

ROBERT DULIŃSKI

METODY IDENTYFIKACJI GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH ORGANIZMÓW W ŻYWNOŚCI

Streszczenie

W pracy przedstawiono najważniejsze metody analityczne stosowane w detekcji genetycznie zmodyfikowanej żywności. Zdecydowana większość technik polega na identyfikacji zmian w strukturze dwóch biologicznie czynnych makrocząsteczek: DNA oraz białek. W przypadku kwasów nukleinowych podstawowe narzędzie diagnostyczne stanowi reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), pozwalająca na selektywną amplifikację wybranych regionów DNA wraz z jakościową i ilościową oceną wprowadzonych modyfikacji. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym jest obecnie uznawana za wiodącą metodę analizy zawartości genetycznie zmodyfikowanych organizmów w roślinach uprawnych i produktach żywnościowych. Na określenie modyfikacji genetycznych manifestujących się na poziomie struktury białek pozwalają testy immunoenzymatyczne polegające na selektywnym rozpoznaniu rekombinantowego białka przez specjalnie zaprojektowane przeciwciała. Jednak zarówno uproszczony wariant identyfikacji kompleksu antygen – przeciwciała na nitrocelulozowym pasku, jak i klasyczna wersja testu immunochemicznego na mikropłytkach traktowane są przede wszystkim jako metody oceny jakościowej.

Wraz z rozwojem technologii manipulacji genowych, rosnącą liczbą transformacji roślin i prawdopodobnie w niedalekiej przyszłości zwierząt, obserwowana jest tendencja do opracowania wiarygodnych testów, pozwalających na detekcję oraz analizę ilościową kilku genetycznych modyfikacji w trakcie pojedynczego oznaczenia.

Słowa kluczowe: genetycznie zmodyfikowane organizmy, reakcja łańcuchowa polimerazy, testy immunoenzymatyczne

Wprowadzenie

Od połowy lat 90. XX w., czyli od momentu wprowadzenia na rynek przez firmę Calgene pierwszego produktu żywnościowego będącego rezultatem genetycznej modyfikacji – pomidora Flavr Savr™ – obserwuje się rosnące zainteresowanie technologią DNA żywności. Inżynieria genetyczna jest implementowana do rolnictwa, przemysłu spożywczego i paszowego celem poprawienia użytkowych cech roślin uprawnych

(tolerancja na herbicydy, odporność na choroby i szkodniki), poprawienia technologicznych właściwości w trakcie przechowywania i obróbki (twardość owoców) czy też ulepszenia sensorycznych i funkcjonalnych cech produktów żywnościowych (jakość skrobi, zawartość witamin i aminokwasów) (tab. 1) [1, 2, 3, 7].

Tabela 1

Przykłady modyfikacji stosowanych w uprawach roślin oraz produkcji GM żywności.
Examples of modifications applied to transgenic crops and production of GM food.

Opis modyfikacji Modification description	Korzyści dla rolnika lub konsumenta Benefits for farmer or consumer	Przykłady roślin uprawnych i produktów żywnościowych Examples of transgenic crops and food
Wprowadzenie genu podwyższającego próg tolerancji na środki chwastobójcze np. glifosat Introduction of a gene increasing tolerance level for herbicides i.e. glyphosate	zwiększona odporność na herbicydy increased herbicide tolerance	soja Roundup® Ready, Roundup® Ready soy
Wprowadzenie genu <i>cry</i> pochodzącego z <i>Bacillus thuringiensis</i> kodującego bakteryjną endotoksynę perforującą układ trawienny owada Introduction of the <i>cry</i> gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> encoding bacterial endotoxin degrading insect digestive system	ochrona przed szkodnikami protection against insects pests	ziemniaki NewLeaf™, kukurydza Bt176, Bt11 NewLeaf™ potato, Bt176, Bt11 corn
Wprowadzenie genów kodujących enzymy odpowiedzialne za wczesne etapy biosyntezy β -karotenu, pochodzących z żonkila i bakterii <i>Erwinia uredovora</i> Introduction of genes encoding enzymes for early stages of β -carotene biosynthesis derived from daffodil and bacteria <i>Erwinia uredovora</i>	wzrost zawartości prowitaminy A increased provitamin A content	„Złoty ryż” Golden Rice
Ograniczenie biosyntezy enzymu poligalaktouronazy odpowiedzialnego za mięknięcie owoców Decreased polygalactouronase biosynthesis, the enzyme responsible for fruit ripening	wydłużenie okresu przechowywania i przydatności do spożycia elongated shelf-life and consumption period	pomidory Flavr Savr™ Flavr Savr™ tomato

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1, 3, 7, 24] / Source: according to the published data [1, 3, 7, 24].

Niezależnie od obaw, jakie wzbudzają rozwiązania polegające na rekombinacji DNA, wydaje się, że zarówno z perspektywy zwolenników, jak i przeciwników genetycznie zmodyfikowanych organizmów (GMO) istotnym problemem jest ustalenie

wiarygodnych i powszechnie akceptowanych metod identyfikacji GMO. Prawo konsumenta do wyboru pomiędzy naturalnym produktem a efektem manipulacji genetycznej jest realizowane przez odpowiedni system znakowania żywności, zaś zgodnie z rozporządzeniem UE nr 1829/2003 maksymalna zawartość GMO w nieoznakowanych produktach nie może przekraczać 0,9% [27, 29].

W 1999 r. Unia Europejska w ramach Wspólnego Centrum Badawczego (JRC, ang. Joint Research Centre) zainicjowała tworzenie sieci wyspecjalizowanych laboratoriów analizujących GMO (ENGL, ang. European Network of GMO Laboratories). Do projektu przystąpiły również polskie jednostki badawcze m.in. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzionkowie, Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach czy inspekcje podległe Głównemu Inspektoratowi Sanitarnemu (Białystok, Tarnobrzeg i in.). Celem tych placówek jest współpraca i wymiana poglądów, opracowanie i walidacja skutecznych metod jakościowej i ilościowej oceny żywności genetycznie zmodyfikowanej [14].

Metody detekcji GMO w żywności

Białka i kwasy nukleinowe to dwa typy makromolekuł specyficznych dla genetycznych modyfikacji, których analiza może potwierdzić obecność GMO w żywności. Modyfikacja jest inicjowana na poziomie DNA i polega na wprowadzeniu do istniejącego zestawu genów nowej sekwencji zapewniającej np. odporność rośliny na herbicydy. Ta zmiana w sensie fenotypowym objawia się poprzez biosyntezę nowego białka zakodowanego we wprowadzonej sekwencji DNA.

W przypadku białek zasadniczą techniką stosowaną do identyfikacji jest test immunoenzymatyczny ELISA (ang. enzyme linked immunosorbent assay). Zmiany na poziomie sekwencji DNA monitorowane są poprzez reakcję łańcuchową polimerazy PCR (ang. polymerase chain reaction), powszechnie stosowaną technikę biologii molekularnej, pozwalającą na detekcję określonych fragmentów DNA wprowadzonych do genomu badanej rośliny. Spotykane są również połączenia obu metod tzw. PCR-ELISA i należy je traktować bardziej jako komplementarne niż wykluczające się analizy [20].

Testy immunoenzymatyczne

Zestawy analityczne bazują na wykorzystaniu przeciwciał selektywnych wobec określonego – w tym przypadku genetycznie zmodyfikowanego (GM) białka – i następującej po rozpoznaniu antygeny reakcji barwnej. Tego rodzaju oznaczenia są powszechnie stosowane i akceptowane w wielu aplikacjach dotyczących kontroli obecności witamin, antybiotyków, patogenów czy też substancji specyficznych w produktach żywnościowych [4, 17]. W celu opracowania testu ELISA na GMO należy wyizolować rekombinantowe białko z żywności czy też rośliny uprawnej, a następnie wyprodukować

wać przeciwciała specyficzne wobec tej proteiny. Przeciwciała są najczęściej unieruchamiane na mikropłytkę i oznakowane substancją, która w trakcie analizy utworzy barwny produkt. Istnieją dwa typy testów immunochemicznych polegających na reakcji antygen–przeciwciało wykorzystywanych w detekcji GMO.

Testy paskowe

Przeciwciała skierowane wobec GM białka zostają immobilizowane na pasku nitrocelulozowym. Po zanurzeniu testera w próbówce zawierającej ekstrakt roślinnej tkanki z transgenicznym białkiem następuje utworzenie kompleksu z częścią przeciwciał znakowanych barwnym reagentem. Kompleks białkowy dzięki porowatej membranie wędruje do jednego z przeciwległych końców paska, który ma dwie strefy. Jedną z nich jest specyficzna dla kompleksu przeciwciało–rekombinantowe białko, a druga dla niezwiązanych przeciwciał znakowanych tylko barwnikiem. O pozytywnym wyniku próby decyduje obecność dwóch barwnych linii: kontrolnej – świadczącej o prawidłowym wykonaniu oznaczenia oraz testowej – potwierdzającej obecność GMO. Powszechnie stosowane są testy na obecność bakteryjnej endotoksyny z *Bacillus thuringensis* oraz białka sojowego CP4 EPSPS [2].

Testy mikropłytkowe

Oznaczenie odbywa się na mikropłytkę titracyjnej z usuwalnymi 8-12 studzienkowymi paskami, na której unieruchomione są przeciwciała skierowane wobec GM białka. W zasadniczej wersji kompleks przeciwciało – antygen może być wizualizowany przez użycie drugiego przeciwciała skoniugowanego z enzymem przeprowadzającym reakcję chromogenną. Procedura obejmuje często kilka etapów „opłaszczania” oraz przemywania substancji immobilizowanych na dnie studzienek. Ostatecznym potwierdzeniem obecności GMO jest reakcja barwna, której intensywność – w przypadku dysponowania standardami o znanej zawartości GMO – jest podstawą do ilościowego oznaczenia białka. Przykładowy limit detekcji białka sojowego CP4 EPSPS wynosi 0,25% w przypadku nasion i 1,45% - produktów mięsnych [18].

Metody immunoenzymatyczne mają jednak pewne wady, które nakazują traktować je raczej jako techniki jakościowe. W przypadku produktów żywnościowych podlegających skomplikowanej obróbce technologicznej można oczekiwać przynajmniej częściowej denaturacji białka, co może skutkować utratą powinowactwa przeciwciała wobec oznaczanej proteiny. Konsekwencją selektywności reakcji ELISA jest ograniczenie stosowania określonego zestawu tylko i wyłącznie do jednego typu zmodyfikowanego białka, ponadto wątpliwości budzi trudny do oszacowania wpływ odmiany rośliny, fazy wzrostu, rodzaju tkanki i warunków polowych na wynik oznaczenia [1]. Jednak w przypadku analizy DNA również nie można wykluczyć fragmentacji docelowego materiału wskutek termicznej obróbki produktów, ponadto wydajność izolacji

kwasów nukleinowych z takich wysoko przetworzonych próbek, jak np. olej rafinowany, nie zawsze pozwala na uzyskanie wystarczającej ilości matrycy [5].

Techniki PCR

Rozwinięta, w drugiej połowie lat 80. XX w., reakcja łańcuchowej syntezy fragmentów DNA umożliwia selektywną amplifikację wybranych regionów DNA i stała się w przypadku detekcji GMO zasadniczą techniką diagnostyczną [9, 16, 18, 19, 22]. Materiałem docelowym jest w tym przypadku kwas deoksyrybonukleinowy, który należy wyizolować przy użyciu określonej procedury uzależnionej od charakteru próbki. Zalecane są protokoły z zastosowaniem detergentu jonowego bromku heksadecylo-trimetyloamoniowego (CTAB) lub też gotowych komercyjnych zestawów do izolacji polegających często na selektywnym związaniu, a następnie elucji kwasu nukleinowego na minikolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym [23]. Wydajność izolacji uzależniona jest od stopnia przetworzenia żywności, zdecydowanie większą efektywność uzyskuje się w przypadku oczyszczania DNA z wyjściowych roślin uprawnych [5]. Po uzyskaniu czystej frakcji DNA, gotowej do amplifikacji, pozostaje wybór pomiędzy dwoma zasadniczymi systemami PCR.

Konwencjonalny PCR

Ten wariant techniki PCR stosowany jest do analizy jakościowej oraz ilościowej, wskazując głównie na obecność bądź nieobecność poszukiwanych sekwencji w próbce. Finalny etap identyfikacji produktów stanowi rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Równocześnie z produktami PCR rozdzielane są markery mas molekularnych w celu precyzyjnego określenia wielkości amplikonu.

Podstawowy element testu skriningowego oprócz standardowych składników: oligonukleotydów, polimerazy *Taq* i matrycy DNA stanowią startery komplementarne do sekwencji DNA najczęściej wykorzystywanych w modyfikacjach genetycznych roślin (tab. 2). Powszechnie używanym promotorem do regulacji ekspresji transgenu jest promotor 35S pochodzący z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) i terminator genu nopalinowej syntazy (nos) występujący naturalnie w bakteriach glebowych *Agrobacterium tumefaciens* [21].

Zidentyfikowanie takiej sekwencji w finalnym produkcie PCR świadczy o zanieczyszczeniu GMO, ale nie jest to dowód ostateczny, bowiem nie daje odpowiedzi na temat charakteru wprowadzonej zmiany. Potwierdzenie może nastąpić poprzez (1) zastosowanie specyficznego trawienia enzymami restrykcyjnymi, (2) hybrydyzację z sondą DNA komplementarną wobec docelowej sekwencji lub (3) bezpośrednio zsekwencjonowanie finalnego produktu co jest zabiegiem dosyć kosztownym.

Tabela 2

Startery najczęściej stosowane w skriningu żywności GM.
Primers most frequently used in screening of GM food.

Nazwa wprowadzanego fragmentu Name of introduced fragment	Przykładowa sekwencja startera (5'-3') Exemplary starter sequence (5'-3')	Rozmiar ampliconu (pz) Amplicon size (bp)	Organizm źródłowy Organism of origin	Przykłady zastosowań Typical applications
Promotor P-35S 35S promoter	AAAGATGGACC CCCACCCAC	143	wirus mozaiki kalafiora cauliflower mosaic virus, CaMV	kukurydza Bt11, kukurydza MON810, kukurydza T25, pomidory Flavr Savr™, soja Roundup Ready™, ziemniaki B33-inv, Bt11 corn, MON810 corn, T25 corn, Flavr Savr™ tomato, Roundup Ready™ soy, B33-inv potato
Terminator genu syntazy nopaliny nos3 Nopaline synthase gene terminator nos3	CTGTTGCCGGT CTTGCGATGAT	189	bakterie glebowe <i>Agrobacterium tumefaciens</i> soil bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	kukurydza Bt11, kukurydza MON810, pomidory Flavr Savr™, pomidory NEMA 28F Bt11 corn, MON810 corn, Flavr Savr™ tomato, NEMA 28F tomato

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1, 7] / Source: according to the published data [1, 7]

Przykładem systemu polegającego na wykorzystaniu tzw. sekwencji granicznych specyficznego dla kukurydzy MON810 jest kombinacja promotora 35S CaMV i regionu hsp70 ekson1/intron1, które są odpowiednio konstytutywną sekwencją regulatorową i sekwencją białka szoku cieplnego stosowaną w celu uzyskania zwiększonego poziomu transkrypcji [21].

Ilościowy kompetywny PCR

W tej metodzie o parę identycznych primerów współzawodniczą: cząsteczka DNA o znanym stężeniu oraz docelowa sekwencja DNA. Fragmenty DNA konkurują ze sobą w serii reakcji, w których ilość jednego ze składników utrzymywana jest na stałym poziomie, podczas gdy zawartość drugiego jest sukcesywnie zwiększana. Zaletą tego wariantu reakcji łańcuchowej polimerazy (QC-PCR, ang. quantitative competitive

PCR) jest przeprowadzenie reakcji przy jednoczesnej obecności standardu oraz matrycy DNA w jednej próbówce.

W przypadku występowania inhibitorów PCR w tym samym stopniu wpływają one na obniżenie wydajności reakcji standardu, jak i badanego fragmentu DNA [16]. Procedura składa się z następujących etapów:

1. Koamplifikacja wewnętrznego standardu oraz badanej sekwencji DNA.
2. Rozdzielenie produktów przy zastosowaniu elektroforezy na żelu agarozowym w obecności bromku etydyny.
3. Analiza densytometryczna żelu.
4. Określenie zawartości docelowej sekwencji DNA oraz standardu poprzez analizę regresji.

Podstawę analizy ilościowej stanowi wyznaczenie punktu równoważności (ang. equivalence point), w którym końcowe stężenia produktów amplifikacji obu konkurujących fragmentów DNA są równe. Następuje to poprzez skonstruowanie wykresu przedstawiającego zależność $\log(X_n/C_n)$ od $\log C_n$ (gdzie X_n stanowi stężenie molowe produktu amplifikacji docelowego DNA, C_n stężenie konkurenta, uzyskane po n cyklach amplifikacji i C_0 – różnicę początkowego stężenia konkurującego DNA wprowadzonego do mieszaniny reakcyjnej w stosunku do końcowego produktu). Jeśli wydajności amplifikacji docelowego oraz współzawodniczącego DNA (E_x oraz E_c) są identyczne, to rozwiązanie równania (1) stanowi linia prosta.

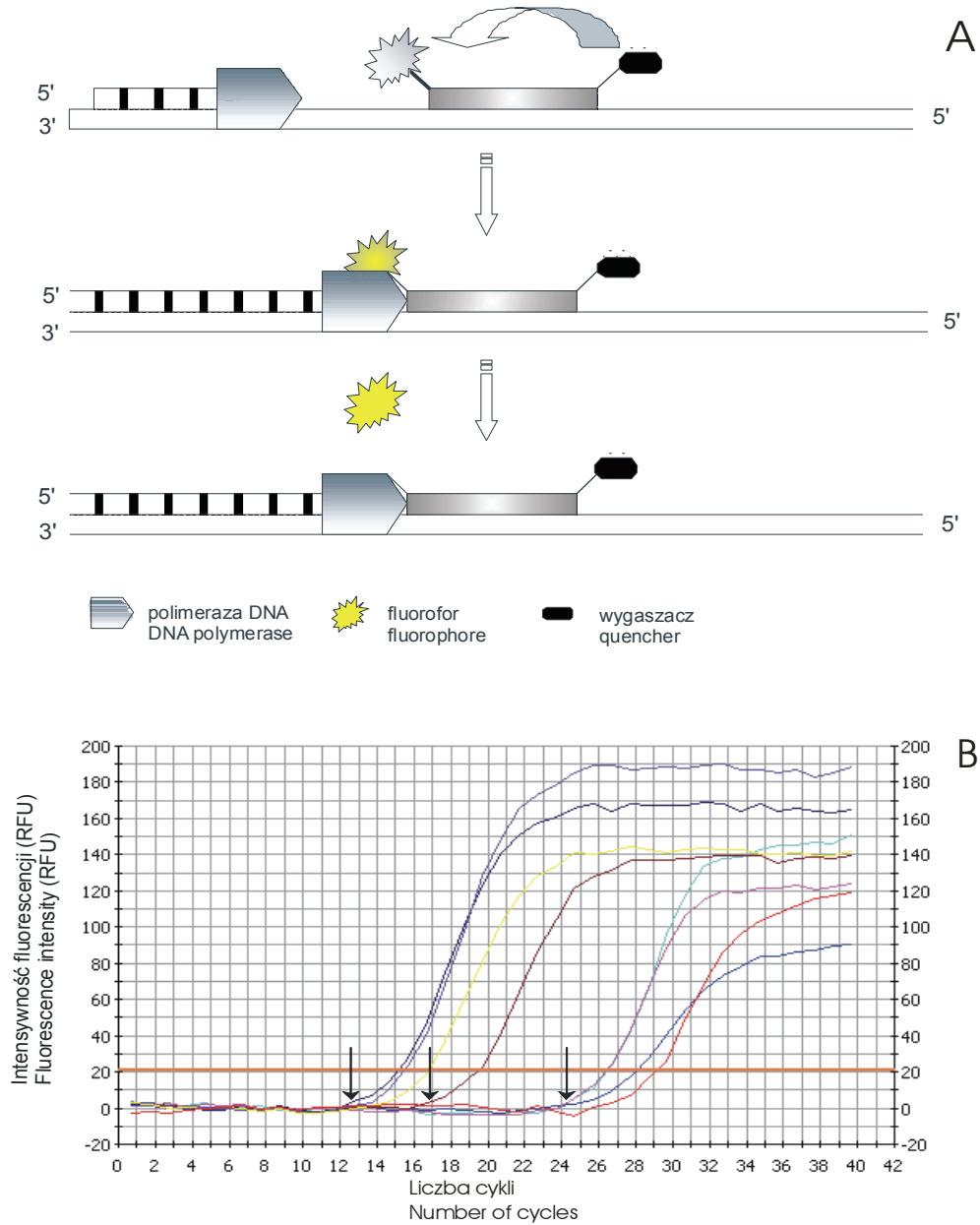
$$\log(X_n/C_n) = \log X_0 - \log C_0 + n \cdot \log[(1 + E_x)/(1 + E_c)] \quad (1)$$

W takim przypadku możliwe jest obliczenie ilości docelowej sekwencji DNA na podstawie znanego stężenia konkurenta (C_0) w punkcie równoważności.

PCR w czasie rzeczywistym

Ta alternatywna wersja PCR (ang. Real-Time PCR) pozwala na ilościową analizę dzięki aparaturze monitorującej przyrost powielanej sekwencji w trakcie kolejnych cykli reakcji. Detekcja produktów amplifikacji może być realizowana przez zastosowanie:

- 1) barwników fluorescencyjnych interkalujących się w sekwencji DNA np. Sybr GreenTM [11, 13],
- 2) sond hybrydacyjnych komplementarnych do powielanej matrycy DNA wywodzących się z technologii rezonansowego przeniesienia energii FRET (ang. fluorescence resonance energy transfer) [7],
- 3) sond podlegających hydrolitycznej degradacji np. TaqManTM lub specyficznie oddziaływujących z ampikonem np. startery Scorpion czy systemu Molecular BeaconsTM [6, 28].



Rys. 1. PCR w czasie rzeczywistym. (A) Schemat działania sond TaqMan™. (B) Kinetyka reakcji RT-PCR, strzałkami oznaczono wartości C_T przykładowych produktów amplifikacji.

Fig. 1. Real time PCR. (A) Outline of action of TaqMan™ probes. (B) Kinetics of RT-PCR, C_T parameters for hypothetical amplification products are marked by arrows.

Źródło: opracowanie i badania własne / Source: based on own study

Najczęściej stosowany jest ostatni wariant i oprócz standardowych składników reakcji PCR zawiera on primer połączony z barwnikiem fluorescencyjnym oraz wygaszczem (rys. 1A). Zlokalizowany w bliskim sąsiedztwie fluorofora (0,1 -1 nm) wygaszcz tłumi jego emisję światła do momentu aż w trakcie wydłużania nici, wskutek egzonukleazowej aktywności polimerazy DNA, fluorofor nie zostanie odłączony od sondy. Systematyczny wzrost fluorescencji w trakcie kolejnych cykli PCR będzie wprost proporcjonalny do komplementarności powielanych sekwencji DNA wobec startera – sondy.

Analiza ilościowa możliwa jest dzięki wyznaczeniu parametru C_T , punktu na krzywej amplifikacji oznaczającego numer cyklu, kiedy sygnał emitowany przez sondy molekularne jest już wykrywany przez system detektorów (rys. 1B). Jego wartość jest odwrotnie proporcjonalna do wyjściowej liczby kopii powielanej sekwencji. System umożliwia zróżnicowanie pomiędzy specyficznymi i niespecyficznymi produktami reakcji PCR dzięki hybrydyzacji z sondami lub analizie krzywej topnienia produktów [13]. Niespecyficzne, krótsze sekwencje mają tendencje do topnienia w znacznie niższej temperaturze w stosunku do specyficznych produktów reakcji PCR [26].

RT-PCR przy wykorzystaniu certyfikowanych standardów GMO zyskał powszechną akceptację w skali światowej i jest w chwili obecnej uznawany za najbardziej dokładną metodę analizy GM żywności. Dodatkowe zalety techniki to minimalne ryzyko krzyżowej kontaminacji dzięki przeprowadzeniu etapu amplifikacji oraz detekcji w pojedynczej próbówce oraz krótki czas analizy [5]. Pewnym ograniczeniem w stosunku do QC-PCR jest jednak koszt aparatury oraz sond molekularnych.

Inne warianty PCR i alternatywne techniki identyfikacji GMO

Sukcesywne poszerzanie zestawu manipulacji genowych stanowi impuls do poszukiwania wszechstronnych technik detekcji. Odpowiedzią na takie zapotrzebowanie jest zwiokrotniony PCR (ang. multiplex PCR), pozwalający na jednoczesną amplifikację kilku docelowych sekwencji w pojedynczej reakcji PCR [13, 30]. Ta pozornie prosta koncepcja sprawia trudności techniczne związane z kompromisowymi warunkami amplifikacji, gwarantującymi wydajność tak szerokiego spektrum primerów. Niewątpliwy sukces odnieśli hiszpańscy badacze, którzy opracowali test przy użyciu systemu Sybr Green I polegający na analizie krzywych topnienia amplifikowanych sekwencji. Pozwoliło to na jednoczesne wykrycie produktów specyficznych dla kukurydzy Maximizer 176, Bt11, MON810 oraz GA 21, a także soi GTS 40-3-2 na poziomie czułości 0,1%, co stanowi realną alternatywę dla RT-PCR [13]. Inny wariant reakcji PCR to połączenie tej metody z testem immunoenzymatycznym. W tej technice biotynylowane produkty PCR są *in situ* hybrydyzowane z sondą znakowaną digoksygeniną, po czym następuje ich związanie na dnie pokrytych streptawidyną studzienek. Imobilizowane fragmenty DNA są oznaczane ilościowo testem ELISA. Dane wska-

zują, że metoda jest wiarygodna oraz wysoce powtarzalna, pozostawiając znaczne możliwości automatyzacji [20].

W przypadku klasycznego PCR wadą jest konieczność przeprowadzenia minimum dwóch etapów: PCR oraz elektroforezy żelowej niezbędnych do identyfikacji transgenów, co przy rutynowych analizach jest absorbujące czasowo. Pojawiły się zatem propozycje analizy techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy równoczesnej detekcji UV rozdzielonych w kolumnie produktów PCR [10]. Koncepcja znacznego obniżenia kosztów wpłynęła na zastosowanie kapilarnej elektroforezy żelowej w kombinacji z RT-PCR [8]. Na etapie rozwoju są testy wykorzystujące mikro-macierze DNA, piezoelektryczne biosensory czy też spektrometrię masową [12, 18, 25].

Podsumowanie

Na przestrzeni ostatnich kilku lat klasyczne procedury PCR zyskały status podstawowego narzędzia diagnostycznego w analizie genetycznie zmodyfikowanej żywności. Jakkolwiek wzrastająca liczba roślinnych transformacji, nowych GM szczepów mikroorganizmów potencjalnie obecnych w rolnictwie i przemyśle żywnościowym stanowi impuls do opracowania wszechstronnych, ukierunkowanych na ilościową analizę technik. Istotne znaczenie ma nie tylko metoda oznaczania, ale również sposób wyboru reprezentatywnej próby i stosowanie wysokiej jakości materiałów referencyjnych [15]. Aktualnie jest wiele technik wykorzystujących kombinacje amplifikacji, detekcji oraz kwantyfikacji dostępnych w analizie GMO, ale tylko nieliczne z nich spełniają surowe kryteria procesu walidacji i są akceptowane przez międzynarodowe instytucje zajmujące się kontrolą jakości produktów żywnościowych. Niezależnie od kierunku rozwoju rynku produktów zawierających GMO istnieje potrzeba opracowania metod analizy, które pozwoliłyby w sposób wiarygodny na identyfikację oraz ilościową detekcję kilku różnych GM w trakcie pojedynczego oznaczenia i w tym kierunku powinny zmierzać badania w najbliższej przyszłości.

Literatura

- [1] Ahmed F.E.: Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.*, 2002, **20**, 215-223.
- [2] Auer C.A.: Tracking genes from seed to supermarket: techniques and trends. *Trends Plant Sci.*, 2003, **12**, 591-597.
- [3] Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Portykus I.: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J. Nutr.*, 2002, **132**, 506S-510S.
- [4] Bonwick G.A., Smith C.J.: Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39**, 817-827.

- [5] Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J., Gruden K.: Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.*, 2006, **37**, 1-15.
- [6] Deisingh A.K., Badrie N.: Detection approaches for genetically modified organisms in foods. *Food Res. Intern.*, 2005, **38**, 639-649.
- [7] Garcia-Canas V., Cifuentes A., Gonzales R.: Detection of Genetically Modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, **44**, 425-436.
- [8] Garcia-Canas V., Cifuentes A., Gonzales R.: Highly reproducible Capillary Gel Electrophoresis (CGE) of DNA fragments using uncoated columns. Detection of genetically modified maize by PCR-CGE. *J. Sep. Sci.*, 2002, **25**, 577-583.
- [9] Greiner R., Konietzny U., Villavicencio A.L.: Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 2005, **16**, 753-759.
- [10] Hayward-Lester A., Oefner P.J., Doris P.A.: Rapid quantification of gene expression by competitive RT-PCR and Ion-Pair Reversed-Phase HPLC. *BioTechniques*, 1996, **20**, 250-257.
- [11] Hernandez M., Esteve T., Prat S., Pla M.: Development of real-time PCR systems based on SYBR®Green I, Amplifluor™ and Taqman® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA 21. *J. Cereal. Sci.*, 2004, **39**, 99-107.
- [12] Hernandez M., Fernandez S., Boyer F., Burns M., Bruderer S., Glouden T., Harris N., Kaeppli O., Philipp P., Pla M., Puigdomenech P., Vaitilingom M., Bertheau Y., Remacle J., Leimanis S.: A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Mol. Biol.*, 2006, **61**, 123-39.
- [13] Hernandez M., Rodriguez-Lazaro D., Esteve T., Prat S., Pla M.: Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal. Biochem.*, 2003, **323**, 164-170.
- [14] <http://engl.jrc.it/>.
- [15] <http://www.irmm.jrc.be/html>.
- [16] Hubner P., Studer E., Luthy J.: Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 1999, **10**, 353-358.
- [17] Ibanez E., Cifuentes A.: New Analytical Techniques in Food Science. *Cit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2001, **41**, 413-450.
- [18] Kuiper H.A.: Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, 1999, **10**, 339-349.
- [19] Linkiewicz A., Wiśniewska I., Sowa S.: Molekularne metody wykrywania i identyfikacji organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO). *Biotechnologia*, 2006, **74**, 44-53.
- [20] Liu G., Su W., Xu Q., Long M., Zhou J., Song S.: Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 2004, **15**, 303-306.
- [21] MacCormick C.A., Griffin H.G., Underwood H.M., Gasson M.J.: Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, **84**, 969-980.
- [22] Meyer R., Candrian U.: PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensm.-Wiss. u Technol.*, 1996, **29**, 1-9.
- [23] PN-EN ISO 21571:2006 Artykuły żywnościowe. Metody wykrywania organizmów zmodyfikowanych genetycznie i produktów pochodnych. Ekstrakcja kwasów nukleinowych.
- [24] Polak J.: Metody analizy żywności modyfikowanej genetycznie. W: *Metody pomiarowe i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii – pod red. M. Jankiewicza i Z. Kędziora*. Wyd. AR w Poznaniu, Poznań 2003, s. 413-431.

- [25] Radecki J., Radecka H., Cieśla J., Tudek B.: Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej genetycznie. *Biotechnologia*, 2006, **74**, 67-79.
- [26] Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 1997, **254**, 154-160.
- [27] Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dn. 22 września 2003 r., dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie. *Off. J. Eur. Commun.*, L 268, 1-23.
- [28] Tyagi S., Kramer F.R.: Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.*, 1995, **14**, 303-308.
- [29] Ustawa o organizmach genetycznie zmodyfikowanych z dn. 22 czerwca 2001 r. Tekst ujednolicony – *Dz. U.* 2007 r. Nr 36, poz. 233).
- [30] Wang W., Fang T.J.: Development of multiplex and quantitative PCR assay to detect genetically modified Roundup Ready soybean in foods. *J. Food Drug Anal.*, 2005, **13**, 132-138.

METHODS OF IDENTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN FOODS

S u m m a r y

In this paper, the most important analytical methods applied in detection of genetically modified food are presented. Most of the techniques are based on identification of changes in structure of two biological active macromolecules: DNA and proteins. In case of nucleic acid, basic diagnostic tool is polymerase chain reaction (PCR), used in selective amplification of specific DNA fragments with qualitative and quantitative analysis of introduced modifications. Real-time PCR is actually established as a primary method in analysis of the contents genetically modified organisms in transgenic crops and foods. To estimate the genetic modification manifested on protein structure level there are introduced immunoenzymatic assays based on selective recognition of recombinant protein by specially designed antibody. Although simplified form with recognition of antigen-antibody complex on nitrocellulose strip and classic version of immunoenzymatic assay on microplate are mainly treated as qualitative methods.

Together with the development of genetic manipulation, numbers of plant transformations are growing and probably, in the near future also animal transformations, there is a need to establish reliable tests for detection and quantification of several genetic modifications in a single analysis.

Key words: genetically modified organisms, polymerase chain reaction, immunoenzymatic assays 