

# Genetikailag módosított növények detektálása élelmiszerekben polimeráz láncreakcióval

*Szabó Erika és Szamos Jenő*

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 2001. június 20.

A nemesítők régi álma a géntechnológiával módosított (GM) növények termesztésbe vonása napjainkra valósággá vált. A rovarrezisztens és gyomirtószer toleráns transzgén növények, így a Roundup Ready szója, termesztése olyan előnyt jelent a tengerentúli országok mezőgazdaságában, amely indokolja az előre jelzett 400 millió hektáron történő termesztésüket 2002-ben [1]. A GM növények megjelenése ugyanakkor nagyszámú, élelmiszerbiztonsággal, ökológiával, etikával kapcsolatos kérdést vet fel, amelyekkel a közlemény nem foglalkozik.

Kísérleti munkánk célja volt egy genetikailag módosított élelmiszerek detektálására alkalmas screening-módszer adaptálása és alkalmazása különböző élelmiszermintákra.

Az elmúlt években az analitikai módszerek fejlesztését ezen a területen az Európai Unió törvényhozás által életbe léptetett rendeletek indukálták (EEC 257/98). A legtöbb európai országban törvény kötelezi az élelmiszer előállítókat, hogy termékeiken a genetikailag módosított összetevő(k) jelenlétét feltüntessék, ha annak (azok) mennyisége az 1 %-os küszöbértéket meghaladja (EC 49/2000).

Analitikai szempontból előnyös az a körülmény, hogy a legtöbb engedélyezett GM élelmiszer-növényben közös szabályozó régiókat alkalmaznak. Ez is hozzájárult ahhoz, hogy a fehérje-, illetve DNS alapú eljárások közül az utóbbiak terjedtek el nagyobb mértékben [2, 3]. A két szabályozó régióra (CaMV 35S promotor, NOS terminátor) tervezett polimeráz láncreakcióval (PCR) a jelenleg forgalomban lévő GM élelmiszer-növények zöme detektálható (screening-módszer), míg az egyedi génkonstrukciók azonosításához specifikus PCR módszerekre van szükség [4].

A PCR alkalmazásának előfeltétele a sokszorozásra alkalmas minőségű (méretű, tisztaságú) DNS izolálása a különböző növényi- és élelmiszer-mintákból. Az élelmiszerek tartós hőkezelésének hatására a DNS 300 bp átlagméretű fragmentumokra törik, ami egyrészt limitálja a GM komponensekből származó, sokszorozható fragmentek méretét, másrészt az élelmiszer-mátrixban előforduló különböző komponensek (pl. fehérjék, szénhidrátok, zsírok, sók,..) gátolják a polimeráz láncreakciót [5].

# Anyagok és módszerek

## 1. Vizsgálati anyagok

A hazai kereskedelemben forgalmazott szójatartalmú élelmiszerek: pulyka felvágott, címeres sertésmájkrém, zöldséges tofu, szójas fasírtpor, valamint genetikailag módosított Roundup Ready (RR) szója és módosítatlan EVANS szója.

## 2. Vizsgálati módszerek

Analitikai rendszerként a Hanse Analytik GmbH Gene Check Screening kit-jét (Cat.no. 8021018) használtuk, amivel a genetikai módosítás nyersanyagokban, feldolgozott élelmiszerekben és takarmányokban detektálható. Az eljárás a Német Hivatalos Módszergyűjteményben (§35.LMBG) leírtak szerint valósítható meg, és az európai validálás folyamatban van.

Az első lépés a DNS izolálása a mintából. Ez különböző módszerekkel történhet, célja megfelelő mennyiségű és tisztaságú DNS kinyerése. A következő lépésben három különböző DNS fragmentum sokszorozása történik PCR-technikával. Egy kontroll és két specifikus reakció segítségével megállapítható, hogy a minta PCR-tiszta-e (tehát nem tartalmaz láncreakció inhibitorokat), illetve tartalmaz-e általánosan alkalmazott szabályozó DNS szekvenciákat, így a 35S promotert és/vagy NOS terminátort, amelyeket a növények genetikai módosításához alkalmaznak. A specifikus reakciók termékének további vizsgálatával dönthető el, hogy a várt terméket kaptuk-e.

### 2.1. A DNS izolálása

#### *CTAB I. módszer [6]*

- Steril csőbe 100 mg mintát mértük be, ehhez 500 µl CTAB puffert adtunk (20 g CTAB/l, 1,4 M NaCl, 0,1 M TRIS/HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA), összekevertük, és 30 percig 65 °C-on inkubáltuk.
- Az oldatot ezután 10 percig centrifugáltuk (12000xg), a felső fázist 200 µl kloroformot tartalmazó csőbe tettük, majd 30 másodpercig kevertettük, majd ezt követően 10 percig centrifugáltuk (11500xg).
- A felülúszót új csőbe vittük, 2 térfogat CTAB kicsapó oldatot (5 g CTAB/l, 0,04 M NaCl) adtunk hozzá, és az elegyet 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk.
- A csapadékot 350 µl 1,3 M NaCl-ben oldtuk és 350 µl kloroformot adtunk hozzá. 30 másodpercig kevertettük, majd 10 percig fázisszétválásig centrifugáltuk (12000xg).
- A felső vizes fázist új csőbe vittük és 0,6 térfogat izopropil alkoholt adtunk hozzá. Összekevertük és 10 percig centrifugáltuk (11500xg). A felső fázist eltávolítottuk.

- A pelletet tartalmazó csőbe 500 µl 70 v/v%-os etanol adtunk, alapos összekeverés után 10 percig centrifugáltuk (11500<sub>xg</sub>).
- A felülúszót eldobtuk, és a pelletet rövid idejű szárítás után kétszer desztillált vízben oldottuk.

## **CTAB II. módszer [7]**

Ugyanaz, mint a CTAB I., de a 3. lépés kimarad.

### **Wizard módszer**

- 100 mg homogenizált mintát steril csőbe mértünk és 200 µl kétszer desztillált vizet adtunk hozzá, összekevertük és 10-15 percig állni hagytuk.
- Ezt követően 860 µl extrakciós puffert (TNE), 100 µl 5M-os guanidin hidrokloridot és 40 µl 20 mg/ml proteináz K enzimet pipettáztunk a mintához. Alaposan összekevertük és legalább 3 órán keresztül 60 °C-on rázógépből inkubáltuk.
- Inkubálás után a mintát 5 percig centrifugáltuk (10000<sub>xg</sub>),
- Összerázás után 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe 1-1 ml Wizard gyantát pipettáztunk. A mintaoldatból 500 µl-t adtunk a gyantához, összekeverés után az elegyet a minioszlopra pipettáztuk, majd vákum segítségével az oszlopba juttattuk.
- Az oszlopot 2 ml 80 %-os izopropanollal mostuk, ezután pedig 30 másodpercig vákummal szárítottuk.
- A maradék izopropanolt centrifugálással (10000<sub>xg</sub>, 5 perc) távolítottuk el.
- Végül a minioszlopról 50 µl, 70 °C-os kétszer desztillált vízzel eluáltuk a megkötött DNS-t (10000<sub>xg</sub>, 5 perc).

## **2.2. Az extrahált DNS tisztaságának meghatározása**

Az extrahált DNS-t 35-szörösére hígítottuk (20 µl minta + 680 µl kétszer desztillált víz), és félmikro kvarcküvetében spektrofotométerrel mértük az elnyelést 260 nm-en valamint 280 nm-en.

Ha a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciaértékek hányadosa:

- 1,7-2,0 közötti, akkor az extrahált DNS oldat megfelelő tisztaságú,
- 1,7-nél kisebb, az extrahált oldatban fehérje is jelen van,
- 2,0-nél nagyobb, az extrahált oldat RNS-t is tartalmaz.

## **2.3. Kontrol PCR**

Szója specifikus lektingén sokszorozásával vizsgáltuk az izolált DNS PCR-tisztaságát. A lektingén minden szójafajtában, így a GM szójában is előfordul, és a kit szójalektin primereivel a lektingén egy 145 bp hosszúságú fragmentje sokszorozható. A mintából izolált DNS PCR-rel történő sokszorozhatóságának vizsgálatával a hamis-negatív eredmények is eliminálhatók. A termékvizsgálat 1%-os agaróz gélen történik. A DNS

sávok etidium-bromidos megfestését követően azokat DNS-hosszúság markerrel, valamint a kontrollként használt hagyományos, illetve RR szója mintákra kapott sávokkal hasonlítottuk össze.

A lektinén PCR-t a következő hőmérséklet profillal végeztük [6]:

94 °C/10 perc |  $\underbrace{94\text{ °C}/25\text{ perc}, 62\text{ °C}/30\text{ perc}, 72\text{ °C}/45\text{ perc}}_{50\text{-szer}}$  | 72 °C/3 perc, 4 °C/∞

## 2.4. Specifikus reakciók

A specifikus reakciókkal eldönthető, hogy a minta-DNS-ben előfordul-e a 35S promoter és/vagy NOS terminátor. A kit-ben található primerpárokkal a 35S promoterről 195 bp méretű, a NOS terminátorról pedig 180 bp méretű fragmentek sokszorozhatók.

A specifikus (35S, NOS) PCR-t a következő hőmérséklet profillal végeztük [6]:

94 °C/10 perc |  $\underbrace{94\text{ °C}/20\text{ perc}, 54\text{ °C}/40\text{ perc}, 72\text{ °C}/44\text{ perc}}_{50\text{-szer}}$  | 72 °C/3 perc, 4 °C/∞

## 2.5. Azonosítás

A 35S és NOS analitikában kapott termékek azonosításának szükségességére Stadler és mtsai [8] hívták fel a figyelmet. Nagy számú minta analízisével bizonyították, hogy nagy gyakorisággal képződik a várt terméktől eltérő szekvenciájú, de nagyon közeli molekulatömegű PCR termék, ami további azonosítás hiányában hamis pozitívként értékelhető. Eredményeik ismeretében ma már mindig ellenőrizni kell a kapott termék szekvenciáját, ami történhet pl. restrikciós endonukleázzal, fészek PCR-rel, vagy Southern blot technikával. A szekvencia ellenőrzés gyors, egyszerű és költségkímélő módszere az ún. DNS-ligandum gélelektroforézis. Az agaróz gélhez adott DNS-kötő ligandum (biszbenzimid PEG/H.A. Yellow) specifikusan kötődik az adeninben és timinben gazdag régiókhoz. A DNS fragmentumok vándorlása a megkötött ligandum molekulák számával arányosan lassul a gélben, ami lehetővé teszi az azonos vagy eltérő szekvencia detektálását egy referencia fragmentumhoz képest.

# Eredmények

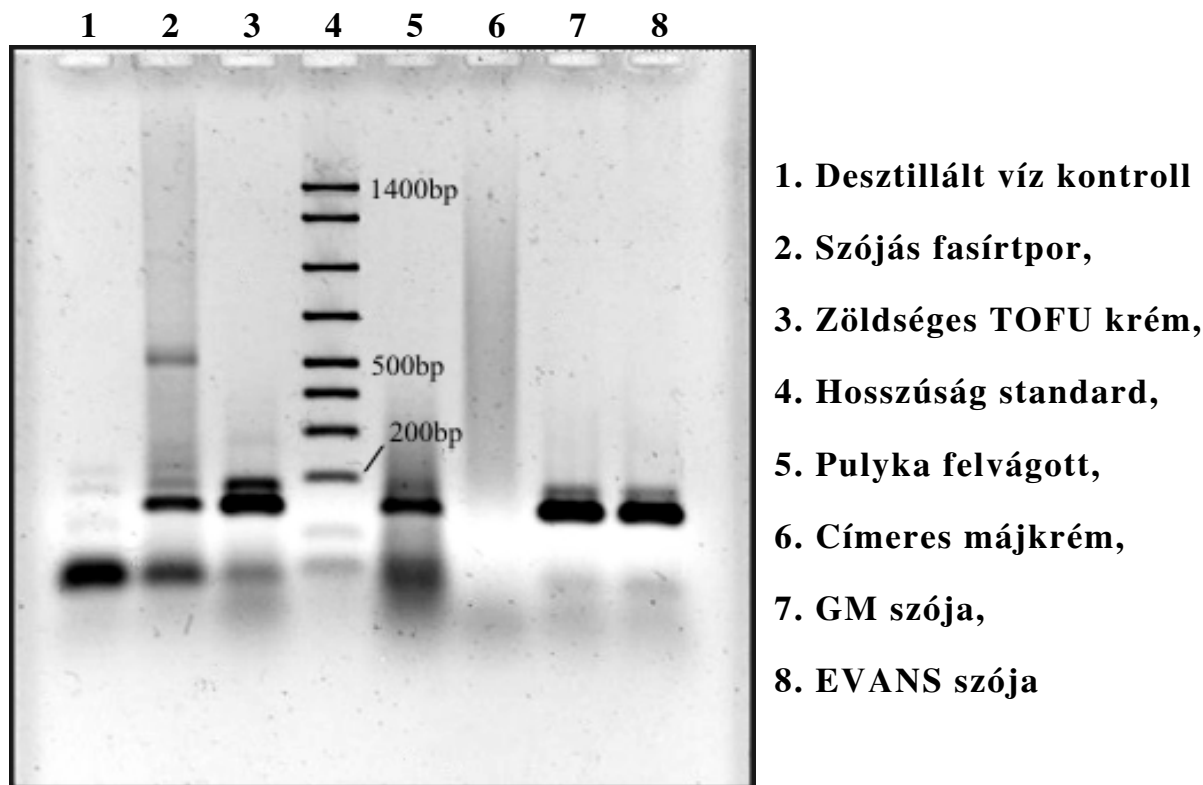
**DNS izolálás.** Az 1. táblázat tartalmazza a különböző módszerekkel előállított nukleinsavak jellemzőit. A CTAB módszer I. változata és a WIZARD módszer alkalmazásával az összes vizsgált élelmiszer esetében tiszta DNS-t kaptunk, míg a CTAB II. csak a nyersanyagok esetében eredményezett megfelelő tisztaságú DNS-t. Az alkalmazott módszerekkel

– közvetlenül vagy utólagos tisztítással kiegészítve – megfelelő minőségű DNS izolálható a különféle élelmiszer mintákból.

**1. táblázat: A DNS izolálás eredményei**

Minták	R <sub>CTAB I.</sub>	R <sub>CTAB II.</sub>	R <sub>WIZARD</sub>
Pulyka felvágott	1,70	1,53	1,74
Címeres sertés májkrém	1,69	1,46	1,68
Zöldséges tofu	1,80	1,63	1,79
Szójás fasírtpor	1,85	1,54	1,79
EVANS szója	1,90	1,72	1,87
RR szója	1,87	1,78	1,92

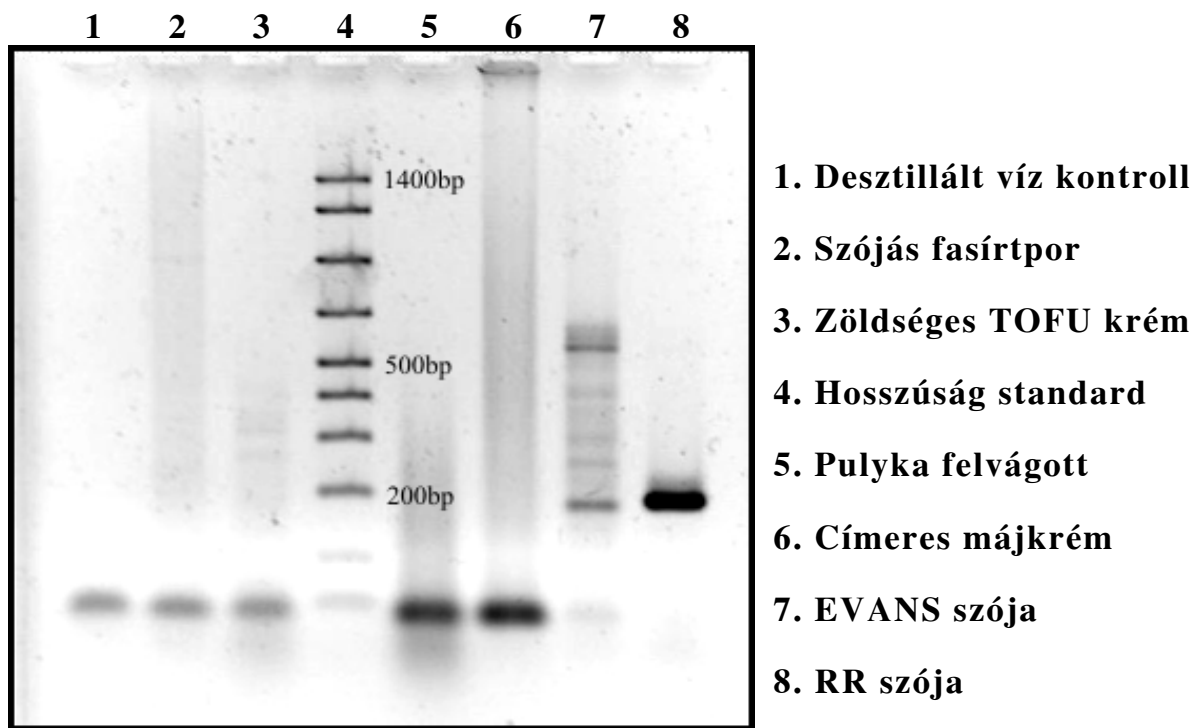
**Szója lektin kontroll.** A szója lektin kontroll eredményei az 1. ábrán láthatók. A címeres májkrém kivételével az összes vizsgált termékből kivont DNS-re erős jelet kaptunk, amely egyszerre utal a termékekben szója-DNS jelenlétére és annak PCR tisztaságára. A PCR sokszorozást minden esetben desztillált víz kontroll-lal ellenőriztük az esetleges kontamináció felderítésére.



**1. ábra: Az élelmiszerminták lektin-PCR-jének eredményei**

**Szabályozó régiók sokszorozása.** A NOS-PCR eredményei alapján a 2., 5. és 6. mintákból kapott jel utalhat a 180 bp termék fragment jelenlétére,

míg a 35S-PCR alapján (2. ábra) meglepő módon a 7. mintában (EVANS szója) található a 195 bp-hez közeli termék származhat 35S szekvenciából.

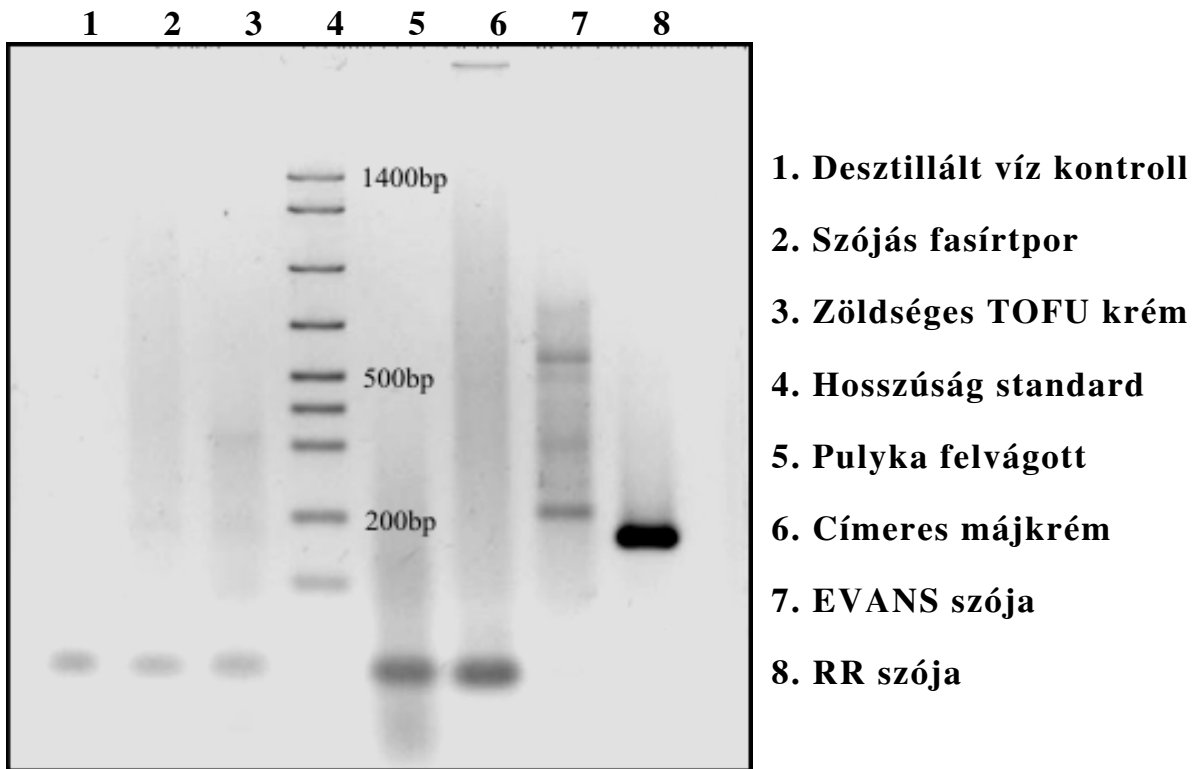


**2. ábra: Az élelmiszerminták 35S-PCR-jének eredményei**

**Termék azonosítás.** Nagyszámú analízis eredményei alapján a 35S és NOS analitikával nyert termékek szekvenciáját igazolni kell, mert a műtermék képződés valószínűsége meglehetősen nagy. Az H.A. yellow-gélelektroforézissel a NOS és a 35S-PCR termékekről egyértelműen megállapítható, hogy **a vizsgált minták nem tartalmazznak detektálható mennyiségben RR szója DNS-t.** A címeres májkrém esetében még szója jelenlétére utaló jelet (lektin kontroll) sem kaptunk.

## Következtetések

Az általunk használt Gene Check Screening kit megfelelő Taq-polimeráz enzimmal és termék azonosító módszerrel (H.A. yellow-elektroforézis) kiegészítve (3. ábra), jól alkalmazható az RR-szója, illetve 35S és/vagy NOS szekvenciákat tartalmazó növények vizsgálatára. A vizsgálatba bevont élelmiszerekben nem detektáltuk az általánosan használt szabályozószekvenciák egyikét sem, ami a viszonylag kis számú mérési adat alapján semmiképp sem jelenti azt, hogy a termékek készítésének időpontjában (2000.11.10.) transzgén szója még nem került Magyarországra.



**3. ábra: Az élelmiszerminták 35S-PCR-jének eredményei**  
(H.A. yellow gélelektroforézis)

## IRODALOM

- [1] Boross Tiborné: A mezőgazdasági biotechnológia mai helyzete és kilátása – vállalati politika, fogyasztói bizalom(-vesztés), terjesztési gondok. *Biotechnológia*, **4** (2001) 15-23.
- [2] H. Hardegger, P. Brodmann, A. Herrmann: Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur Food Res. Technol.*, **209** (1999) 83-87.
- [3] R. Meyer: Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, **10** (1999) 391-399.
- [4] A.M.A. Van Hoef, E.J. Kok, E. Bouw, H.A. Kuiper, J. Keijer: Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Add. and Cont.*, **15** (1998) 767-774.
- [5] L. Rossen, P. Nørskov, K. Holstrøm, O.F. Rasmussen: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assay and DNA-extraction solution. *Int. Journal of Food Microb.*, **17** (1992) 37-45.
- [6] M. Lipp, P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels, E. Anklam: IUPAC Collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, **82** (1999) 923-928.
- [7] A. Zimmermann, J. Lüthy, U. Pauli: Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acid on soya bean food samples. *Lebens. Unters. Forsch. A*, **207** (1998) 81-90.
- [8] M. Stadler, P. Hübner, A. Eugster: Probleme bei der Anwendung der 35S- und NOS-PCR für die GVO-Analytik. *Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg.* **89** (1998) 308-317.