

MOŽNOSTI STANOVENÍ GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ODRŮD POLNÍCH PLODIN

Identification and Quantification of Genetically Modified Cultivars of Field Plants

Jaroslava Ovesná, Ladislav Kučera, David Cháb, Vladimíra Pouchová
VÚRV Praha - Ruzyně

Abstract

Genetically modified plants (GMPs) were developed due to the improved scientific knowledge in the last century. GMPs have spread from laboratories into the environment and now appear even in the food chain. GMOs handling is strictly regulated in EU. GMO identification and quantification is required by EC regulations beside others. Sampling is considered highly important step in the whole process. PCR and real-time PCR based techniques are used for GMO identification and quantification. The methodological progress tends to DNA arrays development and use. It is necessary to ensure new methods development, their validation and acceptance. Therefore Community Reference Laboratory (CRL) was established. CRL coordinate ENGL (European Network of GMO Laboratories) activities, too. Laboratories dealing with GMO detection operated also in the Czech Republic. An example of GMO detection is present.

Key words: *GMO, detection, PCR, real-time PCR, DNA arrays, ENG*

Souhrn

Pokrok vědeckého poznání umožnilo vývoj geneticky modifikovaných rostlin. Ty se z laboratoří dostaly do životního prostředí a potravního řetězce. Nakládání s GMO je v zemích EU přísně regulováno a mezi jinými vyžaduje používat přesné metody identifikace a kvantifikace GMO. Velmi důležitým krokem je správné vzorkování GMO. Pro identifikaci a kvantifikaci se používají metody založené na PCR a real-time PCR. Vývoj dále směřuje k využívání DNA čipů. Je třeba vyvíjet stále nové metody, validovat je a zavádět do praxe. Proto byla ustavena Referenční laboratoř evropského společenství, která koordinuje i činnost ENGL (Sít' evropských laboratoří pro stanovení GMO). V ČR také operují laboratoře, které se zabývají stanovováním GMO. Příklad stanovení je uveden v příspěvku.

Úvod

Konec 19. století a celé století 20. přineslo řadu nových poznatků mezi nimi např. objev zákonů dědičnosti (Mendel) či procesu indukované mutagenese. Tyto objevy byly využívány k cílenému zlepšování produkčního potenciálu rostlin. V průběhu 70. a 80. let byly vyvinuty technologie, které umožňují připravit rekombinantní DNA, tj. molekulu DNA jejíž jednotlivé části pocházejí z DNA odlišných organismů. Nové poznatky umožnily získat organismy, označované jako geneticky modifikované (GMO), které by nemohly vznikat evolucí nebo tradičními šlechtitelskými postupy. Tyto organismy nesou část genetické informace z jiného organismu (jiných organismů), která nebyla přenesena křížením a rekombinací.

Vzhledem k povaze GMO a možnostem teoreticky kombinovat genetické informace z odlišných organismů, je nakládání s GMO přísně regulováno. V ČR byl přijat zákon č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty, účinný od 25.2.2004, který nahradil Zákon č. 153/2000 Sb.. V zásadě kopíruje Směrnici EU 2001/18/EC. Podle jeho § 28 je Ministerstvo životního prostředí ústředním správním úřadem v posuzování vlivů GMO a geneticky modifikovaných produktů. Rozhoduje však společně s Ministerstvem zemědělství a Ministerstvem zdravotnictví a má Českou

komisi pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty jako svůj poradní orgán. Dne 23.7.2003 vzešlo Doporučení Komise evropských společností č. 003/556/EC o koexistenci zemědělství, využívajícího GMO s konvenčním a ekologickým zemědělstvím. Jeho principem je dát stejná práva ekologickým zemědělcům, kteří podle zákona nesmí používat GMO, zemědělcům, kteří pěstují konvenční plodiny a zemědělcům, kteří pěstují GMO. ČR také přijala Protokol k Úmluvě o biologické rozmanitosti (CBD). *Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti* (CPB), který byl přijat na prahu nového tisíciletí – v lednu r. 2000 v Montrealu jakožto první a dosud jediný protokol k Úmluvě o biologické rozmanitosti a který vstoupil v platnost 11. září 2003, představuje také významný závazek v mezinárodní oblasti.

Česká republika je také povinna dodržovat řadu nařízení EU, které se týkají bezpečnosti potravinového řetězce. Také musí zabezpečit kontrolu výskytu GM složek v potravním řetězci a jejich správné značení.

Mezinárodní spolupráce ve stanovení GMO

Vedoucím pracovištěm, které se zabývá metodami stanovení GMO a z nich odvozených produktů je v Evropě Joint Research Center EU (Ispra, Itálie), v rámci kterého operuje referenční laboratoř EU (Community Reference Laboratory). Při JRC Ispra pracuje i ENGL (European Network of GMO laboratories). Úkolem je navrhnout, optimalizovat, validovat a do praxe uvádět systém stanovení GMO, poskytovat zázemí pro členské laboratoře a spolupracovat s laboratořemi zemí mimo EU, standardizovat úroveň členských laboratoří a v rámci pravidel udržovat kontakty se společnostmi, které na trh uvádějí GMO.

V ČR pracuje několik laboratoří, které se stanovením GMO zabývají. Některé z nich jsou rutinními pracovišti, jiná jsou zaměřena i na výzkum v této oblasti. Laboratoře také řeší aplikační záležitosti – monitoring výskytu GMO nebo jejich částí v potravním řetězci nebo interakce GMO s místními agroekosystémy. Laboratoře ČR jsou zapojeny do ENGL a pracují podle mezinárodně uznávaných standardů.

Celý detekční systém zahrnuje řadu kroků. Jedná se zejména o správný odběr vzorků (tzv. vzorkování), správné laboratorní zpracování vzorků a samotné analytické stanovení obsahu GMO ve vzorku.

Vzorkování pro účely stanovení GMO

Správné odebrání vzorků ze zásilky je považováno za stěžejní krok pro korektní stanovení přítomnosti GMO a jejich částí. Není problém kontrolovat zásilku označenou jako GM materiály. Ovšem stanovit míru možné kontaminace produktů, které nenesou označení GM je velmi složité. Vzorky je třeba odebírat z velkých zásilky sóji nebo kukuřice (z lodí, z nákladních vlaků) nebo z obchodních balení. Kontaminace nesmí přesáhnout stanovenou mez. Distribuce těchto kontaminací může být zvláště ve velkém nákladu náhodná. Pokud není odběr vzorků proveden správně, následná stanovení mohou velmi oscilovat kolem správné hodnoty. V pozitivních vzorcích může být zjištěn vysoký obsah geneticky modifikované příměsi. ENGL organizuje projekt KeLDA, který zatím ukazuje, že normy vhodné pro stanovení jiných kontaminací nejsou zřejmě pro vzorkování GMO vhodné.

Analytické postupy

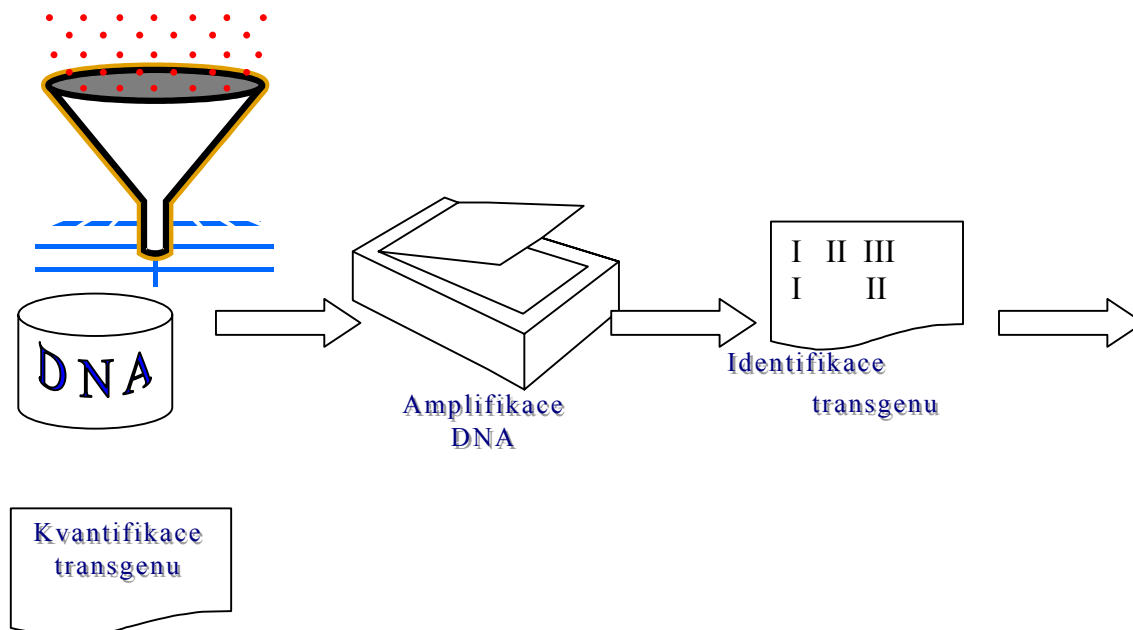
Samotné stanovení pak zahrnuje několik kroků a vychází ze struktury DNA, která byla do GMO vpravena. Do genomu vybrané odrůdy/linie je obvykle vnesen konstrukt (rekombinantní DNA), který se skládá ze selekčního genu (markéru) a vlastního genu, který podmiňuje žádanou vlastnost. Markér i vlastní gen jsou opatřeny řídicími částmi, tzv. promotorem, který zabezpečuje přepis genu do proteinu a terminátorem, který signalizuje konec přepisu. Proto se buď detekuje příslušný protein nebo úsek genu. Metody založené na detekci proteinu jsou většinou méně citlivé a nejsou využitelné u vysoce zpracovaných materiálů (potraviny). Spíše se využívají postupy založené na zjišťování přítomnosti části

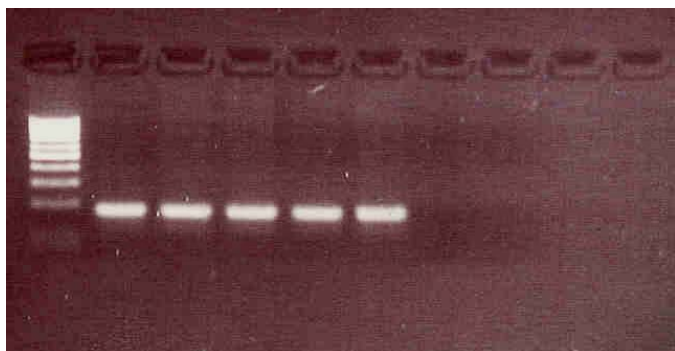
vlastního genu - DNA. Fragментy DNA jsou přítomny i ve výrobcích vysoce zpracovaných. Jsou vypracovány postupy, které umožní získat DNA ze zelené listové hmoty, semen, mouky, ale i lupínků, rostlinných mas, čokolády nebo medu. Obtížné je však získat DNA z margarínu nebo rafinovaných olejů. Kvalita DNA je testována spektrofotometricky a elektroforeticky. Pro stanovení přítomnosti určitého genu nebo transgenu se využívá zejména tzv. PCR (polymerázová řetězová reakce), která umožňuje specificky amplifikovat část sledovaného genu. Pokud je sledovaný gen přítomen, lze detekovat přítomnost jeho amplifikačních produktů pomocí gelové elektroforézy.

Prvním krokem po izolaci DNA je potvrzení přítomnosti DNA ve vzorku (např. u sušeného krmiva, konzerv). Využívá se buď amplifikace chloroplastové DNA nebo DNA specificky se vyskytující u jednotlivých rostlinných druhů – např. gen pro sójový lektin, zásobní protein kukuřice, napin z řepky nebo patatin z bramboru. Pokud je potvrzena přítomnost vlastního genu, je možné přistoupit ke stanovení vneseného genu (transgenu). Pro identifikaci se obvykle využívají úseky promotorů. Často se využíval při tvorbě transgenních rostlin 35S CaMV promotor. Proto se ho využívá pro skrínig. Pak následuje stanovení vlastního transgenu. Je třeba stanovit, zda se jedná jednoznačně o schválené GMO.

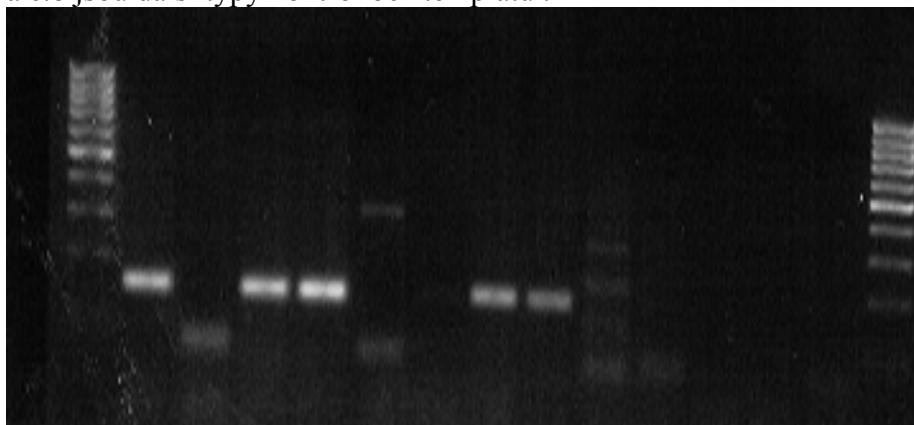
V případě, že je potvrzena přítomnost schváleného GMO v analyzovaném vzorku, stanovuje se jeho množství. Při analýzách se porovnává množství kopií vlastního genu daného rostlinného druhu (např. lektinu u sóji) a množství kopií vneseného genu (např. genu odolnosti k herbicidu). Každá buňka obsahuje jednu kopii genu pro lektin. Každá buňka pocházející z geneticky modifikované sóji pak jednu kopii vneseného genu. Kvantifikace vyžaduje používání zařízení pro PCR v reálném čase. Cena tohoto zařízení je vysoká a disponují jím pouze specializovaná pracoviště. Komerční metody pro kvantifikaci GVMR jsou zatím dostupné pro omezený počet GVMR (Roundup Ready sóju, Bt kukuřici). Další vývoj směřuje k DNA čipům.

SCHÉMA STANOVENÍ GMO:





Příklad výsledku stanovení přítomnosti sójové komponenty: amplifikace genu pro lectin (interní kontrolní gen) Dráha č.1 – délkový standard 100 bp, pak následuje na pozici č.1 IRMM 0% sója a na pozici č. 2, 3, 4 a 5 jsou vzorky sóji 1A, 1B,2A a 2B. Na pozici č.6 je extrakční kontrola a na pozici č.7 a č.8 jsou další typy kontrol bez templátu .



Příklad výsledku detekce 35S CaMV promotoru jako části transgenů, který se často vyskytuje v GM odrůdách. Zleva nejdříve délkový standard 100 bp. V pozici č.1 je pozitivní kontrola, v pozici č.2, 3 a 4 jsou IMMR standardy 0 %, 0,1% a 1% MON810, v pozici č.5 a č.6 je vzorek amplifikované DNA z matrice kukuřičného škrobu (negativní), v pozici č.7 a 8 je vzorek amplifikované DNA z matrice sóji (pozitivní), v pozici č.9 je vzorek amplifikované DNA z matrice sójové mouky (negativní). Na pozici č.10 je extrakční kontrola a na pozici č.11 a č.12 jsou další typy kontroly bez templátu.

Kroky ve vývoji DNA čipu

Na pracovišti ve VÚRV jsme testovali jsme možnost využití technologie pro tisk, hybridizaci a čtení DNA arrays. Amplifikovali jsme za optimalizovaných podmínek úseky DNA, které odpovídají vybraných interním genům rostliny a transgenům. Amplifikační produkty byly purifikovány a nanášeny na skleněný nosič pomocí zřízení fy Genomic Solution. DNA izolovaná z rostlinného materiálu byla označena fluorescenční značkou Cy3/Cy5 a DNA array byl hybridizován s označenou DNA za stringentních podmínek. K experimentům byl využit systém firmy Genomic Solution.

Výsledky ukazují, že je třeba ještě další optimalizace metody, zejména výběr a purifikace sond a že tato cesta je v postati možná.

Tento příspěvek byl připraven za podpory projektu MZe ČR NAZV 1B44068.

Kontaktní adresa autora: RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, tel. 233 022 424, E-mail: ovesna@vurv.cz

