

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Jan Hodek

Vývoj a validace metod pro detekci GMO

Development and validation of methods for GMO detection

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Praha, 2014

Výsledky předkládané dizertační práce byly zpracovávány v Referenční laboratoři pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting, Oddělení molekulární biologie, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. v Praze-Ruzyni s podporou výzkumného záměru MZe ČR 0002700604 a grantů MZe ČR 1B44068, MŠMT ČR MEB080849, MZe ČR 1G46068, MZe ČR QI101B267, MŠMT ČR OC09031, MŠMT ČR MEB091010 a MŠMT ČR COST OC09062.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.5.2014

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych rád jmenovitě poděkoval Jarce Ovesné za vedení nejen při řešení této práce. Dále děkuji Láďovi Kučerovi a Leoně Leišové-Svobodové za mnohé cenné rady.

Samozřejmě také děkuji za přízeň i pomoc všem ostatním bývalým kolegům z NRL GMO i z celého Oddělení molekulární biologie ve VÚRV, v.v.i.

Za stejné bych také rád poděkoval i současným kolegům z týmu Virologie v ÚOCHB.

Poděkovat chci také Tereze, Emičce i celé rodině za velkou vstřícnost a pomoc především v poslední fázi studia.

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Literární přehled.....	12
3.1	Počátky geneticky modifikovaných organismů.....	12
3.2	Geneticky modifikované rostliny.....	14
3.3	Vývoj legislativy pro nakládání s GMO.....	16
3.4	Legislativní normy pro nakládání s GMO v ČR.....	22
3.5	Dohled nad nakládáním s GMO.....	23
3.6	Kritické body stanovení GMO v potravinách a krmivech.....	25
3.6.1	Detekce bílkovinného produktu.....	26
3.6.2	Detekce DNA.....	27
3.7	Extrakce DNA.....	27
3.8	PCR detekce.....	28
3.9	PCR kvantifikace.....	33
3.10	Nové metody detekce GMO.....	36
4	Výčet použitých metod.....	41
5	Výsledky.....	42
5.1	Extrakce DNA z papáji.....	42
5.2	Vliv inhibitorů na efektivitu real-time PCR.....	50
5.3	Spolehlivost screeningových metod pro stanovení GMO.....	59
5.4	Vývoj a verifikace metody real-time PCR pro kvantifikaci hrachu setého.....	67
5.5	Ověření vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem pro hodnocení GM a konvenčních odrůd kukuřice.....	80
6	Diskuse.....	90
6.1	Extrakce DNA z papáji.....	90
6.2	Vliv inhibitorů PCR na efektivitu reakce.....	93
6.3	Spolehlivost screeningových metod pro stanovení GMO.....	94
6.4	Vývoj metody real-time PCR pro kvantifikaci taxon-specifického genu hrachu setého.....	96
6.5	Využití vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem pro charakterizaci konvenčních a GM odrůd kukuřice.....	97
7	Závěr.....	99
8	Seznam použité literatury.....	100
9	Přílohy.....	121

9.1	Praktické výsledky související s tématem dizertační práce.....	121
9.1.1	Metodiky pro praxi.....	121
9.1.2	Užité průmyslové vzory	121
9.2	Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce.....	121
9.3	Praktické výsledky nesouvisející s tématem dizertační práce	122

Abstrakt

V předkládané práci je řešena problematika stanovení geneticky modifikovaných organismů (GMO) v rostlinách a odvozených produktech. Platná legislativa v Evropské unii nařizuje sledování GMO a upravuje pravidla pro jejich značení a dohledatelnost.

Cílem práce bylo přispět k řešení vybrané problematiky kritických bodů stanovení GMO. Prvním bodem byla extrakce DNA. Problematika byla řešena pro případ extrakce DNA z plodů papáji a z kandované papáji. Pro obě potraviny byla vhodnost vybrané metody extrakce ověřena a potvrzena amplifikací specifického úseku extrahované DNA metodou PCR. Dalším bodem byla real-time PCR, kdy byla řešena problematika inhibitorů reakce. Byla ukázána inhibice real-time PCR vlivem EDTA a vlivem zbytkového množství iontů těžkých kovů, obsažených v laboratorním plastu. V obou případech vedla inhibice k ovlivnění efektivity reakce. Další kritickou částí stanovení GMO je používání screeningových elementů. Práce byla zaměřena na falešnou pozitivitu výsledků.

Dalším cílem práce byl vývoj nových metod pro stanovení GMO. Byla představena metoda real-time PCR pro kvantifikaci taxon-specifického genu hrachu setého. Metoda byla ověřena na 13 kultivarech hrachu setého a vybraných příbuzných rostlinách čeledi bobovitých.

Použití metody vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem bylo testováno pro charakterizaci GM a konvenčních odrůd kukuřice na základě jejich metabolomických profilů. Nebylo potvrzeno, že by testovaná metoda umožnila odlišení konvenčních a GM kultivarů kukuřice, ale byl ukázán její potenciál pro hodnocení jednoho z kritérií bezpečnosti GMO, kterým je ekvivalence ve složení obsahových látek konvenčních a GM odrůd.

Abstract

The present work is focused on the issue of genetically modified organisms (GMOs) detection in the plants and derived products. Existing legislation in the European Union regulates monitoring of GMO and lays down rules for their labeling and traceability.

The aim was to contribute to solving certain issues of critical points in GMO detection. The first point was DNA extraction. The problem was addressed to the example of DNA extraction from the fruit of papaya and candied papaya. For both food products the suitability of the selected extraction methods was verified and confirmed by amplification of a specific DNA sequence by PCR. The second critical point was related to PCR inhibitors. We observed the effect of real-time PCR inhibition due to the influence of the residual EDTA and the residual amount of heavy metal ions, which were present in laboratory plastic. In both examples, the inhibition affects the PCR efficiency. Another critical point in the GMO detection is use of screening elements. That work was focused on false positive results.

Development of new methods for GMO detection was another goal of this work. We have developed the method for garden pea taxon-specific gene quantification by real-time PCR. The method was tested on 13 cultivars of garden pea and several related plants of *Fabaceae* family.

Application of Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry was tested for characterization of GM and conventional maize varieties on the basis of metabolomics profiles. It was not confirmed that the test method allowed the differentiation of conventional and GM maize cultivars. Nevertheless, the method has shown to be useful for the evaluation of one of the criteria for the safety of GMOs, which is equivalence in the composition of substances contained in conventional and GM varieties.

Seznam zkratek

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Bt	Bacillus thuringiensis
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CRM	Certified reference material
Ct	Cycle threshold
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
ČR	Česká republika
DG	Directorate general
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EC	European Community
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EEC	European Economic Community
EFSA	European Food Safety Authority
EHS	Evropské hospodářské společenství
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMBO	European Molecular Biology Organization
ENGL	European Network of GMO Laboratories
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
ES	Evropské společenství
ESF	European Science Foundation
EU	Evropská unie
EU-RL GMFF	European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed
FAST	Forecasting and Assessment in Science and Technology
FDA	Food and Drug Administration
FEFAC	European Feed Manufacturers' Federation
FMV	Figwort Mosaic Virus
GI	Genové inženýrství
GM	Genetically Modified /geneticky modifikovaný
GMAG	Genetic Manipulation Advisory Group
GMO	Genetically Modified Organism/geneticky modifikovaný organismus
IHCP	Institute for Health and Consumer Protection

IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements
ISO	International Organization for Standardization
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MZe ČR	Ministerstvo zemědělství České republiky
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NIH	National Institutes of Health
NOS	Nopaline synthase
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase II
NRL	National Reference Laboratory
NRL GMO	Národní referenční laboratoř pro identifikaci GMO
ODM	Oligonucleotide directed mutagenesis
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAC	Recombinant DNA Advisory Committee
RdMD	RNA-directed DNA methylation
rDNA	recombinant DNA
Ri plazmid	hairy root-inducing
RNA	Ribonucleic acid
SDN	site-directed nuclease
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	small interfering RNA
SV40	Simian virus 40
TE	Tris-EDTA
Ti plazmid	tumor-inducing
UHPLC-QTOFMS	Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
US	United States
USA	United States of America
UV	Ultra Violet
VÚRV, v.v.i.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, veřejná výzkumná instituce
ZNF	Zinc Finger Nuclease Technology

1 ÚVOD

Pojem GMO (Genetically Modified Organism – GMO) je široký a zahrnuje GM organismy od těch nejjednodušších, jako jsou mikroorganismy, po ty nejsložitější, jako jsou rostliny a živočichové. V rámci této práce byla řešena problematika spojená s geneticky modifikovanými zemědělskými plodinami a z nich odvozenými produkty (potravinami a krmivy). Je-li tedy v experimentální části používán obecný pojem GMO, týká se GM plodin a z nich odvozených produktů. Řada odborných výrazů, popisujících GMO, biotechnologické nebo molekulárně-biologické metody, nemá vhodný český překlad. Proto se v textu vyskytují některé pojmy v angličtině, anglický výraz je ale vždy vysvětlen popisným českým překladem.

Nakládání s GMO je regulováno evropskou i národní legislativou. Pod tyto regulace spadají také kontroly obsahu GMO v potravinách a krmivech a pravidla pro značení a dohledatelnost GMO. Aby mohl být takový dozor vykonáván za standardních podmínek v rámci celé Evropské Unie, musí dozorové laboratoře pro tento druh analýz disponovat spolehlivými a robustními metodami. Pro analýzu GMO v potravinách a krmivech jsou to metody polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR) a real-time PCR (PCR v reálném čase), které jsou založené na analýze DNA.

Tato práce i související výzkumné aktivity jsou spojené s působením doktoranda v Referenční laboratoři pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting, která byla v roce 2006 v souladu s Nařízením (ES) č. 882/2004 a z rozhodnutí MZe ČR jmenována Národní referenční laboratoří pro GMO (NRL GMO). Volba jednotlivých kroků řešení dizertační práce i publikační aktivita tedy úzce souvisí s postupy při stanovení GMO v rostlinách a odvozených produktech a řešením problémů, které jsou s touto činností spojeny.

Výběr rostlinného materiálu nebyl zaměřen na jeden konkrétní typ GMO, ale bylo využito více různorodých GM zemědělských produktů, konkrétně papája, sója, hrách a kukuřice.

Tento rostlinný materiál byl použit pro řešení případových studií jednotlivých kroků detekce GMO, od extrakce DNA, přes PCR a real-time PCR, po vývoj nových metod stanovení GMO.

2 CÍLE PRÁCE

- Ověření metod pro extrakci DNA z čerstvého plodu papáji (*Carica papaya*) a z kandované papáji
- Sledování vlivu inhibitorů real-time PCR na efektivitu reakce
- Ověření spolehlivosti stanovení GMO screeningovými metodami
- Vývoj real-time PCR pro stanovení taxon-specifického genu hrachu setého (*Pisum sativum*)
- Využití vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem pro charakterizaci GM a konvenčních odrůd kukuřice

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 POČÁTKY GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ

Historie geneticky modifikovaných organismů (GMO) sahá do 70. let minulého století a je spojena se vznikem genového inženýrství (GI). Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA *in vitro* (klonování genů a jejich úpravy) a cílené změny genetické informace prováděné *in vivo* (Jähne *et al.*, 1995, Daniell *et al.*, 2002).

GI pracuje s vytvářením pozměněných či nových genů nebo přípravou nových kombinací genů. Ty jsou zaváděny do genomu organismů a jsou tak vytvářeny geneticky modifikované (transgenní) organismy. Na počátku GI stojí experimenty vědecké skupiny amerického biochemika Paula Berga. Jednalo se o využití restričních enzymů a DNA ligázy k vytvoření první rekombinantní DNA molekuly, obsahující DNA opičího viru SV40 a lambda viru (Jackson *et al.*, 1972). Dalším experimentem byla potvrzena možnost přenosu rekombinantní plazmidové DNA s vloženým genem rezistence k antibiotiku kanamycin a tím i přenosu příslušné rezistence do bakterie *Escherichia coli* (Cohen *et al.*, 1973). Takto transformovaná *E. coli* byla prvním zdokumentovaným geneticky modifikovaným organismem, který vzniknul metodou genového inženýrství, tedy s použitím rekombinantní DNA, připravené pomocí restriktáz a plazmidů.

První přímý přenos DNA z jednoho organismu na druhý technikou DNA klonování byl proveden v roce 1973 ve spolupráci dvou amerických vědců, Herberta Boyera a Stanleyho Cohena. S použitím restričního enzymu EcoRI byl ze žáby rodu *Xenopus laevis* (drápatka vodní) získán fragment DNA, kódující 18S a 28S podjednotku ribozomální RNA. Tento fragment byl vložen do bakteriálního vektoru, který byl použit pro transformaci bakterií *E. coli*. Plazmid byl v *E. coli* stabilně replikován v nejméně 100 generacích, bakterie tedy tvořila žabí rDNA, současně docházelo i k její transkripci (Morrow *et al.*, 1974).

Boyer a Cohen své výsledky prezentovali na Gordonské konferenci o nukleových kyselinách, která se konala v roce 1973. Tam poprvé zazněly obavy z možných rizik, které souvisí s novými rekombinantními technikami. Obavy vedly k požadavku na Národní akademii věd, aby byla ustavena pracovní skupina pro posouzení rizika technik založených na rekombinantní DNA.

Byla tedy sestavena jedenáctičlenná skupina vědců z oboru molekulární biologie, jejímž předsedou byl Paul Berg. Zprávu ze svého zasedání skupina publikovala ve formě otevřeného dopisu v červenci roku 1974 (Berg *et al.*, 1974). V dopise vědci žádají pozastavení experimentů s určitými typy DNA rekombinací, dokud nebudou lépe vyhodnocena možná

rizika takové práce nebo dokud nebudou poskytnuty dostatečné bezpečnostní záruky, které by zabránily možnému šíření rekombinantní DNA. Zazněl také návrh na uspořádání konference, která by se riziky a bezpečnostními opatřeními spojenými s rekombinantní DNA zabývala. Tato konference se konala v roce 1975 v kalifornském Asilomaru. Účastnili se jí kromě vědců, především biologů, také odborníci z řad právníků a lékařů. Výsledkem konference byla formulace bezpečnostních zásad pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy. Byla sestavena škála potenciální nebezpečnosti pokusů podle typu možné kontaminace a povahy materiálu (typ DNA, hostitelský organismus), se kterým je experiment prováděn. Ke každému typu rizika bylo uvedeno doporučení pro správnou laboratorní praxi a zavedení nezbytných bezpečnostních prvků. Bylo také ustanoveno moratorium na experimenty s DNA odvozené z vysoce patogenních organismů, s DNA obsahující geny toxinů a na rozsáhlé experimenty (více jak 10 litrů buněčné kultury) s rekombinantní DNA, které by mohly vést k produkci látek potenciálně nebezpečných pro lidi, zvířata i rostliny (Berg *et al.*, 1975). Ohlasy na Asilomarskou konferenci na stránkách odborného i veřejného tisku znamenaly začátek veřejné diskuse o vědě a její závěry jsou považovány za první příklad předběžné opatrnosti v GI. Pokrok v genovém inženýrství se tak stal katalyzátorem pro debatu o kontrole vědy a technologie v širším slova smyslu. Shodné stanovisko NIH (National Institutes of Health) a účastníků Asilomarské konference ale nemělo jiný statut, než dočasná dobrovolná dohoda v rámci vědecké komunity (Drobník, 2008).

Brzy se ukazuje, že GI má v sobě velký finanční potenciál. Na konferenci v americkém Indianopolis v květnu roku 1976, sponzorované firmou Eli Lilly & Co (průmyslový výrobce inzulínu), byl předložen návrh projektu přípravy lidského inzulínu metodou genového inženýrství. Běžně používaný prasečí inzulín se liší od lidského v jedné z 51 aminokyselin a citliví pacienti na to negativně reagují (Patterson *et al.*, 1973, Wiles *et al.*, 1983). Do řešení se pustily tři vědecké skupiny: skupina Waltera Gilberta z Harvardovy univerzity, skupina Herberta Boyera z Kalifornské univerzity v San Francisku, se kterou spolupracoval Arthur Riggs ze City of Hope a skupina Williama Ruttera a Howarda Goodmana. Pro řadu lidí v té době představovala práce s rekombinantní DNA obrovské riziko, všechny pracovní skupiny se tedy od počátku musely potýkat s byrokratickým tlakem i s tlakem veřejnosti. Nejlépe se s nastalou situací vypořádala skupina Herberta Boyera (pod hlavičkou firmy Genentech), která připravila gen lidského inzulínu chemickou syntézou polynukleotidů. Z legislativního hlediska nešlo o gen, ale o chemikálii, sloučenina tedy nepodléhala žádným bezpečnostním regulím vztahujícím se k rekombinantní DNA. Akcie firmy Genentech se v roce 1980 dostaly na burzu a během jednoho dne se jejich cena zdvojnásobila a z obou zakladatelů firmy,

Herberta Boyera a Roberta Swansona, se stali milionáři. Úspěch firmy Genentech pomohl rozvoji biotechnologických firem. Nový biotechnologický průmysl začal mít vliv na politiku a skrze ně také na veřejné mínění. Hnací silou racionálnějšího přístupu k novým biotechnologiím se tak stal ekonomický prospěch. Důsledkem byl i tlak na zmírnění byrokratických regulací (Dunlop, 2000, Drobník, 2008).

3.2 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ROSTLINY

Historie geneticky modifikovaných rostlin je spojena s půdní bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Virulentní kmeny *A. tumefaciens* a jejich schopnost tvořit na rostlinách nádory byly předmětem studia Ivo Zaenena na Univerzitě v Gentu. Objevil v nich velký plazmid, který nebyl přítomen v nevirulentních kmenech bakterie. Tento Ti plazmid (tumor-inducing) totiž nese informaci nezbytnou pro vývoj nádorů (Zaenen *et al.*, 1974). Možnost zavedení genetických modifikací do rostlin s využitím půdní bakterie *A. tumefaciens* a jejího Ti plazmidu se tak dostala do popředí zájmu (Kleinhofs a Behki, 1977, Drummond a Chilton, 1978, Chilton, 1979). Americká mikrobioložka Mary-Dell Chiltonová jako první prokázala přítomnost části DNA Ti plazmidu *A. tumefaciens* v jaderné DNA nádorů odnožovacích uzlů rostlin (Chilton *et al.*, 1977). Další výzkum ukázal, že geny zodpovědné za vývoj rostlinných nádorů, mohou být z Ti plazmidu odebrány, aniž by byla ovlivněna schopnost jeho integrace do rostlinného genomu (Chilton *et al.*, 1982).

V roce 1983 publikovaly své výsledky genetické transformace rostlin pomocí Ti plazmidu bakterie *A. tumefaciens* nezávisle na sobě čtyři výzkumné skupiny. Za první GM rostlinu bývá považován tabák, do kterého byl vnesen gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycin (Bevan *et al.*, 1983). Pro transformaci byla pak kromě tabáku použita i petúnie, slunečnice, mrkev a fazol (Herrera-Estrella *et al.*, 1983, Fraley *et al.*, 1983, Murai *et al.*, 1983).

Kromě nepřímých metod transformace, které pro přenos DNA využívají vektor (např. již zmíněný Ti plazmid *A. tumefaciens* nebo Ri plazmid *A. rhizogenes*), se začaly používat i přímé metody transformace. Ty jsou založeny na mechanickém, chemickém nebo elektro-fyzikálním přenosu DNA do jádra hostitelského organismu. Pro přímou transformaci je nejčastěji využívána biolistická metoda s použitím tzv. genové pistole. DNA je v tomto případě navázána na mikročástice vzácného kovu, které jsou nastřeleny do rostlinných pletiv. Mikročástice tak překonají buněčné stěny a dostanou se až do chromozomu. Nepřímé metody transformace pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* ani přímé metody transformace však neumožňují cílený přenos vnášené DNA do určitého místa na chromozomu. Místo integrace DNA vnesené do hostitelského genomu je nutno zpětně dohledat.

První GM plodinou, která byla komerčně pěstována a určena pro konzumaci, bylo rajské jablko Flavr Savr. Flavr Savr bylo připraveno transformací pomocí *A. tumefaciens*. Vložení antisence-genu byl u něj deaktivován gen pro produkci polygalakturonázy, která štěpí pektin zodpovědný za měknutí plodů. Plody méně měkly a pomaleji podléhaly hnití. Flavr Savr bylo vyvinuto kalifornskou firmou Calgene, která v roce 1992 podala žádost o licenci pro potravinářské využití k federálnímu úřadu U.S. Food and Drug Administration (FDA). V roce 1994 FDA o žádosti kladně rozhodla, rajské jablko Flavr Savr, použitý selekční marker gen *kanamycin* i jeho produkt, aminoglykosid 3'-fosfotransferáza II, byly vyhodnoceny jako bezpečné. Na trhu v USA (od roku 1994), Kanadě (od roku 1995), Mexiku (od roku 1995) a Japonsku (od roku 1997) byla rajská jablka k dostání až do roku 1997, kdy byla jejich produkce ukončena jako nerentabilní (Redenbaugh *et al.*, 1994, Kärenlampi, 1996).

Na evropský trh se obdobná GM rajčata dostala v roce 1996. Byla vyvinuta firmou Zeneca a do Velké Británie se dovážela již ve formě konečného produktu, kterým byl rajský protlak. Na obalu bylo vyznačeno, že výrobek obsahuje GMO. Díky nižším nákladům na výrobu byla cena protlaku z GM rajčat o 20 % nižší než u protlaku z konvenčních plodů. Na trhu byl tento výrobek do roku 1999, kdy došlo k významnému poklesu prodeje z důvodu změny veřejného vnímání GM plodin (Bruening a Lyons, 2000).

Cílovou skupinou pro vývoj dalších GMO již nebyli konzumenti, ale producenti zemědělských výrobků, kteří představují vyšší kupní sílu. Vznikaly tak GM plodiny tolerantní vůči herbicidům a plodiny rezistentní vůči hmyzím škůdcům (Halford, 2003, Halford, 2006).

Na evropský trh vstupuje v roce 1996 Roundup Ready sója (vyvinutá firmou Monsanto), tolerantní vůči širokospektrálnímu herbicidu glyfosátu (Halford, 2003) a kukuřice Bt176 (vyvinutá firmou Syngenta), rezistentní vůči hmyzím škůdcům (Brookes, 2002).

S vývojem a zlepšováním technik genetických modifikací, které se staly rutinními, se rozšiřovala paleta GM rostlinných druhů (Moeller a Wang, 2008, Wang *et al.*, 2011). Rostoucí kvalita GM plodin měla také pozitivní dopad na příjmy zemědělců díky zlepšené efektivitě a produktivitě pěstování (Brookes a Barfoot, 2012). Plocha osázená GM plodinami celosvětově roste. Ze 170,3 milionů hektarů, na kterých byly pěstovány GM plodiny v roce 2012, vzrostla jejich plocha do roku 2013 o 3 % na 175,2 milionů hektarů. Celkový nárůst plochy osázené GM plodinami od roku 1996 (1,7 milionů hektarů) do roku 2013 (175,2 milionů hektarů) je více než stonásobný. Evropa přitom představuje pouhý zlomek této plochy, navíc zde v poslední době rozvoj pěstování GM plodin spíše stagnuje. V roce 2007 nastal pokles, který trval do roku 2010, od té doby můžeme každoročně sledovat, jak plocha osázená GM plodinami mírně roste. V roce 2013 byla jedinou komerčně pěstovanou GM

plodinou v Evropě kukuřice MON810, která byla vyseta na ploše 148 013 hektarů. Nejvíce se pěstovala ve Španělsku (136 962 hektarů), zbylá plocha náleží Portugalsku, České republice, Slovensku a Rumunsku (James, 2012, 2013).

3.3 VÝVOJ LEGISLATIVY PRO NAKLÁDÁNÍ S GMO

V reakci na prvotní obavy z možného nebezpečí rekombinantní DNA byly v obou komorách Kongresu USA v letech 1976-1977 připraveny zákony o regulaci rekombinantní DNA. Ve stejné době NIH zřídil komisi NIH RAC (NIH Recombinant DNA Advisory Committee), která měla za úkol vytvořit pravidla pro vedení výzkumu s použitím rekombinantní DNA. První verze těchto pravidel byla připravena 23. června 1976 a k jejímu zveřejnění ve *Federálním registru* došlo 7. července 1976 (Cantley *et al.*, 1995, Drobník, 2008, McHughen a Smyth, 2008). Vývoj legislativních norem v USA postupoval směrem k hodnocení organismu podle jeho vlastností a ne podle způsobu jejich dosažení. Tento přístup, kdy nejsou hodnoceny techniky přípravy, ale zamýšlené použití produktu, umožnil příslušným autoritám využití stávajících zákonů, které tak byly dostačující i pro zvládnutí novinek, jako byly genetické modifikace (Dunlop, 2000).

Konzistentní zaměření US autorit na produkt bylo podporováno tlakem vědecké loby i biotechnologického průmyslu. Tato organizovanost pomohla novým biotechnologickým technikám ubránit se mnohým veřejným i politickým tlakům (Cantley, 1995, Dunlop, 2000).

V Evropě byl počáteční přístup ke genovému inženýrství uvolněnější než v USA. Situace zde byla také proto, že se zde podobné experimenty nedělaly (Swarna Latha, 2007).

Na zámořské obavy z rekombinantních technik reagoval *Research Council* ve Velké Británii, když nařídil moratorium na specifickou práci s rekombinantní DNA, stejně jako tomu bylo v USA. Současně koncem roku 1974 vznikla pracovní skupina, kterou vedl botanik Eric Ashby. Ashbyho skupina doporučila pokračování práce s rekombinantní DNA za předpokladu splnění základních bezpečnostních opatření. Zejména šlo o zajištění biologických bariér, které zabrání přežití geneticky modifikovaného organismu v přirozeném prostředí. Skupina také žádala o jmenování poradního sboru, který by vypracoval normu pro práci s rekombinantní DNA. Další tým, vedený Robertem Williamsem, tento požadavek zpracoval, což vedlo k vytvoření Genetic Manipulation Advisory Group (GMAG). GMAG měla posuzovat návrhy na práci zahrnující konstrukce geneticky modifikovaných organismů. Její fungování bylo paralelou americké NIH RAC (Williamson, 1979, Wright, 1994, Swarna Latha, 2007).

Jednotlivé státy Evropského společenství měly v prvních letech vzniku GI samostatné směrnice pro práci s rekombinantní DNA. Jejich sestavení vycházelo ze závěrů několika

orgánů ES, např. Evropské vědecké nadace (ESF) nebo Evropské molekulárně-biologické organizace (EMBO).

Ve společné agendě Evropského hospodářského společenství (European Economic Community – EEC) se věda a technologie objevuje začátkem roku 1974. V roce 1978 je rozhodnutím Rady založen výzkumný program FAST (Forecasting and Assessment in Science and Technology), který měl přispět k vymezení cílů dlouhodobého výzkumu a vývoje Společenství a tím k formulaci ucelené politiky vědy a technologie v dlouhodobém horizontu. Obsahoval sub-program Bio-society, který byl zodpovědný za strategický vývoj biotechnologie a přírodních věd, jejich aplikace a potenciálních dopadů s časovým rozpětím následujících třiceti let. V roce 1978 bylo ředitelstvím Komise pro vědu a technologie (DG XII) navrženo, aby byla vypracována první směrnice, vztahující se k rekombinantní DNA. Šlo by o povinnost registrace a zisku povolení pro práci s určitou rekombinantní DNA na národní úrovni členského státu. Kategorizace nebezpečí a stupeň omezení práce s takovou DNA by pak byl plně v pravomoci daného státu. Směrnice by také obsahovala požadavek na harmonizaci legislativních norem pro práci s rekombinantní DNA v rámci jednotlivých států společenství (Commission of the European Communities, 1980, Aguilar *et al.*, 2013).

Revize směrnice měly být dokončeny maximálně do dvou let. Její potřeba však byla v roce 1979 Ekonomickým a sociálním výborem Komise zpochybněna. Vzhledem k nárůstu zkušeností týkajících se práce s GMO považoval výbor riziko práce s nimi za klesající a prvotní obavy za poněkud přehnané. Výsledkem nakonec bylo, že místo směrnice byl návrh nahrazen v roce 1982 pouze doporučením (Doporučení Rady č. 82/472/EHS), které je nezávazné a jeho plnění není vymahatelné (Patterson, 1999, Dunlop, 2000, Drobník, 2008). Politika, která byla k využívání biotechnologie a GMO otevřená, panovala v Evropské komisi do poloviny 80. let dvacátého století.

V roce 1985 probíhala v Evropském parlamentu diskuse o Biotechnologickém akčním programu (Biotechnology Action Programme 1985-1989 – BAP), který poprvé zaměřoval systematickou pozornost na hodnocení rizika (European Commission, 1984). Program byl sice přijat, ale jeho projednávání iniciovalo přípravu vlastní zprávy Evropského parlamentu. V roce 1987 vznikla zpráva pod taktovkou nizozemské poslankyně Phili Viehoff. Po projednání v parlamentních výborech je zpráva poslankyně Viehoff zformulována do Rozhodnutí o biotechnologii v Evropě a potřebě politiky integrace (Resolution on Biotechnology, 1987). Rozhodnutí uznává potenciál nových směrů biotechnologie, ale současně požaduje např., aby byly zhodnoceny jejich sociální, etické, ekonomické, ekologické, zdravotnické a právní aspekty. Obsahuje také poznámku, že vzhledem

k nedostatečné zkušenosti s úlohou DNA by bylo extrémně nebezpečné a nezodpovědné uspěchat komerční realizace biotechnologických procesů vzhledem ke složitosti struktur, organismů a ekosystémů, které by mohly být ovlivněny. Dále je v rozhodnutí zmíněno, že dosud nejsou k dispozici spolehlivé vědecké metody odhadu střednědobých a dlouhodobých účinků uvádění GMO do prostředí. Pro minimalizaci rizika požaduje rozhodnutí vznik nové legislativy. Zde je již vidět změna politického kurzu v Evropském parlamentu (Dunlop, 2000, Patterson a Josling, 2002). Tímto byla v podstatě odmítnuta mezinárodní dohoda, formulovaná ve zprávě OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) z roku 1986 s názvem Recombinant DNA Safety Consideration (Posouzení bezpečnosti rekombinantní DNA, známé též jako „modrá kniha“). Tento dokument se naopak brání regulačnímu přístupu k rekombinantní DNA.

V roce 1990 vstupuje v platnost Směrnice 90/220/EHC, o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí. Podle této Směrnice byly na Evropský trh v roce 1996 uvedeny dva GM produkty – Roundup Ready sója a kukuřice Bt176 (König *et al.*, 2004a). Následovaly další institucionální a legislativní změny. V roce 1997 bylo založeno Generální ředitelství pro zdraví a ochranu spotřebitele (European Commission Directorate General for Health and Consumer Protection – DG SANCO), které má v členských státech EU kontrolovat potravinovou bezpečnost, shodu legislativy v oblasti potravinové bezpečnosti a dohlížet na implementaci veterinární, rostlinolékařské a potravinářské legislativy.

Na uvádění GM plodin a z nich odvozených produktů na Evropský trh reaguje Evropská komise další legislativní normou. V roce 1997 je schváleno Nařízení (ES) č. 258/97, o nových potravinách a nových složkách potravin, podle kterého musí být produkty obsahující GMO značeny, jestliže se v zásadě liší od konvenčního produktu. Uvedení GM rajského protlaku o rok dříve je s tímto nařízením v souladu, protože na produktu byla informace o použití GM rajčat uvedena.

V roce 1998 vstupuje v platnost speciální legislativní norma, Nařízení (ES) č. 1139/98, o povinném uvádění údajů, které nejsou stanoveny ve směrnici 79/112/EHS, při označování určitých potravin vyrobených z geneticky modifikovaných organismů. V Nařízení jsou jako GMO konkrétně uvedeny GM sója Roundup Ready a GM kukuřice Bt176. Norma doplňuje Směrnici 90/220/EHS, která jmenovitě neřeší neživé (non-viable) produkty odvozené od GMO. Povinnost značení se týká výrobků, ve kterých může být detekován protein nebo DNA pocházející z GMO. V normě je současně uvedeno, že by měla být stanovena jasná pravidla pro označování GMO produktů, která by umožnila úřední dozor. Také by měly být vyvinuty

validované zkušební metody, a protože nelze vyloučit možnost kontaminace výrobku, měla by být také stanovena prahová hodnota pro detekci GMO (Bonfini *et al.* 2002).

V červnu roku 1999 vyhlásilo pět států Společenství (Dánsko, Řecko, Itálie, Francie a Lucembursko), že v souladu se zásadou předběžné opatrnosti by mělo být pozastaveno schvalování dalších GMO, dokud nebudou přijata jasná a přesná pravidla, která stanoví také zásady pro sledovatelnost GMO. Tím bylo *de facto* vyhlášeno moratorium na schvalování nových GMO. Moratorium vedlo k přípravě nových legislativních norem, které měly za cíl vytvořit jasná pravidla pro nakládání s GMO a definovat podmínky sledovatelnosti (Lhereux *et al.*, 2003, Thorpe a Robinson, 2004, König *et al.*, 2004b).

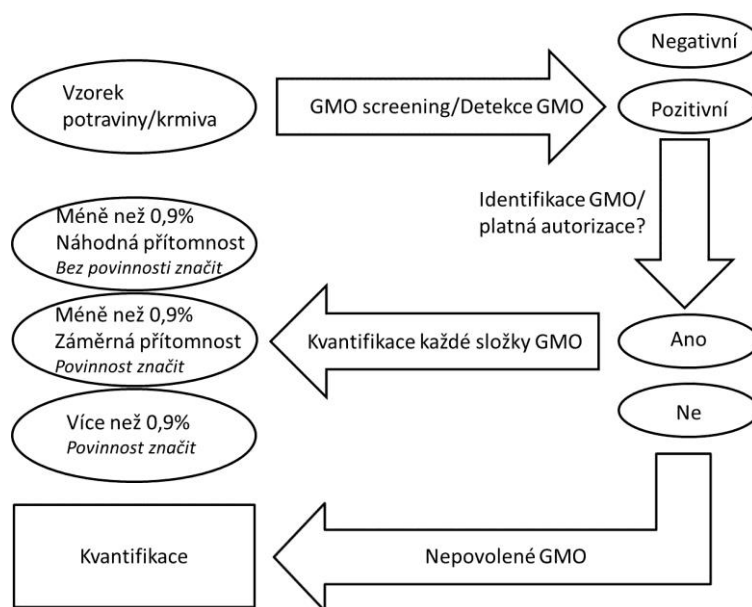
V roce 2000 bylo schváleno Nařízení (ES) č. 49/2000, kterým se mění nařízení Rady (ES) č. 1139/98. V Nařízení (ES) č. 49/2000 je stanovena hranice pro označování určitých potravin vyrobených z geneticky modifikovaných organismů na hodnotu 1% obsahu GM materiálu (bílkoviny nebo DNA) na pozadí konvenční složky produktu. V případě překročení této hranice musí být produkt označen, že obsahuje GMO. Při obsahu GMO pod 1 % není značení nutné, pokud je příměs GMO v produktu náhodná.

V roce 2001 je přijata Směrnice Evropského parlamentu a rady 2001/18/ES, o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí a o zrušení směrnice Rady 90/220/EHS. V tomto dokumentu je uvedena definice GMO, podle které je GMO organismus, s výjimkou lidských bytostí, jehož genetický materiál byl změněn způsobem nedosažitelným přirozenou cestou pářením ani přirozenou rekombinací. Za organismus je v tomto případě považována biologická entita schopná rozmnožování nebo přenosu genetického materiálu. Techniky, které vedou ke vzniku GMO, zahrnují rekombinace nukleové kyseliny spočívající ve vytváření nových kombinací genetického materiálu vkládáním molekul nukleové kyseliny připravené různými způsoby vně organismu do virů, bakteriálních plazmidů nebo jiných vektorových systémů a jejich zabudování do hostitelského organismu, ve kterém se přirozeně nevyskytují, ale jsou v něm schopny pokračujícího množení. Dále to jsou techniky, které spočívají v přímém zavedení genetického materiálu připraveného vně organismu do organismu. Tyto techniky zahrnují mikroinjekci, makroinjekci a mikroenkapsulaci a ke vzniku GMO vede i buněčná fúze (včetně fúze protoplastů) nebo hybridizační techniky, při nichž jsou fúzí dvou nebo více buněk vytvářeny živé buňky s novými kombinacemi dědičného genetického materiálu cestami, které se v přírodních podmínkách nevyskytují.

Směrnice obsahuje také výčet technik, jejichž použití ke vzniku GMO nevede, pokud pracovní postup nezahrnuje použití rekombinantních molekul nebo GMO. Mezi tyto techniky

patří oplodnění *in vitro*, konjugace, transdukce, transformace nebo jiné obdobné přirozené procesy a indukce polyplodie. Ve Směrnici jsou uvedeny i metody genetické modifikace, jejichž výsledkem jsou organismy, na které se tato směrnice nevztahuje, pokud nezahrnují použití rekombinantních molekul nukleové kyseliny nebo GMO. Těmito technikami jsou mutagenese a buněčná fúze (včetně fúze protoplastů) rostlinných buněk organismů, u nichž může být výměny genetického materiálu dosaženo tradičními šlechtitelskými metodami (Directive 2001/18/EC).

V roce 2002 vzniká Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority – EFSA). Ten má za úkol poskytovat nezávislá vědecká stanoviska a být vědeckou a technickou podporou EU v oblastech, které mají vztah k bezpečnosti potravin a krmiv. Konečně roku 2003 jsou přijata požadovaná nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech, a 1830/2003, o sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z geneticky modifikovaných organismů a o změně směrnice 2001/18/ES. Podle těchto nových směrnic je pak hranice pro označování obsahu podílu složky/složek GMO ve výrobku vyšší než 0,9 %. Náhodné příměsi GMO, jejichž přítomnosti nešlo technicky zabránit, povinnosti značení nepodléhají. Schéma postupu při analýze GMO je uvedeno na Obrázku 1.



Obrázek 1. Příklad postupu analýzy GMO v souladu s Nařízením (ES) č. 1830/2003.

Tato legislativa také stanovuje povinnosti dovozců, zpracovatelů a prodejců GMO pro uvádění schválených GMO na trh i pro jejich sledovatelnost. Tím byl poskytnut základní

rámec pro proces schvalování GM potravin a krmiv. Schvalovací proces je založen na hodnocení rizika a zodpovídá za něj EFSA.

Legislativní procesy upravující nakládání s GMO ale neustaly. V poslední době jsou aktuální diskuse na téma nových technik šlechtění, jako je metoda zinkových prstů, oligonukleotidy řízená mutace, cisgenoze a intragenoze, RNA řízená metylace DNA, roubování GM podnože, reverzní šlechtění, agro-infiltrace nebo syntetická genomika. Rostliny získané některými z těchto nových šlechtitelských technik jsou v rámci EU již v polních pokusech a řada z nich se již blíží komercializaci. Kompetentní autority tedy zadaly úkol vypracovat vědecké stanovisko pro hodnocení specifických aspektů při používání těchto technik, jako je rozsah změny původního rostlinného genomu a reálná možnost její detekce. Důležitá je také otázka, zda výsledný organismus spadá do oblasti působnosti právních předpisů o GMO, tak jak je to uvedeno ve Směrnici č. 2001/18/ES (Directive 2001/18/EC, Lusser *et al.*, 2011, Devos *et al.*, 2014).

V roce 2011 obdržela EFSA požadavek od Evropské komise na vyřešení dvou otázek spojených s novými technikami šlechtění. Za prvé, zda je potřeba vytvoření nových směrnic, případně zda mají být stávající směrnice aktualizovány pro tyto nové techniky šlechtění. Druhá otázka se týkala posouzení rizika, které by nové techniky šlechtění mohly představovat z hlediska dopadů na člověka, zvířata a životní prostředí, a to bez ohledu na to, zda budou spadat do GMO legislativy. EFSA poskytla zatím hodnocení pro techniky zinkových prstů, cisgenoze a intragenoze. Podle GMO Panelu EFSA jsou techniky zinkových prstů a cisgenoze co do svého rizika srovnatelné s konvenčním šlechtěním. Naproti tomu intragenoze může vést, obdobně jako transgenoze, ke vzniku nového rizika. V případě techniky zinkových prstů, nebo obecně techniky místně-řízené nukleázy 3 (site-directed nuclease 3 – SDN-3) je uvedena poznámka, že se z hlediska svých možností pro vnášení genů tato technika nijak neliší od jiných momentálně používaných GM technik.

Míra rizika dopadů těchto nových technik na zdraví lidí, zvířat a na životní prostředí závisí na expozici, tzn. například na rozsahu pěstování daných rostlin nebo na množství konzumace z nich odvozených potravin nebo krmiv. V případě rozhodnutí, že se produkty těchto hodnocených technik šlechtění budou považovat za GMO, je pro ně plně aplikovatelná stávající legislativa. Naopak je možné, že bude v závislosti na konkrétním případě potřeba méně specifických údajů pro posuzování jejich rizika (EFSA, 2012a, EFSA, 2012b, Devos *et al.*, 2014).

Vývoj a směřování další legislativy, aktuálně upravující nové biotechnologické techniky šlechtění, je tedy něco, co nás v blízké budoucnosti čeká. A přestože si EFSA v průběhu let ve

vědeckém hodnocení GMO vydobyla prominentní roli, neznamená to, že by její strategie posuzování rizik a následné vědecké poradenství byly jednotně přijímány všemi členskými státy a zainteresovanými stranami (Devos *et al.*, 2014).

3.4 LEGISLATIVNÍ NORMY PRO NAKLÁDÁNÍ S GMO V ČR

Legislativně vychází Česká republika z platných právních předpisů EU, protože nakládání s GMO a jejich produkty je součástí společné politiky EU. Stěžejními právními předpisy v ČR je zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů (novelizace zákonem č. 346/2005 Sb.) a zákon č. 252/1997 Sb., o zemědělství, ve znění pozdějších předpisů (novelizace zákony č. 441/2005 Sb. a č. 291/2009 Sb.).

Prováděcím předpisem k zákonu č. 78/2004 Sb je vyhláška č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů. Ta byla v roce 2010 novelizována vyhláškou č. 29/2010 Sb. Prováděcím předpisem k zákonu č. 252/1997 Sb. je pak vyhláška č. 86/2006 Sb., o bližších podmínkách pěstování geneticky modifikované odrůdy, ve znění vyhlášky č. 58/2010 Sb.

Přímo aplikovatelné právní předpisy EU, které se týkají GMO, jsou Nařízení (ES) č. 1829/2003, o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech, v platném znění, Nařízení (ES) č. 1830/2003, o sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z geneticky modifikovaných organismů a o změně směrnice 2001/18/ES, v platném znění, a Nařízení (ES) č. 1946/2003, o přeshraničních pohybech geneticky modifikovaných organismů.

Nařízení č. 1829/2003 se týká schvalování GM potravin a krmiv i plodin pro účely pěstování a označování GM potravin a krmiv. Hlavní kompetence v tomto případě náleží Odboru bezpečnosti potravin MZe ČR.

Nařízení č. 1830/2003 řeší systém označování a sledovatelnosti GMO a hlavní kompetence i v tomto případě náleží Odboru bezpečnosti potravin MZe ČR.

Nařízením č. 1946/2003 se řídí problematika GMO ve vztahu k třetím zemím, jako jsou dovozy a vývozy mimo EU. Toto nařízení přejímá Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti, který je v platnosti od září 2003. Protokol navíc umožňuje jednostranné odmítnutí GMO, panují-li vědecké nejistoty o jejich bezpečnosti (Trnková *et al.*, 2014).

3.5 DOHLED NAD NAKLÁDÁNÍM S GMO

Pro účinnou kontrolu nakládání s GM plodinami a odvozenými produkty v souladu s Evropskou legislativou (především formulovanou v Nařízeních (EC) č. 1829/2003 a č. 1830/2003) bylo nutné nominovat laboratoře, které budou dohled vykonávat. Práce těchto laboratoří pak musí být standardizována, stejně tak jako analytické metody, které budou v kontrolních postupech aplikovány (Bonfini *et al.* 2002).

Poskytování cílené vědecké a technické podpory v souvislosti s implementací politiky Evropské unie, nezávisle na komerčních a národních zájmech, má za úkol generální ředitelství Evropské komise s názvem Společné výzkumné centrum (Joint Research Centre – JRC). Široké pole působnosti JRC zahrnuje i problematiku GMO. JRC je tvořeno sedmi vědeckými institucemi, rozmístěnými v Belgii, Německu, Itálii, Nizozemsku a Španělsku. GMO se přímo týkají dvě pracoviště. Institut pro referenční materiály a měření (Institute for Reference Materials and Measurements – IRMM) v Belgickém Geelu, který je zodpovědný za tvorbu a distribuci referenčních materiálů pro zajištění kvality testovacích laboratoří, včetně těch pro analýzu GMO. V Italské Ispře sídlí Institut pro zdraví a ochranu spotřebitelů (Institute for Health and Consumer Protection – IHCP), který se kromě jiného zabývá ochranou a zdravím spotřebitelů v souvislosti s GMO v potravinách a krmivech. V rámci IHCP je pak zřízena Evropská referenční laboratoř pro GM potraviny a krmiva (European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed – EU-RL GMFF). EU-RL GMFF stojí legislativně na Nařízení (ES) č. 1829/2003, Nařízení (ES) č. 882/2004, o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat, Nařízení (ES) č. 1981/2006, o prováděcích pravidlech k článku 32 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 týkajícímu se referenční laboratoře Společenství pro geneticky modifikované organismy, a Nařízení (ES) č. 641/2004, o prováděcích pravidlech k nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003, pokud jde o žádosti o povolení nových geneticky modifikovaných potravin a krmiv, o oznámení stávajících produktů a o náhodnou nebo technicky nevyhnutelnou přítomnost geneticky modifikovaného materiálu s příznivým hodnocením rizika.

Mezi úkoly EU-RL GMFF patří vědecké posuzování a validace metod pro detekci GMO potravin a krmiv v rámci povolovacího řízení v EU a koordinace Národních referenčních laboratoří pro GMO (National Reference Laboratories – NRLs), které vykonávají kontroly GMO na národních úrovních. Činnost NRLs je dále propojena v rámci Sítě evropských

laboratoří pro identifikaci GMO (European Network of GMO Laboratories – ENGL). NRLs sdružené v síti ENGL jsou přitom nápomocny EU-RL GMFF. Hlavní náplň EU-RL GMFF tedy spočívá v činnostech spojených s agendou během přihlašování nových GM potravin či krmiv na území EU, jako je ověření sekvence i umístění vloženého úseku DNA do hostitelského genomu, hodnocení informací o nových GMO a účelnosti testování provedených žadatelem, testování a validace metody pro detekci nového GMO, a konečně i předání zprávy o hodnocení k rukám EFSA. Dále má EU-RL GMFF za úkol uchovávat, připravovat a distribuovat kontrolní vzorky (pozitivní i negativní) pro členy sítě ENGL, případně i pro další NRLs. EU-RL GMFF také poskytuje NRLs analytické referenční metody, koordinuje jejich používání, organizuje testy způsobilosti pro NRLs, vede tréninkové kurzy pro členy NRLs i další zájemce, poskytuje Evropské komisi vědeckou i technickou výpomoc v případech nutnosti rozhodčích analýz a dále spolupracuje s laboratořemi třetího světa při analýzách potravin a krmiv. Z tohoto výčtu je zřejmé, že rozsah činností EU-RL GMFF je široký.

Během validačních studií při zavádění nových analytických metod pro detekci a kvantifikaci GMO spolupracuje EU-RL GMFF s laboratořemi sítě ENGL. Cílem validace je vyhodnocení výkonnostních charakteristik a limitů těchto metod (Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, 2010). K účasti ve validační studii se laboratoř ze sítě ENGL musí přihlásit, do studie je pak náhodně vybráno většinou 12-15 laboratoří. Organizace validační studie, distribuce protokolů, vzorků, shromažďování výsledků i jejich vyhodnocení je úkolem EU-RL GMFF. Je-li výsledek validační studie vyhodnocen jako vyhovující, tzn. výkonnostní charakteristiky splnily podmínky nastavené před započítáním validační studie, je analytická metoda vyhodnocena jako vyhovující svému účelu a může být zveřejněna.

Činnosti NRLs, které souvisí s GMO detekcí pro oficiální účely, musí probíhat podle mezinárodních ISO norem. To ukládá NRLs povinnost akreditovat se podle EN ISO/IEC 17025:2005. Z toho vyplývá, že i používaná zařízení by měla být kalibrována a validovaná a veškerá práce by měla probíhat podle předem daných, schválených schémat (Žel *et al.*, 2012). NRLs mají také v souladu s EN ISO/IEC 17025:2005 povinnost prokazovat svou způsobilost pro vykonávanou činnost účastí v testech způsobilosti. Povinnost pro nominované NRLs účastnit se testů způsobilosti organizovanými EU-RL GMFF je navíc zakotvena v Nařízeních (ES) č. 1829/2003 a 882/2004. Je tedy vidět, že kontrolní činnost NRLs zahrnuje kromě vlastní analýzy obsahu GMO v potravinách, odvozených produktech a krmivech, také další agendu, spojenou se zajištěním a udržením akreditace a povinnostmi vůči EU-RL GMFF.

3.6 KRITICKÉ BODY STANOVENÍ GMO V POTRAVINÁCH A KRMIVECH

Hlavním cílem standardizovaných postupů kontroly obsahu GMO v potravinách a krmivech je zajistit reprezentativnost stanovení. Postup analýzy lze zjednodušeně rozdělit na čtyři základní kroky: vzorkování, laboratorní zpracování analytu, analýza obsahu GMO a interpretace výsledků (Querci *et al.*, 2007, Žel *et al.*, 2012).

Vzorkování je jedním z nejkritičtějších kroků při stanovení GMO v potravinách a krmivech. Volbu strategie vzorkování GMO v potravinách a krmivech je nutné přizpůsobit danému účelu, přičemž chybně provedené vzorkování nebo nesprávně zvolená metoda vzorkování může konečný výsledek analýzy významně ovlivnit (Kobilinsky *et al.*, 2005, Onori *et al.*, 2012). Strategii vzorkování udává Doporučení (ES) č. 2004/787/2003 a mezinárodní technická norma CEN/TS 15568:2006.

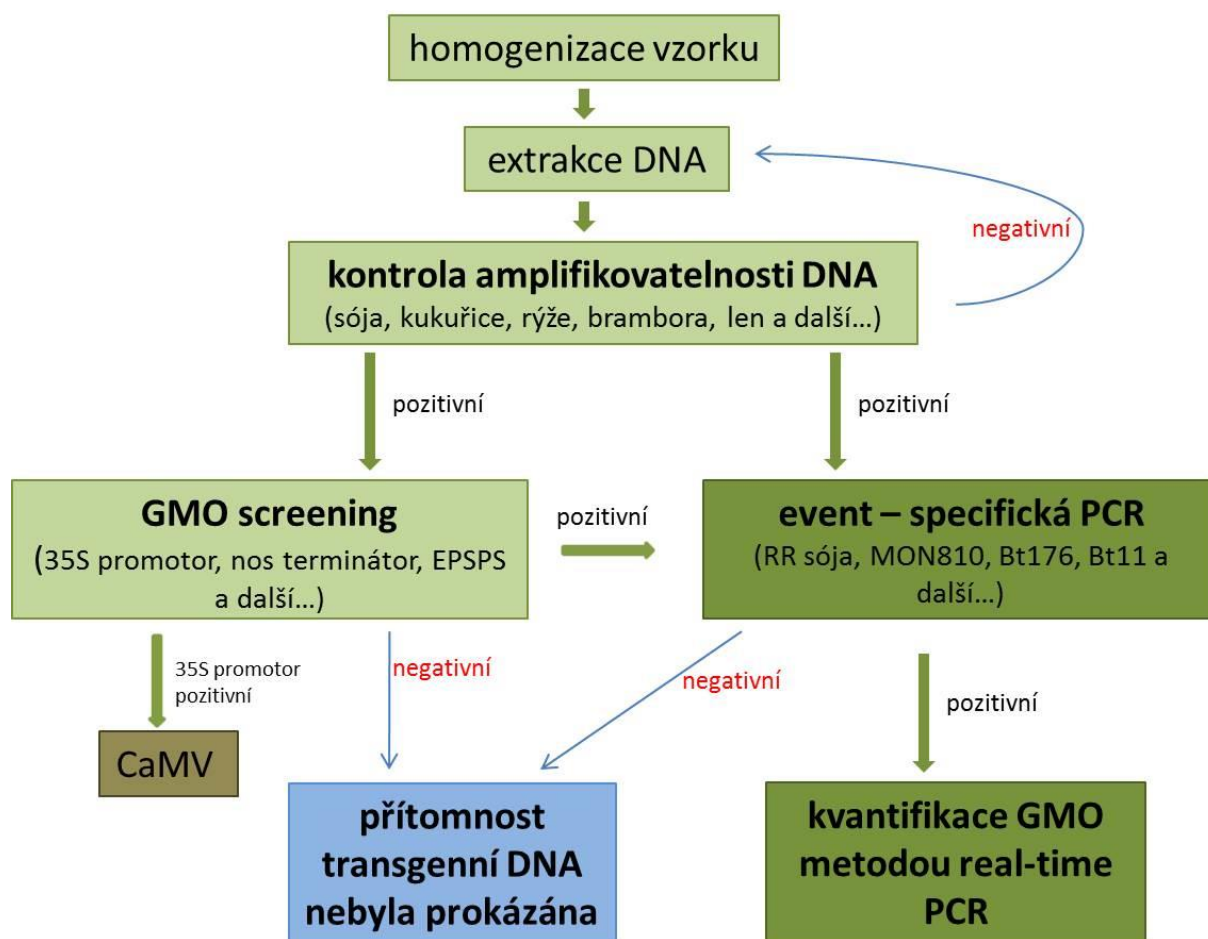
Sběr vzorků, a tím i vzorkování, většinou spadá do kompetence jiných složek státní správy, než je jmenovaná NRL pro detekci GMO v rostlinách a odvozených produktech. Většina NRL tedy sama vzorkování neprovádí. V samotné laboratoři se ale provádí laboratorní zpracování analytu, kterým je většinou homogenizace vzorku. Dokonalá homogenizace je velmi významná pro dostatečnou efektivitu extrakce DNA, stejně tak jako pro zajištění rovnoměrné distribuce částic odvozených z GMO v rámci konečné velikosti vzorků, ze kterých extrakce DNA probíhá (Žel *et al.* 2012).

Pro analýzu přítomnosti GMO v konvenčních plodinách a odvozených produktech se používají dva základní přístupy. První možností je detekce nových úseků DNA, které byly vloženy do hostitelského genomu. Druhou možností je detekce nového proteinu, který může být syntetizován vloženým genem, příp. geny (Quercy, 2004, Marmimoli *et al.*, 2008).

Pro oba typy analýz existují validované metody a jejich použití má oporu v příslušných ISO normách. Při detekci bílkovin se postupuje podle EN ISO 21572:2004. Je-li analytem DNA, postupuje se v souladu s EN ISO 21571:2005, ve které jsou uvedeny metody extrakce DNA a jejich aplikace. Kvalitativní stanovení DNA, která je charakteristická pro dané případy GMO se řídí podle normy EN ISO 21569:2005. Kvantitativní stanovení GMO metodou real-time PCR probíhá podle normy EN ISO 21570:2005.

Znalost a využívání metod uvedených v ISO normách, dodržování stanovených pracovních postupů a dodržování návaznosti jednotlivých kroků analýzy, to je základem správné laboratorní praxe při stanovení GMO. Je to také jedna z podmínek pro to, aby mohla být příslušná laboratoř pro analýzu GMO v potravinách a krmivech akreditována. Na Obrázku 2

je uveden příklad rozhodovacího schématu, podle kterého je řízena posloupnost analýzy vzorku na přítomnost GMO v NRL pro detekci GMO a DNA fingerprinting při VÚRV, v.v.i.



Obrázek 2. Rozhodovací schéma postupu analýzy při stanovení GMO v NRL pro detekci GMO a DNA fingerprinting při VÚRV, v.v.i.

3.6.1 DETEKCE BÍLKOVINNÉHO PRODUKTU

Analytické metody, založené na detekci nového proteinu, lze aplikovat pouze na čerstvé a nezpracované potraviny či krmiva. Pro úspěšnou detekci je totiž nezbytné, aby vzorek obsahoval intaktní protein s neporušenou terciální či kvartérní strukturou (Lin *et al.*, 2006). Navíc detekce transgenního proteinu neumožňuje rozlišení mezi různými GM plodinami, které obsahují stejný transgenní konstrukt. Jednoznačná identifikace GMO je přitom podmínkou sledovatelnosti GMO (Broeders *et al.*, 2012). Další omezení této metody je dáno tím, že ne každá genetická modifikace musí nutně vést k produkci nového proteinu (Terada *et al.*, 2002). A je-li nový protein produkován, může k jeho expresi docházet jen ve specifických tkáních nebo pouze v určitých fázích vývoje rostliny (Benfey *et al.*, 1990, Kehr, 2001).

Hladina exprese transgenního produktu v GM rostlinách se většinou pohybuje v rozsahu 0 až 2 % rozpustného proteinu (Longstaff *et al.*, 1995, Hemmer, 1997).

K detekci proteinů se používá imunologická detekce, kdy se na bílkovinu naváže vysoce specifická protilátka. Nejčastěji používanou imunochemickou metodou pro detekci GMO je ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Steinkeliner *et al.*, 1998, Lipp a Anklam, 2000, Anklam *et al.*, 2002). Obecně se však tato detekční technika používá spíše během experimentální fáze vývoje transgenních rostlin, kdy se hodnotí stupeň exprese nového proteinu (Rogan *et al.*, 1992, Fuchs *et al.*, 1993, Wood *et al.*, 1995, Padgett *et al.*, 1995, McKenzie *et al.*, 2000) nebo případná alergenicita GMO (Song, 2000, Gizzarelli, 2006). V roce 2000 byla validována metoda ELISA pro specifickou detekci proteinu CP4 EPSPS (zdrojem EPSPS je *A. tumefaciens* kmen CP4) v Roundup Ready sóji. Kit byl schopen zachytit příměs GMO v konvenční sóji v rozmezí od 0,3 do 5 % (Lipp a Anklam, 2000). Komerční soupravy pro tuto analýzu dodávala firma Strategic Diagnostic (Newark, Německo).

Aktuálně jsou pro oficiální kontroly GMO jednoznačně preferovány metody založené na polymerázové řetězové reakci (Polymerase Chain Reaction – PCR), tedy na detekci specifického úseku DNA.

3.6.2 DETEKCE DNA

Detekce nově vložené DNA je pro daný účel nejčastějším způsobem identifikace a kvantifikace GMO v potravinách a krmivech. Výhodou DNA jako analytu je, že je obsažena takřka v každé rostlinné buňce a je to poměrně stabilní molekula. Pro extrakci DNA existuje řada účinných metod. DNA přitom může být extrahována z různých typů vzorků, od nezpracovaného rostlinného materiálu, přes zpracované potraviny a z nich odvozené produkty. DNA je pak templátem pro PCR, která je v současnosti nejpoužívanější metodou pro stanovení GMO (Marmioli *et al.*, 2008, Žel *et al.*, 2012, Bonfini *et al.*, 2012).

3.7 EXTRAKCE DNA

Jak již bylo uvedeno, k dispozici je celá řada metod pro extrakci DNA, volba dané konkrétní metody závisí především na výchozím materiálu vzorku. Obecně lze metody extrakce DNA z rostlinného a z rostlin odvozeného materiálu rozdělit do několika kroků. Nejprve je nutné rozbít buněčné stěny (např. mletím po zmražení v tekutém dusíku), poté narušit buněčné membrány (např. pomocí detergentu jako je CTAB nebo SDS) a inaktivovat endogenní nukleázy (použitím detergentu a EDTA). Přídavkem proteinázy K se inaktivují a degradují

proteiny. Poté dochází k řadě separačních kroků, kdy se DNA promývá od polysacharidů a dalších buněčných zbytků buď s použitím křemíkových kolonek, na kterých je DNA zachycena, nebo na základě různé rozpustnosti v organických rozpouštědlech, jako je například chloroform. Posledním krokem je precipitace DNA ve směsi sůl/alkohol. Tím se roztok DNA zbaví zbytků použitých rozpouštědel a může být zakoncentrován (Bonfini *et al.*, 2002). Pro extrakci DNA mohou být využity také různé typy purifikačních kolonek, založených na vazbě DNA k oxidu křemičitému a dalším oxidům křemíku (Kathryn *et al.*, 1996). Integrita a čistota extrahované DNA (obecně spojováno v pojmu „kvalita“ DNA) je pro následné analýzy klíčová (Terry *et al.*, 2002, Cseke *et al.*, 2004). Kontrolu kvality extrahované DNA lze provést například pomocí elektroforetické separace v agarózovém gelu s vizualizací pod UV světlem po přidavku ethidium bromidu. V případě nezpracovaného rostlinného materiálu je extrakce DNA poměrně snadnou záležitostí a vede většinou k získání dostatečně kvalitní DNA, vhodné pro následnou PCR analýzu. Problém může nastat v případě vysoce zpracovaných potravinářských produktů, při kterých došlo k poškození DNA použitím enzymů nebo vlivem fyzikálních či chemických podmínek při výrobě (např. octy, oleje, dětské výživy apod.). Problematické mohou být také vzorky, které obsahují silné inhibitory PCR, které mohou přejít do testovaného vzorku spolu s extrahovanou DNA (Terry *et al.*, 2002, Cankar *et al.*, 2006). K dispozici je řada metod extrakce a následné purifikace DNA a mnoho z nich bylo ověřeno pro použití při GMO detekci v rostlinném materiálu a odvozených produktech (Bonfini *et al.*, 2002, Zimmermann *et al.*, 1998, Demeke a Jenkins 2010). Přesto je často nutné vyvinout nebo optimalizovat protokol extrakce DNA případ od případu, v závislosti na konkrétním složení a zpracování potravinové matrice (Gryson *et al.*, 2004).

Výběr metody extrakce DNA má velký vliv na kvalitu i množství získané DNA. Laboratoř musí při výběru metody extrakce DNA vzít v úvahu požadavky na experimentální práci vzhledem k povaze vzorků a plánovaným analýzám, stejně jako náklady na analýzu i časovou náročnost (Rafaat *et al.*, 2011).

3.8 PCR DETEKCE

PCR je robustní a velmi citlivá enzymatická *in vitro* metoda, která umožňuje mnohonásobné zmnožení určitého úseku DNA, jehož krajní nukleotidové sekvence jsou známy. Na tuto známou sekvenci se vážou komplementární oligonukleotidy, které určují hranici množení DNA úseku (Saiki *et al.*, 1985, Mullis a Faloona, 1987).

Teoretická výtěžnost PCR je dána vzorcem exponenciální funkce:

$$N = 2^n \quad (1)$$

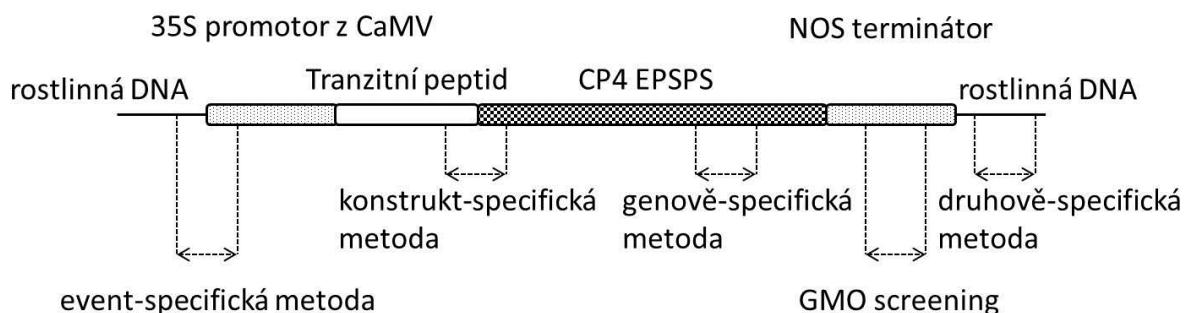
N – počet DNA molekul na začátku reakce

n – počet cyklů PCR

Detekce PCR produktů probíhá nejčastěji v agarózovém gelu po elektroforetické separaci fragmentů DNA na základě jejich délky. Pro určení délky PCR amplikonu se používají různé délkové standardy – fragmenty DNA o známé délce, které jsou separovány v gelu spolu s analyzovanými vzorky. Pro vizualizaci se používá vhodné interkalační činidlo, které je viditelné pod světlem určité vlnové délky, např. ethidium bromid pod UV zářením. S PCR produkty je možné samozřejmě zacházet jako s každou jinou DNA, lze tedy provést ještě kontrolní analýzu např. s použitím restriktáz (Meyer, 1995, Pietsch *et al.*, 1997) nebo je možné DNA sekvenovat (Hupfer *et al.*, 1997).

DNA sekvence vložených genů i jejich pozice v hostitelském genomu je v případě povolených GMO známá. Geny zájmu jsou do hostitelského genomu vkládány spolu s regulačními úseky pro zajištění silné transkripce, v transgenních kazetách bývají také vloženy pomocné selekční geny. Volba cílového úseku pro PCR určuje stupeň selektivity stanovení GMO. Stanovení může probíhat detekcí regulačních úseků (promotory, terminátory), případně selekčních genů. Tímto způsobem je možné testovat přítomnost kteréhokoliv GMO, které tyto tzv. „screeningové elementy“ obsahuje. Zúžení okruhu GMO umožní PCR s primery, které jsou specifické pro určitou formu genu, který je součástí transgenní kazety. I tato metoda může být použita pro detekci všech GMO, které daný gen obsahují. Obě tyto metody jsou současně založeny na detekci DNA sekvencí, které se mohou v přírodě přirozeně vyskytovat. Větší přiblížení se ke konkrétnímu GMO umožní PCR s primery pro amplifikaci specifického GMO konstruktů, tedy úseku mezi dvěma různými geny. Takový DNA konstrukt se již v přírodě přirozeně nevyskytuje, ale opět je možné, aby ho obsahovaly dvě různé GM plodiny. Jednoznačný průkaz jedné konkrétní GMO události pak umožní pouze tzv. „event-specifická“ metoda, kdy je jeden primer komplementární k úseku DNA hostitelského rostlinného genomu, a druhý se specificky váže na DNA obsaženou v transgenním konstruktě. Hraniční oblast vložené a hostitelské DNA je jedinečná

pro každý jednotlivý případ GMO, protože k integraci GMO konstruktů dochází náhodně (Thomas *et al.*, 1994, Jacobs *et al.*, 1995). Pouze event-specifická metoda určí se 100% jistotou, že GMO je daný konkrétní případ (Obrázek 3).



Obrázek 3. RoundUp Ready sója (MON-Ø4Ø32-6). Znázornění typů GMO analýzy metodou PCR- průkaz rostlinné DNA druhově-specifickou PCR, GMO screening, genově-specifická metoda, konstrukt specifická metoda, event-specifická metoda.

Vůbec první metoda detekce GMO v potravinách byla vyvinuta pro identifikaci GM rajčete Flavr Savr (Meyer, 1995). Další vývoj PCR metod pro detekci GMO pokračoval průkazem obecných regulačních úseků. Pietsch *et al.* (1997) uvedl metodu pro GMO screening, která byla schopná zachytit většinu z tehdy povolených GM plodin na evropském trhu. Screening byl založen na detekci regulačních úseků DNA, které ohraničovaly nově vložené geny. Tyto pro GMO charakteristické regulační úseky byly 35S promotor viru kvěťákové mozaiky (Cauliflower mosaic virus – CaMV) a *nos* terminátor genu nopaliny syntázy bakterie *A. tumefaciens*, jejich detekce probíhala metodou PCR (Pietsch *et al.*, 1997). Tato metoda byla také první, která byla validována na úrovni Evropské unie (Lipp *et al.*, 1999). S přibývajícím počtem GMO přestal být screeningový systém, založený na dvou regulačních elementech, dostačující. Hemmer *et al.* (1997) navrhuje zavedení dalších tří screeningových elementů- *nptII* genu, genu E9 z hrachu (3' sekvence malé podjednotky *rbcS* – ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylázy) a genu *als* (acetolaktát syntáza). Zároveň upozorňuje na aspekt, že je třeba volit takové primery, které umožní detekci co největšího počtu vyšetřovaného elementu. Například v roce 1997 již bylo v rámci GMO používáno osm různých variant 35S promotorů z CaMV. Hlavním problémem analýzy GMO s použitím cílových DNA sekvencí, které se mohou vyskytovat v přírodě jako přirozené kontaminanty, je hrozba falešně pozitivních výsledků. Wolf *et al.* (2000) uvedl metodu pro detekci CaMV. Vzorky s pozitivním signálem

35S promotoru z CaMV by měly být kontrolovány z hlediska možné přítomnosti samotného viru.

Cílem tedy bylo identifikovat GMO pomocí jednoznačných event-specifických metod. V současné době je pro GMO screening na webových stránkách EU-RL GMFF k dispozici 14 validovaných screeningových metod pro detekci 4 elementů: 35S promotor z CaMV, gen *nptII*, NOS terminátor, 34S promotor z FMV (virus krtičníkové mozaiky – Figwort Mosaic Virus) a gen *pat* (Bonfini *et al.*, 2012). Detekce screeningových elementů slouží především rychlou pro orientaci, zda vyšetřovaný vzorek obsahuje známý GMO a pro rozhodnutí o dalších analýzách, které většinou probíhají s použitím event-specifických metod. Na obrázku 4 je ukázka schématu GMO a jejich screeningových elementů, které bylo využíváno v NRL pro GMO a DNA fingerprinting při VÚRV, v.v.i.

GMO-event	P35S	NOS-t	P-rAct	<i>pat</i>	<i>bar</i>	<i>EPSPS</i>	<i>nptII</i>
Bt176	+	-	-	-	+	-	-
676, 678, 680	+	-	-	+	-	-	-
B16	+	-	-	-	+	-	-
Bt11	+	+	-	+	-	-	-
C8H 351	+	+	-	-	+	-	-
DAS 06275-8	+	-	-	-	+	-	-
DAS-59122-7	+	-	-	+	-	-	-
DBT418	+	-	-	-	+	-	-
MON80100	+	+	-	-	-	+	+
MON802	+	+	-	-	-	+	+
MON809	+	+	-	-	-	+	-
MON810	+	-	-	-	-	-	-
MON832	+	+	-	-	-	+	+
MON863	+	+	-	-	-	-	+
MON88017	+	+	+	-	-	+	-
MON89034	+	+	-	-	-	-	-
MS3	+	+	-	-	+	-	-
MS6	+	+	-	-	+	-	-

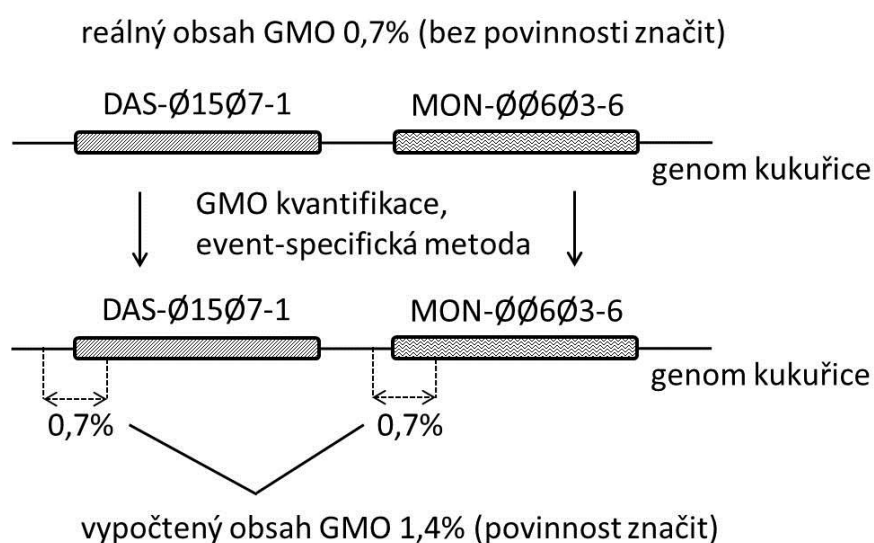
GMO-event	P35S	NOS-t	P-rAct	<i>pat</i>	<i>bar</i>	<i>EPSPS</i>	<i>nptII</i>
NK603	+	+	+	-	-	+	-
T14, T25	+	-	-	+	-	-	-
TC1507	+	-	-	+	-	-	-
Event 3272	-	+	-	-	-	-	-
GA21	-	+	+	-	-	+	-
LY038	-	-	+	-	-	-	-
MIR162	-	+	-	-	-	-	-
MIR604	-	+	-	-	-	-	-
A2704-12, A2704-21, A5547-35	+	-	-	+	-	-	-
A5547-127	+	-	-	+	-	-	-
G94-1, G94-19, G168	+	+	-	-	-	-	-
GTS 40-3-2	+	+	-	-	-	+	-
GU262	+	-	-	+	-	-	-
MON89788	-	-	-	-	-	+	-
W62, W98	+	-	-	-	+	-	-
LLRICE06, LLRICE62	+	-		-	+	-	-
LLRICE601	+	+		-	+	-	-

	kukuřice
	sója
	rýže

Obrázek 4. Schéma GMO a jejich screeningových elementů využívané v NRL pro GMO a DNA fingerprinting při VÚRV, v.v.i.

V případě negativní detekce určitého screeningového elementu je GMO, které tento prvek obsahuje, vyřazeno z dalších analýz, a naopak, pozitivní detekce určitého screeningového elementu znamená, že dané GMO může být ve vzorku obsaženo. Cílem takového

rozhodovacího diagramu je co nejrychleji a s co nejmenším počtem analýz detekovat event-specifickou metodou konkrétní GMO, nebo ve vzorku přítomnost známého GMO vyloučit. Ale i event-specifické metody mají své limity. Problematická je analýza GMO, obsahující „stacked gene events“. To jsou GM plodiny, do kterých bylo přeneseno dva a více genetických konstruktů. Takové GMO vznikají klasickým křížením dvou různých GM plodin, ko-transformací jedné rostliny různými nezávislými genovými konstrukty, transformací rostliny různými genovými konstrukty, které jsou k sobě vázané nebo re-transformací, tedy opakovanou transformací již existující GM plodiny (Miraglia *et al.*, 2004, Holst-Jensen *et al.*, 2006, James, 2012). Běžnou PCR analýzou není možné tyto GMO se stacked-geny odlišit od analogických individuálních transformantů (Taverniers *et al.*, 2008). To pak může vést k nesprávnému výsledku při analýze obsahu takového GMO ve vzorku. Vznik chybného výsledku při určení obsahu GMO se stacked-geny event-specifickou metodou real-time PCR je uveden na Obrázku 5 na příkladu hybridu herbicid-tolerantní a insekt-rezistentní GM kukuřice Herculex™ I Roundup Ready™ 2 maize (DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3-6), který vznikl křížením linky DAS 1507 (DAS-Ø15Ø7) a NK 603 (MON-ØØ6Ø3-6).

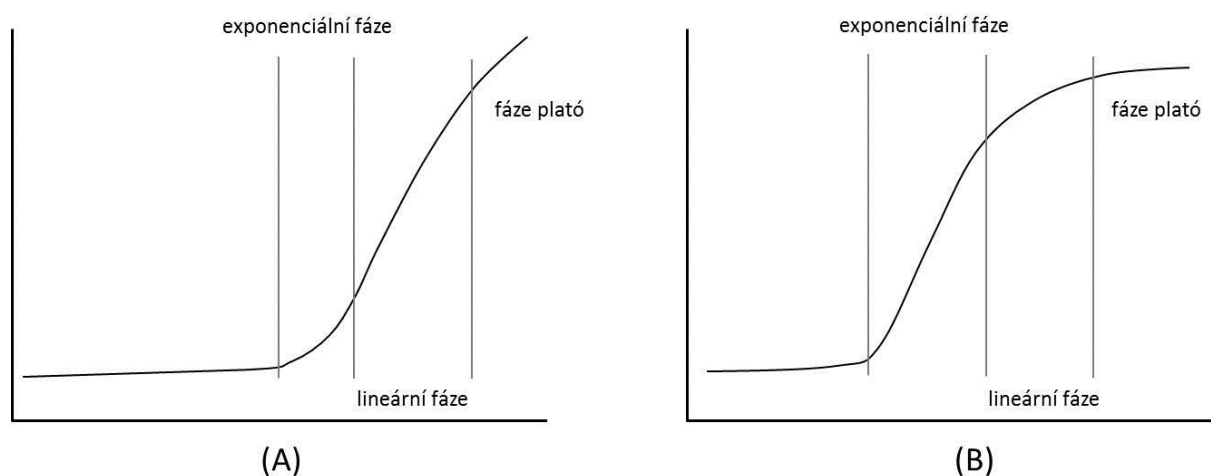


Obrázek 5. Kvantifikace GMO se stacked-geny event-specifickou metodou.

V případě GMO se stacked-geny je ještě nutné vytvořit jednotné definice, které vezmou v potaz všechny možnosti vzniku takovýchto GMO. Kvantifikace GMO se stacked-geny a jejich odlišení od rodičovských linií je možná pouze v případě analýzy osiva nebo individuálních rostlin. Je-li produkt již zpracován, není takové rozlišení možné (Akiyama *et al.*, 2005, Taverniers *et al.*, 2008).

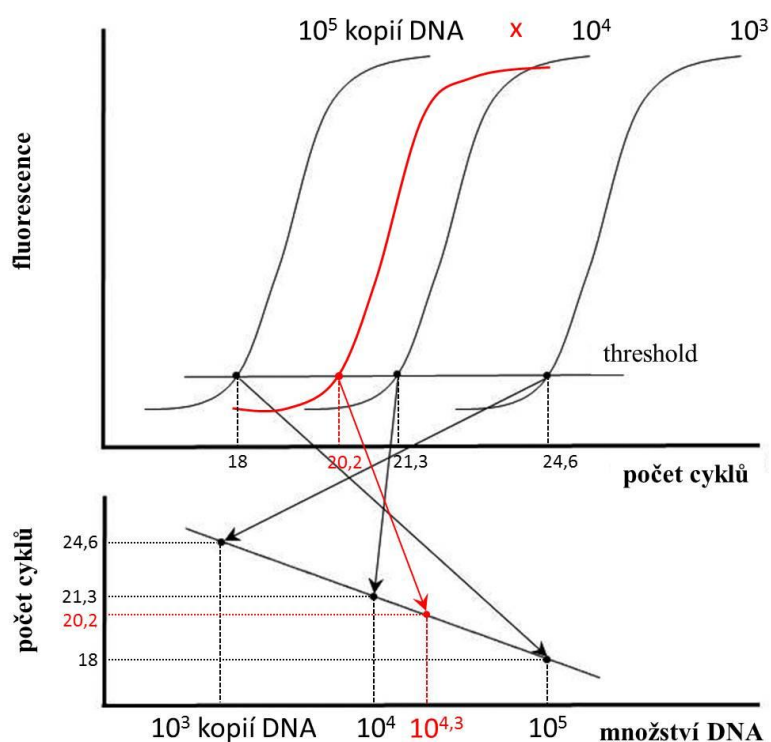
3.9 PCR KVANTIFIKACE

V současné době je metodou první volby pro kvantifikace GMO v potravinách a krmivech kvantitativní PCR, nebo jinak PCR v reálném čase (quantitative PCR – qPCR, real-time PCR). Real-time PCR umožňuje sledovat amplifikační reakci v reálném čase (Higuchi *et al.*, 1992, Heid *et al.* 1996). Sledování probíhá pomocí detekce fluorescenčního signálu, který je emitován příslušným reportérem, který obsahuje fluorofor se schopností absorbovat energii o určité vlnové délce ze světelného záření. Absorbovaná energie excituje elektron fluoroforu, během návratu elektronu zpět na svou energetickou hladinu fluorofor emituje záření o delší vlnové délce, než jaké bylo fluoroforem přijato (Bustin, 2004). K emisi tohoto signálu dochází v exponenciální fázi reakce, kdy je také detekován, a množství tohoto signálu je přímo úměrné nárůstu PCR produktů v každém cyklu (Ahmed, 2000). Na základě srovnání nárůstu signálu analyzovaného vzorku se sadou kontrolních vzorků, u nichž známe množství DNA vložené do reakce, lze interpolovat počáteční množství DNA analyzovaného vzorku. Signál může být tvořen buď sekvenčně nespecifickou vazbou interkalačního činidla (např. SYBR[®] Green) nebo s pomocí třetího oligonukleotidu, tzv. sondy, která je sekvenčně specifická. Nárůst signálu je měřen v exponenciální fázi reakce, kdy je množství amplifikované DNA dostatečné na to, aby byl signál významně větší než šum, a zároveň není PCR ve fázi plató, kdy už nejsou další amplikony tvořeny podle exponenciální funkce. To je rozdíl oproti klasické end-point PCR, kdy se z důvodu dosažení co největší citlivosti detekují PCR produkty na agarózovém gelu po dosažení maximálního výtěžku reakce, tedy ve fázi plató. Jednotlivé fáze PCR jsou ale samozřejmě v obou případech shodné (Obrázek 6).



Obrázek 6. Fáze PCR. (A) Průběh nárůstu fluorescenčního signálu během přibývajících cyklů PCR. (B) Logaritmus průběhu nárůstu fluorescenčního signálu během přibývajících cyklů PCR.

Pro výpočet obsahu GMO v potravinářských produktech a krmivu metodou real-time PCR je nezbytné amplifikovat (nezávisle ve dvou reakčních směsích nebo současně v jedné reakční směsi) dva cílové DNA fragmenty- transgenní DNA sekvenci a taxon-specifickou sekvenci daného rostlinného druhu (referenční gen). Pro oba systémy jsou vytvořeny kalibrační křivky (nezávisle nebo pro oba současně), pomocí kterých je vypočítáno množství GMO, případně referenčního genu ve vzorku (Obrázek 7).



Obrázek 7. Sestavení kalibrační křivky a interpolace množství DNA neznámého vzorku (x).

Threshold označuje prahovou hodnotu, která odráží statisticky významné body signálu. Průnik mezi thresholdem a křivkou signálu se označuje jako Ct (threshold cycle) – v obrázku označen bodem. Hodnota Ct vyjadřuje cyklus reakce, při kterém fluorescence překročila prahovou hodnotu. Kalibrační křivky jsou tvořeny sadou vzorků, u kterých je známý obsah analyzovaného GMO. Pro tyto účely se používají certifikované referenční materiály (Certified Reference Materials – CRMs), u kterých jsou uvedeny údaje o jejich vzniku, kvalitě, nejistotě certifikované hodnoty a podobně. Přestože by používání CRM mělo zajistit správný a reprodukovatelný výsledek, nejistotu do něj vnáší biologický faktor, kterým je v případě

rostlin zygotita, ploedita tkáně a především charakter rodičovské linie GM rostliny (Holst-Jensen *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008, Žel *et al.*, 2012).

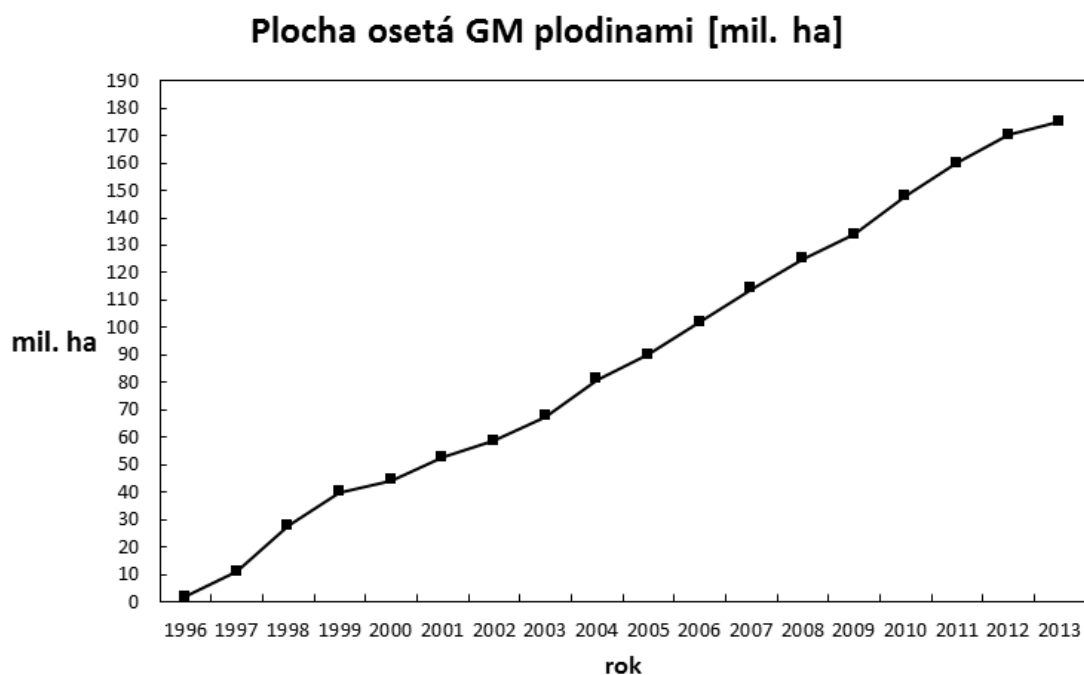
Výsledný obsah GMO v analyzovaném vzorku se poté vypočítá poměrem množství GMO k množství referenčního genu, výsledek se uvádí v %. Pro výpočet je nutné vědět, v kolika kopiích se kvantifikovaný úsek DNA v genomu vyskytuje, tedy zda je poměr výskytu obou kvantifikovaných úseků 1 : 1. V případě známého GMO jsou tyto údaje snadno dohledatelné, u event-specifické metody je kopie jedna. Základní vlastností referenčního genu je specifita pro daný taxon, žádné alelické variace genu mezi různými kultivary a nízký a stabilní počet kopií daného genu v haploidním genomu (Ding *et al.* 2004, Chaouachi *et al.* 2007).

Výchozí jednotky, ve kterých je zastoupení transgenu a referenčního genu v analyzovaném vzorku měřeno, nejsou v Nařízení (ES) č. 1830/2003 nijak specifikovány. Použitá jednotka závisí na tom, v jaké jednotce je uvedena hodnota CRM. To může být % GMO, počet kopií cílového úseku DNA nebo hmotnostní poměr GMO a konvenčního materiálu, podle toho, z jakého materiálu a jakým způsobem byl CRM připraven. Jako pomůcka pro kvantitativní výpočty obsahu GMO v analyzovaných vzorcích metodou real-time PCR bylo vydáno Doporučení komise 2004/787/ES jako technický průvodce pro vzorkování a detekci GMO. V Doporučení je uvedeno, že výsledek kvantitativní analýzy by měl být vyjádřen jako procentuální poměr počtu cílových kopií transgenní DNA v poměru k počtu cílových kopií referenční DNA, vypočítaný vzhledem k haploidnímu genomu (Commission Recommendation 2004/787/EC, 2004).

V Nařízení (ES) č. 619/2011, které stanovuje metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv z hlediska přítomnosti geneticky modifikovaného materiálu, u něhož probíhá postup povolování nebo u něhož uplynula platnost povolení, je uvedeno, že certifikované množství obsahu GMO se uvádí v hmotnostních zlomcích, v případě dostupnosti i v počtu kopií na ekvivalent haploidního genomu. V příloze stejného dokumentu je ale následně řečeno, že pokud se výsledky primárně vyjadřují jako počty geneticky modifikovaných kopií DNA ve vztahu k počtu kopií DNA specifických pro cílový taxon vypočítané na základě haploidních genomů, převedou se na hmotnostní zlomek v souladu s údaji poskytnutými v každé validační zprávě EU-RL (Žel *et al.*, 2012, Commission Regulation (EU) No 619/2011). Tento příklad ilustruje mnohdy nedostatečnou provázanost mezi předkládanými normami a možnostmi analytických metod (Holst-Jensen *et al.*, 2006). Vyjádření výsledného množství GMO ve vzorku hmotnostním zlomkem nebo poměrem počtu kopií vyžaduje jiný typ CRM.

3.10 NOVÉ METODY DETEKCE GMO

Celosvětová plocha osetá GM plodinami od roku 1996 kontinuálně roste (Obrázek 8). Nové GM plodiny jsou také daleko složitější. V roce 2013 zabíraly GM plodiny se stacked geny 27 % světové plochy oseté GM plodinami, což odpovídá rozloze 47 milionů hektarů. To je nárůst o 3,3 miliony hektarů oproti roku 2012 (James, 1996, 2013).



Obrázek 8. Celosvětový nárůst plochy oseté GM plodinami, rok 1996-2013 (zdroj ISAAA).

Stoupá také rozmanitost nových GMO. Vedle GM kulturních plodin se v potravinářském, případně krmivářském průmyslu možná brzy objeví GM losos či prase (Marris, 2010). GMO slouží jako jedlé vakcíny, GM mikroorganismy vznikají za účelem produkce chemikálií, vznikají nové GM stromů, objevuje se GM hmyz (Sourrouille *et al.*, 2009, Faye a Gomord 2010, Beech *et al.*, 2012, Aguilera *et al.*, 2013, Barker *et al.*, 2013). Je zřejmé, že náročnost detekce GMO stoupá. A nejde jen o rozmanitost GM organismů nebo komplexnost vkládaných transgenních kazet. Pokrok nastal i ve vývoji nových molekulárně-biologických metod šlechtění, které se na rozdíl od dosud používaných metod pro transgenozy liší tím, že umožňují cílené změny v rámci určitého místa genomu. Metoda Zinkových prstů (Zinc Finger Nuclease Technology – ZFN) může být použita pro cílené vnášení genů nebo naopak pro odstraňování genů. Pomocí této metody byla připravena k herbicidu tolerantní kukuřice s vloženým genem *pat* (Shukla *et al.*, 2009) nebo k herbicidu tolerantní tabák, který byl

připraven zavedením cílených mutací s použitím ZFN do genu pro acetohydroxyacid syntázu (Townsend *et al.*, 2009).

Přímá mutace řízená oligonukleotidy (Oligonucleotide directed mutagenesis – ODM) umožňuje stabilní změnu jednoho nebo několika vedle sebe sousedících oligonukleotidů. Tímto způsobem byl připraven k herbicidu rezistentní tabák zavedením specifické mutace do genu pro acetolaktát syntázu (Beetham *et al.*, 1999) nebo k herbicidu rezistentní kukuřice zavedením jednobodové mutace do genu pro acetohydroxyacid syntázu (Zhu *et al.*, 2000).

Metody cisgenoze a intragenoze sice neumožňují změnu genomu, zacílenou do specifického místa, ale na rozdíl od transgenoze zahrnují přenos genů v rámci jednoho rostlinného druhu nebo mezi rostlinami příbuzných druhů, které je možné křížit klasickými šlechtitelskými metodami. Při intragenozi ještě navíc dochází ke vzniku nových kombinací genů pomocí *in vitro* přeskupování funkčních genů (Rommens *et al.* 2004, Rommens *et al.*, 2007, Holme *et al.*, 2013).

Další molekulárně-biologickou metodou šlechtění rostlin, je RNA řízená metylace DNA (RNA-directed DNA methylation – RdDM), kdy se využívá epigenetického procesu metylace DNA pomocí siRNA na základě homologie cílových úseků (Wassenegger *et al.*, 1994, Cigan *et al.*, 2005, Huettel *et al.*, 2007). To je jen pár příkladů nových biotechnologických metod šlechtění, jejichž produkty by mohly být legislativně hodnoceny jako GMO. To je velká výzva pro všechny NRLs a evropské i národní autority, které se zabývají nakládáním s GMO a příslušnými kontrolami.

Jednou z možností pro zlepšení výkonu diagnostiky GMO je zvyšování kapacity stávajících metod. V roce 2009 byl JRC představen koncept Ready-To-Use Multitarget analytický systém, který byl ověřen pro simultánní detekci 39 cílových event-specific DNA sekvencí pro real-time PCR a 7 taxon-specifických DNA sekvencí pro průkaz rostlinného druhu. Real-time PCR probíhají v 96-jamkovém platu, na dně každé jamky jsou lyofilizované primery a sonda pro amplifikaci daného cílového úseku DNA. Systém byl testován v rámci laboratoří sítě ENGL, limit detekce vyjádřený v kopiích DNA haploidního genomu byl stanoven na 0,045 % (Querci *et al.*, 2009).

Metody založené na multiplex real-time PCR spojují výhody real-time PCR za současného zvýšení kapacity, kdy je v rámci jedné zkumavky testováno více cílových DNA sekvencí. Smysl má do multiplex real-time PCR zařadit co největší množství taxon-specifických genů pro průkaz rostlinného druhu a co nejvíce screeningových elementů. Většinou jsou tyto cílové úseky amplifikace ještě doplněny i o event-specifické metody, které případně umožní přesnou identifikaci GMO.

Bahrtdt *et al.* (2010) představil hexaplex real-time PCR, založenou na detekci šesti screeningových elementů: 35S promotor z CaMV, NOS terminátor, 34S promotor z FMV, SAMS (přechodový úsek z promotoru S-adenosyl-L-methionine syntetázy do genu sóji acetolaktát syntázy – *Glycine max gm-hra* gen), LY (hraniční úsek mezi sekvencemi pro tranzitní peptid chloroplastu kukuřice dihydrodipicolinát syntázu a *cordapA* genu bakterie *Corynebacteria glutamicum*, kódujícího enzym k lysinu necitlivé dihydropicolinát syntázy). Šestý cílový úsek pro real-time PCR je vnitřní pozitivní kontrola pro amplifikaci DNA, která není rostlinného původu. Tento úsek slouží k odhalení případných inhibitorů PCR. S použitím takto složeného hexaplex real-time PCR je možné odhalit více jak 100 povolených GMO.

Zatím nejvíce komplexní přístup představuje multiplex real-time PCR detekce 47 cílových úseků DNA, jejichž amplifikace probíhá současně ve 24 multiplexních reakcích. Celý systém je připraven na 384-jamkovém platu, v jednotlivých jamkách jsou lyofilizované oligonukleotidové primery a sondy pro detekci taxon-specifických genů, screeningových elementů i event-specifických elementů, včetně pozic pro pozitivní i negativní kontroly. Podle údajů z veřejných GMO databází umožňuje tato multiplex real-time PCR detekci zhruba 95 % celosvětově používaných GM plodin (Cottenet *et al.*, 2013).

Metoda digitální PCR umožňuje absolutní kvantifikaci cílového úseku DNA v analyzovaném vzorku s použitím limitního ředění DNA. Reakční směs pro PCR je spolu s omezeným množstvím analyzované DNA distribuována na základě Poissonova rozdělení do velkého množství navzájem oddělených reakčních komor způsobem, že každá komora obsahuje žádnou, jednu nebo více kopií DNA. Po proběhnutí reakce je každá komora vyhodnocena, zda obsahuje (označení „1“) nebo neobsahuje (označení „0“) PCR produkt.

Corbisier *et al.* (2010) demonstroval s použitím CRM MON810 potenciál digitální PCR pro určení počtu kopií genu. Digitální PCR je přitom přesnější než klasický přístup pomocí real-time PCR, odpadá nutnost používat referenční kalibrátor (CRM) a výsledek není ovlivněný efektivitou amplifikace. Morisset *et al.* (2013) publikoval verzi digitální PCR, kdy reakce neprobíhají v oddělených komorách, ale reakční směs PCR je spolu s DNA rozdělena do tisíců až milionu individuálních kapek, které se nacházejí v emulzi se složením voda-olej. Pro detekci pozitivních PCR testů se v této „kapičkové“ digitální PCR (droplet digital PCR) používá průtoková cytometrie. Droplet digital PCR byla v tomto případě použita pro stanovení počtu kopií různých CRM MON810 a několika reálných vzorků s obsahem GM kukuřice MON810, s obsahem konvenční kukuřice a jeden vzorek neobsahoval kukuřičnou DNA vůbec.

Stejný koncept spojení real-time PCR detekce cílových DNA sekvencí s čipovým mikrofluidním systémem představil Brod *et al.* (2014). Na čipu probíhaly reakce cílené na 28 screeningových elementů, event-specifických DNA sekvencí nebo taxon-specifických genů. Reakce probíhá v řádech nanolitrů na čipu, umožňujícím analýzu ve formátu 48.48 (48 vzorků x 48 reakcí), 192.24 nebo 96.96. Hlavní výhodou tohoto systému je citlivost a vysoká kapacita systému v krátkém reakčním čase a šetření nákladů na analýzu díky malým reakčním objemům.

Řešení nabízí také nové robustní a finančně efektivní metody. Na tomto konceptu se pracuje, jak je vidět z pokroku ve vývoji řady alternativních metod pro detekci GMO. Tyto technologie jsou však často finančně i časově velmi náročné a vyžadují specializované pracovní síly. Navíc mohou být obtížně standardizované, jejich aplikace v rutinním zkoušení je proto v blízké době nepravděpodobná. Nicméně, je zde určitý potenciál, že by zjednodušené formy těchto metod mohly být přizpůsobeny např. pro analýzy určitých druhů GM plodin (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

Metoda LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) umožňuje provést event-specifickou analýzu GMO pomocí izotermální amplifikace cílových úseků DNA během krátkého časového úseku (až 38 minut). Reakce je katalyzovaná *Bst* DNA polymerázou, která má schopnost vytlačovat komplementární řetězec DNA. Cílové úseky amplifikace jsou ohraničeny sadou minimálně čtyř primerů, které rozeznávají šest cílových oblastí na DNA (Parida *et al.*, 2008, Mori a Notomi, 2009, Bi *et al.*, 2012). Možnost použití LAMP metody pro detekci GMO byla demonstrována v řadě vědeckých publikací (Fukuta *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2009, Randhawa *et al.*, 2013, Cheng *et al.*, 2014).

Jednou z alternativních metod, která má potenciál především pro detekci nepovolených GMO s neznámým složením, je metoda DNA fingerprintingu („otisku prstu“). Při analýze se vychází s celogenomické DNA, která je štěpena restrikcími enzymy. Následují kroky ligace adaptorů a nested nebo touch-down PCR. Fingerprint jednotlivých GMO je pak charakterizován profilem generovaných PCR fragmentů (Raymond *et al.*, 2010, Ruttink *et al.*, 2010).

DNA microarrays (DNA čipy), představují další možnost vysoce-kapacitního přístupu k analýze GMO. DNA čip je většinou tvořen desetitisíci až milióny oligomerních jednovláknových DNA řetězců (sond), které jsou upevněny na pevnou podložku. Vyšetřovaný vzorek DNA je vhodným způsobem označen a nanesen na čip, kde za vhodných podmínek v případě komplementarity bází dojde k hybridizaci testované DNA k sondě. Po odstranění

nenavázaných DNA molekul vzorku je detekován signál značených DNA molekul hybridizovaných na komplementárních sodách.

Tengs *et al.* (2007) prezentoval koncept využití techniky DNA microarrays pro detekci a charakterizaci neznámých GMO. Vycházel při tom z čipu firmy Affymetrix (USA), na který se hybridizuje celogenomová DNA. Čip je s velmi vysokou hustotou pokryt DNA sondami o délce 25 bp, které sekvenčně pokrývají vybrané referenční úseky DNA. Hlavním problémem tohoto přístupu je požadavek na vysoce kvalitní DNA a také cena analýzy.

Systém pro detekci GMO, založený na DNA microarrays s nízkou hustotou sond v kombinaci s pre-amplifikačním krokem několika multiplex PCR, byl úspěšně validován v mezilaboratorní studii a je v nabídce firmy Eppendorf (Leimanis *et al.*, 2008).

Metody sekvenace DNA další generace (Next-generation sequencing – NGS) a jejich využití pro detekci GMO se jasně nabízí. Asi nejznámější a nejpropracovanější systémy NGS prezentují firmy Illumina, Roche a Applied Biosystems (nyní Life Technologies). Základní postup je pro všechny tři systémy stejný. Analyzovaná DNA je štěpena, z DNA fragmentů je vytvořena knihovna a tato knihovna je sekvenována miliony paralelně probíhajících sekvenačních reakcí. Sekvenované úseky DNA jsou pak s pomocí referenční sekvence složeny do co nejsprávnějšího pořadí a není-li referenční sekvence dostupná, je DNA sekvence sestavena *de novo*. Koncept využití NGS metody s použitím systému od Illuminy publikovala na příkladu GM rýže LL62 Wahler *et al.* (2013).

Pro využívání těchto metod je limitující především stále jejich cena a zásadní je také dostupnost referenčních DNA sekvencí pro správné sestavení sekvenovaných DNA fragmentů. To může být limitujícím faktorem v případě neznámých GMO i v případech velmi komplexních směsí s obsahem GMO.

4 VÝČET POUŽITÝCH METOD

- CTAB metoda extrakce DNA z čerstvého rostlinného materiálu
- CTAB metoda extrakce DNA ze suchého rostlinného materiálu a komplexních potravinářských matric
- Wizard metoda extrakce DNA
- Extrakce DNA s použitím komerční soupravy GeneSpin DNA Isolation Kit
- Řetězová polymerázová reakce (PCR)
- Řetězová polymerázová reakce v reálném čase (Real-time PCR)
- Klonování DNA
- Sekvence DNA
- Vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

5 VÝSLEDKY

5.1 EXTRAKCE DNA Z PAPÁJI

Prvním cílem práce bylo srovnání tří metod pro extrakci DNA z papáji (*Carica papaya*) a vyhodnocení jejich použitelnosti pro následnou kontrolu výskytu GM papáji na trhu v ČR. Materiálem pro extrakci DNA byl čerstvý plod papáji a potravinářský výrobek, kandovaná papája. Tato produkty byly vybrány jako nejvíce frekventované výrobky z papáji na našem trhu. Pro extrakci DNA z papáji byly testovány tři běžně používané metody pro extrakci DNA z rostlin, odvozených potravinářských produktů a krmiv. Byla to metoda založená na CTAB (cetyltrimethylammonium bromid), popsaná Murrayem a Thompsonem (1980), metoda Wizard, založená na extrakci DNA pomocí TNE pufru a guanidin chloridu s následnou purifikací DNA přes kolonku s využitím vazby DNA na roztok s obsahem pryskyřice (Lüthy *et al.*, 1998), a metoda extrakce DNA s použitím komerční soupravy GeneSpin DNA Extraction Kit (Eurofins, Německo).

Použitelnost testovaných metod pro monitoring výskytu GM papáji na trhu byla ověřena PCR amplifikací úseku taxon-specifického genu *papain* (Goda *et al.* 2001). Výsledek PCR ukázal, že CTAB metoda poskytla DNA v dostatečném množství a dostatečné kvalitě v případě extrakce z dužiny a pecek čerstvého plodu papáji, v případě kandované papáji byl výsledek negativní.

Metoda Wizard nevedla k zisku amplifikovatelné DNA v žádném ze tří testovaných vzorků papáji (dužina a pecky čerstvého plodu, kandované ovoce).

Extrakce DNA z kandované papáji se podařila až po optimalizaci pracovního postupu při použití komerční soupravy GeneSpin (použití lytického pufru v nadbytku a prodloužení doby, kdy mu byl vzorek vystaven). Úspěšnost byla potvrzena amplifikací specifického úseku taxon-specifického genu *papain*.

Obě ověřené metody extrakce DNA byly použity při testování vzorků papáji a výrobků obsahující kandovanou papáju na přítomnost nepovolené GMO. Protože GM linie papáji 55-1/63-1 a X17-1 obsahují 35S promotor z CaMV, byla detekce provedena PCR amplifikací specifického úseku tohoto screeningového elementu (Vollenhofer *et al.* 1999). Žádná GM papája nebyla v testovaných výrobcích detekována.

Výsledky této studie byly prezentovány v časopise s impakt faktorem (IF=0,602):

Ovesna J, Hodek J. Detection of Transgenic Papaya Lines: Extraction Protocol Optimisation and Verification of DNA Quality by PCR Assay. *Czech J Food Sci.* 2009;**27**(S2):75-81.

Detection of Transgenic Papaya Lines: Extraction Protocol Optimisation and Verification of DNA Quality by PCR Assay

JAROSLAVA OVESNÁ and JAN HODEK

Department of Molecular Biology, Crop Research Institute, Prague-Ruzyně, Czech Republic

Abstract: Food matrices are controlled for the presence of authorised and unauthorised GMOs (Genetically Modified Organisms). Transgenic papaya was developed and approved for the market in the USA. However, authorisation in EC have not been accomplished. Recently, unauthorised GM papaya was catch on EC market. Therefore it is necessary to dispose by an assay revealing genetically modified fruits. High quality DNA is required for the assay. We tested and optimised CTAB, Wizard and spin column based procedure for DNA extraction. We found that CTAB based protocol allows isolation of amplifiable DNA from fresh fruit flesh and stones, whereas spin columns allowed isolation of amplifiable DNA from candied fruits. Modified protocol is described. No transgenic fresh fruit or candied fruit from the market was detected.

Keywords: GMO detection; papaya; PCR; DNA isolation

Papaya is the fruit of the plant *Carica papaya*, in the genus *Carica*. It is native to the tropics of the Americas, and was cultivated in Mexico several centuries before the emergence of the Mesoamerican classic cultures. Papaya (*Carica papaya*) is widely grown in the tropics and has been grown in Hawaii for over a century as well (GONSALVES 1998). It is a popular fruit. The juice has been seen to have an antiproliferative effect on liver cancer cells cultured in the laboratory, probably due to its component of lycopene (RAHMAT *et al.* 2002).

A major production constraint for papaya worldwide is papaya ringspot virus (PRSV), a potyvirus that is rapidly transmitted by a number of aphid species in a nonpersistent manner (GONSALVES & ISHII 1980). Efforts to develop transgenic papaya to control PRSV began shortly after transgenic tobacco expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus was developed and shown to be resistant to *Tobacco mosaic virus*. The papaya research team cloned the coat protein gene of PRSV, transformed embryogenic cultures of pa-

paya cvs. Sunrise, Sunset, and Kapoho (FITCH *et al.* 1990).

The team identified in 1991 a single line derived from cv. Sunset (designated line 55-1) that was resistant to PRSV HA (a severe strain from Hawaii) in greenhouse inoculations (FITCH *et al.* 1992). New transgenic cultivars were developed shortly SunUp and Rainbow. SunUp is a transgenic red-fleshed Sunset that is homozygous for the coat protein gene. Rainbow is a yellow-fleshed F1 hybrid developed by crossing SunUp and non-transgenic yellow-fleshed Kapoho (MANSHARDT 1998). Transgenic papaya has been grown widely on Hawaii (SCHWEMBER 2008). From the results it is clear that the PRSV-resistant transgenic papaya is a practical solution for controlling PRSV, as has been shown in Hawaii. Infection fields were replaced by transgenic cultivar and thus selection pressure decreased and some production is non transgenic allowing export to e.g. Japan. In January 2003, Canada allowed the importation of transgenic papaya.

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. 1B44068 PUV and No. MZE 0002700604, and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Project No. MEB 080849.

European community does not allow import of transgenic papaya into its territory. European jurisdiction requires risk assessment by EFSA (European Food Safety Authority) before authorisation. For details see EC Regulation 1829/2003. Recently unauthorised GM papaya was catch on EC market (BUSCH *et al.* 2004). To control the import detection methods are required. Generally they are PCR based but others are under the development (ANKLAM *et al.* 2002; LIU *et al.* 2004; MONMA *et al.* 2004; MAFRA *et al.* 2008).

GMO contains foreign DNA usually consisting of promotor, coding sequence and terminator for both functional and marker genes. Often, CaMV 35S promoter is used in the construct. So that PCR based methods require isolated DNAs containing target DNA string. For details and principle see e.g. OVESNÁ *et al.* (2008). According GM database of the AgBios (AgBios GM Database), which is an internationally respected Canadian company dedicated to providing public policy, regulatory, and risk assessment expertise for products of biotechnology, there are two events of GM papaya event 55-1/63-1 and X17-2. Both traits are resistant to viral infection PRSV and both transgenic constructs contain CaMV 35S promoter. Schema of genes inserted into the papaya 55-1 is presented in Figure 1. The gus gene is not presented in line 63-1 compared to 55-1 line.

We aimed in our research to establish reliable protocol for isolation of DNA from raw and candied papaya fruit amplifiable by appropriate method, as the GM papaya is unapproved in EC and the DNA extraction from papaya products was revealed as problematic (WALL *et al.* 2004).

Here we describe optimised protocol and results of GM screening based on CaMV 35S promoter

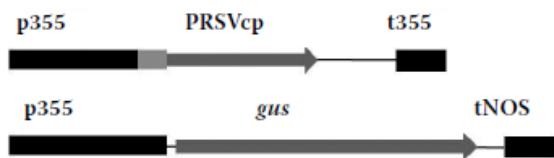


Figure 1. Transgenic construct of GM papaya. p35S = CaMV 35S promoter (CaMV – *Cauliflower mosaic virus*); PRSVcp = viral coat protein (PRSV – papaya ringspot potyvirus); t35S = CaMV 35S terminator (CaMV – *Cauliflower mosaic virus*); gus = beta-D-glucuronidase (from *Escherichia coli*); tNOS = *A. tumefaciens* nopaline synthase (nos) 3'-untranslated region. Adapted according: AgBios GM Database and WALL *et al.* (2004)

of two most frequent food products on the Czech market – the fresh papaya fruit and the candied papaya.

MATERIAL AND METHODS

Material. Papaya samples were collected on the market. The fruit was peeled, the flesh was separated from the stones, cut into pieces and the slices of papaya flesh was dried in the oven at 37°C for 12 h to reduce the moisture content. Both the tissue were stored at –80°C until further processed.

The candied papaya was stored at room temperature until processed.

DNA isolation. From each sample two independent isolations were performed. Prior to DNA isolation, samples were homogenised in liquid nitrogen.

CTAB based DNA extraction. CTAB method (Cetyl trimethylammonium bromide) DNA isolation was performed according ISO Standard (EN ISO 21571:2002). Total of 200 mg of powdered sample was used for DNA isolation. Extracted DNAs were eluted in 60 µl of 0.1 × TE buffer.

Wizard DNA extraction. DNAs were extracted and purified using the modified Wizard method. 200 mg of powdered sample was mixed with 860 µl of TNE buffer (5mM Tris-HCl, pH 8.0, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1% SDS). The mixture was vortexed. 100 µl of 5M guanidin hydrochloride and 40 µl of proteinase K hydrochloride were added to the solution, the mixture was vortexed and after that incubated at 58°C for 5 hours with occasionally mixing. After incubation, the mixture was centrifuged for 10 min at 13 000 × g. 500 µl of supernatant was transferred into the new microtube and 10 µl of RNase was added to the sample. The sample was further incubated at 65°C for 10 minutes. DNA solution was subsequently purified with Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, USA).

GeneSpin DNA Isolation Kit. DNA was extracted using GeneSpin DNA Extraction Kit (Eurofins, Freiburg, Germany) following the manufacturers instructions. Total of 200 mg of powdered sample was used. In the case of candied papaya the protocol was modified as follows. The volume of lysis buffer increased to 700 µl and time of incubation was prolonged to 1 hour.

Assessment of DNA quality. DNAs were evaluated by agarose electrophoresis for its integrity and rough estimation of quantity. For detailed

Table 1. Primers used in PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Source
Papain 1–3	GGGCATTCTCAGCTGTTGTA	211	GODA <i>et al.</i> (2001)
Papain 1–5	CGACAATAACGTTGCACTCC		
35S-F	CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC	162	VOLLENHOFER <i>et al.</i> (1999)
35S-R	ATATAGAGGAAGGGTCTTGCGAAGG		

evaluation, spectrophotometer NanoPhotometer (Implen, Munich, Germany) was used. Absorbancy at 260 nm, 280 nm, and 320 nm was measured and spectra profile (from 190 nm to 760 nm) recorded. Purity was calculated based on A_{260}/A_{280} ratios.

PCR. The DNA amplifiability was verified by amplification of 211 pb long stretch of species specific gene papain. For primer sequence see Table 1.

Detection of papain. Amplification reactions (25 μ l) were performed using AmpliTaq Gold PCR reagents (Applied Biosystems, Forster City, USA). End concentrations of PCR components were as follow: Gold buffer 1 \times ; $MgCl_2$ 2mM; dNPTs (Fermentas, Burlington, Canada) 0.2mM; primer papain 1–3 0.5 μ M; primer papain 1–5 0.5 μ M; AmpliTaq Gold polymerase 1 U. The volume was adjusted with water for PCR to 20 μ l. PCR was performed using 5 μ l of template DNA (100 ng DNA in reaction in case of genomic positive control or 10 ng DNA in case of plasmid positive control).

Amplification was performed in PCR thermal cycler (MJ Research, Waltham, USA) and consisted of: 12 min at 95°C; 41 cycles with 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C and 10 min at 72°C.

Detection of CaMV 35S promoter. For detection of transgenic sequence, 162 bp string of 35S

CaMV promoter was used. For primer sequence see Table 1. Amplification reactions (25 μ l) were performed using AmpliTaq Gold PCR reagents (Applied Biosystems, Forster City, USA). End concentrations of PCR components were as follow: Gold buffer 1 \times ; $MgCl_2$ 1.5mM; dNPTs (Fermentas, Burlington, Canada) 0.2mM; primer 35S-F 0.24 μ M; primer 35S-R 0.24 μ M; AmpliTaq Gold polymerase 1 U. The volume was adjusted with water for PCR to 20 μ l. PCR was performed using 5 μ l of template DNA (100 ng DNA in reaction in case of positive controls).

Amplification was performed in PCR thermal cycler MJTB (MJ Research, Waltham, USA) and consisted of: 12 min at 95°C; 41 cycles with 30 s at 95°C, 30 s at 66°C, 30 s at 72°C; and s 10 min at 72°C.

Data evaluation. All isolations and amplifications were run in duplicates. Positive, extraction and MasterMix controls were always included. As the positive control for papaya internal gene amplification, the plasmid containing papain target sequence was used. This plasmid (pPCR[®] 2.1-TOPO[®]) was prepared in our laboratory by insertion of 211 bp of papain target sequence using TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Alternatively, isolated DNA from transgenic papaya

Table 2. Spectrophotometry measurement of isolated DNAs

Papaya matrix	DNA isolation protocol	Gel elfo	DNA quantity (ng/ μ l)	Amplifiability
Flesh	CTAB	–	1	+
	Wizard	–	–	–
	GeneSpin	–	–	–
Stone	CTAB	+	7	+
	Wizard	–	–	–
	GeneSpin	–	–	–
Candied	CTAB	–	–	–
	Wizard	–	–	–
	GeneSpin	–	–	+

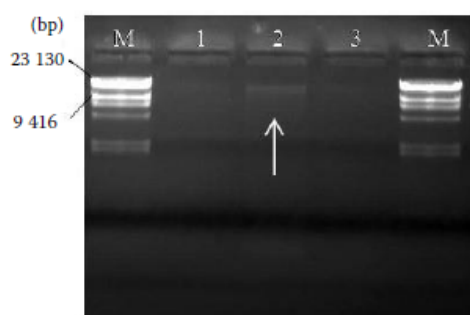


Figure 2. CTAB isolated DNA from papaya fruit tissues flesh and stone. Lane contents: M – HindIII DNA ladder (Fermentas, Canada), 1 – DNA extracted from papaya flesh, 2 – DNA extracted from papaya stone, 3 – extraction control. The high-molecular DNA is indicated by arrow

provided by S. Pecoraro (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Germany) was explored. IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) reference materials of RoundUp Ready (RR) soya (GM line GTS 40-3-2) were used as positive controls for CaMV 35S promoter evaluation. Contents of CaMV 35S promoter equals to RoundUp ready contents (AgBios GM Database). Reference materials BF410a ($\geq 0.03\%$ RR soya), BF410b (0.1% RR soya) and BF410d (1% RR soya) were applied in each GM papaya screening PCR. Data were evaluated as recommended the ISO Standard (EN ISO 21571:2002).

Extraction control originated from DNA isolation – microtube without any sample for DNA isolation was treated in the same way as other samples. Extraction control serve to check of DNA contamination during isolation process.

MasterMix control (no DNA in reaction) was used for checking of contamination in PCR reagent.

RESULTS AND DISCUSSION

Usually, DNA isolation protocol affect quality and quantity of resulting DNA and possible use for downstream applications (DEMEKE *et al.* 2009). As it is not trivial to isolate pure DNA from all food matrices (CHAPELA *et al.* 2007; MURRAY *et al.* 2009), three different methods for DNA isolation (CTAB, Wizard method, GeneSpin DNA Isolation Kit) from two tissues of papaya fruit (flesh and stone) and from candied papaya were tested.

When extracts were analysed on 0.8% agarose gel by electrophoretic separation, that provides qualitative information on DNA degradation extent (HÜBNER *et al.* 1999), high molecular DNAs were not visible except for DNA isolated from papaya stone by CTAB procedure (Figure 2).

Spectrophotometry acknowledges the results showing low concentration of isolated DNA at or under the LOD of the instrument. Results of gel electrophoresis, measurement of DNA quantity and the amplifiability of DNA are summarised in Table 2. As low DNA concentration at detection limit of the apparatus were reached, values reporting DNA purity (A_{260}/A_{280}) were not finally calculated.

For more detailed information, the absorption spectrum from 190 nm to 760 nm was recorded. Relevant peaks at 260 nm were noted in samples isolated by CTAB procedure from fresh fruit flesh and stones only (Figure 3).

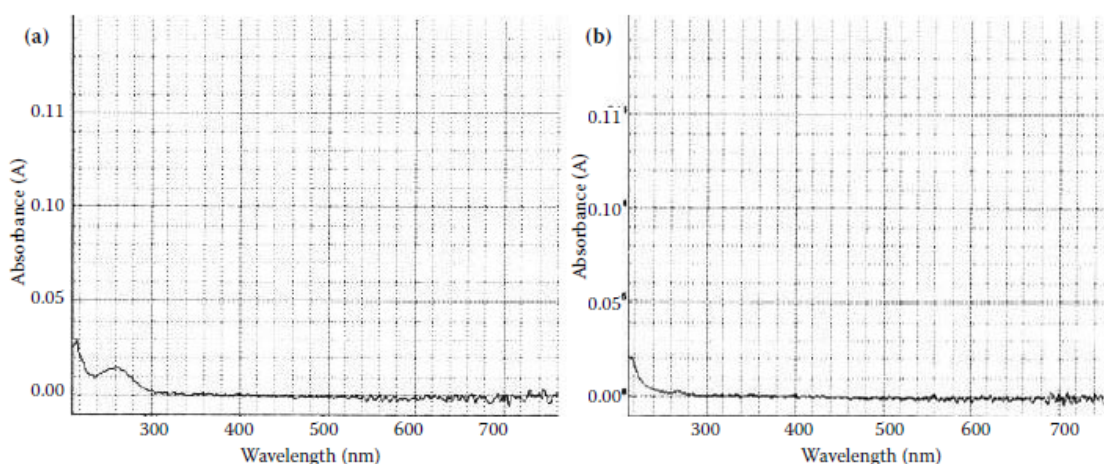


Figure 3. Absorption spectrum of CTAB isolated DNA from the papaya stone (a) and the flesh (b)



Figure 7. Amplification of CaMV 35S promoter (162 bp). Line contents: M – HindIII DNA ladder (Fermentas, Canada); 1 – $\geq 0.03\%$ positive control (BF410a); 2 – 0.1% positive control (BF410b); 3 – 1% positive control (BF410d); 4 – papaya flesh (isolation A); 5 – papaya flesh (isolation B); 6 – papaya stone (isolation A); 7 – papaya stone (isolation B); 8 – extraction control; 9 – MasterMix control



Figure 8. Amplification of CaMV 35S promoter (162 bp). Line contents: M – HindIII DNA ladder (Fermentas, Canada); 1 – $\geq 0.03\%$ positive control (BF410a); 2 – 0.1% positive control (BF410b); 3 – 1% positive control (BF410d); 4 – candied papaya (isolation A); 5 – candied papaya (isolation B); 6 – extraction control; 7 – MasterMix control

result as an appropriate control, no 35S CaMV promoter sequence was detected in any assayed papaya material (Figures 7 and 8).

CONCLUSIONS

We verified and applied suitable protocol for DNA isolation from fresh papaya fruit and optimised the protocol for amplifiable DNA isolation from candied fruits. The procedures can be successfully used for control purposes and monitoring of papaya import. No GM papaya fruits fresh or candied was found on the market.

References

ANONYMOUS (2003): EC Regulation 1829/2003: on genetically modified (GM) food and feed. Available at http://europa.eu/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_268/l_26820031018en00010023.pdf (accessed 7. 9. 2009).

ANKLAM E., GADANI F., HEINZE P., PIJNENBURG H., VAN DEN EEDE G. (2002): Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, **214**: 3–26.

AgBios GM Database: Available at www.agbios.com (accessed 7. 9. 2009).

BUSCH U., PECORARO S., POSTHOFF K. (2004): Estendorfer-Rinner S First time detection of a genetically modified papaya in Europe – Official complaint of a non authorized genetically modified organism within the EU Source. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **100**: 377–380.

BUSTIN S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169–193.

CHAPELA M.J., SOTELO C.G., PÉREZ-MARTÍN R.I., PARDO M.A., PÉREZ-VILLAREAL B., GILARDI P., RIESE J. (2007): Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*, **18**: 1211–1215.

DEMEKE T., RATNAYAKA I., PHAN A. (2009): Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *Journal of AOAC International*, **92**: 1136–1144.

EN ISO 21571:2002: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction.

FITCH M.M., MANSHARDT R.M., GONSALVES D., SLIGHTOM J.L., SANFORD J.C. (1990): Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, **9**: 189–194.

FITCH M.M., MANSHARDT R.M., GONSALVES D., SLIGHTOM J.L., SANFORD J.C. (1992): Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, **10**: 1466–1472.

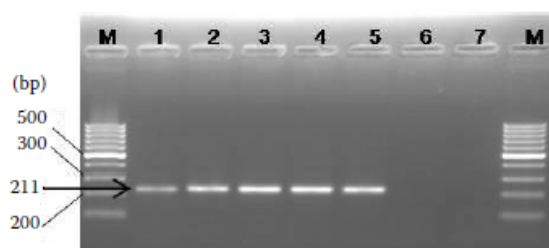


Figure 4. CTAB extracted DNAs from papaya flesh and stone – amplification of specific region of internal papain gene (211bp) is indicated by arrow. Line contents: M – HindIII DNA ladder (Fermentas, Canada); 1 – positive control; 2 – papaya flesh (isolation A); 3 – papaya flesh (isolation B); 4 – papaya stone (isolation A); 5 – papaya stone (isolation B); 6 – extraction control; 7 – MasterMix control

DNA quantity and quality are considered a basic prerequisite for successful PCR amplification (HÜBNER *et al.* 1999). A wide range of DNA concentrations can be used for qualitative PCR, quantitative PCR must use a pure DNA within a quite narrow concentration range to reach the threshold around $Ct = 22$ (Joint Research Centre 2004; YUN *et al.* 2006; SHOKERE *et al.* 2009). Otherwise DNA target gene relative concentration can not be calculated reliably (BUSTIN 2000).

Only DNAs isolated by CTAB based method from both of papaya fruit tissues (flesh and stone) were amplifiable (Figure 4). Other methods of DNA isolation did not lead to amplifiable product.

No detectable amount of DNA was isolated by CTAB or Wizard based method from candied papaya as it was shown by spectrophotometry and electrophoretic separation. No amplification by PCR was recorded when aliquotes of resulting solution were used as templates. Manufacturer's protocol recommended for GeneSpin DNA Isolation Kit did not lead to isolation of amplifiable DNA either.

Candied fruit is processed by drenching in syrup, which made the fruit to be saturated with sugar. The high sugar content probably caused that the sample mixed with lytic buffer became viscous and difficult to separate.

Therefore, manufacturer's protocol was modified. The volume of lytic buffer was increased up to 700 μ l due to consistency of resulting supernatant. The time of incubation in the buffer was increased up to 1 h along with. Resulting DNAs were not detectable by gel electrophoresis. Spectrophotometry showed presence of large mass of a stuff absorbing over estimated range (Figure 5).

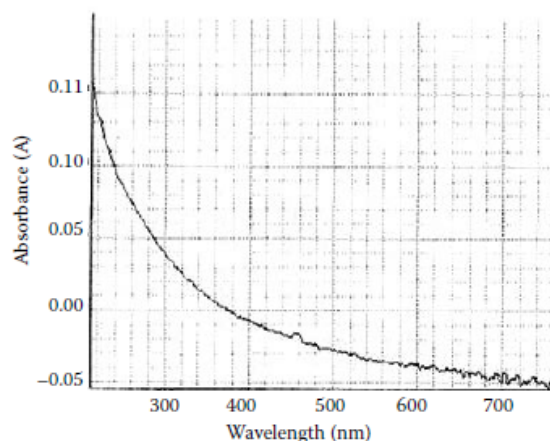


Figure 5. Absorption spectrum of GeneSpin isolated DNA from the candied papaya

Also amplification did not occurred. OGUCHI *et al.* (2009) reported absence and/or amplification inhibition of sugarbeet internal gene in extracts from different kinds of sugar. Also RICAUT *et al.* (2005) reported inhibition of PCR reaction by Maillard reaction products. To estimate possible presence of inhibitors, DNAs were diluted 10 \times and after that the reaction run over (Figure 6).

Amplifiable DNAs were tested for the presence of screening element CaMV 35S promoter as it is a part of transgene and the sequence is often for preliminary verification of transgene presence (HÜBNER *et al.* 1999) and it is involved in transgenic constructs of GM papaya (AgBios GM Database). As the detection limits of papain specific assays and CaMV 35S promoter assays are comparable (LOD = 0.05 ng), the approach can be employed for the first examination of products on the market. Although reference sample gave a positive



Figure 6. GeneSpin extracted DNAs from candied papaya – amplification of specific region of internal papain gene (211 bp) is indicated by arrow. Line contents: M – HindIII DNA ladder (Fermentas, Canada); 1 – positive control, 2 – candied papaya (isolation A); 3 – candied papaya (isolation B); 4 – extraction control; 5 – MasterMix control

- GODA Y., ASANO T., SHIBUYA M., HINO A., TOYODA M. (2001): Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **42**: 231–236.
- GONSALVES D. (1998): Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review of Phytopathology*, **36**: 415–437.
- GONSALVES D., ISHII M. (1980): Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology*, **70**: 1028–1032.
- HÜBNER P., STUDER E., HAFLIGER D., STADLER M., WOLF C., LOOSER M. (1999): Detection of genetically modified organisms in food: critical points for duality assurance. *Accreditation and Quality Assurance*, **4**: 292–298.
- Joint Research Centre (2004): Available at: <http://gmocrl.jrc.it> (accessed 7. 9. 2009).
- LIU J.F., XING D., SHEN X.Y., ZHU D.B. (2004): Detection of genetically modified organisms by electrochemiluminescence PCR method. *Biosensors & Bioelectronics*, **20**: 436–441.
- MAFRA I., FERREIRA I., OLIVEIRA M. (2008): Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, **227**: 649–665.
- MANSHARDT R.M. (1998): UH Rainbow papaya. Germplasm, G-1. Honolulu, HI: University of Hawaii College of Tropical Agriculture and Human Resources.
- MONMA K., ARAKI R., ICHIKAWA H., SATO M., UNO N., SATO K., TOBE T., KURIBARA H., MATSUOKA T., HINO A., SAITO K. (2004): Detection of genetically modified organisms from food samples obtained. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **45**: 184–190.
- MURRAY S.R., BUTLER R.C., TIMMERMAN-VAUGHAN G.M. (2009): Quantitative real-time PCR assays to detect DNA degradation in soy-based food products. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, **89**: 1137–1144.
- OGUCHI T., ONISHI M., CHIKAGAWA Y., KODAMA T., SUZUKI E., KASAHARA M., AKIYAMA H., TESHIMA R., FUTO S., HINO A., FURUI S., KITTA K. (2009): Investigation of residual DNAs in sugar from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **50**: 41–46.
- OVESNÁ J., DEMNEROVÁ K., POUCHOVÁ V. (2008): The detection of genetically modified organisms: An overview. In: TOLDRA F. (ed.): *Meat Biotechnology*. Springer, New York: 319–334.
- RAHMAT A., ROSLI R., ENDRINI S., ZAIN W.N.I.W.M., SANI A.H. (2002): Antiproliferative activity of pure lycopene compared to both extracted lycopene and juices from watermelon (*Citrullus vulgaris*) and papaya (*Carica papaya*) on human breast and liver cancer cell lines. *Journal of Medical Sciences*, **2**: 55–58.
- RICAUT F.X., KEYSER-TRACQUI C., CRUBEZY E., LUDS B. (2005): STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Science International*, **151**: 31–35.
- SHOKERE L.A., HOLDEN M.J., JENKINS G.R. (2009): Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food Control*, **20**: 391–401.
- SCHWEMBER A.R. (2008): An update on genetically modified crops. *Ciencia e Investigación Agraria*, **35**: 231–250.
- VOLLENHOFER S., BURG K., SCHMIDT J., KROATH H. (1999): Genetically modified organisms in food – screening and specific detection by polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5038–5043.
- WALL E.M., LAWRENCE T.S., GREEN M.J., ROTT M.E. (2004): Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR. *European Food Research and Technology*, **219**: 90–96.
- YUN J.J., HEISLER L.E., HWANG I.I.L., WILKINS O., LAU S.K., HYRCZA M., JAYABALASINGHAM B., JIN J., MCLAURIN J.A., TSAO M.S., DER S.D. (2006): Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **34**: e85.

Corresponding author:

RNDr. JAROSLAVA OVESNÁ, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika
tel.: + 420 233 022 424, e-mail: ovesna@vurv.cz

5.2 VLIV INHIBITORŮ NA EFEKTIVITU REAL-TIME PCR

Druhý cíl práce byl zaměřen na sledování inhibitorů real-time PCR a jejich vlivu na efektivitu reakce. Real-time PCR je po extrakci DNA návazným krokem při kvantitativní analýze GMO v potravinách a krmivech (Peano *et al.*, 2004; Moreano *et al.*, 2005, Marmimoli *et al.*, 2008, Žel *et al.*, 2012). Pro správnou kvantifikaci je velmi důležité, aby efektivita reakce byla pro všechny analyzované vzorky včetně referenčních vzorků srovnatelná a pohybovala se mezi 90-100 % (Fernandez *et al.*, 2005, Mazzara *et al.*, 2008). Jsou-li v reakční směsi přítomny inhibitory PCR, může být efektivita reakce ovlivněna, což může vést k chybnému výpočtu obsahu GMO ve vzorku, případně může být kvantifikace úplně znemožněna.

Z certifikovaného referenčního materiálu (CRM IRMM 416-3), obsahujícího 10 % GM kukuřice MON863 (MON-ØØ863-5) byla metodou CTAB extrahována DNA. V jednom případě byl pelet DNA rozpuštěn v 0,1 x TE pufru (Sigma-Aldrich, USA), v druhém případě ve vodě pro PCR. Extrahovaná DNA byla použita pro sestavení kalibrační křivky a proběhla event-specifická real-time PCR podle validované metody pro kvantifikaci GM kukuřice MON863 (Mazzara *et al.*, 2005). V případě sestavení kalibrační křivky s DNA rozpuštěnou v 0,1 x TE pufru byla efektivita reakce 76,7 % v případě taxon-specifického genu a 67,7 % v případě event-specifického úseku MON863. Výsledek se nezlepšil ani při zopakování reakce s novou sadou chemikálií. Při rozpuštění DNA ve vodě pro PCR vzrostla efektivita reakce taxon-specifického genu na 92,9 % a transgenního úseku na 90,0 %.

Druhý případ ovlivnění real-time PCR inhibitory byl zaznamenán při kvantitativní analýze GM kukuřice MON863 shodnou metodou real-time PCR. V tomto případě byla kalibrační křivka připravena s použitím barevných a čirých mikrozkumavek, určených pro molekulární biologii. Při použití barevných mikrozkumavek nebylo možné kalibrační křivku vůbec vyhodnotit, při použití čirých mikrozkumavek byla efektivita reakce pro taxon-specifický systém 89,3 % a pro transgen 90,6 %.

Výsledky byly publikovány v časopise s impakt faktorem (IF=0,602):

Hodek J, Ovesná J, Kučera L: Interferences of PCR Effectivity. Importance for Quantitative Analyses. *Czech J Food Sci.* 2009;**27**(S2):42-49.

Interferences of PCR Effectivity: Importance for Quantitative Analyses

JAN HODEK¹, JAROSLAVA OVESNÁ¹ and LADISLAV KUČERA¹

¹Department of Molecular Biology, Crop Research Institute, Prague-Ruzyně, Czech Republic

Abstract: Importance of the Polymerase chain reaction (PCR) have already crossed the border of mere target DNA sequence present or absence analysis. For number analyses e.g. Genetically Modified Organisms (GMOs) or gene expression assesment the DNA quantification is demanded. Real-time (or quantitative) PCR is the most used tool for nucleic acids quantification. PCR efficiency has relevant importance on DNA quantification – it should be almost same for each PCR and its value should varied between 90–100%. There are a lot of PCR enhancers and inhibitors well known. We described impact of used DNA solvent and used laboratory plastic on real-time PCR efficiency.

Keywords: real-time PCR; DNA quantification; PCR efficiency; GMO analysis

Deoxyribonucleic acid (DNA) is the fundamental molecule of the living cellular organisms. The main role of DNA molecules is the storage of genetic information, which is encoded by nucleotide sequence. DNA molecules are present in each cell of organism and are sequentially specific. That enable effectual usage of DNA as a target molecule for several analysis.

The basic properties of DNA was at first proved by WATSON and CRICK (1953), who first suggested structure of double-stranded DNA. The second important finding for establishing of molecular techniques was a discovery of DNA denaturation and renaturation ability (MARMUR & DOTY 1961).

The discovery of DNA polymerase chain reaction principle made possible that DNA has been universally used as a target molecule in several analyses.

Recently, PCR and another PCR-based methods have been probably most used analytical tools in molecular-biology laboratories worldwide.

PCR – historical overview, the principle

PCR is *in vitro* technique, which allows to amplify a part of DNA – the reaction may generate as many

as millions copies of a particular DNA sequence. The process of specific DNA target amplification was at first decribed by Kleppe and Khorana (KLEPPE *et al.* 1971). They use repair replication, which duplicated and then quadrupled a small synthetic molecule with the help of two primers and DNA polymerase.

However, the man, who improved PCR and made it the central technique in molecular biology was Kary B. Mullis. In year 1993 became Nobel Prize in Chemistry for his development of the Polymerase Chain Reaction. The main improvement was the incorporation of thermal cycling and using thermostable polymerase. The thermal cycling allowed the rapid and exponential amplification of large quantities of any desired DNA sequence from an extremely complex template. Using of thermostable Taq polymerase made the PCR relatively easy to done (MULLIS *et al.* 1986; SAIKI *et al.* 1988).

Thus, PCR relies on thermal cycling with three necessary steps – denaturation, annealing and extension. Denaturation step causes separation of DNA template by disrupting the hydrogen bonds between complementary bases of the DNA strands. Annealing step allows annealing of the primers to the single-stranded DNA template and in extension step the DNA polymerase synthesises a new DNA

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. 1B44068 PUV and No. MZE 0002700604.

strand complementary to the DNA template by adding dNTPs in 5' to 3' direction. Every another cycle is analog. PCR product of expected length is firstly produced at the 3rd PCR cycle. After n -cycles is reaction finished by adding some inhibitor or by cooling the reaction mixture. Schema of the PCR is shown in Figure 1.

Theoretically, the final number of PCR products is given by formula:

$$N = 2^n \quad (1)$$

where:

N – initial number of template DNA molecules

n – number of PCR cycles

This relation is valid in case of 100% efficiency of PCR. The basic components for PCR are DNA template that contains the DNA region to be amplified, two primers that are complementary to the 3' ends of each of the sense and anti-sense strand of the target on DNA template, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), which are the building blocks for new DNA strand, Taq polymerase or another thermostable DNA polymerase, Buffer solution, providing a suitable chemical environment for optimum activity and stability of the DNA polymerase and divalent cation magnesium ions and monovalent cation potassium ions as a DNA polymerase activators.

Application of PCR

From its beginning, PCR shows how strong instrument is in very different parts of DNA analysis.

In routine laboratory practise is probably most used PCR for selective amplification of a specific DNA region. In diagnostic analyses positive amplification signal confirms presence of the target region in sample DNA. Otherwise, products

of amplification could be used for subsequent work- as a hybridisation probes for Southern or Northern hybridisation or for DNA Microarrays (SOUTHERN 1975; ALWINE *et al.* 1977; VORA *et al.* 2004; LEIMANIS *et al.* 2006; XU *et al.* 2007), or as an object of Sanger sequencing (SANGER *et al.* 1977; OVESNÁ *et al.* 2000). Methods as AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) or RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), coming up from PCR, serve for genetic fingerprint generating, which is used in several techniques based on unknown DNA analysis, such a forensic techniques or in genome mapping, localisation of genetic disease genes, determination of risk for a disease and for paternity testing (Vos *et al.* 1995; POWELL *et al.* 1996; MUELLER & WOLFENBARGER 1999; LEIŠOVÁ *et al.* 2007).

Real-time PCR

Quantitative or real-time PCR is another upgrade of classical PCR. Real-time PCR is used in a lot of applications, e.g. for diagnostics of infectious diseases, cancer or genetic abnormalities, for GMO quantification or for gene expression quantification (HEID *et al.* 1996; VAITILINGOM *et al.* 1999; BUSTIN 2000; PEIRIS *et al.* 2003; HOLST-JENSEN *et al.* 2003).

By real-time PCR the increase of quantity of a PCR products during the thermal cycling could be measured. Increase of PCR product is visualised by using fluorescent dyes, such as Sybr Green, or fluorophore containing DNA probes, such as TaqMan.

Principle of fluorescent signal generation by TaqMan probes and Sybr Green demonstrate Figure 2.

Whole PCR process can be divided into three stages (Figure 3).

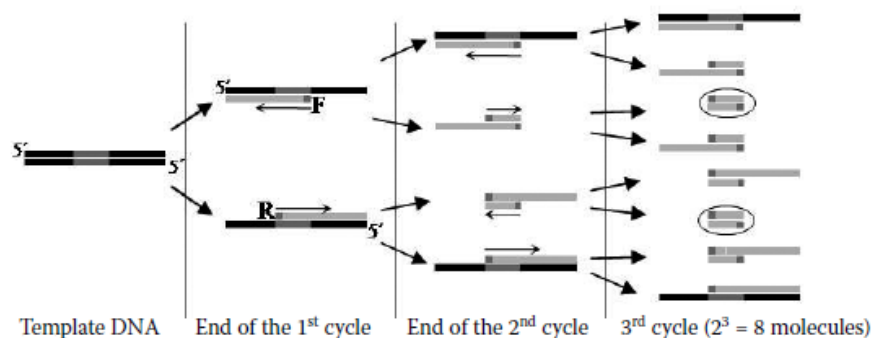
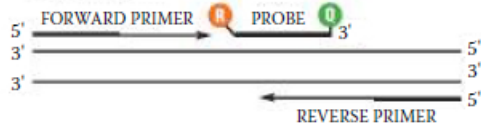


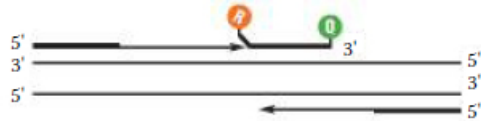
Figure 1. Schema of PCR. Target PCR product is indicated by circle

TaqMan® probe-based assay chemistry

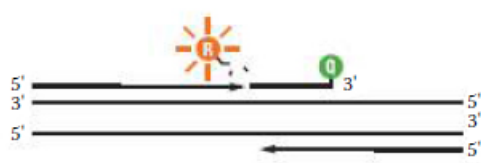
1. **Polymerisation:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



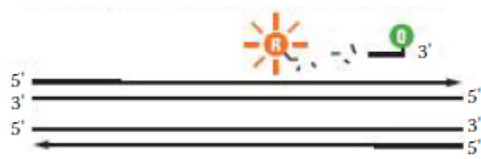
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



3. **Polymerisation completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



SYBR® green I Dye assay chemistry

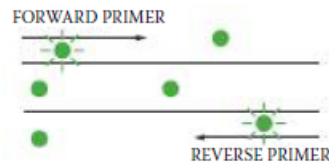
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. **Polymerisation:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. **Polymerisation completed:** When polymerisation is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.

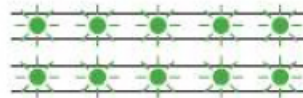


Figure 2. Principle of fluorescent signal generation using SYBR® Green or TaqMan® chemistry (source Applied Biosystems)

In the first exponential stage the PCR efficiency nears to 100% – it means that at every cycle the amount of products is doubled. This stage is used for DNA quantification. In the second linear stage the yield of PCR is highly variable. In the third stage, plateau phase, there no more products accumulate. PCR products are analysed using agarose gel upon this stage.

Efficiency of PCR drops from the exponential to the plateau stage – as the main mechanism for the attainment of PCR plateau phase is highly probable the inhibitory effect of endogenous amplicon DNA on the activity of DNA polymerase (KAINZ 2000).

The starting amount of sample DNA is evaluated on the basis of quantity PCR product in definite part

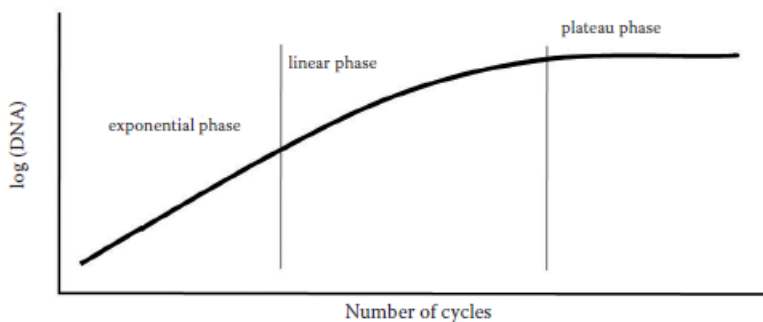


Figure 3. Diagram of PCR stages

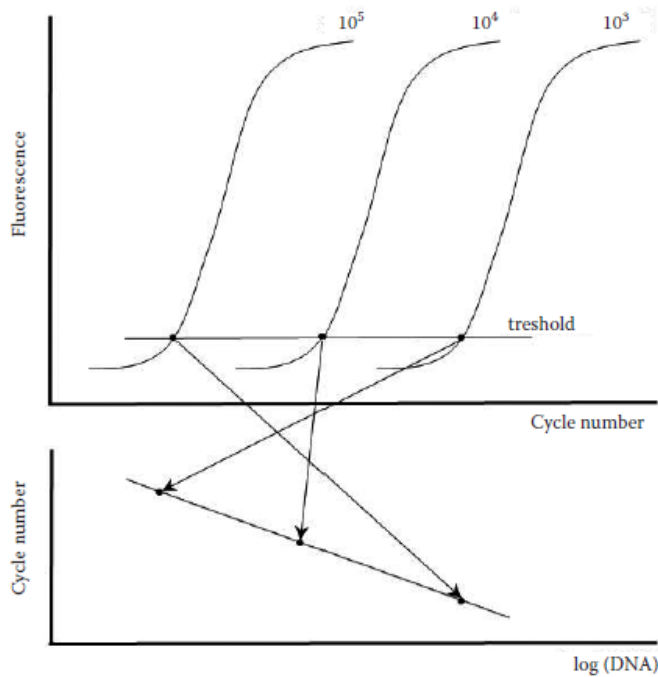


Figure 4. Calibration curve creation. Curves represent starting copy number (10^5 , 10^4 and 10^3 DNA copies) of the target DNA sequence in the reaction

of exponential amplification. A fixed fluorescence threshold is set significantly above the baseline. An intersection of threshold and increased fluorescent signal is defined as Cycle Threshold (Ct) and its value is used for DNA quantity interpolation. Diagram of calibration curve creation is shown in Figure 4.

For DNA quantification by real-time PCR it is very important to perform all reaction at the almost same efficiency. The calibration curve get the slope value from -3.6 to -3.1 when the efficiency of reaction was between 90–100%. When the efficiency of reaction was 100%, the slope of calibration curve equals -3.323 . Any problem with PCR efficiency may lead to inaccurate quantification of unknown sample.

Formula for calculation of PCR efficiency comes from the slope of calibration curve and is given by relation:

$$\text{Efficiency} = 100 - (10^{-1/\text{slope}}) \times 100 \quad (2)$$

PCR inhibitors

PCR is characterised by high sensitivity. Thus, presence of contamination and inhibitors in samples or in laboratory background represent a big problem. That is why the strict anticontamination conditions during PCR performance should be kept.

PCR inhibitors could originate from sample and its surrounding or from pre-PCR reagents. Among well-known PCR inhibitors belong e.g. agar, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ethanol, SDS (sodium dodecyl sulfate), DMSO (dimethyl sulfoxide), NaCl, phenol, proteinase K, cellulose, powder from gloves, calcium and metal cations.

MATERIAL AND METHODS

DNA isolation. DNA isolation from the certified reference material 10% MON863 (CRM IRMM

Table 1. Dilution of calibration curve from 10% MON863

Sample code	S1	S2	S3	S4	S5
Maize genome copies	102 752	25 688	6 422	1 606	401
MON863 GM copies	10 275	2 569	642	161	40

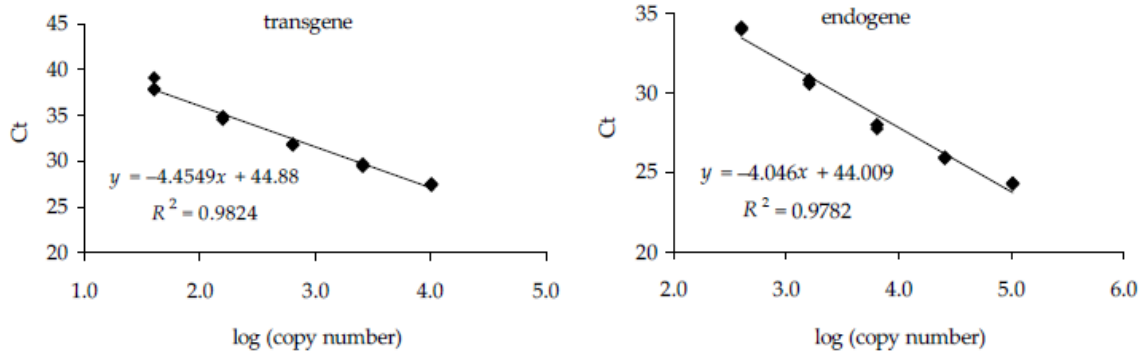


Figure 5. Calibration curve with DNA solved by TE buffer

416-3) was carried out by CTAB method (EN ISO 21571:2002). DNA was dissolved in $0.1 \times$ TE buffer.

Calibration curve construction. A calibration curve was produced by plotting Ct-values against the logarithm of the target copy number for the calibration points. The calibration curves consist of five dilutions of DNA extracted from the 10% candidate CRM IRMM-416-3. A series of one to four dilution intervals at a starting concentration of 102 752 maize genome copies was used. This corresponds to 280 ng of DNA with one maize genome assumed to correlate to 2.725 pg of haploid maize genomic DNA (ARUMUGANATHAN & EARLE 1991).

In the first real-time PCR run was used $0.1 \times$ TE buffer for series of DNA dilution, in the second real-time PCR run was for DNA dilution used water. Dilution scheme is shown in Table 1.

Real-time PCR run. Amplification reactions for real-time PCR of maize transgenic line MON863 (Joint Research Centre 2005) were performed using TaqMan PCR core reagents (Applied Biosystems, USA). Coctail PCR mixtures were prepared sepa-

rately for the maize endogenous *adh1* reference system and for transgene MON863 system. End concentrations of PCR components were follow: TaqMan Universal PCR Master Mix 1 \times ; for the reference endogenous system were used primers *adh1*-F (CCAGCCTCATGGCCAAAG) 150nM; *adh1*-R (CCTTCTTGCGGCTTATCTG) 150nM; probe *adh1* (6-FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCGT-GTTCCCT-TAMRA) 50nM; for the GMO target system MON863 were used primers MON863-F (GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC) 150nM; MON863-R(TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT) 150nM; probe MON863 (6-FAM-TGAACACCATCCGAACAAGTAGGGTCA-TAMRA) 50nM. The volume was adjusted with water for PCR to 45 μ l. Real-time PCRs were performed using 5 μ l of template DNA.

Amplification was performed in the real-time PCR equipment ABI 7900 HT (Applied Biosystems, USA) and consisted of: 2 min at 50°C; 10 min at 95°C; 45 cycles with 15 s at 95°C, 1 min at 60°C. The fluorescent signal was measured at 60°C, which is step of annealing and extension.

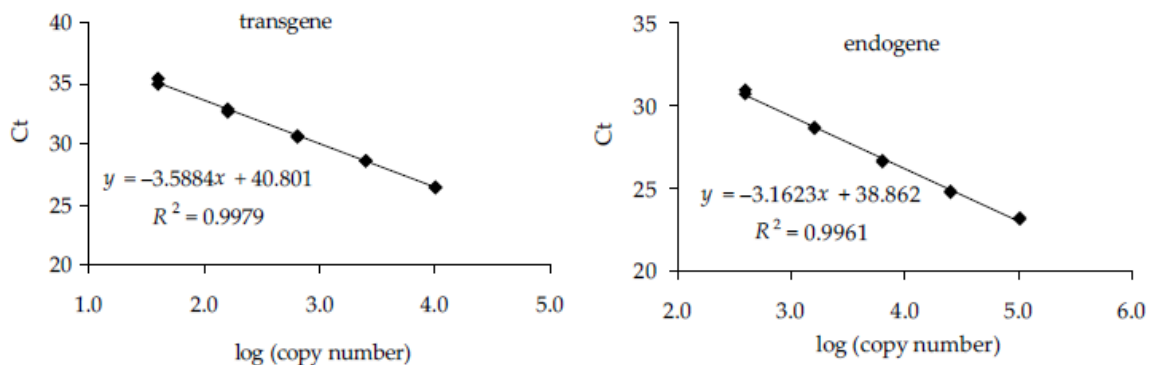


Figure 6. Calibration curve with DNA solved by water

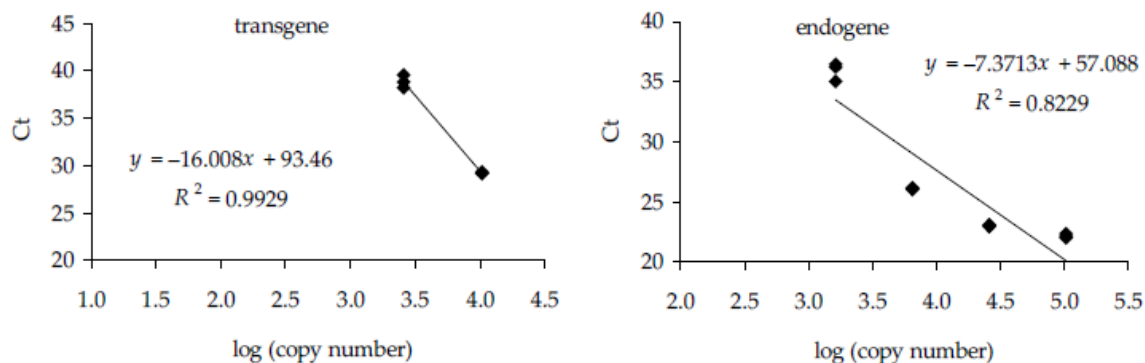


Figure 7. Calibration curve with using of colored microtubes

RESULTS AND DISCUSSION

As was mentioned above, efficiency of real-time PCRs have fundamental impact on DNA quantification. In case of poor efficiency, the calibration curve had a bad slope and the interpolation of sample quantity could be encumbered by error.

We have found two various cases when the calibration curve was affected by at first look common events. Both cases were discovered during the quantification of transgenic maize line MON863.

In the first real-time PCR calibration curves of reference endogenous and target GMO real-time PCR system seem well for the first look (Figure 5). But the slopes of both calibration curves indicate, that the PCR efficiencies are insufficient. PCR efficiencies for endogenous reference and transgenic systems were 76.7% and 67.7%, respectively.

Even new diluted calibration curve, new chemistry and another operator do not lead to better results. We used to dissolved DNA samples in $0.1 \times$ TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5). At the Skirball Institute for Biomolecular Medi-

cine (2004) was found, that although TE buffer is often used as DNA solvent, the presence of excess EDTA can result in poor sequencing results. In their experimente was shown, that one molecule EDTA chelates two molecules of Mg. The final concentration of Mg^{2+} cations have influence on the process of PCR.

On the basis of this findings we decided to change DNA solvent and use water instead TE buffer. Real-time runs with calibration curve prepared by dilution with water are shown in Figure 6.

After that, PCR efficiencies for endogenous reference and transgenic systems equal 92.9% and 90.0%, respectively.

Results of other problematic real-time PCR run for MON863 quantification is shown in Figure 7. The efficiency of PCRs is so heterogenic, that it is impossible to create calibration curve.

There was recapitulated all work procedure. At first was excluded the possibility of faulty chemistry and the fail of operator. After then we focused on used plastics and tips. We found that the samples for calibration curve were prepared in colored

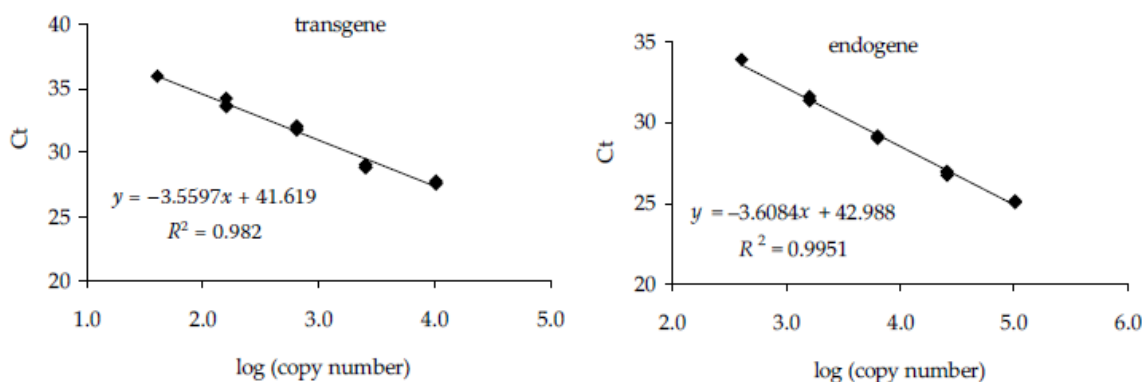


Figure 8. Calibration curve without using of colored microtubes

microtubes. These microtubes were supplied as a equivalent to non-colored tubes from a established provider. For coloration of microtubes are used several metals and there is a possibility, that in tubes some of their residues could occurred. That could affect the PCR efficiency because of the inhibitory activity of metals on PCR.

We repeated the real-time run without using of any colored microtube and the calibration curve was satisfactory as is shown in Figure 8. The real-time PCR efficiency was calculated as 89.3% for the endogenous reference system and as 90.6% transgenic system, which we rated as satisfactory.

CONCLUSIONS

The process of DNA quantification using real-time PCR is affected by several factors, starting with sample type, method of DNA extraction, quality of extracted DNA, used chemistry and good optimised reaction and ending with well prepared calibration curve. Even if it seems, that all processes and used chemistry are verified and reliable, problems could happen.

We described two accidents in real-time PCR quantification of GM maize MON863 and their solutions.

The first problem was connected with using of 0.1 × TE buffer as a solvent for DNA. It was shown, that perhaps EDTA presented in TE influences PCR effectivity and due that self DNA quantification. The problem was solved by change of DNA solvent.

The second problem was probably caused by using of colored microtubes, which are in molecular-biology laboratories commonly used. However, it was demonstrate, that perhaps residues of metals in these tubes can caused PCR inhibition.

References

- ALWINE J.C., KEMP D.J., STARK G.R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**: 5350–5354.
- ARUMUGANATHAN K., EARLE E.D. (1991): Nuclear content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9**: 208–218.
- BUSTIN S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169–193.
- EN ISO 21571:2002: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction.
- HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**: 986–994.
- HOLST-JENSEN A., RONNING S.B., LOVSETH A., BERDAL K.G. (2003): PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375**: 985–993.
- Joint Research Centre (2005): Available at: <http://gmocr.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm> (accessed 7. 9. 2009).
- KAINZ P. (2000): The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, **1494**: 23–27.
- KLEPPE K., OHTSUKA E., KLEPPE R., MOLINEUX I., KHORANA H.G. (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, **56**: 341.
- LEIMANIS S., HERNANDEZ M., FERNANDEZ S., BOYER F., BURNS M., BRUDERER S., GLOUDEM T., HARRIS N., KAEPPELI O., PHILIPP P., PLA M., PUIGDOMENECH P., VAITILINGOM M., BERTHEAU Y., REMACLE J. (2006): A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Molecular Biology*, **61**: 123–139.
- LEIŠOVÁ L., KUČERA L., DOTLAČIL L. (2007): Microsatellites as a tool to evaluate and characterise bread wheat core collection. In: BUCK H.T., NISI J.E., SALOMON N. (eds): *Wheat Production in Stressed Environments*, Vol. 12: 771–778.
- MARMUR J., DOTY P. (1961): Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, **3**: 585.
- MUELLER U.G., WOLFENBARGER L.L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**: 389–394.
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**: 263–273.
- OVESNÁ J., SVOBODOVÁ S., NOVÁKOVÁ I., DOTLAČIL L. (2000): Sequence analysis of the 5'-terminal part of

- Glu-D1 locus of landraces and old cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Cereal Research Communications*, **28**: 411–416.
- PEIRIS J.S.M., CHU C.M., CHENG V.C.C., CHAN K.S., HUNG I.F.N., POON L.L.M., LAW K.I., TANG B.S.F., HON T.Y.W., CHAN C.S., CHAN K.H., NQ W.L., LAI R.W.M., GUAN Y., YUEN K.Y. (2003): Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet*, **361**: 1767–1772
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRE C., HANAFEY M., VOGEL J., TINGEY S., RAFALSKI A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225–238.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487–491.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**: 5463–5467.
- Skirball Institute for Biomolecular Medicine (2004): Available at <http://saturn.med.nyu.edu/facilities/dna/effect.html> (accessed 7. 9. 2009).
- SOUTHERN E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**: 503–517.
- VAITILINGOM M., PIJNENBURG H., GENDRE F., BRIGNON P. (1999): Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5261–5266.
- VORA G.J., MEADOR C.E., STENGER D.A., ANDREADIS J.D. (2004): Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3047–3054.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VANDELEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995): AFLP – a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407–4414.
- WATSON J.D., CRICK F.H.C. (1953): Molecular structure of nucleic acids – a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**: 737–738.
- XU J., ZHU S.F., MIAO H.Z., HUANG W.S., QIU M.Y., HUANG Y., FU X.P., LI Y. (2007): Event-specific detection of seven genetically modified soybean and maizes using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 5575–5579.

Corresponding author:

Mgr. JAN HODEK, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Oddělení molekulární biologie, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika
tel.: + 420 233 022 279, e-mail: hodek@vurv.cz

5.3 SPOLEHLIVOST SCREENINGOVÝCH METOD PRO STANOVENÍ GMO

Třetím cílem práce bylo řešení problematiky stanovení obsahu GMO v krmivech metodou real-time PCR, založenou na kvantifikaci regulačního elementu, a možnosti vzniku falešně pozitivních výsledků. NRL mohou pro detekci a kvantifikaci GMO v potravinách a krmivech metodou PCR používat různé cílové úseky pro amplifikaci DNA. Stanovení GMO může být založené na detekci screeningových elementů, které jsou společné pro určité skupiny GMO, dále to jsou metody založené na detekci genů používaných v transgenních konstruktech, metody založené na detekci transgenních konstruktů a tzv. event-specifické metody, které umožňují amplifikaci úseku DNA na rozhraní transgenního konstruktů a vlastní DNA hostitelské rostliny. Problém detekce GMO pomocí screeningových elementů jako je 35S promotor z CaMV nebo NOS terminátor je v tom, že tyto sekvence jsou součástí organismů, které se v blízkosti zemědělských plodin přirozeně vyskytují. Při pozitivním zachytu takovéto sekvence by měla být proto vyloučena možnost, že jde o kontaminaci z přírodního zdroje (Wolf, 2000). Přesto jsou metody založené na detekci, případně kvantifikaci regulačních úseků GMO používány kvůli své rychlosti i ceně (Vollenhofer *et al.*, 1999). Pro ověření spolehlivosti určení obsahu GMO pomocí kvantifikace regulačního úseku 35S promotoru z CaMV (TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit, Applied Biosystems, USA) byla jako modelový organismus vybrána odrůda konvenční sója pěstovaná ze semen. Vzorky sóji byly odebírány na poli, během přepravy a v silu. DNA byla ze zrn sóji extrahována CTAB metodou. Analýzou obsahu GMO s použitím komerční soupravy TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit byl zjištěn negativní výsledek u vzorků odebraných přímo na poli. Spolu s postupem vzorku směrem ke skladování v silu ale procentuálně zastoupení GMO, reprezentované 35S promotorem z CaMV, rostlo. U vzorků odebraných během dopravy a ve skladovacích prostorech byl zjištěn obsah GMO přes 5 %.

Kontrolní analýza PCR i real-time PCR s amplifikací konstrukt-specifického úseku pro GM sóju Roundup Ready (Pietsch a Waiblinger, 2000) mezi genem pro tranzitní peptid z petúnie a genu EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-fosfát syntáza), který zodpovídá za toleranci ke glyfosátu Roundup, byla negativní. PCR detekce CaMV (Wolf, 2000) byla ve vzorcích pozitivní. Pro ověření, že jde o kontaminaci vzorků CaMV virem, ke které dochází během manipulací se sójou při transportu a při skladování v silu, byly vzorky odebrané v jednotlivých fázích zacházení se sójou čištěny (nejprve odstraněním veškerých úlomků a zbytků neznámého původu ze vzorku, poté ještě promytím vodou). Po opakování kvantitativní analýzy s použitím TaqMan GMO 35S Soya Detection Kitu bylo ověřeno,

že obsah GMO, prezentovaného 35S promotorem z CaMV významně klesl. Obsah GMO po manuálním odstranění botanických nečistot u vzorků, odebraných během transportu, klesl na 1,4 %, u vzorků odebraných ze sila byl obsah GMO, stanovený pomocí 35S promotoru z CaMV, vypočítán na hladině 1,7 %. Analýza byla znovu opakována, vzorky byly tentokrát před extrakcí DNA kromě odstranění botanických nečistot ještě promyty vodou. U vzorků, odebraných během transportu klesl obsah GMO (35S promotoru z CaMV) na 0,35 %, u vzorků, odebraných ze sila na 0,51 %.

Prezentované výsledky byly publikovány v časopise s impakt faktorem (IF=0,413):

Ovesná J, Kučera L, Hodek J, Demnerová K. Reliability of PCR based Screening for Identification and Quantification of GMOs. *Czech J Food Sci.* 2010;**28**(2):133-138.

Reliability of PCR based Screening for Identification and Quantification of GMOs

JAROSLAVA OVESNÁ¹, LADISLAV KUČERA¹, JAN HODEK¹ and KATEŘINA DEMNEROVÁ²

¹Department of Molecular Biology, Division of Plant Genetics, Breeding and Product Quality, Crop Research Institute, Prague-Ruzyně, Czech Republic; ²Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

OVESNÁ J., KUČERA L., HODEK J., DEMNEROVÁ K. (2010): Reliability of PCR based screening for identification and quantification of GMOs. *Czech J. Food Sci.*, 28: 133–138.

Handling with genetically modified organisms (GMOs) is regulated namely in EC. Laboratories often use polymerase chain reaction (PCR) based screening methods to monitor the presence of GM particles in food commodities as a cost effective approach. The reliability was tested of such screening using 35S CaMV promoter as the target sequences. Soya grown from non-GM cultivar as declared by a seed company was investigated after the harvest, transport to the silo, and before processing. The results based on PCR and real-time PCR analysis clearly showed that, the contamination with debris of other species, dust during transport, storage, and other kind of handling led to contamination with detectable amounts of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Impurities are allowed by EC regulations but may, as we have shown, interfere with the analytical procedures based on PCR. The identification of 35S CaMV promoter and NOS terminator in food with uncertain history and no approved specific events may indicate unknown GMOs and perhaps emergency situation.

Keywords: GMO (Genetically Modified Organism); identification; PCR; real-time PCR; screening; RR soya

Genetically modified plants (GMPs), that means plants whose genome was modified by insertion of one or more genes into the genome in a way that does not occur naturally, have become a part of the food chain worldwide and GMPs production has been constantly increasing (JAMES 2008). Compared with other parts of the world, EC has approved only a limited number of GM events, most of which are imported anyway. On the whole, European food producers reflect the sensibilities of their consumers and prefer to use GM-free ingredients, thus primarily corresponding cultivars

are used on EC farms. It is only corn MON810 which is cropped to some extent (Anonymous 2008). Although the approved GM events must be labelled on the food products containing them, in EC a tolerance of up to 0.9% exists for accidental and technically unavoidable admixtures (Commission Regulation (EC) 1829/2003). GMO handling is controlled by competent authorities in each country, and incorrect handling can lead to administrative affairs and penalties. For this reason, food producers run their own internal audits and, more commonly, submit either properly

Supported of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. 1B46068 PUV and MZE 0002700604.

sampled materials or randomly selected samples for laboratory analysis.

PCR (Polymerase Chain Reaction)-based methods have been developed and validated for the detection of GMOs and derived products in the food chain and PCR constitutes the most common approach (GARCIA-CANAS *et al.* 2004; MICHELINI *et al.* 2008). PCR, which enables multiple DNA sequences to be targeted by unique primer sets, is used not only to confirm the presence of a particular DNA sequence, but also to quantify it (ELENIS *et al.* 2008; MARMIROLI *et al.* 2008). Even several copies of target transgenes may be detected and quantified by the approved methods. Their sensitivity is given as Limit of Detection (LOD) or Limit of Quantification (LOQ), respectively. In EC such detection and quantification methods are normally validated in ring trials organised by the Community Reference Laboratory (CRL) at the Joint Research Centre in Ispra, Italy, which was established in accordance with EC regulations. The CRL is assisted by the ENGL (European Network of GMO Laboratories), which carries out validation studies in accordance with EC regulation 1829/2003. Only methods meeting the specified performance criteria are approved as suitable for the purpose (ZEL *et al.* 2008). The methods and their updates are available on the CRL website (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>).

Most EC-approved GMPs were developed using the 35S CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) promoter and/or the NOS terminator derived from *Agrobacterium tumefaciens*. These elements are present in the first generation of GM material, and they are used for GMO screening (VOLLENHOFER *et al.* 1999) and in some cases also for transgene quantification (e.g. TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit, Applied Biosystems; TaqMan GMO 35S Maize Detection Kit, Applied Biosystems). As the analysis of a specific GM event often requires multiple PCR reactions, it is expensive and time consuming. Consequently, the screening methods that only detect regulatory elements are considered more cost effective (VOLLENHOFER *et al.* 1999) when multiple samples have to be processed.

We investigated the ability of the screening methods to identify reliably the presence of GMO. We applied the method throughout the transportation/production chain from the farm to the factory. We chose soya as a model because soya is the most cultivated GM plant in the world, with 75% of the world soya production resulting from

this cultivar (Anonymous 2008). GM Roundup Ready transgene consists of 35S CaMV promoter, transit peptide, EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) tolerant to glyphosate, and NOS terminator. Although (EC) food producers generally aim to avoid GM products, the results of the screening tests show that their products are often contaminated nevertheless. The results based on such screening occasionally appear in the European rapid alert system. It was this fact that prompted our investigation.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. All samples of soya kernels originated from a field in the Czech Republic in which a non-GM cultivar was grown as declared by the seed company. The samples were taken at three sampling points: the first sample was taken directly after harvesting, prior to the kernels being loaded into trucks, the second was taken after transportation, during offloading from the trucks into a silo; and the third was taken prior to the processing of the grains in the factory. At each sampling point, triplicate samples were taken. For sampling from the end-gate grain stream, increment samples from the entire width and depth of the grain stream were collected. Double-tube compartmented probes were used to collect the increment samples from lots of grain in carloads (stationary sampling). The grains from the first parallel were ground as they were harvested. Prior to analysis, visible impurities were manually removed from the grains in the second parallel, while grains in the third parallel were manually purified, carefully washed with sterile distilled water and dried.

DNA isolation. The soya kernels were ground into a homogenous powder with an average particle size of 200 µm. The DNAs were extracted and purified in accordance with the procedure prescribed in EN ISO 21571:2002. Two independent isolations were performed from each analytical sample. DNA quality and quantity were then estimated following the procedure described in Appendix B of the same standard.

GMO detection. The ability of DNA amplification was verified using primers specific for the lectin gene. As described by VOLLENHOFER *et al.* (1999), PCR was used to detect the presence of GM elements for the 35S CaMV promoter, NOS

terminator, and EPSP synthase. The CaMV sequence itself was detected following WOLF *et al.* (2000), using 100 ng of the extracted total genomic DNA per reaction. The detection limit of the reactions was estimated as 30 copies of the target sequence with an expected confidentiality of 98% in soya flour using the equipment and personnel available in the laboratory. DNA extracted in the same way from IRMM RR soya standards ERM BF410 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were used as a control.

GMO quantification. GMO quantification was performed using the TaqMan[®] GMO 35S Soya Detection Kit on ABI 7900 HT (both Applied Biosystems, Foster City, USA). To verify the results, quantification was done using TaqMan probes specific for EPSPS (PIETSCH & WAIBLINGER 2000) with the exception of TaqMan probe labelling – VIC and FAM dyes as well. GMO content was assessed relatively using Ct of each reaction for endogene and transgene and the calibration curve developed from IRMM standards.

RESULTS AND DISCUSSION

We investigated how reliably the screening PCR-based methods may detect the accidental presence of GM material in soya, as the screening methods are most commonly used (MORISSET *et al.* 2008). With the increasing number of GMOs on the market equipped with more gene-specific regulative elements (JACOBSEN & SCHOUTEN 2007), it is clear that the exclusive use of the 35S CaMV promoter and NOS terminator in screening will lead to false negative results in the future. However, we tested whether or not the sole use of these elements can also easily produce false positives. Roundup Ready (RR) soya is the most widely cultivated GM plant variety in the world (AKHOND & MACHRAY

2009) and is used as feed and food. Its transgene consisting among others of the 35S CaMV promoter derived from the cauliflower mosaic virus, a widely occurring pathogen of the *Brassicaceae* family (HAAS *et al.* 2002); and the NOS terminator derived from the soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* (YUAN *et al.* 2008) were the analytical targets. The cauliflower mosaic virus itself is not infectious for soya, and thus should not be present in the kernel. Also *A. tumefaciens* is not expected to be part of the harvest. Therefore, a combination of two assays amplifying the 35S CaMV promoter and NOS terminator should be sufficient for detecting the presence of transgenic soya.

We analysed the soya samples taken at each stage of the transport chain from the farm to the factory. The plants were grown from the seeds of a traditional soya cultivar that had been tested negative for the presence of p35S CaMV and NOS terminator, as well as for the transgene itself (construct specific test) according to the certificate. The first samples analysed, i.e. those taken immediately after harvesting, were tested as negative, too (Table 1). However, the samples tested after the transportation in a truck, together with those tested after being stored in a silo, were both positive for the screening elements. The validated TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit using also 35S CaMV sequence as the analytical target was used to quantify the level of contamination, which was found to exceed 0.9%. The analytical parameters of the assays were found to be within the expected limits (FERNANDEZ *et al.* 2005), i.e. the slope of the calibration curve ranging from –3.1 to –3.6, Ct value for the endogen in the range 21–23, and uncertainty expressed as standard deviation was estimated to be 30% in all the samples analysed. As GM admixtures have a negative impact on the value of goods and their position in the market, we attempted to determine the cause of the con-

Table 1. p35S CaMV content (in %) in soya lots from field to processing, as detected using TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit

	Total sample	Manually purified (%)	Manually purified and washed by water (%)
Field	0	0	0
Van	over 5%	1.4	0.35
Silo	over 5%	1.7	0.51
After purification	1.5%	1.1	0.1

tamination. Using the construct specific marker system, we tested the samples for the presence of the Roundup Ready transgene itself, but the results were negative using both PCR and real-time PCR. As no other transgenic soya cultivar was in use anywhere in the world at the time, we assume that the lot could be contaminated by naturally occurring DNA sequences in the respective virus or organisms.

However, such an assumption can not be made with regards to the resulting food products of unknown history. Such products being tested positive for the screened elements and negative for the approved events should/must be considered to contain unapproved GMO and, in accordance with the current legislation, directly withdrawn from the market (Commission Regulation (EC) 1829/2003).

With the replicates of the samples taken at three different sampling points (field, van, and silo), we were able to analyse the samples from the truck and silo after purification: the remaining samples were manually purified and the debris of unknown origin was removed; additionally, the last portions were manually purified as described above, and carefully washed with sterile distilled water and dried.

All samples were subsequently subjected to analysis. Table 1 shows that the contamination percentage as detected by the kit decreased after purification.

Based on the quantification of 35S CaVM sequence, the samples taken from the van and silo were reported to be GMO positive in quantity exceeding 5%. After the analysis of the manually purified samples, the detected contamination in the van and silo samples dropped to 1.4% and 1.7%, respectively; after manual purification with washing it fell to 0.35% and 0.51%, respectively. Thus, even after such cleaning when all the impurities are removed, the analysis based on PCR screening methods results in contamination percentage still exceeding the legal limit of 0.9% for labelling (Commission Regulation (EC) 1830/2003).

As the cleaning of the kernel decreased 35S CaMV promoter sequence quantity and contamination with other transgene was not probable, we attempted at detecting the sequence of the naturally occurring virus. PCR primers were used amplifying part of the virus genome outside 35S promoter. All the positive samples were analysed and found to be contaminated with the cauliflower mosaic

virus itself, suggesting that the contamination is spread by the debris and dust of other plant species collected during the transportation and storage process (data not shown). In particular, silos are often used to store several species subsequently, thus they are difficult to remain free of the remnants of the previous species, and so admixtures are allowed to some extent. Such contamination is legal and is referred to as botanical impurities by EC legislation and may reach up to 2%. Normally, this does not have any negative impact on other properties of the lot. However, PCR is highly sensitive and, as other authors have also shown, good at detecting even the slightest amounts of specific DNA sequences (HOLST-JENSEN *et al.* 2003). DNA extracted from botanical impurities and their pathogens may interfere with the analytical procedure. Likewise, transgene specific assays using DNA originally occurring in other species as e.g. *Bacillus thuringiensis* (BRAVO *et al.* 2007) as a target may lead under some circumstances to false conclusions as well.

The indication of the presence of unauthorised or unknown GMOs leads to consequent analytical and legislative steps that have to follow. Our findings clearly show that the methods targeting the screening elements including those suited for quantification have only informative value, however, such approaches are still used (ORABY *et al.* 2005; REITING *et al.* 2007). If the individual validated event specific real-time PCR assays are used instead, the process of analysis slows down and the prices for the analysis of one sample increase. For that reason, laboratories call for simple cost effective assays as suggested e.g. by HAMELS *et al.* (2009) or CHAOUACHI *et al.* (2008). However, they need to be approved by practice. We suggest that the combination of screening and event specific methods is a possible solution. New approaches are indeed highly required to ensure food safety in EC (HOLST-JENSEN 2008).

References

- AKHOND M.A.Y., MACHRAY G.C. (2009): Biotech crops: technologies, achievements and prospects. *Euphytica*, **166**: 47–59.
- Anonymous (2008): GMO compass: http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/392.gm_maize_cultivation_europe_2008.html (Accessed 11. 3. 2009)

- BRAVO A., GILL S.S., SOBERON M. (2007): Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**: 423–435.
- CHAOUACHI M., CHUPEAU G., BERAPD A., MCKHANN H., ROMANIUK M., GIANCOLA S., LAVAL V., BERTHEAU Y., BRUNEL D. (2008): A High-throughput multiplex method adapted for GMO detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 11596–11606.
- Commission Regulation (EC) 1829/2003 on genetically modified (GM) food and feed. Available at http://europa.eu/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_268/l_26820031018en00010023.pdf (Accessed 11. 3. 2009)
- Commission Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC, http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2003/l_268/l_26820031018en00240028.pdf (Accessed 11. 3. 2009)
- ELENIS D.S., KALOGIANNI D.P., GLYNOU K., IOANNOU P.C., CHRISTOPOULOS T.K. (2008): Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**: 347–354.
- FERNANDEZ S., CHARLES-DELOBEL C., GELDREICH A., BERTHIER G., BOYER F., COLLONNIER C., COUÉ-PHILIPPE G., DIOLEZ A., DUPLAN M.N., KEBDANI N., ROMANIUK M., FEINBERG M., BERTHEAU Y. (2005): Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms, Part I: Operating procedure. *Journal of AOAC International*, **88**: 547–557.
- GARCIA-CANAS V., CIFUENTES A., GONZALEZ R. (2004): Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 425–436.
- HAAS M., BUREAU M., GELDREICH A., YOT P., KELLER M. (2002): Cauliflower mosaic virus: still in the news. *Molecular Plant Pathology*, **3**: 419–429.
- HAMELS S., GLOUDEN T., GILLARD K., MAZZARA M., DEBODE F., FOTI N., SNEYERS M., NUEZ T.E., PLA M., BERBEN G., MOENS W., BERTHEAU Y., AUDEON C., VAN DEN EEDE G., REMACLE J. (2009): A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. *European Food Research and Technology*, **228**: 531–541.
- HOLST-JENSEN A. (2008): GMO testing – trade, labeling or safety first? *Nature Biotechnology*, **26**: 858–859.
- HOLST-JENSEN A., RONNING S.B., LOVSETH A., BERDAL K.G. (2003): PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375**: 985–993.
- JACOBSEN E., SCHOUTEN H.J. (2007): Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology*, **25**: 219–223.
- JAMES C. (2008): Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. Brief No. 39, ISAAA SEAsiaCenter, c/o IRRI, DAPO.
- MARMIROLI N., MAESTRI E., GULLI M., MALCEVSCI A., PEANO C., BORDONI R., DE BELLIS G. (2008): Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**: 369–384.
- MICHELINI E., SIMONI P., CEVENINI L., MEZZANOTTE L., RODA A. (2008): New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**: 355–367.
- MORISSET D., STEBIH D., CANKAR K., ZEL J., GRUDEN K. (2008): Alternative DNA amplification methods to PCR and their application in GMO detection: a review. *European Food Research and Technology*, **227**: 1287–1297.
- ORABY H.A.S., HASSAN A.A., ABOU MOSSALLAM A.A. (2005): Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3 , terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**: 1974–1980.
- PIETSCH K., WAIBLINGER H.U. (2000): Quantification of genetically modified soybeans in food with the LightCycler system. In: MEUER S., WITTEWER C., NAKAGAWARA K. (eds): *Rapid Cycle Real Time PCR – Methods and Applications*. Springer Verlag, Heidelberg.
- REITING R., BROLL H., WAIBLINGER H.U., GROHMANN L. (2007): Collaborative study of a T-nos real-time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit-Journal for Consumer Protection and Food Safety*, **2**: 116–121.
- VOLLENHOFER S., BURG K., SCHMIDT J., KROATH H. (1999): Genetically modified organisms in food – Screening and specific detection by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5038–5043.
- WOLF C., SCHERZINGER M., WURZ A., PAULI U., HUBNER P., LUTHY J. (2000): Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *European Food Research and Technology*, **210**: 367–372.

- YUAN Z.C., HAUDECOEUR E., FAURE D., KERR K.F., NESTER E.W. (2008): Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cellular Microbiology*, **10**: 2339–2354.
- ZEL J., MAZZARA M., SAVINI C., CORDEIL S., CAMLOH M., STEBIH D., CANKAR K., GRUDEN K., MORISSET D., VAN DEN EEDE G. (2008): Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: An example of laboratories testing for genetically modified organisms. *Food Analytical Methods*, **1**: 61–72.

Received for publication March 27, 2009
Accepted after corrections August 16, 2009

Corresponding author:

RNDr. JAROSLAVA OVESNÁ, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Odbor genetiky, šlechtění a kvality produkce, Oddělení molekulární biologie, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika
tel.: + 420 233 022 424, e-mail: ovesna@vurv.cz

5.4 VÝVOJ A VERIFIKACE METODY REAL-TIME PCR PRO KVANTIFIKACI HRACHU SETÉHO

Čtvrtým cílem práce byl vývoj a ověření referenčního systému pro real-time PCR detekci taxon-specifického genu hrachu setého (*Pisum sativum*). Kvantifikace obsahu GMO v potravinách a krmivech se provádí amplifikací dvou cílových úseků DNA. Jeden úsek je specifický pro transgenní DNA, druhý úsek reprezentuje taxon-specifický fragment hostitelské DNA. Množství GMO ve vzorku se vypočítá na základě poměru obsahu GM plodiny ke složce obsahu konvenční plodiny. Vývoj referenčního systému je nezbytný krok pro možnost kvantifikace GM plodiny daného taxonu metodou real-time PCR, přičemž příprava GM hrachu na různých pracovištích probíhá. Práce začala návrhem cílového úseku DNA pro PCR amplifikaci. Jako cílový taxon-specifický gen hrachu setého byl vybrán *lectin*, který se v genomu hrachu vyskytuje v jedné kopii a ve veřejně dostupných databázích je dostatek informací o jeho DNA sekvenci (Gatehouse *et al.*, 1987, Kaminski *et al.*, 1987, Chrispeels a Raikhel, 1991, Galasso *et al.*, 2004, Lioi *et al.*, 2005). Dostupné DNA sekvence genu *lectin* hrachu setého byly analyzovány *in silico*, byl vybrán konzervativní úsek DNA o délce 658 bp a byly navrženy primery pro jeho amplifikaci. Specifický úsek DNA genu *lectin* hrachu setého byl vložen do plasmidového vektoru a klonován do kompetentních buněk *E. coli* s použitím komerční soupravy TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, USA). Vložený úsek DNA v plasmidu byl ověřen sekvenací, *in silico* analýzou byl metodou BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) porovnán s podobnými sekvencemi příbuzných rostlin čeledi *Fabaceae* (bobovité). Napříč dostupnými sekvencemi genu *lectin* hrachu setého byly vybrány konzervativní úseky DNA. Pro tyto sekvence byly navrženy primery pro amplifikaci 101 bp dlouhého úseku DNA. Navržené primery byly testovány pro kvantitativní stanovení hrachu setého metodou real-time PCR s použitím SYBR Green detekce. Připravená plasmidová kontrola byla ověřena pro použití jako referenční materiál při kvantifikaci. Byla ověřena CTAB metoda extrakce DNA ze semen hrachu setého a semen příbuzných bobovitých rostlin, vikve, sóji, čočky a fazolu. S použitím třinácti kultivarů hrachu setého a čtyř rostlin řádu *Fabaceae* byla ověřena specifita reakce. LOD reakce s použitím detekční metody SYBR Green byla stanovena na 40 kopií DNA a LOQ byla stanovena na 160 kopií DNA hrachu setého.

Výsledky byly publikovány v časopise s impakt faktorem (IF=0,685):

Vráblík A, Hodek J, Soukup J, Demnerová K, Ovesná J. Development and Verification of PCR based Assay to Detect and Quantify Garden Pea *lec* Gene. *Czech J Food Sci.* 2012;**30**(3):247-257.

Development and Verification of PCR based Assay to Detect and Quantify Garden Pea *lec* Gene

ALEŠ VRÁBLÍK^{1,2,3}, JAN HODEK¹, JOSEF SOUKUP², KATEŘINA DEMNEROVÁ³
and JAROSLAVA OVESNÁ¹

¹Department of Molecular Biology, Crop Research Institute, Prague, Czech Republic;

²Department of Agroecology and Biometeorology, Czech University of Life Sciences Prague,

Prague, Czech Republic; ³Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

VRÁBLÍK A., HODEK J., SOUKUP J., DEMNEROVÁ K., OVESNÁ J. (2012): Development and verification of PCR based assay to detect and quantify garden pea *lec* gene. Czech J. Food Sci., 30: 247–257.

Genetically modified organisms (GMOs) entering the food chain have become its part, which is necessary to monitor. GMO analyses are used as a control mechanism according to valid acquis communautaire for traceability and labeling of GMOs. Generally, approved PCR based protocols are used and they require stepwise procedures that use amplification of species specific gene as initial point. This study aims to develop and verify PCR based assay for amplification of garden pea lectin gene (*Pisum sativum* L.) as reference one. Lectin gene was analysed *in silico*, selected region was amplified and sequenced and new set of species specific primers for identification of garden pea was designed. Conditions of conventional PCR as well as real-time PCR were optimised and specificity of new primer set on DNA extracted from garden pea cultivars as well as DNA extracted from other selected species from *Fabaceae* family was tested. Quantification of garden pea lectin gene using real-time PCR based on SYBR Green I was optimised and performance characteristics recorded. The characteristics fit to method acceptance criteria range. Plasmid with garden pea lectin sequence was developed and plasmid is available as a positive control.

Keywords: GMO; lectin; PCR detection; real-time PCR

There are three fundamental types of agriculture in Europe considered. Conventional agriculture, ecological agriculture and GM (genetic modified) plants cultivation. Coexistence measures must be applied for these three types of agricultural.

Basic rules are carried out by technical and agronomical arrangements, e.g. use of buffer zones with specific variety structure, registry of GM plants cultivation, establish of GM plants cultivation methods and accidental admixtures of

GM and non-GM crops definition. Regulation are in place for GM derived food and feed (e.g. EU Regulations – EC 1829/2003 and EC 1830/2003). Methods are in place that allows efficient control of in EU approved GMO.

The most used methods for GMO detection in food and feed are based on Polymerase Chain Reaction (PCR). Principles of these methods are described in the international standards (e.g. EN ISO 21571:2005) and validated protocols are avail-

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Projects No. 0002700604 and No. QI101B267, by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Projects No. OC09031 and No. MEB091010.

able on the JRC (Joint Research Centre) website covering mostly GM soybean, maize, cotton, rapeseed or rice (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm> – accessed 27. 7. 2011).

DNA extraction from representative samples constitutes the first step of PCR based GMO analysis. The DNA should meet certain criteria for further analysis. Several procedures have been described that allow efficient DNA extraction (EN ISO 21571:2005; ENGL 2008). Among them extraction exploiting selective precipitation in cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (MURRAY & THOMPSON 1980) was found to be an appropriate method, which is in line with preceding recommendation for DNA isolation from plants containing higher content of polysaccharides, lipids and polyphenols (POREBSKI *et al.* 1997; OVESNA *et al.* 2010).

After DNAs are isolated, they are subjected either to conventional or real-time PCR. In both cases, DNA amplifiability is verified by plant/species specific gene(s) amplification. This procedure is used for verifying if the PCR ran through and for the control of false negatives results in further analyses (HEMMER 1997).

In real-time PCR, nucleic acid increase is measured and the standard curve is used as a reference standard for extrapolating quantitative information for starting amount of nucleic acid (PAOLETTI *et al.* 2006). The resulting percentage of GMO in the sample is then calculated from the proportion of species-specific (endogenous) DNA and the transgenic target.

For correct GMO quantification, the reaction has to be fully optimised and reaction efficiency should reach at least 90% (QUERCI *et al.* 2005). The PCR efficiency can be affected by several factors as e.g. primer design, composition of reaction mixture, reaction profile and presence of inhibitors/enhancers (HOLST-JENSEN *et al.* 2006; HODEK *et al.* 2009; BERGEROVÁ *et al.* 2011).

As increasing number of various GM plants has appeared in the environment released deliberately for research or commercial purposes, appropriate assays are required for efficient control.

Also garden pea (*Pisum sativum* L.) has been already transformed and the cultivars are undergoing field tests (RAKOUSKY *et al.* 2004; ŠVÁBOVÁ *et al.* 2005).

Development of PCR based assay for detection and quantification of garden pea species specific gene, verification of method performance and specificity was the main aim of the study.

A gene coding for lectin was selected as multiple sequencing data were available in the databases (CHRISPEELS & RAIKHEL 1991; LIOI *et al.* 2005). Moreover, garden pea lectin is a one-copy gene (GATEHOUSE *et al.* 1987; KAMINSKI *et al.* 1987; GALASSO *et al.* 2003) and amplification of part of pea lectin gene as a control element was already used in several studies (BREŽNÁ *et al.* 2006; HRNČIROVÁ *et al.* 2008).

MATERIAL AND METHODS

Plant material. The 13 cultivars of commercially available pea (*Pisum sativum* L.) seeds (Raman, Alderman, Arvika, Bajka, Hero, Dalila, Havel, Oskar, Pegaz, Rondo, Kelvedon Wonder, Ambrosia and Delikata) and selected species of the pea family (*Fabaceae*) vetch (*Vicia villosa* ROTH), soybean (*Glycine max* L.), lentil (*Lens culinaris* Med.), mung bean (*Vigna radiata* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) were used. All used seeds were stored at room temperature until processed.

DNA isolation. Seeds were ground in liquid nitrogen to obtain a homogenous powder. The CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) method for DNA extraction was performed according ISO standard (EN ISO 21571:2005). DNA was extracted from 200 mg of powdered sample. Two independent extractions were performed from each sample. Extracted DNAs were eluted in 60 µl of ultrapure DNA and RNA free H₂O.

The extraction of plasmid DNA was performed using High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland).

Assessment of DNA quality. The quality of extracted DNA (its integrity and rough estimation of quantity) was evaluated using electrophoretic separation on 0.8% agarose gel with ethidium bromide staining. The spectrophotometer NanoPhotometer (Implen GmbH, Munich, Germany) was used for measurement of DNA quantity. Absorption at 260 and 280 nm was measured and the spectra profile (from 190 nm to 760 nm) was recorded. DNA quantity was calculated from the absorption at wavelength 260 nm and DNA purity calculation was based on A_{260}/A_{280} ratios.

Primers design. Free-software Primer3Plus was used for oligonucleotide primer designing (UNTERGASSER *et al.* 2007). First, primers for amplification of 658 bp long part of pea lectin gene (primers Lec658) were designed according to DNA sequence

Table 1. Primers used in PCR

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Product size (bp)	Source
Pla F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	ca 600	TABERLET <i>et al.</i> (1991)
Pla R	GGGGATAGAGGGGACTTGAAC		
Lec658 F	CCGAACAACCTCGAAGAAATAC	658	this paper
Lec658 R	ACTCTGCGCTATTGAAAACCTCC		
Lec101 F	CCCAGCAACAAAACCTAAT	101	this paper
Lec101 R	TAGAGGGCTCTGCCAACAGT		

of pea lectin (EU825771.1). Amplicons were used for cloning and for subsequent DNA sequencing.

Primers Lec101 were designed according to sequenced DNA of 658 bp long part of pea lectin gene. Primers Lec658 and Lec101 are shown in Table 1.

The specificity of primers Lec101 was analysed *in silico* in ClustalW2 free-software for the multiple sequence alignment and in free accessible database of the Center for Biotechnology Information (NCBI) with using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). Amplification reactions (25 µl) were performed using AmpliTaq Gold PCR reagents (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). For the verification of DNA amplifiability of all samples used in this study, primers (Pla primers) for amplification of specific region within gene coding plastid t-RNA were used (TABERLET *et al.* 1991) (Table 1).

PCR for preparation of 658 bp long part of pea lectin gene (with Lec658 primers) was performed with DNA extracted from seeds of garden pea cv. Raman.

PCR with Lec101 primers was used for reaction specificity test with all samples used in this study (all garden pea cultivars as well as chosen species belonging to the family *Fabaceae*).

Final concentration of PCR's components were as follow: Gold buffer 1×, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs (Fermentas, Burlington, Canada) 0.2mM, AmpliTaq Gold polymerase 1U, and primers both of Pla primers 0.5µM, both of Lec658 primers 0.5µM or both of Lec101 primers 0.24µM. The volume was adjusted with water for PCR to 20µl. PCR was performed using 5µl of template DNA. Several controls were included in each reaction set – positive control of PCR run, control of extraction reagents (CTRL EX) and control of amplification reagents (CTRL MM and CTRL MM open).

All reactions were performed in an MJTB-96 PCR thermal cycler (MJ Research, Watertown, USA) and the thermal profile was: 12 min at 95°C; 40 cycles at 95°C for 30 s, at 60°C for 30 s (Pla primers and Lec658 Primers) or at 65°C for 30 s (Lec101 primers), at 72°C for 30 s and final extension was at 72°C for 10 minutes. Used primers were distributed by GENERI BIOTECH, s.r.o. (Hradec Králové, Czech Republic).

Results of PCR were visualised using electrophoretic separation on 2% agarose gel with ethidium bromide staining.

Cloning. Positive plasmid control (Plasmid658) was prepared by cloning of 658 bp long amplicon of pea lectin gene. Cloning was performed using TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, Grand Island, USA). Plasmids were linearised with the restriction enzyme *Hind*III (Fermentas, Burlington, Canada) before using in PCR – circular form of plasmid is not appropriate for that purpose (HOU *et al.* 2010).

DNA sequencing. Plasmid658 was used for DNA sequencing 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). The sequencing was performed using BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's protocol. The sequencing reaction was performed independently twice with forward primer Lec658 and independently twice with reverse primer Lec658.

Real-time PCR. Real-time PCR was performed with Lec101 primers in the 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). All reactions were done in triplicates using SYBR® Green (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) detection. Final concentration of real-time PCR's components were as follow: SYBR® Green 1×, both of Lec101 primers 0.05µM, volume was adjusted with water for PCR to 45 µl. The thermal profile of real-time PCR consisted of 10 min at 95°C; 35 cycles at 95°C for 15 s, and at 60°C for 45 seconds.

Real-time PCR characterisation. The occurrence of inhibitions or enhancers was controlled using 10-fold dilution of template DNA, when the difference between Ct values in no inhibited reaction should be around 3.3 Ct.

The real-time PCR efficiency was determined for genomic DNA as a template using serial of dilutions. The starting amount of DNA in reaction was 200 ng (corresponding to approx. 41 000 DNA copies; BENNET & SMITH 1976), sample was diluted 4-times with ultrapure H₂O for PCR at ratio of 1:3. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were defined. Specificity of used primers Lec101 was tested in real-time PCR with all of used samples in this study (all garden pea cultivars and chosen species belonged to the family *Fabaceae*).

Efficiency of reaction was calculated according to the formula:

$$\text{Efficiency} = 100 - \text{ABS} (100 - (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100) \quad (1)$$

Data from 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) were evaluated in Microsoft Office Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

The CTAB method was proved to be suitable for DNA extraction from seeds of the *Fabaceae* family. CTAB based method thus represents an adequate alternative to GeneSpin protocol exploited by e.g. BREŽNÁ *et al.* (2006). DNA amplifiability that serves an independent check of its quality was verified using a tRNA-leu specific PCR assay (TABERLET *et al.* 1991) and confirms required DNA purity.

Using cv. Raman DNA as a template in PCR with Lec658 primer pair we amplified 658 bp long fragments. Fragments were cloned into the plasmid vector to prepare Plasmid658 control DNA. Insert representing part of the lectin gene in the Plasmid658 was sequenced and DNA sequences were *in silico* analysed against NCBI database. Results confirm 100% homology for all of 658 nts with genomic DNA sequence of *Pisum sativum* L. lectin gene (EU825771.1, X66368.1), 98% homology (646/658 nts identity) was observed with genomic DNA sequence of *Pisum sativum* L. lectin gene

Table 2. Accession numbers of nucleotide sequences used for testing of Lec101 primers specificity

Accession number	Description
EU825771.1	<i>Pisum sativum</i> lectin (<i>psl</i>) gene, complete cds
X66368.1	<i>Pisum sativum</i> <i>psl</i> gene for Psl lectin
Y00440.1	<i>Pisum sativum</i> <i>lecA</i> gene for lectin
M18160.1	Pea <i>PSLI</i> gene encoding lectin, complete cds
J01254.1	pea lectin (alpha and beta subunits) mRNA
HQ337024.1	<i>Pisum sativum</i> lectin gene, 5' upstream region
AY342212.1	<i>Glycine max</i> lectin (<i>Le2</i>) gene, complete cds
HM348715.1	<i>Vigna radiata</i> cv. Wilczek lectin gene, complete cds
AJ277588.1	<i>Vigna unguiculata</i> partial mRNA for lectin (<i>lec</i> gene)
AJ920065.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> partial <i>lec1</i> gene for lectin precursor
AJ318222.2	<i>Lens odemensis</i> lectin gene, clone Ode9-1
AJ318220.2	<i>Lens ervoides</i> lectin gene, clone Erv6-22
AJ419573.2	<i>Lens lamottei</i> lectin gene
AJ318221.3	<i>Lens nigricans</i> lectin gene, clone Nig7-42
AJ421799.2	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>tomentosus</i> lectin gene
AJ318219.2	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>orientalis</i> lectin gene, clone Ori4-31
AJ318218.2	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i> lectin gene, cv. Eston, clone Est1-17
AJ318217.2	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i> lectin gene, cv. Laird, clone Lai2-71
DQ005103.1	<i>Lens culinaris</i> cv. L-4076 lectin mRNA, complete cds
AJ318216.1	<i>Lens culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i> lectin gene, partial
AJ438490.2	<i>Vicia faba</i> <i>lec2</i> gene for lectin
AJ438593.2	<i>Vicia faba</i> <i>lec1</i> gene for lectin


```

CCGAAACAACCTCGAAGAAATACAAGTTATTTACATGCAAAAATATATAGTAATAAAATAAACTAGTTAAACAAAATACAATATTTTTGTCT
TCAAAAGAAGATTCGATGGACGGTAGAAAATGATGGGACATGGTGTGTATATGTGTTTCATTGTAACGCACATATAAAGACACGTAGAATGAGT
CATCACCACATATAAACAAGTAGCATGCATGCATGCATGCAATTATAACCAATAATGGCTTCTCTTCAAACCCAAATGATCTCGTTCATGCG
ATATTTCTATCCATTCTCTTAACAACAATCCTTTTCTTCAAGGTGAACCTCAACTGAAACCACCTTCTTCTTGATCACCAAGTTCCAGCCCGACC
AACAAAACCTAATCTTCCAAGGAGATGGCTATACCACAAAAGAGAAGCTGACACTGACCAGGCAGTAAAGAACACTGTTGGCAGAGCCCTCTA
TTCTCACCATCCATATCTGGGATAGAGAAACAGGCAACGTTGCTAATTTGTAACTTCTTCACTTTTGTGCATAAATGCACCCAAACAGTTAC
AACGTTGCCGACGGGTTTACGTTCTTCATCGCACCCTGTAGATACTAAGCCGACAGCCGGCGGTGGATATCTCGGAGTTTTCAATAGCGCAGAGT
    
```

Figure 1. DNA sequence of 658 bp long part of garden pea lectin gene. Part 5'-upstream region DNA is labelled black, the exon part of lectin gen is without labelling. Target regions for Lec101 primers are labelled with a black line

Y00440.1 (recorded DNA sequence contained 12 nts deletion compared to our DNA sequence), 98% homology (651/661 nts identity) was observed with mRNA sequence of *Pisum sativum* L. lectin gene M18160.1 and the 98% homology (414/415 nts identity) was observed with mRNA sequence of *Pisum sativum* L. lectin gene J01254.1.

The results document that this sequence fragment corresponding to the garden pea (*Pisum sativum* L.) lectin gene is highly conservative and thus suited for designing of specific primers. Sequenced

DNA includes border part of 5'-upstream region DNA (labeled black) with the exon part of lectin gene (Figure 1).

Primers Lec101 were designed to be specific to the exon part of lectin gene. Specificity of Lec101 primers was tested: (1) *in silico* by comparison with NCBI recorded DNA sequences corresponding to lectin gene in tested species of the family *Fabaceae* (Table 2); (2) experimentally in the conventional PCR after the assay had been optimised.

Plasmid658	-----AAAAAT-IGATA-TACTAT-----TTAA-ACTG 92
gi 311221585 gb HQ337024.1	-----AAAAAT-IGATA-TACTAT-----TTAA-ACTG 92
gi 194460511 gb EU825771.1	-----AAAAAT-IGATA-TACTAT-----TTAA-ACTG 92
gi 562782 emb X66368.1	-----AAAAAT-IGATA-TACTAT-----TTAA-ACTG 1372
gi 26800841 emb AJ318218.2	GCCCGACCAATCAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 26800839 emb AJ318217.2	GCCCGACCAATCAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 62910854 gb DQ005103.1	GCCCGACCAATCAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 14488167 emb AJ318216.1	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 142
gi 308944133 gb HM348715.1	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 257
gi 26800843 emb AJ318219.2	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 26986101 emb AJ421799.2	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 26800849 emb AJ318222.2	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 26986099 emb AJ419573.2	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 26800845 emb AJ318220.2	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 26800847 emb AJ318221.3	GCCCGACCAACAAAACC-TTATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 169
gi 32468855 emb AJ438490.2	GCCCGACCAACCAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 172
gi 32468857 emb AJ438593.2	GCCCGACCAACCAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAC-ACCA 172
gi 20769 emb Y00440.1	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAT-ACCA 641
gi 169111 gb J01254.1 FEALEC	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAT-ACCA 187
gi 169112 gb M18160.1 FEALECB	GCCCGACCAACAAAACC-TAATC-ITCCAAGGAGATGG--CTAT-ACCA 631
gi 122688424 emb AJ920065.1	-----
gi 42794341 gb AY342212.1	TGCCAACCACCGAACCCCTGATC-CTC-AAGGAGACGCCCTTGTGACCT 225
gi 27529072 emb AJ277588.1	ATTCGATAGGTCAAAAC-TAACAGTTACA-----CATTACTA 167
Plasmid658	CTTGATCACCAGTTCAGCCCGACCAACAAAACCTAATCTTCCAAGGAG 1011
gi 311221585 gb HQ337024.1	-----
gi 194460511 gb EU825771.1	CTTGATCACCAGTTCAGCCCGACCAACAAAACCTAATCTTCCAAGGAG 1011
gi 562782 emb X66368.1	CTTGATCACCAGTTCAGCCCGACCAACAAAACCTAATCTTCCAAGGAG 2288
gi 26800841 emb AJ318218.2	-----
gi 26800839 emb AJ318217.2	-----
gi 62910854 gb DQ005103.1	-----
gi 14488167 emb AJ318216.1	-----
gi 308944133 gb HM348715.1	-----
gi 26800843 emb AJ318219.2	-----
gi 26986101 emb AJ421799.2	-----
gi 26800849 emb AJ318222.2	-----
gi 26986099 emb AJ419573.2	-----
gi 26800845 emb AJ318220.2	-----
gi 26800847 emb AJ318221.3	-----
gi 32468855 emb AJ438490.2	-----
gi 32468857 emb AJ438593.2	-----
gi 20769 emb Y00440.1	GGCAATGGGACATGCATACTCCGGGGCAGAGACACCTTGTITTTGTATCC 1611
gi 169111 gb J01254.1 FEALEC	-----
gi 169112 gb M18160.1 FEALECB	GGCAATGGGACATGCATACTCCGGGGCAGAGACACCTTGTITTTGTATCC 1600
gi 122688424 emb AJ920065.1	-----
gi 42794341 gb AY342212.1	-----
gi 27529072 emb AJ277588.1	-----

Figure 2. The alignment of forward primer Lec101 with sequences of the lectin gene of selected species of the family *Fabaceae*. Target sequence for the primer is underlined. Mismatches in target sequences are labelled in a black box

Plasmid658	CGAG--AG---TTTTGTTTCTGA---AG---GTIAAAAATA----- 122
gi 311221585 gb HQ337024.1	CGAG--AG---TTTTGTTTCTGA---AG---GTIAAAAATA----- 122
gi 194460511 gb EU825771.1	CGAG--AG---TTTTGTTTCTGA---AG---GTIAAAAATA----- 122
gi 562782 emb X66368.1	CGAG--AG---TTTTGTTTCTGA---AG---GTIAAAAATA----- 1402
gi 26800841 emb AJ318218.2	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 213
gi 26800839 emb AJ318217.2	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 213
gi 62910854 gb DQ005103.1	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 213
gi 14488167 emb AJ318216.1	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 186
gi 308944133 gb HM348715.1	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 301
gi 26800843 emb AJ318219.2	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 213
gi 26986101 emb AJ421799.2	CAAA--AGGGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 213
gi 26800849 emb AJ318222.2	CGAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 213
gi 26986099 emb AJ419573.2	CGAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 213
gi 26800845 emb AJ318220.2	CGAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 213
gi 26800847 emb AJ318221.3	CAAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 213
gi 32468855 emb AJ438490.2	CAAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 216
gi 32468857 emb AJ438593.2	CAAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAGCA---CTGTT 216
gi 20769 emb Y00440.1	CAAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 685
gi 169111 gb J01254.1 PEALEC	CAAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 231
gi 169112 gb M18160.1 PEALECB	CAAA--AGAGAAGTTGACACTGACCAAGGCAGTAAAGAACA---CTGTT 675
gi 122688424 emb AJ920065.1	
gi 42794341 gb AY342212.1	CATC--GAGAAAGTTACAACTCACCAAGGTTGACGAAAGCGAGGTTCTCT 273
gi 27529072 emb AJ277588.1	CGAGCAAAAATGCTATCACAACT--AGCTTCTTCCACATT---CTGC- 211
Plasmid658	-----AATCCCT--TC---AGTTTAA--TGACGTGTA--GTT----- 152
gi 311221585 gb HQ337024.1	-----AATCCCT--TC---AGTTTAA--TGACGTGTA--GTT----- 152
gi 194460511 gb EU825771.1	-----AATCCCT--TC---AGTTTAA--TGACGTGTA--GTT----- 152
gi 562782 emb X66368.1	-----AATCCCT--TC---AATTTAA--TGACGTGTA--GTT----- 1432
gi 26800841 emb AJ318218.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 26800839 emb AJ318217.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 62910854 gb DQ005103.1	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 14488167 emb AJ318216.1	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 230
gi 308944133 gb HM348715.1	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 345
gi 26800843 emb AJ318219.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 26986101 emb AJ421799.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 26800849 emb AJ318222.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 26986099 emb AJ419573.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 26800845 emb AJ318220.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 26800847 emb AJ318221.3	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 257
gi 32468855 emb AJ438490.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 260
gi 32468857 emb AJ438593.2	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 260
gi 20769 emb Y00440.1	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 729
gi 169111 gb J01254.1 PEALEC	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 275
gi 169112 gb M18160.1 PEALECB	GGCAGAGCTCTCTATTC-CACACCTAT-CCATATAIGG--GAT--AGAGA 719
gi 122688424 emb AJ920065.1	
gi 42794341 gb AY342212.1	GGICGCGCCCTCTACTC-CACCCCTAT-CCACATTGG--GAC--AGCGA 317
gi 27529072 emb AJ277588.1	-----AATCTCCAGGTCATACACTTAAAGCATTAGTAACTGTTCAAGGGT 256
Plasmid658	ACTGTTGGCAGAGCCCTCTATTCCTCACCTATCCATATCTGGATAGAGA 1111
gi 311221585 gb HQ337024.1	ACTGTTGGCAGAGCCCTCTATTCCTCACCTATCCATATCTGGATAGAGA 1111
gi 194460511 gb EU825771.1	ACTGTTGGCAGAGCCCTCTATTCCTCACCTATCCATATCTGGATAGAGA 2388
gi 562782 emb X66368.1	
gi 26800841 emb AJ318218.2	
gi 26800839 emb AJ318217.2	
gi 62910854 gb DQ005103.1	
gi 14488167 emb AJ318216.1	
gi 308944133 gb HM348715.1	
gi 26800843 emb AJ318219.2	
gi 26986101 emb AJ421799.2	
gi 26800849 emb AJ318222.2	
gi 26986099 emb AJ419573.2	
gi 26800845 emb AJ318220.2	
gi 26800847 emb AJ318221.3	
gi 32468855 emb AJ438490.2	
gi 32468857 emb AJ438593.2	
gi 20769 emb Y00440.1	
gi 169111 gb J01254.1 PEALEC	TAIGTTTTGTTGAGCTGGCACCTCTCAAATATACGGATCC----- 1701
gi 169112 gb M18160.1 PEALECB	TAIGTTTTG----- 1659
gi 122688424 emb AJ920065.1	
gi 42794341 gb AY342212.1	
gi 27529072 emb AJ277588.1	

Figure 3. The alignment of reverse primer Lec101 with sequences of the lectin gene of selected species of the family *Fabaceae*. Target sequence for primer is underlined. Mismatches in target sequences are labelled in a black box

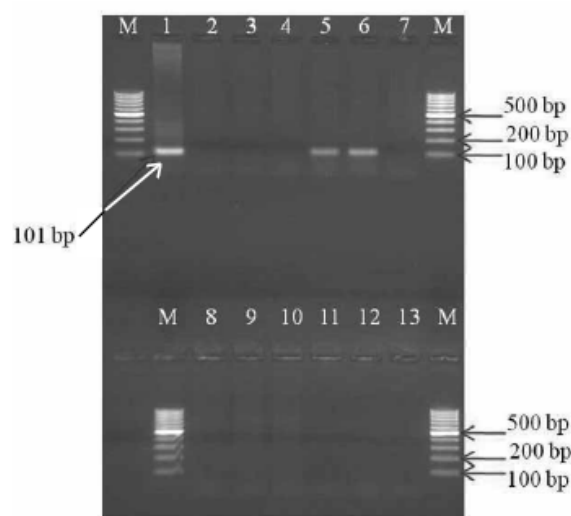


Figure 4. Verification of Lec101 primers specificity via PCR on *Fabaceae* plants: 1 – plasmid control, 2 – vetch, 3 – soybean A, 4 – soybean B, 5 – pea (Raman) A, 6 – pea (Raman) B, 7 – lentil A, 8 – lentil B, 9 – bean A, 10 – bean B, 11 – CTRL EX, 12 – CTRL MM, 13 – CTRL MM – open

Results of *in silico* analysis showed that both Lec101 primers show 100% homology only for the garden pea exon part of lectin gene (Y00440.1, J01254.1, M18160.1, EU825771.1, and X66368.1).

However, both primers show certain homology to several clones of lentil, mung bean and vetch (HM348715.1, AJ318222.2, AJ318220.2, AJ419573.2, AJ318221.3, AJ421799.2, J318219.2, AJ318218.2, AJ318217.2, DQ005103.1, AJ318216.1, AJ438490.2, AJ438593.2). Mismatches were identified within available sequences corresponding to primer sites (Figures 2 and 3).

In experimental test, no PCR products were recorded when vetch, soya-bean, lentil and bean DNAs were used as template DNA, while amplification of all pea DNA isolates showed the expected amplification products (Figures 4 and 5).

To allow quantification, optimised protocol was used in real-time PCR with SYBR[®] Green detection system regardless its disadvantage, i.e. tendency to inhibit PCR at higher concentration (KARSAI *et al.* 2002; GIGLIO *et al.* 2003; GASPARIC *et al.* 2010).

SYBR[®] Green real-time PCR was specific also only for samples of garden pea – no amplification signal was recorded when the DNAs from the family *Fabaceae* were used as a template that confirmed previous results obtained by conventional PCR.

To allow quantification, optimised protocol was used in real-time PCR with SYBR[®] Green detection

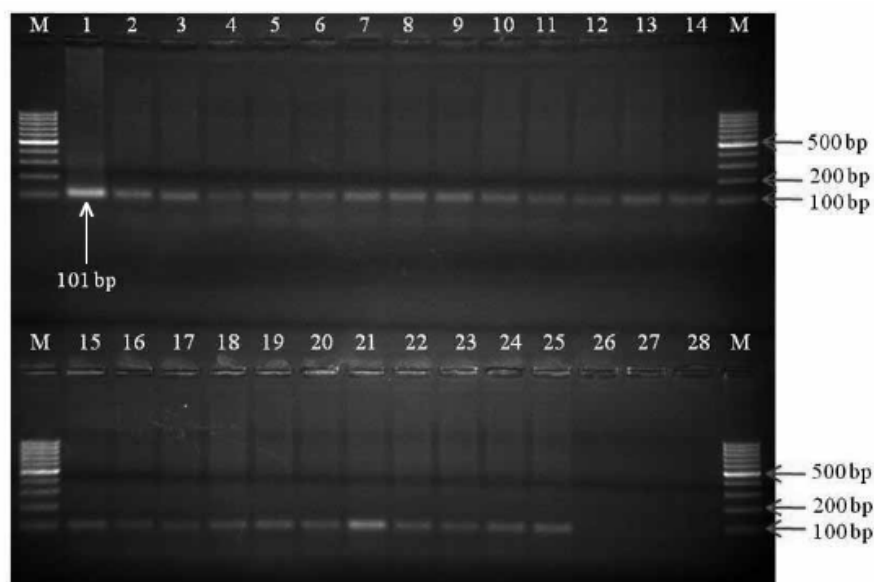


Figure 5. Verification of Lec101 primers specificity via PCR on selected pea species: 1 – plasmid control, 2 – Alderman A, 3 – Alderman B, 4 – Arvika A, 5 – Arvika B, 6 – Bajka A, 7 – Bajka B, 8 – Hero A, 9 – Hero B, 10 – Dalila A, 11 – Dalila B, 12 – Havel A, 13 – Havel B, 14 – Oskar A, 15 – Oskar B, 16 – Pegaz A, 17 – Pegaz B, 18 – Rondo A, 19 – Rondo B, 20 – Kelvedon Wonder A, 21 – Kelvedon Wonder B, 22 – Ambrosia A, 23 – Ambrosia B, 24 – Delikata A, 25 – Delikata B, 26 – CTRL EX, 27 – CTRL MM, 28 – CTRL MM – open

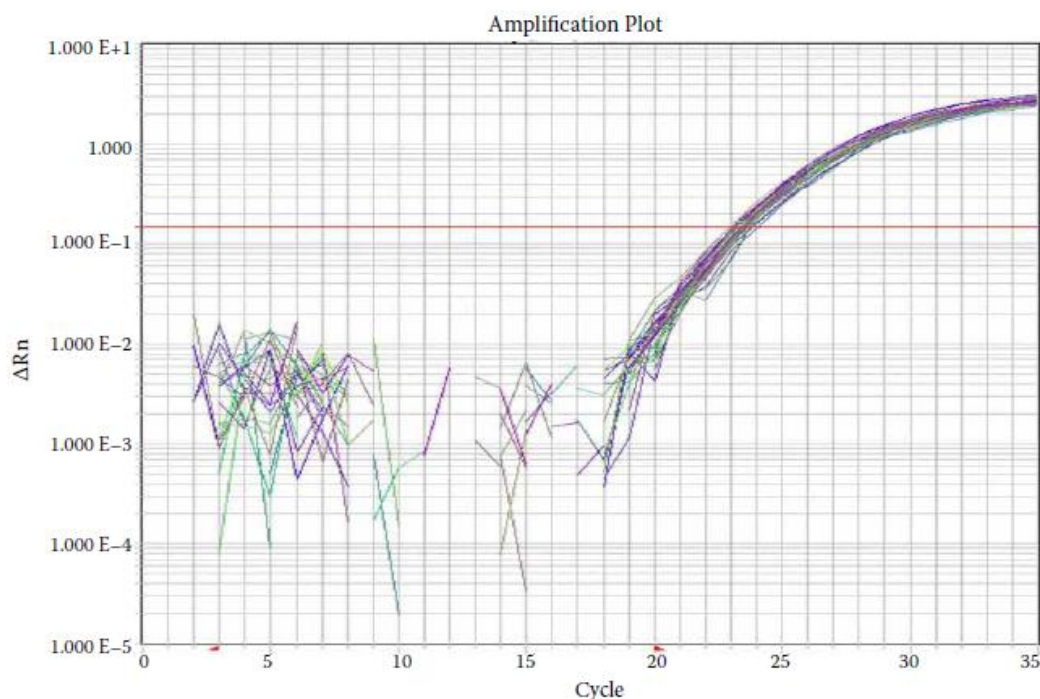


Figure 6. Fluorescent signal of garden pea cultivars with the average value of 23.56 ± 0.36 Ct

system regardless its disadvantage, i.e. tendency to inhibit PCR at higher concentration (KARSAI *et al.* 2002; GIGLIO *et al.* 2003; GASPARIC *et al.* 2010).

SYBR[®] Green real-time PCR was specific also only for samples of garden pea – no amplification

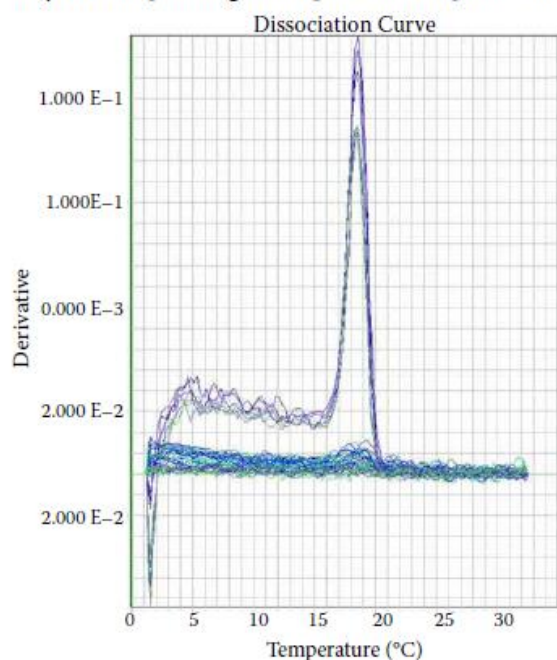


Figure 7. Dissociation curves of real-time PCR, selected plants of the family *Fabaceae* and pea cultivars

signal was recorded when the DNAs from the family *Fabaceae* were used as a template that confirmed previous results obtained by conventional PCR.

Obtained Ct values of reaction based on garden pea DNA (200 ng of DNA in reaction, corresponding to approx. 41 000 genome copies) reached on average 23.56 ± 0.36 , which is an acceptable value for analytical assay (Figure 6).

Dissociation melting curves of final PCR products confirmed that reaction lead to a unique specific product amplification (Figure 7).

The specific product size of 101 bp was also checked by gel electrophoresis (data not shown). A difference of 3.23 Ct between the signal of pea samples at a DNA concentration of 40 ng/μl (23.28 Ct) and the same 10-fold diluted samples (26.51 Ct) exclude inhibition by template (Figure 8). The results confirm that DNAs quality is fitting for the purpose.

Real-time PCR efficiency was calculated for genomic DNA as a template. The efficiency was 99% and the average value of R^2 was 0.997 (Figure 9).

On the base of dilution, limit of quantification was defined to be 160 copies of garden pea DNA. That is the lower limit of linear range, in which the reaction fulfils an acceptance criteria for real-time PCR based GMO quantification (ENGL 2008). The

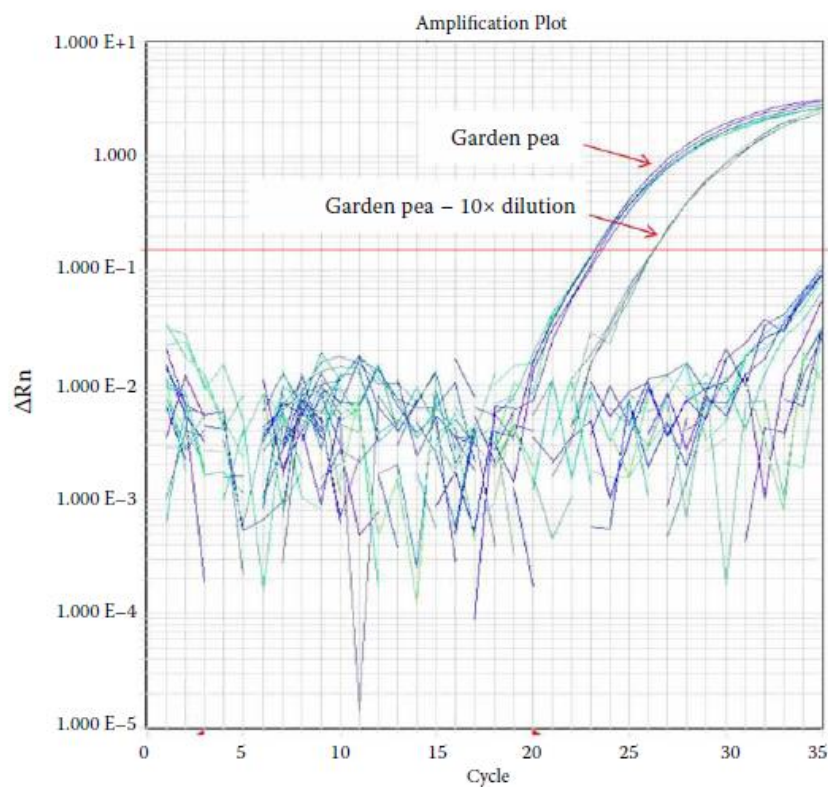


Figure 8. Control of the reaction inhibition signal of pea samples at DNA concentration of 40 ng/μl (23.28 Ct) and the same 10-fold diluted samples (26.51 Ct)

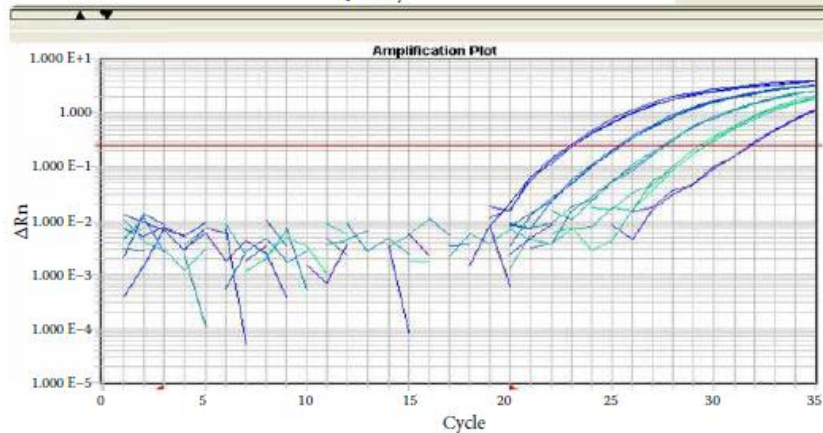
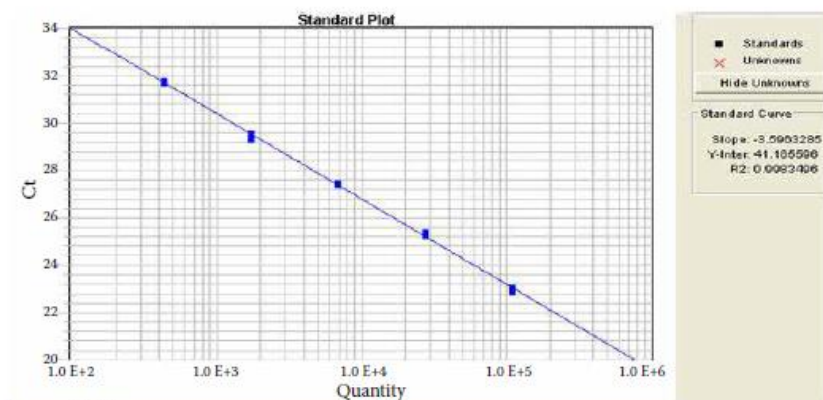


Figure 9. Serial of dilution of genomic DNA for the calculation of real-time PCR efficiency

the limit of detection was revealed to be 40 copies of garden pea DNA.

As the reaction fulfill also criteria described by AHMED (2002) and ANKLAM *et al.* (2002) we verified that the amplicon suits as a comparator for the quantification in real-time PCR.

In conclusion, we designed and optimised the real-time PCR based assay for specific detection and quantification of garden pea lectin gene (*P. sativum* L.). This reaction was developed to be used as a reference system for the quantification of GM pea varieties on the market. Although the SYBR Green assay is based on non-specific fluorescent detection, the characteristic of reaction meets requirements for GMO detection defined by the Community Reference Laboratory (CRL) for GM food and feed (ENGL 2008). The assay could be used as well for relative quantification of pathogens as it was shown for other species (LEISOVA *et al.* 2006) or allergens (WENSING *et al.* 2003). Moreover, positive plasmid control containing part of garden pea lectin gene is available and can be used according currently available standards.

References

- AHMED F.E. (2002): Detection of genetically modified organism in foods. *Trends in Biotechnology*, 20: 215–223.
- ANKLAM E., GADANI F., HEINZE P., PIJNENBURG H., VAN DEN EEDE G. (2002): Analytical methods for detection and determination of genetically modified organism in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214: 3–26.
- BENNETT M.D., SMITH J.B. (1976): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 274: 227–274.
- BERGEROVÁ E., GODÁLOVÁ Z., SIEKEL P. (2011): Combined effect of temperature, pressure and low pH on the DNA amplification of plant derived foods. *Czech Journal of Food Sciences*, 29: 337–345.
- BREŽNÁ B., HUDECOVÁ L., KUČTA T. (2006): Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *European Food Research and Technology*, 222: 600–603.
- CHRISPEELS M.J., RAIKHEL N.V. (1991): Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*, 3: 1–9.
- EC 1829/2003. Regulation of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Available at http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/labelling/Reg_1829_2003_en.pdf (Accessed 27. 7. 2011).
- EC 1830/2003. Regulation of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organism and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organism and amending Directive 2001/18/EC. Available at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0024:0028:EN:PDF> (Accessed 27. 7. 2011).
- EN ISO 21571 (2005): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction. ISO Copyright Office, Geneva.
- ENGL (2008): Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. European Network of GMO Laboratories. Available at http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf (Accessed 27. 7. 2011).
- GALASSO I., LIOI L., LANAVE C., BOLLINI R., SPARVOLI F. (2003): Identification and isolation of lectin nucleotide sequences and species relationships in the genus *Lens* (Miller). *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1098–1102.
- GASPARIC M.B., TENGS T., LA PAZ J.L., HOLST-JENSEN A., PLA M., ESTEVE T., ZEL J., GRUDEN K. (2010): Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 2023–2029.
- GATEHOUSE J.A., BOWN D., EVANS I.M., GATEHOUSE L.N., JOBES D., PRESTON P., CROY R.R.D. (1987): Sequence of the lectin gene from pea (*Pisum sativum* L.). *Nucleic Acids Research*, 15: 7642–7642.
- GIGLIO S., MONIS P.T., SAINT C.P. (2003): Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, 31: e136.
- HEMMER W. (1997): Foods derived from genetically modified organism and detection methods. Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss Science Foundation (BATS), Report 2/97.
- HODEK J., OVESNÁ J., KUČERA L. (2009): Interferences of PCR effectivity: importance for quantitative analyses. *Czech Journal of Food Sciences*, 27: 42–49.
- HOLST-JENSEN A., DE LOOSE M., VAN DEN EEDE G. (2006): Coherence between legal requirements and approaches for detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2799–2809.
- HOU Y., ZHANG H., MIRANDA L., LIN S. (2010): Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal *pcna* as the model gene. *PLoS One*, 5: 1–7.

- HRNČÍROVÁ Z., BERGEROVÁ E., SIEKEL P. (2008): Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47: 23–28.
- KAMINSKI P.A., BUFFARD D., STROSBURG D. (1987): The pea lectin gene family contains only one functional gene. *Plant Molecular Biology*, 9: 497–507.
- KARSAI A., MULLER S., PLATZ S., HAUSER M.T. (2004): (2002): Evaluation of a homemade SYBR (R) Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790–792.
- LEISOVA L., MINARIKOVA V., KUCERA L., OVESNÁ J. (2006): Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 446–455.
- LIOI L., GALASSO I., SANTANTONIO M., LANAVE C., BOLLINI R., SPARVOLI F. (2005): Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1615–1623.
- MURRAY H.G., THOMPSON W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research Journal*, 8: 4321–4325.
- NCBI. Available at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Accessed 27. 7. 2011).
- OVESNA J., STRYMPLOVA STASTNA K., VACULOVA K., MILOTOVA J. (2010): Haplotyping barley *bmy1* using the SNaPshot assay. *Biologia*, 65: 75–80.
- PAOLETTI C., HEISSENBERGER A., MAZZARA M., LARCHER S., GRAZIOLI E., CORBISIER P., HESS N., BERBEN G., LÜBECK P.S., DE LOOSE M., MORAN G., HENRY CH., BRERA C., FOLCH I., OVESNA J., VAN DEN EEDE G. (2006): Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *European Food Research and Technology*, 224: 129–139.
- POREBSKI S., BAILEY L.G., BAUM B.R. (1997): Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8–15.
- QUERCI M., JERMINI M., VAN DEN EEDE G. (eds) (2005): Users Manual – Training Course on the Analysis of Food and Feed Samples for the Presence of Genetically Modified Organism. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- RAKOUSKY S., ONDREJ M., SEHNAL F., HABUSTOVA O., HUSSEIN H.M., OVESNA J., KUCERA L., KOCOUREK F., RIHA K., DOSTALOVA R., SEIDENGLANZ M., TEJKLOVA E., GRIGA M. (2004): Transgenic plant products and their introduction into the environment and crop protection systems, a risk assessment. In: NAP J.P., ATANASSOV A., STIEKEMA W.J. (eds): *Genomics for Biosafety in Plant Biotechnology*. NATO Science Series, Series I: Life and Behavioural Sciences, Vol. 359. IOS Press, Amsterdam: 173–184.
- ŠVÁBOVÁ L., SMÝKAL P., GRIGA M., ONDŘEJ V. (2005): Agrobacterium-mediated transformation of *Pisum sativum* *in vitro* and *in vivo*. *Biologia Plantarum*, 49: 361–370.
- TABERLET P., GIJELY L., PAUTOU G., BOUVET J. (1991): Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105–1109.
- UNTERGASSER A., NIJVEEN H., RAO X., BISSELING T., GEURTS R., LEUNISSEN J.A.M. (2007): Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35: W71–W74.
- WENSING M., KNULST A.C., PIERSMA S., O'KANE F., KNOL E.F., KOPPELMAN S.J. (2003) Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111: 420–424.

Received for publication July 31, 2011

Accepted after corrections April 6, 2012

Corresponding author:

Ing. ALEŠ VRÁBLÍK, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Oddělení molekulární biologie, Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika
tel. + 420 233 022 280, e-mail: vrablik@vurv.cz

5.5 OVĚŘENÍ VYSOCE ÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETREM PRO HODNOCENÍ GM A KONVENČNÍCH ODRŮD KUKUŘICE

Pátý cíl práce byl zaměřený na ověření necílené metabolické analýzy s použitím vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s kvadrupólovým time-of-flight hmotnostním spektrometrem (Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometry – UHPLC-QTOFMS) pro hodnocení konvenčních kultivarů kukuřice a GM kultivarů Bt kukuřice MON810 (MONØØ81Ø-6). První sadu vzorků tvořily rostliny jednoho GM a jednoho konvenčního kultivaru kukuřice, pěstované v různém prostředí. Pro analýzu byly odebrány vzorky listů vždy z deseti rostlin transgenní i konvenční varianty. Druhou sadu vzorků tvořily listy rostlin pěstovaných za stejných provozních podmínek v polním pokusu. Jednalo se o deset různých kultivarů GM kukuřice a deset kultivarů konvenční kukuřice.

Z části vzorků byla extrahována DNA a u všech rostlin kukuřice byla metodou PCR provedena kontrola transgenních a konvenčních rostlin. Nejprve u všech vzorků úspěšně proběhla kontrolní amplifikace úseku invertázy, taxon-specifického genu pro kukuřici. Identifikace GM kukuřice MON810 byla provedena event-specifickou metodou, vzorky byly dále pro další kontrolu analyzovány na přítomnost regulačních elementů 35S promotoru z CaMV a NOS terminátoru. Výsledky PCR zkoušek byly v souladu s informacemi o vzorcích. GM kukuřice byly pozitivní ve zkoušce na přítomnost transgenů MON810 a 35S promotoru z CaMV, výsledek zkoušky na přítomnost NOS terminátoru byl negativní. U konvenčních rostlin byly negativní výsledky všech zkoušek, kromě amplifikace taxon-specifického genu.

Z další části vzorků listů byly do methanolu extrahovány metabolity, separace a detekce probíhala s použitím vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry – UHPLC-MS). Prvním krokem necílené analýzy methanolických extraktů z listů transgenních a konvenčních kultivarů kukuřice bylo vytvoření komplexního metabolického fingerprintu („otisku prstu“), založeného na co největším objemu informací o separovaných metabolitech. Dvou-dimenzionální PCA byla využita pro odhalení rozdílů v metabolickém profilu (fingerprintu) listů kukuřice, pocházejících z kultivarů transgenní i konvenční kukuřice z první sady vzorků. PCA u těchto vzorků vedla k tvorbě dvou relativně dobře odlišitelných klastrů, tvořených transgenní a konvenční kukuřicí. Výsledky LC-MS analýzy druhé sady vzorků (20 kultivarů kukuřice) byly vyhodnoceny faktorovou analýzou 2 613 píků a jejich

intenzity. Byla sestavena kombinační korelační matrice (20 x 20) a provedena tří-dimenzionální PCA analýza.

Metabolomickou analýzou se ale nepodařilo odlišit GM kultivary kukuřice linie MON810 od konvenčních linií. Nepodařilo se ani detekovat specifický metabolomický profil nebo signál, charakteristický pro GM kultivary, které byly pěstované za stejných podmínek.

Tyto výsledky byly publikovány v časopise s impakt faktorem (IF=0,685):

Václavík L, Ovesná J, Kučera L, Hodek J, Demnerová K, Hajšlová J. Application of Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UHPLC-MS) Metabolomic Fingerprinting to Characterise GM and Conventional Maize Varieties. *Czech J Food Sci.* 2013;**31**(4):368-375.

Application of Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UHPLC-MS) Metabolomic Fingerprinting to Characterise GM and Conventional Maize Varieties

LUKÁŠ VÁCLAVÍK¹, JAROSLAVA OVESNÁ², LADISLAV KUČERA², JAN HODEK²,
KATEŘINA DEMNEROVÁ³ and JANA HAJŠLOVÁ¹

¹Department of Food Analysis and Nutrition, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology Prague, Prague, Czech Republic, ²Department of Molecular Biology, Division of Plant Genetics, Breeding and Product Quality, Crop Research Institute, Prague, Czech Republic, ³Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

VÁCLAVÍK L., OVESNÁ J., KUČERA L., HODEK J., DEMNEROVÁ K., HAJŠLOVÁ J. (2013): Application of ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) metabolomic fingerprinting to characterise GM and conventional maize varieties. *Czech J. Food Sci.*, 31: 368–375.

The feasibility of metabolomic fingerprinting approach based on ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS) was studied to assess its ability to discriminate between maize varieties, and to show the associations between them on the metabolomic level. The non-targeted metabolomic analysis was applied to assess the variability within two varieties grown under different environmental conditions and to characterise the association within a sample set comprising both conventional and transgenic (MON-ØØ81Ø-6) maize varieties cultivated under the same environmental conditions (locality). Typical metabolomic fingerprints were established for individual plants. The plants representing two varieties formed well separated clusters. Metabolomic fingerprints of the second sample set enabled their unambiguous discrimination. The differences in metabolomic fingerprints between maize varieties were identified and documented by grouping in PCA and/or CA. The results indicate a similar genetic basis of transgenic maize varieties as they descend from a MON 810 event. The results explicitly showed that the variability of the metabolites in MON 810 did not exceed the ranges measured within the conventional varieties, thus supporting the concept of substantial equivalence.

Keywords: chemometric analysis; maize; metabolomics

The use of genetically modified (GM) crops in agriculture and agro-industry may offer a number of advantages over the conventional counterparts, such as the resistance to various diseases, pests, herbicides, or increased yields and nutritive value (KOZIEL *et al.* 1993; GAO *et al.* 2000; BARROS *et al.* 2010). Among

other GM crops, the commercial transgenic maize (*Zea mays* L.), containing various forms of the *Cry* gene (*Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1af*, *Cry2Ab2*, *Cry34ab1*, *Cry3Bb1*, *Cry9c* or *Cry1Fa*) from the *Bacillus thuringiensis* (Bt), is grown on the largest scale (CLIVE 2012). The expression of the above genes allows the

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QI101B267, and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Project No. COST OC09062 – Implementation of Metabolomic Method.

Bt maize to produce proteins that are highly toxic to some Coleopteran and/or Lepidopteran and to protect itself from major insect pests frequent in European and North American agriculture (e.g. European corn borer) (CLIVE 2012).

The commercial growth and use of GM crops for food and other purposes is regulated in many countries and comprehensive safety assessment procedures are required prior to their approval (MARMIROLI *et al.* 2008). The safety assessment of the GM crops is based on the concept of “substantial equivalence” and involves comparative analyses of targeted chemical constituents representing nutrients, toxins, and antinutrients in a GM crop and the appropriate conventional counterpart (OECD 1993; FAO/WHO 2000). Relatively recently, non-targeted metabolomics-based approaches were applied to extend the coverage of analytes in substantial equivalence studies and to identify the compounds differing in abundance in GM and non-GM plants (BARROS *et al.* 2010; HEINEMANN *et al.* 2011; MANNETTI *et al.* 2006; LEON *et al.* 2009; FRANK 2012).

Although a large amount of data has been evaluated to assess the safety of the GM plant and products, metabolomics-based studies aiming at comprehensive analysis of as many low molecular compounds (metabolites) in a biological sample as possible, have not been extensively used up to now. This challenging task can be only completed with the use of advanced analytical platforms facilitating the analysis of a wide range of metabolites differing both by physico-chemical properties and abundance, such as nuclear magnetic resonance (NMR) and/or mass spectrometry (MS) coupled with the separation techniques employing liquid chromatography (LC), gas chromatography (GC), and capillary electrophoresis (CE) (DUNN & ELLIS 2005; WISHART 2008; CEVALLOS-CEVALLOS *et al.* 2009). As the data generated by these techniques are very complex, advanced processing software tools and multivariate chemometric methods are needed for their interpretation (KATAJAMAA & DRESIC 2007).

In this feasibility study, the potential of non-targeted metabolomics workflow using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS) instrumentation and chemometrics has been explored for the evaluation of the conventional and GM maize (MON 810 event). The samples analysed comprised: (i) GM and non-GM unrelated varieties coming from different environmental conditions and (ii) various commercial Bt

maize and non-GM maize varieties grown under identical field conditions in a field trial. Here we report the possibility of using UHPLC-MS-based metabolomic fingerprinting for comprehensive evaluation of the metabolome of maize leaves.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. The first set of leaf samples (approximately 5 g) used in this study was kindly provided by a private grower. The second set was sourced from Czech Institution for Testing in Agriculture (CISTA) in field trials. The plant leaves were collected in phenological phase on BCHCH-scale: Leaf development, code 19 (LANCASHIRE *et al.* 1991). The first sample set consisted of transgenic Bt variety Kvalitas YG (event MON 810) and the non-GM unrelated maize, both grown under different environmental conditions. For each of the above mentioned groups (i.e., transgenic and conventional maize), 10 samples representing leaves were taken from individual plants. The second sample set represented both GM Bt maize varieties ($n = 10$) and non-GM maize varieties ($n = 10$), grown in the field trial as comparators under identical conditions in the southern part of the Czech Republic. Like in the case of the first sample set, leaves were collected from individual plants of each variety (Table 1). Until further processing, the leaf tissues were stored in the dark at -70°C .

Verification of GM and non GM nature of samples. Briefly, the collected leaf tissue samples were frozen and homogenised in liquid nitrogen. DNAs were isolated from each leaf sample in duplicates by CTAB based method (OVESNÁ *et al.* 2008). DNAs quality and quantities were checked by electrophoretic separation of sample aliquots on 0.7% agarose gel and spectrophotometry (NanoPhotometer; Implen, Los Angeles, USA) at 260 and 280 nm. The DNA (100 ng) was further used for real-time PCR-based event specific (MON-ØØ81Ø-6) assay (ABI 7900 HT) to verify the presence of MON 810 event. Specific primer sets were used to detect the presence of 35S CaMV promoter and NOS terminator (OVESNÁ *et al.* 2006; QUERCI *et al.* 2010) and to exclude other GM modifications using PCR (MJ Research, Watertown, USA).

Metabolite extraction procedure. The leaves were homogenised in liquid nitrogen. The obtained powder (1 g) was extracted by shaking with 10 ml of methanol for 5 minutes. The mixture was cen-

Table 1. List of varieties used in the study, breeding company and basic characteristic of plant material

Variety	GM	Company	FAO number	Registration	Hybrid/Line	Early vigor (9–1)
CRAZI YG	MON 810	KWS SAAT AG	320	2009	Sc	8.3
DKC 2961 YG	MON 810	Monsanto Technology LLC	230	2010	Sc	5.7
DKC 3512 YG	MON 810	Monsanto Technology LLC	290	2008	Sc	7
DKC 3795		Monsanto Technology LLC	260	2010	Sc	8.3
DKC 3872 YG	MON 810	Monsanto Technology LLC	270	2011	Sc	6.3
ES IMPERIAL YG	MON 810	Euralis Semences	300	2011	Sc	9
JOKARI CS		Caussade Semences	320	2007	Sc	8.3
JUXXIN		Société RAGT 2n	330	2008	Sc	9
KARAS YG	MON 810	KWS SAAT AG	400	2008	Sc	9
KRABAS YG	MON 810	KWS SAAT AG	300	2011	Sc	8.3
LG 30290		LIMAGRAIN GENETICS Grandes Cultures S.A.	280	2011	Sc	8.3
MERCURIO		KWS SAAT AG	250	2010	Tc	8.3
OXXYGEN YG	MON 810	Société RAGT 2n	330	2011	Sc	7
P9494		Pioneer Hi-Bred International, Inc.	340	2011	Sc	7.7
PR38V12		Pioneer Hi-Bred International, Inc.	330	2007	Sc	7
PR39T47	MON 810	Pioneer Hi-Bred International, Inc.	270	2008	Sc	8.3
RH07103		Société RAGT 2n	nd	nd	nd	nd
RH11056	MON 810	Société RAGT 2n			Sc	7.7
SUBIANCA		Dow AgroSciences GmbH	340	2010	Sc	7
TEXXUD		Société RAGT 2n	340	2005	Sc	5

nd – not detected

trifuged for 5 min (10 000 rpm, 20°C), the supernatant was passed through a 0.22 µm PTFE filter and transferred into a 2 ml amber autosampler vial. Prior to UHPLC-MS analysis, the samples were diluted 10-fold with pure methanol to avoid the possible saturation of the MS detector. The sample extracts were stored at –22°C.

Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS). An Acquity Ultra Performance LC system coupled with Synapt G2 HD quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Waters, Milford, USA) was used in this study. Chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC HSS T3 reversed phase analytical column (50 mm × 2.1 mm *i.d.*, 1.7 µm particle size; Waters, Milford, USA) maintained at 40°C. The sample volume of 3 µl with the partial loop injection mode was used. The mobile phase consisted of 0.1% aqueous formic acid (A) and 0.1% formic acid in methanol (B). The gradient elution was carried out as follows: 0–7 min eluent B 5 – 100%; 7–9 min eluent B 100%; 9–10 min column equilibration – eluent B 5%. The mobile phase flow was 0.5 ml/minute.

The Synapt G2 HD instrument was operated in positive electrospray ionisation (ESI) mode; the parameter settings used during the measurements were as follows: capillary voltage (+2500 V), cone voltage (+30 V), source temperature (120°C), desolvation temperature (350°C). Nitrogen was used as both desolvation and cone gas at a flow rate of 800 and 10 l/h, respectively. Leucine-enkephaline was used as lock mass (m/z 556.2771) for internal calibration at a concentration of 2 ng/µl and a flow rate of 10 µl/minute. Both full MS and the MS/MS fragmentation mass spectra were acquired at a rate 2 spectra per second in the range m/z 50–1000. The mass resolving power of the instrument was approximately 20 000 FWHM (full width at half maximum) at m/z 200.

In order to diminish any possible time dependent changes in UHPLC-MS chromatographic fingerprints, the in-batch sequence of the samples was randomised. Two repeated analyses of each sample were performed. Within the measurement sequence, blank samples (pure methanol) were analysed.

Data processing and statistical analysis. With regard to the complexity of UHPLC-MS records obtained by the analysis of the sample sets studied, an automated algorithm was employed for the data mining and aligning procedures. The software automatically organised the data into matrix of ($x \times y$) containing y peaks (characterised by RT, m/z value, and intensity) in each of the x records. To ensure that the data comprise only the peaks originating from the maize extract, the peaks observed in the blank samples records were removed.

The processing of the LC-MS data was carried out with the use of MarkerLynx software, Version 4.1 (Waters, Milford, USA). Automated data mining was performed in the retention time (RT) window of 0.2–10.0 min and m/z range 50–1000 at an intensity threshold setting of 500 cps. To reduce the dimensionality of the data matrix obtained, the peaks representing isotopic ions were automatically excluded during the data mining based on isotope spacing. The detected peaks were aligned across the sample set using a mass tolerance window 0.01 Da and a retention time window 0.1 minutes. Data matrix comprising the list of peaks characterised by RT, m/z , and intensity was obtained in this way. The data set No.1 was Pareto-scaled (square root of the standard deviation is used as the scaling factor) prior to the principal component analysis (PCA) facilitated by Extended Statistics module. In the case of the data set No. 2, the peaks with zero intensity in at least one sample were excluded from the data matrix. The data matrices of (20×2613) containing 2613 peaks (characterised by RT, m/z value, and intensity) in each of the 20 records were obtained for each data set. The data set No. 1 was processed with PCA, while for processing the data set No. 2 both cluster analysis (CA) and PCA were used. In the case of the sample set No. 2, PCA and CA were conducted with the use of the software package STATISTICA, Version 10 (StatSoft, Tulsa, USA). Three dimensional PCA based on correlation matrix of (20×20) resulted from the factor analysis of UHPLC-MS data obtained by the analysis of the data set No. 2 (20 maize varieties, 2613 peaks).

RESULTS AND DISCUSSION

DNA analysis confirmed the expected nature of the plant material. The conventional varieties were free of contamination with GM maize and

neither of the analysed varieties contained other GM event. Hence, the material for the preliminary investigation of the possible associations between the inserted GM event and the metabolomic fingerprint was available. If there is some general effect of the transgene MON 810 other than the pest resistance, a specific metabolic pattern has to be identified across the two sets.

LC-MS metabolomic fingerprinting

In this study, non-targeted analysis of maize methanolic leaf extracts was performed to obtain comprehensive metabolomic fingerprints containing information on as many metabolites as possible. Considering the non-targeted nature of the analyses to be performed, some generic settings had to be applied to both LC separation and MS detection. Since various metabolites differ significantly in terms of polarity, an analytical column with reversed stationary phase containing embedded polar groups was used instead of conventional C_{18} or C_8 reversed stationary phases to enhance the retention of highly polar components present in the maize leaf metabolome. The use of stationary phase with sub-2 μm particles significantly increased the chromatographic resolution and enabled relatively rapid analysis with injection-to-injection run time of 11 minutes. Since the typical base width of the detected peaks was below 12 s, sufficient characterisation of the analytes peak shapes was possible at acquisition speed settings used.

The reproducibility of both m/z values and retention times (RT) of the detected metabolites has a major impact on the overall quality of UHPLC-MS metabolomic data. High fluctuations of these parameters during the measurement sequence result in a poor outcome of the data mining process and lead to misinterpretation of the results. To explore the possible RT fluctuation, RTs of three peaks (RT 0.7, 4.2, and 7.1 min) were monitored during the measurement sequence of 20 sample injections. Based on these data, typical peak RT variability was found to be below 5% (relative standard deviation, RSD) that can be considered as an acceptable value. QTOF mass analyser can be considered an effective tool for metabolomics-based studies of biological samples (XIE *et al.* 2008). It also enables accurate mass measurement in a broad m/z range. To obtain as low mass errors as possible,

regular external calibration of the instrument was performed. Additionally, a continuous correction of small mass drifts correction was carried out with the use of mass locking compound delivered to the instrument via 2nd ESI sprayer. Under these conditions, the achieved mass accuracy was below 5 ppm. Despite that in the initial optimisation experiments both positive and negative ESI modes were used, the preliminary results have explicitly shown that the latter polarity setting yielded significantly fewer informative records. Therefore, only positive ESI was further used.

Data mining and data pre-treatment

It should be noted that the peaks extracted from the UHPLC-MS fingerprints could not be generally considered to be the individual metabolites because of the signal redundancy. This redundancy was, to some extent, decreased in the data mining step by automatic removal of the peaks of monoisotopic ions (i.e., signals with the lowest m/z value within the isotope pattern). It is well known, however, that in ESI, ionisation of a single metabolite may result in the formation of multiple signals, such as various adduct or fragment ions. For example, in positive ESI ionisation ammonium $[M + NH_4]^+$, sodium $[M + Na]^+$, or potassium adducts $[M + K]^+$, are frequently formed.

Since metabolites typically occur in distinct concentrations, large differences in intensities (by up to several orders of magnitude) were observed with many peaks. Such differences can significantly affect the data variance determined treatment by the multivariate analysis. To modify the weights of the respective peaks (variables), the Pareto scaling of the data was performed (IVOSEV *et al.* 2008). This type of scaling enabled the reduction but not complete elimination of the above abundance differences. It provides good results when applied to LC-MS data because it takes into account that larger peaks can be more reliable, but all variables are equivalent. The scaling of the data was not performed for the set No. 2, the log scaling when applied to LC-MS data (intensity) yielded less informative results. The detection of correlations between different features in a set of feature vectors is a very important data mining task because the correlation indicates a dependency between the features or some association of the cause and effect between them (BÖHM *et al.* 2004). Our

simplified approach was based on a combination correlation matrix (20×20) resulted from the factor analysis of LC-MS data (20 maize varieties, 2613 peaks, peak intensity) and PCA. Therefore, this multivariate analysis is not affected by large differences in the peaks intensities.

Chemometric analysis

In the next step, principal component analysis (PCA) was applied to the pre-processed experimental data. This unsupervised pattern recognition technique represents a highly useful and widely employed tool for the interpretation of complex data. PCA allows the dimensionality reduction and visualisation of the intrinsic patterns present in the original data in the form of a few principal components (PCs) while retaining the maximum possible variability (BERUETTA *et al.* 2007). In this study, PCA was used to explore the differences in LC-MS metabolomic fingerprints of leaves originating from various varieties of both transgenic and conventional maize. The sample leaves extracts were characterised by LC-MS metabolomic fingerprints that were processed as described above. As can be seen in Figure 1, two relatively well-resolved sample clusters of the respective maize varieties were formed in the PCA space defined by the first and second principal components calculated as based on sample set No. 1. The separation of these samples clearly documents the differences in their metabolomic fingerprints. These differences are apparently linked to changes in the metabolites concentrations. The differences between the samples of the same variety are in-

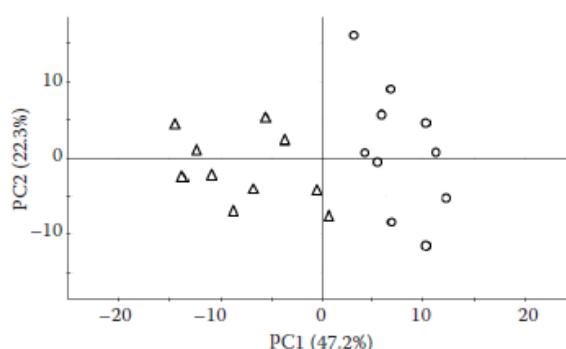


Figure 1. Two dimensional PCA scores plot showing association between metabolomic fingerprints of two maize varieties represented by 10 samples per cultivar (each cultivar forms a specific group)

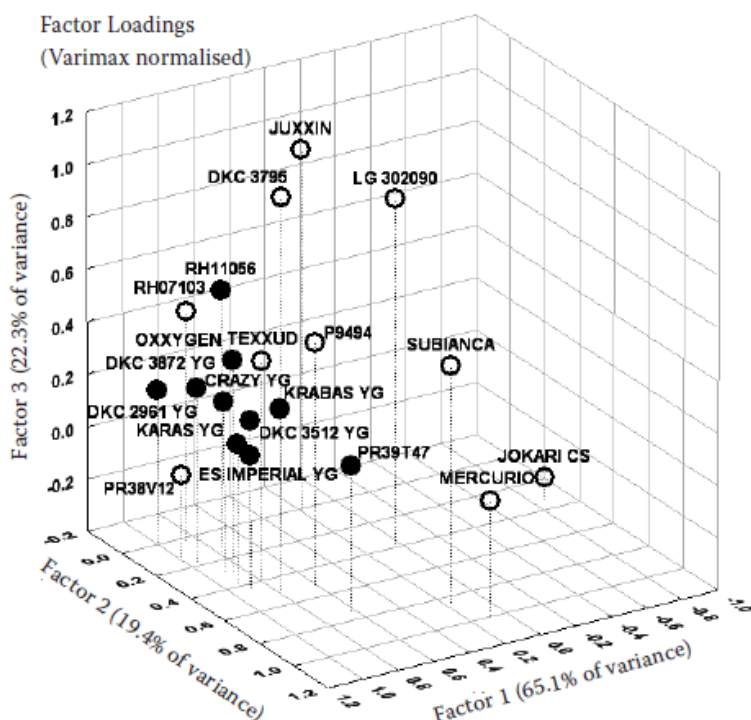


Figure 2. Three dimensional principal component analysis based on correlation matrix (20 × 20) resulted from factor analysis of LC-MS data (20 maize varieties, 2613 peaks, peak intensity)
White circles – conventional maize variety;
black circles – GM-maize variety

duced by varying micro-environmental and soil conditions. As shown in the two-dimensional PCA graph, the metabolomic profiles of ten different leaf samples representing identical varieties were closer to one another than to the set of profiles derived from the other varieties. The two sets did not overlap, which proved the potential of

the technique to differentiate between cultivars, thus we proceeded to analyse the data obtained by analysis of the sample set No. 2.

As can be seen in the three-dimensional scores plot (Figure 2), the PCA grouped the examined varieties according to their origins, i.e. according to the respective breeding company by which the

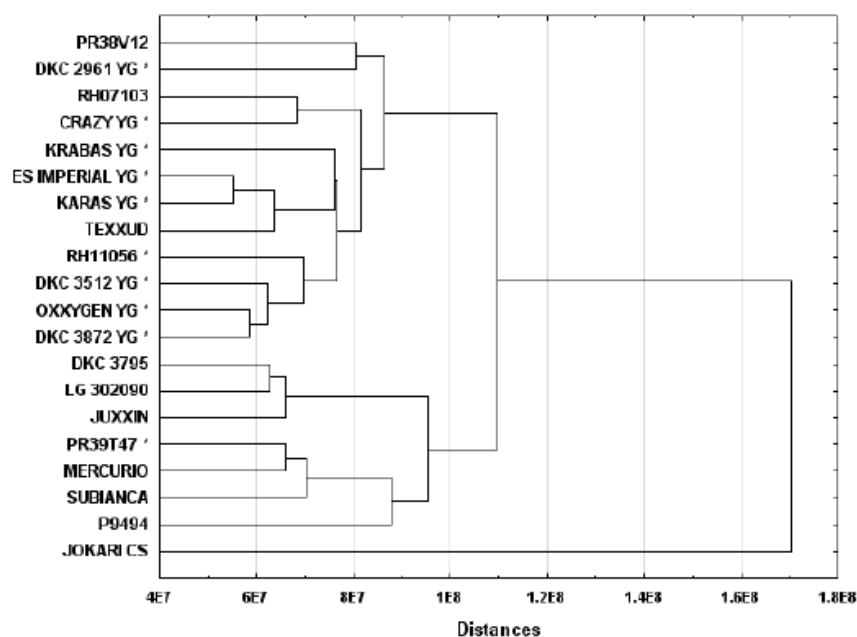


Figure 3. Results of cluster analysis for LC-MS data (peak intensities) of 10 transgenic (marked with an asterisk) and 10 conventional maize varieties (20 maize varieties, 2613 peaks)

respective variety was released. This finding was also explicitly documented by the CA (Figure 3). The first, second, and third principal components explained for 55.1, 19.4, and 22.3% of the data variance, respectively. The MON 810 varieties were in the PCA scores plot closer to one another compared to conventional varieties, which indicated on their similar genetic basis. This finding was expected as all GM MON 810 descended from a single modified line. Also, the company may use different types of germplasm in their breeding program. Although the GM varieties seem to be closer to one another, they do not exceed the variability range that was calculated for the conventional varieties. The range of values representing maize leaves metabolome is documented by the distance of Jokari CS variety from the other GM and conventional varieties (Figure 3).

As two sets of varieties were used in this study, one representing two varieties GM and conventional, each represented by multiple samples, and the second several GM and conventional varieties, we were able to demonstrate the capability of metabolomics-based approach to differentiate efficiently between the maize varieties, and to trace their relationships on the metabolomic level. No significant correlation was found between the metabolic profiles measured at the given developmental stage and agronomically important traits, namely earliness, yield or use of the varieties (silage, grains).

We were not able to find any specific patterns/signals typical for GM varieties even though these were cultivated under the same environmental conditions as their conventional counterparts. Moreover, as the ranges of the metabolite intensities detected in individual GM and conventional varieties overlapped, it can be expected that in the case of equivalence the metabolite concentrations in GM varieties will not differ from those in the conventional cultivars and will not be shifted in PCA plot with respect to them (EFSA 2011). Our findings support the opinion of equivalence of MON 810 with conventional maize. However, studies under different environmental conditions with a higher number of replicates are necessary.

In general, the composition of the leaf tissue may have an impact on the safety of GM plants. Much more data for the composition analysis of maize kernels are available (KUIPER *et al.* 2001; CELLINI *et al.* 2004). The presented approach allows large-scale evaluation of leaf metabolome and can provide extensive data for GMO safety assessment.

CONCLUSIONS

UHPLC-QTOFMS technique was demonstrated to hold a great potential in discriminative metabolomics of conventional and Bt transgenic maize varieties. The processing of metabolomic fingerprints (mass spectra) by advanced chemometric methods demonstrated the capability of this approach to classify various maize varieties in both GM and non-GM sample sets. On the other hand, distinguishing MON 810 event was not possible. This means, in fact, that 'substantial equivalence' principle has been confirmed.

References

- BARROS E., LAZAR S., ANTONEN M.J., VAN DIJK J.P., RÖHLING R.M., KOK E.J., ENGEL K.H. (2010): Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 436–451.
- BERUETTA L.A., ALONSO-SALCES R.M., HÉRBERGER K. (2007): Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158: 196–214.
- BÖHM CH., KAILING K., KOGER P., ZIMEK A., (2004): Computing clusters of correlation connected objects. In: *Proceeding ACM International Conference on Management of Data (SIGMOD)*, Paris, France, 2004.
- CELLINI F., CHESSON A., COLQUHOUN I., CONSTABLE A., DAVIES H.V., ENGEL K.H., GATEHOUSE A.M.R., KÄRENLAMPI S., KOK E.J., LEGUAY J.J., LEHESRANT A. S., NOTEBORN H.P.J.M., PEDERSEN A.J., SMITH M. (2004): Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1089–1125.
- CEVALLOS-CEVALLOS J.M., REYES-DE-CORCUERA J.I., ETXEBERRIA E., DANYLUK M.D., RODRICK G.E. (2009): Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 557–566.
- CLIVE J. (2012): *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops*. ISAAA Brief No. 44. ISAAA, Ithaca.
- DUNN W.B., ELLIS D.I. (2005): Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 24: 285–294.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) (2011): Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal*, 9(5): 2150: 37. doi:10.2903/j.efsa.2011.2150
- EN ISO 21571 (2005): *Foodstuffs — Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products — Qualitative Nucleic acid Based Methods*. ISO Copyright Office, Geneva.

- FAO/WHO (2000): Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plant Origin. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Roma.
- FRANK T., RÖHLING R.M., DAVIES H.V., BARROS E., ENGEL K.H. (2012): Metabolite profiling of maize kernels – genetic modification versus environmental influence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 3005–3012.
- GAO A.G., HAKIMI S.M., MITTANCK C.A., WU Y., WOERNER B.M., STARK D.M., SHAH D.M., LIANG J.H., ROMMENS C.M.T. (2000): Fungal atrogen protection in potato by expression of a plant defending peptide. *Nature Biotechnology*, **18**: 1307–1310.
- HEINEMANN J.A., KURENBACH B., QUIST D. (2011): Molecular profiling – a tool for addressing emerging gaps in the comparative risk assessment of GMOs. *Environment International*, **37**: 1285–1293.
- IVOSEV G., BURTON L., BONNER R. (2008): Dimensionality reduction and visualization in principal component analysis. *Analytical Chemistry*, **80**: 4933–4944.
- KATAJAMAA M., ORESIC M. (2007): Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*, **1158**: 318–328.
- KOZIEL M.G., BELAND G.L., BOWMAN C., CAROZZI N.B., CRENSHAW R., CROSSLAND L., DAWSON J., DESAI N., HILL M., KADWELL S., LAUNIS K., LEWIS K., MADDOX D., MCPHERSON K., MEGHJI M.R., MERLIN E., RHODES R., WARREN G.W., WRIGHT M., EVOLA S.V. (1993): Field performance of elite transgenic maize plants expressing insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnology*, **11**: 194–200.
- KUIPER H.A., KLETER G.A., NOTENORN H.O.J.M., KOK E.J. (2001): Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*, **27**: 503–528.
- LANCASHIRE P.D., BLEIHOLDER H., VAN DEN BOOM T., LANGELUDEKE P., STAUSS R., WEBER E., WITZENBERGER A. (1991): An uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* **119**: 561–601.
- LEON C., RODRIGUEZ-MEIZOSO I., LUCIO M., GARCIA-CAÑAS V., IBAÑEZ E., SCHMITT-KOPPLIN P., CIFUENTES A. (2009): Metabolomics of transgenic maize combining Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry and pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, **1216**: 7314–7323.
- MANNETI C., BIANCHETTI C., CASCIANI L., CASTRO C., DI COCCO M.E., MICCHELI A., MOTTO M., CONTI F. (2006): A metabolomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 2613–2625.
- MARMIROLI N., MEASTRI E., GULLI M., MALCEVSCI A., PEANO C., BORDONI R., DE BELLIS G. (2008): Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**: 369–384.
- OECD (1993): Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles. Organization of Economic Cooperation and Development.
- OVESNÁ J., KUČERA L., HODEK J., DEMNEROVÁ K. (2010): Reliability of PCR-based screening for identification and quantification of GMOs. *Czech Journal of Food Sciences*, **28**, 133–138.
- QUERCI M., VAN DEN BULCKE M., ZEL J., VAN DEN EEDE G., BROLL H. (2010): New approaches in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396**: 1991–2002.
- WISHART D.S. (2008): Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, **17**: 482–493.
- XIE G.X., NI Y., SU M.M., ZHANG Y.Y., ZHAO A.H., GAO X.F., LIU Z., XIAO P.G., JIA W. (2008): Application of ultra-performance LC-TOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal Panax herbs. *Metabolomics*, **4**: 248–260.

Received for publication April 10, 2013
Accepted after corrections May 3, 2013

Corresponding author:

Prof. Ing. JANA HAJŠLOVÁ, CSc., Vysoká škola chemicko technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika; E-mail: jana.hajslova@vscht.cz

6 DISKUSE

6.1 EXTRAKCE DNA Z PAPÁJI

První cíl práce byl zaměřen na problematiku extrakce DNA a její následné použitelnosti jako templátové molekuly v PCR při stanovení GMO. Volba konkrétní metody extrakce DNA závisí na povaze vzorku i na účelu, kterému má extrahovaná DNA sloužit (Rapp, 2010, Armani *et al.*, 2014, Brestovac *et al.*, 2014, Guertler *et al.*, 2014, Morono *et al.*, 2014, Sharma *et al.*, 2014). V případě extrakce DNA z rostlin a odvozených produktů jsou nejvíce používány metody extrakce DNA založené na CTAB pufru a na kolonkách, vázajících DNA pomocí oxidu křemičitého (Bonfini *et al.*, 2002). Na rozdíl od živočichů a mikroorganismů obsahují rostliny ve svých tkáních větší množství polysacharidů, polyfenolů a další sekundární metabolitů, které mohou narušovat proces extrakce DNA nebo mohou inhibovat následné laboratorní analýzy (Nagori *et al.*, 2014). Metoda CTAB umožňuje extrakci vysokomolekulární DNA z rostlin při současném odstranění kontaminant, které mohou inhibovat enzymatické reakce (Murray a Thompson, 1980). V řadě případů je však metoda CTAB limitována. Protokoly extrakce DNA jsou tedy často upravovány podle aplikace na určité rostlinné druhy nebo specifické rostlinné tkáně (Sangwan *et al.*, 1998, Porebski *et al.*, 1999, Michiels *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2004, Haque *et al.*, 2008, Shepherd *et al.*, 2011).

Metody založené na vazbě DNA na kolonky s obsahem oxidu křemičitého jsou oblíbené především pro svoji jednoduchost a rychlost procedury. Tyto kolonky jsou v nabídce řady firem ve formě komerční soupravy, která představuje komplexní řešení extrakce DNA. Často se používají také kombinace obou metod, kdy je DNA extrahována metodou CTAB a s použitím kolonky je dále purifikována (Bonfini *et al.*, 2002).

Při oficiálních kontrolách obsahu GMO v potravinách a krmivech je nutné extrahovat DNA i ze vzorků, ve kterých je poškozena výrobními postupy. Při technologickém zpracování výrobku je DNA často vystavena různým fyzikálním (např. teplo, tlak) či chemickým vlivům (např. změny v pH, enzymatické aktivity, fermentace). To vede např. k její hydrolýze, oxidaci nebo deaminaci (Hupfer *et al.*, 1998, Meyer, 1999, Kharazmi *et al.*, 2003, Kakihara *et al.*, 2006). Kvalita, čistota a množství extrahované DNA rozhoduje o možnosti jejího použití jako analytu pro PCR. Aby bylo pro účely stanovení GMO možné použít i relativně silně poškozenou DNA, využívají se pro její amplikaci krátké úseky (Demeke *et al.*, 2009, Gryson, 2010).

Vzorkem, pro který byla ověřena metoda extrakce DNA, byl plod čerstvé papáji (rozdělené na extrakci DNA z dužiny a pecky) a kandovaná papája. Problémy se získáním vysoce kvalitní DNA z plodů papáji uvádí více studií (Wall *et al.*, 2004, Zhuang *et al.*, 2007). Marfo *et al.* (1986) uvádí, že pecky papáji jsou bohatým zdrojem bílkovin, tuků, vlákniny (obsahují také oligosacharidy a polysacharidy) a tříslovin (fenolické látky).

V naší studii byly pro extrakci DNA porovnány tři metody: metoda založená na použití CTAB, metoda Wizard, založená na použití TNE pufru a guanidin chloridu a následné purifikaci DNA přes kolonku s využitím vazby DNA na roztok s obsahem pryskyřice (Lüthy *et al.*, 1998) a komerční souprava GeneSpin DNA Extraction Kit (Eurofins, Německo). Množství a čistota extrahované DNA byla hodnocena spektrofotometricky, kvalita DNA byla hodnocena elektroforetickou separací na 0,8% agarózovém gelu s vizualizací pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Jediný pozitivní signál vysokomolekulární DNA byl zaznamenán na agarózovém gelu v případě extrakce DNA metodou CTAB z pecek papáji. Spektrofotometrickým hodnocením byla zaznamenána koncentrace extrahované DNA z dužiny metodou CTAB (1 ng/μl) a koncentrace extrahované DNA z pecek metodou CTAB (7 ng/μl). Při extrakci DNA metodami Wizard a GeneSpin neposkytla DNA po elektroforetické separaci na agarózovém gelu žádný signál. Ani spektrofotometrické měření nezaznamenalo žádnou DNA. Zimmerman *et al.* (1998) ve své studii píše, že CTAB metoda má spolu s metodou Wizard relativně nízký výtěžek extrahované DNA. Tato DNA je ale kvalitní a vhodná pro použití do PCR, kde byl v použité reakci potvrzen limit detekce 100 pg DNA. Tung Nguyen *et al.* (2009) ověřil, že metoda Wizard je vhodná pro použití při extrakci DNA z průmyslově zpracovaných potravin s nízkým obsahem DNA ve vzorku (sójové mléko, tofu). Naopak při extrakci DNA z nezpracovaných rostlinných produktů (ve studii prezentovaných sójovými boby a kukuřicí) vedla metoda Wizard k horším výsledkům než metoda CTAB.

Nezávisle na výsledku detekce extrahované DNA na agarózovém gelu nebo na spektrofotometrickém měření byla amplifikovatelnost DNA ověřena v PCR pro detekci taxon-specifického genu papáji, *papainu* (Goda *et al.*, 2001). Amplifikace byla potvrzena pro DNA extrahovanou z dužiny a pecek čerstvého plodu papáji metodou CTAB. Metody Wizard ani GeneSpin k pozitivnímu výsledku PCR nevedly.

Wall *et al.* (2004) testovala pro extrakci DNA z papáji kromě jiných také modifikovanou metodu Wizard a NucleoSpin Food kit, která je obdobou metody GeneSpin. Ani jedna z metod nebyla pro extrakci DNA z plodů papáji vhodná, následná amplifikace metodou PCR

neproběhla. Důvodem může být souhra přítomnosti inhibitorů PCR a faktu, že plody papáji jsou velmi chudé na obsah DNA, extrahované množství je pak pod limitem detekce PCR.

Metoda CTAB se tedy ukázala být vhodnou pro extrakci DNA z čerstvého plodu papáji, jak z dužiny, tak z pecek. Přítomné inhibitory byly použitou metodou CTAB extrakce DNA odstraněny bez nutnosti modifikace protokolu. Tyto výsledky byly potvrzeny i v jiných studiích při extrakci DNA z rostlin s vysokým obsahem fenolických látek, v některých případech pak bylo nutné protokol CTAB extrakce DNA mírně modifikovat (Porebski *et al.*, 1997, Sarwat *et al.*, 2006, Sahu *et al.*, 2012, Nagori *et al.*, 2014).

V případě kandované papáji neproběhla PCR amplifikace v žádném z testovaných metod extrakce DNA. Postup extrakce DNA z kandované papáji byl opakován optimalizovanou metodou GeneSpin. Ke vzorku bylo přidáno více lytického pufru a byl prodloužen čas inkubace. Tento postup zlepšil konzistenci vzorku, která byla díky velkému obsahu cukru v papáji příliš viskózní při původním postupu. To pravděpodobně vedlo k obtížím při separaci DNA a její vazbě na kolonku. Na agarózovém gelu ani pomocí spektrofotometru však nebyla žádná DNA zaznamenána. Přítomnost a amplifikovatelnost DNA v eluátu z kolonek GeneSpin kitu byla dále ověřena metodou PCR. Při aplikaci koncentrovaného vzorku k žádné amplifikaci nedošlo. PCR produkt byl detekován až po reakci s 10x ředěným vzorkem. Inhibice PCR neředěného vzorku může být dána kritickou koncentrací cukru, který se z kolonky eluoval spolu s DNA. Inhibice PCR v přítomnosti cukru byla evidována (Oguchi *et al.*, 2009). Ricaut *et al.* (2005) popsal inhibici PCR produkty Maillardovi reakce, ke které může docházet mezi redukcujícími cukry, případně jejich produkty, a aminokyselinami nebo bílkovinami. Vhodnost metody GeneSpin zaznamenal Spaniolas *et al.* (2008) pro extrakci DNA ze zrn pražené kávy, kdy bylo PCR potvrzeno, že v případě kávy metoda GeneSpin účinně odstraní inhibitory PCR. To, že je úspěšnost extrakce DNA i její kvalita odlišná v případě různě zpracovaných produktů jednoho rostlinného druhu uvádí Jasbeer *et al.* (2009). Na 14 vzorcích krmiva rostlinného původu (hlavní složkou vzorků byla kukuřice) bylo ověřeno sedm metod extrakce DNA (včetně metody CTAB, Wizard a kolonkové metody NucleoSpin, která je obdobou metody GeneSpin). Žádná z testovaných metod nebyla univerzálně použitelná pro všechny vzorky.

Extrahovaná DNA metodou CTAB ze vzorků plodů papáji a DNA extrahovaná metodou GeneSpin ze vzorků kandované papáji, zakoupených v obchodní síti, byla použita pro detekci GM papáji linií 55-1/63-1 a X17-1. Pro stanovení GMO byla v tomto případě použita PCR pro detekci screeningového elementu 35S promotoru z CaMV, který je přítomný

v transgenních kazetách uvedených linií GM papáji. V žádném z testovaných výrobků nebyl 35S promotor z CaMV detekován, čímž byla přítomnost GM papáji vyloučena.

6.2 VLIV INHIBITORŮ PCR NA EFEKTIVITU REAKCE

Další cíl práce byl zaměřen na problematiku inhibice real-time PCR. Real-time PCR je v současnosti stále nejpřesnější metodou pro kvantifikaci DNA. Přítomnost inhibitorů ovlivňuje efektivitu PCR. Ta má přitom zásadní vliv na vývoj fluorescenčního signálu a tím i na přesnost výpočtu množství DNA. Efektivita PCR je důležitým ukazatelem přesnosti kvantifikace DNA (Tichopad *et al.*, 2003). Konstantní efektivita amplifikace všech srovnávaných vzorků je zásadní podmínka pro správné určení množství DNA ve vzorku. V případě stanovení GMO to znamená efektivitu amplifikace cílového úseku DNA certifikovaných referenčních materiálů i testovaných vzorků v systému specifickém pro GMO i v referenčním systému taxon-specifického genu (Pfaffl, 2004).

Experimentálně jsme sledovali vliv inhibice PCR na efektivitu amplifikace transgenního i referenčního systému kvantifikace DNA. Nejprve byl vliv inhibice PCR pozorován při rozpuštění DNA extrahované z certifikovaného referenčního materiálu (CRM IRMM 416-3) v 0,1 x TE pufru (Sigma-Aldrich, USA). Efektivita real-time PCR pro referenční systém byla 76,7 %, efektivita amplifikace event-specifického úseku MON863 byla 67,7 %. Po opakované extrakci DNA a jejím rozpuštění ve vodě pro PCR bylo znovu provedeno hodnocení efektivit amplifikace transgenního i taxon-specifického úseku metodou real-time PCR. V tomto případě byla zaznamenána efektivita reakce referenčního systému 92,9 % a efektivita amplifikace event-specifického úseku MON863 90,0 %. Použitý TE pufr měl složení 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5. Použití TE pufru pro rozpouštění DNA je doporučováno z důvodů větší stability DNA (Lahiri a Schnabel, 1993, Freeman *et al.*, 2003). V našem experimentu jsme ale pozorovali, že efektivita real-time PCR byla ovlivněna použitým TE pufrům s obsahem 1 mM EDTA. Jeden z důvodů stability DNA v TE pufru je inhibice nukleáz chelatační aktivitou EDTA pro dvojmocné ionty hořčíku (Wang *et al.*, 1992, Wiedbrauk *et al.*, 1995). Tato chelatační aktivita ale může mít negativní vliv také na PCR, kde jsou dvojmocné ionty hořčíku (Mg^{2+}) jednou ze základních složek reakce jako kofaktory DNA polymerázy.

V dalším experimentu byla zaznamenána inhibice PCR vlivem reziduí iontů těžkých kovů, obsažených v barevném laboratorním plastu, určeném pro molekulární biologii. Real-time PCR byla provedena se stejným materiálem a stejnou metodou jako v předchozím experimentu. Při rámci přípravy ředící řady a reakčních směsí byly v barevných

mikrozkumavkách vortexována DNA i jednotlivé komponenty reakce. Při analýze výsledku real-time PCR nebylo možné vyhodnotit efektivitu amplifikace referenčního ani transgenního systému. Rezidua kovových iontů v plastu způsobila kolaps v efektivitě PCR amplifikace. Také Arribas *et al.* (2005) popisuje vliv řady kovových kationtů (Cu^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} nebo Co^{2+}) na efektivitu PCR. Kationty Cu^{2+} a Cr^{3+} PCR inhibují způsobem, který, může být zvrácen vyšším přidavkem Mg^{2+} , naproti tomu kationty Fe^{3+} a Zn^{2+} způsobují inhibici nevratnou. Inhibiční vliv iontů kovů na extrakci DNA z kostí i na následnou PCR popisuje také Matheson *et al.* (2009). Při opakování reakce s použitím čirého laboratorního plastu byla efektivita reakce referenčního systému 89,3 % a efektivita amplifikace event-specifického úseku MON863 90,6 %. Cankar *et al.* (2006) shrnuje, že metodu real-time PCR charakterizuje nízká variabilita mezi jednotlivými opakováními jak v rámci jedné analýzy, tak při srovnání nezávisle provedených reakcí. Reakce je tak především ovlivněna vlastnostmi vzorku. Prvky inhibující PCR ale nemusí pocházet jen ze vzorku DNA. Původ mohou mít také v kontaminovaných reagentech, v používaném spotřebním materiálu nebo mohou souviset se špatně optimalizovanými reakčními podmínkami (Rossen *et al.*, 1992, Wilson, 1997).

V této studii byly popsány inhibitory PCR pocházející ze zdrojů, které jsou na původu vzorku i na metodě extrakce DNA nezávislé. V reakci byl demonstrován vliv těchto inhibitorů na efektivitu amplifikace cílových úseků DNA.

6.3 SPOLEHLIVOST SCREENINGOVÝCH METOD PRO STANOVENÍ GMO

V rámci třetího cíle práce jsme sledovali spolehlivost screeningové metody pro PCR kvantifikaci GM sóji. Je zřejmé, že screeningové metody založené na výhradním použití 35S promotoru z CaMV a NOS terminátoru nejsou s rozšiřující se paletou i pestrostí nových GMO (Jacobsen a Schouten, 2007) dostačující a mohou vést k falešně negativním výsledkům. Pro stanovení GM sóji Roundup Ready, která je nejrozšířenější celosvětově pěstovanou GM plodinou (Akhond a Machray, 2009, James, 2013), však tyto elementy postačují.

Screeningové metody pro detekci a kvantifikaci GM sóji jsme sledovali z důvodu posouzení možného falešně pozitivního výsledku. Kvantifikace GM sóji pomocí amplifikace specifického úseku 35S promotoru z CaMV totiž může vést snadno k falešně pozitivnímu výsledku při kontaminaci virem kvěťákové mozaiky (CaMV), který tento promotor přirozeně obsahuje. Stejně tak detekce NOS terminátoru může způsobit falešně pozitivní výsledek. CaMV je poměrně široce rozšířený patogen rostlin čeledě brukvovitých (Haas *et al.*, 2002). Také NOS terminátor se přirozeně vyskytuje v půdní bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (Yuan *et al.*, 2008). Kontaminace vzorků přirozenými nositeli DNA úseků, které byly cílem

PCR analýzy, nebyla očekávána. CaMV sám o sobě není přirozeným patogenem sóji a také *A. tumefaciens* by neměla být přítomna ve sklizené části rostliny. Z těchto důvodů se zdá být využití screeningových metod založených na detekci 35S promotoru z CaMV a NOS terminátoru oprávněné. Vzorky byly odebírány ve třech fázích transportu sóji během a po sklizni: na poli, během přepravy a v silu. Ve vzorcích byla provedena kvantifikace 35S promotoru z CaMV (TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit). Analytické parametry real-time PCR přitom vyhovovaly podmínkám pro takové stanovení, tzn. směrnice kalibračních přímek byla v rozmezí -3,1 a -3,6, hodnoty Ct pro referenční systém začínaly mezi 21-23 a nejistota stanovení, vyjádřená směrodatnou odchylkou byla 30 % pro všechny analyzované vzorky (Fernandez *et al.*, 2005). Analýzou obsahu GMO s použitím komerční soupravy TaqMan GMO 35S Soya Detection Kit bylo zjištěno, že procentuální zastoupení GMO (reprezentovaného 35S promotorem z CaMV) roste směrem od odběru na poli až ke skladování v silu. Byla provedena kontrolní analýza PCR i real-time PCR s amplifikací konstrukt-specifického úseku pro GM sóju RoundUp Ready (Pietsch a Waiblinger, 2000), která však byla negativní. Kontrola kontaminace byla provedena PCR pro detekci CaMV (Wolf, 2000), výsledek byl pozitivní. To však nevylučuje možnou přítomnost GM sóji s jiným složením transgenní kazety, která by ovšem byla na území EU nepovolená. Takový produkt by musel být v souladu s platnou legislativou (Nařízení (EC) č. 1829/2003) okamžitě stažen z trhu. Proto bylo přistoupeno k manuálnímu čištění odebraných replikátů vzorků (nejprve odstraněním veškerých úlomků a zbytků neznámého původu ze vzorku, poté ještě promytím vodou). Analýza byla zopakována, výsledek ukázal, významný pokles obsahu GMO pod hranici 0,9 %. To je významné především z legislativních důvodů, kdy je podle Nařízení (ES) č. 1829/2003 povinnost značit potravinářské produkty a krmiva s obsahem GMO větším než 0,9 %. Podle Nařízení č. 96/25/EHS, o oběhu krmných surovin, kterou se mění směrnice 70/524/EHS, 74/63/EHS, 82/471/EHS a 93/74/EHS a ruší směrnice 77/101/EHS a podle Nařízení (ES) č. 767/2009, o uvádění na trh a používání krmiv, o změně nařízení (ES) č. 1831/2003 a o zrušení směrnice Rady 79/373/EHS, směrnice Komise 80/511/EHS, směrnice Rady 82/471/EHS, 83/228/EHS, 93/74/EHS, 93/113/ES a 96/25/ES a rozhodnutí Komise 2004/217/ES (o botanických nečistotách) je pak povolena ve vzorku přítomnost botanických nečistot do obsahu hmotnostních 5 %. Evropská federace výrobců krmiv (European Feed Manufacturers' Federation – FEFAC) na tento problém reagovala prohlášením, že množství GMO botanické nečistoty by mělo být vyjádřeno jako hmotnostní zlomek k celkovému množství krmné suroviny, ve které je obsažen, tzn. platila by pro ně povinnost značení při překročení hranice obsahu 0,9 % (Berben, 2011). Neznamená to však, že by se měly

screeningové metody zavrhnout. Je však nutné sledovat možnost výskytu falešně pozitivního výsledku, například při kombinaci screeningové metody s potvrzením pomocí event-specifické metody.

6.4 VÝVOJ METODY REAL-TIME PCR PRO KVANTIFIKACI TAXON-SPECIFICKÉHO GENU HRACHU SETÉHO

Čtvrtým cílem práce byl vývoj a ověření referenčního systému pro real-time PCR detekci taxon-specifického genu hrachu setého (*Pisum sativum*). Prvním krokem bylo ověření metody extrakce DNA semen hrachu a příbuzných rostlin čeledi *Fabaceae*. Již bylo ukázáno, že extrakce DNA musí být často optimalizována podle rostlinného druhu nebo specifické rostlinné tkáně (Porebski *et al.*, 1997, Sangwan *et al.*, 1998, Michiels *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2004, Haque *et al.*, 2008, Shepherd *et al.*, 2011). Metoda CTAB se ukázala být pro dané vzorky vhodnou a je i levnější variantou k metodě GeneSpin (Eurofins, Německo), která byla pro extrakci DNA z hrachu ověřena Brežnou *et al.* (2006). Vhodnost extrahované DNA pro použití v PCR byla ověřena amplifikací specifického úseku plasticidového genu (Taberlet *et al.*, 1991). Jako cílový gen pro návrh taxon-specifického systému kvantifikace hrachu setého byl vybrán *lectin*. *In silico* analýzou byly v rámci tohoto genu nalezeny konzervativní úseky, vhodné pro nasedání primerů a následnou amplifikaci v PCR. Lektiny a jejich funkce jsou obecně dlouho studovaným tématem a ve veřejných databázích je tak pro tento druh analýz dobrá dostupnost DNA sekvencí hrachu setého i příbuzných rostlin z čeledi bobovitých (Lioi *et al.*, 2005, Chrispeels and Raikhel, 1991). *Lectin* hrachu setého je obsažen v genomu pouze v jedné kopii (Gatehouse *et al.*, 1987, Kaminski *et al.*, 1987, Galasso *et al.*, 2004), což je pro možnost použití jako referenčního genu při kvantifikaci GMO zásadní (Bonfini *et al.*, 2002). *Lectin* byl v případě hrachu setého vybrán jako kontrolní úsek DNA pro PCR již v několika studiích (Brežná *et al.*, 2006, Hrnčířová *et al.*, 2008).

Pro amplifikaci specifického úseku genu *lectin* hrachu setého byly navrženy 2 sady primerů. První pro amplifikaci 658 bp dlouhého amplikonu, který byl použit pro přípravu pozitivní plasmidové kontroly a byl sekvenován. *In silico* bylo v databázi NCBI ověřeno, že získaná sekvence odpovídá *lectinu* hrachu setého. V rámci této ověřené DNA sekvence byly navrženy primery pro amplifikaci 101 bp dlouhého úseku DNA, který již sloužil jako cílový úsek kvantitativní taxon-specifické real-time PCR. Primery byly navrženy se 100% homologií ke všem dostupným DNA sekvencím hrachového *lectinu* a s co největším počtem chybného párování s *lectiny* příbuzných rostlin čeledi bobovitých. Přítomnost chybného nasedání některých nukleotidů v primerových sekvencích se může stupněm svého efektu lišit.

Stadhouders *et al.* (2010) uvádí, že vliv chybného párování rychle klesá směrem od 3' konce primeru ke 5' konci. Chybné párování přímo na 3' konci primeru vede k průměrnému zeslabení signálu v real-time PCR o 5,19 Ct. Na pozici druhého nukleotidu od 3' konci primeru je průměrný posun signálu už jen 1,87 Ct. Nicméně také zaznamenal, že v individuálních případech chybného párování i na non-terminální pozici nukleotidu může být vyvolán účinek s posunem až o 5,96 Ct. V našem případě obsahoval forward primer pro příbuzné rostliny z čeledi bobovitých 1, 2 nebo 3 chybné nukleotidy, přičemž žádný z nich nebyl přímo v 3' koncové pozici. Současně revers primer obsahoval 1 nebo 2 chybné nukleotidy, v závislosti na konkrétním rostlinném druhu. Primery byly v PCR testovány na 13 kultivarech hrachu setého a 4 příbuzných rostlin z čeledi bobovitých (vikvi, sóje, čočce a fazolu). Reakce byla nejprve ověřena v konvenční PCR, poté v real-time PCR. V případě konvenční PCR byl detekován pozitivní signál pouze u kultivarů hrachu, u testovaných příbuzných rostlin k žádné amplifikaci nedošlo. Tento výsledek byl potvrzen i v real-time PCR s detekcí pomocí SYBR Green. Specifita PCR produktu byla kontrolována křivkou teploty tání i elektroforetickou separací DNA na 2 % agarózovém gelu s detekcí pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Průměrný signál testovaných kultivarů hrachu setého byl při použití 200 ng DNA v reakci $23,56 \pm 0,36$ Ct. Inhibice real-time PCR byla kontrolována metodou 10x ředění vzorku, posun signálu o 3,23 Ct prokázal, že reakce inhibována není. S použitím genomické DNA byla sestavena kalibrační křivka a byla vypočítána 99% efektivita reakce, průměrná hodnota korelačního koeficientu R^2 byla 0,997. Výkonnostní charakteristiky reakce byly ve shodě s požadavky JRC pro GMO detekci (Mazzara *et al.*, 2008).

6.5 VYUŽITÍ VYSOCE ÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETREM PRO CHARAKTERIZACI KONVENČNÍCH A GM ODRŮD KUKUŘICE

Pátý cíl práce byl zaměřený využití nové techniky pro detekci GMO. Analýza GMO pro oficiální účely v potravinách a krmivech probíhá takřka výhradně metodou PCR a real-time PCR. Tyto metody jsou plně akceptovány autoritami, které jsou zodpovědné za dohled na nakládání s GMO a dodržování stanovených pravidel (Marmioli *et al.*, 2003, Bonfini *et al.*, 2012). Přesto každoroční celosvětový nárůst GMO (James, 2013) vyvíjí velký tlak na stávající metodologii i na NRL, zabývající se detekcí GMO. Tuto situaci umocňuje rostoucí diverzita nových GMO i komplikovanost jejich složení. Větší nároky na rychlost, komplexnost, citlivost i přesnost analýzy GMO v potravinách a krmivech vede vědce

k hledání nových metod, které by bylo možné pro daný účel použít (Broeders *et al.*, 2012). Nový přístup k analýze GMO přinášející metody, využívající necílené metabolomické analýzy pro identifikaci látek, kterými se liší GM a konvenční rostliny (Manetti *et al.*, 2006, Leon *et al.*, 2009, Barros *et al.*, 2010, Heinemann *et al.*, 2011, Frank, 2012). V prezentované studii bylo testováno využití UHPLC-QTOFMS pro necílenou metabolomickou analýzu konvenčních kultivarů kukuřice a GM kultivarů Bt kukuřice MON810 (MONØØ81Ø-6).

Nejprve byl metodou PCR potvrzen genetický původ (konvenční versus GM) použitých rostlin kukuřice. Necílená analýza methanolických extraktů z listů kukuřice byla použita pro vytvoření metabolomického otisku prstu. Data byla dále zpracovávána vzhledem k přesycení signálu i velkým rozdílům v intenzitách některých píků. S takto upravenými daty byla provedena analýza PCA. PCA umožňuje snížení dimenze dat při maximálním možném zachování informace (Beruetta *et al.*, 2007).

PCA analýza ukázala rozdíly v metabolomických profilech transgenní a konvenční kukuřice. Tyto rozdíly byly dány patrně odlišnou koncentrací metabolitů. Vzdálenosti jednotlivých vzorků v rámci klastru byly dány různými podmínkami životního i půdního prostředí.

Pro další analýzu byl zvolen přístup kombinační korelační matrice (20 x 20), získané faktorovou analýzou LC-MS dat, a PCA. Tento multivariační přístup není ovlivněn velkými výkyvy v intenzitě píků. Tří-dimenzionální PCA analýza naznačila, že GM kultivary jsou si navzájem blíže ve srovnání s těmi konvenčními. To byl očekávaný výsledek, vzhledem k tomu, že transgenní kultivary jsou odvozeny z jedné GM MON810 linie. Ale přesto u nich nebyl překročen rozsah variability vypočtené pro konvenční odrůdy.

Metabolomický profil neukázal ani významnou korelaci mezi vzorky na základě jejich vývojového stupně v době sběru a zemědělsky hodnocenými znaky, jako ranost, výnos nebo použití odrůdy pro siláž nebo zrno. Naopak, rozsahy intenzit metabolomických signálů jednotlivých GM a konvenčních rostlin se překrývaly způsobem, že lze předpokládat situaci rovnovážného stavu, který by znamenal, že se transgenní kultivary v koncentraci metabolitů neliší od kultivarů konvenčních. To je v souladu se splněním podmínky ekvivalence složení pro konvenční a GM plodiny (EFSA, 2011, OECD, 1993, FAO/WHO, 2000).

Přestože je k dispozici více informací o metabolomickém složení kukuřičných zrn (Kuiper *et al.*, 2001, Cellini *et al.*, 2004), složení listové tkáně také může mít na bezpečnost GM rostlin vliv. Tato studie představila přístup, který umožňuje ve velkém měřítku vyhodnocení metabolomu listů kukuřice a může poskytnout rozsáhlé údaje pro posouzení bezpečnosti GMO.

7 ZÁVĚR

V předložené dizertační práci byla řešena problematika jednotlivých fází stanovení GMO v rostlinách a odvozených produktech, založeném na anlyze DNA. Problematické okruhy se týkaly extrakce DNA, vlivu inhibitorů na efektivitu real-time PCR a stanovení GMO pomocí screeningových elementů.

Byly testovány tři metody extrakce DNA (CTAB, Wizard, GeneSpin) z pecek a dužiny papáji a z kandované papáji. Vhodnost extrakčních metod pro daný materiál byla ověřena a potvrzena PCR amplifikací taxon-specifického genu papáji. Pro extrakci DNA z dužiny a pecek papáji byla nejlépe hodnocena metoda CTAB, metoda GeneSpin po optimalizaci byla vhodná pro extrakci DNA z kandované papáji. Vybrané metody extrakce DNA byly použity při monitoringu GM papáji na trhu.

Při studiu inhibitorů PCR byl sledován vliv EDTA a reziduí iontů těžkých kovů na efektivitu real-time PCR. Inhibitory PCR pocházely ze zdrojů, které byly nezávislé na původu vzorku i na metodě extrakce DNA. Byl demonstrován jejich vliv na efektivitu real-time PCR.

Problematika využívání screeningových elementů při stanovení GMO byla studována při kvantitativní analýze GM sóji. Výskyt falešně pozitivních výsledků byl zaznamenán při kvantitativním stanovení GMO metodou real-time PCR s použitím screeningového elementu 35S pomotoru z CaMV. Výsledky byly diskutovány vzhledem ke stávající legislativě a povinnosti značit výrobky s obsahem GMO >0,9 %. Diskutovány byly také výhody a limity používání screeningových elementů pro stanovení GMO.

V další části práce byla navržena metoda real-time PCR pro kvantifikaci taxon-specifického genu hrachu setého. Byly navrženy primery a bylo optimalizováno složení reakční směsi a teplotní profil real-time PCR. Byla ověřena specifita reakce, mez kvantifikace, mez detekce a byla připravena pozitivní plazmidová kontrola.

Analýza metabolomických profilů konvenčních a GM odrůd kukuřice byla testována pro možné využití při detekci GMO. Pro analýzu byla použita vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s kvadrupólovým TOF hmotnostním spektrometrem. Testovaná metoda sice odlišení GM a konvenční kukuřice neumožnila, ale ukázala svůj potenciál pro využití např. při hodnocení bezpečnosti nových GMO.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aguilar A, Magnien E, Thomas D. Thirty years of European biotechnology programmes: from biomolecular engineering to the bioeconomy. *N Biotechnol.* 2013;**30**(5):410-425.
- Aguilera J, Nielsen KM, Sweet J. Risk assessment of GM trees in the EU: current regulatory framework and guidance. *iForest.* 2013;**6**:127-131.
- Ahmed FE. Molecular markers for early cancer detection. *J Environ Sci Health.* 2000;**18**(2):75-125.
- Akhond MAY, Machray GC. Biotech crops: technologies, achievements and prospects. *Euphytica.* 2009;**166**:47-59.
- Akiyama H, Watanabe T, Wakabayashi K, Nakade S, Yasui S, Sakata K, Chiba R, Spiegelhalter F, Hino A, Maitani T. Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Anal Chem.* 2005;**77**(22):7421-7428.
- Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Van den Eede G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms (GMO's) in agricultural crops and plant-derived food products - a review. *Eur Food Res Technol.* 2002;**214**:3-26.
- Armani A, Tinacci L, Xiong X, Titarenko E, Guidi A, Castigliero L. Development of a Simple and Cost-Effective Bead-Milling Method for DNA Extraction from Fish Muscles. *Food Anal Methods.* 2014;**7**:946–955.
- Arribas A, Vicente A, Arias A, Lázaro E. Effect of metallic cations on the efficiency of DNA amplification. Implications for nucleic acid replication during early stages of life. *Int J Astrobiol.* 2005;**4**(2):115-123.
- Bahrtdt C, Krech AB, Wurz A, Wulff D. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Anal Bioanal Chem.* 2010;**396**(6):2103-2112.
- Barker D. Genetically Engineered Trees: The New Frontier of Biotechnology. Center for Food Safety, 2013. www.centerforfoodsafety.org/reports/2637/genetically-engineered-trees-the-new-frontier-of-biotechnology

- Barros E, Lazar S, Anttonen MJ, Van Dijk JP, Röhling RM, Kok EJ, Engel KH. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnol J*. 2010;**8**(4):436-451.
- Beech CJ, Koukidou M, Morrison NI, Alphey L. Genetically modified insects: science, use, status and regulation. *Collect Biosaf Rev*. 2012;**6**:66-124.
- Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;**96**(15):8774-8778.
- Benfey PN, Ren L, Chua NH. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J Jun*. 1990;**9**(6):1677-1684.
- Berben G. GMO content of botanical impurities: when to label? 3rd Workshop dei laboratori del controllo ufficiale di OGM, Roma, Italy, 2011.
- Berg P, Baltimore D, Boyer HW, Cohen SN, Davis RW, Hogness DS, Nathans D, Roblin R, Watson JD, Weissman S, Zinder ND. Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science*. 1974;**185**(4148):303.
- Berg P, Baltimore D, Brenner S, Roblin RO, Singer MF. Summary statement of the Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;**72**(6):1981-1984.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*. 1983;**304**:184-187.
- Bi A, Nakajima C, Fukushima Y, Tamaru A, Sugawara I, Kimura A, Kawahara R, Hu Z, Suzuki Y. A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspX for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex. *Jpn J Infect Dis*. 2012;**65**(3):247-251.
- Bonfini L, Heinze P, Kay S, Van den Eede G. Review of GMO Detection and Quantification Techniques. EUR 20384 EN. EC, JRC, 2002.
- Bonfini L, van den Bulcke MH., Mazzara M, Ben E, Patak A. GMOMETHODS: The European Union Database of Reference Methods for GMO Analysis. *J AOAC Int*. 2012;**95**(6):1713-1719.
- Brestovac B, Wong ME, Costantino PS, Groth D. A Rapid DNA Extraction Method Suitable for Human Papillomavirus Detection. *J Med Virol*. 2014;**86**(4):653-657.

- Brežná B., Hudecová L., Kuchta T. Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *Eur Food Res Technol.* 2006;**222**:600-603.
- Brod FC, van Dijk JP, Voorhuijzen MM, Dinon AZ, Guimarães LH, Scholtens IM, Arisi AC, Kok EJ. A high-throughput method for GMO multi-detection using a microfluidic dynamic array. *Anal Bioanal Chem.* 2014;**406**(5):1397-1410.
- Broeders SR, De Keersmaecker SC, Roosens NH. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. *Journal of Biomedicine and Biotechnology. J Biomed Biotechnol.* 2012; doi: 10.1155/2012/402418.
- Brookes G. The farm level impact of using Bt maize in Spain. Brookes West, Canterbury, UK, 2002.
- Brookes G, Barfoot P. The income and production effects of biotech crops globally 1996-2010. *GM Crops Food.* 2012;**3**(4):265-272.
- Bruening G, Lyons JM. The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture.* 2000;**54**(4):6-7.
- Bustin SA. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line, USA, 2004.
- 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;**6**:37.
- Cantley MF. The regulation of modern biotechnology: A historical and European perspective. In Rehm HJ and Reed G (eds). *Biotechnology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1995.
- Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AM, Kärenlampi S, Kok EJ, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborn HP, Pedersen J, Smith M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem Toxicol.* 2004;**42**(7):1089-1125.
- CEN/TS 15568:2006. Foodstuffs – Methods of analysis for detection of genetically modified organisms and derived products – Sampling strategies.
- Cigan AM, Unger-Wallace E, Haug-Collet K. Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. *Plant J.* 2005;**43**(6):929-940.

- Codex Committee On Methods Of Analysis And Sampling. Guidelines On Performance Criteria And Validation Of Methods For Detection, Identification And Quantification Of Specific cDNA Sequences And Specific cProteins In Foods. CAC/GL 74–2010. Rome: Codex alimentarius commission - WHO. 2010.
- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973;**70**(11):3240-3244.
- Commission of the European Communities. Science and technology policy, FAST -Sub-programme bio-society Research activities, 1980.
- Commission Recommendation 2004/787/EC of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. *Off J Eur Union*. 2004;**L348**:18-26.
- Commission Regulation (EU) No 619/2011 of 24 June 2011 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorisation procedure is pending or the authorisation of which has expired. *Off J Eur Union*. 2011;**L166**:9-13.
- Corbisier P, Bhat S, Partis L, Xie VR, Emslie KR. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Anal Bioanal Chem*. 2010;**396**(6):2143-2150.
- Cottenet G, Blancpain C, Sonnard V, Chuah PF. Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*. 2013;**405**(21):6831-6844.
- Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai CJ. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. CRC Press, Boca Raton, 2004.
- Daniell H, Khan MS, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*. 2002;**7**(2):84-91.
- Demeke T, Ratnayaka I, Phan A. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *J AOAC Int*. 2009;**92**(4):1136-1144.

- Demeke T, Jenkins G. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem.* 2010;**396**(6):1977-1990.
- Devos Y, Aguilera J, Diveki Z, Gomes A, Liu Y, Paoletti C, du Jardin P, Herman L, Perry JN, Waigmann E. EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead. *Transgenic Res.* 2014;**23**(1):1-25.
- Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W, Zhang D. Validation of a rice-specific gene, sucrose-phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. *J Agric Food Chem.* 2004;**52**(11):3372-3377.
- Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Off J Eur Union.* 2001;**L 106**:1-38.
- Drobník J. Biotechnologie a společnost. Nakladatelství Karolinum, 2008.
- Drummond MH, Chilton MD. Tumor-Inducing (Ti) Plasmids of *Agrobacterium* Share Extensive Regions of DNA Homology. *J Bacteriol.* 1978;**136**(3):1178-1183.
- Dunlop CA. GMOs and Regulatory Styles. *Env Polit.* 2000;**9**(2):149-155.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA J.* 2011;**9**(5):2150-2237.
- EFSA Scientific Opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J.* 2012a;**10**(2):1-33.
- EFSA Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site- Directed Nucleases with similar function. *EFSA J.* 2012b;**10**(10):1-31.
- EN ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- European Commission. Proposal for the Council Decision Adopting a Multinational Research Programme of the European Economic Community in the Field of Biotechnology. *Com.* 1984;(84):230.
- FAO/WHO. Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plant Origin. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2000.
- Faye L, Gomord V. Success stories in molecular farming-a brief overview. *Plant Biotechnol J.* 2010;**8**(5):525–528.
- Fernandez S, Charles-Delobel C, Geldreich A, Berthier G, Boyer F, Collonnier C, Coué-Philippe G, Diolez A, Duplan MN, Kebdani N, Romaniuk M, Feinberg M, Bertheau Y. Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms, Part I: Operating procedure. *J AOAC Int.* 2005;**88**(5):547-557.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;**80**(15):4803-4807.
- Frank T, Röhlrig RM, Davies HV, Barros E, Engel KH. Metabolite profiling of maize kernels – genetic modification versus environmental influence. *J Agric Food Chem.* 2012;**60**(12): 3005-3012.
- Freeman B, Smith N, Curtis C, Hockett L, Mill J, Craig IW. DNA from buccal swabs recruited by mail: evaluation of storage effects on long-term stability and suitability for multiplex polymerase chain reaction genotyping. *Behavior genetics.* 2003;**33**(1):67-72.
- Fuchs RL, Heeren RA, Gustafson ME, Rogan GJ, Bartnicki DE, Leimgruber RM, Finn RF, Hershman A, Berberich SA. Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. *Biotechnology.* 1993;**11**(13):1537-1542.
- Fukuta S, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Hasegawa M, Hayashi I, Hashimoto M, Kanbe M. Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms. *Eur Food Res Technol.* 2004;**218**(5):496-500.

- Galasso I, Lioi L, Lanave C, Bollini R, Sparvoli F. Identification and isolation of lectin nucleotide sequences and species relationships in the genus *Lens* Miller. *Theor Appl Genet.* 2004;**108**(6):1098-1102.
- Gatehouse JA, Bown D, Evans IM, Gatehouse LN, Jobes D, Preston P, Croy RRD. Sequence of the lectin gene from pea (*Pisum sativum* L.). *Nucleic Acids Res.* 1987;**15**(18):7642-7642.
- Gizzarelli F, Corinti S, Barletta B, Lacovacci P, Brunetto B, Butteroni C, Afferni C, Onori R, Miraglia M, Panzini G, Di Felice G, Tinghino R. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. *Clin Exp Allergy.* 2006;**36**(2):238-248.
- Goda Y, Asano T, Shibuya M, Hino A, Toyoda M. Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *J Food Hygienic Soc Japan.* 2001;**42**: 231-236.
- Gryson N, Messen K, Dewettinck K. Evaluation and optimization of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *J Sci Food Agric.* 2004;**84**:1357-1363.
- Gryson, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCRbased GMO analysis: A review. *Anal Bioanal Chem.* 2010;**396**(6):2003–2022.
- Guertler P, Eicheldinger A, Muschler P, Goerlich O, Busch U. Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food Chem.* 2014;**149**:302-306.
- Halford NG. *Genetically Modified Crops.* Imperial College Press, 2003.
- Halford NG. *Plant Biotechnology: Current and Future Applications of Genetically Modified Crops.* Chichester: Wiley, 2006.
- Haque I, Bandopadhyay R, Mukhopadhyay K. An optimized protocol for fast genomic DNA isolation from high secondary metabolites and gum containing plants. *Asian J Plant Sci.* 2008;**7**:3304-3308.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;**6**(10):986-994.
- Heinemann JA, Kurenbach B, Quist D. Molecular profiling – a tool for addressing emerging gaps in the comparative risk assessment of GMOs. *Environ Int.* 2011;**37**(7):1285-1293.

- Hemmer W. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-Report 2/1997, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland, 1997.
- Herrera-Estrella L, Block MD, Messens E, Hernalsteens JP, Montagu MV, Schell J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant-cells. *EMBO J.* 1983;**2**(6):987-995.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;**10**(4):413-417.
- Holme IB, Wendt T, Holm PB. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development, *Plant Biotechnol J.* 2013;**11**(4):395-407.
- Holst-Jensen A, De Loose M, Van den Eede G. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *J Agric Food Chem.* 2006;**54**(8):2799-2809.
- Holst-Jensen A, Bertheau Y, de Loose M, Grohmann L, Hamels S, Hougs L, Morisset D, Pecoraro S, Pla M, Van den Bulcke M, Wulff D. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnol Adv.* 2012;**30**(6):1318-1335.
- Hrnčířová Z, Bergerová E, Siekel P. Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *J Food Nutr Res.* 2008;**47**:23-28.
- Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, van der Winden J, Matzke AJM, Matzke M. RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta.* 2007;**1769**(5-6):358-374.
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Engel KH. Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1997;**205**:442-445.
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Engel KH. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unter Forsch.* 1998;**206**:203-207.
- Chaouachi M, Giancola S, Romaniuk M, Laval V, Bertheau Y, Brunel D. A strategy for designing multi-taxa specific reference gene systems. example of application-ppi

- phosphofruktokinase (ppi-PPF) used for the detection and quantification of three taxa: maize (*Zea mays*), cotton (*Gossypium hirsutum*) and rice (*Oryza sativa*). *J Agric Food Chem.* 2007;**55**(20):8003-8010.
- Cheng Z, Zhang M, Hu K, Sun F, Tao R, Gao X, Luan F. Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Event-Specific Detection of Wheat B73-6-1. *Food Anal Methods.* 2014; **7**:500-505.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell.* 1977;**11**(2):263-271.
- Chilton MD. Agrobacterium Ti Plasmids as a Tool for Genetic Engineering in Plants. *Basic Life Sci.* 1979;**14**:23-31
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J. Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature.* 1982;**295**:432-434
- Chrispeels MJ, Raikhel NV. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.* 1991;**3**(1):1-9.
- Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1972;**69**(10):2904-2909.
- Jacobs JM, Van Eck HJ, Arens P, Verkerk-Bakker B, Te Lintel Hekkert B, Bastiaanssen HJ, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ. A genetic map of potato (*S. tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor Appl Genet.* 1995;**91**(2):289-300.
- Jacobsen E, Schouten HJ. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends Biotechnol.* 2007;**25**(5):219-223.
- Jähne A, Becker D, Lörz H. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. *Euphytica.* 1995;**85**:35-44.
- James C. Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants, 1986 to 1995: The First Decade of Crop Biotechnology. Ithaca, NY: The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 1996.

- James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012. Ithaca, NY: The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2012.
- James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. Ithaca, NY: The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2013.
- Jasbeer K, Son R, Mohamad Ghazali F, Cheah YK. Real-time PCR evaluation of seven DNA extraction methods for the purpose of GMO analysis. *Int Food Res J.* 2009;**16**:329-341.
- Kakihara Y, Matsufuji H, Chino M, Takeda M. Extraction and detection of endogenous soybean DNA from fermented foods. *Food Control.* 2006;**17**(10):808-813.
- Kaminski PA, Buffard D, Strosberg AD. The pea lectin gene family contains only one functional gene. *Plant Mol Biol.* 1987;**9**(5):497-507.
- Kärenlampi S. Health effects of marker genes in genetically engineered food plants. Nordic Council of Ministers, 1996.
- Kehr J. High resolution spatial analysis of plant systems. *Curr Opin Plant Biol.* 2001;**4**(3):197-201.
- Kharazmi M, Bauer T, Hammes WP, Hertel C. Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis*. *Syst Appl Microbiol.* 2003;**26**(4):495-501.
- Kleinhofs A, Behki R. Prospects for Plant Genome Modification by Nonconventional Methods. *Annu Rev Genet.* 1977;**11**:79-101.
- Kobilinsky A, Bertheau Y. Minimum cost acceptance sampling plans for grain control, with application to GMO detection. *Chemometr Intell Lab.* 2005;**75**:189-200.
- König A, Kleter G, Hammes W, Knudsen I, Kuiper H. Genetically modified crops in the EU: food safety assessment, regulation, and public concerns. European Commission, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2004a.
- König A, Cockburn A, Crevel RW, Debruyne E, Grafstroem R, Hammerling U, Kimber I, Knudsen I, Kuiper HA, Peijnenburg AA, Penninks AH, Poulsen M, Schauzu M, Wal JM. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem Toxicol.* 2004b;**42**(7):1047-1088.

- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP, Kok EJ. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J*. 2001;**27**(6):503-528.
- Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical genetics*. 1993;**31**(7-8):321-328.
- Lee D, Mura M, Allnut T, Powell W. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences. *BMC Biotechnol*. 2009;**9**(7):1-7.
- Leimanis S, Hamels S, Nazé F, Mbongolo Mbella G, Sneyers M, Hochegger R, Broll H, Roth L, Dallmann K, Micsinai A, La Paz JL, Pla M, Brünen-Nieweler C, Papazova N, Taverniers I, Hess N, Kirschneit B, Bertheau Y, Audeon C, Laval V, Busch U, Pecoraro S, Neumann K, Rösel S, van Dijk J, Kok E, Bellocchi G, Foti N, Mazzara M, Moens W, Remacle J, Van den Eede G. Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. *Eur Food Res Technol*. 2008;**227**:1621-1632.
- Leon C, Rodriguez-Meizoso I, Lucio M, Garcia-Cañas V, Ibañez E, Schmitt-Kopplin P, Cifuentes A. Metabolomics of transgenic maize combining Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry and pressurized liquid extraction. *J Chromatogr A*. 2009;**1216**(43):7314-7323.
- Lhereux K, Libeau-Dulos M, Nilsagård H, Rodríguez-Cerezo E, Menrad K, Menrad M, Vorgrimler D. Review of GMOs under research and development. EC, JRC, 2003.
- Lin HY, Wei HA, Lin FP, Shih DYC. Study of PCR detection methods for genetically modified soybeans with reference molecules. *J Food Drug Anal*. 2006;**14**:194-202.
- Lioi L, Galasso I, Santantonio M, Lanave C, Bollini R, Sparvoli F. Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genet Resour Crop Ev*. 2005;**53**:1615-1623.
- Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E, Borchers T, Braunschweiger G, Busch U, Eklund E, Eriksen FD, Fagan J, Fellingner A, Gaugitsch H, Hayes D, Hertel C, Hörtner H, Joudrier P, Kruse L, Meyer R, Miraglia M, Müller W, Phillipp P, Pöpping B, Rentsch R, Wurtz A. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *JAOC Int*. 1999;**82**(4):923-928.

- Lipp M, Anklam E, Stave J. Validation of an immunoassay for the detection and quantification of Roundup-Ready soy beans in food and food fractions. *J AOAC Int.* 2000;**83**(4):919-927.
- Longstaff M, Edmonds HS and Newell CA. An improved method for the detection and quantification of recombinant protein in transgenic plants. *Plant Mol Biol Rep.* 1995;**13**:363-368.
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E. New plant breedings techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development. European Commission EUR 24760 EN, 2011.
- Lüthy J, Brodmann P, Bühler HP, Deru JY, Eugster A, Gafner JL, Hemmer W, Hübner P, Meyer R, Pauli U, Pfefferkorn A, Rentsch J, Ruf J, Vögeli U. Molekularbiologische Methoden. Swiss Food Manual, Chapter 52B, 1998.
- Manetti C, Bianchetti C, Casciani L, Castro C, Di Cocco ME, Miccheli A, Motto M, Conti F. A metabolomic study if transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *J Exp Bot.* 2006;**57**(11):2613-2625.
- Marfo EK, Oke OL, Afolabi OA. Chemical composition of papaya (*Carica papaya*) seeds. *Food Chem.* 1986;**22**(4):259-266.
- Marmioli N, Peano C, Maestri E. Advanced PCR techniques in identifying food components In: Lees M (ed) Food authenticity and traceability. CRC, Cambridge, 2003:3-33.
- Marmioli N, Maestri E, Gulli M, Malcevski A, Peano C, Bordoni R, De Bellis G. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem.* 2008;**392**(3):369-384.
- Marris E. Transgenic fish go large. *Nature.* 2010;**467**:259.
- Matheson CD, Marion TE, Hayter S, Esau N, Fratpietro R, Vernon KK. Technical note: removal of metal ion inhibition encountered during DNA extraction and amplification of copper-preserved archaeological bone using size exclusion chromatography. *Am J Phys Anthropol.* 2009;**140**(2):384-391.
- Mazzara M, Foti N, Price S, Paoletti C, Van den Eede G. Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line MON 863 Using Real-Time PCR – Validation Report and Protocol. Online Publication, 2005. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON863-Val-report_mm.pdf.

- Mazzara M, Savini C, Charles Delobel C, Broll H, Damant A, Paoletti C, Van Den Eede G. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing European Network of GMO Laboratories (ENGL). OPOCE, 2008.
- McHughen A, Smyth S. US regulatory system for genetically modified [genetically modified organism (GMO), rDNA or transgenic] crop cultivars. *Plant Biotechnology J.* 2008;**6**(1):2-12.
- McKenzie MJ, Mett V, Jameson PE. Modified ELISA for the detection of neomycin phototransferase II in transformed plant species. *Plant Cell Rep.* 2000;**19**:286-289.
- Meyer R.. Detection of genetically engineered plants by the polymerase. chain reaction (PCR) using the Flavr Savr tomato as an example. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1995;**201**(6):583-586.
- Meyer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control.* 1999;**10**(6):391-399.
- Michiels A, Van den Ende M, Tucker L, Van Riet A, Van Laere. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem.* 2003;**315**(1):85-89.
- Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJ, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JP, Zagon J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food Chem Toxicol.* 2004;**42**(7):1157-1180.
- Moeller L, Wang K. Engineering with precision: tools for the new generation of transgenic crops. *Bioscience.* 2008;**58**:391-401.
- Moreano F, Busch U, Engel KH. Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: Influence of particle size compositions and heat-induced DNA degradation. *J Agric Food Chem.* 2005;**53**(26):9971-9979.
- Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009;**15**(2):62-69.
- Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K, Žel J. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PloS One.* 2013;**8**(5):e62583.

- Morono Y, Terada T, Hoshino T, Inagaki F. Hot-Alkaline DNA Extraction Method for Deep-Subseafloor Archaeal Communities. *Appl Environ Microbiol.* 2014;**80**(6):1985-1994.
- Morrow JF, Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Goodman HM, Helling RB. Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;**71**(5):1743-1747.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;**155**:335-350.
- Murai N, Kemp JD, Sutton DW, Murray MG, Slightom JL, Merlo DJ, Reichert NA, Sengupta-Gopalan C, Stock CA, Barker RF, Hall TC- Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science.* 1983;**222**(4623):476-482.
- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;**8**(19):4321-4325.
- Nagori R, Sharma P, Habibi N, Purohit SD. An Efficient Genomic DNA Extraction Protocol for Molecular Analysis in *Annona reticulata*. *Natl Acad Sci Lett.* 2014;**37**(2):137-140.
- OECD. Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles. Organization of Economic Cooperation and Development, 1993.
- Oguchi T, Onishi M, Chikagawa Y, Kodama T, Suzuki E, Kasahara M, Akiyama H, Teshima R, Futo S, Hino A, Furui S, Kitta K. Investigation of residual DNAs in sugar from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2009;**50**(1):41-46.
- Onori R, Šuštar-Vozlič J, Bellocchi G, Berben G, Blejec A, Brera C, Čergan Z, Debeljak M, De Giacomo M, De Vivo M, Esteve T, Janssen E, Kozjak P, Leprince F, Macarthur R, Malcevski A, Marmioli N, Meglič V, Melé E, Messeguer J, Miraglia M, Nadal A, Oger R, Palmaccio E, Pla M, Planchon V, Prantera E, Rostohar K, Vrščaj B. GMO sampling strategies in the food and feed chain. In Bertheau Y, enetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability. Blackwell Publishing, 2012.
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholz DA, Peschke VM, Nida LD, Taylor NB, Kishore GM.

- Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 1995;**35**:1451-1461.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash P, Rao P, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008;**18**(6):407-421.
- Patterson R, Mellies CJ, Roberts M. Immunologic Reactions Against Insulin: II. IgE anti-Insulin, Insulin Allergy and Combined IgE and IgG Immunologic Insulin Resistanc. *J Immuno.* 1973;**110**:1135-1145.
- Patterson AL. A Comparison of Biotechnology Regulatory Policy in the United States and the European Union. Presented at the Biennial Conference of the European Community Studies Association. Pittsburg, PA, 1999.
- Patterson AL, Josling TE. Regulating biotechnology: Comparing EU and US approaches. European Policy Paper Series. Pittsburgh, PA: European Studies Center. University of Pittsburgh, USA, 2002.
- Peano C, Samson MC, Palmieri L, Gulli M, Marmioli N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. *J Agric Food Chem.* 2004;**52**(23):6962-6968.
- Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In Bustin SA (ed). A-Z of quantitative PCR, La Jolla, 2004.
- Pietsch K, Waiblinger HU, Brodmann P, Wurz A. Screeningverfahren zur Identifizierung 'gentechnisch veränderter' pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* 1997;**93**:35-38.
- Pietsch K, Waiblinger HU. Quantification of genetically modified soybeans in food with the LightCycler system. In Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K. (eds). Rapid Cycle Real Time PCR – Methods and Applications. Springer Verlag, 2000.
- Porebski S, Bailey L, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep.* 1997;**15**:8–15.
- Querci M, Paoletti C, Van den Eede G. From Sampling to Quantification: Developments and Harmonization of Procedures for GMO Testing in the European Union. In: Craig W

- (ed) Collection of biosafety reviews. Trieste (Italy): International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), 2007.
- Querci M, Foti N, Bogni A, Kluga L, Broll H, Van den Eede G. Real-Time PCR-Based Ready-to-Use Multi-Target Analytical System for GMO Detection. *Food Anal Methods*. 2009;**2**(4):325-336.
- Randhawa GJ, Singh M, Morisset D, Sood P, Zel J Loop-mediated isothermal amplification: rapid visual and real-time methods for detection of genetically modified crops. *J Agric Food Chem*. 2013;**61**(47):11338-11346.
- Rapp D. DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends. *J Appl Microbiol*. 2010;**108**(5):1485-1493.
- Raymond P, Gendron L, Khalf M, Paul S, Dibley KL, Bhat S, Xie VR, Partis L, Moreau ME, Dollard C, Coté MJ, Laberge S, Emslie KR. Detection and identification of multiple genetically modified events using DNA insert fingerprinting. *Anal Bioanal Chem*. 2010;**396**(6):2091-2102.
- Redenbaugh K, Hiatt W, Martineau B, Lindemann J, Emlay D. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH(3')II): Review of its safety and use in the production of genetically engineered plants. *Food Biotechnol*. 1994;**8**(2-3):137-165.
- Resolution on Biotechnology in Europe and the Need for an Integrated Policy, Doc. A2-134/86, *Off J Eur Commun*. 1987;**C76**:25-29.
- Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Ludes B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci Int*. 2005;**151**(1):31-35.
- Rogan GJ, Ream JE, Berberich SA, Fuchs RL. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of neomycin phosphotransferase II in genetically modified cotton tissue extracts. *J Agric Food Chem*. 1992;**40**:1453-1458.
- Rommens CM, Humara JM, Ye J, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K. Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol*. 2004;**135**(1):421-431.
- Rommens CM, Haring MA, Swords K, Davies HV, Belknap WR. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends Plant Sci*. 2007;**12**(9):397-403.

- Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol.* 1992;**17**(1):37-45.
- Ruttink T, Demeyer R, Van Gulck E, Van Droogenbroeck B, Querci M, Taverniers I, De Loose M. Molecular toolbox for the identification of unknown genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem.* 2010;**396**(6):2073-2089.
- Sahu SK, Thangaraj M, Kathiresan K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Mol Biol.* 2012.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;**30**(4732):1350-1354.
- Sangwan NS, Sangwan RS, Kumar S. Isolation of genomic DNA from the antimalarial plant *Artemisia annua*. *Plant Mol Biol Rep.* 1998;**16**(4):1-9.
- Sarwat M, Negi MS, Lakshmikumaran M, Tyagi AK, Das S, Srivastava PS. A standardized protocol for genomic DNA isolation from *Terminalia arjuna* for genetic diversity analysis. *Electron J Biotech.* 2006;**9**(1):86-91.
- Sharma S, Sharma KK, Kuhad RC. An efficient and economical method for extraction of DNA amenable to biotechnological manipulations, from diverse soils and sediments. *J Appl Microbiol.* 2014;**116**(4):923-933.
- Shepherd LD, McLay TGB. Two microscale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue. *J Plant Res.* 2011;**124**(2):311-314.
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.* 2009;**459**(7245):437-441.
- Song P, Heinen JL, Burns TH, Allen RD. Expression of two tissue-specific promoters in transgenic cotton plants. *J Cotton Sci.* 2000;**4**:217-223.
- Sourrouille C, Marshall B, Liénard D, Faye L. From Neanderthal to Nanobiotech: From Plant Potions to Pharming with Plant Factories. *Methods Mol Biol.* 2009;**483**:1-23.

- Spaniolas S, Tsachaki M, Bennett MJ, Tucker GA. Evaluation of DNA extraction methods from green and roasted coffee beans. *Food Control*. 2008;**19**(3):257-262.
- Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes TH, Schutten M. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *J Mol Diagn*. 2010;**12**(1):109-117.
- Steinkeliner H, Korschhineck I. Detection of recombinant viral coat protein in transgenic plants. In: Cunningham C, Porter AJR (eds). *Methods in biotechnology. Recombinant proteins from plants*. Humana Press, 1998;**3**:65-75.
- Swarna Latha CD. *Principles Of Biotechnology*. Discovery Publishing House, 2007.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast. *Plant Mol Biol*. 1991;**17**(5):1105-1109.
- Taverniers I, Papazova N, Bertheau Y, De Loose M, Holst-Jensen A. Gene stacking in transgenic plants: towards compliance between definitions, terminology, and detection within the EU regulatory Framework. *Environ Biosafety Res*. 2008;**7**(4):197-218.
- Tengs T, Kristoffersen AB, Berdal KG, Thorstensen T, Butenko MA, Nesvold H, Holst-Jensen A. Microarray-based method for detection of unknown genetic modifications. *BMC Biotechnol*. 2007;**7**:91.
- Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol*. 2002;**20**(10):1030-1034.
- Terry CF, Harris N, Parkes HC. Detection of Genetically Modified Crops and Their Derivatives: Critical Steps in Sample Preparation and Extraction, *J AOAC Int*. 2002;**85**(3):768-774.
- Thomas CM, Jones DA, English JJ, Carroll BJ, Bennetzen JL, Harrison K, Burbidge A, Bishop GJ, Jones JD. Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol Gen Genet*. 1994;**242**(5): 573-585.
- Thorpe A, Robinson C. When goliaths clash: US and EU differences over the labeling of food products derived from genetically modified organisms. *Agric Human Values*. 2004;**21**:287-298.

- Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 2003;**31**(20):e122.
- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. High frequency modification of endogenous plant genes using engineered zinc finger nucleases. *Nature.* 2009;**459**(7245):442-444.
- Trnková J, Hanák J, Křístková M. Organizace a kontrola pěstování GM plodin v ČR. Ministerstvo zemědělství, odbor rostlinných komodit, 2014.
- Tung Nguyen CT, Son R, Raha AR, Lai OM, Clemente Michael WVL. Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *Int Food Res J.* 2009;**16**:21-30
- Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, Kroath H. Genetically modified organisms in food – Screening and specific detection by Polymerase Chain Reaction. *J Agric Food Chem.* 1999;**47**(12):5038-5043.
- Wahler D, Schauser L, Bendiek J, Grohmann L. Next-Generation Sequencing as a Tool for Detailed Molecular Characterisation of Genomic Insertions and Flanking Regions in Genetically Modified Plants: a Pilot Study Using a Rice Event Unauthorised in the EU. *Food Anal Methods.* 2013;**6**:1718-1727.
- Wall EM, Lawrence TS, Green MJ, Rott ME. Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR. *Eur Food Res Technol.* 2004;**219**(1):90-96.
- Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin SM, Lin JT, Chen DS. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. *J Clin Microbiol.* 1992;**30**(3):750-753.
- Wang Y, Yau YY, Perkins-Balding D, Thomson JG. Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Rep.* 2011;**30**(3):267-285.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sängler HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell.* 1994;**76**(3):567-576.
- Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol.* 1995;**33**(10):2643-2646.

- Wiles PG, Guy R, Watkins SM, Reeves WG. Allergy to purified bovine, porcine, and human insulins. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;**287**(6391):531.
- Williamson R. Genetic manipulation advisory group (GMAG) and the environment for genetic engineering in Britain. *Biochem Soc Symp*. 1979;**44**:119-121.
- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997;**63**(10):3741-3751.
- Wolf C, Scherzinger M, Wurz A, Pauli U, Hübner P, Lüthy J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur Food Res Technol*. 2000;**210**:367-372.
- Wood DC, Vu LV, Kimack NM, Glennon JR, Ream JE, Nickson TE. Purification and characterization of neomycin phosphotransferase II from genetically modified cottonseed (*Gossypium hirsutum*). *J Agric Food Chem*. 1995;**43**(4):1105-1109.
- Wright S. *Molecular Politics: Developing American and British Regulatory Policy for Genetic Engineering, 1972-1982*. University of Chicago Press, 1994.
- Xu Q, Wen X., Deng X. A simple protocol for isolating genomic DNA from Chestnut Rose (*Rosa roxburghii* tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Mol Biol Rep*. 2004;**22**(3):301-302.
- Yuan ZC, Haudecoeur E, Faure D, Kerr KF, Nester EW. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling crosstalk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cell Microbiol*. 2008;**10**(11):2339-2354.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Van Montagu M, Schell J. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol*. 1974;**86**(1):109-127.
- Zhang D, Corlet A, Fouilloux S. Impact of genetic structures on haploid genome-based quantification of genetically modified DNA: theoretical considerations, experimental data in MON 810 maize kernels (*Zea mays*) and some practical applications. *Transgenic Res*. 2008;**17**(3):393-402.
- Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczyński CL. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol*. 2000;**18**(5):555-558.

Zhuang YL, Xiang DP, Zhou ML, Cai Y, Chen YQ, Xu YM, Liang XY. Development study on PCR detection method for genetically modified components in papaya and its highly-processed products. *Food Sci.* 2007;**28**(7):352-355.

Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1998;**207**:81-90.

Žel J, Milavec M, Morisset D, Plan D, Van den Eede G, Gruden K. How to Reliably Test for GMOs. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition - 1st Edition, 2012.

9 PŘÍLOHY

9.1 PRAKTICKÉ VÝSLEDKY SOUVISEJÍCÍ S TÉMATEM DIZERTAČNÍ PRÁCE

9.1.1 METODIKY PRO PRAXI

Tesařová Z, Šídová-Wagnerová D, Vráblík A, Hodek J, Ovesná J. Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-7427-134-2, 2013.

Vráblík A, Hodek J, Ovesná J. Metodika detekce vnitřního genu hrachu setého lektinu pomocí PCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-7427-096-3, 2012.

Ovesná J, Hodek J, Pavlátová L. Kvalitní stanovení transgenní linie rýže Bt 63 metodou PCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-7427-035-2, 2009.

Hodek J, Ovesná J, Pavlátová L. Metodika detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-87011-96-6, 2008.

Ovesná J, Hodek J, Pavlátová L. Metodika detekce geneticky modifikovaného tabáku viržinského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) s vneseným kvasinkovým mitotickým aktivátorem (gen SpCdc25 z poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*). Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-87011-97-3, 2008.

Hodek J, Ovesná J. Detekce vnitřního genu rýže fosfolipázy D pomocí PCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-87011-35-5, 2007.

Hodek J, Ovesná J. Detekce rýžového transgenu LL601 pomocí PCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. , ISBN 978-80-87011-40-9, 2007.

9.1.2 UŽITNÉ PRŮMYSLOVÉ VZORY

Hodek J, Ovesná J. Reakční směs pro monitoring inhibilicí/enhancerů kvantitativní real-time PCR. Č. užitného vzoru 24235. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, 2012.

9.2 Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce

Jagtap PR, Ford L, Deister E, Pohl R, Císařová I, Hodek J, Weber J, Mackman R, Bahador G, Jahn U: Highly Functionalized and Potent Antiviral Cyclopentane Derivatives by a Unique Tandem Process Joining Organometallic, Transition Metal-Catalyzed and Radical Reaction Steps. *Chemistry-A European Journal*. 2014; v tisku

Impakt faktor 5,831

Janská A, Hodek J, Svoboda P, Zámečník J, Prášil IT, Vlasáková E, Milella L, Ovesná J: The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress. *Molecular Genetics and Genomics*. 2013;288(11):639-649.

Impakt faktor 2,881

Landa P, Vaňková R, Andrlová J, Hodek J, Maršík P, Štorchová H, White JC, Vaněk T: Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of Hazardous Materials*. 2012;**241**:55-62.

Impakt faktor 3,925

Pavlatová L, Novotný D, Hodek J, Chrpová J, Ovesná J: Utilization of DNA microarrays for detection and identification of selected *Fusarium* species from the Czech Republic. *Czech Journal of food sciences*. 2011;**29**(SI):93-101.

Impakt faktor 0,522

Landa P, Štorchová H, Hodek J, Vaňková R, Podlipná R, Maršík P, Ovesná J, Vaněk T: Transferases and transporters mediate the detoxification and capacity to tolerate trinitrotoluene in *Arabidopsis*. *Functional & Integrative Genomics*. 2010;**10**(4):547-559

Impakt faktor 3,397

Héžová R, Slabý O, Faltejsová P, Mikulková Z, Burešová I, Raja KRM, Hodek J, Ovesná J, Michálek J. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cellular Immunology*. 2010;**260**(2):70-74.

Impakt faktor 2,575

9.3 PRAKTICKÉ VÝSLEDKY NESOUVISEJÍCÍ S TÉMATEM DIZERTAČNÍ PRÁCE

Janská A, Hodek J, Ovesná J. Kombinace sad primerů pro normalizaci exprese genů v ječmeni po působení nízkých teplot a mrazu. Č. užitného vzoru 23400. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, 2012.

Pavlatová L, Ovesná J, Hodek J. Reakční směs pro normalizaci genové exprese *Saponaria officinalis* L. Č. užitného vzoru 23800. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, 2012.