

УДК 577.2:575:57.08:658.562

**ДОСЛІДЖЕННЯ МЕДУ НА ВМІСТ ПИЛКУ З ГЕНЕТИЧНО  
МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН МЕТОДОМ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ**

**Р. В. ОБЛАП**, кандидат біологічних наук

**Н. Б. НОВАК**, кандидат сільськогосподарських наук

*ДП Укрметртестстандарт (м. Київ)*

**Т. М. ДИМАНЬ**, доктор сільськогосподарських наук, професор

*Білоцерківський національний аграрний університет*

*E-mails: roblap@hotmail.com; n.b.novak@ukr.net*

**Анотація.** Відпрацьовано методику виділення ДНК із пилку меду та її дослідження на наявність послідовностей генно-інженерних конструктів, притаманних біотехнологічним культурам. За використання методу ПЛР у режимі реального часу проведено моніторинг зразків меду вітчизняного виробництва щодо контамінації пилком генетично модифікованих рослин, зокрема біотехнологічного ріпаку. Під час проведених досліджень виявлено зразки меду, що містили пилки біотехнологічного ріпаку Roundup Ready™. Отримані результати свідчать про доцільність і необхідність проведення більш жорсткого контролю харчової продукції та сільськогосподарської сировини щодо вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО).

**Ключові слова:** генетично модифіковані організми, біотехнологічний ріпак, ДНК, квітковий пилко або пилко меду, полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу.

**Актуальність.** Мед як цінний харчовий продукт та ефективний лікувальний засіб широко використовують у харчовій і фармацевтичній галузях промисловості. Однак більшість країн світу не може забезпечити внутрішнє споживання меду власним виробництвом унаслідок обмеженого потенціалу медозбору. Крім того, у світі відчувається дефіцит натуральних підсолоджувачів (цукри, кукурудзяний сироп, мед) на рівні 8–12 млн т на рік. У зв'язку з цим попит на мед та інші продукти бджільництва у розвинутих країнах перевищує пропозицію. До головних імпортерів меду належать США, Німеччина і Японія, які щорічно закуповують в інших країнах до 250 тис. т меду. Країни-члени ЄС у сукупності імпортують 140–150 тис. т [1].

За даними FAO (продовольча та сільськогосподарська організація ООН), Україна посідає сьому позицію серед світових виробників меду, а також є другим (після Китаю) найбільшим експортером меду до країн ЄС. Зокрема, у 2016 р. частка України становила приблизно 19 % у загальному постачанні меду до ЄС. Упродовж останніх п'яти років обсяги експорту меду зросли більш ніж у чотири рази [2]. Однак для подальшого збільшення експортного потенціалу країни в галузі бджільництва необхідно забезпечити належний рівень безпеки та якості продукції відповідно до

світових вимог. Сьогодні в Україні не діють жодні обов'язкові вимоги до якості меду, а чинний ДСТУ 4497:2005 має суто інформативний характер. У рамках угоди про асоціацію Україна взяла на себе зобов'язання запровадити європейські вимоги до меду, які зафіксовано в Директиві Ради 2001/110/ЄС до кінця 2019 р. [3].

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Одним із критеріїв оцінювання безпеки та якості меду є наявність генетично-модифікованих інгредієнтів. Упродовж останніх 20 років у світі спостерігають стійке зростання посівних площ, відведених під біотехнологічні культури. Так, у 2016 році вони займали вже 185,1 млн гектарів, що становить 10 % придатної орної землі, та вирощувались у 26 країнах світу. За розмірами посівних площ до найбільш поширених біотехнологічних культур належать соя (91,3 млн га, або 78 % від загальних посівів сої в усьому світі), бавовник (22,4 млн га, 64 %), кукурудза (48,1 млн га, 26 %) та ріпак (8,6 млн га, 24 %) [4]. Крім того, сьогодні ведуть розробки з отримання генетично модифікованих (ГМ) дерев. Уже зареєстровано три лінії трансгенної яблуні, сливу, дві лінії тополі та евкаліпт [5]. Незважаючи на очевидні переваги, продукти біотехнології, зокрема ГМО, виправдано викликають у широких наукових колах гостру дискусію про їхню можливу дію на здоров'я людини та навколишнє середовище. З огляду на це в багатьох країнах світу здійснюють державне регулювання використання ГМО та маркування продукції, яку вироблено із сировини біотехнологічного походження [6].

У країнах ЄС, де споживачі традиційно пред'являють підвищені вимоги до безпеки та якості харчової продукції, дуже стримано ставляться до ГМО. Так, у вересні 2011 р. Верховний Суд ЄС своєю постановою С-442/09 заборонив збут у ЄС меду без проведення попереднього аналізу на вміст ГМО пилку та відповідного маркування готової продукції [7]. У 2012 р. Інститут здоров'я і захисту споживачів (Health and Consumer Protection, IHCP) Об'єднаного наукового центру Європейського Союзу (Joint Research Centre, JRC) опублікував рекомендації щодо аналізу ДНК ГМ пилку з меду [8].

Метою роботи було відпрацювання методичного підходу для проведення аналізу меду на наявність пилку з ГМ рослин.

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

Матеріалом для виділення тотальної ДНК слугували зразки меду з різних регіонів України. Всього було досліджено п'ятнадцять зразків, які було відібрано у Вінницькій, Київській, Одеській, Полтавській та Черкаській областях. ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації з власними модифікаціями. Концентрацію виділеної нуклеїнової кислоти та її чистоту за співвідношеннями A260/A280 та A260/A230 визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer AG 22331» (Eppendorf, Німеччина) [9].

ПЛР у режимі реального часу (технологія *TaqMan*) проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США) [9]. Реакційна суміш містила 100–500 нг ДНК, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ дНТФ суміші, 20 пкМ кожного з праймерів, 10 пкМ зонду та 1 од. Taq-полімерази (Thermo Scientific™, Литва). Олігонуклеотидні зонди були мічені флуоресцентними барвниками FAM, JOE, ROX, Cy5 та гасниками флуоресценції BHQ1 і BHQ2. Температурний режим включав початкову денатурацію впродовж 3 хв за 95 °С та наступні 45 циклів: денатурації – 15 с за 95 °С, випалювання праймерів і синтез – 40 с за 60 або 65 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювали по завершенню стадії випалювання праймерів та синтезу у кожному циклі ампліфікації.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У зв'язку з постійним зростанням посівних площ, відведених під біотехнологічні культури, та жорстким контролем за обігом ГМО в багатьох країнах світу, розроблення та запровадження нових підходів щодо визначення наявності ГМ рослин у сільськогосподарській сировині та харчових продуктах рослинного походження набуває великого значення. Нині існує два основні підходи для визначення наявності трансгенних рослин у харчовій продукції та продовольчій сировині. У першому випадку застосовують метод ПЛР-аналізу, який уможливує виявлення фрагментів ДНК нововведеного гена або елементів генно-інженерних конструктів. Другий підхід базується на визначенні самого продукту введеного гена – трансгенного білка, за допомогою імунологічних методів аналізу, зокрема ІФА. Кожен з підходів має свої сильні та слабкі сторони [10].

У своїх дослідженнях ми зупинилися на одній із численних модифікацій методу ПЛР, зокрема ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ). Останнім часом більшість випробувальних лабораторій світу використовує у своїй практиці *TaqMan*-технологію методу ПЛР-РЧ. Це пов'язано передусім з її високою чутливістю та специфічністю, невеликою тривалістю аналізу, можливістю досліджувати зразки ДНК, які зазнали значних пошкоджень, а також зменшенням ризиків виникнення хибно-позитивних результатів.

Важливим етапом розроблення методів визначення ГМО на основі ПЛР-аналізу є оптимізація процедури екстракції ДНК. Якість виділеної ДНК значною мірою впливає на кінцевий результат аналізу. Цей аспект є особливо важливим, оскільки більшість харчової продукції є багатокомпонентними сумішами, до складу яких входять речовини, здатні інгібувати роботу *Taq*-полімерази, отже перебіг самої реакції. Крім того, готові до споживання харчові продукти зазвичай піддаються термічній обробці, що значною мірою впливає на цілісність фрагментів ДНК. Іншим не менш важливим аспектом є підбір самої методики виділення ДНК. Існує низка дуже складних матриць із високим умістом жирів, білків та полісахаридів, що вимагає коректного застосування лізуючого реагента та подальшого ретельного доочищення молекул НК.

До однієї з таких складних матриць належить мед. По-перше, він містить багато цукрів (80 %) та ди- і полісахаридів (до 10 %), залишки яких

негативно впливають на перебіг ПЛР. По-друге, мед характеризується дуже низьким виходом ДНК. Це передусім пов'язано з тим, що основна кількість ДНК локалізована у пилку, а його вміст у медові менш ніж 1 %. Існує низка підходів до екстракції рослинної ДНК, які реалізовано в готових комерційних наборах різних виробників. Ми у своїх розробках зупинилися на СТАБ-методі екстракції ДНК завдяки його універсальності, простоті виконання та низькій собівартості. Слід зазначити, що, незважаючи на універсальність СТАБ-методу, його необхідно адаптувати під кожен тип харчової матриці з обов'язковим проведенням процедури валідації.

Для відпрацювання методики виділення ДНК брали наважки меду в кількостях 10, 25 та 50 г. Наважки меду заливали дистильованою водою у співвідношенні 1:5 та інкубували на шейкері впродовж 30 хв за температури 65°C. Далі зразки меду центрифугували впродовж 30 хв зі швидкістю 4000 об/хв. Супернатант зливали, а осад розчиняли у 1 мл дН<sub>2</sub>O. Проводили наступне центрифугування впродовж 15 хв за 12000 об/хв. Супернатант знов зливали, а осад розчиняли у 800 мкл лізуючого розчину зі СТАБ. Далі проводили виділення ДНК за стандартною методикою [9; 11].

Якість і кількість екстрагованої ДНК перевіряли методом спектрофотометрії. Отримані результати наведено у табл. 1. Із усіх трьох наважок меду вдалося виділити ДНК. Найбільший вихід ДНК, але найменшої якості, було отримано з наважки 50 г. Стосовно чистоти зразків ДНК, виділених із 10 і 25 г меду, то вони вкладалися в бажані діапазони як за  $\lambda$  260/280 (1,8–2,0), так і  $\lambda$  260/230 (1,5–2,0). Найбільш оптимальний результат за кількістю та якістю виділеної ДНК було отримано з наважки меду 25 г.

### 1. Характеристика виділених зразків ДНК із пилку меду

Вага меду (г)	Кількість ДНК (нг/мкл)	Чистота ДНК	
		$\lambda$ 260/280	$\lambda$ 260/230
10	20±5	1,89	1,89
25	70±8	1,98	1,62
50	150±10	2,30	0,87

Наші попередні дослідження показали, що в Україні сьогодні трапляються лише три ГМ культури – соя, кукурудза та ріпак [12]. З-поміж них до медоносних культур належить лише ріпак, хоча іноді з кукурудзи бджоли також можуть брати пилок. У зв'язку з цим було обрано ДНК-мішені, притаманні трансгенному ріпаку. Скринінговий аналіз щодо наявності генно-інженерних конструктів у досліджуваних зразках меду проводили за регуляторними послідовностями P35s і tNOS, а також генами «нової» ознаки – 5-енолпірувілшикимат-3-фосфат синтази із *Agrobacterium tumefaciens* штам CP4 (CP4 epsps), фосфінотрицин N-ацетилтрасферази із *Streptomyces viridochromogenes* (pat) та фосфінотрицин N-ацетилтрасферази із *Streptomyces hygrosopicus* (bar). Слід зазначити, що ці ДНК-мішені характерні і для більшості інших ГМ культур.

Для проведення ПЛР-аналізу використовували тест-системи власного виробництва. Тест-система «ГМ рослина (p35S/tNOS скринінг)» давала змогу ідентифікувати регуляторні послідовності p35S та tNOS, як ендогенний контроль використовували ген *psbA* хлоропластної ДНК. Друга тест-система «ГМ ріпак (CP4 epsps/Pat-Bar/tNos скринінг)», відповідно, давала змогу визначати послідовності генів *CP4 epsps*, *pat*, *bar* та tNOS. Як ендогенний контроль використовували ген *cruA* ріпаку [11].

Дані щодо дослідження зразків меду наведено у табл. 2. Всього було досліджено 15 зразків ДНК із п'яти областей України. Позитивний сигнал за геном *psbA* було отримано в 14 зразках. Послідовності ДНК ріпаку було виявлено у сімох зразках меду з Київської, Одеської, Полтавської та Черкаської областей. Стосовно генетичних елементів, характерних для генно-інженерних конструктів, то їх було виявлено в одному зразку меду (p35S) з Київської області, трьох зразках (p35S, *CP4 epsps*) з Одеської області, одному (p35S) – з Полтавської та одному (*CP4 epsps*) – з Черкаської.

Як відомо з літературних джерел, вірус CaMV, з геному якого було запозичено p35S, уражає передусім представників родини капустяних (Brassicaceae), до якої належить і ріпак. З огляду на це виявлені послідовності p35S у досліджуваних зразках меду могли бути результатом наявності генно-інженерних конструктів, так і генетичного матеріалу природного вірусу. Що ж до трьох зразків, в яких було виявлено послідовності гена *CP4 epsps*, то тут, безперечно, можна стверджувати про наявність пилку ГМ ріпаку Roundup Ready™ (Monsanto Company).

## 2. Результати ПЛР аналізу зразків меду з різних регіонів України

Області	Рослинна ДНК		Трансгенна ДНК				
	<i>psbA</i>	<i>cruA</i>	p35S	tNOS	<i>CP4 epsps</i>	<i>pat</i>	<i>bar</i>
Вінницька	+++	---	---	---	---	---	---
Київська	+++	-+-	-+-	---	---	---	---
Одеська	+++	+++	+ - +	---	+ + -	---	---
Полтавська	+ + -	+ - -	+ - -	---	---	---	---
Черкаська	+++	+ + -	---	---	+ - -	---	---

Отже, проведені дослідження показали можливість проведення контролю меду на наявність пилку трансгенних культур, зокрема ріпаку. Оптимальна кількість меду для проведення аналізу становить приблизно 25 г. Рекомендується проводити одночасний аналіз як за регуляторними елементами, так і генами «нової» ознаки, що входять до складу генно-інженерних конструктів, використаних для отримання біотехнологічних культур.

**Висновки і перспективи.** Відпрацьовано методику виділення ДНК із пилку меду на основі СТАБ-методу. Проведено дослідження зразків меду з різних регіонів України на наявність генно-інженерних конструктів. У сімох із п'ятнадцяти зразків меду виявлено наявність пилку ріпаку. В двох зразках

меду з Одеської області та одному з Черкаської області доведено наявність пилку біотехнологічного ріпаку Roundup Ready™.

### Список використаних джерел

1. Фарамазян А. Мировой рынок мёда, или Как помочь отечественному производителю / А. Фарамазян, Б. Угринович, А. Пономарев // Главный зоотехник. – 2009. – № 2. – С. 19–24.
2. Production of commodity in selected country. FAO [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>.
3. Якубчак О. М. Вимоги до безпеки та якості меду / О. М. Якубчак, А. В. Коновалова // Ветеринарна медицина України. – 2014. – 12 (226). – С. 19–22.
4. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 / ISAAA Brief №52. – ISAAA: Ithaca, NY. – 2016 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>.
5. GM Approval Database. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>.
6. Волков О. Державне регулювання обігу ГМО в Україні: поточний стан та концепція / О. Волков // Проект USAID «АгроІнвест», 2014 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.facebook.com/USAIDAgroInvest/ю>
7. Press release database. European commission [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_CJE-11-79\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_CJE-11-79_en.htm).
8. Verification Report on the extraction and analysis of GM pollen DNA in honey. Joint Research Centre [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://gmocr1.jrc.ec.europa.eu/GM-honey-report.htm>.
9. ПЦР в реальном времени / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов и др. ; под редакцией Д. В. Ребрикова. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
10. Димань Т. М. [та ін.] Генетично модифіковані с/г культури: прогрес, проблеми, перспективи : монографія / передмова та ред. Т. М. Димань, Л. Г. Шморгун. – К. : Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. – 158 с.
11. Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови / ТУ У 24.6-02568182-001:2011. – К. : ДП «Укрметртестстандарт», 2012. – 52 с.
12. Облап Р. В. Моніторинг продуктів харчування та сільськогосподарської сировини в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів / Р. В. Обап // Вісник аграрної науки. – 2014. – № 1. – С. 59–63.

### References

1. Faramazyan, A., Ugrinovich, B., Ponomarev, A. (2009). Mirovoj rynek mjoda, ili Kak pomoch' otechestvennomu proizvoditelju [World honey market or how to help native producer]. General zootechnician, 2, 19–24.

2. Production of commodity in selected country. FAO. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>.
3. Yakubchak, O., Konovalova, A. (2014). Vymohy do bezpeky ta yakosti medu [Requirements for honey safety and quality]. Veterinary medicine of Ukraine, 12 (226), 19–22.
4. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 / ISAAA Brief №52. – ISAAA: Ithaca, NY. – 2016. Available at: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>.
5. GM Approval Database. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Available at: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>.
6. Volkov, O. (2014). Derzhavne rehuliuвання obihu HMO v Ukraini: potochnyi stan ta kontsepsiia [Governmental regulation of GMO circulation in Ukraine: Current status and conception]. Project USAID «AgroInvest». Available at: [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PA00KRK3.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00KRK3.pdf).
7. Press release database. European commission. Available at: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_CJE-11-79\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_CJE-11-79_en.htm).
8. Verification Report on the extraction and analysis of GM pollen DNA in honey. Joint Research Centre. Available at: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/GM-honey-report.htm>.
9. Rebrikov, D. V. [et al.] (2009). PCR v real'nom vremeni [Real-Time PCR]. Moskva, 223.
10. Dyman, T. [et al.] (2013). Henetychno modyfikovani s/h kultury: prohres, problemy, perspektyvy [Biotechnological agricultural crops: progress, problems, perspectives]. Kyiv, 158.
11. Test-systemy dlia vyznachennia yakisnoho ta kilkisnoho vmistu henetychno modyfikovanykh orhanizmiv (HMO) roslynnoho pokhodzhennia v kharchovykh produktakh. Tekhnichni umovy (2012). [TU U 24.6-02568182-001:2011. Kits for quantitative and qualitative detection of plant origin GMO content in food products. Technical conditions]. Kyiv, 52.
12. Oblap, R. (2014). Monitorynh produktiv kharchuvannia ta silskohospodarskoi syrovyny v Ukraini na vmist henetychno modyfikovanykh inhrediiientiv [Monitoring of food products and agricultural raw material for GM ingredients content in Ukraine]. Messenger of agrarian sciences, 1, 59–63.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДА НА СОДЕРЖАНИЕ ПЫЛЬЦЫ ИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

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

***Аннотация.** Отработана методика выделения ДНК из пыльцы меда и ее исследование на присутствие последовательностей генно-инженерных конструктов, присущих биотехнологическим культурам. При использовании метода ПЦР в режиме реального времени проведен мониторинг образцов меда отечественного производства на предмет контаминации пыльцой генетически модифицированных растений, в частности биотехнологического рапса. В ходе проведенных*

*исследований выявлены образцы меда, которые содержали пыльцу биотехнологического рапса Roundup Ready™. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности и необходимости проведения более жесткого контроля пищевой продукции и сельскохозяйственного сырья относительно содержания генетически модифицированных организмов (ГМО).*

**Ключевые слова:** *генетически модифицированные организмы, биотехнологический рапс, ДНК, цветочная пыльца или пыльца меда, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.*

## **DETECTION BIOTECHNOLOGICAL PLANT POLLEN IN HONEY BY REAL-TIME PCR**

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

**Abstract.** *Methodological approach of detection DNA from honey pollen and detection biotechnological constructs was designed. Monitoring of native honey samples for biotechnological plant pollen contamination, in particular, biotechnological rape seed, was performed by using of PCR-RT method. During the study honey samples with biotechnological rapeseed pollen of Roundup Ready™ were detected. Obtained data shows advisability and necessity of more strict control of food products and agricultural raw material for GMO content.*

**Keywords:** *genetically modified organisms, biotechnological rapeseed, DNA, flower pollen or honey pollen, Real-Time polymerase chain reaction.*