

## РОЗВИТОК БІОСЕНСОРНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ

В. Д. НАУМЕНКО *orcid* 0009-0006-4590-0434,  
Ф. Н. ПАЦЮК *orcid* 0009-0008-6932-5432,  
А. І. ЄМЕЦЬ *orcid* 0000-0001-6887-0705,  
Я. Б. БЛЮМ *orcid* 0000-0001-7078-7548

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,  
Україна, 04123, Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а  
email: [naumenko.valentina88@gmail.com](mailto:naumenko.valentina88@gmail.com)

*Протягом майже трьох десятиліть після того, як генетично модифіковані організми (ГМО) були вперше комерціалізовані, генетично модифіковані (ГМ) культури здобули перевагу над своїми традиційними аналогами. Основними ознаками, принесеними в комерціалізовані рослини, є стійкість до гербіцидів та шкідників. Впровадження ГМ культур в сільське господарство призвело до підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Незважаючи на їх швидке та широке впровадження МО викликали занепокоєння суспільства щодо їх впливу на здоров'я людини та довкілля, що обумовило стурбованість споживачів безпекою трансгенних харчових продуктів. Постанова питання про моніторинг та перевірку присутності ГМО в сільськогосподарських культурах та харчових продуктах викликала інтерес до розробки аналітичних методів для чутливого, точного, швидкого та дешевого детектування ГМО. ДНК біосенсори (геносенсори) були задумані як нова технологія виявлення ДНК, яка може замінити нинішні методи на основі ампліфікації, що потребують вартісного обладнання та висококваліфікованого персоналу. Цей огляд підсумовує розгляд ряду досліджень щодо застосування геносенсорних технологій для якісного та кількісного визначення трансгенних ознак.*

**Ключові слова:** ГМО, біосенсор, ДНК біосенсор, оптичний, п'єзоелектричний, електрохімічний.

**Генетично модифіковані організми.** За останні вже майже тридцять років генетично модифіковані організми привели до революційних змін в сільському господарстві. Через глобальні екстремальні зміни кліматичних умов та постійне зростання популяції населення селекційне розведення не може ефективно вирішити нагальну проблему нестачі їжі. Це призвело до того, що вчені почали використовувати генну інженерію, щоб покращити сільськогосподарські культури та зробити їх стійкими до хвороб і комах-шкідників, гербіцидів, екстремальних погодних умов, тощо з метою збільшення виробництва продуктів харчування та поліпшення харчової цінності.

Генетично модифіковані організми — це організми, в яких ДНК була змінена нетрадиційним шляхом. Відповідно до Закону України «Про державне регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично-модифікованих організмів і продукції» — генетично модифікований організм (далі — ГМО) — будь-який організм, крім людини, у якому генетичний матеріал цілеспрямовано змінений внаслідок перенесення до геному організму-реципієнта екзогенної нуклеїнової кислоти у спосіб, який не відбувається природним шляхом, внаслідок схрещування та/або природної рекомбінації (Закон України, 2023). Відзначено, що за останні роки генетично модифіковані культури здобувають перевагу над своїми традиційними аналогами. Завдяки застосуванню новітніх технологій досягнуто значного підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Переваги застосувань досягнень генетичної інженерії в сільському господарстві призвели до значного підвищення врожайності, зниження витрат на виробництво харчових продуктів, стійкості до шкідників і хвороб та зменшення потреби в пестицидах, поліпшення складу поживних речовин і відповідно якості продуктів харчування, стійкості до несприятливих кліматичних умов тощо.

Значного прогресу було досягнуто в розробці культур, які набули властивість швидше дозрівати та краще переносити стресові фактори зовнішнього середовища, що дозволило вирощувати рослини в стресових умовах.

Хоча перші комерційні ГМ культури були висаджені в 1994 р. (томати), 1996 рік став першим роком, коли трансгенні культури були висаджені на площі 1,66 млн га. Відтоді відбулося різке збільшення насаджень ГМ культур. За останні більш ніж двадцять років глобальна посівна площа під цими культурами зросла до 185,6 млн га у 2016 р. (James, 2015). В основному ГМ культури вирощують у США, Канаді, Аргентині та Китаї. Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) повідомило, що 85 % кукурудзи, виробленої в США, генетично модифікована. Головними ГМ культурами, які займають основну площу вирощування, є соя, бавовна, кукурудза та ріпак (47,4 % глобальних посівів), найбільша частка серед них належить сої. У деяких країнах поширені цукровий буряк (прийняті у США та Канаді з 2008 р.), папайя (у США з 1999 р. та Китаї з 2008 р.), люцерна (у США спочатку в 2005–2007 рр., а потім з 2011 р.), кабачки (в США з 2004 р.), яблука (в США з 2016 р.), картопля (в США з 2015 р.) і баклажани (у Бангладеш з 2015 р.), що займають невеликі площі посівів (James, 2015).

Згідно даних ISAAA (International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications) загалом у 2019 р. трансгенні рослини вирощувались вже на площі 190,4 млн га в 29 країнах, що значно сприяло продовольчій безпеці, стійкості, пом'якшенню наслідків зміни клімату (ISAAA, 2019), а у 2023 р. ГМ технології були використані у 76 країнах, при тому, що глобальні посіви ГМ культур сягли 206,3 млн га (Cheng et al., 2024). У країнах, що розвиваються, зокрема у В'єтнамі, на Філіппінах і в Колумбії були зафіксовані двозначні темпи зростання посівів ГМ культур (Komen and Wafula, 2021).

Незважаючи на те, що ГМ культури все більше отримують визнання в США, Аргентині, Канаді та Китаї, в європейських країнах спостерігається несприйняття споживачами ГМО та продукції з їх вмістом через побоювання, що ГМ продукти можуть потенційно нанести шкоду здоров'ю людини (Ponti, 2005; Dona and Arvanitoyannis, 2009), а також побоювання того, що посіви ГМ культур можуть завдати шкоди довкіллю. Як результат ЄС встановив один із найсуворіших законів, де чітко врегульоване питання ГМ культур та ГМ продукції. Безпечне використання ГМО, пов'язане з вивільненням ГМО і розміщенням ГМО на ринку, в країнах ЄС регулюється Директивою 2001/18/ЄС від 12 березня 2001 р. (Directive (EC),

2001). Крім цього основного документу в ЄС прийнято також декілька Регламентів, що регулюють обіг ГМО, в тому числі Регламент (ЄС) 1829/2003 Європейського парламенту та Ради Європи від 22 вересня 2003 року про генетично модифіковані продукти харчування та корми, який наполягає на процедурі маркування для всіх продуктів, що містять ГМ матеріали (European Commission. Regulation (EC), 2003). Отже, міжнародні правила та рекомендації Кодексу передбачають вимоги біобезпеки щодо ГМО. Всі ГМ продукти та ГМ компоненти в країнах ЄС маркуються, якщо вміст ГМО в них перевищує норми рекомендованого порогу 0,9 %. У зв'язку з чим виникла необхідність виявлення та кількісної оцінки ГМО. Виявлення ГМ культур зосереджено на скринінгу специфічних генетичних ознак (якісний аналіз) і частки ГМ компонентів у продуктах харчування (кількісний аналіз). Якісні тести в основному проводяться за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (Datukishvili et al., 2015), методів виявлення на основі ПЛР (Noguchi et al., 2015), твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) (Liu et al., 2004; Emslie et al., 2007; Liu et al., 2022) або швидких тестів (реагенти для швидкого скринінгу, тестовий папір) (Jang et al., 2011), а кількісні тести проводяться в основному за допомогою ПЛР в режимі реального часу (RT-PCR) (Zeng et al., 2020; Broeders et al., 2015). Проведення таких аналізів потребує підготовки зразків, виділення та очищення ДНК, ампліфікації ДНК та виявлення генетичних модифікацій. І хоча ці методи вважаються дуже зручними та продуктивними, а ПЛР є еталонною методологією, вони трудомісткі, відносно вартісні та вимагають висококваліфікованого персоналу (Salisu, 2017). Це, в свою чергу, мотивувало науковців до пошуку і розробки альтернативних аналітичних, чутливих, точних, швидких та дешевих методів з застосуванням біосенсорів. Саме нова біосенсорна технологія для якісного і кількісного визначення трансгенних ознак здатна замінити існуючі методи ПЛР.

**Біосенсори.** Біосенсори — це новітні аналітичні пристрої, які транслюють біологічну подію в вимірювальний сигнал, біохімічний сигнал приймає фізичний перетворювач і перетворює його в електричний. Всі біосенсори складаються з трьох частин: біоселективного елемента, чутливого до сполуки, що міститься в аналізованій речовині; перетворювача, який перетворює результат взаємодії цього елемента з аналізованою речовиною в інший сигнал, який простіше виміряти; електронного пристрою, що відображає цей сигнал у зручному для користувача вигляді (рис. 1.).



Рис. 1. Складові частини ДНК біосенсора.

Як біоселективний елемент можуть використовуватися всі види біологічних структур, такі як ферменти, антитіла, рецептори, живі клітини та ін. (Rezayı et al., 2018). Перетворювачами можуть бути різні пристрої: електрохімічні, оптичні, п'єзоелектричні, гравітаційні, калориметричні та резонансні системи. Теоретично будь-який біоселективний елемент можна комбінувати з будь-яким з можливих перетворювачем, внаслідок чого виникає велика різноманітність різних типів можливих біосенсорів. Класифікацію біосенсорів можна розглядати на основі біорецепторів, перетворювачів, технологій та систем детектування.

Найпоширенішими біосенсорами є сенсори з ферментами та іммобілізованими клітинами в якості біоселективних елементів. Так, створені клітинні біосенсори для визначення фенолів, глутаміну, тиразину, молочних кислот та ін., існують клітинні біосенсори для аналізу якості води і стічних вод. Окремо можна зазначити так звані біочіпи, що містять масиви біоселективних елементів. За допомогою таких біочіпів можна проводити множинний, у тому числі і генетичний, аналіз біологічних речовин. Головною перевагою

біосенсорів є швидкість аналізу в порівнянні з традиційними аналітичними методами.

**ДНК біосенсори як платформа для виявлення ГМО.** ДНК біосенсорами або геносенсорами називають біосенсорні пристрої в яких система розпізнавання включає нуклеїнові кислоти (селективний матеріал) як рецептори та реакцію гібридизації як подію розпізнавання (формування розпізнавального елемента). (Labuda et al., 2010). Чутливим компонентом, елементом розпізнавання, в ДНК біосенсорах / геносенсорах є олігонуклеотиди з відомою послідовністю, послідовності ДНК або РНК, аптамери, ДНК-зими або події гібридизації. ДНК біосенсори / геносенсори використовують принципи подій гібридизації або взаємодій, специфічних для певних послідовностей з метою точного визначення цільової нуклеїнової кислоти. Принцип заснований на комплементарному зв'язуванні послідовностей нуклеїнових кислот.

ДНК біосенсори можуть використовувати різноманітні перетворювачі, проте лише ДНК біосенсори з оптичними, п'єзоелектричними, та електрохімічними перетворювачами показали себе успішними у визначенні ГМО, що детально розглядається в огляді (Arugula and Simonian, 2016). Lopez та співробітники (2018) зробили пошуковий аналіз частоти публікацій відносно застосування методів ГМО детектування за допомогою ДНК біосенсорів з 2001 по 2017 рік (Рис. 2). Для пошуку в інтернет ресурсах автори використовували ключове слово «електрохімічний або оптичний чи п'єзоелектричний». Результати пошуку засвідчили, що більшість пристроїв для детектування ГМО базуються на електрохімічних методах.

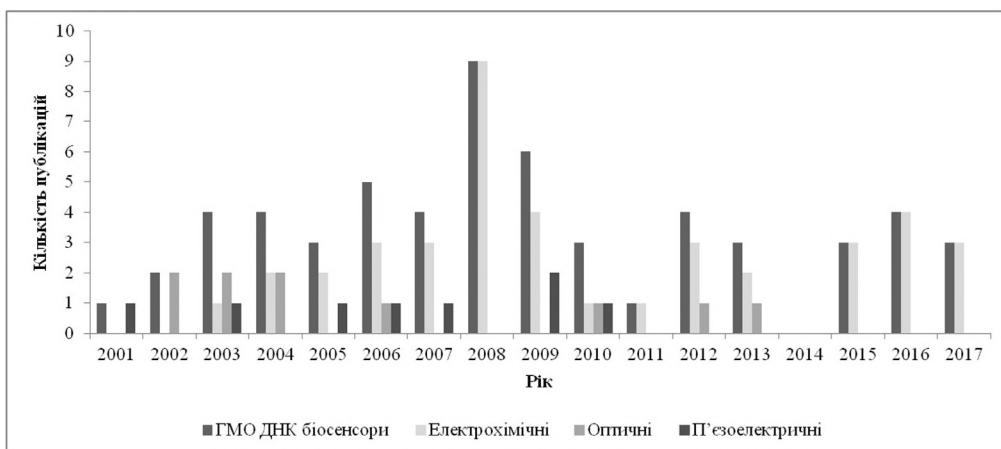
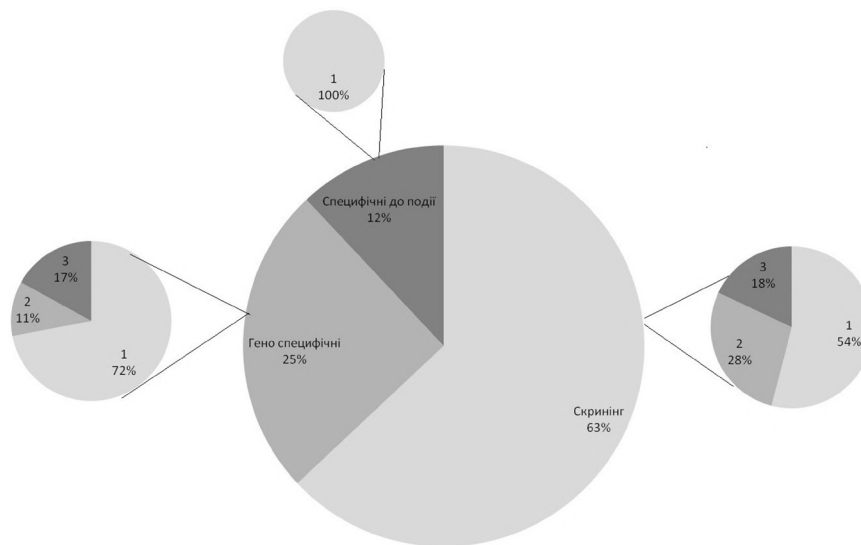


Рис. 2. Кількість публікацій, що свідчать про частоту використання ДНК біосенсорів для виявлення ГМО з 2001 по 2017 рік. Дані отримані з ISI Web of Knowledge та Scopus (адаптовано до Lopez et al., 2018).

Відомо, що більшість ДНК біосенсорів для скринінгу використовують ген специфічні методи. І тільки в незначній кількості досліджень автори описують виявлення специфічних для даної події послідовностей, що представляє собою найвищий унікальний рівень специфічності, де всі біосенсори мали в своєму складі електрохімічний перетворювач. Слід відзначити, що основну роль в аналітичній продуктивності ДНК біосенсору відіграє етап іммобілізації проби. Вирішальне значення при цьому відіграє контроль над структурою біоселективного шару, його хімічним складом та покриттям, де вагомим фактором виступає густина іммобілізованих проб на поверхні перетворювача. Якщо вона буде надто

значною, можливе виникнення стеричних та інших перешкод, що суттєво погіршать можливість ефективної гібридизації. (Kasry et al, 2009). Хімічний склад покриття повинен бути високо специфічним для зв'язування проби, забезпечуючи ефективне блокування поверхні з метою уникнення неспецифічної адсорбції іншими видами молекул, наприклад, короткими нуклеотидами, білками та ін. Такий контроль необхідний для посилення чутливості, селективності та частоти відтворюваності відгуків Частоту використання того чи іншого методу та типу перетворювача для ГМО визначення наглядно представлено на рис. 3.



**Рис. 3.** Кількість публікацій стосовно застосування геносенсорів для ГМО детектування залежно від рівня специфічності та перетворювача: 1 — електрохімічний біосенсор, 2 — оптичний біосенсор і 3 — п'єзоелектричний біосенсор (адаптовано до Sanchez-Paniagua Lopez et al., 2018).

Виходячи з аналізу отриманої інформації видається доцільним зупинитися на розгляді аналітичних методів ГМО детектування за допомогою оптичного, п'єзоелектричного та електрохімічного біосенсорів.

**Оптичні геносенсори.** В оптичних ДНК біосенсорах застосовуються оптичні перетворювачі, які використовують зміни у властивостях світла внаслідок біологічних взаємодій між аналітом і шаром розпізнавання. Оптичні геносенсори застосовують метод поверхневого плазмонного резонансу (SPR), флуоресценції, люмінесценції та абсорбції. Метод SPR заснований на явищі поверхневого плазмонного резонансу, який досліджує шари органічних чи біоорганічних молекул, нанесених на поверхню благородного металу, наприклад золота, що застосовується

у вигляді тонкої плівки. SPR метод частіше використовується для виявлення ГМО, проте можуть застосовуватись електролюмінесценція, поверхнево-посилене комбінаційне розсіювання (SERS), а також спектроскопія. SPR реагує з високою чутливістю на зміни діелектричної проникності суміжного середовища, а отже, і на показник заломлення. Ця особливість робить його особливо придатним для виявлення ДНК. Різні системи іммобілізації проби (захоплення) на золотій плівці (сенсорній поверхні) були описані як ковалентне з'єднання (Bai et al., 2010), з'єднання біотин-стрептавідин (Zhao et al. 2013; Kalogianni et al., 2005; Zhu et al., 2010) та самоорганізовані моношари (Wang et al., 2004; Wang et al., 2012). І як електрохімічні біосенсори, більшість оптичних геносенсорів призначені для скринінгу ГМО, а

саме для виявлення промотора 35S і термінатора NOS. Інші пристрої на основі плазмонного поверхневого резонансу можуть виявляти частину гена, пов'язану зі специфічною генетичною модифікацією і тому відносяться до ген специфічних методів. Повідомлялось про виявлення генів Cry1Ab або CP4 EPSPS за допомогою плазмонного поверхневого резонансу. Більшість систем спрямовані на виявлення синтетичних олігонуклеотидів і, в деяких випадках на використання сертифікованих референсних зразків, так званий метод CRM (CP3). Оптичні геносенсори для виявлення ГМО представлені в публікації (Lopez et al., 2018).

**П'єзоелектричні геносенсори.** П'єзоелектричні біосенсори є різновидом механічних біосенсорів, які використовують п'єзоелектричний ефект, тобто генерування електричних / акустичних хвиль, викликаних механічною напругою або тиском. Ці сенсори здатні забезпечувати селективність і виявлення біологічних подій у реальному часі без використання міток. QCM-мікроваги на основі кварцового кристалу (МВКК) є найбільш поширеними пристроями для біосенсорного вимірювання. Основу МВКК складає кварцова пластина, вирізана з монокристалу кварцу під певним кутом. Зверху та знизу цієї пластини нанесені золоті електроди. Елементи біорозпізнавання зазвичай іммобілізуються на поверхні золота. Після процесу гібридизації відбувається збільшення маси та зменшення резонансної частоти. Мікроваги на основі кварцового кристалу здатні вимірювати зміну маси (внаслідок подій зв'язування), відстежуючи резонансну частоту кристала кварцу. Ці пристрої продемонстрували багатобіччі результати прямого аналізу виявлення ГМО в режимі реального часу без використання мітки. Для обробки сигналів існують спеціальні інтегральні схеми, які здатні значно посилювати слабкі сигнали від біосенсору. Відмічається, що для забезпечення надійних стабільних вимірів сигналу слід враховувати проблеми шуму та інші перешкоди.

Виявлення ГМО з допомогою QCM біосенсору спрямоване не тільки на такі скринінгові послідовності ДНК, як промотор 35S і термінатор NOS, але також на гени Cry1Ab і CP4 EPSPS. Повідомлялось про різні стратегії іммобілізації ДНК проб, наприклад такі як з'єднання біотин-стрептавідин (Mannelli et al., 2003; Minunni et al., 2001), аміногрупами (Karamollaoglu et al., 2009) та з'єднання з використанням тіолу (Mannelli et al., 2003; Minunni et al., 2001). Детально застосування п'єзоелектричних геносенсорів для визначення ГМО описано в роботах (Minunni et al., 2005; Stobiecka et al., 2007; Passamano, Pighini, 2006).

**Електрохімічні геносенсори.** Електрохімічні біосенсори були детально вивчені завдяки їх високій чутливості, економічній ефективності, швидкій реакції та можливості застосуванню водних розчинів (Xu and Wang, 2017; Rezaei et al., 2012; Said et al., 2016; Rezaei et al., 2018). Електрохімічні біосенсори засновані на реакції ферментативного каталізу, в якій звільняються або поглинаються електрони (ферменти належать до класу оксидоредуктаз). Біосенсор зазвичай включає три електроди: електрод порівняння, робочий і допоміжний. На поверхню робочого електрода наносять біологічний матеріал, який відповідає за вибірккову взаємодію з цільовим аналітом утворюючи з'єднання біорецептор-аналіт. Надалі датчик перетворює взаємодію біорецептор-аналіт у вимірювальний сигнал. Різноманітні методи охоплюють цю категорію, перетворюючи біологічні реакції в електричні сигнали або підсилюючи наявні електричні сигнали. Для виявлення ГМО використовуються різні електрохімічні методи, включаючи електрохімічну імпедансну спектроскопію (EIS), циклічну вольтамперометрію (CV), квадратно-хвильову вольтамперометрію (SWV) та анодну вольтамперометрію (ASV) (Arugula et al., 2014).

За допомогою спеціально розроблених комп'ютерних програм для обробки великої кількості даних (Yuhong Zheng et al., 2022) здійснено аналіз наукових публікацій щодо застосування електрохімічних методів для виявлення і аналізу ГМ культур у період з 1993 по 2021 рік. Виходячи з аналізу отриманих даних можна зробити висновки, що хоча в деякі роки була виявлена дещо більша кількість річних публікацій, вибухового зростання публікацій по даній тематиці у зазначений період часу не спостерігалось. Однак, щороку публікується ряд статей з питання виявлення ГМО за допомогою електрохімічних біосенсорів. Статистика вказує також на те, що дослідження з даної тематики не припинялися. Електрохімічні методи залишаються перспективним обладданим варіантом для детектування ГМ культур. Автори визначили п'ять основних журналів, де були опубліковані статті, в яких дослідження проводились з застосуванням електрохімічних методів виявлення ГМ культур в період з 2000 по 2022 рік: Biosensors & Bioelectronics (13), Sensor and Actuators B: Chemical (9), Talanta (8), Analytical chemistry (4), Analyst (3).

Про чутливість метода можна зробити висновки з табл., яка відображає аналітичні дані виявлення ГМО за допомогою електрохімічних сенсорів.

**Таблиця.** Аналітичні дані виявлення ГМО за допомогою електрохімічних сенсорів (адаптовано до Mousavian et al., 2018)

Метод	Організм	Цільова послідовність / ген	Сенсор	Лінійний діапазон
Диференціально-імпульсна анодна інверсійна вольтамперометрія	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Термінатор NOS	Золотий електрод	$8,0 \times 10^{-12}$ - $4,0 \times 10^{-9}$ М
Диференціально-імпульсна анодна інверсійна вольтамперометрія та диференціальна імпульсна вольтамперометрія	Цвітна капуста	CaMV 35S	Золотий електрод	$1,2 \times 10^{-11}$ - $4,8 \times 10^{-8}$ М
Вольтамперометрія з лінійною розгорткою потенціалу	Кукурудза	CBH 351	Одноразовий електрохімічний друкований чіп	20 мМ
Циклічна вольтамперометрія			Референсний електрод (Ag/AgCl дріт); лічильний електрод (платинова котушка)	5-200 нМ
Мікروагаи на основі кварцового кристалу	Соя	CaMV 35S		
Диференціальна імпульсна вольтамперометрія	Соя	Ген A2704-12	Вуглецево-іонний рідкий електрод	$1,0 \times 10^{-12}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ М
Диференціальна імпульсна вольтамперометрія	Соя	Таксон специфічна (лектин) та специфічна до події (RR)	Одноразовий вугільний електрод	2-250 пМ для кожного

Біосенсори на основі ДНК вимагають, щоб послідовність ДНК зонда була іммобілізована на поверхні перетворювача для розпізнавання цільової ДНК або комплементарної послідовності через процедуру гібридизації. Електрохімічний сигнал виявляється за допомогою диференціальної імпульсної вольтамперометрії. Зразок може бути оцінений на основі розміру сигналу на вольтамперограмі та використанням калібрувальної кривої (Mahmoodi et al., 2019; Rezaei et al. 2014; Rezaei et al., 2016). Потенційну відповідь ДНК біосенсора аналізували (Mahmoodi et al., 2019) за допомогою диференціальної імпульсної вольтамперометрії. Послідовність ДНК зонда була іммобілізована на поверхні електрода з трафаретним друком покритим наночастинками золота.

У дослідженні Sun et al. (2007) використовували електрохімічний ДНК біосенсор на основі наночастинок сульфіда кадмію (CdS) для ідентифікації послідовностей зразків, специфічних для ГМО, та діагностики послідовності гена термінатора нопалінсинтази (NOS) (5'-PO4-AC GGA CGA GGT CGT CCG TCC -3'). Модифіковані меркаптооцтовою кислотою наночастинок CdS були ковалентно зв'язані з модифікованими NH<sub>2</sub> олігонуклеотидними послідовностями NOS термінатора (5'-NH<sub>2</sub>-GGA CGG ACG ACC TCG TCC GT-3).

Після цього цільова послідовність одноланцюгової ДНК була зафіксована на золотому електроді меркаптоетанолом, а наночастинок CdS були гібридизовані з цільовою одноланцюговою ДНК на поверхні електрода. Результати показали лінійну кореляцію з концентрацією цільової одноланцюгової ДНК у діапазоні  $8,0 \times 10^{-12}$  –  $4,0 \times 10^{-9}$  М. В іншому дослідженні, проведеному Sun та співавторами (2008), наночастинок сульфіда свинцю (PbS) використовувалися в якості олігонуклеотидних міток для ідентифікації послідовностей вірусу мозаїки цвітної капусти (35S промотор). Наночастинок PbS були з'єднані з олігонуклеотидним зондом, після чого проводилася гібридизація ДНК зонда з цільовою ДНК на золотому електроді. Авторами був визначений відповідний діапазон концентрацій цільової послідовності одноланцюгової ДНК в електрохімічному ДНК біосенсорі на основі наночастинок PbS, який становив  $1,2 \times 10^{-11}$  –  $4,8 \times 10^{-8}$  М. Автори прийшли до висновку, що електрохімічний ДНК біосенсор може бути застосований для виявлення послідовності CaMV 35S в ГМО зразках в перспективі.

Berti та колегами (2009) був розроблений новий електрохімічний геносенсор на основі тонких плівок багатощарових вуглецевих нанотрубок (MWCNT) для виявлення рекомбінантної ДНК у

ГМО продуктах. Цей аналіз виконано з використанням методів немічених та мічених ферментів. В методі з використанням немічених ферментів лінійний відгук оцінювався в 0,5 мМ і 10 мкМ, тоді як у іншому дослідженні з використанням мічених ферментів лінійний відгук спостерігався при концентраціях 5–200 нМ.

Lien та співавтори (2010) використовували ДНК біосенсор на основі поліпіролу (PPy), легованого багат шаровими вуглецевими нанотрубками, для виявлення ГМО у стійкої до гербіцидів сої (RR) за допомогою QCM та EIS методів. ГМО детектування (без мітки) ґрунтувалося на системі C-PPy-ODN. Завдяки покращенню ефективності композитного матеріалу C-PPy-ODN спостерігалось зменшення діапазону цільової концентрації CaMV 35S промотору. Таким чином, можна було зробити висновок, що в діапазоні низьких цільових концентрацій CaMV 35S (25–80 пМ) дані EIS метода добре узгоджувалися з моделлю Рендлса.

Sun et al. (2013) представили електрохімічний ДНК сенсор на основі вугільних електродів, модифікованих оксидом графену (RGO). Сенсор використовувався для чутливого виявлення послідовності цільової одноланцюгової ДНК у послідовності трансгенної сої A2704-12. Автори застосували 1-бутилпіридин гексафторфосфат як з'єднуючу речовину для розробки вуглецевого іонного рідкого електроду. Сенсор працював в діапазоні концентрацій  $1,0 \times 10^{-12}$  –  $1,0 \times 10^{-6}$  М з межею виявлення  $2,9 \times 10^{-13}$  М ( $3\sigma$ ). Враховуючи отримані результати авторами було запропоновано використовувати розроблений електрохімічний ДНК біосенсор для детектування ГМ продуктів.

Електрохімічний геносенсор на основі мультиплексної електрохімічної платформи ДНК для кількісного визначення на фемтомолярному рівні специфічних подій в харчових продуктах був представлений у роботі (Manzanares-Palenzuela et al., 2015). Імобілізація, гібридизація та мічення обох послідовностей (одна націлена на специфічну для події послідовність RR сої, інша — на ген ендогенного лектину) проводилися одночасно в одній пробірці. Автори використовували мічені зонди для гібридизації сендвіч-сигналів з флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) для RR сої або дигоксигенін (Dig) для лектину, а фермент пероксидаза хрому застосовували для зв'язування анти-FITC або сполучення anti-Dig. В обох системах оптимізація кількості циклів ПЛР (30 і 35 циклів ампліфікації для лектину та RR сої, відповідно) призвела до лінійності в межах 53-4425 копій ДНК для RR сої та 1093-88496 копій ДНК для лектинової послідовності у сої. З межею

виявлення (LoD) 53 копій ДНК RR сої (відносна LoD : 0,06 %). Протестований авторами електрохімічний магнітний аналіз в поєднанні з ПЛР виявився високочутливим, результати якого можна порівняти з даними, отриманими методом ПЛР в режимі реального часу.

Manzanares-Palenzuela et al. (2016) запропонували магнітоаналіз, в якому електрохімічне виявлення було інтегроване з кінцевою ПЛР для кількісного аналізу генетично модифікованої сої з подією GTS-40-3-2 (також відомою як Roundup Ready). Електрохімічне вимірювання проводили на вугільних електродах з трафаретним друком. Було отримано лінійний діапазон 2–250 пМ для специфічних подій та таксон специфічних цілей з межами виявлення 650 фМ (160 атомоль) та 190 фМ (50 атомоль) відповідно. Електрохімічний нанобіосенсор на основі розшарованого оксиду графену і вуглецевого електроду та модифікованого золотом наноліжка з трафаретним друком був запропонований Aghili et al. (2017) для кількісного аналізу виявлення ГМО. Отримано лінійний діапазон 40–1100 фМ з межею виявлення 13,0 фМ. Однак потрібно зазначити, що в розроблених електрохімічних ДНК біосенсорах тестовими зразками зазвичай використовувалась синтетична ДНК, референсний зразок з ПЛР або реальний зразок з ПЛР, що можна розглядати скоріше як недолік. Бажано, щоб детектування ГМО з допомогою електрохімічного ДНК біосенсора можна було би проводити без використання ПЛР, використовуючи зразки, отримані безпосередньо з сільськогосподарських культур.

Новий геносенсор, який може якісно та кількісно виявляти генетичні модифікації соєвих бобів, використовуючи простий електрод з рівномірно розподіленими одношаровими наночастинками золота був розроблений Chou et al. (2022). ДНК чутливий електрод був виготовлений шляхом напилення золотої плівки на підкладку з наступним послідовним нанесенням 1,6-гександітіола та золотих наночастинок з сірчаними групами. Оцінювання характеристик запропонованого електроду проводилося із застосуванням метода електричної імпедансної спектроскопії. Метою даного дослідження було безпосереднє виявлення генетично модифікованих культур за допомогою EIS метода. У якості зонда захоплення використовувався промотор CaMV 35S, оскільки відповідно до статистичних даних, більше 80 % ГМ культур були сконструйовані з використанням промотора CaMV 35S та термінатора NOS (Bak and Emerson, 2020). З огляду на даний факт автори відібрали ГМ сою, що містить 35S промотор, з метою розробки недорогої і простої методики виявлення генетичних модифікацій

(Arugula et al., 2013). Що важливо зазначити, для побудови стандартної кривої використовувались не синтезовані фрагменти ДНК, а цільова ДНК, безпосередньо екстрагована з ГМ модифікованої сої. Експериментальні результати засвідчили, що протестований геносенсор може безпосередньо виявляти чужорідні гени у сої. Розробники отримали дві процентні калібрувальні криві. Калібрувальна крива, що відповідає нижньому процентному діапазону (1–6 %), демонструє чутливість  $2.36 \Omega/\%$  при  $R^2 = 0,9983$ , тоді як калібрувальна крива, що відповідає верхньому процентному діапазону (6–40 %), має чутливість  $0.1 \Omega/\%$  за  $R^2 = 0,9928$ . Межа виявлення становить 1 %. Розроблений в даному дослідженні електрод з наночастинками золота є досить чутливим і підходить для якісного та кількісного виявлення ГМ сої, а також може бути додатково застосований для тестування інших ГМ культур в перспективі.

З огляду на аналіз публікації за останні роки привертає увагу дослідження Xia et al. (2024), які розробили CRISPR/Cas12a опосередкований ентропійно керований електрохемілюмінесцентний (ECL) біосенсор для чутливого та специфічного виявлення найпоширенішої у світі трансгенної кукурудзи MON810, стійкої до комах. Також були створені дві крПНК для активації CRISPR/Cas12a, що дозволило йому розрізати ланцюги ДНК. Окрім того, був модифікований тетраедр ДНК (DT) на поверхні золотого електрода з метою зменшення неспецифічної адсорбції. Для ампліфікації відбувається керована ентропією реакція зміщення ланцюга з цільовою ДНК. Розроблена авторами безферментна реакція зміщення ланцюга викликається ентропією та заснована на гібридизації ДНК для забезпечення каскадної ампліфікації сигналу з метою підвищення чутливості аналізу. Процес, відомий як ентропійно кероване зміщення нитки на нозі (ETSD), є ізотермічним і безферментним механізмом ампліфікації, що приводиться в дію ескалацією ентропії (Zhang et al., 2020). Під час ETSD пари основ залишаються незмінними, оминаючи інтерференцію інших нуклеїнових кислот і складних середовищ, що зрештою полегшує розпізнавання мутацій однієї основи та забезпечує виняткову селективність для ідентифікації мішеней (Lv et al., 2015; Connolly and Trau, 2010; Fang et al., 2018).

Біосенсор виявляє задовільну точність і селективність з лінійним діапазоном ECL 1–106 фМ і межею детектування (LOD) 3,3 фМ за методом  $3\sigma$ . Біосенсор не вимагає ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції або складної обробки зразків, що значно підвищує ефективність виявлення трансгенних культур. ECL біосенсор за-

безпечує швидке, чутливе та високоспецифічне виявлення трансгенних культур і має великий потенціал для широкомасштабного застосування в польових умовах.

### **Висновки**

З розвитком генної інженерії, розширенням виробництва харчових продуктів з використанням ГМО сировини особлива увага приділяється моніторингу та виявленню ГМО в харчових продуктах, що обумовлено стурбованістю громадськості щодо наслідків використання ГМО та ГМ продукції. Цей факт викликав інтерес наукової спільноти до розробки ДНК біосенсорів як приладів для виявлення та кількісного визначення ГМО з перспективою розробки автоматизованого процесу в майбутньому для якого не потрібно залучення висококваліфікованого персоналу та вартісного обладнання. З огляду на моніторинг та аналіз наукових досліджень за останній період можна прийти до висновку, що електрохімічні ДНК біосенсори / геносенсори можуть застосовуватись як пристрої для ГМО детектування в польових умовах, що обумовлено в першу чергу їх економічністю, високою чутливістю, простотою у використанні та портативністю. У зв'язку з чим постало питання підвищення продуктивності ДНК біосенсорів, яке може бути вирішено в площині правильного вибору та поєднання обраного методу та іммобілізаційної матриці, що суттєво впливає на ефективну іммобілізацію ДНК зонда. З іншого боку, використання наноматеріалів (наприклад, наночастинок) призводить до збільшення площі поверхні іммобілізації, що дозволяє мобілізувати більше ДНК зондів на матриці, тим самим покращуючи продуктивність геносенсора. Незважаючи на те, що в галузі біосенсорної технології ГМО тестування досягнуто значного прогресу, проте ще багато чого необхідно зробити в цій галузі.

**Фінансування.** Робота виконана в рамках бюджетної теми Інституту «Детекція трансгенних подій на основі методів ізотермічної полімеразної реакції і електрохімічних біосенсорів та аналіз ефективності їх практичного використання» (2020–2024 рр.) (Державний реєстраційний номер: 0120U100936).

### **References**

1. *Bulletin of the Verkhovna Rada (VVR)*, 2023, No.91, p. 354 / *Відомості Верховної Ради (ВВР)*, 2023, № 91, стор. 354 [in Ukrainian].
2. Aghili Z., Nasirizadeh N., Divsalar A., Shoeibi S., Yaghmaei P. A nanobiosensor composed of exfoliated graphene oxide and gold nano-urchins, for detection



- hybridization studies. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2009. Vol. 1. No. 8. P. 1793–1798. <https://doi.org/10.1021/am9003073>.
26. Komen J., Wafula D.K. Authorizing GM crop varieties: policy implications for seed systems in Sub-Saharan Africa. *Agronomy*. 2021. Vol. 11. No. 9. P. 1855.
  27. Labuda J., Brett A.M.O., Evtugyn G., Fořta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 2010. Vol. 82. No. 5. P. 1161–1187. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-09-08-16>.
  28. Lien T. T. N., Lam T. D., An V. T. H., Hoang T. V., Quang D. T., Khieu D. Q., Tsukahara T., Lee Y. H., Kim J. S. Multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs)-doped polypyrrole DNA biosensor for label-free detection of genetically modified organisms by QCM and EIS. *Talanta*. 2010. Vol. 80. P. 1164–1169. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.002>.
  29. Liu G., Su W., Xu Q., Long M., Zhou J., Song S. Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*. 2004. vol. 15. No. 4. P. 303–306.
  30. Liu W., Meng L., Liu X., Liu C., Ji W. Establishment of an ELISA method for quantitative detection of PAT/pat in GM crops. *Agriculture*. 2022. Vol.12. No. 9. 1400. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091400>.
  31. Mahmoodi P., Fani M., Rezayi M., Avan A., Pasdar Z., Karimi E., Amiri I.S., Ghayour-Mobarhan M. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. *Biofactors*. 2019. Vol. 45. No. 2. P. 101–117. <https://doi.org/10.1002/biof.1465>.
  32. Mannelli I., Minunni M., Tombelli S., Mascini M. Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosens. Bioelectron*. 2003. Vol. 18. No. 2–3. P. 129–140.
  33. Manzanares-Palenzuela C. L., de-los-Santos-Álvarez N., Lobo-Castañón M. J., López-Ruiz B. Multiplex electrochemical DNA platform for femtomolar-level quantification of genetically modified soybean. *Biosens. Bioelectron*. 2015. Vol. 68. P. 259–265.
  34. Manzanares-Palenzuela C. L., Mafra I., Costa J., Barroso M. F., de-los-Santos-Álvarez N., Delerue-Matos C., Oliveira M. B. P., Lobo-Castañón M. J., López-Ruiz B. Electrochemical magnetoassay coupled to PCR as a quantitative approach to detect the soybean transgenic event GTS40-3-2 in foods. *Sens. Actuators B Chem*. 2016. Vol. 222. P. 1050–1057.
  35. Minunni M., Tombelli S., Fonti J., Spiriti M. M., Mascini M., Bogani P., Buiatti M. Detection of fragmented genomic DNA by PCR-free piezoelectric sensing using a denaturation approach. *J. Am. Chem. Soc*. 2005. Vol. 127. No. 22. P. 7966–7967. <https://doi.org/10.1021/ja051345q>.
  36. Minunni M., Tombelli S., Pratesi S., Mascini M., Piatì P., Bogani P., Buiatti M. A piezoelectric affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Anal. Lett*. 2001. Vol. 34. No. 6. P. 825–840. <https://doi.org/10.1081/AL-100103595>.
  37. Mousavian S. Z., Safarian M., Tavakoly Sany S. B., Pasdar Z., Rezayi M. Advancement in electrochemical DNA biosensors for GMO detection: Review Study. *J Nutrition Fasting Health*. 2018. Vol.6. No.4. P. 168–173.
  38. Noguchi A., Akiyama H., Nakamura K., Sakata K., Minegishi Y., Mano J., Takabatake R., Futo S., Kitta K., Teshima R., Kondo K., Nishimaki-Mogami T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *Eur. Food Res. Technol*. 2014. Vol. 240. No. 2. P. 413–422.
  39. Passamano M., Pighini M. QCMDNA-sensor for GMOs detection. *Sens. Actuator B: Chem*. 2006. Vol. 118. No. 1–2. P. 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.012>.
  40. Ponti L. Transgenic crops and sustainable agriculture in the European context. *Bull. Sci. Technol. Soc*. 2005. Vol. 25. No. 4. P. 289–305. <https://doi.org/10.1177/0270467605277292>.
  41. Rezayi M., Ghayour-Mobarhan M., Tavakoly Sany S. B., Fani M., Avan A., Pasdar Z., Ferns G. A., Abouzari-Lotf E., Amiri I. S. A comparison of analytical methods for measuring concentrations of 25-hydroxy vitamin D in biological samples. *Anal. Methods*. 2018. Vol. 10. No. 47. P. 5599–5612.
  42. Rezayi M., Gholami M., Said NR, Alias Y. A novel polymeric membrane sensor for determining titanium (III) in real samples: Experimental, molecular and regression modeling. *Sensors Actuators B: Chem*. 2016. Vol. 224. P. 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.089>.
  43. Rezayi M., Karazhian R., Abdollahi Y., Narimani L., Tavakoly Sany S.B., Ahmadzadeh S., Alias Y. Titanium (III) cation selective electrode based on synthesized tris(2pyridyl) methylamine ionophore and its application in water samples. *Sci. Rep*. 2014. Vol. 4. P. 4664. <https://doi.org/10.1038/srep04664>.
  44. Said N. R., Rezayi M., Narimani L., Al-Mohammed N., Manan N. S. A., Alias Y. A new N-heterocyclic carbene ionophore in plasticizer-free polypyrrole membrane for determining Ag<sup>+</sup> in tap water. *Electrochim. Acta*. 2016. Vol. 197. P. 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.02.173>.
  45. Sánchez-Paniagua López M., Manzanares-Palenzuela C. L., López-Ruiz B. Nearly 25 years of research. *Critical Rev. Anal. Chem*. 2018, Vol. 48. No. 5. P. 391–405. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1442708>.
  46. Stobiecka M., Cieřla J.M., Janowska B. Tudek B., Radecka H. Piezoelectric sensor for determination of genetically modified soybean Roundup Ready (R) in samples not amplified by PCR. *Sensors*. 2007. Vol. 7. No. 8. P. 1462–1479. DOI: 10.3390/s7081462.
  47. Sun W., Zhang Y., Hu A., Lu Y., Shi F., Lei B., Sun Z. Electrochemical DNA biosensor based on partially reduced graphene oxide modified carbon ionic liquid electrode for the detection of transgenic soybean

- A2704-12 gene sequence. *Electroanalysis*. 2013. Vol. 25. No. 6. P. 1417–1424.
48. Sun W., Zhong J., Qin P., Jiao K. Electrochemical biosensor for the detection of cauliflower mosaic virus 35 S gene sequences using lead sulfide nanoparticles as oligonucleotide labels. *Anal. Biochem.* 2008. Vol. 377. No. 2. P. 115–119.
49. Sun W., Zhong J., Zhang B., Jiao K. Application of cadmium sulfide nanoparticles as oligonucleotide labels for the electrochemical detection of NOS terminator gene sequences. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 389. No. 7–8. P. 2179–2184.
50. Wang R., Minunni M., Tombelli S., Mascini M. A new approach for the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 20. No. 3. P. 598–605. [https://doi.org/ 10.1016/j.bios.2004.03.013](https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.03.013).
51. Wang R., Tombelli S., Minunni M., Spiriti M.M., Mascini M. Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing. *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 20. No. 5. P. 967–974. [https://doi.org/ 10.1016/j.bios.2004.06.013](https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.06.013).
52. Xia Z., Zhang J., Pan R., Zhang K., Dai H. CRISPR/Cas12a-mediated entropy-driven electrochemical biosensor for detection of genetically modified maize Mon810. *Analytica Chimica Acta* 1296 (2024) 342290. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342290>.
53. Xu M., Wang R., Li Y. Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Talanta*. 2017. No. 162. P. 511–522.
54. Zhang Y., Wang W., Lin Z., Liu B., Zhou X. Dual-output toehold-mediated strand displacement amplification for sensitive homogeneous electrochemical detection of specie-specific DNA sequences for species identification. *Biosens. Bioelectron.* 2020. 161. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112256>.
55. Zhao Z., Chen Y., Xu W., Ma M. Surface plasmon resonance detection of transgenic Cry1Ac cotton (*Gossypium* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61. No. 12. P. 2964–2969. [https://doi.org/ 10.1021/jf3050439](https://doi.org/10.1021/jf3050439).
56. Zhu D., Liu J., Tang Y., Xing D. A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead-based electrochemiluminescence. *Sens. Actuator B: Chem.* 2010. Vol. 149. No. 1. P. 221–225. [https://doi.org/ 10.1016/j.snb.2010.05.047](https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.047).

## DEVELOPMENT OF BIOSENSOR TECHNOLOGIES FOR THE DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

V. D. Naumenko, F. N. Patsyuk, A. I. Yemets, Ya. B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, str. Baidy-Vyshnevetskohe, 2a email: [naumenko.valentina88@gmail.com](mailto:naumenko.valentina88@gmail.com)

In the nearly three decades since genetically modified organisms (GMOs) were first commercialized, genetically modified (GM) crops have gained an advantage over their conventional counterparts. The main traits introduced into commercialized plants are herbicide and pest resistance. The introduction of GM crops into agriculture has led to increased crop productivity. Despite their rapid and widespread introduction, GMOs have raised public concerns about their effects on human health and the environment, leading to consumer concerns about the safety of transgenic foods. The need to monitor and verify the presence of GMOs in crops and foods has sparked interest in developing analytical methods for sensitive, accurate, rapid, and low-cost GMO detection. DNA biosensors (genosensors) have been conceived as a new DNA detection technology that can replace current amplification-based methods that require expensive equipment and highly skilled personnel. This review summarizes a review of a number of studies on the application of gene sensor technology for qualitative and quantitative detection of transgenic traits.

**Keywords:** GMO, biosensor, DNA biosensor, optical, piezoelectric, electrochemical.