



Molekularno-genetičke metode u kontroli
mikrobiološke sigurnosti hrane

Metode identifikacije/detekcije GMO-a u hrani

Prof.dr.sc. Ivan-Krešimir Svetec
iksvetec@pbf.hr

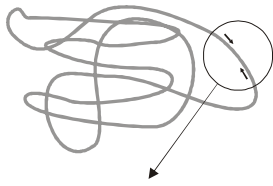
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i geneiku mikroorganizama
Pierottijeva 6, 10.000 Zagreb



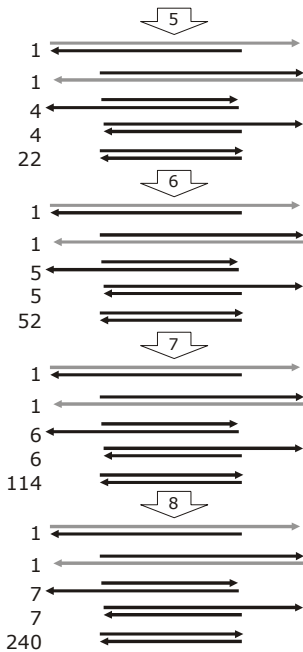
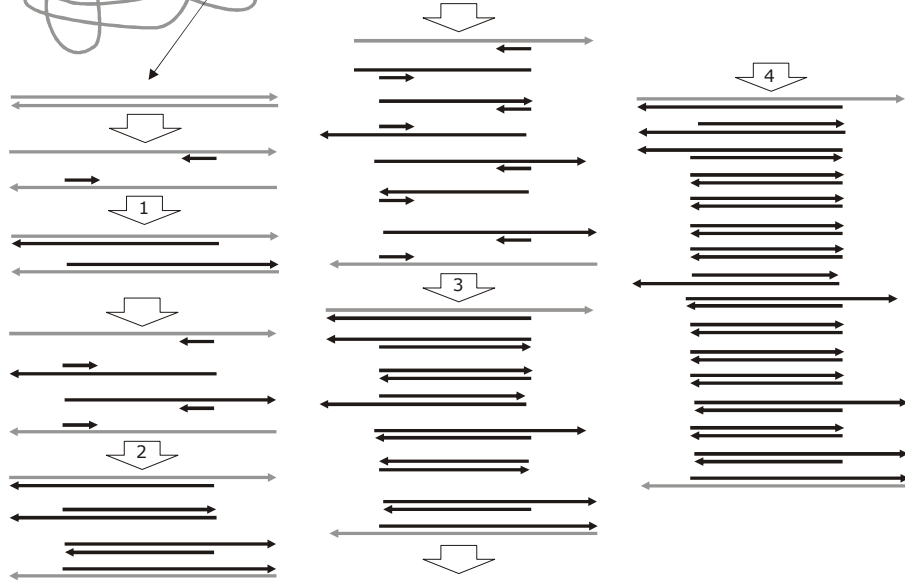
PCR – lančana reakcija polimerazom (Polymerase Chain Reaction)

- o Termorezistentne DNA-polimeraze
 - Taq (*Thermus aquaticus*)
 - Tfl, Pfu, Vent . . .
- o Primjena
 - umnažanje točno određenog dijela genoma (DNA) iz male količine genetičkog materijala
 - dvije klice, oligonukleotida (eng. “primer”, početnice, začetnice)
 - 12-30 nukleotida
 - omeđuju dio DNA koji želimo umnožiti
 - 3'-krajevi klica moraju biti orjentirani jedan prema drugome

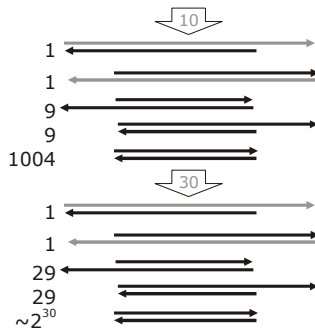
5' -ATTCGCTATTATGGCCATATAGTTA---AAGATCATCCATGAATATCTCCGTA-3'
3' -TAAGCGATAATACCGGTATATCAAT---TTCTAGTAGGTAATTATAGAGGCAT-5'
5' -CGCTATTATGGC-3'



PCR – lančana reakcija polimerazom (Polymerase Chain Reaction)



PCR – lančana reakcija polimerazom (Polymerase Chain Reaction)



$$M = M_0 \times 2^n \text{ (teoretski)}$$

M = broj molekula nakon n ciklusa

M_0 = početni broj molekula

N = broj ciklusa



Uvjeti za provođenje PCR-a

- Sastav reakcijske otopine (najčešće 50 ili 100 µL)

- DNA-kalup
- početnice (1 pM/µL)
- dNTP-ovi (200 pM/µL)
- polimeraza (1-5 U)
- pufer za polimerazu, Mg²⁺ (1x)



- Uvjeti reakcije

- početna denaturacija DNA – 5 min, 94-95°C
- denaturacija DNA – 30 s, 94-95°C
- komplementarno sparivanje početnica (“annealing”) – 50-65°C (5-20°C ispod T_m), 1 min
- sinteza DNA – 70-72°C, vrijeme ovisi o duljini fragmenta (~1min/kb)
- završna sinteza DNA – 10 min

} 25-35
puta



Označavanje proizvoda koji sadrže GMO

VLADA REPUBLIKE HRVATSKE

Na temelju članka 51. stavka 3. Zakona o genetski modificiranim organizmima (»Narodne novine«, broj 70/2005), Vlada Republike Hrvatske je na sjednici održanoj 31. srpnja 2008. godine donijela

UREDBU

O RAZINI GENETSKI MODIFICIRANIH ORGANIZAMA U PROIZVODIMA ISPOD KOJE PROIZVODI KOJI SE STAVLJAJU NA TRŽIŠTE NE MORAJU BITI OZNAČENI KAO PROIZVODI KOJI SADRŽE GENETSKI MODIFICIRANE ORGANIZME

Članak 3.

Proizvodi koji sadrže slučajne ili tehnološki neizbježne tragove dopuštenih genetski modificiranih organizama u razini od **0,9% i manje**, u proizvodu **od jednog sastojka**, odnosno **0,9% i manje dopuštenih** genetski modificiranih organizama **po pojedinom sastojku** proizvoda koji se sastoje od više sastojaka, **ne označavaju se** kao proizvodi koji sadrže genetski modificirane organizme. Iznimno od stavka 1. ovoga članka, **reprodukcijски biljni materijal**, koji sadrži genetski modificirane organizme u bilo kojoj količini, mora biti označen sukladno posebnom propisu.



Detekcija GMO u hrani i sirovinama za prehrambenu industriju

- o Prema zakonu o GMO nije potrebno deklarirati proizvode koji sadrže
 - “neizbježne tragove dopuštenih genetski modificiranih organizama u razini od 0,9 % i manje. . .”
 - nedopušteni GMO?

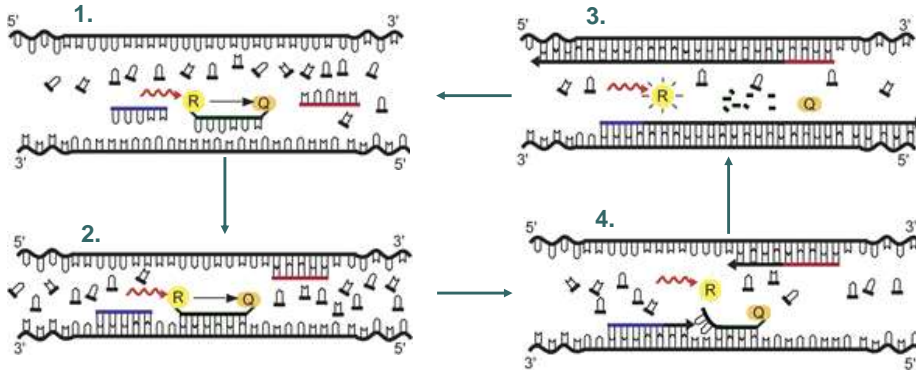


Real-time PCR (RT-PCR) Quantitative PCR (Q-PCR ili qPCR)

- o kvantitativna analiza – određivanje udjela GMO-a
 - određivanje početnih omjera GM i ne-GM genoma
- o ako proizvod/sirovina sadrži manje od 0,9% (dozvoljenog) GMO-a nije ga potrebno deklarirati kao GM-proizvod/sirovinu
 - proizvodi i sirovine mogu se sastojati od jedne ili više komponenti!
- o uvježbani analitičari, akreditirani laboratoriji
 - Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb (HZZJZ)
 - Zavod za sjemenarstvo i rasadničarstvo, Osijek

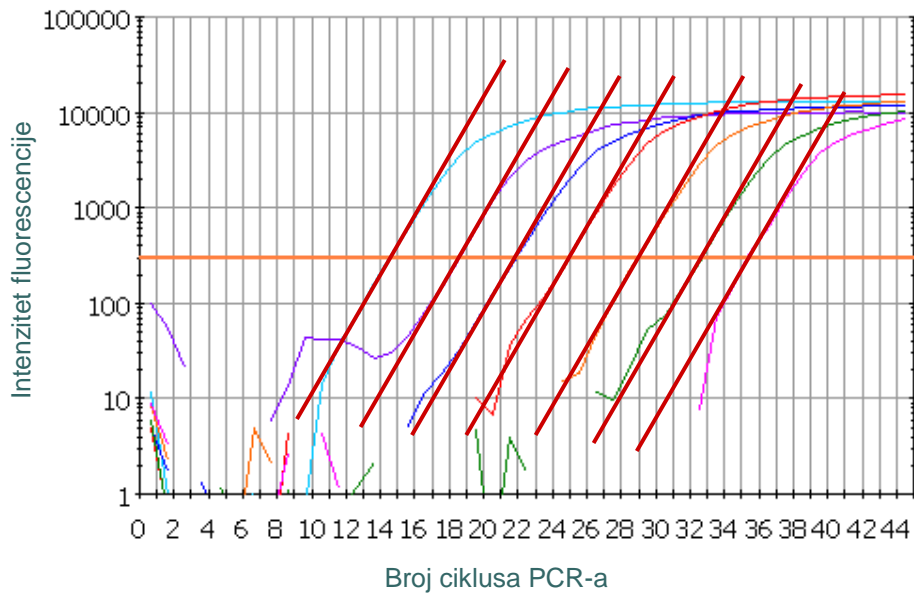


Metoda TaqMan



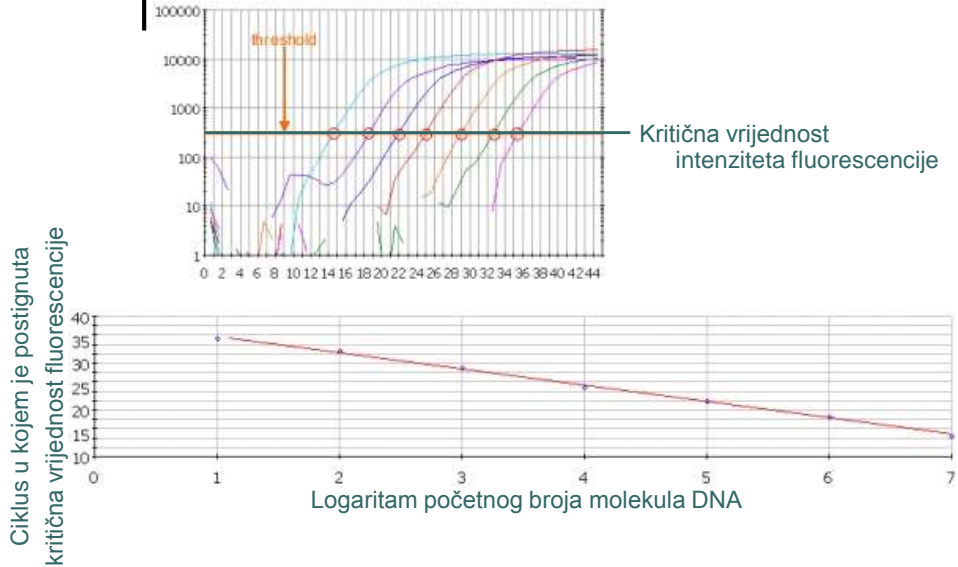
o bilježi se porast fluorescencije

o što je početna količina DNA veća, ranije se postigne **kritična vrijednost** fluorescencije



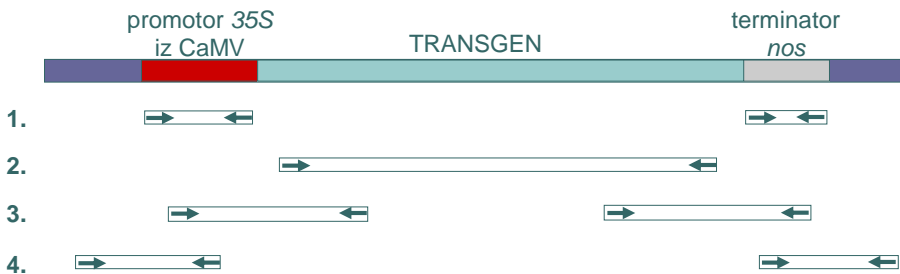


Metoda TaqMan



PCR i RT-PCR

- o detektiranje poznate DNA (ciljne DNA, „genetička modifikacija”)
- o sinteza velikog broja kopija ciljne DNA (omogućava daljnju analizu: restrikcijska analiza, sekvencioniranje)
- o kvalitativna i kvantitativna analiza (RT-PCR, qPCR)

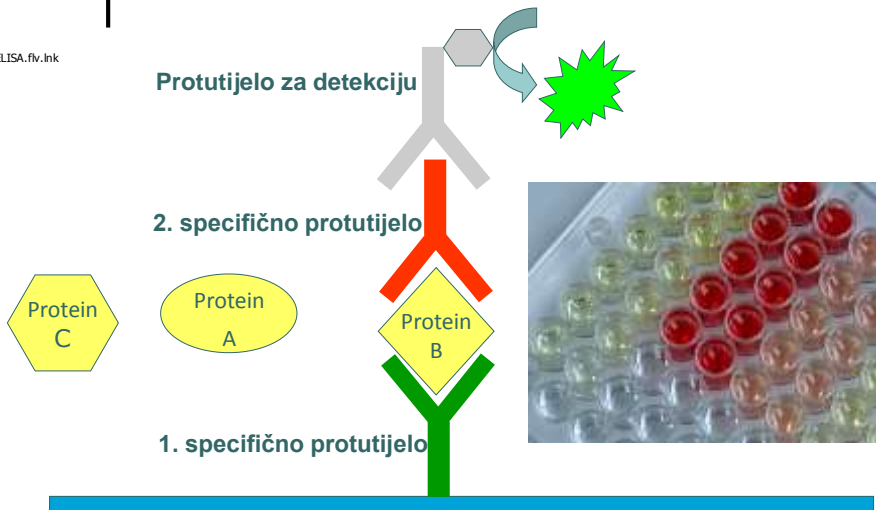


1. – „screening” (pretraživanje)
2. – detekcija transgena
3. – detekcija događaja (konstrukta; „event”)
4. – detekcija transformacijskog događaja



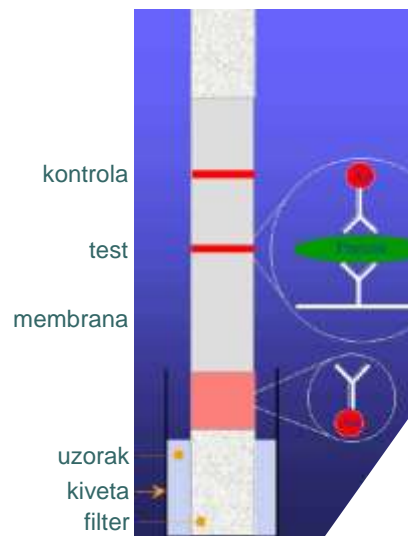
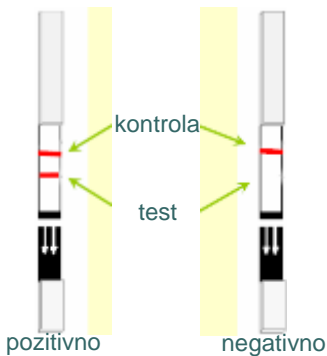
ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“)

ELISA.flv.lnk



Brzi testovi

- o osnivaju se na ELISA
- o komercijalno dostupni
- o jednostavni za korištenje





Brzi testovi

- o kvantitativni ? !



ELISA

- o prednosti

- relativno zadovoljavajuća osjetljivost
- relativno malo lažno pozitivnih rezultata
- komercijalno dostupno (mali troškovi po uzorku)
- omogućava brzu analizu velikog broja uzoraka (paralele)
- može se automatizirati

- o mane

- relativno skupa proizvodnja (razvoj) novih testova
- ciljni protein se može proizvoditi samo u nekim djelovima biljke i samo u nekim fazama životnog ciklusa (prikladno uglavnom za sirovine)
- degradacija ciljnog proteina u procesiranim uzorcima
- ne može se dokazati prisutnost specifičnog GMO konstrukta
- nije u skladu sa europskim zakonskim normama



Real-time PCR (RT-PCR) Quantitative PCR (Q-PCR ili qPCR)

- o prednosti
 - stabilnost DNA
 - omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu
 - visoka specifičnost
 - relativno velika osjetljivost (0,1% GMO-a)
- o nedostaci
 - različita tkiva sadrže različiti udio (količinu) DNA
 - zahtjeva sofisticiranu opremu i uvježbane analitičare
 - cijena po uzorku
 - Rt-PCR: 100-300 \$
 - ELISA: 2-10 \$



Sadrži li neki proizvod GMO! Ako DA, koliko?

- o najveći problem je uzorkovanje



pošiljka

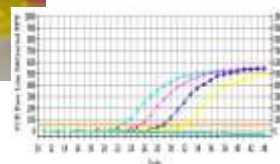
uzorak



analiza



rezultat analize





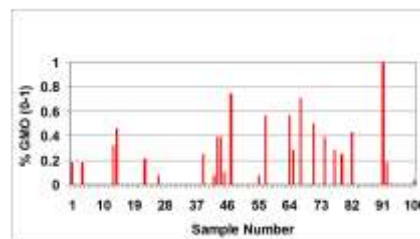
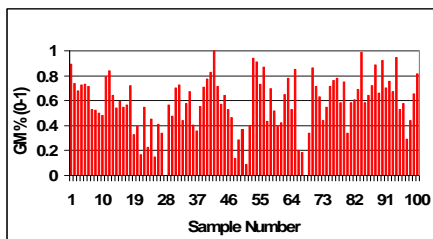
Uzorkovanje

- o uzorkovanje je glavni izvor pogreške
- o određivanje graničnih vrijednosti (zakon, industrija) – 0,9%
- o kod sjemena (sirovine u zrnu) treba odrediti udio GM-sjemenki



Primjer: određivanje udjela GM-soje u 2 pošiljke

- o 100 uzoraka po pošiljci
- o 3000 zrna po uzorku

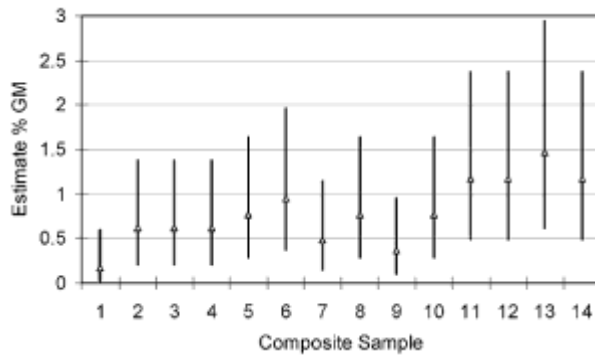


- o Europska preporuka
 - "...on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003"



Primjer: određivanje udjela GM-sijemena ujlane repice

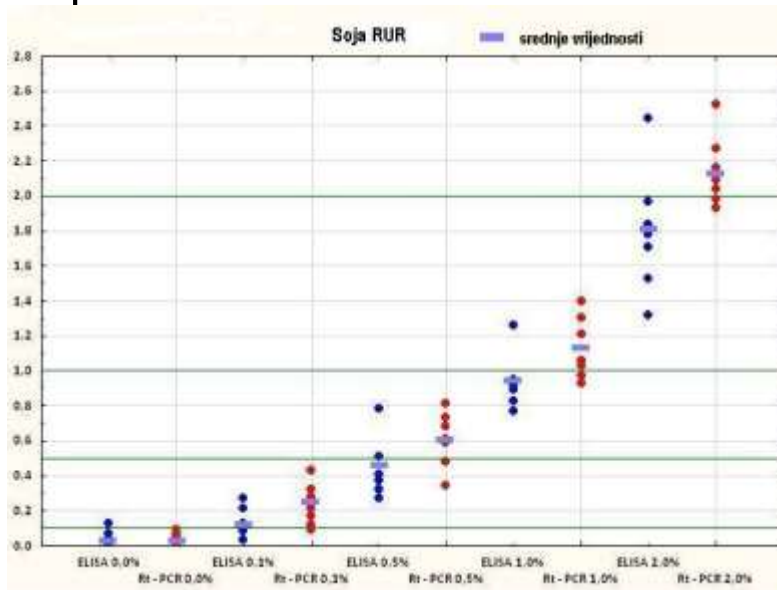
- o silos: ~42 t sadrži **0,6 % GM-zrna**
- o tijekom pražnjenja silosa uzeto **14 uzoraka**
- o od svakog uzorka (14) priređeno **13 radnih uzoraka za mjerenje** udjela GM-zrna (za svako mjerenje uzeto 1000 zrna)
- o metoda određivanja udjela GMO: ELISA



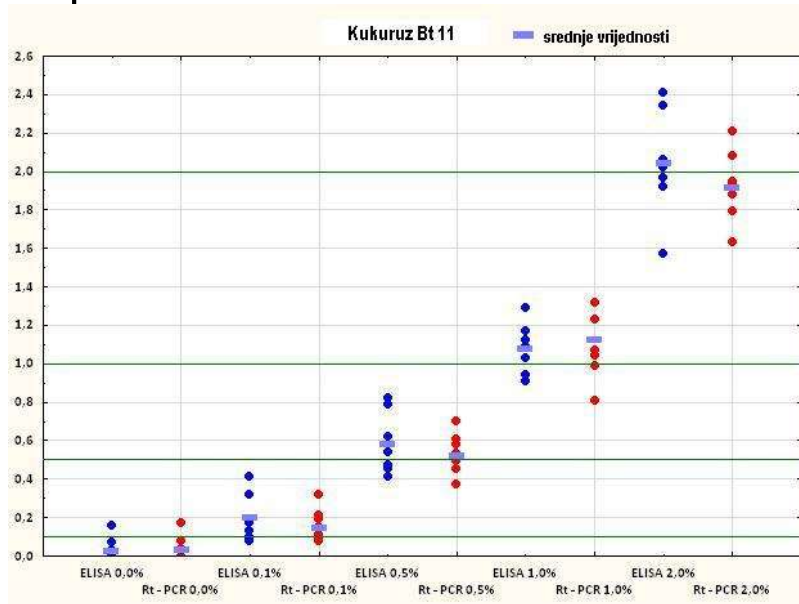
- o srednja vrijednost udjela GMO i 95 %-tni interval pouzdanosti za svaki od 14 uzoraka



RT-PCR vs ELISA



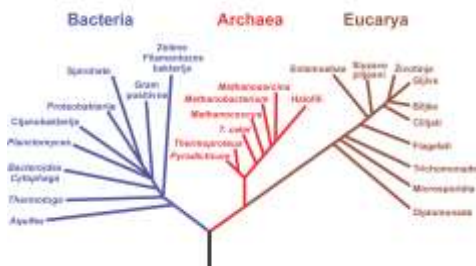
RT-PCR vs ELISA



Metode za analizu polimorfizma DNA



Filogenetsko stablo života



dijagnostika u medicini