

С. Ю. Похилько¹, А. І. Степаненко², Л. Б. Орябінська¹,
О. Я. Карпенко³, О. М. Дуган¹, Б. В. Моргун²

¹Національний технічний університет України “Київський політехнічний інститут”,
кафедра промислової біотехнології

²Інститут клітинної біології та генної інженерії НАНУ

³Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

ДЕТЕКЦІЯ ТРАНСГЕННОЇ СОЇ У ВІТЧИЗНЯНИХ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ ТА СОРТОЗРАЗКАХ, ЯКІ ВИРОЩУЮТЬСЯ В УКРАЇНІ

© Похилько С. Ю., Степаненко А. І., Орябінська Л. Б., Карпенко О. Я., Дуган О. М., Моргун Б. В., 2014

Метою роботи було виявлення трансгенної сої в продуктах харчування та зерні, що вирощується в Україні. Розроблені тести будуть корисними для контролю розповсюдження ГМ сої серед сортового матеріалу нашої країни та дозволять закласти основи системи власного контролю за імпортованим та вітчизняним насіннєвим матеріалом і продуктами харчування з вмістом ГМ компонентів.

Ключові слова: ГМО, соя, харчові продукти, ПЛР, трансформаційна подія GTS 40-3-2.

The aim of the current work was to detect transgenic soybean in food products and plants grown in Ukraine. Tests developed by us are useful to control the proliferation of GM soybeans among high-quality material and will allow our country to lay the foundations of their own control of imported and domestic seed and food products containing GM ingredients.

Key words: GMO, soybeans, food, PCR, transformation event GTS 40-3-2.

Вступ. Соя (*Glycine max* Moench) – однорічна трав'яниста культурна рослина родини бобових, одна з найдавніших їстівних культур. В якості сидерата соя спільно з симбіонтами азотфіксуючими бактеріями засвоює атмосферний азот і робить його доступним для рослин. Виробництво сої являє собою важливу складову світової економіки: на 2012 рік з її урожаєм у продовольчі ресурси надійшло 100 млн. т соєвого білка, вироблено 43 млн. т соєвої олії, 183 млн. т соєвого шроту. За рахунок неї у світову економіку надійшло більше ніж \$128 млрд. на рік [4].

Україна входить в десятку країн світу за виробництвом сої і посідає перше місце в Європі. За п'ять років з 2008 р. по 2012 р. посівні площі сої зросли в 2,6 рази і сьогодні становлять 1412400 га [9]. За прогнозами, до 2017 року посіви збільшаться до 2 млн га.

Економічна сутність великого попиту на сою полягає в тому, що вона за один вегетаційний період генерує два урожаї білка і жиру (з 1 т сої одержують 700 кг соєвого шроту, який містить 44–48 % білка, і 190 кг соєвої олії). За рахунок реалізації соєвої олії практично окупаються прямі витрати на вирощування сої, а соєвий шрот залишається найдешевшим білковим кормовим інгредієнтом [4].

В світі сьогодні зареєстровано 27 ліній трансгенної сої, серед них 23 лінії модифіковані на стійкість до гербіцидів і 24 лінії використовуються в якості продуктів харчування або добавок до

них [10]. Трансформаційна подія GTS 40-3-2 єдина трансгенна лінія сої, що дозволена до продажу в Європейському Союзі (Рішення Комісії 96/281/ЕС від 3 квітня 1996 р.) [5].

Трансгенна соя лінії GTS 40-3-2 (Roundup Ready[®]) розроблена фірмою Monsanto Canada Inc. у 1996 році для використання гліфосату в якості альтернативної системи боротьби з бур'янами під час її промислового вирощування. Створення лінії GTS 40-3-2 засновано на технології рекомбінантних ДНК, яка полягала у введенні гена толерантності до гліфосату ферменту 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтази (EPSPS), виділеного зі штаму CP4 *Agrobacterium tumefaciens* [3].

Поява на ринку генетично модифікованих (ГМ) сортів рослин спричинила необхідність контролю за якісним та кількісним вмістом ГМ інгредієнтів у продуктах харчування та на полях України. З моменту підписання Картахенського протоколу з біобезпеки (11 вересня 2003 р.) наша країна мала б забезпечити повне виконання його вимог щодо маркування ГМ продуктів [2]. Країни ЄС, Росія та Україна вже прийняли закони, якими зобов'язали виробників продуктів харчування надавати інформацію про наявність генетично модифікованих організмів (ГМО) безпосередньо на упаковках та етикетках. Згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 985 від 1 серпня 2007 року ввезення та реалізація харчових продуктів в Україні, що містять генетично модифіковані організми та/або мікроорганізми в кількості більше ніж 0,9 відсотка, здійснюються за наявності відповідного маркування із зазначенням якісного складу таких продуктів. Відповідно до цього, у нашій державі повинна бути створена дієва система контролю обігу продуктів, що містять ГМ компоненти та розроблені відповідні методики якісної та кількісної оцінки їх вмісту [6].

Найпоширенішими нині методами якісного і кількісного аналізу ГМ компонентів є такі, що базуються на аналізі нуклеїнових кислот, насамперед – метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). З одного боку, це обумовлено чутливістю методу ПЛР, оскільки для аналізу потрібна зовсім незначна кількість вихідного матеріалу, а з іншого, тим, що молекула ДНК є достатньо стійкою до впливу різних факторів, тому її можна аналізувати як у сирому рослинному матеріалі, так і в харчових продуктах, які містять інгредієнти, отримані з ГМ рослин [1].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано у відповідності до фундаментальної теми відділу “Молекулярної генетики” Інституту клітинної біології та генної інженерії НАНУ та являє собою фрагмент теми: “Вивчення молекулярно генетичних особливостей генетично модифікованих культурних рослин та встановлення закономірностей функціонування трансгенів” (№ державний реєстраційний номер 0113U003100).

Мета роботи. Розроблення полімеразних ланцюгових реакцій для детекції трансгенної сої у харчових продуктах вітчизняного виробництва та рослинному матеріалі, що вирощується на території України;

- створення мультиплексної ПЛР для одночасного визначення додавання сої у харчові продукти та перевірка цих соєвих добавок на наявність трансформаційної події GTS 40-3-2;
- тестування харчових продуктів та сортозразків рослин сої, зібраних в Україні на присутність чужорідних генетичних послідовностей.

Матеріали та методи дослідження. Матеріалами дослідження були зразки насінневого матеріалу, зеленої маси сої та продуктів її переробки отримані з торговельної мережі в об'ємі 33 зразків. Дослідні роботи проводилися на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Зразки харчових продуктів: Ковбаса молочна “Дитяча”, ковбаса молочна “Теляча”, сосиски з сиром “Укрпромпостач” 95, молочні сосиски “Укрпромпостач” 95, молочні сосиски “Премія”,

сосиски першого сорту “Вінницькі”, сардельки “Хутірські”, сосиски молочні, сосиски “М’ясна Гільдія”, сосиски “Колобок”, сосиски з гірчицею, сосиски “Вкусняшка”, Карпатські сосиски, Сосиски “Антошка”, сосиски дитячі, сосиски Молочні варені, Сарделька, Ратибор “Прем’єра”, Ятрань Кіровоградські сосиски зі смачною скоринкою, Ятрань сосиски “Тигрик”, Фарш соєвий, Харчова добавка, ковбаса. Зразки зернової сої та зеленої маси були зібрані у Черкаській, Кіровоградській та Київській областях.

Загальна ДНК зразків була виділена за допомогою ЦТАБ методу [8], який був додатково оптимізований спеціально для харчових продуктів. Визначення чистоти та кількості ДНК проводили спектрофотометричним вимірюванням оптичної густини на фотометрі ВіоPhotometer (Eppendorf) v.1.35 за довжинами хвиль 230, 260, 280 нм. Згідно з отриманими значеннями готували розведення загальної ДНК до 30 нг/мкл для усіх зразків.

Для постановки полімеразно ланцюгової реакції готували реакційну суміш, склад якої наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Перелік компонентів суміші для полімеразної ланцюгової реакції та їхня кількість для однієї реакції

Назва реактиву	Функція в реакції	Об’єм, мкл
Milli-Q water	Деіонізована вода	13,85
10× Green DreamTaq	Буфер	2,0
2 мМ дНТФ	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів	2,0
10 мкМ F1 (залежно від гена)	Форвардний праймер	0,5
10 мкМ R1 (залежно від гена)	Реверсний праймер	0,5
5 од./мкл DreamTaq polymerase	Термостабільна полімераза	0,1
ДНК 30 нг/мкл	Матриця	1,0

Послідовності праймерів для визначення гена лектину, трансформаційної події GTS 40-3-2 та *nos*-термінатора були обрані з баз даних [11, 12].

Умови полімеразної ланцюгової реакції на ген лектину сої *lec* були такими: денатурація 94 °С – 4 хв, потім 34 цикли 94 °С – денатурація 30 с, 58 °С – відпал 30 с, 72 °С – елонгація 16 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв.

Умови полімеразної ланцюгової реакції на *nos* термінатор: денатурація 94 °С – 4 хв, потім 34 цикли 94 °С – денатурація 30 с, 62 °С – відпал 30 с, 72 °С – елонгація 11 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв.

Умови ПЛР для визначення трансформаційної події GTS 40-3-2 склалися з денатурації 94 °С – 4 хв, потім 34 цикли 94 °С – денатурація 30 с, 53 °С – відпал 30 с, 72 °С – елонгація 20 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв.

Умови мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції на ген лектину сої *lec* та трансформаційну подію GTS 40-3-2 були: денатурація 94 °С – 4 хв, 5 циклів 94 °С – денатурація 30 с, 58(-1) °С – відпал 30 с, 72 °С – елонгація 20 с, потім 29 циклів 94 °С – денатурація 30 с, 53 °С – відпал 30 с, 72 °С – елонгація 1 хв 20 с, завершальна елонгація 72 °С – 5 хв.

Розділяли продукти ампліфікації методом горизонтального електрофорезу у 1,2 % агарозному гелі з концентрацію 0,5 мкг/мл бромистим етидієм у натрій боратному буфері [7] з подальшою ідентифікацією результатів під ультрафіолетовим випромінюванням та документуванням.

Результати та їх обговорення. Виділена загальна ДНК харчових продуктів та зернової сої була перевірена на вміст референтного гена лектину *lec* сої (GenBank accession number AJ010265). Електрофореграма результатів типової ампліфікації наведена на рис. 1.

Спостерігали очікуваний амплікон довжиною 210 пар нуклеотидів (п.н.) (доріжки 1 та 4, рис. 1) у 20 зразках харчових продуктів та в усіх сортозразках сої, що вказує на наявність в них гена лектину, який характерний для виду *Glycine max* Moench. Відповідно згадані харчові продукти (табл. 2) містили харчові добавки соєвого зерна. Сигнал для гена лектину був суворо видоспецифічним і був перевірений додатковим аналізом інших видів та родів бобових, зокрема квасолі, сочевиці, бобів та гороху.

Важливим етапом визначення ГМ матеріалу є проведення ПЛР на регуляторні та кодуючі послідовності конструкцій, які використовуються для трансформації рослин (наприклад, термінаторні та промоторні послідовності). У роботі здійснювалося специфічне виявлення *nos*-термінатору (GenBank accession number AY578916), який присутній у трансформаційному векторі, за допомогою якого була отримана подія GTS 40-3-2. Результат полімеразної ланцюгової реакції представлено на електрофореграмі 1,2 % агарозного гелю (рис. 2).

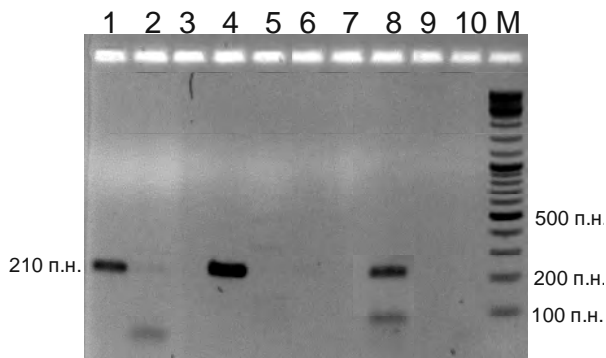


Рис. 1. Електрофореграма результатів ПЛР на референтний ген *lec* сої.

1–7 – дослідні зразки; 8 – позитивний контроль; 9–10 – негативні контроли;

M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix, Thermo Scientific

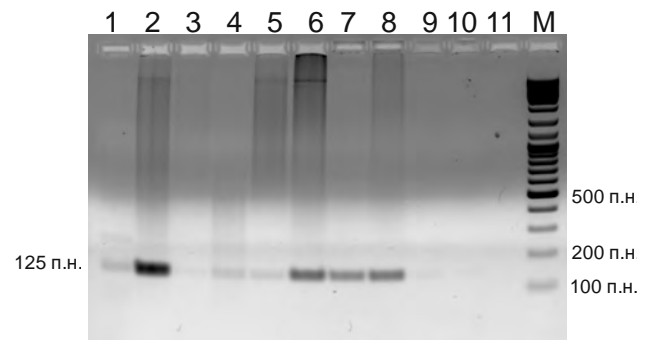


Рис. 2. Електрофореграма результатів ПЛР на *nos*-термінатор.

1–7 – дослідні зразки; 8 – позитивний контроль; 9–11 – негативні контроли;

M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix, Thermo Scientific

Спостерігали очікуваний амплікон довжиною 125 п.н. (доріжки 2, 6 і 7 рис. 2) для 18 зразків харчових продуктів та 2 зразків зернової сої, що свідчить про наявність в їх складі чужорідких генетичних послідовностей (табл. 2).

Визначення трансформаційної події GTS 40-3-2 базувалося на специфічних праймерах до регіону, який включає в себе рослинну ДНК та ділянку Т-ДНК трансформуючого вектора. Цей підхід дозволяє виявити окремі трансформаційні події, які, як відомо, є унікальними. Типові результати ПЛР наведені на електрофореграмі 1,2 % агарозного гелю (рис. 3).

Очікуваний амплікон довжиною 161 п.н. спостерігали для 4-х зразків зернової сої (доріжках 2, 5 та 6 рис. 3), що свідчить про наявність трансформаційної події GTS 40-3-2. Тобто можна стверджувати, що ця соя є трансгенною. Разом з тим ця подія не була ідентифікована у жодному зразку харчових продуктів. Результати виявлення трансформаційної події GTS 40-3-2 для харчових продуктів не завжди відповідають аналізу на присутність *nos*-термінатора. Це можна пояснити значним поширенням цього термінатора у різних конструкціях, які використовувалися для

трансформації цілого ряду рослин. Отже, наявність *nos*-термінатору у зразках, які показали відсутність події GTS 40-3-2, може свідчити про наявність інших ГМ рослин у їх складі або іншої трансформаційної події сої.

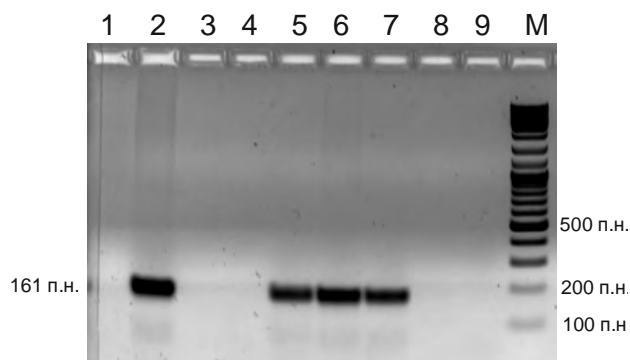


Рис. 3. Електрофореграма результатів ПЛР на визначення трансформаційної події GTS 40-3-2. 1–6 – дослідні зразки; 7 – позитивний контроль; 8–9 – негативні контроли; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix, Thermo Scientific

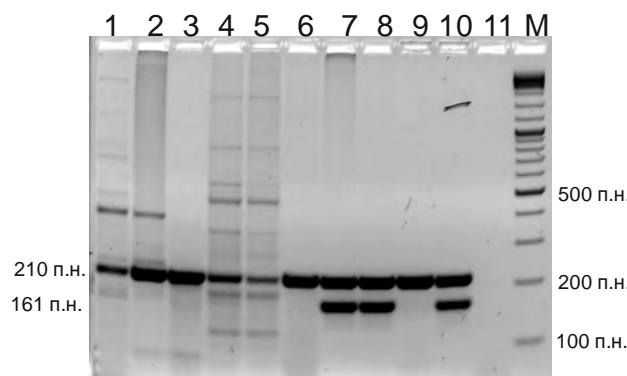


Рис. 4. Електрофореграма мультиплексної ПЛР на ген лектину і трансформаційну подію GTS 40-3-2. 1-9 – дослідні зразки; 10 – позитивний контроль; 11 – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix, Thermo Scientific

Для оптимізації аналізу зразків харчових продуктів було розроблено мультиплексну ПЛР, що дозволяє одночасно провести ампліфікацію референтного гена *Iec* та трансформаційну подію GTS 40-3-2. Результати типової ПЛР наведені на рис. 4.

На цій електрофореграмі зразки на доріжках 7, 8 та 10 дали позитивну реакцію на ген лектину і подію GTS 40-3-2, що підтверджується результатами окремих ПЛР на дані гені. В інших треках присутні лише амплікони характерні для гена лектину. Для зразків зернової сої практично не спостерігали мінорних продуктів реакції, але для харчових продуктів ідентифікували певні нецільові амплікони слабкішої інтенсивності. Це вказує на неспецифічну реакцію цих праймерів з іншим рослинними та тваринними ДНК, що присутні у комплексних харчових продуктах. Отже, за допомогою мультиплексної ПЛР на ген лектину і трансформаційну подію GTS 40-3-2 можна проводити виявлення як звичайної, та і генетично модифікованої сої, яка містить цю трансформаційну подію.

Узагальнені підсумкові результати за зібраними зразками і реакціями наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Результати аналізу зразків харчових продуктів та зернового матеріалу сої на наявність гетерологічних послідовностей

№	Назва продукту, з якого виділена ДНК	Наявність гена лектину	Наявність сої лінії GTS 40-3-2	<i>nos</i> -термінатор
1	2	3	4	5
1	Ковбаса молочна “Дитяча”	+	-	-
2	Ковбаса молочна “Теляча”	+	-	+
3	Сосиски з сиром “Укрпромпочтач” 95	+	-	+
4	Молочні сосиски “Укрпромпочтач” 95	+	-	-
5	Молочні сосиски “Премія”	-	-	-
6	Сосиски першого сорту “Вінницькі”	-	-	-

1	2	3	4	5
7	Сардельки “Хутірські”	+	-	-
8	Сосиски молочні	+	-	-
9	Сосиски “Мясна Гільдія”	+	-	-
10	Сосиски “Колобок”	+	-	+
11	Сосиски з гірчицею	+	-	-
12	Сосиски “Вкусняшка”	-	-	+
13	Карпатські сосиски	-	-	+
14	Сосиски “Антошка”	-	-	+
15	Сосиски дитячі	+	-	+
16	Сосиски Молочні Варені	+	-	+
17	Сарделька	-	-	+
18	Соя, зерно 1, Черкаська обл.	+	+	+
19	Соя, зерно 2, Черкаська обл.	+	+	+
20	Ратибор “Прем’єра”	-	-	+
21	Кіровоградські сосиски зі смачною скоринкою	+	-	+
22	Сосиски “Тигрик”	-	-	+
23	Фарш соєвий	+	-	+
24	Харчова добавка	+	-	+
25	Ковбаса	-	-	-
26	Квасоля	-	н.в.	н.в.
27	Чечевиця	-	н.в.	н.в.
28	Горох	-	н.в.	н.в.
29	Боби	-	н.в.	н.в.
30	Соя м. Богуслав	+	+	+
31	Соя № 2	+	-	-
32	Соя нетрансгенна, контроль	+	-	-
33	Соя Кіровоградська обл.	+	+	+

Примітки: “+” – наявність гена; “-” – відсутність; н.в. – дослідження не проводилися.

Висновки. У результаті проведених досліджень з 33 опрацьованих зразків 20 містили у своєму складі ген лектину, специфічний для сої (продукти марки “Премія”, “М’ясна гільдія”, “Ятрань”, “Укрпромпочтач” 95, “Луганські делікатеси”, “Маршалок” і т.д.), що відповідно вказує на присутність добавок в них сої. З 25 зразків лише чотири дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, яку не спостерігали у зразках харчових продуктів, проте серед зразків сої вона була наявна в зерні з Київської, Черкаської та Кіровоградської областей. Цей факт є прямим свідченням того, що на території цих областей вирощується трансгенна (ГМО) соя. У 18 зразках, серед яких присутні харчові продукти та сортозразки сої, був виявлений *nos*-термінатор. Проте для харчових продуктів не можна однозначно стверджувати про наявність у зразках саме ГМ сої. Для підтвердження наявності ГМ матеріалу інших рослин у їх складі харчових продуктів або інших трансформаційних подій сої потрібні додаткові молекулярно-генетичні дослідження.

Отримані дані свідчать про наявність та очевидно вирощування трансгенного матеріалу сої на території України. У харчових продуктах ГМ сої не виявлено, проте наявність *nos*-термінатору може свідчити про присутність трансгенного матеріалу інших культур у вітчизняних харчових продуктах. Розроблені тести будуть корисними для контролю розповсюдження ГМ сої серед сортового матеріалу нашої країни та дозволять закласти основи системи власного контролю за

імпортованим та вітчизняним насіннєвим матеріалом і продуктами харчування з вмістом ГМ компонентів.

Перспективи досліджень за цим напрямом можуть бути спрямовані на подальші виявлення генетично модифікованих культур у харчових продуктах (наприклад, кукурудзи, пшениці, ячменю тощо). Це дасть можливість точніше контролювати виробників під час виготовлення харчових продуктів, а як наслідок, отримання розгорнутішого складу продуктів, які ми вживаємо.

1. *Впровадження методів оцінки наявності та вмісту генетично модифікованих компонентів у продуктах харчування, кормах і парфумерно-косметичних виробках*/[Я. Б. Блюм, М. О. Банникова, П. А. Карпов та ін.]. – *Наука та інновація*, 2008. – Т4. – № 2. – С. 40–48.
2. *Картахенський протокол про біобезпеку до Конвенції про біологічне різноманіття від 11 вересня 2003 року*. Режим доступу: http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/995_935.
3. *Кверчи М., Маццара М. Анализ образцов пищевых продуктов на пресудствие генетическимодифицированных организмов Сессия 7 – Характеристика сои Roundup Ready кукурузы Вt-176*// *Всемирная Организация Здравоохранения Европейское Региональное Бюро* – 2006. – 21 с.
4. *Побережний М. А. Розміщення посівів сої в Україні* // *Аграрний тиждень Україна*. – 2013. – № 4 (259). – С. 30–31.
5. *Рішення комісії про виведення на ринок генетично модифікованої сої (Glycine max L.) з підвищеною стійкістю до гербіциду гліфосату відповідно до Директиви Ради 90/220/ЄЕС від 3 квітня 1996 р.* – Режим доступу: <http://www.minjust.gov.ua/45875>.
6. *Якісний та кількісний аналіз чужурідного генетичного матеріалу у рослинній сировині та продуктах харчування за допомогою методу полімеразно ланцюгової реакції: метод.рек./Ін-т клітинної біології та генної інженерії НАН України, Держ установа "Ін-т харчової біотехнології геноміки НАН України"*/[Я. Б. Блюм та ін.]. – К., 2008. – 100 с.
7. *Brody, J.R., Kern, S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis* // *Anal. Biochem.* – 2004. – V.333. – P. 1–13.
8. *Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*// *Nucleic Acids Res.* – 1980. – Vol. 8(19). – pp. 4321–4325.
9. <http://faostat.fao.org/> – *Food and Agriculture Organization of the United National.*
10. <http://www.isaaa.org/> – *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech applications.*
11. <http://gmdd.shgmo.org/> – *GMO Detection Method Database.*
12. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/> – *European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed.*