



Molekularne metody wykrywania i identyfikacji organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO)

Anna Linkiewicz, Iwona Wiśniewska, Sławomir Sowa

Laboratorium Kontroli GMO, Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Molecular analysis in detection and identification of genetically modified organisms (GMO)

Summary

Several DNA and protein-based analytical methods for GMOs detection have been established so far. For the detection of GMOs at the DNA level, mostly PCR-based methods are used, whereas at protein level ELISA and lateral strips are predominant. The choice of target sequence motif is the most important factor controlling the specificity of the PCR method. This review summarizes most widely used GMO analysis technologies and point out new areas of analytical investigations.

Key words:

GMO, detection methods, PCR, ELISA, ENGL.

Adres do korespondencji

Anna Linkiewicz,
Laboratorium Kontroli
GMO,
Zakład Biotechnologii
i Cytogenetyki Roślin,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików,
05-870 Błonie.

1. Wprowadzenie

Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej i zmieniającymi się zapotrzebowaniami nowoczesnego rolnictwa coraz bardziej powszechne stają się pasze i produkty żywnościowe otrzymane z organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) lub przy ich współudziale (1). Technologie rekombinowanego DNA pozwoliły w dużym stopniu przewyciężyć ograniczenia na jakie napotyka tradycyjna hodowla (przekazywanie pojedynczych cech, bariery krzyżowalności, selekcja rekombinantów). W związku z tym obserwowuje się stały wzrost areалу uprawy roślin GM, który w 2005 r.

osiągnął powierzchnię 90 mln ha (2). Coraz więcej genetycznie zmodyfikowanych produktów jest akceptowanych na rynku UE. Jednocześnie nowa regulacja 1829/2003 UE nakłada obowiązek znakowania produktów zawierających GM, jak i produktów pochodzących lub wytworzonych za pomocą GMO, takich jak olej, cukier, lecytyna, w których zawartość komponentu GM wynosi powyżej 0,9%. Konieczność ilościowego oznaczania GMO wymusza rozwój coraz doskonalszych metod detekcji GMO.

2. Jak poznać czy produkt jest genetycznie zmodyfikowany?

Organizmy transgeniczne powstały poprzez wprowadzenie do ich genomu nowego genu lub nowego zestawu genów. Wprowadzony gen może ulegać w organizmie ekspresji, co prowadzi do pojawienia się nowego białka, które zapewnia organizmowi pożądaną cechę, jak np. tolerancja na herbicyd czy odporność na owady. Produkt powstały przy użyciu metod nowoczesnej inżynierii genetycznej jest najczęściej „gołym okiem” nierozróżnialny od materiału niezmodyfikowanego. Wykrywanie obecności GMO w roślinach i produktach odbywa się na poziomie DNA (obecność DNA transgenów) lub/i kodowanych przez DNA białek. Metody wykrywania DNA są oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), podczas gdy obecność charakterystycznych białek pozwala wykryć test ELISA. Stosowane są także metody wykorzystujące mikromacierze DNA, spektrometrię masową, chromatografię czy spektroskopię w podczerwieni (3-7).

3. Metody oparte na detekcji DNA

Metody analiz próbek na obecność GMO na poziomie DNA polegają na wykryciu specyficznych sekwencji DNA wprowadzonych metodami inżynierii genetycznej do rośliny, zwierzęcia bądź mikroorganizmu. Najczęściej w praktyce stosowane są testy oparte na technologii PCR, która wykorzystywana jest w celu wykrycia i powielenia specyficznych fragmentów DNA lub fragmentów genów występujących w GMO. Powielenie poszukiwanego fragmentu umożliwia wykrycie produktu reakcji w świetle UV w wyniku elektroforezy na żelu agarozowym. Widoczny prążek o określonej, zdefiniowanej masie potwierdza obecność obcego DNA w testowanej próbce. Główną zaletą PCR jest możliwość wykrycia przy jego udziale śladowych ilości DNA, także w takich próbkach jak silnie przetworzona żywność, oleje, lecytyna. Efektywność reakcji PCR zależy od jakości i czystości DNA użytego do reakcji. Na jakość analizowanego preparatu DNA wpływa obecność związków chemicznych takich jak polisacharydy, lipidy, polifenole, oraz związków chemicznych, używanych do izolacji materiału genetycznego (np. EDTA, fenol, SDS). Przydatność DNA do testów jest determinowana przez wielkość fragmentów i stopień uszkodzeń cząsteczek na skutek

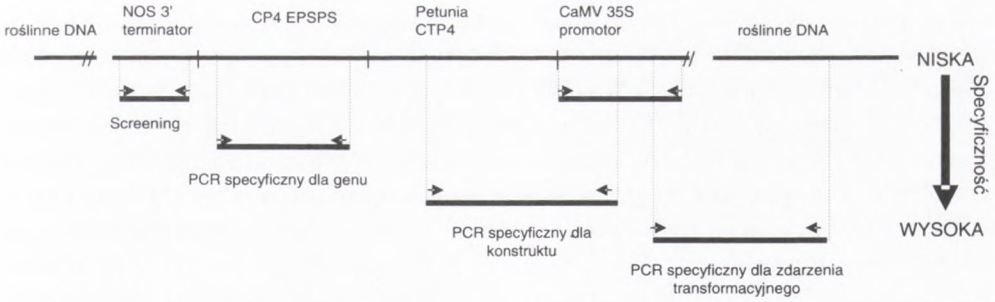
ekspozycji na wysoką temperaturę, niskie pH, działanie nukleaz (hydroliza, depury-nacja lub enzymatyczna degradacja DNA), co zależy od stopnia przetworzenia mate-riału i zastosowanej metody izolacji. Warto zaznaczyć, że DNA wyizolowane z żyw-ności poddanej obróbce termicznej czy też innych przetwarzanych próbek pocho-dzenia roślinnego (np. tytoń z papierosów) jest niskiej jakości, a fragmenty, które mogą być amplifikowane nie przekraczają 100-400 par zasad (8). Z tego względu na-leży pamiętać o odpowiednim doborze starterów gwarantującym amplifikację krót-kich fragmentów.

Równocześnie należy zdawać sobie sprawę ze znacznej czułości metody PCR. Czułość metody zwiększa ryzyko wykrywania niespecyficznych fragmentów, co mo-że prowadzić do fałszywie-pozytywnych wyników. Istotnym elementem każdego te-stu na obecność GMO, przeprowadzonego na bazie techniki PCR, jest weryfikacja metody w celu wykluczenia fałszywie-pozytywnych wyników otrzymanych w wyniku niespecyficznego wiązania starterów. W tym celu przeprowadza się ocenę wielkości produktu PCR w połączeniu z analizą restrykcyjną, analizę *Southern blot* z sondą spe-cyficzną dla amplifikowanego genu/fragmentu DNA, reamplifikacja produktu tech-niką zagnieżdżonego PCR (*nested PCR*), sekwencjonowanie produktu PCR.

3.1 Strategia poszukiwania i identyfikacji GMO metodą PCR

Strategia wykrywania GMO metodą PCR zależy od wiedzy na temat wprowadzo-nej sekwencji transgenu i struktury konstrukcji użytej do transformacji. Każda kon-strukcja genetyczna składa się z kilku podstawowych elementów. Zazwyczaj są to: gen warunkujący wprowadzaną cechę, promotor funkcjonujący jako sygnał startu transkrypcji i terminator zapewniający sygnał stop dla ekspresji genu. Wprowadza-na konstrukcja może zawierać również sekwencje regulatorowe, geny reporterowe i markerowe oraz być flankowana przez sekwencje DNA pochodzące z wektora do klonowania. Metody PCR stosowane przy analizie GMO mogą być podzielone na kil-ka kategorii w zależności od poziomu specyficzności testu (rys. 1). Każda z kategorii odnosi się do typu fragmentu DNA amplifikowanego w reakcji. Wstępną informację zapewniają metody screeningowe pozwalające jedynie stwierdzić obecność modyfi-kacji genetycznej. Bardziej szczegółowe informacje o rodzaju modyfikacji genetycz-nej wnoszą metody specyficzne względem genu oraz specyficzne dla konstruktów. Dopiero metody swoiste dla zdarzenia transformacyjnego pozwalają na jedno-znaczną identyfikację GMO. Należy pamiętać, że GMO definiowane jest poprzez uni-katowe zdarzenie transformacyjne i, tak np. MON 810 i MON 809 są klasyfikowane jako dwa różne GMO, pomimo że reprezentują ten sam gatunek (*Zea mays L.*) trans-formowany jednakowym plazmidem pV-ZMBK07 (9).

Testy screeningowe polegają na detekcji elementów konstruktów najczęściej wy-korzystywanych do transformacji. Ponieważ u większości GMO wprowadzonych na rynek są obecne promotor 35S (*P-35S*) z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) oraz termi-



Rys. 1. Schemat sposobów detekcji genetycznie zmodyfikowanych organizmów metodą PCR, na przykładzie soi Roundup Ready®. Zaznaczono wzrastającą specyficzność reakcji.

nator *nos* z *Agrobacterium tumefaciens*, pierwsza opisana metoda screeningu (10) dotyczyła detekcji właśnie tych elementów. Biorąc pod uwagę, że coraz więcej konstruktyw genetycznych zawiera geny wprowadzone pod promotorami tkankowo-specyficznymi lub rozwojowo-specyficznymi oraz fakt częstej rezygnacji zgodnie z dyrektywą 2001/18/EEC z takich elementów jak markery selekcyjne, a w szczególności oporność na antybiotyki, konieczne jest poszerzenie analiz screeningowych o nowe sekwencje (11). Ze względu na różnorodność wariantów stosowanych elementów genetycznych (np. przynajmniej osiem wersji *P-35S* w dostępnych roślinach GM), konieczne są takie sekwencje starterowe, które umożliwią amplifikację wielu wersji wprowadzanych sekwencji. Warto podkreślić, że analiza screeningowa daje informację wyłącznie o tym, że w badanej próbce mamy do czynienia z GMO, ale nie dostarcza danych na temat wprowadzonej cechy ani nie charakteryzuje jednoznacznie odmiany GM. Obecnie opracowywane są warunki amplifikacji i startery dla regionów granicznych, unikatowych miejsc integracji DNA genomowego i wprowadzonej konstrukcji (5,12,13). Dopiero zastosowanie starterów specyficznych względem zdarzenia transformacyjnego umożliwia jednoznaczną identyfikację poszczególnych GMO.

3.2. Metody ilościowego oznaczania GM techniką PCR

Konwencjonalny PCR niesie odpowiedź typu tak/nie na pytanie, czy w badanym materiale znajduje się element zmodyfikowany genetycznie. Podczas PCR jakościowego, ilość produktu jest mierzona na etapie osiągnięcia maksymalnej amplifikacji (faza *plateau*), kiedy korelacja pomiędzy stężeniem produktu a liczbą początkową cząsteczek matrycy jest bardzo słaba z powodu malejącej wydajności reakcji PCR. Na dokładniejsze ustalenie zależności pomiędzy wyjściową liczbą kopii docelowego DNA a ilością produktu PCR generowanego podczas amplifikacji pozwalają inne metody oparte również na technice PCR, takie jak ilościowy kompetytywny PCR (QC-PCR) czy PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR) (14-16).

W metodzie Real Time PCR ilość amplifikowanego DNA jest monitorowana w każdym cyklu reakcji przy użyciu barwników fluorescencyjnych, a intensywność sygnału fluorescencyjnego jest proporcjonalna do ilości produktu reakcji. Przy zachowaniu właściwych warunków amplifikacji otrzymuje się precyzyjną informację o wyjściowej ilości GM DNA w próbce. Względna zawartość zmodyfikowanego DNA w próbce oznaczana jest poprzez określenie ilościowego stosunku cząsteczek markera modyfikacji genetycznej (np. cząsteczek promotora czy transgeny) w odniesieniu do liczby cząsteczek gatunkowo-specyficznego genu referencyjnego, np. lektyny w przypadku próby zawierającej soję. W praktyce taka relatywna ocena ilościowa wykonywana jest przez równoległe przeprowadzenie dwóch reakcji PCR – jednej dla genu charakteryzującego badane GMO i drugiej dla genu referencyjnego. Uzyskany wynik jest wypadkową tych dwóch oznaczeń. Zakładając, że materiał GM poddany był takiemu samemu traktowaniu jak materiał niemodyfikowany, ilość GM w próbce może być przedstawiona jako wartość procentowa wyrażona poprzez stosunek liczby kopii znalezionej sekwencji GMO do liczby kopii genu referencyjnego lub w postaci wagi, w przeliczeniu na wagowy udział komponentu GM w produkcie (17).

Metoda Real Time PCR charakteryzuje się największą dokładnością analizy, pozwala na wykrycie bardzo małych ilości GMO (nawet poniżej 10 kopii transgeny). Dla zapewnienia precyzji i powtarzalności wyników, każda analiza jest wykonywana w zestawieniu z certyfikowanym materiałem referencyjnym wyprodukowanym dla konkretnej modyfikacji przez IRMM Instytut Materiałów Referencyjnych i Miar, Geel, Belgia (18).

4. Metody oparte na detekcji białek

Detekcja GMO na poziomie białek opiera się na reakcji immunologicznej polegającej na specyficznym wiązaniu pomiędzy antygenem i przeciwciałem. W metodach tych antygenem jest białko produkowane przez wprowadzany gen. Przeciwciałem jest białko rozpuszczalne produkowane przez układ immunologiczny w odpowiedzi na infekcje spowodowane przez obce substancje (antygeny) (19). W systemie tym najważniejszym czynnikiem jest dostępność przeciwciał o określonej specyficzności i powinowactwie. Technologia ta może być stosowana w oznaczeniach jakościowych i ilościowych, jednakże ma ograniczone zastosowanie w przypadku wysoko przetworzonych produktów. Najczęściej stosowanymi metodami opartymi na detekcji białek są: ELISA i paski z przepływem bocznym.

4.1. ELISA – Test immunoenzymo-adsorbcyjny

ELISA jest enzymatyczną próbą immunologiczną wykorzystującą immunoreagenty (antygen i przeciwciało) i immunosorbent, z którym się wiążą. Antygen i przeciw-

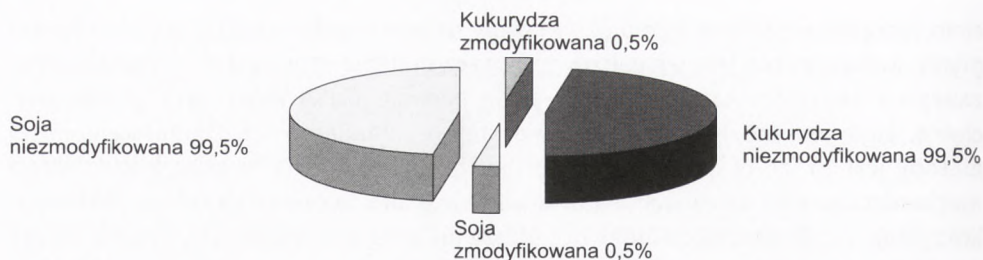
ciało łączą się w stabilny kompleks wiązany na powierzchni studzienek plastikowej płytki. Kompleks ten jest wizualizowany przez dodanie drugiego przeciwciała związanego z enzymem katalizującym reakcję barwną. ELISA może być metodą ilościową, gdyż jest możliwe sporządzenie krzywej standardowej. Ograniczeniem tej metody jest to, że ekspresja transgenu może nie zachodzić na skutek zadziałania mechanizmów RNA-zależnych, bądź zawartość białek w częściach rośliny, które wykorzystuje się do produkcji może być niższa niż próg wykrywalności. Szacuje się, że produkty transgenów stanowią do 2% wszystkich białek rozpuszczalnych. Aktualnie dostępne są komercyjne zestawy do wykrywania specyficznych białek z rodziny Cry (Cry1Ab, Cry1C, Cry3A, itd.), CTP4 EPSPS, PAT/*bar* (11).

4.2. Paski z przepływem bocznym

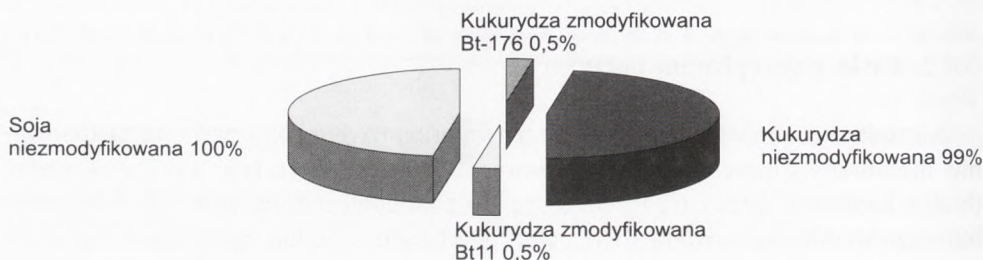
Metoda wykorzystująca paski z bocznym przepływem jest oparta na zastosowaniu membrany z przeciwciałami w formie „kanapki”. W trakcie analizy antygeny (białka kodowane przez transgen) łączą się z kompleksem przeciwciało-odczynnik barwny. Membrana zawiera dwie strefy wychwytu – jedną specyficzną dla kompleksu antygen-przeciwciało-odczynnik barwny, i drugą, kontrolną dla przebiegu reakcji. Strefy wychwytu są widoczne w postaci czerwonego paska, który ujawnia się po związaniu przeciwciał w odpowiednich rejonach. Obecność jednej linii (linia kontrolna) informuje o poprawnym działaniu paska, natomiast wynik uznaje się za pozytywny, gdy pojawia się linia druga. Paski dostarczają głównie informacji jakościowych i półilościowych. Testy paskowe są łatwe i szybkie w użyciu, ale trzeba pamiętać, że można je stosować tylko do konkretnych białek, a ich czułość nie jest wysoka. Ich zaletą natomiast jest to, że analizę można wykonać w warunkach polowych, a czas jej trwania to 10-15 minut. Może ją przeprowadzić osoba bez dużego doświadczenia laboratoryjnego – wymagane jest tylko roztarcie próbki (liść, ziarno, mąka), zawieszenie jej w wodzie lub buforze, zanurzenie w próbce paska i odczytanie po kilku minutach wyniku (20).

5. Znakowanie produktów zawierających GMO

W przypadku stwierdzenia w produkcie jednego lub kilku GMO dopuszczonych na rynek UE (np. soja Roundup Ready®, kukurydza Bt-176, czy kukurydza MON 810) należy wykonywać analizę ilościową w celu określenia zgodności z progiem znakowania, który jest określony na poziomie 0,9% masy białka lub DNA. Według rozporządzenia komisji UE (21) znakowaniu nie podlegają te produkty, które zawierają GMO w ilości poniżej 0,9% w odniesieniu do gatunku, o ile obecność zmodyfikowanego DNA lub białka jest niezamierzona lub nie do uniknięcia. Wszystkie składniki (mąka, olej, śruta) pochodzące z jednego gatunku (np. soi, kukurydzy, itd.) są sumo-



Rys. 2. Znakowanie nie jest konieczne. Zawartość genetycznie zmodyfikowanej soi i kukurydzy nie przekracza progu znakowania 0,9%.

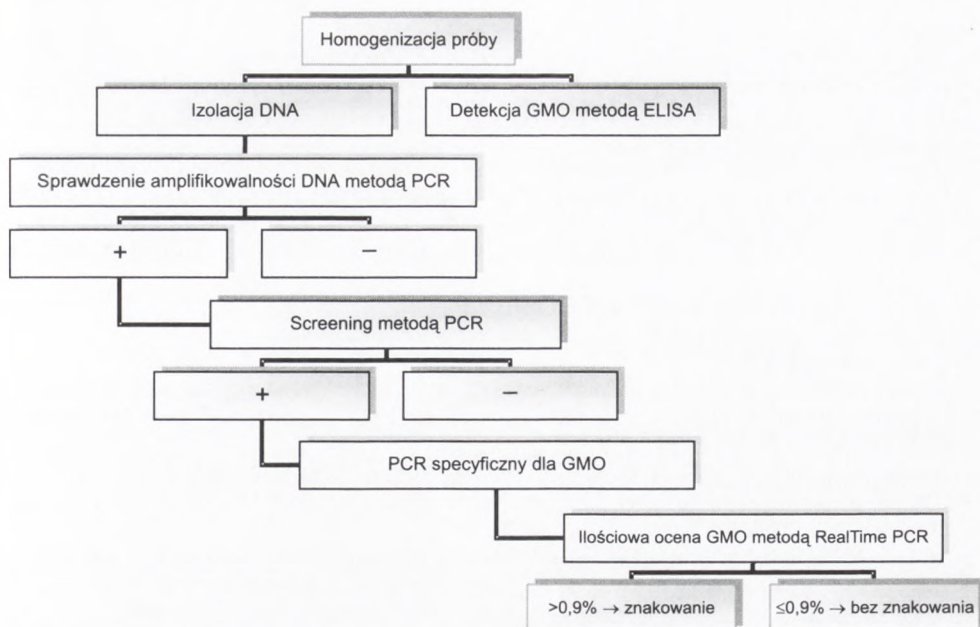


Rys. 3. Znakowanie jest konieczne. Zawartość genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy przekracza próg znakowania 0,9%.

wane i traktowane jako jeden składnik. Znakowanie jest konieczne w przypadku gdy składnik genetycznie zmodyfikowany przekracza poziom 0,9%. W przypadku kiedy produkt zawiera więcej niż jedną odmianę genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy ich ilości są sumowane (rys. 2 i rys. 3). Nowa Regulacja 1829/2003 (22) nakłada obowiązek znakowania nie tylko produktów zawierających GMO, ale i produktów pochodzących i wytworzonych za pomocą GMO. W przypadku materiału siewnego próg dopuszczalnej ilości GMO nie został jeszcze jednoznacznie ustalony.

6. Europejska i polska sieć laboratoriów GMO

Regulacje prawne Unii Europejskiej dotyczące GMO zakładają rozwój wiarygodnych i czułych metod wykorzystywanych do detekcji GMO. Od grudnia 2002 r. istnieje w Unii Europejska Sieć Laboratoriów GMO (ENGL, ang. *European Network of GMO Laboratories*) (23), która jako organ Komisji Europejskiej zajmuje się problemami związanymi z GMO w zjednoczonej Europie. W skład ENGL wchodzi 71 laboratoriów reprezentujących kraje Unii Europejskiej oraz Norwegię i Szwajcarię. ENGL funkcjonuje przy Joint Research Centre (JRC) (24), które skupia wiele laboratoriów badawczych Unii Europejskiej, także laboratoria biotechnologiczne i zajmujące się GMO (25). Zadaniem sieci jest stworzenie grup eksperckich zajmujących się proble-



Rys. 4. Plan typowej analizy GMO. Plus w ramce oznacza wynik pozytywny, minus – negatywny.

mami próbobrania, wykrywania, identyfikacji i ilościowej oceny GMO w środowisku, pożywieniu, paszach dla zwierząt oraz w materiale nasiennym. W tym celu członkowie ENGL opracowują naukowe metody oceny, wykrywania i identyfikowania GMO i ich produktów. Metody takie są następnie ujednolicane w zakresie analitycznym i oceny statystycznej. Działania ENGL pozwoliły na podniesienie wykrywalności GMO, opracowanie i ulepszenie schematów i metod kontroli (rys. 4). Ważną rolę pełnią przez ENGL jest przekazywanie informacji o GMO społeczeństwu i przemysłowi. Przy JRC funkcjonuje także Unijne Laboratorium Referencyjne (Community Reference Laboratory) (26), które z kolei odpowiedzialne jest za walidację i ocenę metod ilościowych oznaczania GMO oraz koordynowanie wspólnych badań prowadzonych przez laboratoria należące do ENGL. Firmy biotechnologiczne wprowadzające GMO na rynek UE są zobowiązane do dostarczenia odpowiednich metod służących do ich jakościowej i ilościowej analizy. Te metody są następnie walidowane przez CRL przy udziale laboratoriów skupionych w ENGL.

W 2003 r. została utworzona Polska Sieć Laboratoriów GMO, której zadaniem jest ujednolicanie i standaryzacja na forum krajowym metod służących pobieraniu próbek oraz detekcji i ilościowego oznaczania GMO. Polska sieć ma na celu stworzenie platformy służącej do wymiany informacji dotyczących GMO, a w szczególności metodyk analiz laboratoryjnych oraz informowanie i edukowanie społeczeństwa na temat GMO.

Literatura:

1. Art. 3. ustawy z 22 czerwca 2001 r. „O organizmach genetycznie zmodyfikowanych”, (Dz.U. z 25 lipca 2001 r.
2. <http://www.isaaa.org/>
3. James D., Schmidt A. M., Wall E., Green M., Masri S., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5829-5834.
4. Nesvold H., Kristoffersen A. B., Holst-Jensen A., Berdal K. G., (2005), *Bioinformatics*, 21, 1917-1926.
5. Burns M., Shanahan D., Valdivia H., Harris N., (2003), *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 428-433.
6. Neff W. E., Mounts T.L., Rinsch W. M., Konishi H., El-Agaimy M.A., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 1101-1109.
7. <http://www.osservaogm.it/pdf/JRCReview.pdf>
8. Hemmer W., (1997), *BATS-Report 2/1997*, Basel, Switzerland.
9. <http://www.agbios.com>
10. Pietch K., Waiblinger H. U., Brodmann P. I, Wurz A., (1997), *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 93, 35-38.
11. Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., van den Eede G., (2002), *Eur. Food Technol.* 214, 3-26.
12. Berdal K.G., Holst-Jensen A., (2001), *Eur. Food Res. Technol.*, 213, 432-438.
13. Windels P., Bertrand S., Depicker A., Moens W., Bockstaele E., Loose M., (2003), *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 259-263.
14. Studer E., Rhyner C., Lüthy J., Hübner P., (1998), *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 207, 207-213.
15. Hardegger M., Brodmann P., Herrmann A., (1999), *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 83-87.
16. Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M., (1996), *Genome Res.*, 6, 986-994.
17. Holst-Jensen A., Rønning S. B., Løvseth A., Berdal K. G., (2003), *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 985-993.
18. <http://www.irmm.jrc.be/rm/html>
19. Brett G. M., Chamber S. J., Huang L., Morgan M. R. A., (1999), *Food Control*, 10, 401-406.
20. Stave J., (1999), *Food Control*, 10, 367-374.
21. Regulation (EC) No 1830/2003, (2003), *Off. J. Eur. Commun.*, L268, 24-28.
22. Regulation (EC) No 1829/2003, (2003), *Off. J. Eur. Commun.*, L 268, 1-23.
23. <http://engl.jrc.it/>
24. <http://www.jrc.cec.eu.int/>
25. <http://biotech.jrc.it/>
26. <http://gmo-crl.jrc.it/>