

Növényi minták GMO-tartalmának kvalitatív meghatározása

Uri Csilla¹ – Prokisch József¹ – Sándor Erzsébet²
– Győri Zoltán¹

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

¹Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai
Intézet, Debrecen

²Növényvédelmi Tanszék, Debrecen
urics@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során kukorica minta GM-tartalmát határoztuk meg polimeráz láncreakcióval, a reakció megfelelő optimalizálását követően. A vizsgálat két fő lépésből áll: először a mintából ki kell vonni a DNS-t, ezt követően a GMO-tartalmat polimeráz láncreakcióval detektáljuk. A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) egy in vitro módszer, mellyel kromoszómális vagy klónozott DNS (cDNS) célszekvenciákat szaporíthatunk fel enzimatis úton. A reakció annyira érzékeny, hogy egyetlen kiindulási DNS-molekulából is a vizsgálatok elvégzéséhez elegendő mennyiségű DNS-t tudunk előállítani. A PCR termék azonosítása agaróz-gélelektroforézis segítségével történik. A PCR reakció optimalizálásánál figyelembe kell venni a MgCl₂ koncentrációt, a reakcióidőt és a hőmérsékletet. Az anelláció hőmérsékletét addig kell emelni, amíg elérjük a legnagyobb specificitást és a legnagyobb kihozatalat. Ha az anelláció hőmérséklete túl alacsony, a primer nem specifikus helyekre is bekötődik; a gélekben több sáv látható egy mintánál. Túl magas anellációs hőmérséklet esetén a primer nem vagy csak kis mértékben kötődik be (kevés sáv, vagy nem látható sáv a gélekben). Az optimalizálást követően kerülhet sor az ismeretlen minta GMO-tartalmának meghatározására megfelelő pozitív és negatív kontrollok alkalmazása mellett.

Kulcsszavak: GMO, PCR, kukorica

SUMMARY

We analysed the GMO content of corn samples by polymerase chain reaction following the appropriate optimization of the reaction. The analysis included two main steps: extraction of DNA from the sample, and detection of the GMO content by polymerase chain reaction. The polymerase chain reaction is an in vitro method to multiply chromosomal or cloned DNA (cDNA) sequences through the enzymatic pathway. The reaction is sensitive enough to produce DNA in sufficient amount for the analysis from a single DNA. We identified the PCR products by agarose gel electrophoresis. When optimizing the reaction, the MgCl₂ concentration, reaction time and temperature have to be taken into consideration. The temperature of the anellation has to be increased until the highest specificity and yield is reached. If the temperature of the anellation is too high, the primer is linked to non-specific sites as well; in the gel visualization, more lines can be seen at one sample. If the temperature of the anellation is too high, the primer is insufficiently linked or is not linked at all (too few lines in the gel visualization). After optimization, the GMO content in the unknown sample can be determined along with the appropriate positive and negative controls.

Keywords: GMO, PCR, maize

1. BEVEZETÉS

Napjaink egyik rohamléptekkel fejlődő tudományterülete a biotechnológia. A géntechnológiai fejlesztések 1980 körül indultak, az első genetikailag módosított növények (GM) 1996-ban kerültek köztermesztésbe. A transzgenikus növények előállításának elsődleges célja a mezőgazdasági termelés segítése volt, mivel ezektől a növényektől a hagyományos nemesítéssel előállítottaktól nagyobb terméshozamot reméltek, illetve az első generációs GM növények a termesztés egy részproblémájának kiküszöbölésére jöttek létre (Pepó, 2006).

1996-tól kezdődően a genetikailag módosított növények vetésterülete világviszonylatban rohamosan nőtt, 2005-re elérte a 90 millió hektárt. A GM-növények vetésterülete legnagyobb az Amerikai Egyesült Államokban (49,8 millió ha), ezt követi Argentína (17,1 millió ha), Brazília (9,4 millió ha), majd Kanada (5,8 millió ha). A legjelentősebb génmódosított növény jelenleg a szója; világviszonylatban vetésterületének több mint 60%-a genetikailag módosított. Jelentőségében a szóját a kukorica követi, amely esetében a 143 millió hektár vetésterületből 20 millió hektár transzgenikus (www.monsanto.hu).

Magyarországon a GMO-k termesztésére jelenleg moratórium van érvényben. Ha a GM növények köztermesztésbe kerülnek, hazánk elveszti GMO-mentes státusát, ezzel fontos EU-s exportpiacoktól esne el. A hazai törvényi szabályozásban a GMO-k nyomon követhetősége fontos szerepet kap a teljes termelési és feldolgozási láncban (Pepó, 2006). Az 1829/2003/EK rendelet szerint a génmódosításból származó fehérje- vagy DNS-tartalmat jelölni kell a termék csomagolásán, ha az 0,9%-nál nagyobb mennyiségben tartalmaz GMO-összetevőt. Az adott alapanyagban vagy késztermékben az adott növényfaj tömegét tekintjük 100%-nak, ehhez viszonyítjuk a genetikailag módosított összetevő arányát. Ez azt jelenti, hogy egy 10% kukoricát tartalmazó késztermék esetében a 0,9% GMO-kukorica előfordulás a késztermék teljes tömegére vonatkoztatva mindössze 0,09% GMO-kukorica tartalmat jelent. Mindezek mutatják, hogy napjainkban egyre fontosabbá válik az élelmiszer és takarmány alapanyagok GMO-tartalmának vizsgálata. Munkánk során kukorica minta GMO-tartalmát határoztuk meg

polimeráz láncreakcióval, a reakció megfelelő optimalizálását követően.

2. A TRANSZGÉNIKUS NÖVÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁHOZ HASZNÁLT GÉNEK

A transzgenikus növények azok, melyek sejtmagjába vagy organellumába gént (DNS-t) juttatunk be, továbbá a donor gén integrálódik, működik és öröklődik. A GM növény minden sejtjének örökítő anyaga tartalmazza a transzgént. Ez csak úgy lehetséges, ha az idegen géneket első lépésben a növények egy-egy izolált sejtjébe juttatjuk be, majd ezekből a sejtekből teljes növényt regenerálunk (Heszky et al., 2005).

A GMO-tartalom polimeráz láncreakcióval történő detektálásának megértéséhez tisztában kell lenni azzal, hogy génmódosításkor milyen géneket juttatnak be a sejtbe. A következőkben ezeket ismertetem.

A növénybe bejuttatni kívánt, új tulajdonság kialakításáért felelős idegen gént nevezzük transzgennek vagy kódoló régiónak. Génmódosításkor a transzgenen kívül egyéb gének DNS-ét is felhasználják.

Promóter vagy indító szakasz: ez teszi a transzgént működőképessé, ugyanis ez egy felismerő régió a DNS-en a DNS-polimeráz enzim számára. A promotert még a genetikai módosítás megkezdése előtt az átvenni kívánt génhez kapcsolják. A GM növények előállításához leggyakrabban használt promóter a karfiol-mozaikvírusból származó CaMV 35S promóter (ismert a szekvenciája – ez a GMO-tartalom kimutatásánál fontos), ami a növényi sejtet arra kényszeríti, hogy az folyamatosan állítsa elő a promóter által kódolt és a transzgennek megfelelő fehérjét (Pusztai és Bardócz, 2004).

Terminátor: a transzkripciót leállító génszakasz.

Marker és riporter gének: a szelekcióhoz szükséges gének, melyek azt jelzik, hogy melyik sejtet sikerült átalakítani a transzgennek. Ezek antibiotikum-rezisztenciát, herbicid-toleranciát kódolnak, vagy fluoreszcenciával különböztetik meg az átalakított sejteket az át nem alakítottaktól (Pusztai és Bardócz, 2004).

A marker és riporter géneket a kódoló szakaszba építik, így a bejuttatni kívánt gén három fő része a promóter, a kódoló régió és a terminátor.

3. KUKORICA MINTA GMO-TARTALMÁNAK KVALITATÍV MEGHATÁROZÁSA

A GMO-tartalom meghatározásának két fő lépése:

- a DNS kivonása a mintából,
- GMO-tartalom detektálása polimeráz láncreakcióval.

3.1. A DNS kivonása növényi mintából

A minta-előkészítés során a száraz kukoricaszemeket megdaráltuk (mintánként 1 kg szükséges). A DNS kivonásához 75 mg mintát mértünk be, majd a kivonást DNeasy Plant Mini Kit

(QIAGEN) segítségével végeztük. A DNS-kivonás sikerességét agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük. A GMO-tartalom kimutatását polimeráz láncreakcióval végeztük, aminek elméleti hátterét a következőkben részletezem.

3.2. A polimeráz láncreakció (PCR) elmélete

Egy mintából kinyert DNS mennyisége olyan csekély, hogy a megfelelő vizsgálatok elvégzéséhez a DNS felszaporítása szükséges, amit polimeráz láncreakcióval végezhetünk. A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) egy in vitro módszer, mellyel kromoszómális vagy klónozott DNS (cDNS) célszekvenciákat szaporíthatunk fel (amplifikálás) enzimatis úton. A módszert Kary B. Mullis találta fel 1985-ben (Mullis, 1990), 1993-ban kémiai Nobel-díjat kapott felfedezéséért. A reakció annyira érzékeny, hogy egyetlen kiindulási DNS-molekulából is a vizsgálatok elvégzéséhez elegendő mennyiségű DNS-t tudunk előállítani (László, 1999).

A reakcióhoz szükséges anyagok:

- DNS-templát,
- primerek (lánckezdő oligonukleotidok),
- hőstabil DNS-polimeráz enzim,
- nukleotidok,
- puffer,
- thermocycler készülék (a hőmérsékletet gyorsan, pontosan változtató készülék).

A transzgen csak akkor mutatható ki, ha ismerjük a beépített gént, vagy annak egy részét. A GMO kimutatáshoz rendszerint a promóter szakaszt használjuk, mivel ez a legtöbb GM növényben azonos. A promóter génszakasz, a 35S, csak a transzgenikus növényekben fordul elő, természetes úton nem kerülhet a növénybe. A primerek rövid (18-25 bp), mesterségesen előállított egyszálú láncok, melyek komplementerek a felszaporítani kívánt DNS-szakasz egy részével.

A PCR reakció 30-40 ciklusból áll, minden cikluson belül három fő lépés különíthető el:

1. Templát denaturáció: a kettős szálú DNS denaturációja 95 °C körüli hőmérsékleten történik, eredményeképpen egyszálú fonalat kapunk.
2. Primer anelláció (primer kapcsolódás): a hőmérsékletet az oligonukleotid primerek olvadáspontjának figyelembe vételével csökkentjük, ekkor a primerek kapcsolódnak a komplementer célszekvenciákhoz.
3. Extenzió vagy polimerizáció: a DNS-polimeráz enzim 72-75 °C-on a primerek 3' végét meghosszabbítja (elongáció), ezzel egy időben a templát DNS-sel komplementer szál szintézise (extenzió) is lejártszódik 5'-3' irányban. Ezzel befejeződik az első ciklus, és a molekulák újbóli denaturálásával kezdődik a második ciklus (Hajósné, 1999).

Megfelelő primereket és DNS-polimerázt alkalmazva a 40. ciklus végére az általunk

felszaporítani kívánt DNS-szakaszból (a primerek által közrefogott rész) mikrogrammnyi mennyiség állítható elő, hiszen a ciklusok ismétlődése során a DNS-polimeráz (legtöbbször Taq-polimeráz) az előző ciklusban keletkezett új DNS-szálakat is templátként használja, így a primer kötőhelyek közötti DNS-szakaszok mennyisége exponenciálisan nő.

3.3. A PCR termék azonosítása agaróz-gélelektroforézissel

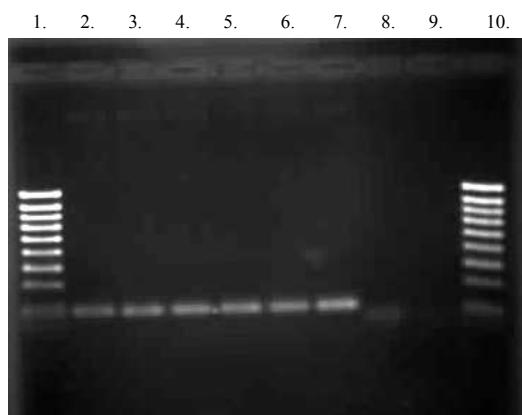
A PCR termék azonosítása agaróz-gélelektroforézissel történik. Az eljárás során agaróz gélbe injektáljuk a PCR-elegyet (ami tartalmazza a felszaporított DNS-fragmenteket). Ezt követően a gélen elektromos áramot vezetünk át, aminek hatására a DNS-szálak a gél pórusain keresztül a pozitív pólus felé vándorolnak. A mozgás sebessége a molekula méretétől függ; a kisebb DNS-molekulák gyorsabban mozognak, mint a nagyobbak.

A gélelektroforézis során a gél első és utolsó zsebébe ún. DNS-létrát injektálunk, ami ismert méretű DNS-fragmenteket tartalmaz. Ehhez viszonyítva becsülhető a PCR termékek hossza.

Minden PCR reakció során 1-3 negatív kontroll elegyet is összeállítunk, ami DNS helyett desztillált vizet tartalmaz. Ezzel ellenőrizhetjük, hogy az elegyek összeállításakor történt-e szennyezés idegen (pl. bakteriális) DNS-sel (ha szennyezés nem történt, a gélképen a negatív kontrollt tartalmazó zseb(ek)ben nem látunk sávot, mivel nem volt DNS, ami felszaporodhatott volna).

A gélelektroforézist követően a gélt etídium-bromiddal (1 µg/ml) festjük meg, így tesszük láthatóvá a vizsgált molekulákat (1. ábra). Az etídium-bromid egy fluoreszcens festék, aminek segítségével ultraibolya fényben már 1-10 ng mennyiségű DNS is kimutatható.

1. ábra: PCR termékek gélképe



1. zseb: DNS-létrá(1), 2-7. zseb: PCR termék(2), 8-9. zseb: negatív kontroll(3), 10. zseb: DNS-létrá(4)

Figure 1: Gel picture of PCR products

1. pocket: DNA ladder(1), 2-7. pocket: PCR product(2), 8-9. pocket: negative control(3), 10. pocket: DNA ladder(4)

3.4. A PCR reakció optimalizálása

A PCR reakció helyes kivitelezésének egyik kulcs lépése a primerek megtervezése. Mint említettem, a primerek mesterségesen előállított, 18-25 bp hosszúságú egyszálú láncok, melyek komplementerek az amplifikálendő DNS-szakasz elejével és végével. A primerek tervezésénél több szempontot kell figyelembe venni:

- a primerek GC tartalma legyen 50% körüli,
- a primerek GC tartalma hasonló legyen, így közeli lesz a két primer olvadáspontja,
- a kép primer szekvenciája – a primer-dimerek keletkezésének megakadályozása érdekében – ne legyen komplementer,
- ne tartalmazzanak a primerek belső hurkot,
- specifikusan kapcsolódjanak a DNS megfelelő részéhez,

– megközelítőleg azonos hőmérsékleti tartományban denaturálódjanak (László, 1999).

Munkánk során a következő primerpárt használtuk (Lipp et al., 2001):

p35S-cf3: 5'- CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG -3'

p35S-cr4: 5'- TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C -3'

A PCR reakció optimalizálásakor a következőket kell figyelembe venni:

- MgCl₂ koncentráció,
- reakcióidő,
- hőmérséklet.

A magnézium koncentráció befolyásolja a primer kapcsolódását, a primer-dimerek keletkezését, a Taq-polimeráz aktivitását, illetve a másolás pontosságát. A Taq-polimeráz működéséhez szabad Mg²⁺-ion jelenléte szükséges (Hajósné, 1999). A PCR elegy összeállításához PCR Master Mixet (Fermentas) használtunk, ami a DNS-polimeráz enzimen kívül optimális mennyiségben tartalmaz MgCl₂-t, illetve dNTP-eket (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

A polimerizációs lépés hossza a célszekvencia hosszától és a DNS-polimeráz enzim lánchosszabbító sebességétől függ. Az enzim lánchosszabbító sebességét a gyártó megadja. Így például Taq-polimeráz esetében az extenzió sebessége 72 °C-on 2-4 kb/min, ami azt jelenti, hogy egy 6 kb hosszúságú PCR terméknel a polimerizáció hossza 72 °C-on 1,5-3 perc.

A hőmérséklet tekintetében a következőket kell figyelembe venni: a denaturáció és a polimerizáció hőmérséklete adott, az anelláció hőmérsékletét kell megfelelően beállítani. Az anelláció hőmérséklete a primerek olvadáspontjától függ. A primer olvadási hőmérséklete (T_m) az a hőmérséklet, amelyen a primer kötőhelyeinek a fele foglalt. Az olvadási hőmérsékletet a primer hosszával nő.

A T_m érték kiszámítása:

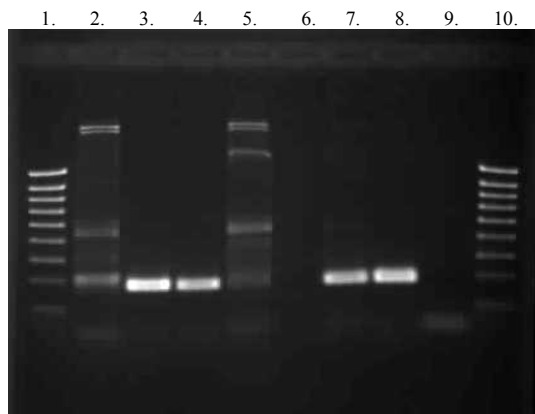
$$T_m \text{ } ^\circ\text{C} = 2(N_A + N_T) + 4(N_G + N_C)$$

ahol N: az adenin (A), timin (T), guanin (G), citozin (C) bázisok száma a primerben.

Az anelláció hőmérséklete körülbelül 5 °C-kal alacsonyabb a primerek olvadási hőmérsékletétől. Az anelláció hőmérsékletét addig kell emelni, amíg

elérjük a legnagyobb specificitást és a legnagyobb kihozattal. Ha az anelláció hőmérséklete túl alacsony, a primer nem specifikus helyekre is bekötődik; a géliképen több sáv látható egy mintánál (2. ábra). Ha az anellációs hőmérséklet túl magas, a primer nem vagy csak kis mértékben kötődik be (kevés sáv, vagy nem látható sáv a géliképen).

2. ábra: PCR termékek géliképe alacsony anellációs hőmérséklet esetén



1. zseb: DNS-létra(1), 2-8. zseb: PCR termék(2), 2. és 5. zseb: alacsony anellációs hőmérséklet(3), 9. zseb: negatív kontroll(4), 10. zseb: DNS-létra(5)

Figure 2: Gel picture of PCR products in low annealing temperature

1. pocket: DNA ladder(1), 2-8. pocket: PCR product(2), 2. and 5. pocket: low annealing temperature(3), 9. pocket: negative control(4), 10. pocket: DNA ladder(5)

3.5. A GMO-tartalom kvalitatív meghatározása a PCR reakció optimalizálását követően

A kukorica mintából történő DNS-kivonás sikerességét – mint korábban említettem – agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük (3. ábra).

A minta DNS felhasználásával a PCR elegyet a következők szerint állítottuk össze:

V= 25 µl

DNS: 2 µl

p35S primerpár (0,8 pmol/µl a PCR elegyben): 2-2 µl

2x PCR Master Mix: 12,5 µl

H₂O: 6,5 µl

A reakcióelegy elkészítését lamináris áramlású fülke alatt végezzük, a fülke UV-fénnyel történő sterilizálása után.

A PCR reakció paraméterei:

Kezdeti denaturáció: 98 °C 3 min

1-5. ciklus lépései:

1. denaturáció: 98 °C 1 min

2. anelláció: 58 °C 30 sec

3. polimerizáció: 72 °C 1 min

6-40. ciklus lépései:

1. denaturáció: 92 °C 1 min

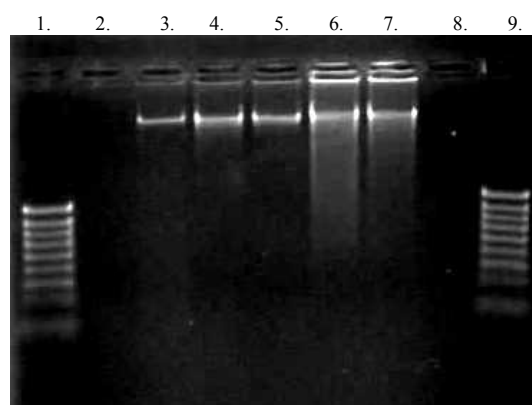
2. anelláció: 58 °C 30 sec

3. polimerizáció: 72 °C 1 min

A PCR reakciót Eppendorf Mastercycler készülékkel hajtottuk végre.

A reakciót követően a PCR terméket agaróz-gélelektroforézis segítségével azonosítottuk. A mintákat 5× DNS Loading pufferrel hígítottuk 4:1 arányban, majd zsebenként 10-10 µl-t vittük fel a géltre. Az elektroforézist Consort E835 típusú készülékkel, 120 V állandó feszültségen, 1 órán át végeztem.

3. ábra: Kukorica mintából kivont DNS géliképe

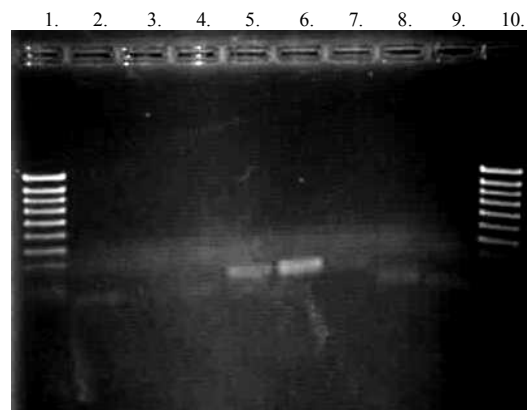


1. zseb: DNS-létra(1), 3-7. zseb: kukorica DNS(2), 9. zseb: DNS-létra(3)

Figure 3: Gel picture of maize sample extracted from DNA

1. pocket: DNA ladder(1), 3-7. pocket: maize DNA(2), 9. pocket: DNA ladder(3)

4. ábra: A PCR termékek géliképe pozitív és negatív kontroll jelenlétében



1. zseb: DNS-létra(1), 2-4. zseb: kukorica minta PCR terméke 3 ismétlésben(2), 5. zseb: pozitív kontroll (1% GMO tartalmú standard)(3), 6. zseb: pozitív kontroll (5% GMO tartalmú standard)(4), 7-9. zseb: negatív kontroll(5), 10. zseb: DNS-létra(6)

Figure 4: Gel picture of PCR products in the presence of positive and negative control

1. pocket: DNA ladder(1), 2-4. pocket: PCR product of maize sample in three repeat(2), 5. pocket: positive control (standard with 1% GMO content)(3), 6. pocket: positive control (standard with 5% GMO content)(4), 7-9. pocket: negative control(5), 10. pocket: DNA ladder(6)

A PCR reakció során pozitív kontrollként ismert GMO-tartalmú (1% és 5%) kukorica standardokat (IRMM ERM-BF413d, ERM-BF413f) használtunk (Trapmann et al., 2001). A 4. ábrán láthatjuk, hogy a gélen a mintákat tartalmazó (2-4.) zsebekben nem jelent meg sáv, tehát a PCR reakció során nem szaporodott fel a keresett DNS-szakasz. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgált kukorica minta GMO-t nem tartalmazott.

A kvalitatív PCR arra alkalmas, hogy egy mintáról nagy biztonsággal eldöntsük, hogy tartalmaz-e GM-hányadot. Napjainkban azonban

előtérbe kerül a GMO-tartalom kvantitatív meghatározása Real-time PCR-ral. A kvalitatív GMO-tartalom meghatározás gyakorlati jelentősége a jövőben egy-egy minta GMO-mentességének igazolása lehet. A fehérje alapú GMO-meghatározási módszerek szintén háttérbe szorulnak, csupán mint gyors módszerek alkalmazhatók jól egy-egy tétel helyszíni vizsgálatokor.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a Bolyai János ösztöndíjalap támogatását.

IRODALOM

- Hajós né N.M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Heszky L.-Fésüs L.-Hornok L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest.
- László É. (1999): Polimeráz láncreakció a géntechnológia nélkülözhetetlen eszköze. Műszaki Szemle, II/7-8. 11-15.
- Lipp, M.-Bluth, A.-Eyquem, F.-Kruse, L.-Schimmel, H.-Van den Eede, G.-Anklam, E. (2001): Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. European Food Research and Technology, 212. 497-504.
- Mullis K.B. (1990): A polimeráz-láncreakció felfedezése. Tudomány, VI/6.
- Pepó P. (2006): Hozzászólás az MTA állásfoglalásához a génmódosított, a hagyományos és a biotermesztett növények együttes termesztéséről. Magyar Tudomány, 2006/4. 484.
- Pusztai Á.-Bardócz Zs. (2004): A genetikailag módosított élelmiszerek biztonsága. Kölcsey Füzetek VII. Kölcsey Intézet, Budapest.
- Trapmann, S.-Le Guern, L.-Prokisch, J.-Robouch, P.-Kramer, G.N.-Schimmel, H.-Pauwels, J.-Querci, M.-Van den Eede, G.-Anklam, E. (2001): CERTIFICATION REPORT. The Certification of Reference Materials of Dry Mixed Maize Powder with different Mass Fractions of MON 810 Maize. European Commission Directorate-General Joint Research Centre. European Communities.
- www.monsanto.hu