

STRATEGIA OZNACZANIA GMO W LABORATORIUM AKREDYTOWANYM JAKO ELEMENT ZAPEWNIENIA JAKOŚCI BADAŃ

Joanna Bucka-Kolendo, Michał Świątek, Katarzyna Piasecka-Józwiak, Danuta Kotyrba

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
Zakład Technologii Fermentacji
Rakowiecka 36, 05-532 Warszawa
joanna.bucka@ibprs.pl

Streszczenie

Celem pracy było zwalidowanie szybkiej metody identyfikacji i ilościowego oznaczania GMO w mączkach kukurydzianych i sojowych w oparciu o Normę EN ISO 21570:2005 „Artykuły żywnościowe. Metody wykrywania organizmów zmodyfikowanych genetycznie i produktów pochodnych, w sposób umożliwiający zastosowanie jej w analizie modyfikacji wielu roślin. Metody ilościowe oparte na kwasach nukleinowych” oraz Protokoły CRL „Event- specific method for Quantification of Maize (specyficzne do różnych modyfikacji) using Real-time PCR” z zastosowaniem znakowanych fluorescencyjnie sond molekularnych typu TaqMan. Metodę zwalidowano stosując certyfikowane materiały odniesienia (CRM), odpowiednio dobrane do poszczególnych modyfikacji oraz próbki mąki kukurydzianej pochodzące z międzynarodowych badań międzylaboratoryjnych (GIPSA). Zoptymalizowanie metody i dostosowanie jej do możliwości laboratorium, pozwala na identyfikację i ilościowe oznaczenie następujących modyfikacji: promotor P35S, MON 810, MON 863, BT 11, BT 176, NK 603, MIR 604, GA21, T25, Herkulex (TC1507), Herkulex RW (59122), Event 3272 oraz soi Roundup Ready. Udział w badaniach biegłości pozwala zweryfikować metodę wykrywania i oznaczania GMO oraz rozszerzyć zakres badanych modyfikacji o niewystępujące na terenie Polski (lub Europy).

Słowa kluczowe: oznaczanie GMO, Real Time PCR, genetycznie zmodyfikowane organizmy, GMO, certyfikowane materiały odniesienia,

GMO DETERMINATION STRATEGY IN AN ACCREDITED LABORATORY AS A PART OF CONFIRMATION OF QUALITY ASSURANCE

Summary

The aim of this work was to validate fast method of identification and quantity determination of GMO in maize and soy flour according to the Norm EN ISO 21570:2005

„Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods” and protocols of CRL „Event-specific method for Quantification of Maize Line (specific for every line) using Real-time PCR” with the use of fluorescent molecular probes in TaqMan type. Method has been validated with the use of certified reference materials (CRM) adequately to individual modification and samples of maize flour from USDA/GIPSA Proficiency Program. Method optimization and adaptation to capabilities of the laboratory, allows to identify and quantitative determinate of the following modifications: promoter P35S, MON 810, MON 863, BT 11, BT 176, NK 603, MIR 604, GA21, T25, Herkulex (TC1507), Herkulex RW (59122), Event 3272 and soy Roundup Ready. Participation in proficiency testing permits to verify the method of detection and identification of GMO's and to extend the range of modification of the one that don't exist in Poland (or in Europe).

Key words: GMO identification, quantity detection, Real Time PCR, genetically modified organisms, GMO, certified reference materials.

WPROWADZENIE

Stale rozszerzający się areal upraw oraz różnorodność roślin genetycznie zmodyfikowanych (GM) sprawia, że stajemy przed coraz większym prawdopodobieństwem zetknięcia się z materiałem GM w łańcuchu żywnościowym. W Unii Europejskiej wzrasta ilość upraw zmodyfikowanej kukurydzy do 115,5 tys. ha (2011 rok), w tym 85% zasiewów GM znajduje się na terenie Hiszpanii. Do upraw w UE, w tym w Polsce, dopuszczona jest tylko jedna odmiana GM kukurydzy linia MON 810. Do stosowania w produkcji żywności dopuszczone są modyfikacje: MON 810, Bt 11, NK 603, 1507, T25 i soja RR (Roundup Ready). Jako dodatek do pasz dla zwierząt dopuszczone są materiały genetycznie zmodyfikowane: 26 odmian kukurydzy, 3 odmiany rzepaku, 6 odmian soi, 1 odmiana ziemniaka, 8 odmian bawełny i 1 odmiana buraka cukrowego.

Wskutek komercjalizacji odmian GM upowszechnia się stosowanie surowców zmodyfikowanych genetycznie (GMO) w produkcji żywności. Wiele państw wdrożyło przepisy regulujące użycie GMO w przemyśle spożywczym, w krajach Unii Europejskiej obowiązują dyrektywy regulujące wszystkie aspekty dotyczące stosowania GMO. Jednak zastosowanie surowców GMO w produkcji żywności i pasz nadal budzi kontrowersje i wątpliwości. Pociągnęło to za sobą konieczność rozwoju technik analitycznych

pozwalających na detekcję oraz ocenę udziału GMO w płodach rolnych i produktach spożywczych. Prowadzone są wciąż badania nad wpływem rekombinowanego materiału genetycznego i kodowanych przez nowe geny białek na homeostazę konsumenta, trwa dyskusja nad bezpieczeństwem żywności i pasz zawierających GMO [Greiner i Konietzny, 2007; Nemeth i in., 2004; Mazza i in., 2005; Sharma i in., 2006]. Znaczna większość prowadzonych na świecie badań, w tym polskich, wskazuje na brak negatywnego wpływu pasz GMO na zwierzęta [Raport, Kraków 2012].

Zgodnie z postanowieniami Unii Europejskiej obecność autoryzowanych modyfikacji GMO powinna być badana i oznaczana ilościowo przy wykorzystaniu metod specyficznych wobec konkretnej modyfikacji (tzw. event-specific) i odpowiednio dobranych materiałów odniesienia. Jednakże badania te są zazwyczaj poprzedzane metodą przesiewową, opartą na identyfikacji sekwencji DNA często występujących w roślinach transgenicznym. Obecnie zostało opisanych wiele metod detekcji GMO opartych na reakcji PCR ukierunkowanej na amplifikację specyficznych sekwencji DNA, charakterystycznych dla odmian różnych roślin GM [Gachet i in., 1999]. Diagnostyka GMO może opierać się na detekcji elementów modyfikacji, które można znaleźć w poszczególnych odmianach GM, takich jak konstrukty 35S-pat, bar, pat, CP4-EPSPS, CryIAb czy promotor FMV. Powszechnie stosowaną metodą przesiewową jest badanie obecności promotora wirusa mozaiki kalafiorowej (CaMV) P35S i terminatora bakterii *Agrobacterium tumefaciens* – T-nos. Interpretując wyniki badań przesiewowych (screeningu) z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, czy w badanej próbce występuje materiał GMO. Spośród podanych 23 przykładowych modyfikacji, tylko jedna (LY038, autoryzowana do stosowania w Holandii) nie zawiera najpopularniejszych sekwencji regulatorowych P35S i NOS (Tabela 1).

Zarówno w przypadku badań ukierunkowanych na wykrycie konstruktyw jak i sekwencji regulatorowych typowych dla GMO detekcja następuje dzięki zastosowaniu w reakcji PCR primerów specyficznych względem docelowych sekwencji [Lipp i in., 1999; Forte i in., 2005].

Tabela 1. Obecność promotora p35S i terminatora NOS w wybranych modyfikacjach

The presence of P35S promoter and the NOS terminator in selected maize modifications.

Modyfikacja	p35S	NOS
176 (Maximizer)	Tak	Nie
1507 (Herculex)	Tak	Nie
B16	Tak	Nie
Bt10	Tak	Tak
Bt11 (Agrisure Advantage)	Tak	Tak
CBH-351 (Starlink)	Tak	Tak
DAS-06275-8	Tak	Nie
DAS-59122-7 (Herculex RW)	Tak	Nie
DBT418 (Bt-Xtra)	Tak	Nie
GA21	Nie	Tak
LY038	Nie	Nie
MIR604 (Agrisure RW)	Tak	Tak
MON 80100	Tak	Tak
MON802	Tak	Tak
MON809	Tak	Tak
MON810 (Yieldgard)	Tak	Nie
MON832	Tak	Tak
MON863	Tak	Tak
MON88017	Tak	Tak
MS3	Tak	Tak
MS6	Tak	No
NK603 (Roundup Ready)	Tak	Tak
T14	Tak	Nie
T25 (Liberty Link)	Tak	Nie

Należy jednak pamiętać, że sama metoda przesiewowa nie daje pełnej informacji o rodzaju modyfikacji, ani o ilości w jakiej znajduje się w badanym materiale. Unijne wymogi nakładają obowiązek znakowania produktów zawierających GMO w ilości powyżej 0,9% [(EC) No.1830/2003]. Wykrycie genetycznej modyfikacji w próbce, w wyniku badań

przesiewowych, powinno zostać potwierdzone badaniami ilościowymi. W tym celu wykorzystuje się technikę Real Time PCR, która pozwala na analizę przyrostu produktu w trakcie trwania procesu amplifikacji (w czasie rzeczywistym) i monitorowanie przebiegu reakcji w czasie jej trwania [Weighardt, 2007]. Technika Real Time PCR stanowi obecnie bardzo popularną i pożądaną metodę badań w biologii molekularnej [Gachet i in., 1999]. Jest to doskonałe narzędzie nie tylko w badaniach nad identyfikacją GMO oraz poszukiwaniu i tworzeniu nowych odmian i modyfikacji, ale również może być wykorzystywane w badaniach ekspresji genów, genotypowaniu oraz w określaniu miana patogenów.

Ilościowe oznaczanie GMO oparte jest na wyznaczeniu zawartości GMO na podstawie krzywej standardowej otrzymanej przy wykorzystaniu referencyjnych materiałów odniesienia. Metoda ta umożliwia wysoce czułe i dokładne oznaczenie modyfikacji, przez co stanowi doskonałe narzędzie do rutynowych analiz nieprzetworzonych i przetworzonych produktów żywnościowych i pasz. Wysoka czułość sprawia, że technika Real Time PCR jest głównym narzędziem do oznaczania GMO w produktach pochodzenia roślinnego. Analiza opiera się na pomiarze emisji sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości produktu wytwarzanego w każdym cyklu reakcji [Bonfini, in. 2002; Toyota, in., 2005; Weighardt, 2007]. Ilościowe oznaczanie (podawane w %) określa stosunek dwóch sekwencji docelowych DNA: transgenu- sekwencji reprezentującej badany organizm zmodyfikowany genetycznie oraz sekwencji specyficznej w odniesieniu do danego taksonu - np. fragment endogenego genu dehydrogenazy alkoholowej *adh1*, występującego w genomie kukurydzy. Weryfikacja metody w odniesieniu do badań międzylaboratoryjnych umożliwia odpowiednie przygotowanie laboratorium oraz zweryfikowanie stosowanej techniki w szerokim zakresie pod względem analiz modyfikacji występujących na terenie Europy jak również tych, które nie zostały dopuszczone do stosowania.

Celem pracy była ilościowa analiza obecności GMO w próbkach mąki kukurydzianej pochodzących z międzynarodowych badań międzylaboratoryjnych, organizowanych przez Ministerstwo Rolnictwa Stanów Zjednoczonych- USDA GIPSA. Do badań wykorzystano techniki Real Time PCR oraz odpowiednio dobrane do poszczególnych modyfikacji, znakowane sondy molekularne typu TaqMan. Badania przeprowadzone w laboratorium Zakładu Technologii Fermentacji ukierunkowane były na wykrycie promotora P35S oraz następujących modyfikacji: MON 810, MON 863, BT 11, BT 176, NK 603, MIT 604, GA21, T25, Herkulex (TC1507), Herkulex RW (59122), Event 3272.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiły próbki mąk (kukurydzianej i sojowej) pochodzących od organizatora badań międzylaboratoryjnych (GIPSA- Grain Inspection, Packers & Stockyards Administration). Informacja o obecności i ilości GMO w otrzymanym materiale była tajemnicą organizatora badań. W badaniach równocześnie stosowano certyfikowane materiały odniesienia kukurydzy (MON810, MON863, Bt11, Bt176, NK 603) i soi (Roundup Ready) o znanej zawartości modyfikacji.

Z wymienionych próbek wyizolowano DNA komercyjnym zestawem NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) zgodnie z instrukcją producenta. Czystość DNA oznaczono na podstawie stosunku absorbancji przy długości fal 260 nm i 280 nm.

Oznaczanie ilościowe zawartości GMO w próbkach przeprowadzono metodą Real Time PCR przy użyciu aparatu ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej wykorzystano odczynnik JumpStart Taq Ready Mix for Quantitative PCR (Sigma Aldrich), który nie zawiera barwników, co umożliwia zastosowanie dowolnie wybranych barwników fluoroscencyjnych do oznaczania sond molekularnych. Jako pasywny barwnik referencyjny zastosowano ROX, którego maximum wzbudzenia znajduje się przy 586 nm, a maximum emisji przy 605 nm. Do optymalizacji reakcji użyto $MgCl_2$ oraz wody wolnej od DNA i RNA (Tab. 2).

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

The composition of the PCR reaction mixture

Składnik	Stężenie	μl/reakcję
JumpStart Ready Mix	1 x	12,5
MgCl₂	25 nM	5,5
ROX		0,55
Primer F	150 nM	0,75
Primer R	150 nM	0,75
Sonda	50 nM	0,45
Matryca DNA (max.200ng)		
H₂O	#	
Objętość końcowa		25

Sondy zostały wyznakowane zgodnie z zaleceniami Komisji Europejskiej, CRL (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed) oraz odpowiednio do parametrów technicznych urządzenia ABI PRISM 7000 dwoma fluoroscencyjnymi barwnikami FAM i TAMRA, gdzie barwnik reporterowy FAM (6-karboksyfluoresceina) znajduje się na końcu 5' zaś barwnik wygaszający TAMRA (6- karboksy-tetrametylorodamina) na końcu 3'. Sekwencje primerów i sond charakterystyczne w odniesieniu do poszczególnych modyfikacji były zgodnie z Normą PN-EN ISO 21570:2007 oraz protokołami postępowania przy oznaczaniu modyfikacji metodą Real Time PCR wydanymi przez CRL (http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/pcr/GMO-JRC_Reference%20Report_2011.pdf). W tabelach 3 i 4 przedstawiono przykładowe sekwencje primerów i sond, zaprojektowanych do identyfikacji genu referencyjnego kukurydzy oraz modyfikacji NK 603.

Tabela 3. Sekwencje oligonukleotydów stosowane do wykrywania genu referencyjnego *adh1*

The sequences of oligonucleotides used to detect the adh1 reference gene

Sekwencja genu GMO dla genu referencyjnego	
Adh1- primer F	5'- TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GCT GA -3'
Adh1- primer R	5'- GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T -3'
Sonda Adh1	5'- FAM- CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA- TAMRA-3'

Tabela 4. Sekwencje oligonukleotydów stosowane do wykrywania modyfikacji NK 603

The sequences of oligonucleotides used to detect the NK 603 modification

Sekwencja genu GMO dla NK 603	
NK 603 - primer F	5'-ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA- 3'
NK 603 - primer R	5'- AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T - 3'
Sonda NK 603	5' -FAM- TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC - TAMRA- 3'

Każda próbka badana była w dwóch powtórzeniach wg zoptymalizowanego profilu temperaturowego, a warunki i czas poszczególnych etapów reakcji podano w tabeli 5. Równolegle przeprowadzono również odpowiednie kontrole celem uniknięcia błędnej interpretacji wyników (eliminacja ryzyka wystąpienia wyników fałszywie negatywnych lub fałszywie pozytywnych). Procentową zawartość obliczono przy użyciu aplikacji GMO Analysis Macro Report Sheet (Applied Biosystems).

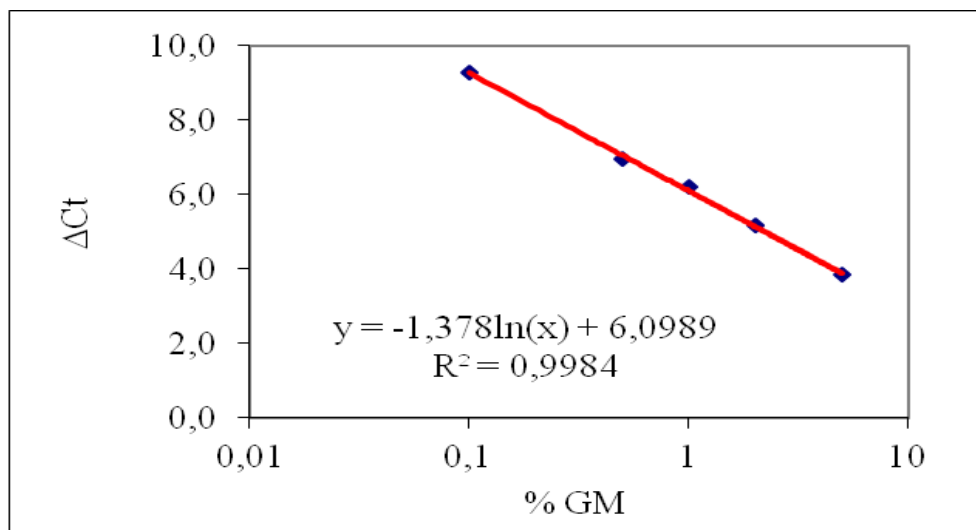
Tabela 5. Profil temperaturowo-czasowy programu Real Time PCR do oznaczania GMO.

Temperature-time profile of the Real Time PCR to determine GMO

Etap		T °C	Czas (sec)	Liczba cykli
Dekontaminacja		50	120	1
Wstępna aktywacja polimerazy i denaturacja matrycy DNA		95	600	1
Amplifikacja	Denaturacja	95	15	45
	Przyłączanie starterów i wydłużanie matrycy	60	60	

WYNIKI I DYSKUSJA

Zawartość GMO w próbce została wyrażona jako stosunek ilości produktu specyficznego transgenu do ilości produktu otrzymanego w toku reakcji ukierunkowanej na amplifikację endogennego genu referencyjnego. Poziom GMO (%) w każdej próbce określono na podstawie interpolacji krzywej standardowej w odniesieniu do ilości genu specyficznego i genu referencyjnego. Krzywą standardową w odniesieniu do każdej z modyfikacji wyznaczono w oparciu o wyniki reakcji przeprowadzonych z udziałem DNA wyizolowanego z certyfikowanych materiałów odniesienia (rys. 1). Otrzymaną w technice Real Time PCR krzywą wzorcową charakteryzują: współczynnik nachylenia i współczynnik R^2 . Nachylenie krzywej standardowej informuje o skuteczności przeprowadzonej reakcji PCR (100% \rightarrow slope = -3,33), natomiast korelacja R^2 jest wskaźnikiem odtwarzalności pipetowania, i powinna wynosić $\geq 0,99$.



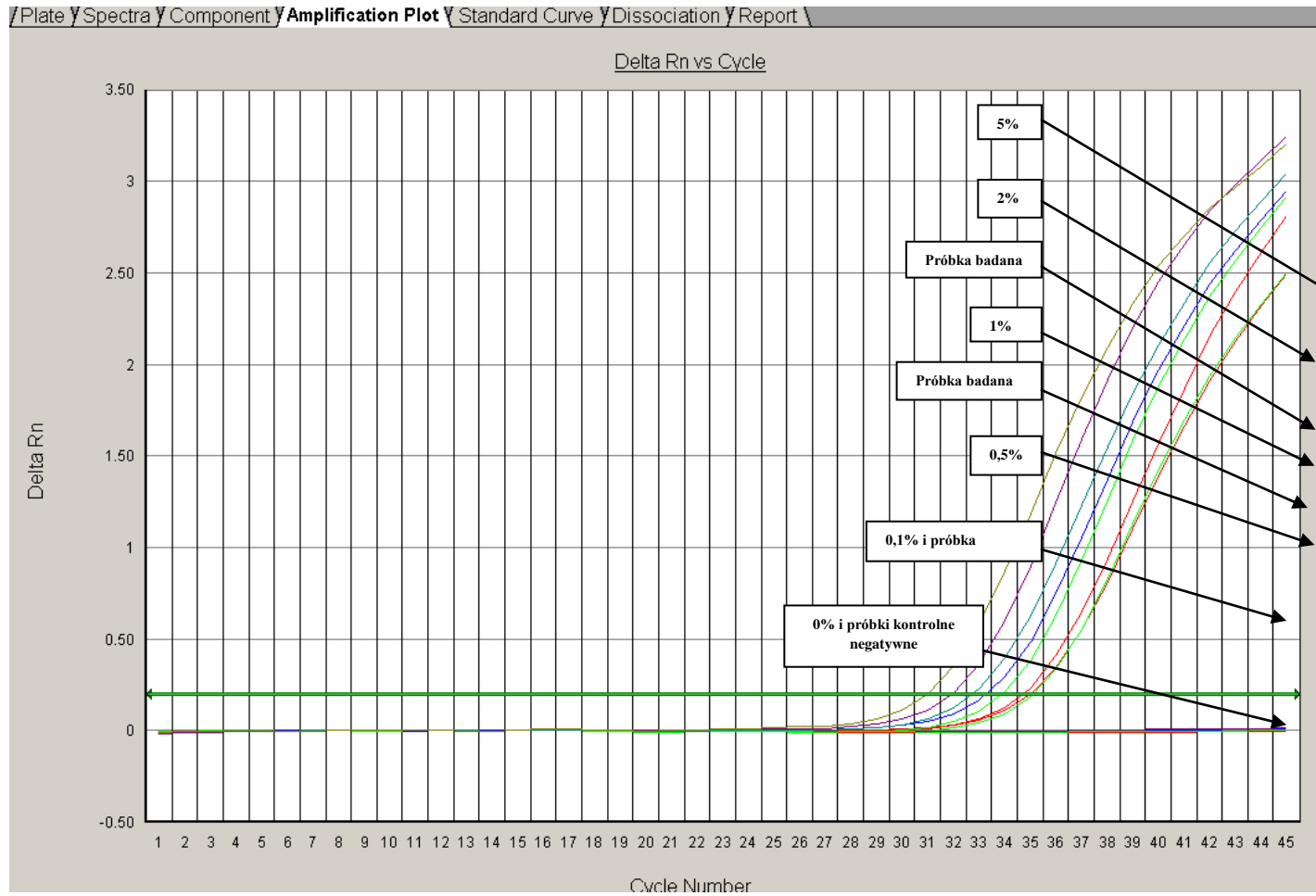
Rysunek 1. Krzywa standardowa wyznaczona na podstawie stosunku target do taksonu w próbkach.

The standard curve determined on the basis of the rate of the target to the taxa in the samples

W poszczególnych próbkach, pochodzących z badań międzylaboratoryjnych, mogły znajdować się różne kombinacje modyfikacji: MON 810, MON 863, BT 11, BT 176, NK 603, MIT 604, GA21, T25, Herkulex(TC1507), Herkulex RW (59122), Event 3272 oraz soi: Roundup Ready. Spośród wszystkich w/w modyfikacji ilościowo analizowano tylko te, w odniesieniu do których dostępne były materiały odniesienia, tj. MON810, MON863, Bt11, Bt176, NK 603 i soję RR. Przykładowy wynik analizy zawartości odmiany NK 603 w certyfikowanych materiałach odniesienia i badanych próbkach przedstawiono na rysunku 2.

Rysunek 2. Analiza zawartości modyfikacji NK 603 w certyfikowanych materiałach odniesienia oraz w badanych próbkach. Oś X – numer cyklu reakcji PCR; oś Y – wartość fluorescencji.

The analysis of the content of modified NK 603 in certified reference materials and in samples. X axis- the number of PCR cycles, the Y axis- the value of fluorescence.



Granica wykrywalności metody (LOD) została określona na poziomie 0,01%. Sekwencję regulatorową P35S wykryto w 70% badanych próbek, pozostałe 30% próbek dało wynik negatywny. Modyfikacje T25, GA21 i MIR604 wykryto w 66,6% próbek. Obecność modyfikacji Herkulex (TC1507), Herkulex RW (59122), Event 3272 i soi Roundup Ready wykryto w 50% badanych próbek. Wyniki badanych jakościowo próbek oznaczonych jako pozytywne lub negatywne, zostały potwierdzone jako oznaczone właściwie w raporcie z badań międzylaboratoryjnych sporządzonym przez organizatora.

W oznaczeniach ilościowych największą precyzję wyników uzyskano w przypadku NK 603, MON 863 i soi RR, gdzie poprawność wyników była 100%, zaś w wynikach analizy modyfikacji Bt 11 i Bt 176 oznaczono 1 próbkę, spośród analizowanych, jako fałszywie negatywną, zaś w przypadku modyfikacji MON 810 uzyskano 2 fałszywie negatywne wyniki, jednak błąd nie przekraczał poziomu istotności. Przyczyny otrzymania fałszywie negatywnych bądź fałszywie pozytywnych wyników, można doszukiwać się w niepewności certyfikowanych materiałów odniesienia, która w niektórych przypadkach może dochodzić do 50% deklarowanej przez producenta wartości.

Przykład wyników oznaczeń jakościowych i ilościowych soi Roundup Ready, w odniesieniu do danych z badań międzylaboratoryjnych GIPSA przedstawiono w tabeli 6, zaś dla próbek kukurydzy w tabelach 7 i 8.

Tabela 6. Porównanie wyników analizy jakościowej (P, N) i ilościowej [%] obecności modyfikacji Roundup Ready w próbkach mączki sojowej (S1-S4) z wynikami organizatora badań (GIPSA). P – wynik pozytywny, N – wynik negatywny.

Comparison of qualitative (P,N) and quantitative results [%] in the modified Roundup Ready soy flour samples (S1-S4) with the results of organizer (GIPSA). P-positive, N-negative

Soja Roundup Ready	S1		S1		S1		S1	
	Otrzyma-ny	wg GIPSA	Otrzyma-ny	wg GIPSA	Otrzyma-ny	wg GIPSA	Otrzyma-ny	wg GIPSA
zawartość modyfikacji Roundup Ready	0 % (N)	0 %	0,6 % (P)	1,5 %	0,1 % (P)	0,2 %	0 % (N)	0 %

Tabela 7. Porównanie wyników analizy jakościowej (P, N) obecności modyfikowanych odmian kukurydzy w próbkach mączki kukurydzianej (C1-C6) z wynikami organizatora badań (GIPSA). P – wynik pozytywny, N – wynik negatywny.

Quality results (P, N) comparison of the presence of the modified type maize in maize flour samples (C1-C6) with the results of proficiency program organizer (GIPSA). P-positive, N-negative.

Modyfikacja	35S		T25		GA21		Herculex RW		Herculex 59122		MIR 604		EVENT 3272	
	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA
C1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P
C2	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	P	P	P	P
C3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C4	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
C5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N

Tabela 8. Porównanie wyników analizy ilościowej [%] obecności modyfikowanych odmian kukurydzy w próbkach mączki kukurydzianej (C1C6) z wynikami organizatora badań (GIPSA). Gwiazdką zaznaczono wyniki fałszywie pozytywne lub fałszywie negatywne.

Quantity results [%] comparison of the presence of the modified type maize in maize flour samples (C1-C6) with the results of proficiency program organizer (GIPSA). P-positive, N-negative.

Modyfikacja	NK 603		MON 863		MON 810		BT 11		BT176	
	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA	otrzymany	wg GIPSA
C1	0%	0%	0,7%	0,4%	0%*	0,1%	2,2%	1,8%	0,7%	0,8%
C2	0%	0%	0%	0%	0,2%	0,5%	1,3%	0,75%	1,4%	1,5%
C3	1,4%	1,3%	0%	0%	0,5%	1%	0%	0%	0,1%	0%
C4	0,7%	0,65	0%	0%	1,2%	2%	0,5%*	0,1%	0%	0%
C5	0%	0%	0%	0%	0%*	0,1%	0%	0%	0%	0%
C6	0%	0%	0,7%	0,8%	0%	0%	0%	0%	0,1%*	0%

Wszystkie powyższe wyniki porównano z wynikami innych laboratoriów biorących udział w badaniach międzylaboratoryjnych. Poprawność przeprowadzonych w Zakładzie Technologii Fermentacji analiz została uznana przez organizatora badań, co potwierdziło kompetencje laboratorium w zakresie stosowanej metody.

Wskaźnik z-score otrzymanych wyników badań uzyskanych w porównaniach międzylaboratoryjnych był poniżej wartości 2, co mieściło się w przyjętym przez organizatora zakresie tolerancji, a wyniki były przyjęte jako zadowalające. Tylko w przypadku wyników dwóch próbek badanych na określenie modyfikacji MON 810 i po jednej próbce z analizowanych na obecność modyfikacji Bt11 i Bt176, otrzymany wskaźnik z-score znajdował się poza spodziewaną granicą, co dawało wynik wątpliwy. Jak wcześniej wspomniano, przyczyną takiego błędu mogły być duże niepewności certyfikowanych materiałów odniesienia względem, których otrzymano wyniki badanych próbek.

W Polsce jako jedynym kraju Unii Europejskiej obowiązuje administracyjny zakaz obrotu produktów GMO. Zakaz upraw GMO w Polsce nie daje gwarancji konsumentom, że nie będą spożywać produktów GM, ze względu na otwartość rynku europejskiego. W UE jest około 45 autoryzowanych odmian modyfikacji roślin, na świecie jest około 200 odmian, natomiast ciągle zwiększa się liczba nieautoryzowanych modyfikacji, które należy kontrolować i monitorować.

Szeroki zakres oznaczeń GM daje możliwość laboratoriom na szybką reakcję na wymagania konsumentów względem powiększającej się liczby rodzajów modyfikacji na rynku. Ważne jest, aby działania laboratorium zostały przeprowadzone w oparciu o zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę, która swoje potwierdzenie znajduje w wynikach badań międzylaboratoryjnych. Laboratorium w ramach prowadzonych badań biegłości potwierdza swoje kompetencje poprzez określenie precyzji i powtarzalności przeprowadzanych badań.

Laboratoria badające obecność GMO stają przed wyzwaniem, jakim jest posługiwanie się efektywną i pewną metodą badawczą. Stosowanie techniki Real Time PCR wymaga posiadania szczegółowych informacji o sekwencji DNA badanej modyfikacji, referencyjnych materiałów odniesienia oraz walidacji metody.

Stosując technikę Real Time PCR z wykorzystaniem sond molekularnych typu TaqMan do ilościowych oznaczeń GMO ma się do czynienia z analizą o wysokiej czułości, o stosunkowo małej wrażliwości na ewentualną słabą jakość matrycy, przy minimalnym ryzyku kontaminacji próbek. Technika pozwala na uzyskanie wyników w krótkim czasie,

zarówno jakościowej jak i ilościowej zawartości GMO w próbkach bez potrzeby przeprowadzania dalszych manipulacji np. elektroforezy. Należy jednak pamiętać, że na dokładność techniki Real Time PCR ma wpływ wiele czynników, począwszy od odpowiednio dobranych sond i odczynników, warunków przeprowadzanej reakcji, rodzaju materiału z którego pozyskano matrycowe DNA, oraz jego jakość, przez umiejętności i doświadczenie osoby przeprowadzającej analizę aż po odpowiednią aparaturę do analizy Real Time PCR.

Wyniki przedstawione w pracy wskazują na skuteczność i wysoką czułość techniki Real-Time PCR w odniesieniu do międzynarodowych badań GMO. Czułość metody pozwala rozróżnić proporcje pomiędzy komponentami odmian GMO i roślin konwencjonalnych nawet poniżej 1% zawartości badanej modyfikacji. Jednocześnie, oprócz dokładnych wyników ilościowych, daje bardzo precyzyjne wyniki jakościowe badanych modyfikacji w porównaniu z konwencjonalną metodą PCR, w której nie jest możliwe uzyskanie parametrycznych wyników.

Udoskonalanie metod inżynierii genetycznej sprzyja rozwojowi technik detekcji i monitoringu nowych genotypów uprawianych roślin GMO.

PIŚMIENNICTWO

1. Bonfini L., Heinze P., Kay S., van den Eede .: (2002) Review of GMO detection and quantification techniques. EUR 20384/EN.
2. Forte V. T., Di Pinto A, Martino C., Tantillo G. M., Grasso G., Schena F.P.: (2005) A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. *Food Control* 16: 535–539.
3. Gachet E., Martin GG., Vigneau F, Meyer G.: (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends Food Sci. Technol.* 9: 380-388.
4. Greiner R., Konietzny U.: (2007) Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. *Symposium on Transgenic Products.*
5. Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Pauwels J., Anklam E.: (1999) IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *J. AOAC Inter.*, 82: 923–928.
6. Mazza R., Soave M., Morlacchini M., Piva G., Marocco A.: (2005) Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Res.* 14: 775–84.
7. Nemeth A., Wurz A., Artim L., Charlton S, Dana G., Glenn K., Hunst P., Jennings J., Shilito R., Song P.: (2004) Sensitive PCR analysis of animal tissue samples for fragments of endogenous and transgenic plant DNA. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6129–6135.

8. PN-EN ISO 21570:2007. Artykuły żywnościowe. Metody wykrywania organizmów zmodyfikowanych genetycznie i produktów pochodnych. Metody ilościowe oparte na kwasach nukleinowych.
9. Protocols of European Union Reference Laboratory for GM food & feed. Event-specific method for quantification of maize using Real-time PCR http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/query.do?db=gmometh&query=id%3AQT-eve-zm*
10. Raport "O wpływie pasz GMO na produktywność i zdrowotność zwierząt, transfer transgenicznego DNA w przewodzie pokarmowym oraz jego retencję w tkankach i produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego". Instytut Zootechniki PIB. Kraków 2012.
11. Rozporządzenie (EC) No 1830/2003 Parlamentu Europejskiego Unii Europejskiej z dnia 22 września 2003. Official Journal of the European Communities No L268/24, 18.10.2003. concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC
12. Sharma R., Damgaard D., Alexander T. W., Dugan M. E. R., Aalhus J. L., Stanford K., McAllister T. A.: (2006) Detection of transgenic and endogenous plant DNA in digesta and tissues of sheep and pigs fed Roundup Ready canola meal. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1699–1709.
13. Toyota A., Akiyama H., Sugimura M., Watanabe T., Sakata K., Shiramasa Y., Kitta K., Hino A., Esaka M., Naitani T.: (2006) Rapid quantification methods for genetically modified maize contents using genomic DNAs pretreated by sonication and restriction endonuclease digestion for a capillary-type Real Time PCR system with a plasmid reference standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (12): 2965-2973.
14. Weighardt F.: (2007) Wykrywanie GMO metodą ilościowego PCR. W: Badanie próbek żywności na obecność Genetycznie Zmodyfikowanych Organizmów. <http://gmotraining.jrc.it/>