

Науковий вісник Львівського національного університету  
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.  
Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University  
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.  
Series: Veterinary sciences

ISSN 2518-7554 print  
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11911  
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 619.616.9:.602:633.3

## Evaluation of the method for quantitative determination of soybean line MON 89788 by PCR-RF method

G. V. Kushnir<sup>1</sup>, V. I. Kushnir<sup>1✉</sup>, G. P. Ryvak<sup>1</sup>, B. V. Gutyj<sup>2</sup>, T. V. Marchyshak<sup>3</sup>, G. Yu. Fedor<sup>1</sup>, L. V. Kurilas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

<sup>2</sup>Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

<sup>3</sup>Biocore Technologies LTD, Kyiv, Ukraine

### Article info

Received 09.06.2025

Received in revised form  
09.07.2025

Accepted 10.07.2025

State Scientific-Research Control  
Institute of Veterinary Medicinal  
Products and Feed Additives,  
Donetska Str., 11, Lviv,  
79019, Ukraine.  
Tel.: +38-098-966-30-20  
E-mail: wolodjak@gmail.com

Stepan Gzhytskyi National  
University of Veterinary Medicine  
and Biotechnologies Lviv,  
Pekarska Str., 50, Lviv,  
79010, Ukraine.

Biocore Technologies LTD,  
Petra Bolbochana Str. 4A,  
Kyiv, 01133, Ukraine.

**Kushnir, G. V., Kushnir, V. I., Ryvak, G. P., Gutyj, B. V., Marchyshak, T. V., Fedor, G. Yu., & Kurilas, L. V. (2025). Evaluation of the method for quantitative determination of soybean line MON 89788 by PCR-RF method. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 27(119), 78–82. doi: 10.32718/nvlvet11911**

The method for quantitative determination of soybean line MON 89788 by polymerase chain reaction was evaluated in accordance with European standards and norms. Intra-laboratory studies were conducted in accordance with the acceptance criteria and performance requirements described in the documents of the European GMO Laboratory Network. The efficiency of the test system was assessed by such characteristics as amplification efficiency and linearity, reproducibility (intra-laboratory precision), analytical sensitivity of the test system, accuracy and convergence. As a result of the studies, a high level of amplification efficiency was established, the slope angle was between  $-3.43$  and  $-3.52$ , and the calculated efficiency values were 95.1 and 92.2 %. A clear linear dependence of the Ct values of the studied samples on the logarithm of the initial concentration of soybean line MON 89788 was also established, and the correlation coefficient  $R^2$  was more than 0.99. To assess reproducibility, a comparison was made between the calculated coefficient of variation (% CV) of Ct values for the MON89788 transformation event and the acceptable coefficient of variation value for the method (% CV<sub>v</sub>), and satisfactory reproducibility of the results of MON89788 quantification on the MA6000 instrument was established. Analyzing the results of all studies studied during verification, it can be concluded that the use of the PCR-RF method using the Biocore® GMO-quantity test system kit Soy MON 89788 is suitable and effective for the quantitative determination of GM soybean MON 89788. The obtained verification parameters comply with EU standards, which makes it possible to apply the specified method in laboratory practice.

**Key words:** polymerase chain reaction, genetically modified plants, soybean line MON 89788, methodology verification.

## Оцінка методики кількісного визначення сої лінії MON 89788 методом ПЛР-РЧ

Г. В. Кушнір<sup>1</sup>, В. І. Кушнір<sup>1✉</sup>, Г. П. Ривак<sup>1</sup>, Б. В. Гутій<sup>2</sup>, Т. В. Марчишак<sup>3</sup>, Г. Ю. Федор<sup>1</sup>,  
Л. В. Курилас<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок,  
м. Львів, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів,  
Україна

<sup>3</sup>ТОВ Біокор Технолоджі ЛТД, м. Київ, Україна

Проведено оцінку методики кількісного визначення сої лінії MON 89788 методом полімеразно ланцюгової реакції згідно з європейськими стандартами та нормами. Внутрішньолaborаторні дослідження проводили відповідно до критеріїв прийнятності та вимог ефективності, описаних у документах Європейської мережі лабораторій по ГМО. Оцінювання ефективності роботи тест-системи здійснювали за такими характеристиками як, ефективність та лінійність ампліфікації, відтворюваність (внутрішньолaborаторна прецизійність), аналітична чутливість тест-системи, правильність та збіжність. В результаті проведених досліджень було встановлено високий рівень ефективності ампліфікації, кут нахилу знаходився в межах  $-3,43$  та  $-3,52$ , а розраховані значення ефективності становили  $95,1$  та  $92,2$  %. Також було встановлено чітку лінійну залежність значень  $C_t$  досліджуваних зразків від логарифму початкової концентрації сої лінії MON 89788, коефіцієнт кореляції  $R^2$  становив більше  $0,99$ . Для оцінки відтворюваності було проведено порівняння розрахованого коефіцієнта варіації (% CV) значень  $C_t$  для трансформаційної події MON89788 з прийнятним значенням коефіцієнта варіації для методу (% CV<sub>у</sub>) та встановлено задовільну відтворюваність результатів кількісного визначення MON89788 на приладі MA6000. Аналізуючи отримані результати усіх досліджень, які вивчали під час верифікації, можна зробити висновок, що використання методу ПЛР-РЧ з використання набору тест системи «Biosoge® ГМО-кількість» Соя MON 89788, є придатним та ефективним для кількісного визначення ГМ сої MON 89788. Отримані параметри верифікації відповідають стандартам ЄС що дає змогу застосовувати зазначену методику в практиці лабораторії.

**Ключові слова:** полімеразна ланцюгова реакція, генетично модифіковані рослини, соя лінії MON 89788, верифікація методики.

## Вступ

Сьогодні генетично модифіковані (ГМ) рослини є невід'ємною частиною сільського господарства в багатьох країнах світу. Кількість посівних площ під такі рослини з року в рік постійно збільшуються (ISAAA Brief 55-2019, 2020).

В різних країнах по різному ставляться до трансгенних рослин. Якщо у США, Мексиці, Японії до таких рослин ставлення позитивне, то у країнах Європейського Союзу діють жорсткі вимоги щодо тестування безпечності кожної ГМ лінії рослин. Відсутність достовірних даних щодо безпеки продуктів біотехнологій для людини, сільськогосподарських тварин і довкілля спонукало до необхідності проведення постійного моніторингу за їх поширенням та маркуванням продукції (Mandyhra et al., 2018; de Vos & Swanenburg, 2018; Haidei et al., 2025).

В Європейському Союзі вперше запровадили пороги значення ГМ інгредієнтів і всі продукти маркуються щодо ГМО. Введення в торговельний обіг ГМ-продукції регулюється цілою низкою Директив та Регламентів, серед яких ключовими можна назвати Регламент (ЄС) № 1829/2003 та №1830/2003 від 22 вересня 2003 року Європейського Парламенту та Ради з відстеження та маркування генетично модифікованих організмів та відстеження продуктів харчування та кормів, вироблених із генетично модифікованих організмів, що вносить зміни до Директиви №2001/18 (Regulation (EC) No 1829/2003; Regulation (EC) No 1830/2003).

Одним з найточніших і найчутливіших методів виявлення ГМО у харчових продуктах та рослинній сировині є метод полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ). Цей метод володіє високою чутливістю та специфічністю, швидкістю проведення аналізу, можливістю досліджувати зразки ДНК, які зазнали значних пошкоджень, а також зменшенням ризиків виникнення хибно-позитивних результатів. Завдяки цьому методу можна не тільки виявити ГМО, але й провести ідентифікацію та кількісне визначення ГМ ліній рослин (Kesmen et al., 2009; Herilovych et al., 2014).

Співдружність референсних лабораторій з визначення ГМО у продуктах харчування і кормах (Community Reference Laboratories for GM Food and Feed, CRL-GMFF) та Європейської мережі лабораторій з

визначення ГМО (European Network of Genetically Modified Organism Laboratories, 2015) розробляють методики якісного і кількісного визначення ГМО методом ПЛР та проводять їх валідацію. Ці методики рекомендуються використовувати в лабораторіях, які займаються виявленням і кількісним визначенням ГМО (Hougs et al., 2017). Головним завданням лабораторії є надання якісних і достовірних результатів досліджень, тому постає питання у зменшенні похибок під час проведення досліджень настільки, наскільки дозволяють обмеження аналітичних систем. Оскільки в нашій країні використовують тест-системи різних виробників тому актуальним питанням постає верифікації кількісних методів, які вже валідовані виробником. Метою верифікації є підтвердження спроможності лабораторії отримувати достовірні результати досліджень валідованим методом.

## Мета дослідження

Метою нашої роботи було провести внутрішньолaborаторну верифікацію методики кількісного визначення ГМ Сої MON 89788 методом ПЛР-РЧ з використанням ампліфікатора MA6000.

## Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили у Державному науковому дослідному контрольному інституті ветеринарних препаратів та кормових добавок в лабораторії акредитованій відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025-19.

Тест-систему для кількісного визначення сої MON89788 було валідовано на сертифікованому сталонному матеріалі, який містить цю трансформаційну подію, з використанням вітчизняної тест системи "Biosoge® ГМО-кількість" Соя MON 89788, виробник ТОВ "Біокор Текнолоджі ЛТД", Україна. Межа чутливості тест-систем становить від 10 до 50 копій ДНК-мішені, межа кількісного визначення відповідає найменшому стандартному зразку та становить  $0,1$  %, ефективність проходження ПЛР-реакції становить більше ніж  $90$  %.

Дослідження кількісного вмісту ГМО проводили згідно ДСТУ ISO 21570:2008.

Внутрішньолaborаторні дослідження проводили відповідно до критеріїв прийнятності та вимог ефективності, описаних у документах Європейської мере-

жі лабораторій по ГМО (European Network of GMO Laboratories (ENGL)). Дослідження проводили в умовах, коли результати вимірювання отримували за однією методикою, на одному приладі, але різними операторами (1 і 2) та коротких інтервалів часу. Кожен зразок був проаналізований в двох повторах і достатній кількості прогонів (Hougs et al., 2017).

Статистичний аналіз здійснювали з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel, за допомогою якого визначали стандартне відхилення паралельних вимірювань.

Облік результатів ПЛР-РЧ аналізу проводився за наявності або відсутності графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає.

### Результати та їх обговорення

Оцінювання ефективності роботи тест-системи здійснювали за такими характеристиками як, ефективність та лінійність ампліфікації, відтворюваність (внутрішньолaboratorна прецизійність), аналітична

чутливість тест-системи (межа виявлення, межа детектування, limit of detection), правильність та збіжність.

В межах робочого діапазону ( $Ct \leq 38$ ) хибно-позитивних чи хибно-негативних результатів не встановили.

Визначення ефективності та лінійності методики проводили у двох повторах і достатній кількості прогонів. За отриманими графіками ампліфікації визначали середнє значення Ct для кожного зразка. Ефективність ампліфікації розраховували за нахилом стандартної кривої (slope), отриманої після побудови декадного напівлогарифмічного графіка значень Ct від кількості/копій ДНК і розраховували за таким рівнянням (рис. 1).

$$\text{Ефективність} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

Залежність значення порогового циклу від логарифму концентрації добре описується лінійною функцією, при цьому розрахований за допомогою методу найменших квадратів коефіцієнт кореляції  $R^2$  становив більше 0,99 (рис. 2).

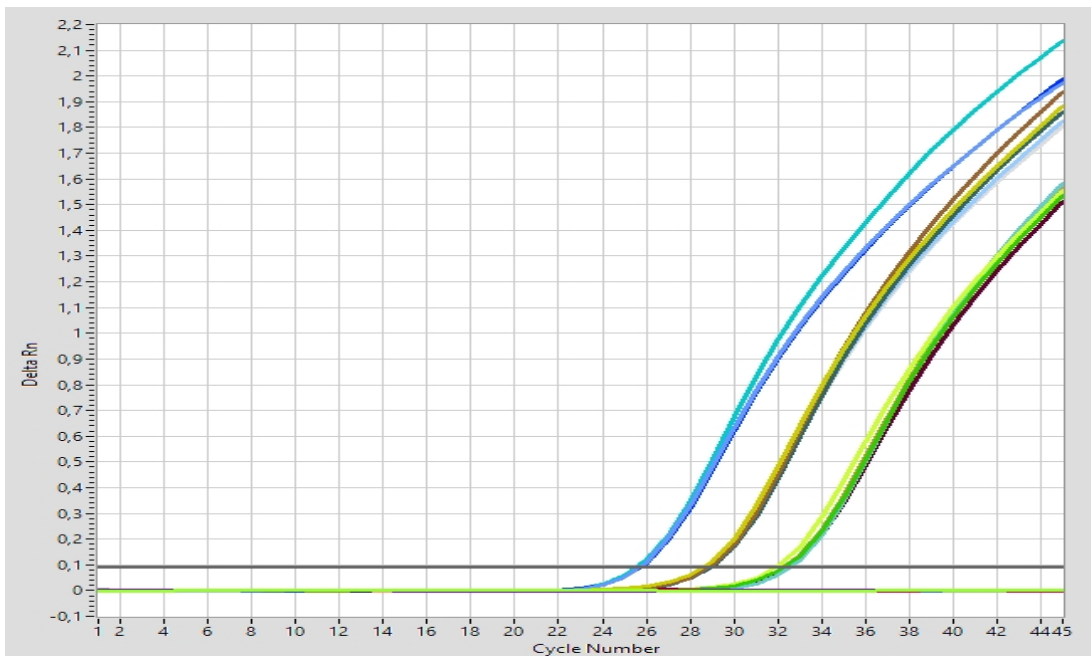


Рис. 1. Криві ампліфікації 35S-промотору 0,1 %, 1 %, 10 % референсних матеріалів ГМ сої лінії MON 89788

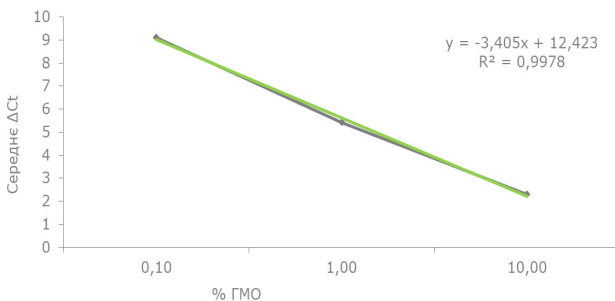


Рис. 2. Графік залежності порогового циклу Ct від концентрації (0,1 %, 1 %, 10 %) референсних матеріалів та відсотковий вміст ГМ сої лінії MON 89788.

У таблиці 1 наведено значення кута нахилу (slope), ефективності ампліфікації та коефіцієнта кореляції

лінійної регресії ( $R^2$ ) калібрувальних графіків з використанням референсних матеріалів сої.

В результаті проведених досліджень було встановлено високий рівень ефективності ампліфікації, кут нахилу становив  $-3,43$  та  $-3,52$  та відповідає ефективності підсилення 95,1 та 92,2 % (припустимий кут нахилу має бути в межах  $-3,6 \leq \text{нахил} \leq -3,1$ , що відповідає ефективності підсилення 90–110 %,  $R^2 \geq 0,98$ ). Також встановлено чітку лінійну залежність значень Ct від логарифму початкової концентрації ГМ сої MON89788 10 % ( $R^2 \geq 0,99$ ).

Отримані значення кута нахилу калібрувальних графіків вказують на високу ефективність ампліфікації, що повністю задовольняє вимоги щодо визначення вмісту нуклеїнових кислот методом ПЛР в режимі реального часу.

**Таблиця 1**

Експериментальні дані щодо кута нахилу, ефективності та лінійності ампліфікації методу

	Кут нахилу (( <i>slope</i> ))		Ефективність ПЛР, %		Лінійність, (R <sup>2</sup> )	
	1	2	1	2	1	2
Прогон №1	-3,4	-3,45	96,8	94,9	0,99	0,99
Прогон №2	-3,4	-3,57	96,8	90,6	0,99	1
Прогон №3	-3,51	-3,55	91,8	91,1	1	0,99
Середнє значення	-3,43	-3,52	95,1	92,2	0,99	0,99

Одним із важливих критеріїв верифікації є правильність і збіжність. Правильність методу показує близькість узгодженості між середнім значенням, отриманим з великої серії результатів тестування, та прийнятими референтними значеннями і розраховували за таким рівнянням:

Правильність = (середнє значення/дійсне значення) × 100.

Значення правильності має бути в межах ± 25 % від приписного, що простежується в наших дослідженнях, оскільки за нашими результатами вона знаходилась в межах 94,3–107,5 % (табл. 2).

**Таблиця 2**

Експериментальні дані щодо правильності методу

Соє	Приписне значення ГМО, %	Середнє значення отриманого ГМО, %	Правильність, %
MON 89788	0,1 %	0,093	107,5
	1 %	1,06	94,3
	10 %	9,69	103,2

Збіжність методу показує наскільки отримані результати відрізняються від приписного значення за багаторазового дослідження одного і того самого зразка. Для кожної концентрації визначали стандартне відхилення значень паралельних вимірювань (табл. 3) і розрахунковим методом визначали збіжність методу:

Збіжність = (стандартне відхилення/середнє значення) × 100.

Збіжність методу має бути ≤ 25 %, що також простежується в наших дослідженнях, оскільки знаходилась в межах 5,7–10,8 %.

**Таблиця 3**

Експериментальні дані щодо збіжності методу

	Приписне значення	Середнє значення отриманого	Стандартне відхилення,	Збіжність
	ГМО, %	ГМО, %	(SD)	(RSDr), %
MON 89788	0,1 %	0,093	0,01	10,75
	1 %	1,06	0,11	10,37
	10 %	9,69	0,55	5,67

Відтворюваність результатів тест-системи відображає наскільки відрізняються між собою отримані значення St за багаторазового визначення одного й того самого зразка. Результати оцінювали за такими показниками, як стандартне відхилення (SD) та коефіцієнт варіації (CV). Відтворюваність результатів при використанні тест-системи повинна бути достатньо високою, відсутні статистично значимі розбіжності результатів дослідження зразків, при цьому обраховане значення CV для кожного досліджуваного

зразка повинно бути нижчим від прийнятого для методу значення CVv.

Для оцінки відтворюваності було проведено порівняння розрахованого коефіцієнта варіації (% CV) значень St для трансформаційної події MON89788 із варіацією часу та оператора з прийнятним значенням коефіцієнта варіації для методу (% CVv). За даними наведеними у табл. 4, встановлено, що % CV ≤ % CVv, що свідчить про задовільну відтворюваність результатів кількісного визначення MON89788 на приладі MA6000.

**Таблиця 4**

Експериментальні дані щодо відтворюваності методу

% ГМО	Ct сер		SD		% CV		% CVv	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0,1 %	32,69	32,88	0,53	0,22	1,5	1,5	1,98	1,53
1 %	29,17	28,80	0,31	0,56	1,7	1,1	1,73	1,71
10 %	25,75	25,36	0,49	0,36	1,1	1,9	1,52	1,94

Отримані результати показали, що аналітична чутливість тест-системи Соя MON 89788 на приладі МА6000 становить 0,1 % досліджуваних ГМ-елементів.

Аналізуючи отримані результати усіх досліджень, які вивчали під час верифікації, можна зробити висновок, що використання методу ПЛР-РЧ з використання набору тест системи “Biosoge® ГМО-кількість” Соя MON 89788, є придатним та ефективним для кількісного визначення ГМ сої MON 89788. Отримані параметри верифікації відповідають стандартам ЄС що дає змогу застосовувати зазначену методику в практиці лабораторії.

### Висновки

Проведено внутрішньолабораторну верифікацію методики кількісного визначення ГМ сої лінії MON89788 методом ПЛР-РЧ.

Отримані параметри верифікації (ефективність та лінійність ампліфікації, відтворюваність, аналітична чутливість тест-системи, правильність та збіжність) в умовах лабораторії відповідають вимогам європейських стандартів і дозволяє застосовувати зазначену методику в лабораторії.

У подальшій перспективі наших досліджень є оцінка методики якісного і кількісного визначення ГМ сої GTS 40-3-2 на новому ампліфікаторі МА6000.

### Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

### References

- de Vos, C. J., & Swanenburg, M. (2018). Health effects of feeding genetically modified (GM) crops to livestock animals: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 117, 3–12. DOI: 10.1016/j.fct.2017.08.031.
- European Network of GMO Laboratories (ENGL). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing (2015). URL: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidance-documents>.
- Haidei, O. S., Velyka, N. V., & Hrynzovskyi, A. M. (2025). Problema vykorystannia henetychno modyfikovanykh orhanizmiv ta poshyreni transhenni linii roslyn v Ukraini protiahom 2013 – 2023 rokiv. *Zdorovyi pochatok zhyttia – zaporuka blahopoluchnoho maibutnoho: materialy naukovopraktychnoi konferentsii z mizhnarodnoiu uchastiu do Vsesvitnoho dnia zdorovia (4 kvitnia 2025 r). Natsionalnyi medychnyi universytet imeni O.O. Bohomoltsia*, 37–38. URL: <http://ir.library.nmu.com/bitstream/123456789/15980/1/1006257.pdf> (in Ukrainian).
- Herilovych, A. P., Stehni, B. T., Zahorodnii, A. I., Vlizlo, V. V., Lymanska, Shch. Iu., Bolotin, V. I., Solodiankin, O. S., Stehni, A. B., Herilovych, I. O., Sapko, S. A., Horaichuk, I. V., & Arefiev, V. L. (2014). Molekuliarno-henetychni metody diahnostyky u veterynarii medytsyni ta biotekhnologii. *Nats. akad. ahrar. nauk Ukrainy, Nats. nauk. tsentr “In-t eksperym. i klinich. vet. Medytsyny”*. Kyiv: ST-Druk (in Ukrainian).
- Hougs, L., Gatto, F., Goerlich, O., Grohmann, L., Lieske, K., Mazzara, M., Narendja, F., Ovesna, J., Papazova, N., Scholtens, I., & Žel, J. (2017). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 29015 EN, Publication Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-77310-5. DOI: 10.2760/645114.
- ISAAA Brief 55-2019: Executive Summary (2020). *Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier*. URL: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>.
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat science*, 82(4), 444–449. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.02.019.
- Mandyhra, M. S., Doletskyi, S. P., Kutsan, O. T., Shevtsova, H. M., Romanko, M. Ie., Orobchenko, O. L., & Herilovych, I. O. (2018). Studying influence of gene-modified soya of line MON 89788 on an organism of laboratory animals. *Visnyk ahrarnoi nauky*, 9, 32–38. DOI: 10.31073/agrovisnyk201809-05.
- Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed (Text with EEA relevance). URL: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2003/1829/oj/eng>.
- Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. URL: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2003/1830/oj/eng>.