилення - відновлення фертильності
11	RF3, ACS-BN003-6	InVigor™, Bayer CropScience (Aventis (AgrEvo (Plant Genetic Systems))), 1996	bar	-	+	
12	MS1 x RF1 (PGS1), ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4	InVigor™, Bayer CropScience, 1994	bar	-	+	Стійкість до глюфозинату амонію, система контролю запилення - чоловіча стерильність, відновлення фертильності
13	MS1 x RF2 (PGS2) ACS-BN004-7 x ACS-BN002-5	InVigor™, Bayer CropScience, 1995	bar	-	+	
14	MS1 x RF3, ACS-BN004-7 x ACS-BN003-6	InVigor™, Bayer CropScience, 2006	bar	-	+	

Продовж. додатку Д

15	MS8 x RF3, ACS-BNØØ5-8 x ACS-BNØØ3-6	InVigor™, Bayer CropScience, 1996	<i>bar</i>	-	+	
16	MS8xRF3xGT73, ACS-BNØØ5-8 x ACS-BNØØ3-6 x MON-ØØØ73-7	відсутня, Bayer CropScience, 2010	<i>bar / CP4 epsps (aroA:CP4)</i>	-	+	Стійкість до гербіцидів гліфосату та глюфозинату, система контролю запилення - чоловіча стерильність, відновлення фертильності
17	MON88302xMS8xRF3, MON-883Ø2-9 x ACS-BNØØ5-8 x ACS-BNØØ3-6	відсутня, Monsanto Company, 2014	<i>bar / CP4 epsps (aroA:CP4)</i>	-	+	Стійкість до гербіцидів гліфосату та глюфозинату, відновлення фертильності
18	MON88302 x RF3, MON-883Ø2-9 x ACS-BNØØ3-6	відсутня, Monsanto Company, 2014	<i>bar / CP4 epsps (aroA:CP4)</i>	-	+	Стійкість до гербіцидів гліфосату та глюфозинату, відновлення фертильності
19	PHY14, відсутній	відсутня, Bayer CropScience (Aventis CropScience (Plant Genetic Systems)), 1997	<i>bar</i>	-	+	Стійкість до гербіциду глюфозинату, система контролю запилення - чоловіча стерильність, відновлення фертильності
20	PHY23, відсутній	відсутня, Bayer CropScience (Aventis CropScience (Plant Genetic Systems)), 2001	<i>bar</i>	-	+	
21	PHY35, відсутній	відсутня, Bayer CropScience (Aventis CropScience (Plant Genetic Systems)), 1997	<i>bar</i>	-	+	
22	PHY36, відсутній	відсутня, Bayer CropScience (Aventis CropScience (Plant Genetic Systems)), 1997	<i>bar</i>	-	+	
23	23-18-17 (Event 18), CGN-89111-8	Laurical™, Monsanto Company, 1994	<i>bay TE</i>	+	-	Збільшення вмісту жирних кислот у насінні, зокрема рівню лаурату та міристинової кислоти
24	23-198 (Event 23) CGN-89465-2	Laurical™, Monsanto Company, 1994	<i>bay TE</i>	+	-	
25	OXY-235, ACS-BNØ11-5	Navigator™, Bayer CropScience (Aventis CropScience (Rhône Poulenc Inc.)), 1997	<i>bxn</i>	+	+	Стійкість до оксинілових гербіцидів, у тому числі бромоксинілу і іоксинілу
26	61061, DP-Ø61Ø61-7	відсутня, DuPont (Pioneer Hi-Bred International Inc.), 2012	<i>gat4621</i>	-	-	Стійкість до гербіциду гліфосату
27	73496, DP-Ø73496-4	Optimum®, Gly, DuPont ((Pioneer Hi-Bred International Inc.), 2012	<i>gat4621</i>	-	-	

Продовж. додатку Д

28	MPS961- MPS965, відсутній	Phytaseed™, BASF, 1999	phyA	-	+	Виробництво фітази та резистентність до антибіотиків
29	NS738, NS1471, NS1473, відсутній	Odyssey™, Pioneer Hi-Bred International Inc., 1995	Отримано за допомогою хімічного мутагенезу			Стійкість до імідазолінових гербіцидів, зокрема імазетапіру
30	45A37, 46A40, відсутній	відсутня, Pioneer Hi-Bred International Inc., 1996	Хімічно індукований мутагенез насіння			Зміна вмісту жирних кислот у насінні, зокрема високий вміст олеїнової
31	46A12, 46A16, відсутній	відсутня, Pioneer Hi-Bred International Inc., 1996	Хімічно індукований мутагенез насіння			кислоти та низький ліноленової кислоти

*Синтетична форма гену Pat отримана зі *Streptomyces viridochromogenes* штам Tu 494

Державне підприємство Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів

ДКПІ 24.6;20.59.52-10.00

УКНД 71.040.30

ПОГОДЖЕНО

Заступник головного державного
санітарного лікаря України
Висновок № 05.03.02-07/8620

"09" лютого 2012р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

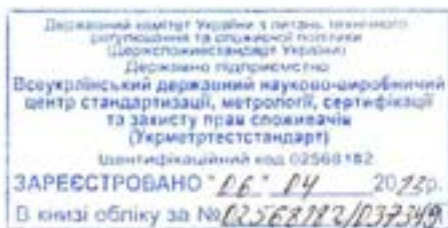
Генеральний директор
ДП "Укрметртестстандарт"

"16" лютого 2012р. О.Ю. Пічугін

Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах

ТЕХНІЧНІ УМОВИ **ТУ У 24.6-02568182-001:2011** (введено вперше)

Дата надання чинності 06.04.2012
Чинні до 06.04.2022



РОЗРОБЛЕНО

Начальник науково-дослідного центру
випробувань продукції

ДП "Укрметртестстандарт"
"12" лютого 2011р. В.К. Семенович

Начальник
науково-виробничої лабораторії
молекулярно-генетичних досліджень
ДП "Укрметртестстандарт"

"12" лютого 2011р. Р.А. Голубець

Старший науковий співробітник
науково-виробничої лабораторії
молекулярно-генетичних досліджень
ДП "Укрметртестстандарт"

"12" лютого 2011р. Р.В. Облап

Молодший науковий співробітник
науково-виробничої лабораторії
молекулярно-генетичних досліджень
ДП "Укрметртестстандарт"

"12" лютого 2011р. Н.Б. Новак

Продовж. додатку Е

	
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ ДЕРЖАВНА САНІТАРНО-ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА СЛУЖБА	
Міністерство охорони здоров'я України (назва установи) м.Київ, вул. Грушевського, 7 (місцезнаходження) тел., факс: 253-94-84; 559-29-88	ЗАТВЕРДЖУЮ Заступник головного державного санітарного лікаря України   Л.М. Черненко
Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи	
від " <u>09</u> " <u>02</u> 2012 р.	№ 05.03.02-07/ <u>8620</u>
ТУ У 24.6-02568182-001:2011 "Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови" (об'єкт експертизи)	
Код ДКПП: 24.6 (код за ДКПП, код за УКТЗЕД, артикул)	
Для використання в якості нормативного документу. (сфера застосування та реалізації об'єкта експертизи)	
ДП "Укрметрестандарт", Україна, 03680, м. Київ, вул. Метрологічна, 4, тел: (044) 526-52-29, 526-42-60, код: 02568182 (розробник, адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, WWW, код СДРІОУ)	
ДП "Укрметрестандарт", Україна, 03680, м. Київ, вул. Метрологічна, 4, тел: (044) 526-52-29, 526-42-60, код: 02568182 (заявник, адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, WWW, код СДРІОУ)	
За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи об'єкт експертизи "ТУ У 24.6-02568182-001:2011 "Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови"" відповідає вимогам діючого санітарного законодавства України і може бути погоджений (затверджений).	
Висновок дійсний: протягом терміну дії ТУ У 24.6-02568182-001:2011 "Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови".	
При внесенні змін до нормативного документа щодо сфери застосування, умов застосування об'єкта експертизи даний висновок втрачає силу.	
Комісія з державної санітарно-епідеміологічної експертизи при головному державному санітарному лікарі України Інституту екології та токсикології ім. Л.І.Медведя	м.Київ, вул. Героїв Оборони, 6 тел. 258-47-73 (назви установи, місцезнаходження, телефон, факс, e-mail, www)
Протокол експертизи	№ 3/8-А-895-12-48427Е від 02.02.2012 р. (№ протоколу, дата його затвердження)
Голова експертної комісії	 Бобішова О.О. (підпис, ім'я, по батькові)



Продовж. додатку Є



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72083** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
C12N 15/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2011 15202	(72) Винахідник(и):	Ример Віктор Давидович (UA), Семенович Володимир Костянтинівич (UA), Облап Руслан Васильович (UA), Голубець Руслан Анатолійович (UA), Маліснюк Вадим Анатолійович (UA), Новак Ніна Богданівна (UA), Северинів Дмитро Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки:	22.12.2011	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ (ДП "УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ"), вул. Метрологічна, 4, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.08.2012	(74) Представник:	Северинів Дмитро Олександрович, реєстр. №0
(46) Публікація відомостей про видану патенту:	10.08.2012, Бюл.№ 15		

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ (ГМО) В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ (ПЛР-РЧ)

(57) Реферат:

Тест-система для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) в харчових продуктах методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ).

UA 72083 U

Додаток Ж



ДЕРЖАВНИЙ КОМІТЕТ УКРАЇНИ З ПИТАНЬ ТЕХНІЧНОГО РЕГУЛЮВАННЯ ТА СПОЖИВЧОЇ ПОЛІТИКИ

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ
(ДП "УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ")

НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ІНСТИТУТ МЕТРОЛОГІЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ВИМІРЮВАНЬ СКЛАДУ,
ВЛАСТИВОСТЕЙ І КІЛЬКОСТІ РЕЧОВИН І МАТЕРІАЛІВ
(МЕТХІМЕНЕРГОТЕСТ)

СВІДОЦТВО про атестацію МВВ

№ МВВ 081/12-0751-11 від 03.08.2011

Методика виконання вимірювань (МВВ) "МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ

(назва методики виконання вимірювань)

ИЗМЕРЕНИЙ ДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (CP4 EPSPS/PAT/BAR/35S/NOS
СКРИНИНГ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВЫХ,
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ И КОСМЕТИЧЕСКИХ ПРОДУКТАХ, ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И КОРМАХ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ" МВВ 081/12-0751-11

Розроблена: ДП «Укрметртестстандарт»

(назва підприємства (організації) розробника МВВ)

Атестована відповідно до ГОСТ 8.010-99

(назва нормативного документа)

Атестація проведена за результатами метрологічної експертизи.

За результатами атестації, проведеної в 2011 р., встановлено, що ця методика
відповідає метрологічним вимогам до МВВ та має такі основні метрологічні
характеристики: наведені на зворотній стороні свідоцтва.

(діапазон вимірювань, характеристики похибок вимірювань (при необхідності її складових))

Контроль похибки вимірювань здійснювати за розділом 13 цієї методики.

Директор



М.С. Рожнов



Продовж. додатку Ж

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ВСЕУКРАИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-
ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ
СЕРТИФИКАЦИИ И ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ»
(ГП Укрметртестстандарт)**

УТВЕРЖДАЮ:

Первый заместитель генерального директора
ГП «Укрметртестстандарт»


В.Д. Ример
« 12 » 2012 г.

**Изменения № 1**

Методика выполнения измерений

ДНК последовательностей (CP4 EPSPS/PAT/BAR/35S/NOS)
генетически модифицированных организмов в пищевых, фармакологических и
косметических продуктах, пищевом сырье растительного происхождения и
кормах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
MBB 081/12-0751-11

РАЗРАБОТЧИКИ:

 В.К. Семенович
 Р.А. Голубец
 Р.В. Облап
 В.А. Малиенко
 Н.Б. Новак

Киев 2012

Додаток 3



20/01/2010 р., вих. № 1569

З метою перевірки компетентності результатів випробувань молекулярно-генетичної лабораторії ДП "Укрметртестстандарт", здійснено випробування одного зразка насіння ріпаку на наявність ГМО в період з 02.11. - 12.11.2009р. в лабораторії Eurofinis GeneScan GmbH, Certificate № 50033-FR0996023-1 від 10.11.2009р.

Вищеназваний зразок пройшов випробування в лабораторії молекулярно-генетичних випробувань згідно листа № 2085 від 02.11.2009р. за вхідним номером №213-31411 від 02.11.2009р, протокол випробувань №1425/09-х.

За результатами досліджень в обох лабораторіях була встановлена наявність у зразку ріпаку BAR послідовності та цільової послідовності NOS – термінатора (нопалін синтази) із *Agrobacterium tumefaciens*. Результати ідентифікації EPSPS модифікації також співпадають (не виявлено).

Начальник відділу експортно – імпорتنих операцій

Н.В. Томаскович



CMD № 023757

SAT "AT Kaprinn"
вул. Мечнікова 3, 4-й поверх
Київ, Україна, 01601

Cargill AT
Metchnikova Str., 3, 4th floor
Kyiv, Ukraine, 01601

Tel (380-44) 230-14-40, 490-56-50
Fax (380-44) 230-14-45, 490-56-37

Продовж. додатку 3



GeneScan

1/3

This copy is an electronic version of the original report and is therefore without signature. The signed original report will be sent by post.

Eurofins GeneScan GmbH
Engesserstr. 4, D - 79106 Freiburg
T | +49 - 761 - 50 36-100
F | +49 - 761 - 50 36-211
info@geneScan.com
www.geneScan.com

SGS Ukraine
Agricultural Services
Ms. Olga Tovkun
40/42, Atamana Golovatogo Str.

Freiburg, 2009-11-10

65003 Odessa
Ukraine

Fax: 0038 48 741 34 89

Certificate No.: 50033-FR0996023-1

EFG Order No.: **50033** EFG Sample No.: **FR0996023**
Date of Order: 2009-11-05 Sample received: 2009-11-09

Sample

Sample description: rapeseeds

Your Sample Code: Ship's Name: PACIFIC WIND, Port of Loading: Odessa, Month of Shipment: October 2009, Sample Marks: Composite, Tons: 25,090, 100 mt, Date: 29.10.09, Seal: 707940

Amount of Sample: 1.5 kg Homogenized Amount: 100 g

Examination Order: CanolaScreen Cargill, if positive quantification

Subsample analysed: 2 x 4 g

	Result	LOD	LOQ	Priority	Start of Analysis	End of Analysis
EPSPS Modification	negative	0,01%	*	express 24h	2009-11-09	2009-11-10
NOS Terminator	positive	0,01%	*	express 24h	2009-11-09	2009-11-10
PAT(SYN) Element	negative	0,01%	*	express 24h	2009-11-09	2009-11-10
BAR Element	positive	0,01%	*	express 24h	2009-11-09	2009-11-10
SeedLink Canola Quantification	<0,1%	*	0,1 %	normal	2009-11-09	2009-11-10

LOD: limit of detection of the method, determined with DNA from pure unprocessed flour. The amount of target DNA extracted from the sample material may be insufficient for the LOD to be applicable to this sample.

LOQ: sample specific limit of quantification.

*: not available.

The results exclusively refer to the actually analysed portion of the sample delivered and therefore they do not have to be representative of the product from which the sample was taken. Our general business terms apply.

Geschäftsführer:
Dr. Markus Brandmeier
Andreas Wutz

Norddeutsche Landesbank Girozentrale
BLZ 250 500 00 Konto-Nr. 150 605 894
IBAN DE3825050000150608594
BIC:SWIFT NOLADE2H

Handelsregister:
Amtsgericht Freiburg i.Br. 6771
Ust-Ident.-Nr. DE 161004043



Додаток И

Ukrmeterteststandart
Metrologichna str. 4
KIEV
Ukraine
03680
UKRAINE

LABORATORY NAME: Ukrmeterteststandart
LABORATORY NUMBER: 015



G e M M A

Proficiency Testing

GeMMA Scheme Proficiency Test GeM SP02

Roundup Ready® Soya in Processed Matrix

August - September 2008

Report

Prepared on behalf of the GeMMA Scheme by

Walker

Caroline Walker

© Crown Copyright 2008

Page 1 of 40



000000 000000

[illegible]

Продовж. додатку И

GeMMA Report GeM SP02

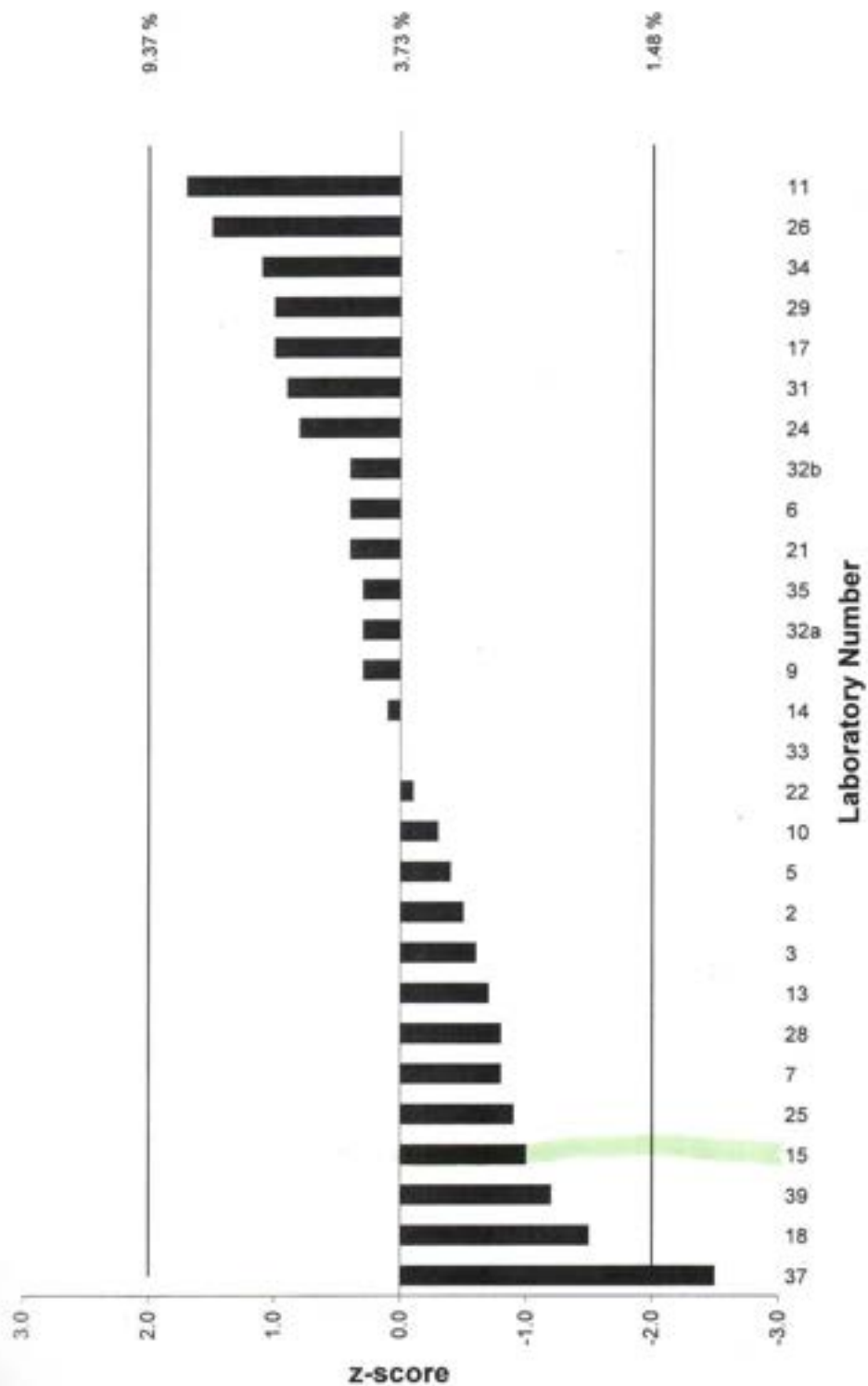


Figure 1: z-Scores for Roundup Ready® Soya (3.73 %) in Processed Matrix Test Material GeM SP02-A

Продовж. додатку И

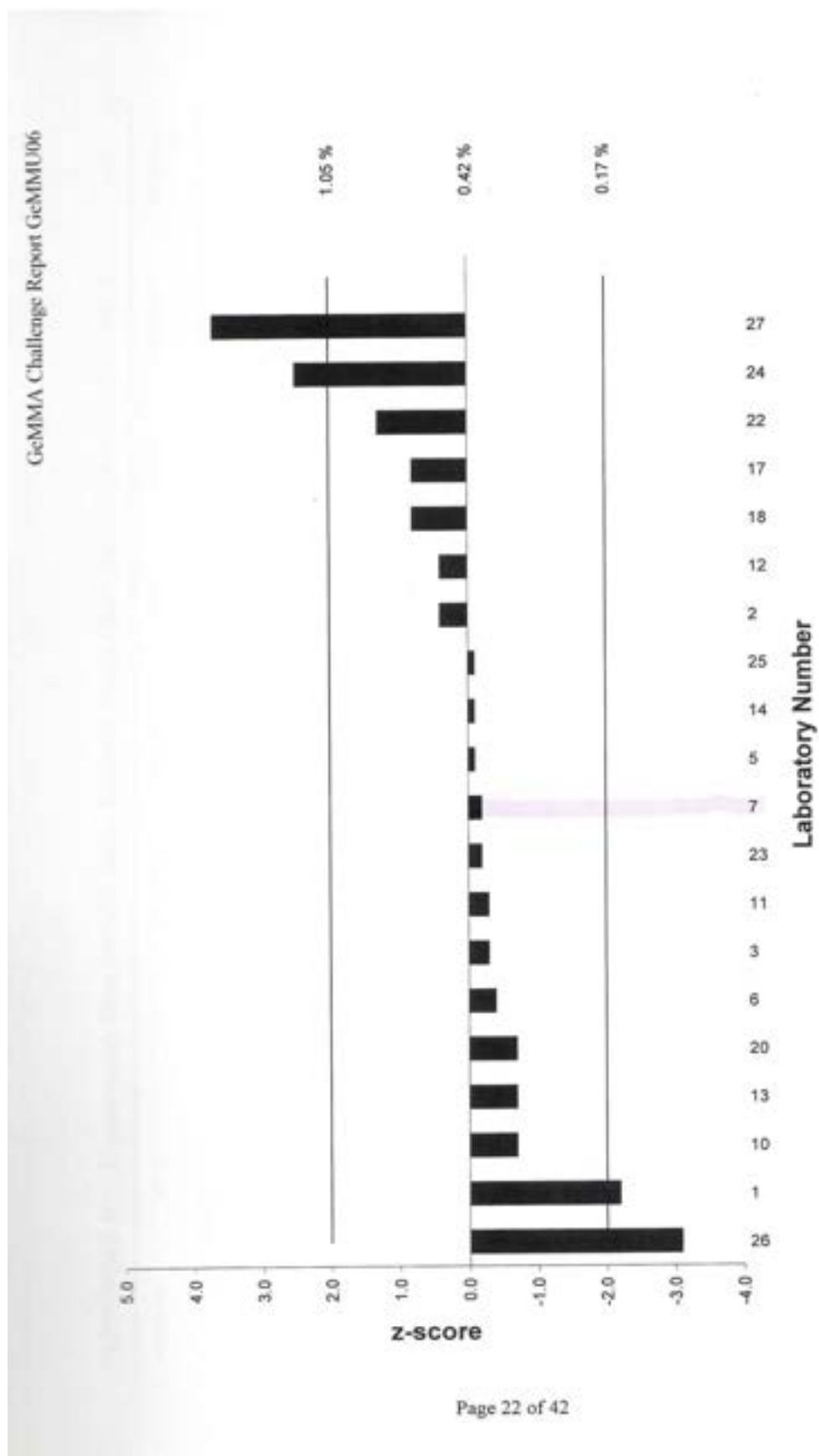


Figure 2: z-Scores for GA21 Maize (0.42 % w/w) in Maize Flour Test Material GeM MU06-C

Продовж. додатку И

GeMMA Report GeM SU02

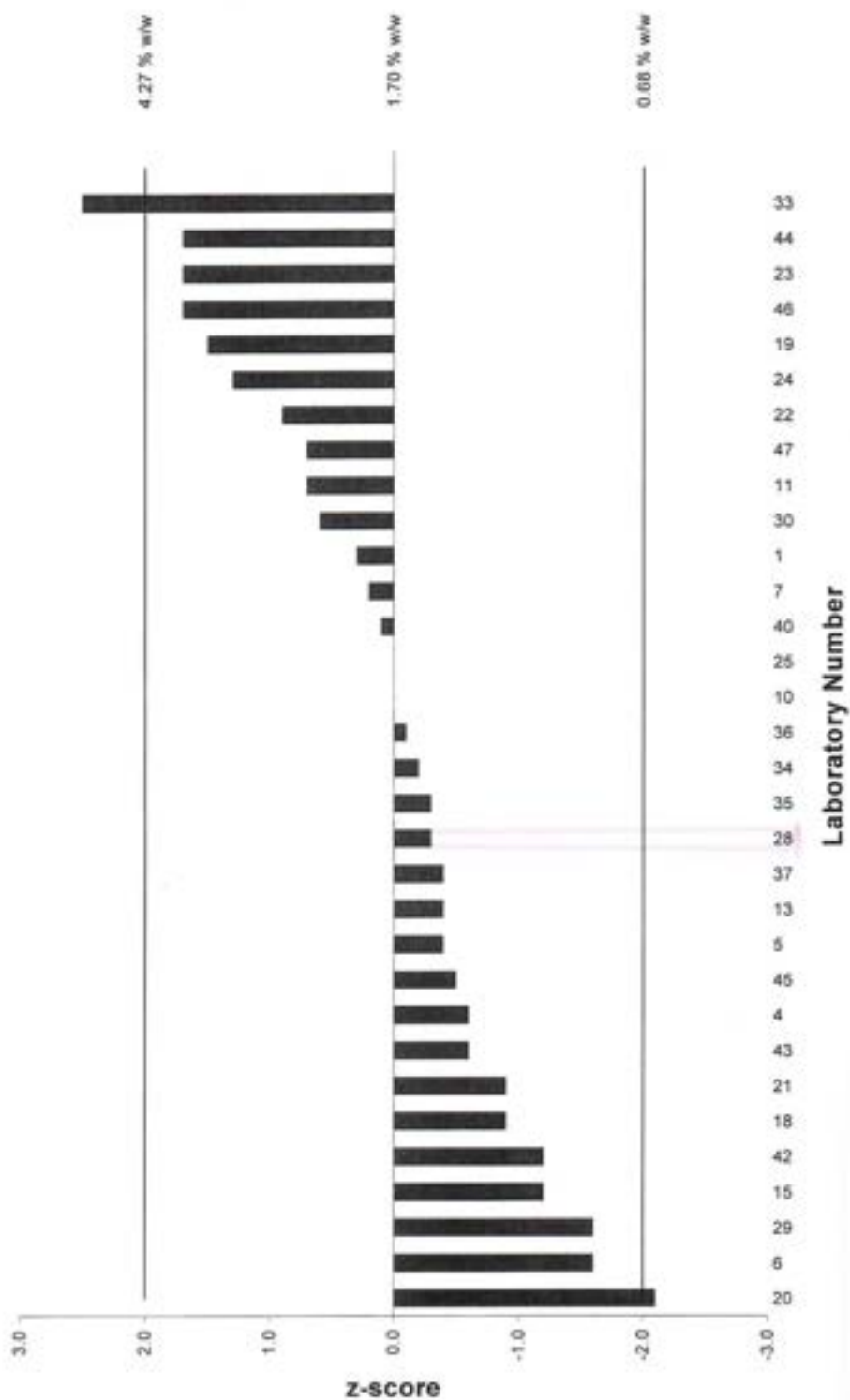


Figure 1: z-Scores for MON810 Maize (1.70 % w/w) in 100% Maize Flour Test Material GeM SU02-A

Додаток І



МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

Державне підприємство
Всеукраїнський державний науково-виробничий центр
стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів
(ДП «Укрметртестстандарт»)

03680, м. Київ-680, вул. Метрологічна, 4
тел.: 526 10 30, ел. пошта: ukresm@ukresm.kiev.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший заступник
генерального директора
ДП «Укрметртестстандарт»



ЗВІТ

ПРО ПРОВЕДЕННЯ МІЖЛАБОРАТОРНИХ ПОРІВНЯНЬ
РЕЗУЛЬТАТІВ ВИПРОБУВАНЬ ЗА ПРОГРАМОЮ «ХАРЧОВА
ПРОДУКЦІЯ ТА ПРОДОВОЛЬЧА СИРОВИНА. ГЕНЕТИЧНО
МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ»

Раунд № 01/11-ГМО



Київ 2011

Продовж. додатку І

Таблиця 1

Атестовані значення вмісту ДНК генетично модифікованої сої лінії GTS-40-3-2

Найменування зразка	*Зразки, що надані координатором	Одиниця вимірювань	Атестоване значення
Зразок сирового борошна	Без ГМО	%	Без ГМО
Зразок сирового борошна	не більше 1%	%	0,842 ± 0,031
Зразок сирового борошна	більше 3%	%	3,33 ± 0,26

*Зразкам, що надані координатором, присвоєні коди, що відомі та використані тільки координатором.

Склад консультативної групи координатора:

Глебов Андрій Борисович	заступник директора науково-виробничого інституту метрологічного забезпечення вимірювань складу, властивостей і кількості речовин і матеріалів ДП «Укрметртестстандарт», кандидат технічних наук.
Семенович Володимир Костянтинович	начальник науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт»
Манська Ольга Миколаївна	начальник науково-технічного відділу з атестації вимірювальних лабораторій ДП «Укрметртестстандарт».
Голубець Руслан Анатолійович	начальник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень, кандидат ветеринарних наук.
Облап Руслан Васильович	старший науковий співробітник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень, кандидат біологічних наук.
Малієнко Вадим Анатолійович	науковий співробітник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень, кандидат сільськогосподарських наук.
Севиринов Дмитро Олександрович	інженер науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень.
Кіщенко Володимир Анатолійович	начальник науково-методичної лабораторії хроматографічних досліджень, кандидат технічних наук.
Голубець Ольга Валеріївна	старший науковий співробітник науково-методичної лабораторії хроматографічних досліджень, кандидат сільськогосподарських наук.

РОЗДІЛ 1

ПРОГРАМА РАУНДУ МПР №01/11-ГМО

1.1 Основні етапи проведення програми раунду МІП №01/11-ГМО:

- розробка та затвердження програми раунду МПР №01/11-ГМО;
- розсилання запрошень та форм гарантійних листів-заявок;
- підготовка тестових зразків;
- дослідження однорідності та стабільності тестових зразків;
- приймання координатором гарантійних листів на участь у програмі раунду МПР №01/11-ГМО;



Продовж. додатку I



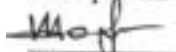
МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

Державне підприємство
«Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації,
метрології, сертифікації та захисту прав споживачів»
(ДП «Укрметртестстандарт»)

Адреса: Україна, 03680, м. Київ, вул. Метрологічна, 4
Тел.: (+38044) 526-20-03; факс: (+38044) 522-66-57; ел. пошта: ptdep@prodcert.org

УЗГОДЖЕНО:

Директор НВІ метрологічного
забезпечення вимірювань складу,
властивостей і кількості речовин і
матеріалів ДП «Укрметртестстандарт»

 М.С. Рожнов
«18» листопада 2013 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Генеральний директор
ДП «Укрметртестстандарт»

 Д.А. Сабатович
«18» листопада 2013 р.

ЗВІТ

ПРО ПРОВЕДЕННЯ МІЖЛАБОРАТОРНИХ ПОРІВНЯНЬ
РЕЗУЛЬТАТІВ ВИМІРЮВАНЬ ЗА ПРОГРАМОЮ
«ХАРЧОВА ПРОДУКЦІЯ ТА ПРОДОВОЛЬЧА СИРОВИНА.
ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ»
Раунд № 02/13-ГМО

Київ



Продовж. додатку І

Склад консультативної групи координатора:

Глєбов Андрій Борисович	заступник директора науково-виробничого інституту метрологічного забезпечення вимірювань складу, властивостей і кількості речовин і матеріалів ДП «Укрметртестстандарт», кандидат технічних наук.
Семенович Володимир Костянтинович	начальник Українського науково-методичного центру підтвердження відповідності та випробувань харчової продукції ДП «Укрметртестстандарт».
Волошинєць Віктор Григорович	начальник науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», кандидат хімічних наук.
Голубєць Руслан Анатолійович	начальник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт», кандидат ветеринарних наук
Облап Руслан Васильович	старший науковий співробітник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт», кандидат біологічних наук.
Малієнко Вадим Анатолійович	науковий співробітник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт», кандидат сільськогосподарських наук.



Продовж. додатку I


МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

Державне підприємство
«Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації,
метрології, сертифікації та захисту прав споживачів»
(ДП «Укрметртестстандарт»)

Адреса: вул. Метрологічна, 4, м. Київ, 03143, Україна
 Телефон: (+38044)-526-20-03; телефакс: (+38044)-522-66-57; ел. пошта: ptdep@prodcert.org

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший заступник
 генерального директора
 ДП «Укрметртестстандарт»

 В. Д. Ример
 14 12 2015 р.

ЗВІТ

ПРО ПРОВЕДЕННЯ МІЖЛАБОРАТОРНИХ ПОРІВНЯНЬ
РЕЗУЛЬТАТІВ ВИМІРЮВАНЬ ЗА ПРОГРАМОЮ
«ХАРЧОВА ПРОДУКЦІЯ ТА ПРОДОВОЛЬЧА СИРОВИНА.
ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ»
Раунд № 04/15-ГМО

Київ – 2015

Продовж. додатку І

Склад консультативної групи координатора:

Семенович Володимир Костянтинівич	начальник 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)
Голубець Руслан Анатолійович	начальник науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт», кандидат ветеринарних наук
Голубець Ольга Валеріївна	старший науковий співробітник, кандидат сільськогосподарських наук.
Облап Руслан Васильович	старший науковий співробітник, кандидат біологічних наук.
Маліснко Вадим Анатолійович	науковий співробітник, кандидат сільськогосподарських наук.

МІНЕКОНОМРОЗВИТКУ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «Укрметртестстандарт»)

вул. Метрологічна, 4, м. Київ, 03143, тел: (044) 526-52-29, факс: (044) 526-42-60, Код ЄДРПОУ 02568182
e-mail: ukrcsm@ukrcsm.kiev.ua, web: <http://www.ukrcsm.kiev.ua>

21.03.2017 № 17-32/63
На № _____

ДОВІДКА

про економічну ефективність одержану від виробництва діагностичних тест-систем для визначення ГМО в харчовій продукції та сільськогосподарській сировині рослинного походження

Розрахунок економічної ефективності створення
технології виробництва тест-системи

Вихідні дані:

Загальні капітальні вкладення в технологію та обладнання	195,0 тис. грн.
у тому числі в першому році реалізації проекту	170,3 тис. грн.
Витрати на виготовлення зразків	17,8 тис. грн.
Витрати на підготовку виробництва	33,2 тис. грн.
Дохід (прибуток від продажупродукції, виготовленої за новоютехнологією) за весь періодреалізації	2200,9 тис.грн.
Ставка дисконтування	0,14
Термін реалізації інноваційно-інвестиційного проекту	7 років
Середня ціна одиниці продукції вперіодіреалізаціїтехнології	3 764,20 грн.
Постійні витрати навиробництво продукції	1 129,26 грн.
Змінні витрати навиробництво одиниці продукції	2 258,52 грн.

15640

Таблиця. Чистий дисконтований дохід від використання нової технології виробництва тест-системи за роками її життєвого циклу

	Будівництво необхідних потужностей та освоєння технологій у виробництві		Використання технологій виробництва тест-системи до повної потужності виробництва					Усього
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Чистий грошовий потік	-170,3	6,0	48,7	-15,8	-9,2	105,7	298,0	
Кумулятивний грошовий потік	-170,3	-164,3	-115,6	-131,4	-140,6	34,9	332,9	
Чистий дисконтований дохід	-149,4	4,6	32,9	-9,3	-4,7	48,2	119,1	41,4

Індекс дохідності (рентабельності)
ІД = 16,8%

Тобто, рентабельність реалізації проекту становитиме 16,8 відсотків, а проект слід визначити прибутковим.
Період окупності інвестицій. Витрати на проект приблизно мають бути окупленими за шість років
T=5,9

Точка безбитковості проекту

Точка безбитковості знаходиться в межах 75 відсотків номінального обсягу виробництва, що підтверджує надійність проекту.

Генеральний директор

В. Рунда



Д.А. Сабатович

Додаток Й

ДКПП 20.1

УКНД 71.040.30



ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор
ТОВ "Біокор Текнолоджі ЛТД"
Саяутін О.І.
2019 р.

СЕРІЯ ТЕСТ-СИСТЕМ

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ (ГМО)
В ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ, ХАРЧОВІЙ СИРОВИНІ ТА КОРМАХ

Технічні умови

ТУ У 20.1-40719638-001:2019

(Вводяться вперше)

Дата надання чинності 01.11.2019 р.
Чинні до 01.11.2029 р.



РОЗРОБЛЕНО

Начальник виробництва
ТОВ "Біокор Текнолоджі ЛТД"
Облап Р.В.
"14" 10 2019 р.

Додаток К

Минэкономразвития Украины
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ ВСЕУКРАИНСКИЙ
 ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
 СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ, СЕРТИФИКАЦИИ И ЗАЩИТЫ ПРАВ
 ПОТРЕБИТЕЛЕЙ (ГП «Укрметрестестандарт»)**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель генерального
 директора ГП «Укрметрестестандарт» -
 директор УкрТЕСТ



В. І. Ример

**Методика выполнения измерений
 массовой доли глина и родственных проламинов
 в пищевых продуктах и продовольственном сырье
 методом иммуноферментного анализа после предварительного скрининга
 методом ПЦР в реальном времени**

МВИ 17/59-12

КИЕВ - 2012

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший заступник генерального директора
з підтвердження відповідності продукції,
послуг, систем якості та наукової діяльності,
директор УкрТЕСТ
ДП «Укрметртестстандарт»

«11» червня 2019 р. В.Д. Ример

АКТ

**впровадження результатів наукових досліджень
Облапа Руслана Васильовича**

- Назва впроваджуваного заходу:** Виробництво діагностичних тест-систем для визначення ГМО в харчовій продукції та сільськогосподарській сировині рослинного походження.
- Яким науково-дослідним закладом запропоновано до впровадження:** Державним підприємством Всеукраїнським державним науково-виробничим центром стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт»).
- Коли й ким прийнято рішення про впровадження:** Українським науково-методичним центром оцінки відповідності та випробувань харчових продуктів, виробів, що контактують з харчовими продуктами, іграшок, парфумерно-косметичної продукції та продукції побутової хімії (УкрПРОДТЕСТ). У 2011 р. з метою забезпечення вітчизняних лабораторій тест-системами з якісного та кількісного визначення ГМО.
- Коротка характеристика впроваджуваної розробки:** Вперше було розроблено та запроваджено у виробництво серію вітчизняних діагностичних тест-систем з визначення ГМО рослинного походження в харчових, фармакологічних і косметичних продуктах, сільськогосподарській сировині та кормах. Розроблена серія тест-систем базується на методі полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (Real-Time PCR). Розроблені тест-системи дозволяють проводити якісний та кількісний аналізи, ідентифікувати лінії біотехнологічних сільськогосподарських рослин та здійснювати видову ідентифікацію рослинних компонентів. Запропоновано до використання методологію щодо визначення ГМО у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині з врахуванням культур, що обробляються в Україні. Показано доцільність використання для якісного аналізу не тільки

Продовж. додатку Л

регуляторних елементів генно-інженерних конструктів, а також таких генів нової ознаки, як CP4 epsp, pat, bar. Тест-системи виконані у форматі мультиплексу, що значно скорочує час проведення аналізу та знижує його собівартість. Відпрацьовано універсальний протокол для всієї серії тест-систем загальною кількістю 58 найменувань. Вся серія тест-систем адаптована під прилади, якими оснащено випробувальні лабораторії країни.

У 2012 р. на тест-системи було розроблено та зареєстровано технічні умови ТУ У 24.6-02568182-001:2011 «Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах» та отримано патент на корисну модель №72083 «Тест-система для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) в харчових продуктах методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПІР-РЧ)». Розроблена серія тест-систем є сучасною, високочутливою, конкурентоспроможною і найголовніше - не поступається за своїми метрологічними характеристиками закордонним аналогам. Завдяки виробництву тест-систем, успішно виконується стратегічно важлива для України робота з контролю якості зернової продукції та продовольчої сировини рослинного походження, що надходить як на внутрішній ринок, так і експортується у країни ЄС, Близького та Середнього Сходу.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Тест-системи успішно використовуються акредитованими за ДСТУ ISO/IEC 17025 лабораторіями України різних систем підпорядкування.
6. **Рік і об'єм впровадження:** Впровадження результатів наукових досліджень здійснюється з 2012 року та охоплює близько тридцяти випробувальних лабораторій України.
7. **Економічний ефект впровадження:** Рентабельність реалізації впровадження становить 16,8 %, а проект слід визначити прибутковим. Витрати на проект приблизно мають бути окупленими за шість років ($T=5,9$). Точка беззбитковості проекту знаходиться в межах 75 % номінального обсягу виробництва, що підтверджує надійність проекту. Прибуток від продажу готової продукції за весь період реалізації склав 2 200,9 тис. грн.

Заступник начальника науково-дослідного
центру випробувань продукції

 Т. А. Шатаєва

Начальник УкрПРОДТЕСТ

 В. К. Семенович

Додаток М

Затверджую
Перший проректор
Білоцерківського національного
аграрного університету
В. П. Новак
2021 р.



АКТ

про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи в освітній процес

Даним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи Облапа Руслана Васильовича на тему «Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції», поданої на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика, використовуються в освітньому процесі на біолого-технологічному факультеті під час викладання дисциплін «Генетика з біометрією» та «Розведення сільськогосподарських тварин» (ОП «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», бакалаврський рівень вищої освіти) та агробіотехнологічному факультеті під час викладання дисциплін «Спеціальна генетика» та «Біотехнологія в рослинництві» (ОП «Агрономія», бакалаврський та магістерський рівні вищої освіти).

Декан біолого-технологічного факультету,
д-р с.-г. наук, професор

 С. В. Мерзлов

Декан агробіотехнологічного факультету,
канд. с.-г. наук, доцент

 В. С. Хахула

Список публікацій 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

(сільськогосподарські науки)

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

12. **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).

13. **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).*

14. **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).*

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

16. Плівачук О.П., Димань Т.М., **Облап Р.В.** Сиропридатність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капаказеїну, 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).*

17. **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).*

18. **Облап Р.**, Новак Н., Димань Т. Дослідження меду на вміст пилку з генетично модифікованих рослин методом ПЛР у реальному часі інгредієнтів. *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).

19. **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).

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

Публікації у наукових фахових виданнях України (біологічні науки)

21. 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).

22. 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)

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 дослідження, 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 міжлабораторних 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).*

Додатково відображають наукові результати дисертації

31. 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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

32. 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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

33. Мельничук М.Д., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції в тваринництві. Методичний посібник. К.: НУБІПУ, 2009. 127 с. *(Здобувачем викладено частину основного змісту).*

34. **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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

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

36. 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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

37. 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. *(Здобувачем викладено частину основного змісту).*

38. **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. *(Здобувачем здійснено збір інформації, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

Наукові праці апробаційного характеру

39. 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. *(Здобувачем викладено частину основного змісту).*

40. **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. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

41. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

42. **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. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

43. 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. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

44. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

45. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Т.Н.Дымань, 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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

46. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

47. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

48. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

49. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

50. **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'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського

(ТМУ). Ялта, Україна, 2013. С. 403. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

51. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

52. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

53. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Малієнко 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

54. **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 сільськогосподарській сировині рослинного походження. *Якість і безпека харчових продуктів*: міжнародна науково-технічна конференція. Київ, Україна, 2013. С. 75–76. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

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

157. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

56. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

57. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

58. **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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

59. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

60. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

61. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

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

63. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

64. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

65. **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. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).

66. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

67. 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. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладено частину основного змісту).*

68. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

69. **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 науково-практична конференція.* Київ, Україна, 2017. С. 117–118. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

70. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

71. **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. *(Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

72. **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. (Здобувачем здійснено дослідження, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

**Патенти на корисну модель, які безпосередньо стосуються
наукових результатів дисертації**

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.