

PŘEHLED METOD DETEKCE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ V POTRAVINÁCH A POTRAVINÁŘSKÝCH SUROVINÁCH

KAMILA ZDEŇKOVÁ, JARMILA PAZLAROVÁ,
MARTINA MACKOVÁ a KATEŘINA DEMNEROVÁ

Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 27.VIII.2001

Klíčová slova: geneticky modifikovaný organismus, detekce nukleových kyselin, detekce proteinu

Obsah

1. Úvod
2. Metody založené na detekci nukleových kyselin
 - 2.1. Polymerasová řetězová reakce
 - 2.1.1. Detekce GMO v potravinách a potravinářských surovinách pomocí PCR reakce
 - 2.1.2. Kvantifikace GMO v potravinách pomocí PCR
 - 2.1.2.1. Kvantitativní kompetitivní polymerasová řetězová reakce (QC PCR)
 - 2.1.2.2. Real-Time PCR
 - 2.1.3. Omezení PCR detekce GM potravin
 - 2.1.3.1. Degradace DNA
 - 2.1.3.2. Inhibice PCR
 - 2.1.4. Mikročipy
 - 2.2. Southernův přenos
 - 2.3. Analýza RNA
3. Metody založené na detekci proteinu
 - 3.1. Imunometody
 - 3.2. Určení aktivity produktu transgenu
4. Ostatní techniky používané pro detekci GMO
 - 4.1. Chromatografie
 - 4.2. Infračervená spektroskopie
5. Závěr

1. Úvod

Jako geneticky modifikovaný organismus (GMO) je označován organismus, kromě člověka, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací (definice ze zákona č. 153/2000 Sb.¹). Genetické modifikace (GM) jsou přímé a cílené zásahy do dědičného materiálu organismu či změna genetického materiálu záměrným vnesením cizorodé informace do hostitelského orgánu. Termín transformace je používán pro označení procesu vnesení cizorodé DNA (cit.²).

Základem genových technologií je fakt, že chemické složení a molekulární struktura deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je nositelkou dědičnosti, a způsob, jímž se uspořádání

bází DNA promítá do uspořádání aminokyselin v bílkovinách (genetický kód), jsou pro všechny živé organismy totožné. Je tedy možné přenášet hmyzí nebo rostlinné geny do buněk savců nebo lidské geny do bakterií.

Mezi geneticky modifikované organismy jsou řazeny organismy, do kterých byl pomocí metod genetického inženýrství vnesen gen o známém složení a funkci, nesoucí pouze požadovanou vlastnost. Ostatní geny zůstanou prakticky nedotčeny.

Uplatnění moderních biotechnologických postupů v zemědělství a v potravinářském průmyslu přináší značné úspory nákladů a může pomoci vyřešit problém nedostatku potravin způsobený neustále se zvyšující populací obzvláště v zemích třetího světa. Na druhé straně je při využívání GMO nezbytná opatrnost vzhledem k tomu, že možné nežádoucí projevy by mohly negativně ovlivňovat ostatní organismy včetně člověka. Rychlý, intenzivní výzkum a vývoj této technologie a kontrola jejího použití jsou však předpokladem, že zkušenosti budou přibývat, a tím omezení klesat³.

Možnost nežádoucích projevů musí být nezbytně respektována. V současné době v řadě zemí celého světa platí určitá omezení pro distribuci, prodej a využití GMO. V České republice podléhá proces nakládání s GMO zákonu č. 153/2000 Sb. Tento zákon byl schválen v květnu 2000, příslušné vyhlášky v říjnu téhož roku. Zákon zahrnuje problematiku „uzavřeného“, tj. v podstatě laboratorního nakládání s GMO, uvádění GMO do prostředí a do oběhu (na trh). Dále byla v České republice v r. 2000 schválena novela zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích ve znění zákona č. 306/2000. Novelizovaná vyhláška č. 324/1997 ve znění 24/2001 čl. 7 Sb. byla schválena 17.1.2001 s platností od 1.6.2001 s výjimkou paragrafu týkajícího se povinnosti značit geneticky modifikované potraviny s obsahem transgenní DNA 1 % a výše (bude uvedena v platnost 1.1.2002).

V současné době je výzkum zaměřen na přenos příslušných genových sekvencí do potravinářsky významných rostlin jako rýže, pšenice, ječmen, žito, rajčata, fazole a hrách². Mimo to se pracuje na zlepšení vlastností dalších druhů ovoce a zeleniny (brokolice, maliny, meloun apod.). Vedle zemědělských plodin lze očekávat další rozvoj přípravy geneticky modifikovaných mikroorganismů používaných při výrobě potravin (startovací kultury v mlékárenském průmyslu²), pivovarské kvasinky, pekařské droždí, v oblasti průmyslových rostlin pro přípravu farmak a plastů, živočichů pro přípravu farmak, možnosti využití zvířecích orgánů pro transplantace.

Kontrola potravinářských surovin i samotných potravin a určování přítomnosti transgenů je dnes široce se rozvíjející vědní oblast, která spojuje znalosti genetického inženýrství, biochemie, mikrobiologie a dalších vědních disciplín. Při detekci GMO jsou kladeny vysoké požadavky na specifičnost a citlivost používaných postupů. Základní schéma detekce GMO zahrnuje odběr reprezentativního vzorku matrice, extrakci nukleových kyselin nebo proteinů, testovací metody potvrzující přítomnost transgenu, identifikaci transgenu a jeho kvantifikaci. Běžně používané postupy jsou shrnuty v tabulce I.

Tabulka I

Techniky běžně používané pro detekci geneticky modifikovaných organismů

Detekce nukleových kyselin	detekce DNA	PCR a její aplikace (multiplex PCR, nested PCR) kvantitativní kompetitivní PCR (QC PCR) Real-Time PCR Southernův přenos mikročipy reverzní transkripce – PCR (RT-PCR) northern hybridizace RPA (Ribonuclease Protein Assay) ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) western přenos (Imunoblot)
	detekce RNA	
Detekce proteinu	imunometody	
Ostatní techniky	určení aktivity produktu transgenu chromatografie infračervená spektroskopie	

2. Metody založené na detekci nukleových kyselin

Pro detekci GMO bývají často používány metody založené na detekci nukleových kyselin (NK). Mezi vhodné metody patří polymerasová řetězová reakce (PCR) a její variace – multiplex PCR, nested PCR, kvantitativní kompetitivní PCR (QC PCR), Real-Time PCR, reverzní transkripce – PCR (RT-PCR), Southern hybridizace, northern hybridizace a ribonuclease protein assay (RPA), založená na specifické vazbě bílkoviny na nukleovou kyselinu. Jedním z prvních kroků testů založených na detekci NK je jejich extrakce z testovaného vzorku potravin a potravinářských surovin. Extrakce nukleových kyselin zahrnuje lyzi buněčných membrán, inaktivaci buněčných nukleas a separaci nukleových kyselin od zbytků buněk. Efektivita metod založených na detekci nukleových kyselin závisí na kvalitě a čistotě extrahovaných nukleových kyselin. Kvalita DNA je udávána délkou fragmentů a stupněm poškození, které může být způsobeno vyššími teplotami, nízkým pH prostředí nebo působením nukleas. Některé typy potravin (např. pyré) jsou náročnější na výběr vhodné extrakční metody a purifikačního procesu (kapitola 2.1.3.).

Množství extrahované DNA lze stanovit elektroforeticky, fluorometricky nebo spektrofotometricky pomocí UV světla o vlnové délce 260 nm. Čistota extrahované DNA bývá určena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm.

2.1. Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je *in vitro* reakce umožňující namnožení definovaných úseků DNA. Reakce je katalyzována termostabilní DNA polymerasou, např. *Taq* DNA polymerasou izolovanou z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. K namnožení cílové DNA se používá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s komplementárními řetězci DNA.

Vlastní PCR se skládá z cyklického opakování 3 základních kroků:

- 1) oddělení vláken dvojšroubovice DNA teplotní denaturací,
- 2) připojení primerů k jejich komplementárním úsekům v DNA (annealing),

3) elongace primerů *Taq* polymerasou.

Počet těchto cyklů (zpravidla 35 nebo 40) závisí na koncentračních poměrech v reakční směsi, požadovaném výtěžku a životnosti enzymu.

PCR umožňuje specifické a citlivé namnožení nízkého množství cílových sekvencí DNA. V takovém případě se jako post-PCR detekce většinou používá horizontální elektroforéza v agarosovém gelu. Při tomto způsobu detekce amplifikovaných produktů existuje riziko, že dojde k záměně nespecificky namnoženého úseku a specifického PCR produktu, zvláště pokud se jedná o produkty podobné velikosti. Pro snížení rizika získání falešně pozitivních výsledků může být produkt namnožení podroben následnému štěpení restrikčními endonukleasami^{4,5}.

Pro charakterizaci a konfirmaci PCR produktu je dále možné použít sekvenci DNA či Southernův přenos s digoxigeninem značenou oligonukleotidovou probou⁶. Po elektroforetickém dělení lze pomocí Southernova přenosu produktů potvrdit, že sekvence mezi primery je hledanou sekvencí⁶. Tento krok je velmi časově náročný, v praxi je zřídka využíván. Přístup je v souladu s postupem doporučeným pro analýzu geneticky modifikovaných brambor ve shodě s § 35 German Food Act⁷.

2.1.1. Detekce GMO v potravinách a potravinářských surovinách pomocí PCR reakce

Detekce GMO v potravinách pomocí PCR je komplexním víceparametrovým problémem. Proces určování přítomnosti GMO je složen z izolace templátové DNA (pre-PCR), vlastní PCR reakce, detekce namnožených produktů a vyhodnocení získaných údajů (post-PCR).

Kritické faktory pro pre-PCR jsou následující:

- homogenita analyzovaného vzorku,
- izolace templátové DNA,
- standardní proces pro odhad koncentrace genomové DNA a všech reakčních činidel používaných v reakci.

Pro PCR reakci jsou kritické tyto body:

- nastavení reakčních parametrů,
- dávkování reaktantů,
- teplotní a časový program.

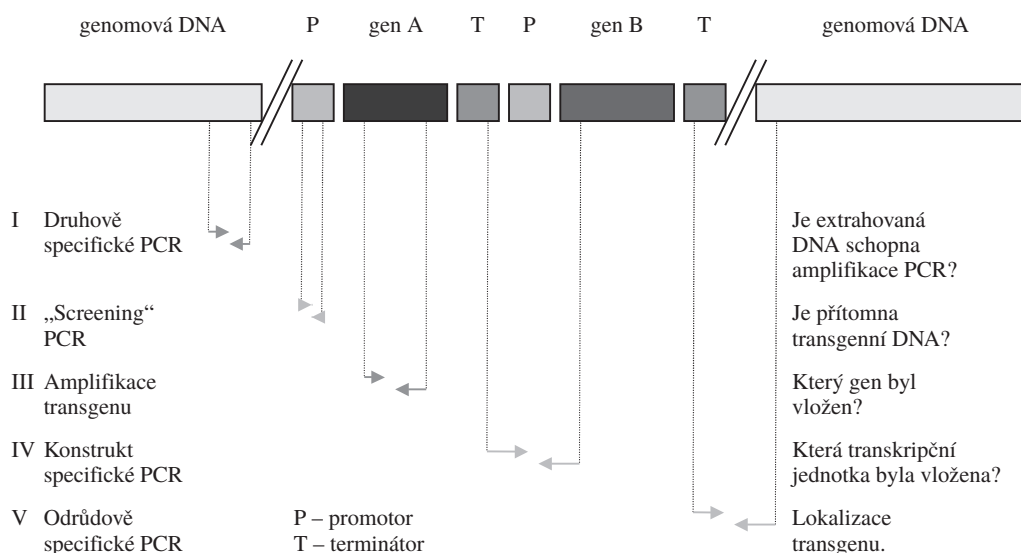


Schéma 1. Používaný PCR systém detekce geneticky modifikovaných potravin a potravinářských surovin

Pro post-PCR proces je kritickým bodem citlivost detekce amplifikovaných produktů.

V současné době jsou v evropských kontrolních potravinářských laboratořích specificky detegovány transgenická DNA sekvence převážně prostřednictvím PCR reakce. Vedle specifických metod jsou rozvíjeny (a již k dispozici) screeningové metody umožňující detekci téměř jakéhokoliv schváleného transgenu². PCR je používáno pro rychlé analýzy vysokých počtů vzorků. Je-li reakční produkt kratší než cca 1000 bp, může použití relativně dlouhých primerů (25–30 nukleotidů) s vysokou teplotou připojení ($T_m \sim 65\text{--}68^\circ\text{C}$) pomoci zabezpečit přesnost reakce. Pro reprodukovatelnou detekci je rozhodující zajištění dostatečné citlivosti primerů, umístění primerů ovlivňuje informační hodnotu produktu PCR. Ve schématu 1 je znázorněn používaný PCR systém detekce geneticky modifikovaných organismů. Schéma ukazuje předem připravenou rostlinnou transkripční jednotku obsahující promotor (P), kódující sekvence (A, B) a terminátor (T). Dále jsou znázorněny rozdílné pozice komplementárních primerů a informace, které je možno získat z výsledků polymerasové řetězové reakce. Pokud jsou v dané reakci použity primery komplementární ke genomové DNA, ze získaných výsledků můžeme určit, je-li extrahovaná deoxyribonukleová kyselina schopna namnožení PCR procesem (viz schéma – úroveň I, Druhově specifické PCR). Např. u potravin částečně vyrobených z transformované sóji je prováděna detekce sójového lecitinového genu⁸. V případě použití primerů komplementárních k regulačním sekvencím mohou získané výsledky potvrdit přítomnost transgenické DNA v testovaném vzorku potravin nebo potravinářské suroviny (úroveň II, „Screening“ PCR). Příkladem je kvalitativní PCR systém specifický pro originální sekvence 35S promotoru viru květákové mozaiky (P-35S promotor) či nos terminátoru z půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, jež patří mezi nejčastěji používané regulační sekvence při cíleném přenosu genů do rostlinných buněk pomocí *A. tumefaciens*⁹. Prostřednictvím primerů nasedajících uvnitř trans-

genické DNA bývá určen vložený gen (úroveň III, Amplifikace transgenu). Primery komplementární k regulační sekvenci a genu určují vloženou transkripční jednotku (úroveň IV, Konstrukt specifické PCR) a primery amplifikující úsek mezi regulační sekvencí a genomovou DNA určují druh transgenického organismu (úroveň V, Odrůdově specifické PCR).

Detekce genetických markerů indukujících genetické modifikace bývají také prováděny použitím specifického a citlivého namnožení DNA pomocí PCR procesu. Počet selekčních genů používaných při genových modifikacích rostlin je velmi široký, nejčastěji jsou používány geny kódující enzymy β -glukuronidasu (GUS) a luciferasu. V poslední době byl popsán autofluorescenční protein z medúzy tzv. green fluorescence protein (GFP), počet jeho použití jako markerového enzymu vkládaného do rostlin stále vzrůstá. Markery jsou velmi výhodné pro studium exprese transgenu, charakterizaci promotoru a rychlý screening velkého množství transformantů¹⁰.

Pomocí PCR metody může být prokázána pouze přítomnost sekvencí komplementárních ke zvoleným primerům. Získané výsledky nenaznačují, zda je templát DNA integrovaný do genomu rostliny ani jeho koncentraci. Vývoj kvantitativní PCR metody otevírá možnost použití této technologie pro zjišťování výsledků dříve získaných pomocí Southern hybridizace, např. odhad počtu kopií transgenu¹⁰.

Obměnou tradiční polymerasové řetězové reakce může být přidání násobného množství párů primerů do reakční směsi – multiplex PCR. Tato modifikace umožňuje analyzovat více parametrů v průběhu jednoho reakčního procesu, což je zvláště výhodné právě při detekci geneticky modifikovaných organismů. Přítomnost více párů primerů v reakční směsi však může způsobovat mnoho problémů, např. zvyšovat tvorbu nesprávných PCR produktů či diskriminaci delších DNA fragmentů¹¹. Pro multiplex PCR proces jsou vybírány primery s podobnou teplotou připojení (T_m). Délka namnožených produktů by měla být blízká, při větších rozdílech bývá upřednostňována ampli-

fikace kratšího úseku, což má za následek odlišné množství namnožených produktů. Ke snížení těchto rozdílů se v reakční směsi pro multiplex PCR používá pufr obsahující přísady *Taq* polymerasy, který snižuje konkurenci mezi amplikony, a tím diskriminaci delších fragmentů.

Ke zvýšení citlivosti a přesnosti může být použito tzv. nested PCR, která je složena ze dvou po sobě následujících amplifikačních reakcí s 15–30 reakčními cykly. Templátem první reakce je DNA získaná extrakcí vzorku, templátem druhé je produkt získaný reakcí první. Jako primery jsou použity dva druhy oligonukleotidové sekvence (vnitřní a vnější). Vnitřní primery jsou komplementární k oblasti produktu získaného první reakcí¹². Protipólem zvýšené citlivosti je však vzrůstající riziko kontaminace. Přesnost je zvýšena díky faktu, že tato technika skoro vždy eliminuje namnožení nespecifických amplifikačních produktů. S vysokou pravděpodobností není žádný nespecifický produkt vznikající v průběhu první amplifikace dostatečně komplementární k vnitřním primerům. Z tohoto důvodu nemůže sloužit jako templát pro druhou PCR amplifikaci.

Závažnou chybou při analýze vzorků pomocí PCR je vznik falešně pozitivních a negativních výsledků. K detekci falešně pozitivních výsledků může dojít tak, že materiál připravený k vyšetření je v laboratorii kontaminován amplikony, které se dostaly do vzduchu během pipetování jiného, již amplifikovaného vzorku nebo příměsí GM organismu při zpracování testovaného vzorku. K falešně pozitivnímu výsledku stačí zcela nepatrná příměs směsi spadlá do dosud nezpracovaného vzorku. Riziko lze snížit důsledným prostorovým oddělením jednotlivých operací, používáním laminárních boxů, špiček s filtry zabráňujícími kontaminaci mechaniky pipet. Pro eliminaci nesprávných výsledků je vhodné do každé série testovaných vzorků zařadit pozitivní a negativní kontrolu. Jako negativní kontrola může být použita nemodifikovaná DNA nebo sterilní voda, jako pozitivní kontrola pak ověřená cílová sekvence. Výsledky získanými amplifikací negativní kontroly je ověřena nepřítomnost kontaminace reagentů, používaných přístrojů, pomůcek i pracovního prostředí. Pozitivní kontrolou bývá ověřena funkčnost všech kroků procesu, a tím zabránění zisku falešně negativních výsledků.

2.1.2. Kvantifikace GMO v potravinách pomocí PCR

Hlavním nedostatkem tradiční PCR je nepřesná kvantifikace, která je závislá na účinnosti amplifikačního procesu. Jestliže je reakční efektivita (*E*) konstantní pro každý reakční cyklus, koncentrace PCR produktu je úměrná množství počáteční cílové DNA. Efektivita však není parametrem konstantním, ale proměnným, ať již v rámci různých reakcí či v průběhu jedné reakce. Zejména v posledních cyklech polymerasové řetězové reakce, kdy jsou produkty tvořené v neexponenciální fázi neznámou reakční rychlostí. Za účelem dosažení maximální citlivosti PCR procesu je množství vytvořeného produktu měřeno v závěrečné fázi, kdy amplikon dosáhne maximálního výtěžku („plato fáze“). V této fázi procesu je korelace mezi koncentrací produktu a počátečním množstvím cílové DNA jen velmi nízká^{13–15}. Pro kvantifikaci DNA jsou používány techniky založené na principu PCR, takové jako kvantitativní kompetitivní polymerasová řetězová reakce (QC PCR) a Real-Time PCR, které vyřešily problém určení vztahu mezi koncentrací cílové DNA sekvence a množstvím

PCR produktu vytvářeného během amplifikace. Nalezená řešení jsou následující:

1. Společná amplifikace cílové sekvence a vnitřního standardu v případě kvantifikace cílové sekvence pomocí QC PCR.
2. Měření PCR produktu v počátečních fázích reakce, kdy je *E* stále ještě konstantní, a proto jsou koncentrace produktu v korelaci s počáteční koncentrací cílové DNA sekvence. Tohoto principu využívají metody Real-Time PCR a PCR-ELISA.

Kritické body pro kvantitativní analýzu jsou selektivita reakce, reprodukovatelnost, přesnost a detekční limit¹⁰.

2.1.2.1. Kvantitativní kompetitivní polymerasová řetězová reakce (QC PCR)

Principem kvantitativní kompetitivní PCR metody (QC PCR) je amplifikace vnitřního DNA standardu společně s cílovou DNA. Kvantifikace přítomného GMO ve vzorku je dosaženo elektroforeticky, porovnáním intenzity proužku PCR produktu získaného namnožením cílové sekvence s vnitřním standardem^{16,17}. Rozdíl ve velikosti produktů se pohybuje maximálně v desítkách párů bazí¹⁸. QC PCR metoda byla úspěšně testována v mezinárodním kruhovém testu pro kvantitativní stanovení transgenů sóji Roundup Ready[®] a kukuřice Maximizer[®] (cit.¹⁶).

2.1.2.2. Real-Time PCR

Při Real-Time PCR dochází k monitorování vznikajícího produktu v průběhu celého amplifikačního procesu a kvantifikace je provedena v exponenciální fázi syntézy DNA¹⁹. První aplikací byl systém založený na fluorimetrickém měření vnitřní sondy. Tato vnitřní sonda je složena z krátkého DNA fragmentu, který obsahuje fluorofor i zhasěč fluorescence. Díky jejich vzájemné blízkosti potlačuje zhasěč všechnu fluorescence ozářeného fluoroforu. DNA sekvence sondy je navržena uvnitř cílové sekvence. V průběhu každého cyklu je stejně jako při klasické polymerasové reakci dvojitá vlákna DNA nejdříve separována na jednotlivá vlákna, dále dochází k nasazení primerů a vnitřní sondy, posledním krokem je polymerase DNA polymerasou. DNA polymerasy používané v Real-Time PCR reakci vykazují silnou 5'–3' exonukleasovou aktivitu, v průběhu reakce tedy štěpí vnitřní sondu na jednotlivé nukleotidy. V tomto stadiu se zhasěč a fluorofor již nenacházejí v dostatečné blízkosti, a proto dochází k nárůstu fluorescenčního signálu. Další postup je založen na použití dvou vnitřních sond s fluoroforem (na 3' konci hybridizační sondy 1) a zhasěčem fluorescence (na 5' konci hybridizační sondy 2). Sondy jsou navrženy k nasazení blízko sebe uvnitř cílové sekvence. První fluorofor po excitaci vnějším zdrojem emituje světlo, které je zachyceno druhou sondou, ovšem jen za předpokladu, že se obě sondy nacházejí v těsné blízkosti. V průběhu elongace dochází k uvolnění vnitřních sond, a tím k jejich oddálení. Druhá sonda tedy nezachytává energii vyslanou první, tím dochází k nárůstu fluorescence, která je měřena po nasazení primerů v každém reakčním cyklu²⁰.

Také je možno použít SYBR Green I, barvivo, které se váže na dsDNA. Pokud je barvivo SYBR Green I nenavázané, je intenzita jeho fluorescenčního signálu velmi nízká. Po

teplotní denaturaci je DNA rozpletena na jednotlivá vlákna, nasednutím primerů dojde k vytvoření krátkého úseku dsDNA, na kterou může být navázán SYBR Green I. V průběhu elongace dochází k zapolymerování vzrůstajícího množství barviva. K měření fluorescence dochází v každém cyklu, a to na konci elongační fáze. Začátek vzrůstu závisí na počáteční koncentraci cílové sekvence DNA²⁰.

Ačkoliv je vysoká cena nástrojů a specifických reagensů překážkou pro mnoho laboratoří, Real-Time PCR může být považován za v současné době nej přesnější a nejvýhodnější z dostupných kvantitativních metod.

2.1.3. Omezení PCR detekce GM potravin

Pro svou rychlost, citlivost a specifičnost je PCR potenciálně velmi účinnou metodou detekce GM potravin. Významný vliv na výsledky získané PCR metodou může mít proces zpracování potravin.

2.1.3.1. Degradace DNA

Různé faktory přispívající degradaci DNA při zpracování potravin můžeme rozdělit na chemické, fyzikální a enzymové. Mezi tyto faktory jsou řazeny například:

- dlouhotrvající tepelná úprava, jako např. autoklávování používané při konzervářských procesech, může mít za následek hydrolyzu DNA na menší fragmenty nebo takové chemické modifikace DNA, které znemožňují PCR proces. Z tohoto důvodu může analýza konzervovaných potravin poskytovat falešně negativní výsledky,
- analýzu také znesnadňuje vzrůst chemické modifikace a hydrolyzy DNA při nízkém pH, např. výrobky konzervované v octu nebo rajčatové pyré a produkty z rajských jablíček, jako třeba kečup. U těchto druhů potravin je analýza velmi obtížná a získané výsledky nemusí být správné,
- při prodlouženém skladování čerstvých potravin může docházet k enzymatické degradaci DNA pomocí nukleas.

2.1.3.2. Inhibice PCR

Problémem při použití metody PCR pro analýzu GM potravin je přítomnost inhibitorů reakce v testovaném materiálu, které redukují účinnost amplifikačního procesu. Do této skupiny patří mnoho běžných složek potravin:

- kationy: např. Ca^{2+} , Fe^{3+} ,
- těžké kovy,
- uhlovodíky,
- tanin (kyselina tříslová), fenoly,
- soli: např. NaCl, dusitany.

Studie popisované v literatuře indikují, že stupeň inhibice PCR je velmi závislý na typu potravin, např. vařená šunka vykazuje malou nebo žádnou inhibici, zatímco různé druhy měkkých sýrů kompletně inhibují PCR proces. Toto může vést k potenciálním analytickým problémům, např. jestliže byl analyzován obsah GM sóji v různě plněných pečivech, a to šunkou, měkkým sýrem, šunkou i měkkým sýrem zároveň²¹.

PCR inhibice může snadno vést k falešně negativním výsledkům, především jestliže je GM potravina analyzována v laboratoři, kde nemají dostatečné zkušenosti s analýzou potravin pomocí PCR metody. Znalost pravděpodobných in-

hibitorů v testovaných vzorcích může přispět k výběru vhodné analýzy, modifikaci rutinní extrakce a PCR procesu. V některých případech je možné snížit inhibiční efekt zředěním extraktu, čímž dochází ke zředění DNA i přítomných inhibitorů. Toto však nelze použít, pokud je koncentrace DNA ve vzorku nízká. V takovém případě mohou být extrahované nukleové kyseliny dále přečištěny a zakonzentrovány. Také přidávek PCR „enhancer“ do reakce snižuje stupeň inhibice. Takové analytické modifikace mohou zabránit získání falešně negativních výsledků a umožňují zvýšit důvěryhodnost získaných výsledků. Na druhé straně zvyšují čas a cenu analýzy²¹.

2.1.4. Mikročipy

Rychlý rozvoj molekulárně genetických metod umožňuje přípravu GMO, které obsahují nové znaky, vyšší množství a rozmanitost vkládaných genů i regulačních prvků. Např. Hemmer⁹ již publikoval některé schválené GM plodiny neobsahující promotor P-35S ani nos terminátor. Z toho vyplývá i potřeba analýzy vyššího množství genetických modifikací. To pak vyžaduje vývoj nových automatizovaných systémů, které mohou snížit nejen čas, ale i náklady analýz jako např. systémy založené na mikročipech^{22–24}. Principem je spojení teplotní řetězové reakce a mikročipové gelové elektroforézy. Pojetí je založeno na miniaturizaci nástřiku, zpracování i analýze vzorku v jednoduchém zařízení. Toto uspořádání dovozuje rychlou (cca 1 minuta/cyklus) a účinnou amplifikaci DNA na čipech následovanou elektroforetickým rozdělením a detekcí amplifikovaných produktů. Ke snížení času analýzy dochází redukcí počtu potřebných termálních cyklů. Metoda umožňuje detekci PCR produktů po proběhnutí pouhých 10 termálních cyklů, s celkovým časem analýzy okolo 20 minut. Počáteční koncentrace cílové sekvence DNA bývá nižší než 15 kopií v nástřikovaném objemu²⁵.

Ačkoliv již bylo publikováno několik článků o PCR-mikrosystémech rozdílné složitosti^{25–27}, jen některé aplikace byly dále rozvíjeny pro detekci DNA. Jednou z nich je surface plasmon resonance (SPR), která může být aplikována jak při detekci DNA, tak proteinů²⁸. Minunni a spolupracovníci²⁹ navrhli použití biosenzorů, včetně SPR pro GMO analýzu. Obdrželi předběžné dobré výsledky s elektrochemickým biosenzorem s imobilizovanými oligonukleotidovými probami komplementárními k P-35S promotoru a nos terminátoru. Testovaný systém byl více citlivý pro detekci P-35S promotoru než nos terminátoru²⁹.

2.2. Southernův přenos

Southernovým přenosem (Southern blotting) je označován přenos DNA na hybridizační membránu z gelu po předchozí elektroforéze. Pro přenos DNA se užívá název Southernův přenos podle E. M. Southerna, který tuto techniku v roce 1975 zavedl. Pro přenosy dalších typů makromolekul se později začaly užívat názvy northern blotting (přenos) pro RNA a western blotting (imunoblotting) pro bílkoviny. Northern i Southernův přenos vyžadují izolaci nukleových kyselin ze vzorku. Nejčastějšími postupy jsou kapilární a elektroforetický přenos či aplikace vakua. Prostá difuze se nepoužívá³⁰.

Southernův přenos patří mezi vlivné postupy dostupné pro molekulární charakterizaci transformovaných rostlin, pomocí

kteřé mohou být získány informace o složitosti vložení transgenů, počtu přítomných kopií, integračním stavu počtu míst na chromosomu, kde by mohl být transgen vložen. Metoda může být také použita pro evidenci integrace transgenů, včetně vložení do mnohonásobných míst. Nejlepších výsledků analýzy bývá dosaženo, pokud je analyzovaný materiál produkován použitím *Agrobacteria*. V tomto případě je T-DNA hranicí, poskytující typické spojení mezi vektorem a rostlinnou DNA, jíž bývá využito¹⁰.

2.3. Analýza RNA

V mnoha případech jsou analýzy exprese transgenů zaměřeny na proteiny nebo jiné finální produkty, protože fenotypovým projevem exprese má být právě akumulace specifických proteinů. Jestliže není možné provést analýzu proteinů, často lze požadovaných výsledků dosáhnout analýzou RNA transkriptů. Dokonce v případech, kdy jsou známy výsledky analýzy proteinů, poskytl analýza RNA užitečné informace o akumulaci transkriptu a jeho stabilitě, dále pomohla při objasňování nepředpokládaných fenotypových projevů. Takové techniky jako reverzní transkripce – PCR (RT-PCR), northern přenos a ribonuclease protein assay (RPA) mohou být použity pro měření množství RNA¹⁰.

Metoda RT-PCR využívá schopnosti reverzní transkriptasy přepsat templátovou mRNA do cDNA, ta je poté podrobena PCR procesu. Nejprve je provedena izolace totální RNA nebo čisté mRNA z testovaného vzorku a pomocí DNasy jsou odstraněny zbytky DNA, dále je RNA podrobena reverzní transkripci a polymerasové řetězové reakci. Popisovaná metoda může být použita jako rychlá a relativně vysoce účinná screeningová metoda určení přítomnosti specifického transkriptu. Výhodami RT-PCR v porovnání s northern přenosem a RPA jsou malá množství potřebného materiálu, vysoká citlivost a snadnost přípravy vzorku¹⁰.

Jestliže použijeme RT-PCR, je nutné umět rozlišit mezi produkty vzniklými z amplifikace genomové DNA vzorku a produkty syntézy cDNA z RNA vzorku *in vitro*. Proto je požadováno zpracování vzorku pomocí DNasy a dále by měly být použity takové primery, aby amplifikace vzorku DNA byla buď nemožná, nebo aby amplifikované produkty měly jinou velikost než amplikony vzniklé z cDNA¹⁰.

3. Metody založené na detekci proteinu

Metody založené na detekci proteinu (imunologické a enzymové) – detegují produkt transgenů nebo metabolity, jejichž produkce je ovlivněna vloženým genem. Tyto metody mají dva významné limity, které brání jejich použití jako rutinních detekčních metod. První nevýhodou je dispozice jen mála protilátek specifických proti proteinům produkovaným expresí vloženého genu. Druhou nevýhodou pro aplikaci těchto analýz je degradace proteinů v průběhu zpracování potravin. V případě, že jsou vhodné protilátky k dispozici, jsou vyvinuté metody vhodné pouze pro čerstvé potravinové suroviny¹⁰.

3.1. Imunometody

Imunochemické detekční metody jsou založeny na specifické reakci mezi antigenem (Ag) a protilátkou (Ab). Jsou

běžně používány pro studium akumulace proteinů v transgenických rostlinách. Pro detekci GMO jsou nejčastěji používány dva typy imunochemických metod:

- western přenos (imunoblot),
- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Obě tyto metody mají do značné míry doplňující se přednosti a slabé stránky.

Sendvičová ELISA je založena na použití dvou protilátek. První protilátka, imobilizovaná na povrch nosiče, interaguje s antigenem. Druhá, enzymem značená protilátka, reaguje s jinými determinantními skupinami na odlišné části molekuly antigenu. Po přidání chromogenního substrátu nebo substrátu a chromogenu je výsledná enzymová reakce vyhodnocena fotometricky³¹.

Výhodou western hybridizace oproti ELISA jsou schopnost stanovit molekulární hmotnost proteinu; reprodukovatelné výsledky mohou být dosaženy i při použití ne zcela přečištěných protilátek. Western přenosy jsou však časově náročnější a kvantitativní výsledky jsou určovány s menší přesností. Naproti tomu ELISA metody jsou méně provozně náročné, vysoce specifické, citlivé a relativně snadno proveditelné¹⁰.

Typickým problémem, se kterým se setkáváme při použití imunometod, je nevhodné pozadí, které může být způsobeno specifickou interakcí protilátek (primární i sekundární, jestliže je použito více druhů) s proteinem v extraktu. Odezva pozadí může být často snížena nebo odstraněna úpravou koncentrace protilátek či použitím vhodného blokačního činidla. Podmínky blokování vhodnými proteiny bývají pro každý protein určeny empiricky¹⁰.

Při ELISA-PCR metodě je amplifikační produkt značen dioxigeninem během amplifikační reakce probíhající v přítomnosti dioxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP). Poté je PCR produkt hybridizován s probou značenou biotinem, která specificky rozpoznává sekvenci uvnitř cílové DNA. Následuje imobilizace biotinem označeného hybridu na streptavidinem pokrytou mikrotitrační destičku. Po promytí je kvantifikováno množství navázaných hybridů pomocí značené protilátky. Metoda PCR-ELISA využívá druhé strategie kvantifikace (kapitola 2.1.2.), polymerasová řetězová reakce je zastavena před poklesem amplifikační efektivity. ELISA byla použita pro kvantifikaci relativně nízkého množství PCR produktu^{32,33}. Přestože metoda byla aplikována v různých oblastech³⁴ a GMO detekční kit využívající tohoto principu je na trhu dostupný (D-Genos, Angers, France), nenašla široké uplatnění při kvantifikaci obsahu GMO v potravinách a potravinářských výrobcích.

3.2. Určení aktivity produktu transgenů

Cíleným fenotypovým projevem vloženého genu bývá nejčastěji protein se specifickou aktivitou. Tato aktivita může i nemusí být enzymatická a může být měřena pomocí biochemických metod nebo biometod – např. rezistence rostliny vůči hmyzu nebo patogenům. V každém případě je důležité pamatovat, že tato aktivita je v mnoha případech nejvíce řízena fenotypem rostliny. Tento fakt může být rozhodující pro pochopení fenotypového projevu. Je důležité uvědomit si, že při používání metody měření aktivity je měřena enzymová aktivita a při imunometodách je měřena hladina akumulovaných proteinů¹⁰.

4. Ostatní techniky používané pro detekci GMO

4.1. Chromatografie

Pokud se liší vlastnosti GMO od nemodifikovaného organismu, např. složení mastných kyselin nebo triglyceridů, mohou být tyto rozdíly detegovány prostřednictvím tradičních chemických metod založených na chromatografickém principu. Toho je možné využít například při detekci oleje získaného z GM kanoly pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní ionizační spektrometrií (HPLC-MS). Při vyšetřování složení triglyceridů³⁵ byl v triacylglycerolovém podílu zaznamenán vyšší obsah triacylglyceridů v oleji z GM kanoly, který vykazuje vyšší oxidační stabilitu díky vysokému obsahu kyseliny stearové a laurové. Tyto výsledky jsou shodné s ostatními výsledky obdrženy při studii oxidační stability v sóji a v kanolovém oleji z nových odrůd pomocí HPLC-FID³⁶.

Nicméně, tato metoda je průkazná pouze tehdy, pokud je složení GM rostlin nebo získaných produktů významně odlišné od složení nemodifikovaných organismů. Mimo to jsou tyto metody vhodné spíše pro kvalitativní analýzu než pro kvantifikaci geneticky modifikovaných organismů. Např. nízké přídavky GM kanolového oleje se změnou skladbou triacylglyceridů k tradičnímu kanolovému oleji nebude s vysokou pravděpodobností detegováno vzhledem k přirozeně se vyskytujícím změnám ve složkách nemodifikovaného oleje.

4.2. Infračervená spektroskopie

Určité zásahy do genomu organismu mohou změnit i strukturu vláken v rostlinách, přestože nejsou detegovatelné žádné významné rozdíly ve složení proteinů nebo olejů (např. Roundup Ready sója). Změny ve struktuře mohou být zaznamenány pomocí infračervené spektroskopie³⁷. Nicméně rozlišit malé množství GMO v nemodifikovaných produktech je v tomto případě rovněž značně obtížné, stejně jako v případě použití chromatografických metod.

5. Závěr

Z výše uvedeného přehledu je zřejmé, že v současné době existuje řada principiálně rozdílných metod, jež mohou být použity pro kvantifikaci a charakterizaci transgenní DNA, případně výsledného produktu její exprese v potravinách a potravinářských výrobcích. Při výběru vhodných detekčních metod pro konkrétní materiál je vždy předem nutné zvážit výpočetní hodnotu, citlivost, specifčnost a další možnosti každého metodického postupu. V souvislosti s tím je důležité přihlídnout též k charakteru, složení a původu testovaného materiálu, jež mohou ovlivnit extrakci DNA nebo bílkovin ze suroviny, a zvolit dostatečné množství kontrol, které by snížily možnost vzniku falešně pozitivních i falešně negativních výsledků. Vzhledem k tomu, že se vždy jedná o analýzy citlivé na přesnost provedení, je laboratorní zručnost a zkušenost v dané problematice nezbytnou podmínkou pro úspěšné testování GMO.

LITERATURA

1. Zákon č. 153/2000 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty.
2. Klein T. M., Harper E. C., Svab Z., Sanord J. C., Fromm M. E., Maliga P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 8502 (1988).
3. Směrnice č. 90/220/EHS o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí.
4. Meyer R.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 201, 583 (1995).
5. Pietsch K., Waiblinger H. U., Brodmann P., Wurz A.: Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 93, 35 (1997).
6. Hupfer Ch., Hotyél H., Sachse K., Engel K.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 205, 442 (1997).
7. L 24.01-1BgVV Anon. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.
8. Meyer R., Jaccaud E.: IX. Conference of EURO FOOD CHEM, Interlaken 1997.
9. Hemmer W., v knize: BATS-Report 2 – Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss priority Programme, Basel 1997.
10. Register C. J.: TIBTECH. 15, 141 (1997).
11. Atlas R. M., Bej A. K., v knize: Methods for General and Molecular Bacteriology, str. 418. American Society for Microbiology, Washington 1994.
12. Newton C. R., Graham A., v knize: PCR. BIOS Scientific Publishers, Oxford 1994.
13. Bindler G., Dorlhac de Borne F., Gadani F., Gregg E., Guo Z., Klus H., Maunders M., Mueller L., Negishi H., Pijnenburg H., Ward M., Zuber J.: CORESTA Bull. 77, 1999 (1999).
14. Gadani F., Bindler G., Pijnenburg H., Rossi L., Zuber J.: Beitrage Tabakforsch. Int. 19, 85 (2000).
15. Rasmussen R. P.: The Rapid Cyclist. 2, 1 (1994).
16. Studer E., Rhyner C., Lüthy J., Hübner P.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 207, 207 (1998).
17. Hardegger M., Brodmann P., Hermann A.: Eur. Food Res. Technol. 209, 83 (1999).
18. Ferré F., v knize: Gene Quantification (Ferré F., ed.). Adv. Biomed. Technol. Birkhäuser, Boston 1998.
19. Vařilingom M., Pijnenburg H., Gendré F., Brignon P.: J. Agric. Food Chem. 47, 5261 (1999).
20. Boehringer Mannheim GmbH Roche Molecular Biochemicals: LightCycler™ System, 2000.
21. Hübner P., Studer E., Häfliger D., Stadler M., Wolf C., Looser C.: Accred. Qual. Assur. 4, 292 (1999).
22. Sanders G., Manz A.: Trends Anal. Chem. 19, 364 (2000).
23. Lemieux B., Aharoni A., Schena M.: Mol. Breeding 4, 277 (1998).
24. Souteyrand E.: Analysis 27, 639 (1999).
25. Khandurina J., McKnight T. E., Jacobson S. C., Waters L. C., Foote R. S., Ramsey J. M.: Anal. Chem. 72, 2995 (2000).
26. Ibrahim S. M., Lofts R. S., Jahrling P. B., Hencal E. A., Weedn V. W., Northrup M. A., Belgrader P.: Anal. Chem. 70, 2013 (1998).
27. Waters L. C., Jacobson S. C., Kroutchinina N., Khandurina J., Foote R. S., Ramsey J. M.: Anal. Chem. 70, 5172 (1998).

28. Rich R. L., Myszka D. G.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 54 (2000).
29. Minunni M., Tombelli S., Chiti G., Mascini M.: *Euro-analysis XI, Eur. Conference Anal. Chem., Lisboa 2000*.
30. Sambrook J., Russel D. W., v knize: *Molecular Cloning a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor)*. Laboratory Press, New York 2001.
31. Králová B., Rauch P., v knize: *Bioanalytické metody*. Ediční a audiovizuální centrum VŠCHT, Praha 1995.
32. González I., García T., Fernández A., Sanz B., Hernández P. E., Marín R.: *J. Appl. Microbiol.* **66**, 231 (1999).
33. Landgraf A., Reckmann B., Pingoud A.: *Anal. Biochem.* **198**, 86 (1991).
34. Taoufik Y., Froger D., Benoliel S., Wallon C., Dussaix E., Delfraissy J. F., Lantz O.: *Eur. Cytokine Network* **9**, 197 (1998).
35. Byrdwell W. C., Neff W. E.: *J. Liq. Chromatogr., Relat. Technol.* **19**, 2203 (1996).
36. Neff W. E., Mounts T. L., Rinsch W. M., Konishi H., El-Agaimy M. A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 1101 (1994).
37. Hurburgh C. R., Rippke G. R., Heithoff C., Roussel S. A.,

Hardy C. L.: *Proceedings of PITTCON 2000 – Science for the 21st Century*, New Orleans, March 2000.

K. Zdeňková, J. Pazlarová, M. Macková, and K. Demnerová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Review of Detection Methods of GMO in the Raw and Processed-Food Matrices**

Genetically modified (GM) organisms are used for production of GM food raw materials and food itself. This brings benefit to food production but also a certain health risk. The novel Czech food legislation requires labelling food containing more than 1 % of GM products. The methods of detection of GM products in raw and processed food are based on the determination of nucleic acids (PCR, analysis of RNA transcripts) or protein determination (transgene product activity, immunoassays). Certain types of GM products can be detected by chromatography or IR spectroscopy. All the methods have certain limitations (sensitivity, presence of inhibitors, etc.). This review summarizes application and suitability of the described methods for analysis of GM products.