

POSTUP IDENTIFIKACE GMO

Ovesná Jaroslava

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, tel. 233022424 e-mail ovesna@vurv.cz

Geneticky modifikované organismy (GMO) vznikají díky činnosti člověka. Genom jakéhokoliv organismu může být pozměněn přidáním nebo vynětím části genetické informace. Jedná se o mikroorganismy, rostliny i živočichy. V životním prostředí se můžeme setkat zatím s rostlinami – jedná se o polní pokusy a pěstování GMO plodin, které jsou považovány za bezpečné. Uvolňování GMO do prostředí podléhá legislativním ustanovením, ze kterých plyne nutnost jejich sledovatelnosti. K zajištění sledovatelnosti a kontroly je třeba disponovat metodami, které umožňují GMO jednoznačně identifikovat a je-li třeba, kvantifikovat.

Príspevek shrnuje současné požadavky na metody stanovení GMO, které jsou využívány ke kontrole akreditovanými laboratořemi.

Klíčová slova: GMO, legislativa, detekční metody, PCR

Úvod

Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou definovány podle směrnice EU 2001/18 jako všechny organismy kromě člověka, jejichž genetický materiál byl modifikován jiným způsobem než se běžně děje v přírodě rekombinací rodičovských genomů. GMO jsou pečlivě sledovány a před uvolněním do oběhu (tj. na trh) je hodnocena jejich bezpečnost. Hodnocení vychází z k tomu určených pokusů a využití toho kterého GMO. U GMO uvolněných do životního prostředí předchází obvykle hodnocení v polních pokusech.

V současné době se můžeme setkat s geneticky modifikovanými (1) mikroorganismy. Ty se obvykle kultivují v uzavřeném prostoru. Může však dojít k jejich úniku. Viz. např. přítomnost geneticky modifikovaných bakterií *Bacillus subtilis* produkujících vitamin B2 ve výrobku dovezeném do EU přes Švýcarsko z Číny (2014). Do životního prostředí pro potřeby zemědělské produkce GM mikroorganismy uvolněny zatím nebyly. V blízké budoucnosti se mohou v otevřených oblastech vyskytnout GM řasy, které jsou zdrojem energie a cenných látek. (2) Ve zkouškách je již GM hmyz, který byl uvolněn do prostředí mimo EU pro experimentální ověřování. (3) GM rostliny patří k nejvíce kontroverzním. Ve světě je pěstováno přes 200 odlišných GMO. V rámci EU je povoleno pěstování jediné GM plodiny – kukuřice MON810. Dalších 50 se může dovážet do EU ve formě semen, která případně mohou životní prostředí kontaminovat stejně jako nepovolené příměsi neschválených GMO. (4) Transgenní (GMO) živočichové nejsou nikde ve světě do oběhu uvolněni jako zdroj potravin, ale probíhá řada pokusů. Nejblíže uvolnění je transgenní losos, zatím známý pod názvem AquAdvantage. GM živočichové se v životním prostředí nevyskytují.

Podle legislativních opatření je v EU vyžadována sledovatelnost GMO a produktů z nich vyrobených (nařízení EU 1829/2003). Z toho plyne povinnost značit GMO, potraviny a krmiva

z nich vyrobené. Jednak pro možnost je v případě potřeby (např. zjištění negativního efektu na zdraví a životní prostředí) dohledat a také pro informované rozhodování spotřebitele.

Stejně tak musí být dohledatelná GMO ve fázi výzkumu a testování. Proto je třeba disponovat spolehlivými metodami detekce.

Kontroly nakládání s GMO

Kontroluje se nakládání s GMO pro experimentální účely, zejména

- (1) v laboratořích a uzavřených provozech (GM mikroorganismy, zvířata, hmyz, rostliny)
- (2) v životním prostředí (zjm. GM rostliny).

Taková GMO kontroluje Česká inspekce životního prostředí. Do její působnosti spadá i kontrola případného výskytu nepovolených GMO v osivech, sadbě nebo v polních porostech.

Nakládání s GMO, které vstupují do potravního řetězce, kontroluje Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a to GMO a produkty z nich odvozené. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ), a to GMO uvolněné do oběhu v krmivech a osivech. Veterinární produkty a krmiva kontroluje dále SVS (Státní veterinární správa).

Pro kontrolu GMO jsou vyvíjeny metody, které jednoznačně mohou určit jednotlivé GMO (požadavek legislativy). Všechny GMO, které byly v EU uvolněny do oběhu, byly vyhodnoceny jako bezpečné z pohledu současných znalostí vědy a výzkumu a současně pro ně byly validovány detekční techniky. Validaci zajišťuje Referenční laboratoř Evropského společenství EU-RL (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>). Na validaci se podílí síť evropských laboratoří (ENGL) a metody jsou používány ve všech členských státech EU.

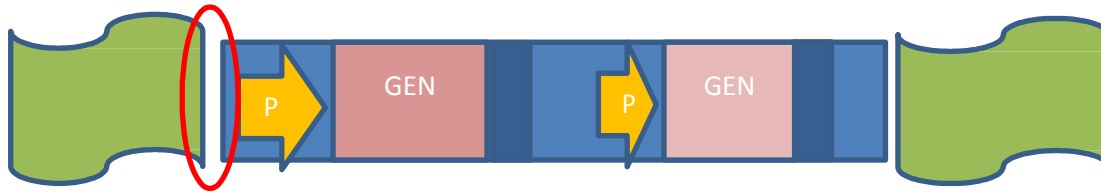
Obdobně musí žadatelé o schválení nakládání s GMO v ČR poskytnout MŽP detekční metodu a referenční materiál. Ten je uložen ve vybraných laboratořích.

Metody detekce GMO vycházejí z principů jejich tvorby.

Princip tvorby GMO

Pro tvorbu GMO se obvykle izoluje žádaný gen (řetězec DNA), opatří se vhodným promotorem, tj. sekvencí DNA, která umožňuje jeho přepis do RNA a proteinu. Přepis je ukončen díky přítomnosti terminátoru, což je opět specifický úsek DNA. Propojením těchto elementů vzniká tzv. konstrukt. Někdy mohou být začleněny další elementy, tj. úseky DNA se specifickou funkcí – zesilují expresi nebo ji modulují. Jedná se o tzv. rekombinantní DNA nebo rekombinantní kazetu. Ta se přenáší jako celek do genomu akceptora. Obvykle jsou přenášeny 2 geny, jeden z nich kóduje žádaný protein, druhý umožňuje selekci geneticky modifikovaných buněk. Rekombinantní DNA jsou stabilně integrovány do genomu, přenášeny do dalších generací ve smyslu mendelistické dědičnosti. Každý GMO je tedy tvořen rekombinantní kazetou s typickými elementy, která je včleněna do konkrétního místa

chromozomální DNA akceptorového organismu. Právě sekvence obklopující spojení DNA akceptora a rekombinantní DNA určuje přesně dané GMO (GMO událost) – viz. Obr. 1.



Obr. 1: Schématické znázornění transgenu. Zelená oblast – rostlinná DNA, modrý obrys - transgenní kazeta, žluté oblasti - promotory, růžová - funkční geny, tmavě modrá terminátory, červený kruh – místo pro jednoznačné určení transgenní události zahrnující část transgenu a rostlinné DNA.

Identifikace GMO

GMO může být identifikován díky vnesené DNA, RNA, která je podle ní transkribována, a výslednému proteinu, který vzniká nebo změně metabolitů.

Metody zaměřené na stanovení specifických metabolitů jsou příliš nákladné a nebyly pro účely stanovení GMO validovány a zavedeny. Naopak jsou k dispozici imunologické metody, které mohou identifikovat výsledný protein. Jedná se zejména o ELISA (angl. zkratka enzyme-linked immuno sorbent assay), která umožňuje kvantitativní stanovení sledovaného proteinu. ELISA je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). ELISA test je k dispozici pro GMO rezistentní k herbicidu na bázi glyfosátu (tzv. Roundup Ready GMO) a GMO obsahující Cry protein zajišťující odolnost k hmyzím škůdcům. Testy nejsou specifické pro typ GMO (Roundup Ready nebo Cry geny se vyskytují ve více GMO). Nesplňují tedy jeden ze základních požadavků evropské legislativy. Navíc jsou vhodné pouze u nezpracovaných GMO, které obsahují nativní proteiny. ELISA testy ve formě testovacích proužků však umožňují detekovat GMO během několika minut a v deskovém uspořádání umožňují semi-kvantitativní analýzu. RNA, resp. mRNA specifická pro GMO má obdobné nedostatky. Jedná se o málo stabilní molekulu a nerozlišuje jednotlivé typy GMO. Zkouška, která umožňuje rozlišit každý GMO, cílí na DNA. Každý GMO má své specifické úseky DNA v hraniční oblasti, které ho odlišují od jiných GMO včetně takových, které obsahují identický konstrukt. Lze identifikovat nejen gen, který kóduje určitou vlastnost, ale i promotory, enhancery nebo terminátory. DNA je stabilní molekula, jejíž části lze identifikovat i ve fragmentovaném stavu.

Existuje řada postupů, jak identifikovat specifický úsek DNA. DNA je dvouřetězcová molekula. Řetězce DNA jsou komplementární. Jedná se o metody, které využívají schopnost DNA hybridizovat, tj. spojovat dva komplementární řetězce. Je-li jeden z řetězců označen, je možné vzniklou dvouřetězcovou strukturu vizualizovat. Na tomto principu je založena tzv. Southernova hybridizace, která se používá pro zkoumání GMO, zjm. pro určení počtu kopií

dané kazety v genomu. Pro stanovení GMO se využívá PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce), kdy enzym – termostabilní polymeráza (Taq polymeráza a její varianty) z úseku DNA (primeru), který je komplementární k cílové DNA (amplikonu) syntetizuje úsek DNA. V reakci se využívají 2 primery, které ohraničují ampikon. Počty ampikonů se rychle množí díky cyklickému schématu reakce. Výsledné ampikony lze vizualizovat. Ampikony mají specifickou délku. Díky přístrojovému vybavení lze jejich počet v reakci sledovat v reálném čase. Využitím specifické sondy, která zvyšuje specifitu reakce, lze množství GMO kvantifikovat. PCR a zjm. real-time PCR je vysoce specifická. Vzhledem k tomu jsou validované metody běžně používané k identifikaci a kvantifikaci GMO založeny na metodě PCR.

VZORKOVÁNÍ

Vzhledem k tomu, že se obvykle nekontroluje jen identita GMO na daném stanovišti, ale jeho šíření do prostředí, je třeba provádět vzorkování určité plochy, tak aby odebraný vzorek reprezentoval zastoupení daného GMO v kontrolované lokalitě nebo souboru. Výskyt GMO a jeho distribuce jsou náhodné, a proto je třeba zajistit, aby odebraný vzorek reprezentoval výskyt GMO v kontrolovaném materiálu. Blíže viz např. Kučera I., Ovesná J. : Metody vzorkování pro účely stanovení GMO, VÚRV, v.v.i., 2009, 978-80-7427-025-3, DEFRA Project Cb 0209 Statistical Theory and Analysis of GMO Enforcement (Stage), Sustar et al. (2010) (Development of sampling approaches for the determination of the presence of genetically modified organisms at the field level, Anal Bioanal Chem. 2010 Mar;396(6):2031-41. doi: 10.1007/s00216-009-3406-4., EU Regulation 619/2009).

IZOLACE DNA

Izolace DNA je významnou součástí stanovení GMO. Pro potřeby Ministerstva životního prostředí (MŽP) lze očekávat, že DNA bude třeba izolovat z rozličných mikroorganismů při jejich úniku do životního prostředí, GM rostlinných pletiv na stanovištích a v jejich okolí, v krmivech, kde se mohou vyskytovat životaschopná semena rostlin. Řada postupů je popsána v ČSN EN ISO 21571 Potraviny - Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů – extrakce nukleové kyseliny.

Musí být zvolen postup, který umožňuje získat DNA v čisté formě, prostou inhibitorů a enhancerů, které mohou ovlivnit výsledek stanovení. Protokol je třeba ověřit (verifikovat) pro danou matici. Vždy se provádí paralelně i extrakční kontrola (postup, který zahrnuje všechny kroky, avšak neobsahuje žádný analyt). Tak je zajištěno, že extrakce nevede ke kontaminaci vzorku. S touto extrakční kontrolou se pak provádějí stejné analýzy jako s izolovanou DNA.

KONTROLA KVALITY DNA

Je vhodné provádět kontrolu získané DNA. Ta se provádí nejčastěji spektrofotometricky měřením koncentrace při vlnových délkách 260, 280 a 240 nm. Přesnější je fluorometrické stanovení. Velmi často se hodnotí integrita DNA po elektroforetické separaci na agarozovém gelu. Významnou kontrolou je kontrola amplifikovatelnosti získané DNA. Využívá se ampikon druhově specifického genu nebo ampikony typické pro více druhů, rodů. Např. u

rostlin se využívá amplikon specifický pro geny v chloroplastech, transferové RNA nebo druhově specifické geny jako je lektin pro sóju, zein pro kukuřici či patatin pro brambor. Jen tak lze odhalit a zabránit vzniku falešných negativ.

IDENTIFIKACE GMO

Počet různých typů GMO stále narůstá. Dříve laboratoře používaly pro jejich určení omezený soubor primerů, specifických pro jednotlivé GMO, nyní se využívá soubor skriningových elementů typických pro skupinu GMO, aby se zjistilo, zda produkt obsahuje GMO. Obvykle se jedná o regulační elementy (promotory a terminátory) nebo také o selekční markery.

Obvykle se využívá 7 - 10 takových elementů. Pokud je zjištěna přítomnost některých elementů, je možné zúžit počet GMO, které jsou v produktu zastoupena. Některé GMO však nejvíce rozšířené elementy neobsahují. Identifikace se provádí přímo pomocí specifických sad primerů. Pokud se zjistí přítomnost GMO podle elementů, je nutné provést průkaz přítomnosti specifického GMO. Pokud není zjištěna přítomnost GMO uvolněného do oběhu, je produkt nelegální a musí být stažen z trhu. Proto je vždy třeba stanovit, zda se jedná o schválený GMO. Pro pěstování byla v EU schválena pouze GM kukuřice MON810, jiné se tedy v osivech a na polích nesmí vyskytovat, s výjimkou schválených pokusů pro experimentální účely na přesně vymezených plochách.

Příklad postupu pro kontrolu GMO je uveden v tabulce 1.

PLÁN KONTROL	odpovědný orgán
VZORKOVÁNÍ	pověření a proškolení pracovníci kontrolního orgánu
VZOREK	předán ke zpracování do akreditované laboratoře
ANALYTICKÝ VZOREK	ze vzorku podle jeho velikosti a složení je podle návodu připraven analytický vzorek, který odráží zastoupení GMO v kontrolovaném souboru
IZOLACE DNA	podle SOP* a ISO norem
KONTROLA KVALITY DNA	podle SOP* a ISO norem
STANOVNENÍ GMO	podle SOP* a ISO norem
IDENTIFIKACE GMO	podle SOP* a ISO norem
VYDÁNÍ PROTOKOLU	interpretace výsledku

Tab. 1: Postup při kontrole nakládání s GMO nebo kontrole osiv, sadby, krmiv či potravin, které mohou obsahovat GMO.

Současná legislativa i technické možnosti umožňují kvantifikovat podíl GMO v každé složce. Kvantifikuje se relativní zastoupení GMO, a to jako podíl k zastoupení interního genu.

Kvantifikace GMO vyžaduje dostupnost platformy pro real-time PCR. Hranice obsahu GMO uvolněného do oběhu je 0,9% nezáměrné příměsi. Pro krmiva platí specifická legislativa, která povoluje stopový obsah GMO, které jsou v EU ve schvalovacím procesu až do výše 0,1%. Nepovolené GMO musí být staženy z trhu. Takové případy musí být hlášeny do systému rychlého varování RASFF. Postup laboratorního stanovení viz obr. 2



Obr. 2 Postupy při stanovení GMO, komplexní stanovení

KONTROLA PŘÍTOMNOSTI GMO

Pro potřeby MŽP a ČIŽP se využívají amplikony specifické pro GMO, které se mohou vyskytovat v tržní síti, ale i v provozních podmínkách a v pokusech v životním prostředí. Pro GMO uvolněné do oběhu, jak bylo popsáno výše, existují validované metody. Detekční metoda je součástí žádosti o nakládání s GMO. Plán kontrol pak připravuje ČIŽP.

Zkoušky jsou oprávněny provádět k tomu akreditované laboratoře. V ČR je několik laboratoří, které jsou akreditovány Českým institutem pro akreditaci podle ISO ČSN EN 17025:2005 pro stanovení GMO.

Jedná se o Národní referenční laboratoř (NRL) pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., Praha (NRL podle Nařízení EU 882/2004), která

má nejširší rozsah zkoušek.

http://www.vurv.cz/index.php?p=referencni_laboratore&site=institute

- laboratoř při VŠCHT Praha

<http://biomikro.vscht.cz/cz/research/groups/rokoska/>

- Státní zdravotní ústav Brno

<http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-geneticky-modifikovane>

- Státní veterinární správa Jihlava

<http://www.svujihlava.cz/289-akreditace-zkusebni-laboratore-podle-normy-csn-en-iso-iec-17025.html>.

ZÁVĚR

Postupy pro stanovení GMO jsou jednoznačně dané. Každý žadatel je povinen dodat údaje, které pomohou identifikovat GMO. Je vyžadována metoda pro jeho detekci. Současně musí žadatel předat referenční materiály, které jsou laboratořím k dispozici. V současné době se používají metody na bázi PCR, které jsou dostatečně robustní a přesné. Kontroly neprokázaly chybné nakládání s GMO a jejich výskyt mimo povolené prostory.

Použitá literatura:

Morisset D., Stebih D., Cankar K., Zel J. (2008): Alternative DNA amplification methods to PCR and their application in GMO detection: a review, *Eur. Food Res. Technol.* 227:1287 – 1298

Kok, Esther J.; Aarts, Henk J.M.; Hoef, A.M. Angeline van; Kuiper, Harry A. (2002): DNA Methods: Critical Review of Innovative Approaches *J.AOAC Int.*, 85: 797-800

Lee LY, Gelvin SB (2008). T-DNA binary vectors and systems" *Plant Physiol.* 146: 325–332.

Kingsbury N. (2009):. *Hybrid: The History and Science of Plant Breeding* University of Chicago Press, Oct 15, 2009

Hrbek, V., Ovesná, J., Demnerová, K., Hajšlová, J. Lze využít metabolomické profilování pro autenticitu geneticky modifikované sóji? *Chemické listy*, 2014, 108 (9): 875 – 881

Ovesná, J., Demnerová, K. Současné trendy ve stanovení geneticky modifikovaných organismů (GMO) *Chemické listy*, 2014, 108 (11): 1024 – 1029

Melo, E. O.; Canavessi, A. M. O.; Franco, M. M.; Rumpf, R. (2007). "Animal transgenesis: state of the art and applications". *J. Appl. Genet.* 48 (1): 47–61

Datukishvili, N., Kutateladze, T., Gabriadze, I. (2015): New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods *Front. Microbiol.* 6, Art. No. 757

Mano, J. (2015) Development of a Comprehensive GMO Detection Method *J. Jap.Soc.Food Sci. Technol. NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI* 62: 365-373

Milavec, M., Dobnik, D., Yang, L. (2014): GMO quantification: valuable experience and insights for the future *Anal. Bioanal. Chem.* Volume: 406: 6485-6497

Chaouachi, M., Berard, A., Said, K. (2013): Relative quantification in seed GMO analysis: state of art and bottlenecks *Transgen. Res.* 22: 461-476

Martins-Lopes, P. Gomes, S., Pereira, L. (2013): Molecular Markers for Food Traceability *Food Technology Biotechnology* Volume: 51 Issue: 2 Special Issue: SI Pages: 198-207 Published: APR-JUN 2013

Broeders, SRM, De Keersmaecker, SCJ., Roosens,NHC (2012): How to Deal with the Upcoming Challenges in GMO Detection in Food and Feed, *J. Biomed. Biotechnol.* Article Number: 402418

Querci, M., Van den Bulcke, M., Zel, J. (2010) New approaches in GMO detection *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1991-2002

Ovesna, J., Demnerova, K. (2014): Current Trends in Determination of Genetically Modified Organisms (GMO) *Chem. listy* 10: 1024-1029

Ovesna, J., Kucera, L., Chab, D. (2005): Identification and Quantification of Genetically Modified Cultivars of Field Plants Book Group Author(s): Czech University of Life Sciences (CULS) Conference: 7th Scientific and Technical Seminar on Seed and

Seedlings Location: Prague, Czech Republic Date: FEB 10, 2005 OSIVO A SADBA: VII ODBORNÝ A VEDECKÝ SEMINAR 145-148