



GEF
Fondul Global
de Mediu



UNEP
Programul Națiunilor
Unite pentru Mediu



Ministerul Ecologiei și
Resurselor Naturale



Universitatea de Stat
din Moldova

**Maria DUCA, Angela LOZAN, Angela PORT,
Aliona GLIJIN, Victor LUPAȘCU**

Aspecte metodologice în testarea plantelor modificate genetic

Chișinău – 2008

CZU 581.151

A 88

Această lucrare a fost elaborată și editată în cadrul proiectului UNEP-GEF nr. GFL/2328-2716-4933 „Suport pentru implementarea Cadrului Național de Biosecuritate în Republica Moldova”, implementat de Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale și susținut financiar de Fondul Global de Mediu.

Grupul de autori:

- Maria DUCA** Doctor habilitat în biologie, profesor universitar, membru corespondent al AȘM, decan al Facultății de Biologie și Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova
- Angela LOZAN** Doctor în biologie, manager de proiect, proiectul UNEP-GEF „Suport pentru Implementarea Cadrului Național de Biosecuritate în Republica Moldova”
- Angela PORT** Doctor în biologie, conferențiar universitar, șef de laborator *Securitate Biologică*, Universitatea de Stat din Moldova
- Aliona GLIJIN** Doctor în biologie, lector superior, prodecan al Facultății de Biologie și Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova
- Victor LUPAȘCU** Doctor în biologie, lector, Universitatea de Stat din Moldova

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Aspecte metodologice în testarea plantelor modificate genetic / Maria DUCA, Angela LOZAN, Angela PORT, Aliona GLIJIN, Victor LUPAȘCU; Fondul Global de Mediu. Programul Națiunilor Unite pentru Mediu. Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale. Universitatea de Stat din Moldova – Chișinău: Î.S.FE-P. „Tipografia Centrală”, 2008, – 168 pag.

ISBN 978-9975-78-613-3

1000 ex.

Copyright © Maria Duca, Angela Lozan, Angela Port, Aliona Glijin, Victor Lupașcu

Copyright © Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale

Copyright © Universitatea de Stat din Moldova

ISBN 978-9975-78-613-3

CUPRINS

Introducere	4
1. NOȚIUNI GENERALE PRIVIND TRANSFORMAREA GENETICĂ	7
1.1. Etape de obținere a OMG	8
1.2. Strategii de identificare, izolare și clonare a genelor „de interes”	9
1.3. Transferul genelor la plante	26
1.4. Regenerarea, selecția și testarea plantelor modificate genetic	32
1.5. Gene „de interes”	36
2. STANDARDIZAREA ȘI VALIDAREA INTERNAȚIONALĂ	47
2.1. Culturi agricole modificate genetic	48
2.2. Strategii de înregistrare și stocare a informației privind PMG în bazele de date ...	51
2.3. Laboratoare acreditate pentru testarea OMG	61
2.4. Norme și legi ce reglementează testarea OMG	65
2.5. Metode validate aprobate pentru testarea OMG	66
3. PRELEVAREA ȘI OBTINEREA PROBELOR PENTRU ANALIZE GENETICE	71
3.1. Principii și norme de selectare a materialului experimental pentru testare	72
3.2. Izolarea și purificarea proteinelor și ADN-ului vegetal	73
3.3. Electroforeza proteinelor și a acizilor nucleici	79
3.4. Estimarea conținutului de proteine și de ADN	86
3.5. Exemple de protocoale	89
4. DETECȚIA PMG LA NIVEL DE EXPRESIE FENOTIPICĂ	
A TRANSGENELOR	93
4.1. Genele-marker și raportoare utilizate în selecția PMG	94
4.2. Biotestul fenotipic al PMG	97
4.3. Exemple de protocoale	101
5. ANALIZA MODIFICĂRILOR GENETICE LA NIVEL DE PROTEINE	103
5.1. Analiza proteinelor prin metoda ELISA	104
5.2. Analiza proteinelor prin testul „Lateral Flow Sticks”	108
5.3. Exemple de protocoale	109
6. IDENTIFICAREA OMG LA NIVEL DE ADN – ANALIZA CALITATIVĂ	113
6.1. Analiza PCR.....	114
6.2. Screening-ul general al PMG.....	118
6.3. Exemple de protocoale	124
7. METODELE PCR DE CUANTIFICARE A PMG	129
7.1. Real-time PCR	130
7.2. RCR-ul cantitativ competitiv (QC-PCR).....	133
7.3. Exemple de protocoale	135
8. CAPACITĂȚI NAȚIONALE PENTRU TESTAREA PMG	139
8.1. Structura și potențialul tehnico-științific al laboratorului <i>Securitate Biologică</i>	140
8.2. Detecția PMG la nivel de expresie fenotipică a transgenelor.....	144
8.3. Identificarea unor transgene la nivel de proteine	147
8.4. Screening-ul PMG prin PCR	148
Glosar de termeni	151
Bibliografie	161
Abrevieri	168

INTRODUCERE

În decursul ultimelor decenii, biotehnologia a cunoscut progrese importante datorită descoperirilor ce țin de mecanismul funcționării acizilor nucleici (ADN-ului și ARN-ului) și investigațiilor desfășurate apoi în domeniul geneticii moleculare. Relevarea particularităților materialului genetic la animale, plante și microorganismе, precum și posibilitatea de modificare a unităților lor componente au lărgit considerabil domeniile aplicării biotehnologiei, generând însă în societate o profundă neliniște față de gradul de securitate și caracterul etic al unor asemenea cercetări.

Biotehnologia modernă include aplicarea tehnicilor de recombinare a acizilor nucleici și a tehnicilor de fuziune celulară *in vitro*, înlăturând barierele naturale de reproducere sau recombinare genetică. Astfel, prin metode de inginerie genetică, metode care reprezintă un sistem de tehnici contemporane de manipulare a genomului, a fost posibilă inserarea unui spectru larg de gene „de interes” (transgene) în mai mult de 120 de specii de plante care aparțin la 35 de familii.

O importanță practică deosebită o au numeroasele varietăți de *plante modificate genetic* (PMG), rezistente la diferite erbicide (Глеба, 1998; Van Eerd și al., 2003), insecte dăunătoare (Sharma și al., 2004), boli (Jauhar, 2006), patogeni fungali (Sahrawat, Becker, Lutticke și al. 2003), bacteriali (Datta, Baisakh, Thet și al. 2002) și virali (Gonsalves, 2003). Un rol aparte va reveni în viitorul apropiat plantelor modificate genetic, ce conțin gene ale rezistenței la stresul abiotic, inclusiv la secetă (Abebe, Guenzi, Martin și al., 2003) și la salinitatea solurilor (Flowers, 2004), care astăzi cauzează până la 50% din pierderile de producție agricolă mondială (Bray, Bailey-Serres și Weretilnyk, 2000). Biofortificarea plantelor de cultură prin introducerea genelor implicate în îmbunătățirea calităților nutritive ale produselor alimentare, precum conținutul de proteine, vitamine și minerale este o direcție relativ nouă, în continuă dezvoltare (Ducieux, Morris, Hedley și al., 2004).

Produsele alimentare derivate din PMG sunt prezente în magazinele și marкетurile Uniunii Europene (UE) din anul 1996. Acest fapt a condiționat apariția unei serii de directive și legi emise de Comunitatea Europeană, menite să supună unui control strict comercializarea și cultivarea *organismelor modificate genetic* (OMG). Conform cerințelor, produsele alimentare care conțin cel puțin 0,9 - 1% OMG trebuie supuse analizelor și etichetării.

Necesitatea monitorizării prezenței PMG și cantității acestora în culturile agricole și în produsele alimentare derivate din acestea a impus căutarea meto-

delor analitice eficiente în detectarea, identificarea și cuantificarea alogenelor și a produselor de expresie, care reprezintă constituenții genetici de bază. Laboratoarele UE au elaborat și dezvoltat metode de testare a PMG la nivel de ADN prin metoda PCR și/sau proteine, prin analize imunoenzimatiche.

În Republica Moldova, cercetările în domeniul biotehnologiei și problema biosecurității sunt la început de cale. Până la momentul de față nu există centre științifice în care s-ar obține PMG, însă produsele modificate genetic pot ajunge la consumatori prin importul de produse alimentare, fructe, legume etc., iar pe câmpurile agricole – prin procurarea din străinătate a materialului semincer.

Pentru reglementarea activităților de obținere a PMG, testarea lor, eliberarea în mediul înconjurător, importul, exportul, transportul acestora etc., Guvernul Republicii Moldova a adoptat *Legea nr.755-XV din 21.12.2001 privind securitatea biologică*, precum și *Legea pentru ratificarea Protocolului de la Cartagena privind biosecuritatea la Convenția privind diversitatea biologică nr. 1381-XV din 11 octombrie 2002*. Introducerea pe piață a OMG și/sau a produselor rezultate din astfel de organisme se face numai în baza autorizației eliberate de *Comisia Națională pentru Securitatea Biologică* în conformitate cu prevederile reglementate de lege.

Implementarea și crearea unui sistem național în domeniul securității biologice în Republica Moldova s-a realizat grație proiectelor finanțate de programul Națiunilor Unite pentru Mediu/Fondul Global pentru Mediu (UNEP/GEF) în comun acord cu Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale. Pe site-ul oficial www.biosafety.md sunt abordate diferite aspecte legate de problema biosecurității, inclusiv testarea și efectuarea cercetărilor biotehnologice.

În cadrul Universității de Stat din Moldova, în baza Ordinului comun (nr. 19 din 10.02.2004) al Ministerului Ecologiei și Resurselor Naturale și Ministerului Educației și în baza deciziei Senatului USM (proces-verbal nr. 8 din 27.01.2004) a fost organizat Laboratorul „Securitatea Biologică” (LSB), laborator care are drept scop testarea PMG.

Pe parcursul ultimilor cinci ani în cadrul LSB au fost realizate proiectele nr. 619 (2004) și nr. 1156 (2006), finanțate de Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale; COBASE, 001028-001 (2004), finanțat de NSF (SUA), MTFP-04-08 (2005), MTFP-015-05 (2006), prin care au fost procurați reagenți specifici pentru testarea PMG și efectuat training-ul privind tehnicile de obținere și testare a PMG; MERL-1300 (2007-2008) finanțate de CRDF/MRDA (SUA), care au permis înzestrarea laboratorului cu echipament modern. Actualmente, laboratorul servește drept bază de cercetare și de instruire a studenților, masteranzilor,

doctoranzilor, contribuind la dezvoltarea unor deprinderi practice de lucru, la însușirea diferitor metode analitice și tehnici de biologie moleculară. Colectivul laboratorului realizează activități de implementare și optimizare a diferitor metode, bazate pe PCR și ELISA de detecție a PMG, ce vor permite efectuarea unor analize mult mai ample – activități care au sugerat ideea scrierii acestui manual.

Lucrarea de față reprezintă un îndrumar practic privind aspecte strategice și metodologice de testare a PMG și include principalele noțiuni, etape și tehnici referitoare la efectuarea testării plantelor transgenice și la reglementarea politico-legală a acestora. Fiind conștienți de faptul că în literatura de specialitate există mult mai multe tehnici și metode decât cele expuse în acest manual, iar dinamica progresivă a cercetărilor în domeniu implică o revizuire continuă a acestora, am încercat să vă conducem pas cu pas spre paginile WEB respective, care sunt accesibile publicului larg.

Cartea este adresată tuturor celor care sunt interesați de problema securității biologice și monitoringului PMG, dar poate fi cu succes utilizată și de studenții facultăților de biologie și agronomie, având astfel o menire dublă – de a contribui la pregătirea cadrelor universitare și de a constitui un suport metodologic pentru cercetătorii din acest domeniu.

Autorii

CAPITOLUL 1

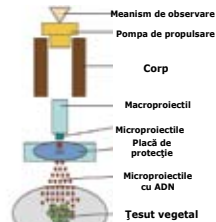
NOȚIUNI GENERALE PRIVIND TRANSFORMAREA GENETICĂ

- 1.1. Etape de obținere a OMG
- 1.2. Strategii de identificare, izolare și clonare a genelor „de interes”
- 1.3. Transferul genelor la plante
- 1.4. Regenerarea, selecția și testarea plantelor modificate genetic
- 1.5. Gene „de interes”

Metoda biolistică sau bombardare cu particule



Biolistic PDS-1000/He



Schema procesului de transformare

OPINII PRIVIND OMG



Selecția și regenerarea transformanților



Material-țintă

Selecția și regenerarea



Creșterea și dezvoltarea

Inrădăcinarea

METODELE TRANSGENEZEI

Capitolul 1. NOȚIUNI GENERALE PRIVIND TRANSFORMAREA GENETICĂ

Ingenieria genetică a plantelor reprezintă un instrument relativ nou, eficient în realizarea multiplelor valorificări de primă importanță pentru ameliorarea standardului de viață al omenirii. În același timp, introducerea în mediu a organismelor obținute prin tehnicile biotehnologiilor contemporane este un subiect discutabil și larg mediatizat, generat atât de beneficiile considerabile pentru societate, cât și de efectele neprevăzute, care pot fi evidente după un timp oarecare.

Abilitatea de a ne orienta și a ne forma o opinie proprie vizavi de introducerea în agricultură și pe piață a PMG și a produselor derivate este determinată de un anumit nivel de informare și înțelegere a acestor probleme, care este inevitabilă fără o descriere a tehnologiilor și instrumentelor de bază utilizate în obținerea plantelor cu însușiri noi prin transformare genetică.

1.1. Etape de obținere a OMG

Transformarea genetică reprezintă modificarea genomului unui organism prin tehnicile biotehnologiilor contemporane, care permit introducerea genelor noi, „de interes”, sau modificarea expresiei unei/ unor gene prezente deja în celulă. Organismele astfel obținute, sunt denumite **organisme modificate genetic** (OMG) sau transgenice.

Evoluarea tehnico-experimentală a ingineriei genetice, în special a metodelor de transfer al genelor peste barierele de sex și la distanțe taxonomice mari, a permis transgeneza unui număr impunător de plante cu importanță economică: cereale, leguminoase, specii pomicole sau forestiere etc. Obținerea autorizării unei varietăți modificate genetic (MG) în conformitate cu reglementările de rigoare impune respectarea următoarelor cerințe: stabilitate în expresia și moștenirea transgenelor în generațiile succesive; segregare mendeliană a fenotipului transgenic, reglarea organ-specifică a expresiei alogenelor și exploatarea produsului său în scop agronomic, alimentar, medical, farmaceutic etc. În afara aplicațiilor practice, manipulările genetice permit analiza structurii și funcției genelor, oferind posibilități de a cunoaște și a interveni în mecanismele de dezvoltare a plantelor.

Literatura de specialitate însumează o serie de date referitoare la transgeneza culturilor agricole, relevând faptul că elaborarea strategiei și selectarea metodei de transformare depind de interesele economice, de echipamentul accesibil și de anumite particularități genetice ale speciei (Kaeppeler și al., 1992; Van der Graaff și al., 1996; Sambrook și Russell, 2001).

Obținerea organismelor modificate genetic include câteva etape, care pot fi rezumate astfel:

- I. Identificarea, izolarea și clonarea genelor „de interes”.
- II. Transferul genelor la plante.
- III. Regenerarea, selecția și testarea plantelor MG.

Aceste etape includ o serie de procese intermediare urmate de verificări care decurg într-o anumită succesiune (fig. 1.1.).

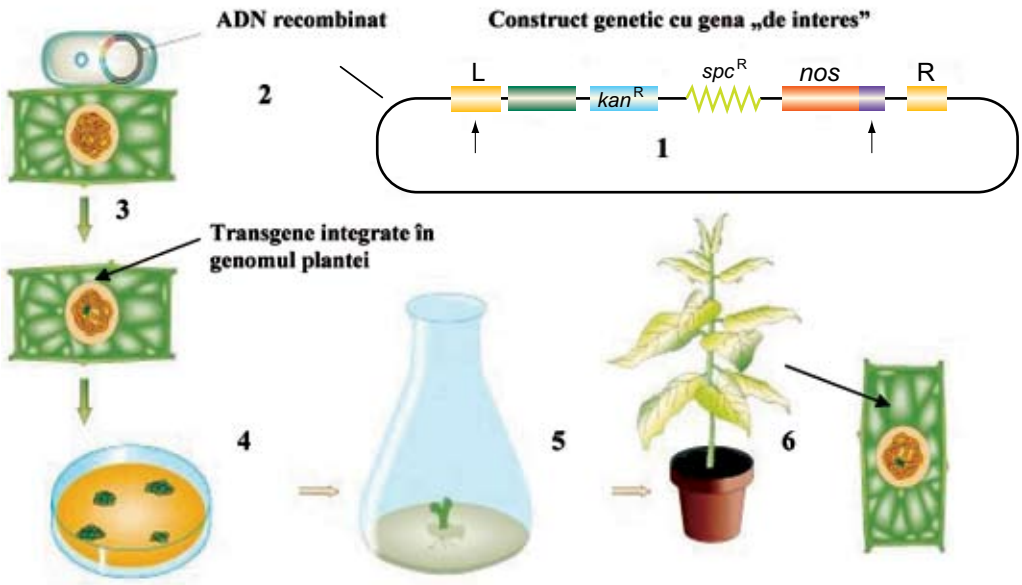


Figura 1.1. Etapele transformării genetice

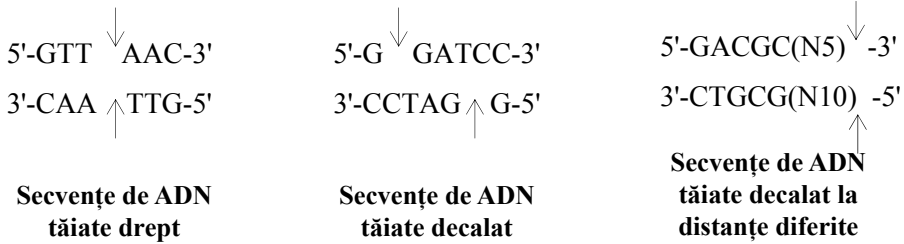
<http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr13-16b.htm>

- 1,2– Identificarea și izolarea genei „de interes”, obținerea ADN-ului recombinat (integrarea transgenei în vector);
- 3 – Transferul genei chimere în celula vegetală prin metode directe sau indirecte;
- 4 – Selectarea celulelor modificate genetic;
- 5 – Regenerarea plantelor din celulele transformate genetic;
- 6 – Reproducerea sexuată/ asexuată a plantelor modificate genetic.

1.2. Strategii de identificare, izolare și clonare a genelor „de interes”

Strategia utilizată într-un proiect de identificare, izolare și clonare a secvențelor nucleotidice utilizate în obținerea ADN-ului recombinat apelează la o gamă largă de metode optimizate în funcție de tipul celulei (procariote, eucariote), țesutului, organului, fazei de vegetație, speciei. Cea mai simplă metodă de izolare a fragmentelor ce conțin gena „de interes” se bazează pe utilizarea unor enzime – **endonucleaze de restricție** – implicate în scindarea hidrolitică a legăturilor fosfodiesterice din ADN. Acestea recunosc secvențe specifice de 4, 6, 8 nucleotide cu structură de palindrom (secvențe repetate invers), având simetrie rotațională de tip doi numite **situsuri** și la nivelul acestora clivează ambele catene ale moleculei. În raport cu axul de simetrie, unele enzime taie ADN-ul asimetric generând extremități complementare sau coezi-

ve, altele taie ambele catene în centrul de simetrie al situsului de restricție, rezultând fragmente cu capete drepte. Când enzimele taie asimetric la distanțe întâmplătoare, atunci se obțin fragmente cu extremități monocatenare cu secvențe nespecifice:



Enzimele de restricție recunosc secvența de nucleotide specifică, indiferent de originea ADN-ului. Prin acțiunea mai multor restrictaze asupra unui genom, se realizează așa-numite **hărți de restricție**, care indică plasarea succesivă a locusurilor de recunoaștere a diferitor enzime. Astfel de hărți permit analiza comparativă a unei și aceleiași regiuni ale ADN-urilor de diferită origine. Dintre restrictazele cel mai des utilizate în tehnicile ingineriei genetice, pot fi menționate: Hae III, Eco RV, Eco RI, TagI, NotI etc. (Sambrook și Russell, 2001).

Fragmentele de restricție obținute prin digestia enzimatică a ADN-ului au lungime variată în funcție de numărul situsurilor de restricție, și anume ele reprezintă materialul inițial în izolarea, clonarea genelor și în obținerea constructului genetic utilizat în transformare (fig. 1.2.).

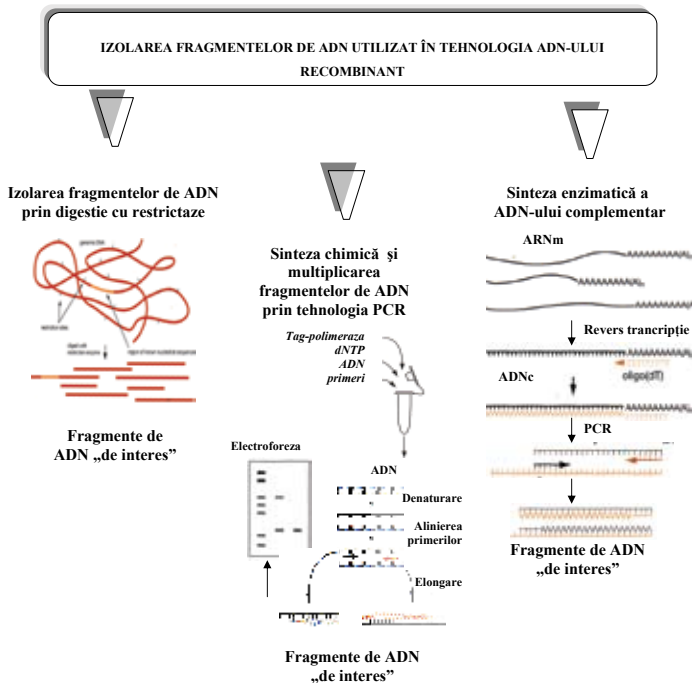


Figura 1.2. Diferite căi de izolare a fragmentelor de ADN utilizat în tehnologia ADN-ului recombinant

O altă metodă de izolare și multiplicare a genelor include **reacția de polimerizare în lanț** (Polymerase Chain Reaction – PCR), prin care are loc amplificarea *in vitro* a diferitor fragmente de ADN, utilizând secvențe nucleotidice specifice numite **primeri**. Existența ADN polimerazelor, purificate și termostabile (de la *Thermus aquaticus* – Taq-polimeraza și de la *Pyrococcus furiosus* – Pfu-polimeraza) și a oligonucleotidelor ADN sintetizate chimic (dNTP) face posibilă clonarea unor secvențe specifice de ADN *in vitro*. Tehnica PCR permite amplificarea de miliarde de ori a unui fragment de ADN dintr-o anumită regiune a genomului doar în câteva ore, în comparație cu tehnica de clonare standard, cu ajutorul băncilor de gene, pentru care sunt necesare mai multe zile (vezi cap. 6).

Procesul de izolare și ulterior clonare poate începe și prin extragerea ARNm din țesuturi și organe în faza de dezvoltare a plantei, în care gena „de interes” este expresată, urmată de sinteza **ADNc**, prin transcripție inversă realizată de revers-transcriptaza.

Fragmentele de ADN izolate prin diferite metode, pot fi atașate unor molecule de ADN capabile de autoreplicare – **vectori de clonare**, astfel obținându-se **ADN recombinat**. Moleculele de ADN recombinat sunt multiplicare prin introducerea vectorilor de clonare în celule bacteriene, care se vor înmulți pe medii de cultură adecvate și vor forma colonii, făcând posibilă obținerea unei mari cantități a genei „de interes”. Această colecție de fragmente de ADN constituie o **bibliotecă de gene** (fig. 1.3.).

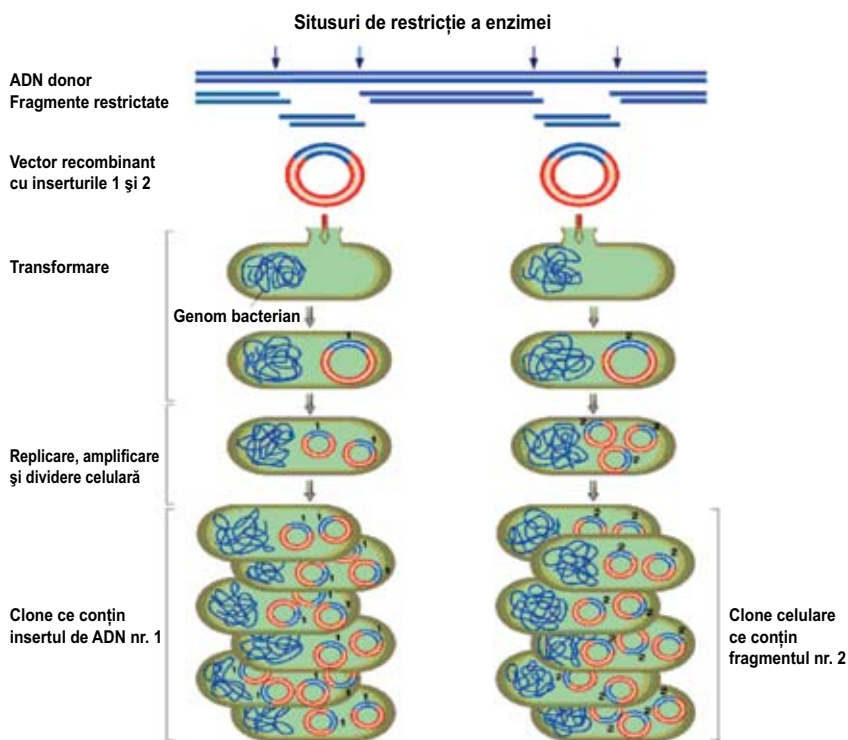


Figura 1.3. Prezentare schematică a clonării fragmentelor de ADN „de interes” în bacterii

În funcție de sursă se pot construi 2 tipuri de biblioteci: genomice și ADNc. Astfel, se poate realiza și izolarea în formă pură a unui anumit segment de ADN dintr-o populație mare și heterogenă de molecule.

Pentru obținerea moleculelor de ADN recombinat se recurge la:

- Utilizarea aceleiași enzime de restricție pentru tăierea (izolarea) ADN-ului genomic și a vectorului de clonare. Capetele fragmentelor de ADN astfel obținute vor fi complementare și la amestecarea lor în prezența unei ADN-ligaze se va realiza legarea covalentă a acestora obținându-se molecule recombinante circulare (fig. 1.4.). Formarea unui plasmid recombinant circular capabil de transformare a bacteriei *Escherichia coli* (*E. coli*) are loc printr-o reacție *intermoleculară* între plasmida liniarizată și fragmentele de ADN cu capete coezive complementare vectorului, rezultând un hibrid molecular și o a doua reacție *intramoleculară*, prin care capetele coezive ale hibridului liniar se leagă formând o moleculă recombinată circulară legată necovalent.

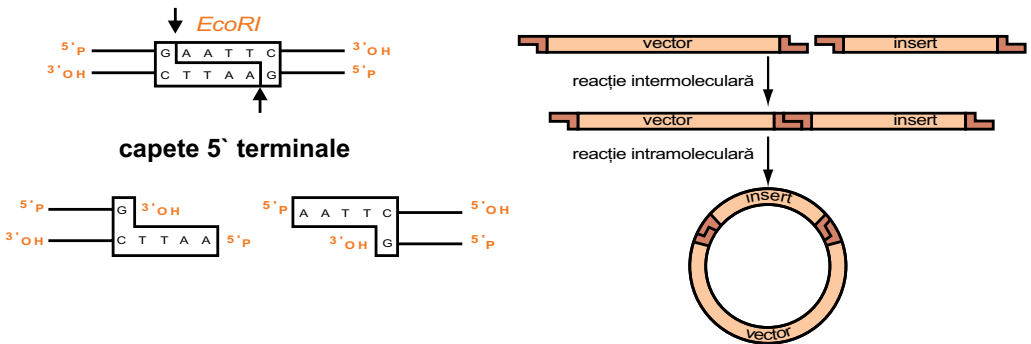


Figura 1.4. Formarea unei plasmide recombinante circulare atunci când se utilizează aceeași restricție pentru ADN-ul exogen și pentru vector

- Atașarea la fragmentele de ADN cu capete drepte (obținute atunci când sunt utilizate anumite enzime de restricție, sau când este clonat ADNc) a unei secvențe linker (de legătură) sau a unor secvențe homopolimere poliA/poliC la nivelul unei singure catene. În același fel se modifică și ADN-ul vectorului, însă prin atașarea unei secvențe de nucleotide complementare poliT/poliG. Secvențele linker sunt secvențe de sinteză, mici, de 8-16 nucleotide, autocomplementare, care conțin situsuri de recunoaștere pentru enzime de restricție necesare unei clonări ulterioare (fig. 1.5.).

Vectorii utilizați în tehnologia ADN-ului recombinat trebuie să corespundă următoarelor cerințe:

- să fie izolat și purificat cu ușurință;
- să poată fi introdus într-o celulă-gazdă;
- să posede o origine a replicării (ori) și astfel să se poată multiplica în celula-gazdă;
- să posede un marker genetic stabil, care să permită identificarea și izolarea celulelor care conțin vectori;
- să conțină mai multe situsuri de restricție pentru o gamă variată de enzime asociate într-un polilinker (situsuri multiple pentru restricțaze) pentru inserția fragmentelor de ADN.

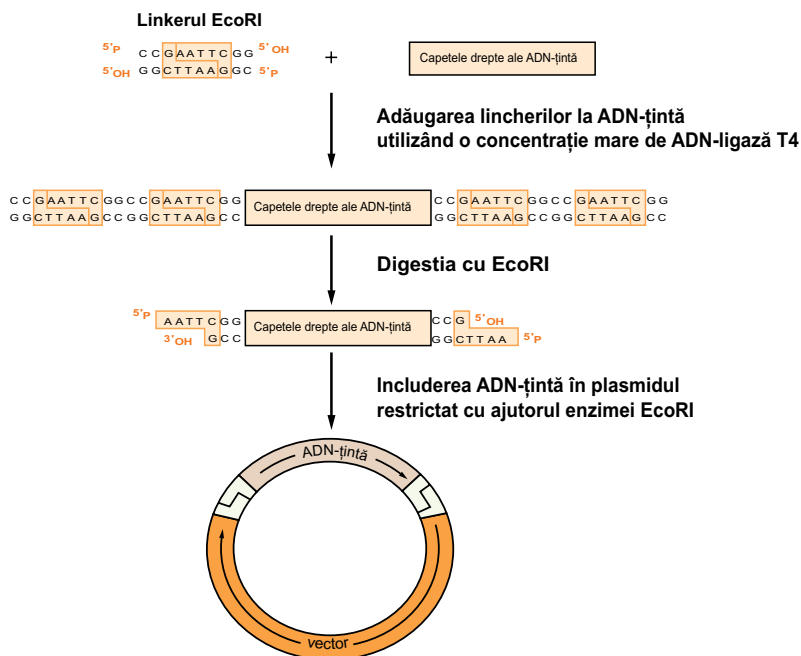


Figura 1.5. Clonarea prin adăugarea unei secvențe linker la ADN-ul „de interes” cu capete drepte (Sambrook și Russell, 2001)

În calitate de vectori cel mai des se utilizează plasmidele bacteriei *E. coli*, derivați ai bacteriofagilor λ și M13, cosmide, cromozomi artificiali de drojdie etc. Varietatea de vectori este determinată de dimensiunea fragmentelor străine de ADN care pot fi inserate.

Plasmidele (unități genetice extracromozomale) reprezintă molecule de ADN dublu catenare, circulare, capabile de replicare independentă, care se întâlnesc practic la toate speciile de bacterii. Macromolecula de ADN are dimensiuni de 100-200 kb și constituie 1-3% din cantitatea totală de material genetic bacterian (cromozom circular alcătuit dintr-o moleculă de ADN dublu catenar). Prezența lor nu este obligatorie, ele pot fi dobândite sau pierdute fără a afecta viabilitatea celulelor purtătoare. Plasmidele sunt dependente de celula-gazdă, cu excepția autoreplicării și a controlului numărului de copii per celulă. Cu cât este mai mare plasmidul, cu atât mai mic este numărul de copii per celulă. Plasmidele posedă o regiune notată **ori**, formată din câteva sute de perechi de nucleotide, unde este inițiată replicarea și alți determinanți genetici (secvențe de inserție, gene de reglare, structurale etc.). Genele structurale atribuie caracteristici fenotipice noii celule-gazde: rezistență la antibiotice, metale grele, UV, sinteză de antibiotice, toxine, producerea de bacteriocine și enzime de restricție etc.

În natură, transferul plasmidelor între diferite celule-gazdă are loc printr-un proces similar cu conjugarea bacteriilor. În laborator, plasmidele sunt transferate în

bacterii printr-un proces artificial numit **transformare** care include incubarea plasmidelor cu bacterii competente (permeabilitate tranzitorie pentru ADN-ul exogen). Astfel, bacteria-gază capătă un nou caracter fenotipic, de exemplu, rezistența la un anumit antibiotic, particularitate importantă în selectarea bacteriilor transformate.

Pentru ca plasmida să fie utilizată în calitate de vector, ea trebuie să fie de dimensiuni mici, replicarea să se afle sub un control redus din partea cromozomului bacterian și să conțină situsuri unice pentru una sau mai multe enzime de restricție, aflate în regiuni neesențiale pentru replicare. Situsurile de inserție a ADN-ului pot fi în cadrul genelor care codifică markeri. În acest caz, va avea loc inactivarea genei respective oferind o posibilitate de selecție. De obicei, se recurge la astfel de inserții în plasmidele care manifestă rezistență la două tipuri de antibiotice (fig.1.6.). Un exemplu de acest fel îl reprezintă utilizarea plasmidei cu genele rezistenței la ampicilină și tetraciclină în scopul clonării. Pentru început, se realizează clivarea ADN-plasmidial cu restrictazele *Hind III* și *Bam II* în situsurile corespunzătoare aflate la nivelul genei rezistenței la tetraciclină și izolarea fragmentului mare al ADN-ului plasmidic (rezultat al digestiei enzimatic) prin electroforeză. Acesta, fiind incubat cu ADN exogen restricționat tot cu aceste enzime, în prezența unei ligaze se combină cu fragmentul ADN „de interes” datorită extremităților coezive complementare vectorului.

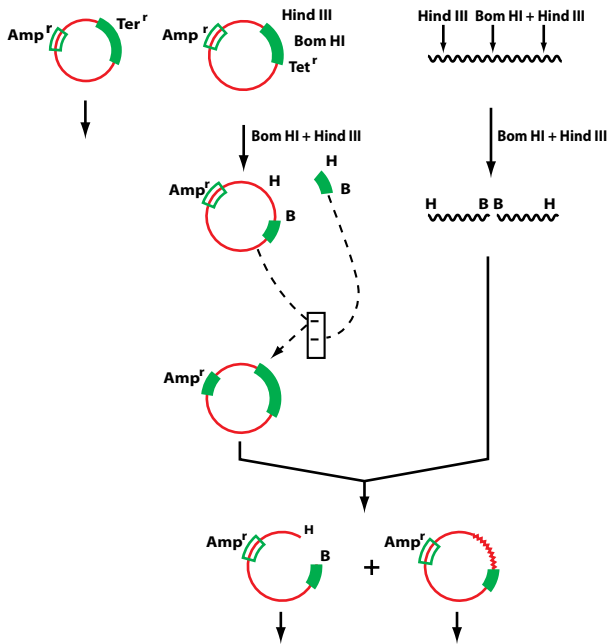


Figura 1.6. Prezentare schematică a clonării fragmentelor într-un situs de inserare la nivelul unei gene, care determină rezistența la tetraciclină în plasmida-vector (Маниатис și al., 1984)

Notații: Amp^r–rezistență la ampicilină; Tet^r– rezistență la tetraciclină; HindIII și BamII – enzime de restricție, respectiv fiind notate și fragmentele clivate.

Recombinantul circular obținut este utilizat în transformarea *E. coli*, transformând-o într-o sușă bacteriană rezistentă la ampicilină. Deoarece capetele monocatenare, numite conform enzimelor care le clivează, nu sunt complementare unul altuia, fragmentul mare care reprezintă ADN-ul vectorului nu se poate circulariza, manifestând astfel o capacitate de transformare foarte joasă. De aceea, selecția clonelor pe baza rezistenței la ampicilină va arăta că majoritatea celulelor bacteriene conțin plasmida recombinată. În funcție de fragmentul exogen și localizarea situsurilor se pot obține combinații variate.

Pentru a majora numărul de situsuri de inserție, în plasmide se introduc anumite segmente de ADN, care conțin mai multe situsuri aranjate succesiv pentru o gamă largă de restricțaze (fig. 1.7.).

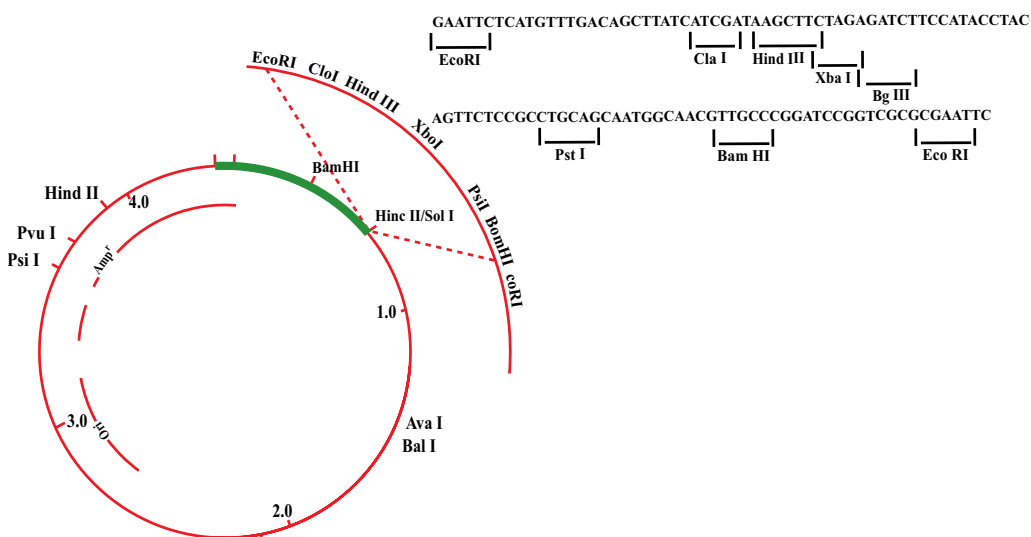


Figura 1.7. Schema unei plasmide care conține polilinker, plink322, derivat de la plasmidul pBR322 (Маниатис și al., 1984)

Amp^r – marker selectiv; situsuri unice:

ClaI, HindIII, XbaI, Bg III, BamHI.)

Pe baza plasmidelor naturale care se întâlnesc la bacterii se obțin plasmide artificiale, care se utilizează în clonarea genelor, în formarea bibliotecilor genomice și în transformarea genetică. Cel mai utilizat vector plasmidial derivat de la plasmide naturale este pBR322 – plasmidă cu control slab al replicării care conține genele rezistenței la ampicilină și tetraciclină și câteva situsuri de restricție. O altă plasmidă din acest grup este pBR325 (codifică rezistența la cloramfenicol, ampicilină și tetraciclină). De la această plasmidă au fost derivate alte plasmide cu caracteristici îmbunătățite. De exemplu, pAT153, care a fost obținută în urma deleției regiunii implicate în controlul numărului de copii/celulă. Aceasta se replică formând de 3

ori mai multe copii per celulă în comparație cu plasmida de la care a derivat. Alți vectori derivați artificial de la plasmide naturale utilizați în tehnologia ADN-ului recombinat sunt cele din grupa *pHV*, *pUC*, *pACYC* etc. (Vlaic, 1997; Moldoveanu și al., 2000).

Vectorii de clonare derivați din plasmidele bacteriene nu tolerează secvențe de ADN mai mari de 6-8 kb, deoarece viteza lor de multiplicare și eficiența lor de transformare scade pe măsură ce dimensiunile inserțiilor cresc. Pentru clonarea fragmentelor de ADN mai mari de 10 kb au fost construiți vectori derivați din fagul λ .

Bacteriofagul λ este un fag lizogen cu genomul sub forma unei molecule de ADN dublu catenar, de aproximativ 47500 pb și include cel puțin 30 gene. Înainte de integrare în cromozomul bacterian (*E. coli*), genomul fagic se circularizează prin împerecherea bazelor de la nivelul extremităților monocatenare complementare, numite **extremități coezive**, sau **situsuri cos** (12 nucleotide). Moleculele de ADN circulare se integrează în situsuri specifice în cromozomul bacterian printr-un crossingover, rezultând un profag liniar, inert genetic, până când, în anumite condiții, se separă și inițiază ciclul litic. Sutele de copii ADN fagic nou rezultat în urma replicării formează lanțuri (concatameri) prin intermediul situsurilor *cos*. Enzimele de asamblare taie acest concatamer, deoarece recunosc cele două situsuri *cos*, aflate la o distanță de aproximativ 45 kb unul de altul, în unități care se asamblează în fagi. Astfel, pentru maturarea fagului, ADN-ul cromozomal trebuie să fie de aproximativ 45 kb și să posede situsurile *cos* (Raicu, 1997).

Construcția vectorilor derivați de la fagul λ s-a bazat pe o serie de particularități:

- regiunea centrală nu este necesară pentru replicare, ceea ce a făcut posibilă eliminarea și înlocuirea acesteia cu fragmentul de ADN care trebuie clonat;
- prezența unor situsuri de restricție pentru o serie de restrictaze importante în clonare.

Astfel, de la fagul de tip sălbatic au fost construite mai multe tipuri de vectori:

- **de inserție** (λ gt și λ ZAP), care posedă un singur situs de restricție la nivelul căruia se taie și se inserează ADN-ul străin, și permit inserarea fragmentelor de 6-7 kb;
- **de înlocuire**, care posedă două situsuri de restricție, ce flanchează fragmentul central, care este înlocuit cu ADN străin, și permit inserarea fragmentelor de 9-22 kb. Vectorii din noua generație posedă situsuri de clonare multiple, care flanchează fragmentul central ce poate fi înlocuit: EMBL, λ DASH, λ Charon 34, 35 etc. (fig. 1.8.).

Utilizarea vectorilor derivați de la fagul λ prezintă avantajul încorporării unui segment mare de ADN străin, iar infecția bacteriilor și selecția clonelor recombinante sunt ușor de realizat.

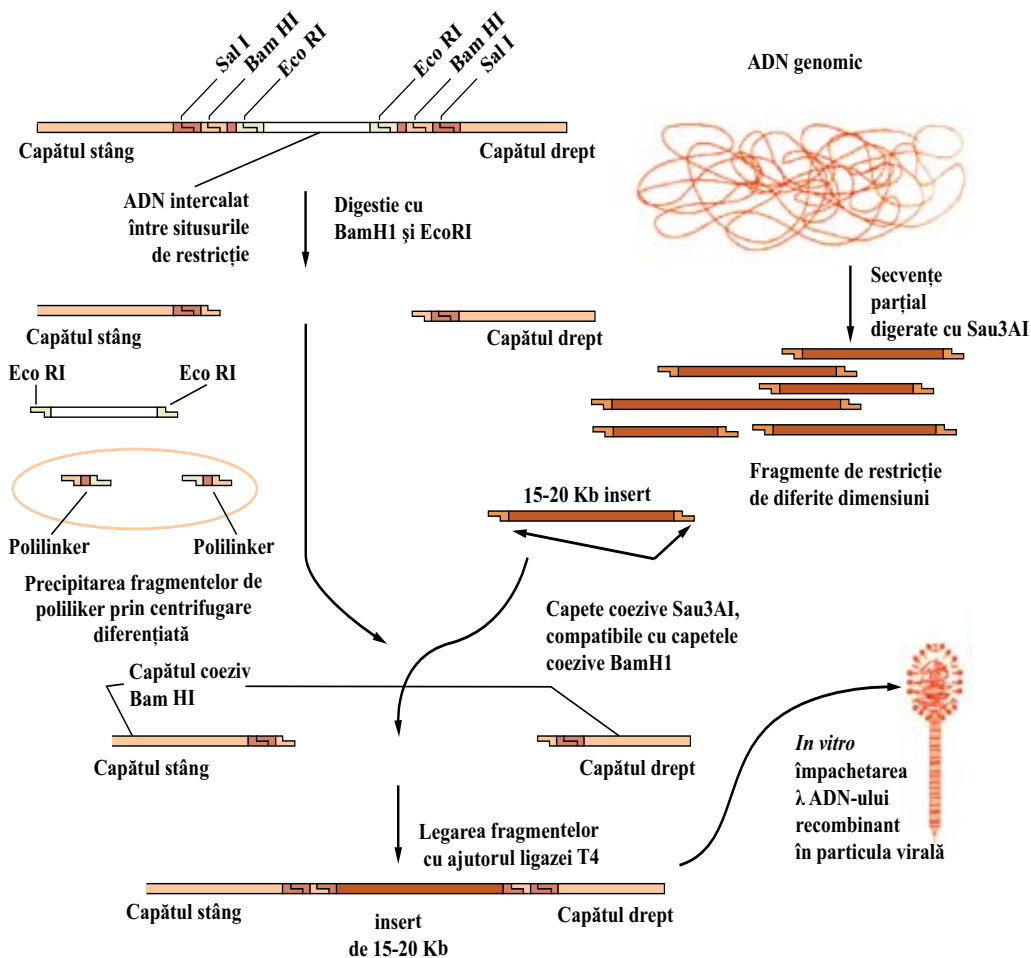


Figura 1.8. Prezentare schematică a clonării genelor „de interes” în vectorul fagic λ *EMBL3A* cu secvențe polilinker
(Sambrook și Russell, 2001)

Pentru clonarea unor fragmente de ADN ale căror dimensiuni variază între 32 și 47 kb au fost construiți vectori numiți **cosmide** – hibridi derivați din fagul λ (siturile *cos*) și plasmide (originea replicării, o genă de rezistență la un antibiotic și situs unic pentru o enzimă de restricție). Pentru clonare, ADN-ul genomic este digerat parțial cu o enzimă de restricție, care generează fragmente cu extremități coezive complementare vectorului (liniarizat cu aceeași enzimă de restricție). Fragmentele de ADN, lungi de 32-47 kb, sunt izolate și atașate la vector. Rezultă concatameri, care conțin fragmente de ADN genomic și ADN aparținând vectorului, în tandem. Un extract de fag, care conține α -terminaza determină tăierea acestor fragmente recombinante de ADN ce pot fi asamblate în particule virale și introduse prin infecție în *E. coli*, unde sunt replicate în bacterie ca plasmide rezistente la antibiotice.

Cosmidele sunt primii vectori, care au fost utilizați în analiza genomurilor complexe. Alți vectori cu capacitate înaltă utilizați în clonare sunt: cromozomi artificiali de drojdie sau YAC (Yeast Artificial Chromosome), care permit inserarea fragmentelor de ADN de 250-400 kb, cromozomi artificiali bacterieni – BAC (Bacterial Artificial Chromosome), care pot insera segmente de nucleotide de 120-300 kb.

Astfel, fragmentele de ADN „de interes” izolate prin diverse metode și clonate în bacterii sau „cell free” reprezintă materialul genetic, care poate fi utilizat în construcția unor gene himere funcționale ce urmează a fi introduse în plante prin transformare genetică. Aceste gene sunt secvențe hibride alcătuite din promotorul unei gene, regiunea codificatoare a unei alte gene și secvența de terminare de la o a treia genă.

Cunoașterea exactă a secvenței de nucleotide, a principalelor părți ale genei: **promotorul** (5'), cu rol de reglare în transcripție și expresie (activator, represor, secvențe implicate în expresia țesut-specifică sau inductibilă); **secvența codificatoare** cu codonul ATG, pentru inițierea translației; **regiunea terminală** (3'), în care se află semnalele ce marchează sfârșitul translației, transcripției și poliadenilării, face posibilă separarea în componente distincte cu recombinarea ulterioară a acestora în scopul obținerii genelor himere „de interes”. De exemplu, dacă o genă cunoscută este expresată la un nivel foarte ridicat (se află sub controlul unui promotor puternic, care permite formarea frecventă a complexului de inițiere a transcripției) în organismul de origine, promotorul poate fi atașat la orice altă genă pentru a-i asigura acesteia o rată de transcripție înaltă.

Secvența codificatoare este aleasă în funcție de scopul cercetării. Pentru început, ea este identificată, izolată și secvențiată. Există gene ai căror produși – ARNm sau proteine – sunt cunoscuți și foarte multe gene despre care nu se cunosc decât modul de transmitere și fenotipul. Pentru ambele categorii, într-o anumită etapă, se utilizează o variantă a tehnicii de hibridare *in situ* – **hibridarea coloniilor**. Procedul permite detectarea prezenței oricărei gene pentru care există o sondă de ADN sau ARN marcată radioactiv sau chimic. Coloniile bacteriene sunt transferate de pe mediul solid pe filtru de nitroceluloză printr-o ușoară apă-sare pe suprafața culturii. O parte din colonii rămâne pe mediu și constituie placa

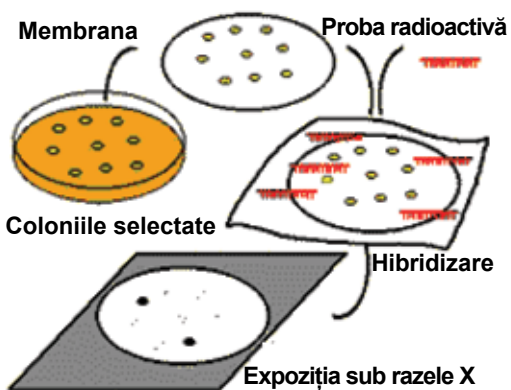


Figura 1.9. Izolarea genelor prin tehnica hibridării *in situ*

de referință. Părțile care aderă, numite **replici**, vor fi, după denaturarea ADN-ului, incubate cu sonda. După înlăturarea „surplusului de sondă”, locul de pe replică în care sonda s-a atașat pe bază de complementaritate va fi identificat prin autoradiografie (fig. 1.9).

Modul în care se obține sonda – un segment de ADN sau ARN marcat, utilizat pentru a realiza selecția în bancă a coloniilor, care conțin secvențe omoloage – depinde de informațiile disponibile referitoare la gena care trebuie să fie izolată (Raicu, 1997).

În multe cazuri, proteina „de interes” este identificată, purificată și secvențiată (cel puțin 30 aminoacizi). Pe baza codului genetic, utilizându-se anumite soft-uri de translație, se deduce secvența nucleotidelor. Se sintetizează artificial oligonucleotide, marcate radioactiv sau chimic, cu care se sondează bibliotecile genomice transferate (replicile). Pentru confirmarea faptului că celulele care urmează a fi transformate vor sintetiza proteina codificată de gena clonată se apelează la **vectori de expresie** în care se inserează ADNc, adiacent unui promotor pentru a asigura sinteza proteinei date în cantitate mare în bacterii. Identificarea în „băncile de expresie” se face cu anticorpi obținuți pentru proteina respectivă. Poziția anticorpului legat de proteină pe filtru este evidențiată după incubarea cu un al doilea anticorp marcat. Proteina sintetizată este astfel din nou caracterizată, confirmându-se faptul că a fost clonată gena „de interes”.

Pentru foarte multe gene, proteina codificată nu este cunoscută, sau nu poate fi purificată în cantități suficiente pentru a determina secvența aminoacizilor ori prepararea anticorpilor. În acest caz, pentru elucidarea funcției unei gene se poate utiliza **strategia ARN antisens**. Construcțiile antisens se realizează prin clonarea unui ADNc provenit de la gena „de interes”, atașat unui promotor foarte puternic, amplasat într-o orientare care face posibilă transcrierea ARN-ului de pe catena opusă (antisens) celei de pe care are loc transcripția ARNm natural. Mecanismul interacțiunii ARNm-endogen cu ARN antisens codificat de transgenă nu este bine cunoscut. Se consideră că în celulă s-ar forma un duplex între cele două tipuri de ARN, care este rapid degradat și, ca urmare, se blochează sau se reduce sinteza proteinei respective. Prin strategia antisens se creează mutații specifice (fig. 1.10.).

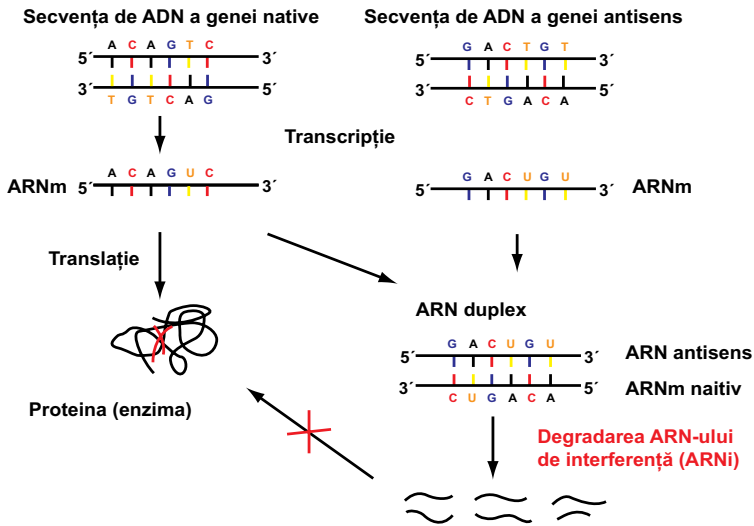


Figura 1. 10. Inhibarea expresiei unor gene „de interes” prin strategia antisens

Acest mecanism de represie, descoperit pentru prima dată la bacterii, există și la animale. ARN antisens sunt definiți ca transcripți de mici dimensiuni, difuzibili, fără capacitate de codificare, care se atașează prin împerecherea bazelor de o regiune com-

plementară specifică a unui ARN-țintă, acționând ca un represor al funcției normale și ca un inhibitor de înaltă specificitate al expresiei genei. La plante însă nu a fost încă demonstrată existența unui asemenea mecanism natural de reglare (Raicu, 1997).

Plantele transgenice obținute cu construcția antisens au fost folosite pentru a identifica funcțiile mai multor gene. În transgeneză se recurge foarte des la această strategie pentru a modula expresia unor gene de interes agricol. Un exemplu de acest fel îl reprezintă modificarea expresiei genelor implicate în întârzierea coacerii fructului de tomate apelându-se la patru modalități:

- inhibarea activității *poligalacturonazei* (PG);
- inhibarea activității *acid-aminociclopropan-1-carboxilic* (ACC) – *sintazei*;
- inhibarea activității *ACC – oxidazei*;
- intensificarea activității *ACC – dezaminazei*.

Plantele de tomate transformate cu gene antisens pentru *poligalacturonaza* – enzima, care determină degradarea peretelui celular în fructele coapte – au produs tomate cu durată mai îndelungată de păstrare. În plus, aceleași fructe au prezentat și caracteristici importante pentru industrializare, și rezistență la o serie de patogeni care atacă după recoltare.

Pectinesteraza (PE), o altă enzimă care metabolizează peretele celular, și *poligalacturonaza* nu sunt factori majori asociați cu înmuierea fructelor. Însă fructele plantelor care conțin PE antisens prezintă o viscozitate sporită a sucului, care ameliorează extractul și crește valoarea pentru prelucrarea sub formă de paste și sosuri.

Biosinteza etilenei în plante implică conversia S-adenosil metioninei în *acid-aminociclopropan-1-carboxilic* (ACC), catalizată de ACC-sintetază și transformarea ACC în etilenă de către ACC-oxidază. Fructele care conțin ACC-oxidază antisens au un fenotip al coacerii modificat. Acumularea licopenului, cu rol în înroșirea fructului copt, a fost redusă. De asemenea, au fost reduse și fenomenele de zbârcire asociate cu supraoacerea. Unele dintre aceste modificări fenotipice au valori comerciale determinate de posibilități de transportare la distanțe mari.

Strategia de design a constructului genetic ce urmează a fi transferat la plante prin transformare genetică este elaborată în funcție de interesele economice. Pentru genele de importanță agronomică se utilizează frecvent ADNc. În vederea obținerii unui nivel de expresie suficient de înalt, în unele situații se impune modificarea secvenței nucleotidelor genei fără modificarea secvenței de aminoacizi. Deoarece codul genetic este universal, secvențele codificatoare de origine procariotă sau de origine animală pot fi ușor exprimate în plante.

Modul de expresie al genelor este reglat de promotor, care poate fi constitutiv (tab. 1.1.), asigurând exprimarea genei în toate țesuturile plantei, tisular-specific, ceea ce determină expresia într-un anumit tip de țesut/organ, sau expresia inductibilă prin rănire, stres termic ori atacul unor patogeni (Raicu, 1997).

Gene cu expresie tisular-specifică și inductibile

Gena	Planta	Gazda transgenică	Factorul inductibil și localizare	
			inductorul	organ/țesut
RbcS	Mazăre	Tutun	Lumină	–
RbcS	Mazăre	Tutun	–	Verde
RbcS	Mazăre	<i>Petunia</i>	–	Verde
Cab	Mazăre	Tutun	–	Verde
Cab	Grâu	Tutun	Lumină	–
ST-LS1	Cartof	Tutun	–	Verde
Patatina	Cartof	Cartof	–	Tubercul
Leghemoglobina	Soia	<i>Lotus</i>	–	Nodul
p-Fazeolina	Fasole	Tutun	–	Semințe
Lectina	Soia	Tutun	–	Semințe
Glutenine	Grâu	Tutun	–	Semințe
Hordeina	Orz	Tutun	–	Semințe
Zeina	Porumb	Tutun	–	Semințe

Promotorii genelor himere utilizate în transgeneză la plante pot proveni chiar de la speciile aceleiași grup, de exemplu, pentru monocotiledonate: de la alcool dehidrogenaza din porumb *Adh-1*, sau de la actina din orez *Act-1*, care posedă un intron în secvența-lider, sau de la specii și organisme diferite, așa cum este promotorul 35S de la virusul fitopatogen *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) sau derivații acestuia (Wilminkand, 1993). Majoritatea plantelor transgenice conțin o copie sau mai multe ale promotorului 35S CaMV (P-35S), grație faptului că este un promotor puternic și constitutiv (cu expresie în toate țesuturile). În același timp, s-a constatat că activitatea acestui promotor nu este tot atât de înaltă și la plantele monocotiledonate, ceea ce a și determinat utilizarea promotorilor de la speciile aceleiași grupe. De aceea, în transformarea genetică a plantelor sunt utilizați mai mulți promotori în conformitate cu planta-recipient și cu scopul de cercetare sau agroindustrial (tab. 1.2.).

Conform unui raport de analiză a PMG aprobate (Genetically Modified [GM] Crops: molecular and regulatory details, 2003) prezentat de Centrul pentru biosecuritate și durabilitate din Elveția (Centre for biosafety and sustainability – BATS) secvențele promotorului 35S CaMV (fig. 1.11.) sunt prezente în majoritatea plantelor transgenice (<http://www.bats.ch/bats/en/index.php>).

Exemple de promotori utilizați în obținerea PMG

Promotorul	Abrevierea	Organismul donator	Gazda transgenică
Promotor derivat de la <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	P-35s	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	porumb, bumbac, rapiță, papaia, cartof, tomate
Promotor ALS1 prezent în tutun	P-AIS	<i>Nicotiana tabacum</i>	bumbac
Promotor derivat de la gena kinazei calciu-dependență (CDPK) expresată exclusiv în polen	P-PCDK	<i>Zea mays</i>	cereale
Promotorul genei cu expresie inductibilă determinat de etilenă	P-E8	<i>Lycopersicon esculentum</i>	tomate
Promotor derivat de la <i>Figwort Mosaic Virus</i> (FMV)	P-FMV	<i>Figwort Mosaic Virus</i>	tomate, bumbac, rapiță
Promotor RuBisCo SSU (ribulozo-1,5-bisfosfat carboxilaza, subunitatea mică 1A) de la <i>Helianthus annuus</i>	P-HelSsu	<i>Helianthus annuus</i>	tutun
Regiunea promotor a genei mannopin sintaza a pTiA6	P-mas	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	tomate
Regiunea promotor a genei nopalin sintaza	P-nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	tomate
Promotorul fosfoenolpiruvat carboxilazei, (PEPC) specifică țesuturilor verzi	P-PEPC	<i>Zea mays</i>	cereale
Promotorul ribulozei-1,5-bisfosfat carboxilaza, subunitatea mică 1A	P-SsuAra	<i>Arabidopsis thaliana</i>	cicoare, rapiță, cartof
Regiunea promotor a genei anter-specifică TA29	P-TA29	<i>Nicotiana tabacum</i>	cicoare, cereale, rapiță

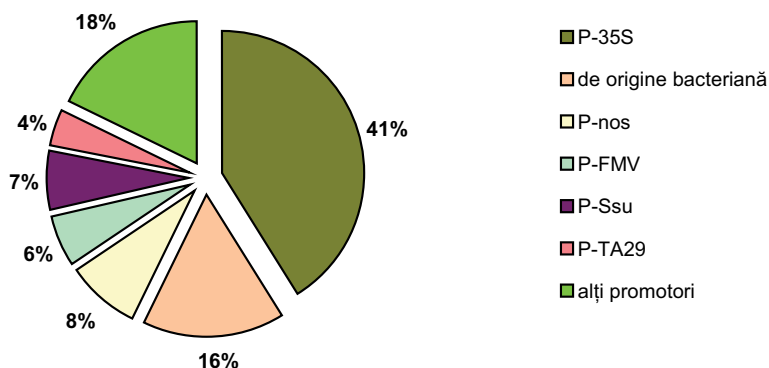


Figura 1.11. Rezultatele analizei a 66 culturi transgenice aprobate privind promotorii inserați <http://www.bats.ch/bats/en/index.php>

Notă: Numărul de varietăți MG exprimat în % care conțin inserții genetice cu promotorii respectivi; grupa P-35s include și derivații P-35s, P-E35s și dP-35s.

O altă secvență de reglare în sinteza și expresia genelor – **terminatorul** – reprezintă o secvență de nucleotide inversate, plasată la sfârșitul unității transcripționale. Cea mai răspândită secvență-terminator este NOS (T-nos), izolată de la gena *nopalinsintasa* a *Agrobacterium tumefaciens*, fiind constatată în 37 culturi MG, <http://www.bats.ch/bats/en/index.php> (fig.1.12.). Unele secvențe-terminator utilizate în transgeneză sunt prezentate în tabelul 1.3.

Tabelul 1.3.

Secvențe-terminator utilizate în transgeneză

Secvența-terminator	Abrevierea	Organismul donator	Organismul receptor
Regiunea 3' non-translabilă a genei ribulozo-1,5-bisfosfat carboxilaza, subunitatea mică E9	T-E9	<i>Pisum sativum</i>	bumbac, rapiță, cartof, tomate
Regiunea de poliadenilare a genei mannopin sintaza pTiA6	T-mas	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	tomate
Regiunea 3' non-translabilă a genei nopalin sintaza	T-nos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cicoare, cereale, bumbac, rapiță, cartof, soia, tutun
Secvența-terminator a genei octopin sintaza	T-ocs	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cicoare, rapiță, tomate
Regiunea 3' non-translabilă a genei ribulozo-1,5-bisfosfat carboxilaza, subunitatea mică	T-SSU	<i>Glycine max</i>	soia
Regiunea de poliadenilare a genei pTiA6	T-tml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	bumbac, rapiță, tomate
Regiunea 3' a genei transcriptului ADN 7	T-Tr7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cicoare, cereale, rapiță

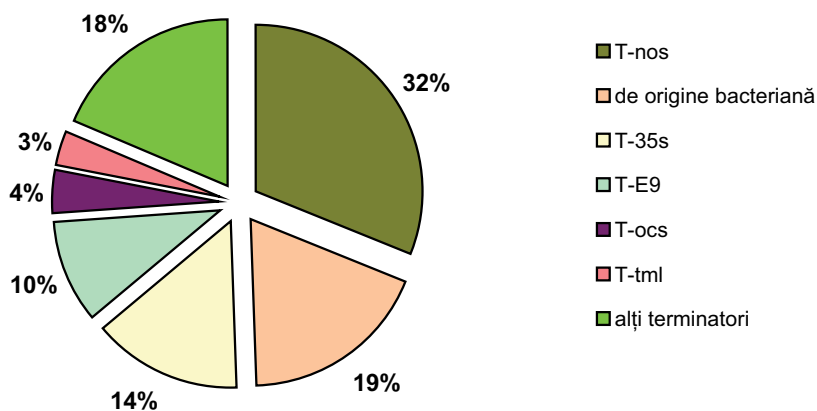


Figura 1.12. Secvențele terminator utilizate cel mai des în transgeneză

<http://www.bats.ch/bats/en/index.php>

Notă: Numărul de varietăți exprimat în % care conțin inserți genetici cu terminatorii respectivi.

Alte secvențe care pot fi prezente în inserții genetice sunt secvențele „de destinație” ce provin de la gene codificatoare de proteine, cu localizare celulară bine cunoscută. De exemplu, secvența peptidică-tranzit utilizată pentru destinația cloroplast provine de la gena subunității mici a enzimei Rubisco.

Astfel, inserțiile cu ADN recombinat efectuate în scop de transformare genetică a plantelor includ trei componente de bază: promotorul, gena „de interes” și terminatorul. În linii generale, combinația „promotor-gena-terminator” reprezintă o casetă a genei „de interes” (fig. 1.13. a). Constructul genetic poate conține două sau mai multe casete ale alogenei (fig. 1.13. b) și suplimentar alte elemente cu rol de control și facilitare a activității genelor străine.

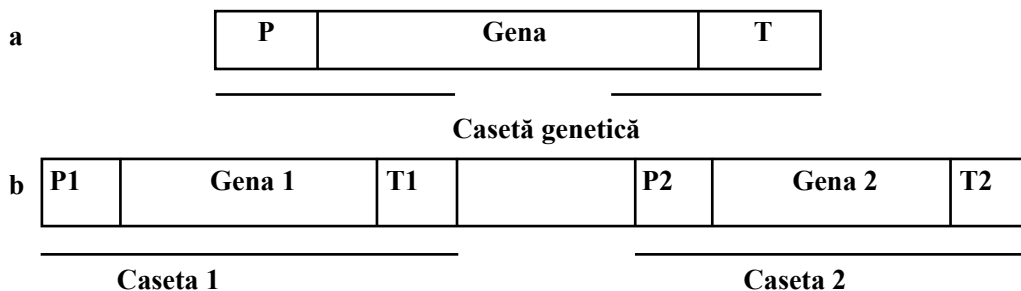


Figura 1.13. Schema inserțului genetic (construct genetic)

- a) Un insert cu componentele de bază necesare integrării și expresiei alogenei (P: promotor, T: terminator).
- b) Insert genetic cu două casete ale genei.

Cunoașterea elementelor inserțului genetic este esențială în detecția, identificarea și cuantificarea materialului transformat genetic. Dosarele de notificare a PMG înaintate pentru autorizare în scopul introducerii pe piață includ astfel de informații. De exemplu, linia de porumb GA21, Roundup Ready (toleranță la glifosat – ingredient activ al erbicidului Roundup Ready), a fost obținută în urma transferului unui fragment de restricție NotI cu lungimea de 3,4 kb de la plasmida pDPG434 prin metoda biolistică (fig. 1.14.).

Vectorul plasmidial pDPG434 conține caseta cu gena *EPSPS* modificată prin mutagenază de la porumb. Produsul de expresie a acestei gene reprezintă o enzimă insensibilă la glifosat, conferind astfel toleranță față de acest compus. Alte secvențe conținute în vector sunt gena-marker selectabilă *bla* (codifică rezistența la ampicilină în bacterii și permite selecția bacteriilor care conțin plasmide), o origine a replicării (*ori*) necesară pentru replicarea plasmidei în *E. coli* și o secvență parțială *lacZ* (fig. 1.14.).

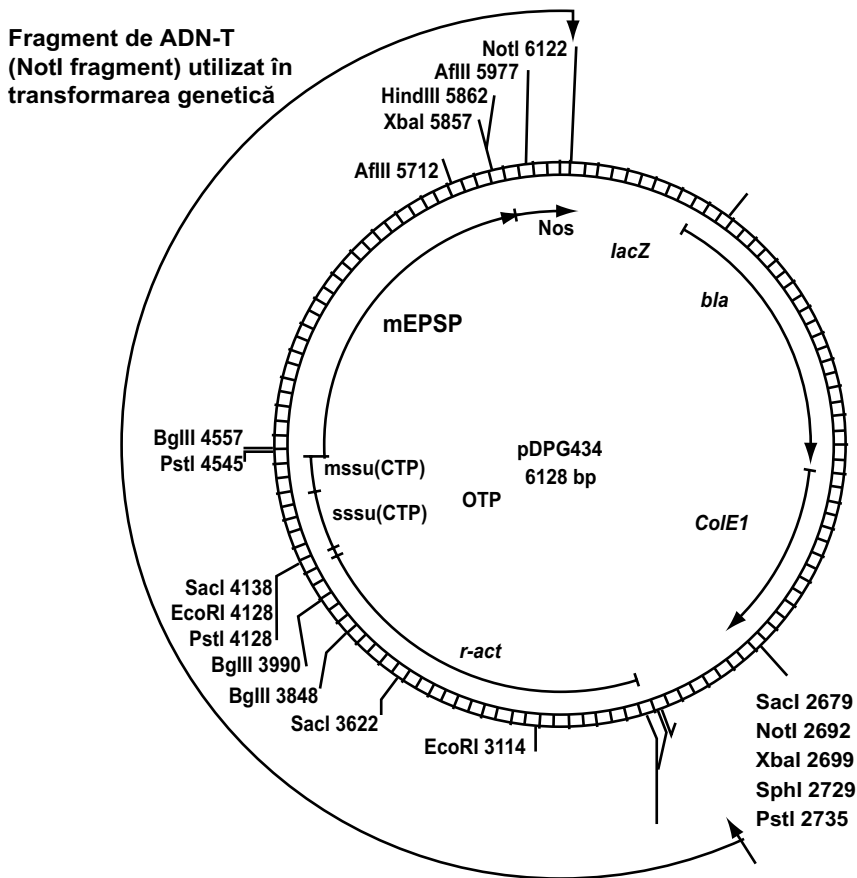


Figura 1.14. Harta plasmidului pDPG434
(Compania Monsanto, dosar de notificare, 1998)

Fragmentul de restricție NotI utilizat pentru transformarea liniei de porumb GA21 Roundup Ready conține o casetă de expresie cu gena EPSPS modificată care include: promotorul r-act - (1,37 kb) și intronul de la gena actinei de la orez; gena - 5-enolpiruvil și kimat-3-fosfat sintaza de la *Zea mays* - mEPSPS (1,34 kb) fuzionată cu o secvență N-terminală a peptidei tranzit în cloroplast derivată de la genele RuBisCo de la *Helianthus annuus* și *Zea mays* pentru a direcționa proteina mEPSPS spre cloroplast, unde are loc sinteza acizilor aromatici; secvența N-terminală a peptidei tranzit în cloroplast (CTP) derivată de la secvențele CTP de la *Helianthus annuus* și genele RuBisCo (ssu CTP and mssu CTP) de la *Zea mays* – OTP (0,37 kb) și NOS 3' secvența de terminare provenită de la plasmida Ti din *Agrobacterium* (fig. 1.14. și 1.15.).

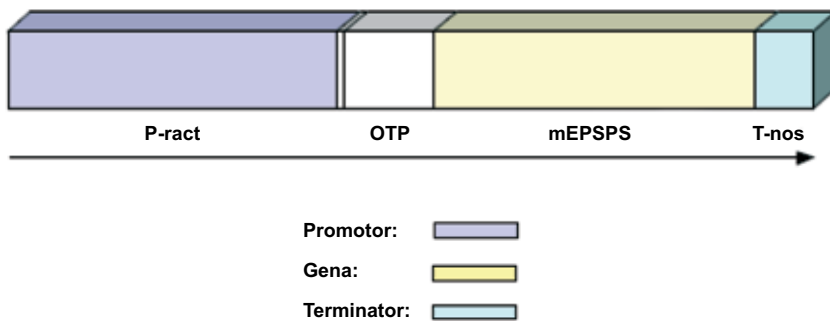


Figura 1.15. Harta liniară a fragmentului de restricție NotI a constructului pDPG434

(Compania Monsanto, US-Patent-N°: 6,040,497)

<http://www.bats.ch/bats/en/index.php>

Informații privind secvențele de reglare utilizate în obținerea PMG, originea acestora și culturile care le conțin sunt accesibile în băncile internaționale de date privind OMG (AGBIOS, COMPASS etc.).

1.3. Transferul genelor la plante

Transferul genelor în celulele plantelor se realizează printr-o gamă variată de metode care după modul de realizare se divid în două grupe: *indirecte*, mediate de bacterii și virusuri, și *directe*, care fac apel la o serie de procedee fizice și chimice.

Tehnicile de transfer mediate de *Agrobacterium* și cele de transfer direct, începând de la primele succese ale aplicării acestora înregistrate în anii 1983 la unele specii de tutun, au evoluat în paralel, însă până în prezent, cel mai larg utilizat rămâne a fi sistemul biologic determinat de simplitatea în realizare și de eficiență la multe specii de plante. În condiții naturale, *Agrobacterium* infectează doar speciile erbacee dicotiledonate, ceea ce limitează utilizarea acestor bacterii în transformarea genetică a speciilor monocotiledonate. Totuși, conform unor cercetări, limitările impuse de gazdele naturale sunt esențial diminuate prin optimizarea condițiilor de cultură a materialului sursă și procedurii de cocultivare a țesutului-țintă cu aceste microorganisme (Ishida și al., 1996).

Transformarea mediată de *Agrobacterium*. Bacteriile din acest gen, *Agrobacterium tumefaciens* și *Agrobacterium rhizogenes* (familia *Rhizobiaceae*) sunt localizate în sol și infectează plantele dicotiledonate susceptibile la nivelul leziunilor de diversă natură, determinând apariția unor tumori la nivelul coletului și, respectiv, a unor rădăcini firoase.

Agrobacteriile conțin în copii unice megaplasmidele Ti (tumor inducing) și Ri (root inducing) cu dimensiuni mai mari de 200 kb. O regiune din ADN-ul plasmidic – ADN-T (transferred) – este transferată și integrată stabil în genomul plantei. Anume această regiune conține un set de gene cu caracter tumoral. Acțiunea oncogenă

este cauzată de introducerea în celula-gază a informației necesare pentru sinteza constitutivă a auxinelor și citochininelor prin căi metabolice complet diferite de cele folosite de plantă (Van Haaren și al., 1988; Van der Graaff, și al., 1996). Astfel, sinteza în exces a acestor doi hormoni determină diviziunea necontrolată a celulelor determinând formarea tumorilor. La inducerea tumorilor participă:

- **Regiunea ADN-T**, care include genele responsabile de sinteza unor aminoacizi mai puțin obișnuiți, numiți **opine** și folosiți ca sursă de azot și carbon de către bacterie și genele care codifică enzimele implicate în sinteza auxinelor și citochininelor. Această regiune este flancată de două fragmente a câte 25 pb în lungime, reprezentând repetări directe, care acționează ca elemente semnal *cis* în transferul ADN-T.

- **Regiunea *vir*** (virulență) cu dimensiunea de 30 kb, plasată în afara regiunii ADN-T, conține cel puțin 22 gene, organizate în 6 operoane: *vir A*, *vir B*, *vir D* și *vir G* esențiale pentru excizia și transferul ADN-T și *vir C* și *E* pentru sporirea eficienței de transfer. Transferul ADN-T este mediat de acțiunea cooperantă a genelor din această regiune și a unor gene de pe cromozomul bacterian responsabile pentru atașarea celulelor bacteriene la plante.

Deoarece genele transferate în plantă se află sub controlul unui promotor cu secvențe de reglare de tip eucariot, se expresează în celulă, modificându-i fenotipul. Analiza transferului mediat de aceste bacterii a pus în evidență trei factori esențiali, care au permis utilizarea în practică a acestui mijloc de transformare prin construirea unor factori și sisteme bacteriene:

- **Apariția tumorilor este rezultatul transformării genetice a celulelor vegetale prin integrarea în genom a ADN-T și al expresiei genelor din această regiune.**
- **Genele ADN-T sunt transcrise numai în celulele vegetale și nu au nici un rol în procesul de transfer.**
- **ADN-ul exogen inserat între cele două capete ale ADN-T poate fi transferat în celulele vegetale.**

Elaborarea unui sistem *Agrobacterium* ca vector pentru gene a impus eliminarea oncogenelor din ADN-T pentru a obține celule transformate capabile să regenereze plante normale și nu proliferarea lor. Această eliminare face însă imposibilă selecția celulelor transformate capabile să crească în absența hormonilor. În scopul selecției genelor transformate au fost construite gene himere cu secvențe ce conferă rezistență la un antibiotic (de ex., kanamicină) atașată unui promotor adecvat (de ex., promotorul genei nopalin-sintazei [*nos*] sau promotorul genei VI de la virusul mozaicului conopidei (Wang, 1984, 1990; Waters și Guiney, 1993).

Au fost construiți numeroși vectori nononcogeni cu diferite caracteristici, clasificați în două categorii: *cis* și *trans*. Vectorii *cis* conțin atât extremitățile în lungime de 25 de pb, cât și regiunea *vir*, pe același replicon. Vectorii *trans* sunt formați din doi repliconi, unul purtând extremitățile și ADN-ul exogen ce va fi transferat în

celula vegetală, iar celălalt (plasmida ajutătoare) posedând funcția *vir*, care este plasată în poziția *trans* (sistem vector binar). Avantajul vectorilor *trans* constă în faptul că sunt mai mici decât plasmidele Ti și Ri, astfel fiind mai adecvați unei manipulări genetice. În cazul ambelor tipuri de vectori, genele străine sunt inserate în ADN-T, clonate mai întâi în *E. coli* și apoi transferate în *Agrobacterium* prin conjugare ori electroporare.

Plasmidul *pCambia 1300* (fig. 1.16.) prezintă un exemplu de vector utilizat în transformarea genetică ce include promotorul 35S, secvențele marginale de 25 kb derivate de la ADN-T, situsuri unice de restricție și grupate în polilinkeri, gena raportoare Lac-Z-alfa, gena marker NPT pentru selecționarea celulelor și plantelor transformate.

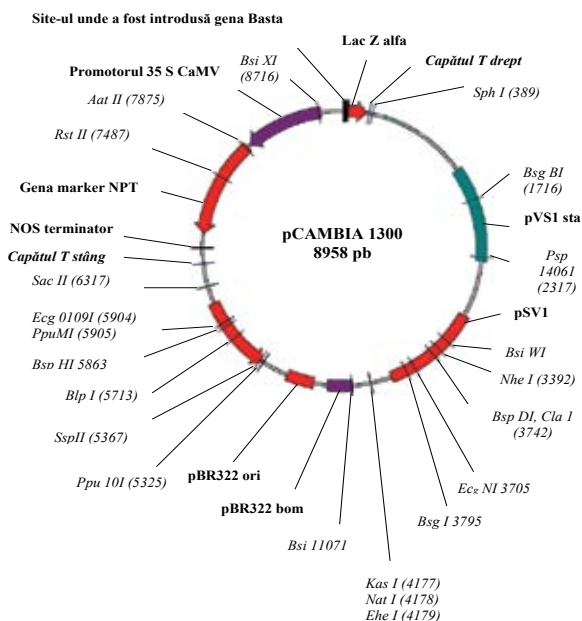


Figura 1.16. Schema plasmidului pCambia 1300

Metodologia folosită în mod curent pentru „agroinfecție” constă în cocultivarea bacteriei cu fragmente de țesut vegetal (frunze, rădăcini, hipocotili, pețioluri, cotiledoane etc.) și cultivarea *in vitro* pe medii de inducere a regenerării, adiționate cu antibiotic pentru eliminarea bacteriei.

La plante, **vectorii virali** sunt utilizați mai puțin decât la bacterii și mamifere. În special, virusurile sunt utilizate ca vector pentru transferul genelor, în vederea elucidării unor probleme teoretice, expresia genelor fără variații determinate de localizarea pe cromozom: caracterizarea expresiei genelor în țesuturi diferențiate fără să fie necesară cultivarea *in vitro* (Raicu, 1997).

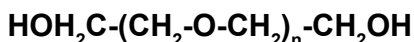
Capacitatea virusurilor de a se răspândi în întreaga plantă asigură niveluri foarte ridicate de expresie a transgenelor. Această însușire a vectorilor virali este exploa-

tată pentru a produce proteine virale în plante. Au fost construiți vectori virali pornindu-se de la virusul mozaicului tutunului, virusul X al cartofului și virusul piticirii tomatelor. Vectorii virali artificiali nu produc simptomele bolii, dar se răspândesc sistemic și conțin o genă străină. Se consideră că pe viitor transferul prin intermediul virusurilor derivate va fi aplicat pe scară largă.

Metodele de transfer direct al genelor se realizează prin procedee fizice, electrice și chimice. În ce privește transferul genelor, în comparație cu sistemul biologic, acestea nu sunt dependente de genotip, însă eficiența lor variază în funcție de tipul celulei-țintă, de capacitatea lor de regenerare, întrucât majoritatea transformărilor se efectuează pe celule cultivate *in vitro*.

Cele mai simple metode de transfer direct ar putea consta în **aplicarea exogenă** a materialului genetic urmată de pătrunderea acestuia în celule și respectiv în nucleu. Există unele lucrări efectuate în anii '80 ai secolului trecut, care indică asupra unui transfer de ADN prin aplicare exogenă conjugată cu polinizarea. Prin funcția sa de a transmite ADN-ul, polenul a generat un interes continuu în transformarea mediată de gametofit (De Wet și al., 1986), însă în lipsa unor gene markeri și a tehnicilor moleculare de analiză adecvată a fost dificil de a atesta transformarea genetică, întrucât markerii genetici clasici puteau fi interpretați drept un rezultat al contaminării polenului și nu al transformării. Totuși cercetările de acest fel au continuat prin obținerea în anii 1986-88 a speciilor de porumb, orez și grâu transformate genetic prin polenizare cu polen și extract de ADN străin. În aceste experimente ADN-ul plasmidial incluzând gena *nptIII* inserată a fost aplicat asupra florilor în perioada polenizării. Fenomenul de transformare a fost confirmat prin screening la rezistența față de antibiotic și analize Southern blot. Autorii au explicat datele obținute prin pătrunderea ADN-ului plasmidial împreună cu tubul polinic în germinare spre ovule, sugerându-se că acestea în faza de fecundare sunt sensibile și pot permite încorporarea ADN-ului străin (Luo și Wu, 1988; Picard și al., 1988). Simplitatea în efectuare, lipsa unui echipament special și costisitor a determinat continuarea acestor experiențe și în anii '90 ai secolului trecut de către alți cercetători (Langridge și al., 1992; Zeng și al., 1994), care au demonstrat succesul transferului de gene mediat de tubul polinic. Cu toate acestea, nu există dovezi suficiente care ar demonstra că prin această metodă se poate asigura o integrare și o transmitere în descendență a genelor inserate.

Transferul genelor în protoplaști (celule lipsite de perete celular) reprezintă prima metodă de transfer direct al ADN-ului în plante a cărei eficiență a fost demonstrată (Krens și al., 1982). Tehnicile utilizate se bazează pe proprietățile ADN-ului de a traversa membrana plasmatică și pe totipotențialitatea protoplaștilor. Primele cercetări care au indicat asupra unei transformări stabile a protoplaștilor s-au bazat pe permeabilizarea reversibilă a membranei plasmatice pentru ADN-ul străin cu *polietilenglicol* (PEG, solubil în apă, greutatea moleculară variază între 200-15000 daltoni) cu formula chimică:



În general, se utilizează polimeri cu greutate moleculară de aproximativ 1500-6000 daltoni, cu o capacitate ridicată de adiție a ionilor de calciu în mediul de cultură. Polietilenglicolul aplicat în concentrații de 25-40% și la o agitare circulară continuă, timp de 30 minute, provoacă, la început, deshidratarea și aglutinarea protoplaștilor cu formarea de punți de hidrogen cu radicalii pozitivi ai proteinelor, fosfolipidelor și glucidelor, proces stimulat de concentrații ridicate de ioni de Ca^{++} și valori superioare ale pH-ului.

Deoarece PEG prezintă un anumit grad de toxicitate, iar în unele cazuri determină formarea celulelor multinucleate, prin fuziuni ale mai multor protoplaști, ca o metodă alternativă de transfer al ADN-ului în protoplaști a fost propusă *electroporarea*. O concentrație mare de ADN plasmidial care conține gena clonată este adăugată la o suspensie de protoplaști cărora i se aplică un șoc electric de 200-600 V/cm timp de 30-100 milisekunde. Ca rezultat, în membranele plasmatice se formează pori care permit pătrunderea ADN-ului exogen în citoplasmă (Milică, 1999; Sambrook și Russell, 2001).

Eficiența transformării prin aceste procedee este influențată de o serie de parametri: greutatea moleculară și concentrația PEG, tensiunea, tipul și durata impulsului electric, dimensiunile și configurația plasmidei (superrăsucită sau liniarizată), starea fiziologică și stadiul din ciclul celular în care se află protoplaștii-recipient, protocolul de regenerare pentru fiecare specie „de interes”. Al doilea dezavantaj al transferului de gene în protoplaști este probabilitatea mare de a integra mai multe copii ale transgenei.

Microinjectia este o metodă fizică directă de introducere a ADN-ului în nucleul celulei vegetale, sub control optic, aplicată cu succes pentru prima dată în a doua jumătate a anilor '90 ai secolului trecut la tutun și lucernă (Crossway și al., 1986). Este una dintre cele mai laborioase și complexe metode. Prezența peretelui celular reprezintă nu numai o barieră fizică, prezentând dificultăți în penetrarea peretelui de către microcapilare, ci și o vizibilitate redusă a nucleului. Prezența vacuolei mari, de asemenea, reprezintă o problemă, deoarece există riscul distrugerii tonoplastului în procesul penetrării spre nucleu. Există și o serie de avantaje: permite controlul numărului moleculelor transferate, face posibil cotransferul de ADN, ARN, proteine sau chiar mitocondrii. Transferul moleculelor poate fi efectuat în celule izolate, structuri multicelulare cu mare competență pentru regenerarea plantelor.

Transferul direct al ADN-ului plasmidial cu **fibre de carbid-silicon** reprezintă o metodă relativ nouă, primele succese fiind înregistrate în anii '90 ai secolului trecut la porumb (Kaepler și al., 1992). Această metodă oferă o alternativă microinjectiei, fiind extrem de simplă și ieftină pentru producerea plantelor transgenice fertile. Tuburile Eppendorff cu suspensii de agregate celulare sunt inițial inversate și apoi vortexate împreună cu ADN-ul plasmidial și fibrele încărcate negativ într-un mediu hipertonic cu un conținut de sorbitol 0,25 M și manitol 0,25 M. Ca urmare a coliziunilor între agregatele celulare și fibrele ascuțite ca niște ace, peretele celular este penetrat și ADN-ul pătrunde în citoplasmă. Principalii factori care pot afecta transferul sunt modalitatea și intensitatea agitării. Până în prezent metoda a fost folosită cu succes la porumb și tutun.

Un dezavantaj al acestei metode este determinat de tipul de țesut-țintă utilizat. Până în prezent s-a reușit utilizarea doar a suspensiilor cu agregate celulare mici cu perete celular subțire. O altă cauză care limitează această metodă o reprezintă faptul că fibrele de carbid-silicon pot fi cancerigene din cauza proprietăților similare cu fibrele de azbest.

Transferul direct al genelor prin **metoda biolistică**, elaborată în 1987 (Sanford și al., 1987), se consideră a fi un progres esențial în manipularea genetică, întrucât realizează transferul genelor în plantele pentru care nu sunt eficiente transferul mediat de *Agrobacterium* sau metodele bazate pe protoplaști. Principiul acestei metode constituie utilizarea microproiectilelor lansate cu viteză mare pentru introducerea ADN-ului în celulele vii.

ADN-ul este precipitat cu clorură de calciu la suprafața unor particule de aur sau tungsten, cu diametrul mai mic de 1 micron. Particulele sunt amplasate într-un glonț din plastic (macroproiectil), introdus în țeava unui dispozitiv special construit în acest scop. Țesutul vegetal țintă este plasat în apropierea unui mic orificiu de la capătul țevii. Macroproiectilul este propulsat spre țesut cu ajutorul unei încărcături explozive și când se izbește de placa de protecție, particulele pe care le poartă trec prin orificiu și lovesc celulele. Țeava pistolului și camera cu țesutul trebuie să fie vidate. În caz contrar, rezistența aerului reduce viteza macroproiectilului. După „bombardare”, celulele sunt transferate în cultură pentru regenerarea plantelor.

Spre deosebire de mecanismele de bombardare cu macroproiectile, o altă variantă – **microșintirea** – generează mai întâi aerosoli printr-un scurt șoc de presiune, după care accelerează picăturile, conform legii lui Bernoulli într-un capilar foarte îngust. Prin intermediul acestui sistem, 80% din totalul particulelor ajung într-o regiune cu diametrul de numai 150 micrometri: meristemul. Această metodă balistică ameliorată este folosită pentru transformarea inflorescenței și meristemelor florale (Raicu, 1997).

Principali factori limitativi sunt: masa și materiile prime ale particulelor care trebuie să reprezinte metale inerte din punct de vedere chimic, natura, forma și concentrația ADN-ului. Pentru învelirea particulelor metalice cu ADN, se poate recurge la aditivi (spermidina, clorura de calciu). Alți parametri cu incidență asupra fiziologiei țesutului sunt: condițiile de temperatură, fotoperioada și umiditatea în care sunt menținute plantele-donor, explantele și țesuturile transformate. Avantajele acestei tehnici constau în transformarea țesuturilor organizate potențial regenerabile, permit transferul unor gene străine în germoplasma-elită, tehnica putând fi aplicată teoretic la orice specie.

Alte tehnici de transfer direct al genelor fac apel la: microfascicule laser, liposomi, sonicare, macroinjecție etc. Această gamă de tehnici de transfer care diferă prin complexitatea tehnică și eficiență se află în dezvoltare, în căutarea noilor metode cu condiții tehnice simple, reproductibile în diverse laboratoare fără un echipament specializat și costisitor.

La momentul actual, conform datelor înregistrate în bazele de date (AGBIOS și COMPASS) privind PMG aprobate, majoritatea plantelor au fost obținute prin transferul genelor indirect mediat de *Agrobacterium* și direct prin metoda biolistică.

1.4. Regenerarea, selecția și testarea plantelor modificate genetic

Regenerarea, selecția și testarea PMG reprezintă componente esențiale ale unui protocol de transformare. Datorită totipotenței caracteristice organismului vegetal, celulele transformate pot regenera prin cultura *in vitro* plante transgenice, care fiind supuse unor etape intermediare de selecție sunt cultivate în câmp pentru o testare a stabilității expresiei transgenei în condiții naturale.

Sistemele de cultură *in vitro* includ atât cultura explantelor care își păstrează integritatea: embrioni zigotici, meristeme, cât și a celor pentru care condițiile *in vitro* determină o dediferințiere celulară mai mult sau mai puțin pronunțată. Dediferințierea este procesul prin care celulele unui organ pierd capacitatea de a-și regla dezvoltarea, devenind apte de a se divide cu formarea unei mase de celule parenchimatoase numit **calus** (Raicu, 1997). În calitate de explante pentru inducerea calusului pot fi folosite diferite părți ale organelor plantei. Excizia explantului induce un răspuns de rănire la nivelul secțiunilor care, cultivate în prezența hormonilor din mediu, formează calus. Prin modificarea raportului de substanțe reglatoare de creștere în mediul de cultivare este indusă **organogeneza**, asigurată de meristemele care apar în calusurile cultivate *in vitro*. Prin organogeneză se formează lăstari care, transferați pe un mediu lipsit de hormoni sau cu un conținut scăzut de auxină, vor înrădăcina. Plantele, astfel obținute, vor fi transferate în seră și, ulterior, în câmp.

Lăstarii pot fi induși să se formeze și direct pe explantele diferențiate: frunze, tulpini, hipocotile, inflorescențe, rădăcini. În acest caz, ei își au originea în zone rămase în stare meristematică sau pot rezulta din diferențierea anumitor celule.

Obținerea plantelor din celule cultivate *in vitro* se poate realiza prin regenerare atât direct, cât și indirect prin calus urmat de organogeneză (fig. 1.17.).

Deși etapa de regenerare *de novo* prin calus nu este o cerință obligatorie pentru a genera plante transgenice, aceasta reprezintă o etapă de bază în majoritatea protocoalelor de transformare. Procedura de regenerare trebuie să corespundă anumitor condiții. De exemplu, în cazul transformării mediate de *Agrobacterium*, pentru a fi accesibile bacteriei, celulelor care urmează să fie regenerare li se aplică diferite forme de rănire, iar acestea trebuie să fie competente pentru a primi și integra ADN-T (Sangwan și al., 1992; Ishida și al., 1996).

Regenerarea plantelor poate fi influențată negativ de concentrații înalte ale bacteriei și perioada lungă de cocultivare – factori esențiali în eficiența transformării. De aceea, este necesar de a găsi un echilibru între frecvența de transformare și viabilitatea țesutului. S-a constatat că modul în care materialul vegetal este cultivat înainte și după infectare cu bacterii, și în special prezența în mediu a hormonilor, reglatorilor de creștere și a diferitor substanțe: antioxidanți sau antibiotice pot influența profund atât competența pentru transformare, cât și capacitatea de regenerare (Joersbo și Okkels, 1996; Perl și al., 1996; Nauerby și al., 1997).

Frecvența regenerării variază și este influențată de genotip și de metoda de transfer. Depășirea acestor dificultăți este posibilă prin elaborarea unor metode de transformare directă a unor structuri cu potențial natural de regenerare, cum sunt embrionii și meristemele. Dezvoltarea transformanților din astfel de explanți este

asociată cu un număr mai mic de manipulări ale tehnicii culturii *in vitro*. De asemenea, se consideră că plantele obținute din cultura meristemelor apicale sau auxiliare nu prezintă variația somaclonală. Cu cât este mai redus gradul de organizare a țesutului și cu cât este mai lung timpul petrecut în această stare, cu atât este mai mare amplitudinea fenomenului de variație somaclonală (variabilitate genetică generată în timpul culturii de țesuturi).

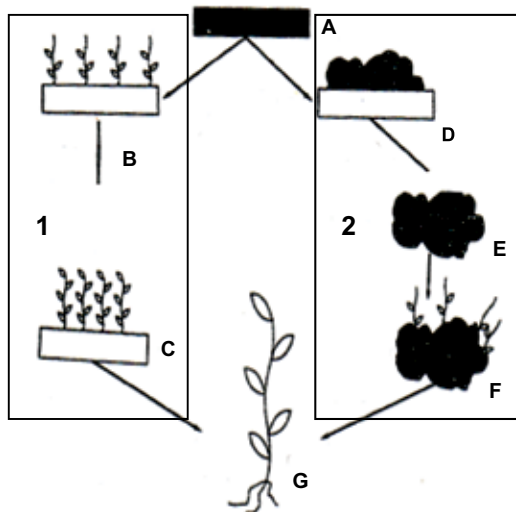


Figura 1.17. Regenerarea plantelor prin organogeneză directă (1) și indirectă (2)
(Raicu, 1997)

Notă: A – explante: fragmente de organe, țesuturi, celule izolate (polen, protoplaști); B – este indusă formarea mugurilor direct din celulele explantului pe un mediu de cultură adecvat; C – dezvoltarea lăstarilor din muguri pe același mediu sau pe un mediu de alungire; D – celulele explantului inițial sunt induse să se dividă, dediferențieze cu formarea calusului primar; E – calusul este subcultivat pe un mediu de creștere; F – este indusă organogeneza prin transferul calusului pe un mediu de regenerare; G – lăstari.

Indiferent de metoda de transfer utilizată, frecvența de integrare a genelor în genomul celulei este redusă. Din această cauză, genei „de interes”, îi este asociată o genă-marker, care permite selecția celulelor vegetale transformate. Cele mai folosite gene-marker selectabile conferă rezistență la un antibiotic sau un erbicid. Produsul unei asemenea gene este de obicei o enzimă, care inactivează o substanță toxică și astfel permite celulelor transformate să supraviețuiască pe un mediu de cultură adiționat cu antibioticul sau erbicidul respectiv și să regenereze.

Alegerea agentului de selecție în concentrație și durată optimă de aplicare este importantă atât pentru un nivel înalt de selectare a celulelor transformate, cât și pentru o regenerare calitativă. Există o varietate mare de gene-marker (tab. 1.4.), care favorizează optimizarea factorilor cu incidență în transformare (Wilminkand și Dons, 1993).

Tabelul 1.4.

Gene-marker utilizate în transformarea genetică a plantelor
(Wilmink și Dons, 1993)

Agentul de selecție/ substratul	Gene- marker	Produsul de expresie	Efectul	Principiul mecanismului de rezistență
Antibiotice				
Kanamicina C418	<i>aphA2</i>	APH(3')II (NPTII)	Sinteza proteinelor	Fosforilarea agentului selectiv
Higromicină	<i>hpt=aphIV</i>	APH(3')II (NPTII) APH(4')		
Erbicide				
Basta, PPT	<i>bar, pat</i>	PAT	Sinteza aminoacizilor	acetilarea agentului de selecție
Glifosat	<i>aroA, Epsps</i>	EPSPS		modificarea/ amplificarea enzimei- țintă
Sulfoniluree Bromoxinil	<i>csr1-1</i> <i>bxn</i>	ALS Nitrilasa	Fotosinteză	degradarea agentului de selecție
Atrazină	<i>psbA</i>	Qb		modificarea enzimei- țintă
Alți agenți de selecție				
Metotrexat	<i>Dhfr</i>	DHFR	Sinteza nucleotidelor	modificarea enzimei- țintă
2,4-D	<i>tda</i>	DPAM	Metabolismul auxinelor	degradarea agentului de selecție

Cea mai des utilizată transgenă în calitate de marker de selecție este gena **neomicin fosfotransferazei aminoglicozidice** (3') de tip II (*nptII*), derivată de la transposonul Tn5 al *E. coli*, care mai este denumită și **gena rezistenței la kanamicină**. Această genă conferă rezistență față de antibioticele aminoglicozide. Gena *nptII* poate fi pusă sub controlul elementelor reglatoare de origine bacteriană, astfel nu va fi expresată în plante sau poate fi controlată de un promotor eucariot care va determina expresia ei în planta-receptor.

O altă categorie de gene care permit analiza eficienței transformării genetice sunt genele **raportoare** (Зверева și Романов, 2000). Expresia acestor gene nu se reflectă asupra metabolismului sau rezistenței plantelor transgenice în condiții normale sau selective. Scopul utilizării lor constă în identificarea cu ușurință a produselor lor de expresie (enzime, care pot fi detectate cu substraturi cromogene, fluorogene, care emit fotoni sau radioactive) pentru a concluziona despre prezența și expresia genelor „de interes” (vezi cap. 4).

Domeniul de utilizare a genelor raportoare este mult mai larg decât transgeneza. Un aspect al utilizării lor este cel de a analiza expresia temporal-spațială a genelor în general, proprie organismului dat, sau a transgenei. În funcție de scopul cercetării, secvența codificatoare a genelor raportoare pot înlocui anumite secvențe în construct. De exemplu, atașarea genei la regiunea promotor permite de a cerceta rolul acestuia în expresia genei respective la nivel de transcripție. Înlocuirea secvenței codificatoare a genei „de interes” cu cea a genei raportoare cu păstrarea regiunilor care codifică secvența de la capătul 5` netranslabil al ARNm permite de a aprecia rolul acestei succesiuni nucleotidice în procesul transportului ARNm din nucleu în citoplasmă și inițierea translării. Prin combinarea secvențelor codificatoare ale genei „de interes” și raportoare se poate determina, în unele cazuri direct, cantitatea proteinei active în celule, interacțiunea cu alte proteine, polipeptide, acizi nucleici, membrane etc.

În ultimii ani au fost propuse o serie de gene utilizate în monitorizarea celulelor vegetale transformate genetic: genele octopinsintetazei – *OCS*, nopalinsintetazei – *NOS*, cloramfenicol acetiltransferazei – *CAT*, β -galactozidazei – *LacZ*, β -glucoronidazei – *GUS*, luciferazei – *LUC*, proteinei fluorescente verzi – *GFP* (Sambrook și Russell, 2001).

Apelarea la genele raportoare este în funcție de avantajele și limitările acestora. Nu există gene cu utilizare universală, de aceea selectarea unui marker adecvat se începe cu informația cunoscută. De exemplu, metodele enzimatiche de elucidare a activității proteinelor raportoare *GUS*, *LUC* și *CAT* sunt mai sensibile decât detectarea fluorescență a *GFP*, iar stabilitatea înaltă a proteinelor *GFP*, *GUS* și *CAT* *in vivo* nu permite de a elucidă pe baza lor modificările rapide în expresia genelor. Pentru acest scop este mai eficientă *LUC*, întrucât timpul de degradare a proteinei în celulele vii este de 2-3 ore (Зверева și Романов, 2000).

În primii ani ai practicii de transformare genetică a plantelor, s-a apelat la gena *β -glucoronidazei*, însă din cauza intervenției distructive a celulelor utilizarea acesteia în testarea transgenelor este limitată (vezi cap. 4). În calitate de markeri vizuali alternativi s-a recurs la luceferază și la genele antocianinelor, în special în transformarea gramineelor. Dar și în acest caz, simplitatea în vizualizare la microscop a acumulărilor de pigmenți antociani este contrastată de faptul că aceștia afectează dezvoltarea celulelor transformate. Însă utilizarea pe larg a luciferazei, care nu manifestă activitate toxică asupra celulelor, este limitată de echipamentul costisitor pentru vizualizarea produselor reacției enzimatiche.

Proteinele *GFP* sunt unele din cele mai recent utilizate în calitate de markeri în transformarea genetică. Aceștia permit detecția vizuală nedistructivă a celulelor transgenice prin microscopie fluorescență. Sistemul dat este independent de genotip și de țesutul analizat și prezintă un nivel jos de toxicitate.

Reieșind din avantajele și dezavantajele fiecărui sistem reporter, se consideră că cel mai des utilizate în tehnologia ADN-recombinant sunt genele *GUS* și *GFP*, și mai puțin *LUC* și *CAT* (vezi cap. 4).

Diferite strategii aplicate în scop de selecție (antibiotice, erbicide, gene raportoare) vizează asigurarea celulelor cu un component final, esențial pentru regenerare. De exemplu, benziladenina glucoronidul inactiv este convertit în citochinina – benziadenina activă în celulele care expresează gena *gus* (Joersbo și Okkels, 1996). Un alt sistem este bazat pe expresia unei gene *isopentiltransferaza (ipt)*, care determină producerea unui precursor al citochininei (Ebinuma și al., 1997). Această strategie determină producerea unui fenotip transgenic aberant, însă problema în cauză a fost înlăturată prin clonarea genei *ipt* într-un element transpozabil, făcând posibilă eliminarea genei prin selecția transgenei.

Ultima verificare a plantelor transgenice în cazul speciilor de interes economic se face în teste de câmp. Aceste teste au drept scop determinarea stabilității genetice a caracterului transferat și evaluarea altor însușiri cu incidență asupra producției și calității. Pentru tehnologia de transfer al genelor, cea mai importantă confirmare a reușitei transformării constă în acceptarea produselor plantelor astfel manipulate de către fermieri și consumatori.

1.5. Gene „de interes”

Obiectivele transformării genetice a plantelor evoluează odată cu cerințele societății. Dacă în primii ani de utilizare a tehnicilor ADN-ului recombinant erau implicate doar centre științifice a căror activitate de cercetare era axată preponderent pe eficientizarea metodelor de transfer al alogenelor și obținerea PMG cu un caracter de valoare, acum există laboratoare comerciale care produc sute de linii transgenice, cu gene de importanță agroindustrială. Realizările ingineriei genetice vegetale își găsesc, din ce în ce mai mult, implementare în diverse domenii ale vieții contemporane fiind stimulate de imposibilitatea rezolvării unor imperative ale timpului, cum ar fi ameliorarea capacității și calității producției, rezistența plantelor la diferiți patogeni și factori abiotici, conservarea biodiversității, poluarea chimică a mediului ambiant, farmaceutică, profilaxia și tratamentul multor maladii etc.

Transformarea genetică este pe larg exploatată în obținerea plantelor cu **rezistență față de insecte** – obiectiv prioritar al biotehnologiilor agricole, determinat de pierderile enorme de recoltă cauzate de insecte și de costul insecticidelor chimice folosite în agricultură. Ameliorarea rezistenței genetice la insecte a fost posibilă prin utilizarea unor gene codificatoare de proteine insecticide, care pot fi de origine vegetală, animală sau microbiană.

În prezent, cel mai frecvent se recurge la utilizarea genelor plasmidiale ale unei bacterii din sol – *Bacillus thuringiensis*. În condiții de stres, aceste bacterii formează endospori pentru care sintetizează din abundență o serie de proteine specifice. Surplusul este depozitat sub forma unui corp proteic paracristalin *cry* (de la „crystal”). Fiind ingerate de insectele sensibile, aceste proteine formează un complex cu receptorii specifici din membrana epiteliului intestinal cauzând moartea ei. Efectele letale sunt limitate la insectele sensibile, ceea ce face ca toxina respectivă să fie în avantaj față de insecticidele chimice care distrug un număr mare de insecte inclusiv nedăunătoare.

Dezavantajul insecticidelor biologice pe bază de *Bacillus thuringiensis* este determinat de costul ridicat și de faptul ca acestea sunt rapid descompuse în condiții de câmp. Transgeneza reprezintă o soluție eficientă prin introducerea genelor care codifică toxina bacteriană în plante. Au fost identificate peste 1000 de toxine diferite, fiecare având un spectru specific de insecte sensibile. Vertebratele, printre care și omul, nu posedă receptori pentru proteinele Bt (*Bacillus thuringiensis*).

Genele Bt active împotriva unor *Lepidoptere* (*cry1*, *cry2*, *cry b* și *cry Q*), gândacului de Colorado și altor coleoptere – *cry 3* – au fost transferate la un număr mare de specii mono- și dicotiledonate cultivate. Expresia genei Bt în PMG determină sinteza unei protoxine inactivă în lungime de 1200 aminoacizi care, după ingerarea ei de către larvele sensibile, este scindată într-un fragment activ de 68 kDa ce leagă receptorii celulelor intestinale, blocându-le funcționarea. Toxinele Bt sunt foarte specifice și acționează chiar și în doze foarte mici (Raicu, 1997).

Primele plante cu rezistență mediată de proteina Bt au fost tutunul și tomatele MG obținute în 1986 și 1987. La momentul actual, dintre speciile de plante MG aprobate la nivel internațional, porumbul include cele mai multe linii cu transgene, care conferă rezistență față de insecte. În baza de date AGBIOS sunt înregistrate genele care codifică proteine insecticide prezente în liniile MG autorizate (tab. 1.5.).

Tabelul 1.5.

**Gene utilizate în transformarea genetică în scopul
obținerii rezistenței față de insecte**

Nr. de varietăți	Gene „de interes”	Sursa de gene
7	Cry1Ab	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk)</i>
3	Cry1Ac	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Btk)</i>
4	cry1F	<i>Bacillus thuringiensis var. aizawai</i>
2	cry2Ab	<i>Bacillus thuringiensis</i>
4	cry34Ab1	<i>Bacillus thuringiensis s. PSI49B1</i>
3	cry35Ab1	<i>Bacillus thuringiensis s. PSI49B1</i>
4	cry3A	<i>Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis</i>
2	cry3Bb1	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis</i>
1	cry9c	<i>Bacillus thuringiensis subsp. Tolworthi</i>
1	Inhibitor al proteazelor	<i>Solanum tuberosum</i>
1	VIP3A	<i>Bacillus thuringiensis s. AB88</i>

O altă grupă de proteine insecticide însă de origine vegetală sunt: lectinele (implicate în fenomene de recunoaștere celulară), inhibitorii amilazei și inhibitorii proteazelor (prezente în semințele leguminoaselor și cerealelor) care, atunci când sunt ingerate în doze mari, inhibă creșterea și dezvoltarea insectelor, însă cu o rată a mortalității mai redusă comparativ cu proteinele Bt. Mediarea rezistenței de către inhibitorii proteazelor de origine vegetală (proteine mici, 5 - 25 kDa) este determinată de faptul că cea mai mare parte din insectele fitofage utilizează proteazele pentru a digera proteinele ingerate. Inhibitorii proteazelor acționează ca analogi ai substratului, formând cu proteazele complexe necovalente, stabile. Primele plante transgenice care sintetizau

un inhibitor al proteazelor cu serină au fost obținute în 1987. Această strategie a fost testată la mai multe specii de plante pentru protecția împotriva lepidopterelor.

Tubercunii de cartof conțin un grup de glicoproteine numite *palatine*, cu greutate moleculară de 40 kDa (cca 40% din totalul proteinelor de rezervă). Palatinele sunt considerate substanțe de protecție contra insectelor și a unor microorganisme care conțin lipaze, active în degradarea lipidelor, cu eliberare de acizi grași. Transferul genelor acestor proteine la tutun și tomate în anul 1987 a determinat creșterea capacității de rezistență la atacul larvelor de *Manduca sexta* (omida cu corn), cu o mare sensibilitate la endotoxine. Se consideră că există peste 50 toxine diferite pentru larvele de Lepidoptere (Milică, 1999).

În laboratoarele academice și industriale se fac eforturi imense pentru a descoperi noi proteine insecticide, însă rezultatele testelor de câmp au evidențiat niveluri de rezistență cu valoare comercială doar în cazul utilizării transgenelor derivate de la *Bacillus thuringiensis*.

Principala problemă legată de utilizarea proteinei Bt constă în posibila apariție a unor insecte rezistente la această toxină. Dezvoltarea rezistenței față de insecte la PMG se asociază cu un control integrat al populațiilor de dăunători. Strategiile pe termen scurt presupun expresia la un nivel foarte înalt a genelor Bt, cultivarea unor plante-gază sensibile, în paralel cu cele transgenice, ca refugiu pentru dăunători, practici agronomice care reduc expunerea insectelor la acțiunea toxinei Bt etc. Se prevede că strategiile pe termen lung vor exploata genele multiple care codifică proteine insecticide cu căi unice de acțiune.

Ameliorarea rezistenței genetice la insecte oferă o serie de beneficii care constau în:

- reducerea poluării chimice a solului;
- protejarea entomofaunei;
- eliminarea reziduurilor de insecticide din apă și alimente;
- ameliorarea calității producției;
- sporirea recoltei de pe aceleași suprafețe de teren arabil, nu se extind suprafețele agricole în detrimentul pădurilor, ceea ce contribuie la protejarea solului împotriva eroziunii.

Viitorul biotehnologiilor agricole care vizează **combaterea dăunătorilor și mărirea rezistenței la boli** pare a fi promițător. Primele cercetări au fost orientate spre diminuarea efectelor negative ale virusurilor asupra producțiilor vegetale. Reieșind din faptul că recunoașterea și neutralizarea patogenului sunt mediate de anticorpi, s-a estimat că expresia în plantele transgenice a genelor care codifică anticorpi ar putea să confere niveluri ridicate de rezistență la patogeni specifici. Într-o plantă transgenică capacitatea unui anticorp de a conferi rezistență față de un patogen depinde exclusiv de posibilitatea lui de a interfera cu funcționarea unor proteine virale, legându-se de situsurile lor antigene. Au fost obținute plante transgenice de tutun care exprimau anticorpi monoclonali ce conțineau numai domeniile necesare pentru recunoașterea și legarea antigenei – proteina virală. Liniile transgenice inoculate cu o suspensie

virală de o mie de ori mai concentrată decât minimul necesar pentru inducerea unei infecții sistemice au prezentat simptome cu 5 până la 14 zile mai târziu decât plantele-martor. Această tehnologie, deocamdată puțin exploatată, va pune la dispoziția ingineriei genetice o gamă nelimitată de anticorpi specifici (Milică, 1999).

O altă strategie în crearea rezistenței la virusuri se bazează pe blocarea ARN-ului virotic prin proteine de înveliș, respectiv secvențe de ARN-antiviral. Prin transformarea genetică a plantelor cu gene responsabile de sinteza proteinelor de înveliș a unui virus planta produce astfel de proteine ca formă de apărare contra virusului respectiv. În acest mod se asigură o protecție față de diverși agenți patogeni. De exemplu, s-a reușit combaterea virusului nervurilor galbene la sfeclă și a virusului mozaicului tutunului (Milică, 1999; Sala și al., 2003).

Baza de date internațională AGBIOS include PMG cu trei tipuri de gene „de interes”, care determină rezistența la infecții virale (tab. 1.6.).

Tabelul 1.6.

Gene utilizate în transformarea genetică în scopul obținerii rezistenței față de infecții virale

Gene „de interes”	Sursa de gene
Helicază	Virusul răsucirii frunzelor la cartof orf 2 (<i>Potato leafroll luteovirus (PLRV) orf 2</i>)
Replicază (ARN dependent de ARN polimeraza)	Virusul răsucirii frunzelor la cartof orf 1 (<i>Potato leafroll luteovirus (PLRV) orf 1</i>)
Proteine de înveliș virale	Virusul mozaicului la castraveți (<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>)
Proteine ale capsidei virale	Virusul petelor inelare la papaia (<i>Papaya ringspot potyvirus (PRSV)</i>)
Proteine ale capsidei virale	Virusul Y la cartof (<i>Potato potyvirus Y (PVY)</i>)
Proteine ale capsidei virale	Virusul mozaicului la pepenele verde (<i>Watermelon mosaic potyvirus 2</i>)
Proteine ale capsidei virale	Virusul mozaicului galben la dovlecei (<i>Zucchini yellow mosaic potyvirus</i>)

Foarte puțin se știe despre impactul cultivării PMG cu transgene de origine virală asupra mediului. Riscurile potențiale ale acestor transgene ar putea fi determinate de posibilități de evoluție a populațiilor virale, favorizând apariția unor variante rezistente. Se presupune că aceste riscuri ar putea fi determinate în special de: recombinația între genomul ARN al unui virus și transcriptul ARN derivat dintr-o genă virală, schimbarea modului de transmitere a virusului de către insectele-vector, datorită încapsidării genomurilor ARN ale unor virusuri infectante de către proteinele codificate de o transgenă (heteroîncapsidare).

În ce privește **combaterea bacteriilor și mai ales a ciupercilor fitopatogene**, cercetările sunt mai avansate. Plantele sintetizează proteine capabile să inhibe creșterea fungilor *in vitro*. Expresia constitutivă sau indusă a genelor corespunzătoare în plantele transgenice poate determina rezistența la atacul ciupercilor. Cele mai cunos-

cute proteine antifungice sunt *chitinazele* și *β-1,3-glucanazele* – enzime implicate în hidroliza chitinei și β-1,3-glucanului din pereții celulelor fungale, astfel inhibând creșterea lor. Au fost descrise patru clase de endochitinaze și trei clase majore de β-1,3-glucanaze prezente la tutun. Aceste hidrolaze acționează sinergic, manifestând o activitate foarte puternică de inhibare a creșterii multor fungi. Utilizarea genelor care codifică diferite clase ale acestor enzime în transgeneză s-a dovedit a fi eficientă la unele varietăți de tutun transgenice care sintetizează o chitinază bacteriană sau vegetală și la tomate, la care coexpresia acestor gene a determinat niveluri sporite de rezistență la *Fusarium* (Milică, 1999; Raicu, 1997).

Prin evaluarea altor proteine corelate cu patogeneză (PR = Pathogenesis Related Proteins), de exemplu, a osmotinei (PR5 – proteină vacuolară indusă de stresul salin, descoperită la tutun), s-a reușit supraexpresia acesteia în plantele de cartof, determinând o întârziere semnificativă a dezvoltării leziunilor produse de *Phytophthora infestans*. Tot la plante s-a descoperit o familie de peptide mici antifungice, numite **defensine**. Unele dintre aceste tipuri de peptide, izolate din semințele mai multor specii (*Raphanus sativus*, *Amaranthus caudatus*, *Mirabilis jatapa*, *Urtica dioica*, *Triticum* și *Hordeum*), manifestă *in vitro* o activitate antifungică față de un spectru larg de patogeni. O genă de la ridiche, care codifică proteina II (R_S-AFP2), a fost exprimată în plantele de tutun transgenice inducând un anumit nivel de rezistență față de *Alternaria longipes*.

Fitoalexinele, compuși cu greutate moleculară mică, par să aibă un rol important în rezistența plantelor la patogeni. Mutantele de *Arabidopsis thaliana*, care au o capacitate redusă de a sintetiza fitoalexine prezintă leziuni mai mari în urma infecțiilor fungice. Expresia genei stilben-sintetazei de la vița-de-vie în plantele de tutun a determinat producerea unei noi fitoalexine (resveratrol) și o rezistență mărită la infecția cu *Botrytis cinerea*.

O altă strategie se bazează pe variate tipuri de oxigen activ, inclusiv peroxidul de hidrogen (H₂O₂) cu rol important în răspunsul de apărare al plantei și la infecțiile patogenilor. Plantele transgenice de cartof care exprimă o genă de origine fungică pentru glucozo - oxidază, ce generează H₂O₂, aveau niveluri crescute ale rezistenței față de unii patogeni fungici și bacterieni: *Erwinia carotovora*, *Verticillium*, *Phytophthora infestans*. Prin urmare, generarea diferitor tipuri de oxigen activ în plantele transgenice pare să determine o rezistență la un spectru foarte larg de boli.

Primele încercări de a obține plante rezistente la patogenii bacterieni au apelat la peptidele magainine sau cecropine, care s-au dovedit a fi cu activitate antibacteriană redusă *in vitro*. Mult mai eficient a fost lizozimul de la bacteriofagul T4, care, exprimat în tuberculii plantelor transgenice de cartof, a mărit rezistența la *Erwinia carotovora ssp. Atroseptica* (Raicu 1997). O altă încercare de ameliorare a rezistenței la bacterii a inclus toxinele nespecifice pentru gazdă care sunt determinanți majori ai virulenței patogenilor bacterieni. Manipularea rezistenței plantelor de tutun la un patogen bacterian *P. syringae pv. tabaci* a fost realizată cu succes prin intermediul unei gene, care codifică o enzimă ce inactivează toxina: gena pentru acetil-transferaza tabtoxină specifică.

Deși există rezultate promițătoare în acest domeniu, puține sunt speciile transgenice ce ar manifesta un nivel de rezistență cu valoare agronomică.

Posibilități înalte de valorificare a transgenezei în sectorul agricol prezintă genele pentru **rezistență la erbicide**. Erbicidele, similar celorlalte pesticide, reprezintă factori indispensabili obținerii unei recolte înalte. Aceste substanțe chimice ar trebui să acționeze selectiv, afectând doar buruienile, nu și cultura în care sunt aplicate. În consecință, cele mai multe dintre ele sunt adaptate anumitor culturi. În același timp utilizarea lor nerațională poate avea efecte grave asupra biocenozei prin acumularea lor persistentă în lanțul trofic datorită biodegradibilității joase a multora dintre ele.

Orientarea modernă în activitatea de combatere a buruienilor din culturi vizează două direcții: creșterea dozelor de erbicide în scopul eradicării sigure a buruienilor în paralel cu sporirea potențialului de rezistență a plantelor cultivate față de erbicidul administrat.

Prin ingineria genetică se încearcă extinderea gamei culturilor în care pot fi folosite erbicide totale (cu efecte minime asupra mediului și cu costuri de producție reduse) și flexibilizarea aplicării tratamentelor, în condițiile eliminării restricțiilor impuse de sensibilitatea speciilor cultivate. În acest scop se recurge la:

- creșterea nivelului enzimei-țintă pentru un anumit erbicid;
- expresia unei transgene derivate de la bacterii, sau plante a cărui produs de expresie nu este afectat de compusul activ;
- introducerea în plantele cultivate a unui sistem de degradare a erbicidului.

Principalele erbicide asupra cărora s-au efectuat cercetări pentru mărirea rezistenței culturilor agricole la doze mai ridicate sunt erbicidele șikimice (glifosatul comercializat sub numele Roundup). Aceste chimicale sunt sistemice totale și au ca țintă o enzimă din calea metabolică de sinteză a aminoacizilor aromatici esențiali – *5-enolpiruvil șikimat-3-fosfat-sintază* (EPSPS), localizată în cloroplast. În consecință, blocarea sintezei triptofanului cu rol de precursor în sinteza acidului indolilacetic conduce la carențe accentuate în auxine naturale și la încetarea creșterii plantelor.

Gena pentru EPSPS a fost clonată și introdusă în genom prin transformare genetică. Expresia acesteia a determinat sporirea de 20 de ori a nivelului activității enzimei față de plantele netransgenice.

Acetolactat-sintetaza (ALS) este enzima-țintă pentru sulfoniluree și imidazolinone, care catalizează prima etapă din biosinteza aminoacizilor cu catenă ramificată: valină, leucină și izoleucină. Gena *als* izolată și clonată de la liniile mutante de tutun rezistente, care conțineau o enzimă insensibilă la aceste erbicide, fiind transferată, s-au obținut plante transgenice tolerante la compușii respectivi.

O largă aplicație au și transgenele care codifică sinteza unor enzime ce degradează substanțele active. De exemplu, fosfinotricinul (PPT), un inhibitor al glutamin-sintetazei, este inactivat de o acetiltransferază codificată de gena *bar* clonată de la *Streptomyces hygroscopicus*. Plantele la care a fost transferată această genă au devenit rezistente la fosfinotricin. Bromoxinilul este un alt erbicid nitrilic degradat eficient de unele bacterii din sol - *Klebsiella ozaenae* care folosește bromoxinilul ca

sursă de azot, deoarece conține enzima nitrilaza, care îl convertește în acid 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoic. Gena care codifică această enzimă a fost utilizată cu succes pentru a obține plante rezistente la acest erbicid.

În țările care au aprobat introducerea în cultură și comerț a PMG, majoritatea plantelor conțin transgene, care determină rezistența la erbicide. Conform bazei de date AGBIOS, 20 de varietăți conțin transgenele EPSPS (toleranță la glifosat), 31 de varietăți – fosfinotricin-N-acetiltransferaza PAT – toleranță la glufosinatul de amoniu (tab. 1.7. și fig. 1.18.).

Tabelul 1.7.

Gene utilizate în transformarea genetică cu scopul de a obține rezistență la erbicide

Gena „de interes”	Abreviere	Sursa de gene	Rezistență la erbicidul:
5-enolpiruvilșikimat-3-fosfat sintaza	<i>EPSPS</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens CP4</i> ; <i>Zea mays</i>	Glifosat
Acetolactat sintaza	<i>ALS</i>	Himeră obținută din 2 gene AHAS (S4-Hr4); Linia de <i>Arabidopsis thaliana</i> toleranță la clorsulfuron; <i>Nicotiana tabacum</i> tolerant la clorsulfuron	Sulfonil uree
Nitrilaza	<i>Nitrilaza</i>	<i>Klebsiella pneumoniae s. ozanae</i>	Bromoxinil și ioxinil
Fosfinotricin-N-acetiltransferaza	<i>PAT</i>	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Glufosinat de amoniu

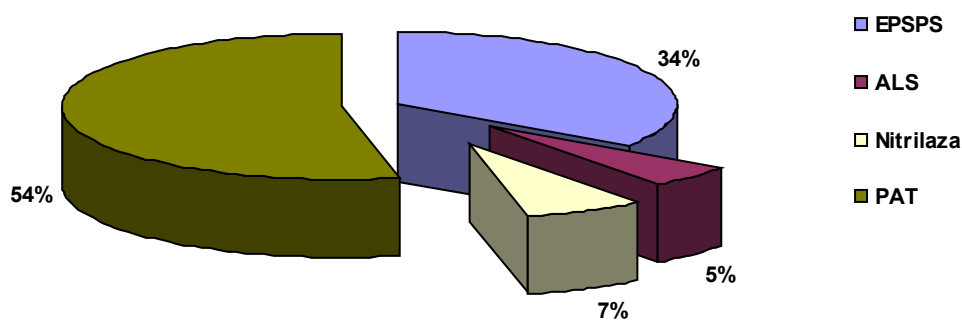


Figura 1.18. Numărul de varietăți (%) care conțin gene utilizate în obținerea PMG rezistente la erbicide aprobate la nivel internațional (AGBIOS)

Un alt scop al transgenezei constă în obținerea unor plante cu **compoziție biochimică și dezvoltare modificată**. Androsterilitatea citoplasmatică este folosită pe

scară largă în obținerea semințelor hibride, deoarece elimină necesitatea castrării manuale a genitorului matern. Însă pentru multe specii cu însușiri agronomice de valoare nu se cunosc bazele moleculare și fiziologo-biochimice ale acestui fenomen. De asemenea, pentru ca liniile consangvine astfel obținute să poată fi multiplicare, trebuie să se dispună și de gene restauratoare ale fertilității. La mai multe plante cultivate, printre care și *Brassica napus*, sursă majoră de ulei vegetal, a fost introdus un sistem, manipulat genetic, de androsterilitate și restaurare a fertilității.

Sterilitatea este determinată de o ribonuclează numită **barnaza**, produsă de bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*. Regiunea de codificare a genei bacteriene atașată unui promotor TA 29, care are o expresie țesut specifică în tapetum care înconjoară sacii polinici din antere, fiind transferată a determinat androsterilitatea ca urmare a distrugerii celulelor tapetumului din cauza degradării ARN-ului de către barnaza. Pentru restaurarea fertilității, se utilizează o altă proteină, numită **barstar**, produsă tot de *Bacillus amyloliquefaciens*. Barstar este o proteină intracelulară, care inactivează barnaza, formând un complex stabil enzimatic inactiv în citoplasmă, protejând astfel celulele bacteriene de propria lor toxină. Plantele transformate cu o genă artificială TA 29- barstar sunt fertile. Ele produc barstar în tapetum, datorită specificității de țesut a promotorului TA29 și atunci când plantele androsterile TA29-barnaza sunt încrucișate cu genitorii masculi care posedă TA29-barstar, rezultă hibridi F₁ fertili.

Calitatea și cantitatea substanțelor de rezervă (uleiuri, proteine, hidrați de carbon) sunt caracteristici individuale ale familiei genului și chiar ale speciei care tind să fie relativ constante. Variabilitatea naturală sau indusă artificial furnizează numai forme cu un set complet sau incomplet de gene responsabile pentru formarea compușilor de rezervă. Nu este posibilă adăugarea de noi gene la cele deja existente în plantele cultivate prin metodele clasice de ameliorare. Transferul genelor între specii îndepărtate genetic în scopul creșterii performanțelor lor agronomice este posibil numai prin inginerie genetică.

Cultura plantelor oleaginoase prezintă un interes deosebit ca obiectiv al transformării genetice determinat de producția acestor specii, care poate fi valorificată nu numai ca aliment, ci și în industrie. Prin transferul unor gene străine, de la alte organisme au fost obținute varietăți proiectate („designer crops”) pentru producerea de uleiuri superioare industriale. Elaborarea acestei tehnologii este deja avansată la rapiță – singura specie oleaginoasă importantă pentru care există tehnici eficiente de transformare genetică. La această specie, în afara celor două varietăți naturale existente, una cu conținut ridicat în acid erucic, alta bogată în acid oleic, au fost produse trei noi „designer crops” cu conținut ridicat în acid stearic (în proporție de 25-30%, un ingredient major al margarinelor și substituent al untului de cacao), acid lauric (cu 25%) și acidul petroselinic. Interesate de acest acid sunt industriile detergenților și maselor plastice. Gena implicată în sinteza acidului petroselinic a fost izolată de la *Coriandrum sativum*. Se intenționează, de asemenea, crearea unei noi varietăți de rapiță, care să conțină ceară jojoba, utilizată în industria farmaceutică, în produce-

rea de cosmetice și ca lubrifiant. Această ceară lichidă se găsește în uleiul conținut de semințele unui arbust din deșertul nord-american, *Jojoba simmondsia chinensis* (Raicu, 1997).

Se află în teste de câmp plante transgenice de rapiță, care conțin acid γ -linoleic, folosit ca agent terapeutic analgezic într-o serie de boli. Gena care codifică enzima implicată a fost izolată de la câteva specii de cianobacterii, iar transferul ei la rapiță a dus la acumularea acidului γ -linoleic în semințe. Se estimează că în următorii 5-10 ani vor fi elaborate tehnici de transformare eficiente și pentru celelalte specii oleagi-noase: floarea-soarelui, soia și inul pentru semințe.

O altă grupă de constituenți biochimici cu importanță comercială o reprezintă proteinele de rezervă, în special cele bogate în aminoacizi esențiali. De exemplu, orezul este deficitar în cisteină, metionină și lizină, orzul și sorgul sunt sărace în treonină și lizină, porumbul – în lizină și triptofan, iar legumele – în aminoacizi cu sulf. Pentru ameliorarea valorii nutritive a proteinelor de rezervă se realizează izolarea și transferul unor gene pentru proteinele de rezervă, modificarea secvenței nucleotidice prin inserarea codonilor suplimentari pentru aminoacizii deficitari. O altă strategie presupune modificarea expresiei genelor astfel încât proteinele care au un conținut mai bogat de aminoacizi deficitari să fie sintetizate preferențial. Întrucât în sinteza multor aminoacizi intervin enzime-cheie reglate feedback, pot fi identificate gene mutante care codifică enzime insensibile la acest gen de control și astfel se realizează stimularea sintezei aminoacidului respectiv. Prin intermediul acestei strategii, se încearcă ameliorarea conținutului de lizină la orez, utilizându-se o genă de la *Escherichia coli*, care codifică o enzimă mai puțin sensibilă la retroinhibiție.

Actualmente, în practica biotehnologiilor agricole există cinci varietăți cu compoziția biochimică modificată, nouă – cu androsterilitate/ restaurare a fertilității indusă, două – cu culoarea florilor modificată și șapte – cu o durată mai mare de coacere (tab. 1.8.).

De tehnologia ADN-ului recombinant beneficiază și **industria farmaceutică**. Mai multe laboratoare încearcă să sintetizeze, cu ajutorul plantelor, molecule bioactive, care până nu demult erau obținute doar prin intermediul microorganismelor și celulelor animale. Sistemele microbiene și animale au numeroase dezavantaje legate de costul de producere înalt și securitate, ceea ce a și stimulat utilizarea PMG în calitate de instrumente în obținerea moleculelor farmaceutice: antigene, anticorpi, factori de creștere, enzime, vitamine, receptorii colinergici, collagen, lactoferina umană, hemoglobina etc. (Miele, 1997; Fischer și Emans, 2000; Giddings și al., 2000; Twyman și al., 2003).

**Transgene implicate în modificarea dezvoltării
și compoziției biochimice a plantelor**

Caracterul	Genele „de interes”	Sursa de gene	Nr. de varietăți
Compoziție modificată a constituenților biochimici			
Aminoacizi <i>conținut înalt în lizină</i>	<i>cordapA</i> , codifică enzima dihidropicolinat sintaza (cDHDPS)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
Acizi grași <i>conținut înalt al acidului lauric și miristic</i> <i>conținut înalt al acidului oleic</i>	Genele codificatoare ale: tioesterazei	<i>Umbellularia californica</i>	1
	dehidrogenazei acizilor grași- delta (12)	<i>Glycine max</i>	2
Conținut redus de nicotină	Gena nicotinat-nucleotid pirofosforilazei	<i>Nicotiana tabacum</i>	1
Dezvoltare modificată			
Androsterilitate/ restaurarea fertilității <i>androsterilitate</i> <i>restaurarea fertilității</i> <i>androsterilitate</i>	Genele: ribonucleazei barnaza	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Escherichia coli</i>	8
	Barstar Adenin metilazei ADN		1
Culoare modificată	Gena flavonoid 3p, 5p hidroxilazei	<i>Petunia hybrida</i> , <i>sp. Viola</i>	2
Creșterea duratei de coacere	Genele: sintazei acidului 1-amino-ciclopropan-1-carboxilic	<i>Dianthus caryophyllus L.</i>	1
	deaminazei acidului 1-amino-ciclopropan-1-carboxilic (ACCD)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1
	sintazei acidului 1-aminociclopropan-1-carboxilic (ACC)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2
	poligalacturonazei (PG)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2
	hidrolazei S-adenozilmetioninei	<i>E. coli bacteriofagul T3</i>	1

Perspectivile utilizării plantelor-biofabrici sunt determinate de un șir de beneficii precum:

- **producția de materie vegetală este relativ ușor de obținut și ieftină;**
- **vaccinurile obținute pot fi păstrate la temperatura mediului ambiant, în „ambalajul lor natural” (fructe, rizomi, tuberculi);**
- **riscurile contaminărilor virale sau bacteriene asociate utilizării vaccinurilor produse pornind de la țesuturi umane sau animale sunt eliminate;**
- **obținerea moleculelor funcționale, cărora le-a fost îmbogățit conținutul de substanțe specifice utile pentru sănătatea consumatorului (vitamine ș.a.) sau pentru anumite utilizări cu caracter industrial (fibre etc.).**

Un exemplu concret de rezolvare a unei probleme sociale prin intermediul PMG îl reprezintă deficiența în vitamina A, caracteristică pentru mai mult de 124 milioane de copii din întreaga lume. Printr-un aport de vitamina A în dietă s-ar preveni anual moartea a 1,3 - 2,5 milioane de copii mici de vârstă preșcolară (Mayne, 1996; Grusak, 1999).

Compușii vitaminei A sunt reprezentați de către retinol, care derivă din β -caroten (provitamina A) sintetizat de microorganisme și plante (Cunningham și Gantt E, 1998). Pentru o nutriție echilibrată în vitamina A, este necesar de consumat zilnic alimente cu un aport de 1000 echivalenți retinol, ceea ce este egal cu 6 mg de β -carotena. Acest fapt, a impulsionat elaborarea diferitor strategii de sporire a conținutului de β -caroten în plante (Guiliano și al., 2000). Până în prezent sunt obținute plante transgenice de orez cu bobul galben, care conține în semințe vitamina A și fier (30% din populația globului este afectată de deficitul de fier) ca urmare a modificării genetice, ceea ce este important pentru țările cu populația săracă, malnutrită. Orezul galben sintetizează β -carotenul nu numai în țesuturile verzi, ci și în semințe, deoarece în genomul său sunt incluse mai multe gene, care codifică enzimele-cheie ale biosintezei acestui pigment (fitoen sintaza, fitoen desaturaza, caroten disaturaza, licopen β -ciclaza). Prin transformare genetică s-a reușit majorarea conținutului de β -caroten până la 200 μ g la 100 g material (Sandmann, 2001). În aceeași specie de orez a fost introdusă și o genă izolată de la soia, care codifică feritina – o proteină ce stochează și transportă fierul. Funcționarea acestei gene puse sub controlul unui promotor „sămânță specifică” a făcut să crească de trei ori nivelul fierului în bobul de orez. Date recente au demonstrat utilizarea tehnicii de inginerie genetică și în sinteza ameliorată a altor vitamine: C – acidul ascorbic și H – biotina (Patton D, 1997; Jain și Nessler, 2000; Alban și al., 2000; Conklin, 2001).

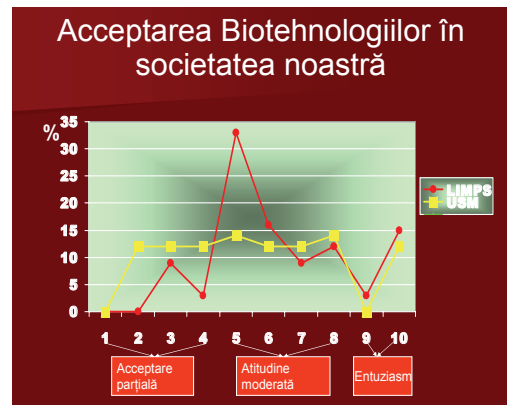
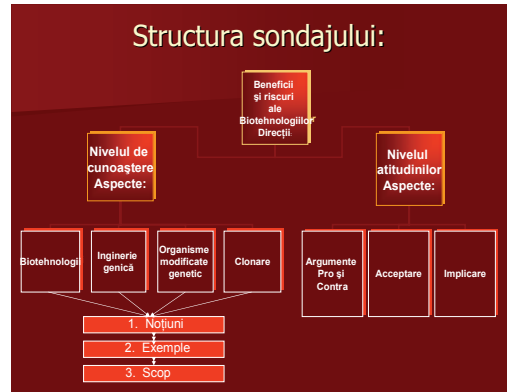
Printre alți compuși farmaceutici activi produși în plante transgenice se enumără (Kapusta și al., 1999; Stoger și al., 2000):

- ◆ antigene (decarboxilaza acidului glutamic, enterotoxina de la *E. coli*);
- ◆ anticorpi (anticorpurile monoclonale IgG (Guy S 13), *Herpes simplex* MAB, monocatena FV);
- ◆ factori de creștere (granulocite – macrofage, factorul de creștere epidermal uman);
- ◆ enzime;
- ◆ alți compuși cu rol terapeutic (receptorii colinergici, colagen, lactoferina umană, hemoglobina, proteina umană C).

CAPITOLUL 2

STANDARDIZAREA ȘI VALIDAREA INTERNAȚIONALĂ

- 2.1. Culturi agricole modificate genetic
- 2.2. Strategii de înregistrare și stocare a informației privind PMG în bazele de date
- 2.3. Laboratoare acreditate pentru testarea OMG
- 2.4. Norme și legi ce reglementează testarea OMG
- 2.5. Metode validate aprobate pentru testarea OMG



SOCIETATEA ÎNTRE RISCURILE ȘI BENEFICIILE BIOTEHNOLOGIILOR

Capitolul 2. STANDARDIZAREA ȘI VALIDAREA INTERNAȚIONALĂ

Comercializarea culturilor modificate genetic poate avea un impact profund asupra societății din punctul de vedere atât al securității alimentare, conținutului și valorii nutriționale față de cele obținute prin agricultura tradițională, cât și al implicațiilor economice. Întrucât în rețeaua de marketuri din lume există din ce în ce mai multe varietăți cu caractere modificate, monitorizarea materialului transgen, chiar și în cele mai mici cantități, și identificarea varietăților modificate genetic vor deveni un imperativ important în determinarea purității semințelor, privind lipsa transgenelor în culturile agricole, înainte de a fi comercializate. O monitorizare eficientă a utilizării culturilor biotehnologice aflate astăzi în ascensiune, a securității eliberării acestora în mediu este favorizată de accesibilitatea și de transparența sistemelor informaționale privind transformarea genetică, în special secvențele nucleotidice ale alogenelor. Accesul la materialele de referință certificate și la datele moleculare a PMG poate contribui la o cooperare mai strânsă a structurilor implicate în activități cu culturile biotehnologice, începând de la producători, agenți economici, experți în domeniu etc.

Tehnicile de testare a OMG sunt continuu perfecționate în scopul îmbunătățirii sensibilității, reproductibilității și duratei de analiză, însă aceste performanțe pot fi puternic diminuate de procedura de prelevare și preparare a probelor. De aceea, pornind de la potențialul impact socio-economic al PMG, este important ca determinările analitice ale prezenței/ absenței OMG în alimente și produse agricole să fie efectuate conform tehnologiilor și standardelor validate la nivel internațional.

2.1. Culturi agricole modificate genetic

Serviciul Internațional pentru Achiziționarea Aplicațiilor Agricole Biotehnologice (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISA-AA, www.isaaa.org.) publică informații privind culturile agricole modificate genetic și suprafețele cultivate cu acestea, începând din anii 1996, când s-au realizat primele comercializări ale PMG (în prezent mai des sunt denumite semănături biotehnologice). Conform Declarației Nr. 35 – 2006, a unsprezecea în seriile anuale, în anul 2006, considerat primul an al decadei a doua de comercializare (2006 - 2015), suprafața globală a semănăturilor biotehnologice a continuat să se extindă. În acest an 22 de țări (11 țări în curs de dezvoltare și 11 țări industriale) au plantat PMG pe 102 mln ha, cu 12 mln ha mai mult comparativ cu suprafața cultivată cu aceste culturi în 2005. Este de remarcat faptul că suprafețele cultivate cu PMG în primii zece ani de comercializare au crescut pe scară mondială mai mult de 60 ori, reprezentând cea mai rapidă dezvoltare a tehnologiilor agricole. În anul 2006, similar primilor 10 ani de comercializare a culturilor MG, SUA rămâne a fi lider incontestabil după suprafața ocupată cu semănături biotehnologice (54,6 mln ha, ceea ce reprezintă 53% din suprafața totală a culturilor biotehnologice), urmate de Argentina, Brazilia, Canada, India și China. Alte 16 țări care cultivă PMG sunt enumerate în ordine

descrescătoare a suprafețelor: Paraguay, Africa de Sud, Uruguay, Filipine, Australia, România, Mexic, Spania, Columbia, Franța, Iran, Honduras, Republica Cehă, Portugalia, Germania și Slovacia (fig. 2.1.).

22 DE ȚĂRI AU APROBAT CULTIVAREA PLANTELOR MODIFICATE GENETIC (total - 102 mln ha, 2006)

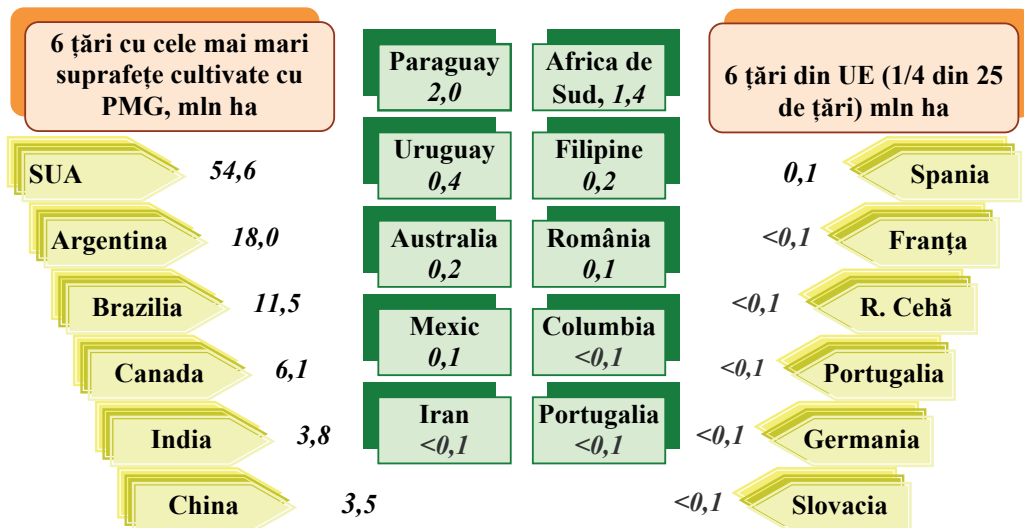


Figura 2.1. Țările în care este autorizată cultivarea plantelor modificate genetic (mln ha)

În prima decadă a comercializării PMG, raportul dintre suprafața mondială cultivată cu plante transgenice și cea cultivată de țările cu economia slab dezvoltată indică o creștere în fiecare an. Mai mult de o pătrime din suprafața mondială de semănături biotehnologice în anul 2006 este cultivată în țările în curs de dezvoltare, înregistrându-se o creștere cu 21% în comparație cu statele industriale, în care suprafețele s-au majorat doar cu 9% (fig. 2.2.).

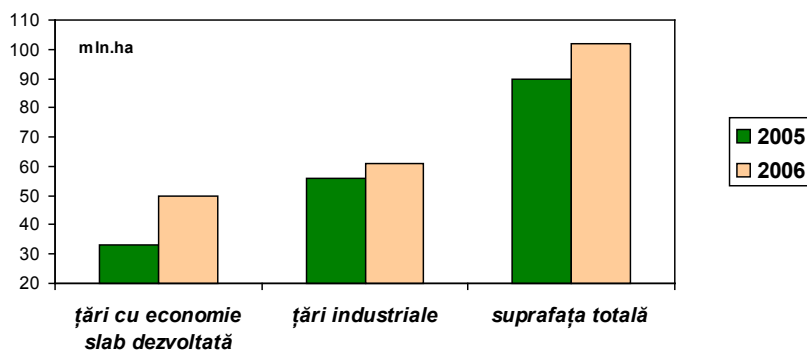


Figura 2.2. Suprafața cultivată cu PMG de țările cu economie slab dezvoltată și de țările industriale

Tendința continuă de cultivare și utilizare a PMG de către cele cinci țări în curs de dezvoltare de bază: China, India, Argentina, Brazilia și Africa de Sud, care reprezintă partea de sud a trei continente (Asia, America de Sud și Africa) influențează deciziile de viitor în ce privește acceptarea și dezvoltarea pe scară mondială a culturilor biotehnologice. Se consideră că acest ritm considerabil de extindere a PMG reprezintă doar unul din scopurile programului „Millennium Development Goal” de a micșora nivelul de sărăcie pe glob cu 50% până în anul 2015.

În prima decadă de cultivare a PMG, rezistența la erbicide a fost caracteristica principală, urmată de rezistența la insecte și de rezistența combinată la erbicide și la insecte. În anul 2006, culturile rezistente la erbicide (soia, porumbul, rapița și bumbacul) ocupau 68% din cele 102,0 mln ha cu plante transgenice, culturile Bt – 19%, iar varietățile cu caractere combinate – 13% (fig. 2.3. C). Acestea din urmă reprezintă așa-numitul **grup caracteristic**, care crește cel mai repede, fiind înregistrată în anii 2005–2006 o creștere cu 30%, față de 10% pentru rezistența la erbicide și 17% pentru rezistența la insecte. Primul produs combinat (2-3 gene) a fost porumbul, care a apărut prima dată în anul 2005 în SUA.

Soia transgenică continuă să predomine în grupul celor patru culturi MG, care ocupă cele mai mari suprafețe, fiind cultivată pe 58,6 mln ha (57% din suprafața mondială a PMG), urmată de porumb – 25,2 mln ha, bumbac – 13,4 mln ha și rapiță – 4,8 mln ha (fig. 2.3. A și B).

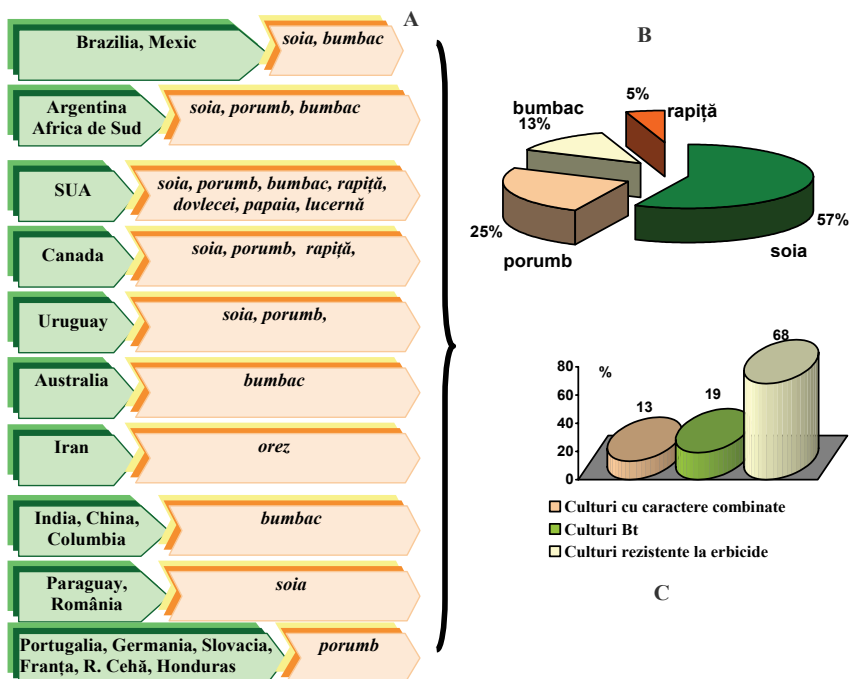


Figura 2.3. Principalele culturi biotehnologice, ISAAA, 2006

A – Principalele state care cultivă PMG

B, C – Ponderea culturilor MG

În anul 2006, pe piața din SUA a apărut o nouă cultură biotehnologică rezistentă la erbicidul Roundup Ready – lucerna. Este prima plantă multianuală modificată genetic, care din primul an de cultivare a ocupat 5% din toată suprafața ocupată cu lucernă. O altă cultură rezistentă la erbicide, apărută în anul 2006, este bumbacul RR Flex. De asemenea, tot în acest an, în China a fost recomandată pentru cultivare papaia rezistentă la virusuri, care a fost obținută în laboratoarele naționale ale acestei țări.

Se estimează că în viitorul apropiat majorarea autorizată a suprafețelor ocupate cu PMG cu caractere combinate în țările industriale, considerate „hectare caracteristice” de semănături biotehnologice, va continua proporțional cu introducerea de particularități noi, combinate astfel încât să fie obținută o valoare superioară în conformitate cu cerințele diferite ale consumatorilor și producătorilor, care solicită alimente și furaje mai nutritive și sănătoase la prețuri acceptabile.

De asemenea, se consideră că ritmul de expansiune a suprafețelor ocupate cu PMG, observat în prima decadă a comercializării, de la anul 1996 până la 2005, va continua și probabil va fi depășit în cea de a doua decadă – de la 2006 la 2015. În aceste condiții, respectarea unei administrări responsabile în conformitate cu legislația în domeniu trebuie să fie continuată, mai ales în țările de sud unde, conform estimărilor făcute de grupul de lucru ISAAA, expansiunea suprafețelor cultivate cu PMG se va realiza rapid.

În anul 2007, suprafața culturilor MG a continuat să crească (cu 12% sau 12,3 mln ha), constituind astfel 114,3 mln ha. Odată cu majorarea suprafețelor culturilor biotehnologice, a crescut și numărul de țări care au cultivat OMG. Astfel, în 2007 OMG au fost cultivate de 23 de țări, dintre care 12 state sunt în curs de dezvoltare. Deși începând cu data de 1 ianuarie 2007, România a renunțat la cultivarea comercială a soiei modificate genetic, a autorizat însă pentru cultivare porumbul transgenic, suprafața căruia în anul 2007 a constituit 0,05 mln ha. În 2007 să cultive OMG au început Chile și Polonia, ultima cultivând porumb Bt. Tot în această perioadă, a fost înregistrat un număr record de fermieri (peste 50 mln), care au acceptat cultivarea culturilor biotehnologice. Principalele culturi MG rămân a fi porumbul, soia și bumbacul (www.isaaa.org). Conform ISAAA, viitorul culturilor MG va fi în ascensiune, între 2006-2015 prognozându-se dublarea suprafețelor și a numărului de state care le vor cultiva.

2.2. Strategii de înregistrare și stocare a informației privind PMG în bazele de date

Există mai multe baze de date și site-uri on-line (ISAAA, OECD Biotechnology Product, AGBIOS, bch.biodiv.org etc.), care conțin informații privind plantele modificate genetic, cadrul de legi și documente legislative utilizate în reglementarea PMG, evenimente noi privind activitățile legate de PMG etc. Însă nu toate bazele de date oferă o informație deplină privind planta modificată genetic, caracteristica moleculară a constructului genetic, raportul de evaluare a securității introducerii în mediu a varietății MG fie în agricultură, alimentație sau ca furaj. Transparența infor-

mațională este necesară, deoarece nu toate varietățile modificate genetic sunt înregistrate la nivel internațional. Această situație creează probleme pentru autoritățile de inspectare în ceea ce privește siguranța că materialul modificat genetic neautorizat nu pătrunde pe piață, fie ca constituenți ai furajului și produselor alimentare, fie ca impurități în rețeaua alimentară. Prin urmare, trebuie să fim capabili să distingem organismele modificate genetic de cele nemodificate genetic și de a determina dacă materialul transgen este autorizat.

Testele utilizate în detecția, identificarea și cuantificarea materialului modificat genetic se selectează în funcție de informația existentă. O informație mai mult sau mai puțin detaliată privind alogenele inserate este oferită de site-ul USDA/APHIS (<http://www.aphis.usda.gov/>). De asemenea, o prezentare generală a OMG și a statutului de aprobare poate fi găsită în baza de date OECD Biotechnology Product (<http://www.ois.oecd.org/bioprod.nsf>) și Canadian AGBIOS (<http://www.agbios.com/dbase.php>). Cu toate acestea, nu pentru toate varietățile sunt specificate secvențele inserțiilor genetice, ceea ce este dificil de determinat. Unul din motivele lipsei de transparență se consideră a fi faptul că secvențele reprezintă proprietatea companiei care a produs varietatea modificată genetic și de aceea informația privind secvențele nu este disponibilă în mod obișnuit.

Analiza PMG se realizează prin identificarea secvenței de nucleotide inserate, a produșilor expresiei transgenei, a expresiei fenotipice a caracterului nou, a markerilor-screening etc.

În testarea OMG pot exista două situații (fig. 2.4.).

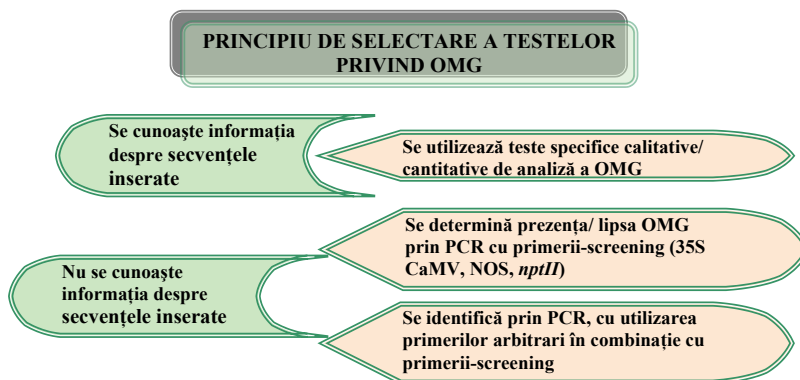


Figura 2.4. Principiu de selectare a testelor de analiză a materialului MG

Conform bazei de date AGBIOS, sunt în total 122 de varietăți de plante, obținute prin tehnici ale biotehnologiei contemporane, care sunt autorizate de către diferite țări și organizații internaționale, precum Organizația pentru Cooperare Economică și Dezvoltare (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD) (tab. 2.1.).

**Varietăți obținute prin tehnicile biotehnologiilor moderne
(conform bazei de date AGBIOS)**

Specia	Varietatea	Producătorul	Caracterul
<i>Agrostis stolonjera</i>	ASR 368	Scotts Seeds	Toleranță la glifosat
<i>Beta vulgaris</i>	GTSB77; H7-1; T120-7	Novartis Seeds; Monsanto	Toleranță la glifosat
<i>Brassica napus</i>	23-18-17, 23-198; 45A37, 46A40; 46A12, 46A16; GT200; GT73, RT73, HCN10, HCN92, MS1, RF1 =>PGS1, MS1, RF2 =>PGS2, MS8xRF3, NS738, NS1471, NS1473, OXY-235 PHY14, PHY35, PHY36; T45 (HCN28)	Pioneer Hi-Bred International Inc., Aventis CropScience; Bayer CropScience.	Conținut înalt de acid oleic și linoleic, toleranță la glifosat, androsterilitate, toleranță la bromoxinil
<i>Brassica rapa</i>	HCR-1; ZSR500/502	Bayer CropScience; Monsanto	Toleranță la glufosinatul de amoniu
<i>Carica papaya</i>	55-1/63-1	Cornell University	Rezistență la virus
<i>Chichorium inthybus</i>	RM3-3, RM3-4, RM3-6,	Bejo Zaden BV	Androsterilitate, rezistență PPT
<i>Cucumis melo</i>	A, B	Agritope Inc.	Supresia sintezei etilenei
<i>Cucurbito pepo</i>	CZW-3, ZW20	Asgrow (USA), Seminis Vegetable Inc., Upjohn (USA)	Rezistență la virusuri (CMV, ZYMV, WMV)
<i>Dianthus caryophyllus</i>	4, 11, 15, 16, 66; 959A, 988A, 1226A, 1351A, 1363A, 1400A	Florigene Pty Ltd.	Toleranță la sulfoniluree, culoare modificată, sinescență întârziată
<i>Glycine max L.</i>	A2704-12, A2704-21, 5547-35, A5547-127; G94-1, G94-19, G168, GTS 40-3-2; GU262; MON89788; OT96-15; W62, W98	Aventis CropScience, Bayer CropScience, DuPont Canada Agricultural products, Monsanto, Agriculture & Agri-Food Canada	Toleranță la glufosinatul de amoniu și glifosat, conținut înalt de acid oleic
<i>Gossypium hirsutum</i>	15985, 19-51A, 281-24-236, 3006-210-23; 31807/31808, BXN; COT102, COT102, DAS-21III23-5 x DAS-24236-5, DAS-21III23-5 x DAS-24236-5 x MON-III1445-2, MON-IIIIII531-6 x MON-III1445-2, MON-15985-7xMON-III1445-2; MON1445/1698 MON15985xMON88913; MON531/757/1076, MON88913	Compania Monsanto, DuPont Canada Agricultural Products, DOW AgroSciences LLC, Calgene Inc., Syngenta Seeds, Inc., Pioneer Hi-Bred International Inc., Bayer CropScience;	Rezistență la insecte, rezistență la insecte și toleranță la bromoxinil, toleranță la glufosinatul de amoniu, toleranță la glifosat
<i>Linum usitatissimum</i>	FP967	University of Saskatchewan, Crop Dev. Centre	Metabolism modificat
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1345-4, 351 N, 5345, 8338, B, Da, F, FLAVR SAVR	DNA Plant Technology Corporation, Agritope Inc., Monsanto, Zeneca Seeds, Calgene Inc.	Coacere întârziată, rezistență la lepidoptere, caracteristici agrotehnice îmbunătățite

<i>Medicago sativa</i>	J101, J163	Monsanto and Forage Genetics International	Toleranță la glifosat
<i>Nicotiana tabacum</i>	C/F/93/08-02; Vector 21-41	Société Nationale d'Exploitation des Tabacs et Allumettes; Vector Tobacco Inc.	Conținut redus de nicotină
<i>Oryza sativa</i>	CL121, CL141, CFX51; IMINTA-1, IMINTA-4; LLRICE06, LLRICE62; LLRICE601; PWC16	BASF Inc., Aventis CropScience; Bayer CropScience	Toleranță la imidazolină, toleranță la glufosinatul de amoniu
<i>Solanum tuberosum L.</i>	ATBT04-6, ATBT04-27, ATBT04-30, ATBT04-31, SPBT02-5, SPBT02-7; BT6, BT10, BT12, BT16, BT17, BT18	Monsanto	Rezistență la gândacul de Colorado
<i>Triticum aestivum</i>	MON71800	Monsanto	Toleranță la glifosat
<i>Zea mays</i>	176; 676, 678, 680; ACS-ZMIIIIII3-2 x MON-IIIIII81III-6, B16 (DLL25); BT11 X4334CBR, X4734CBR), CBH-351, DAS-06275-8; DAS-59122-7; DAS-59122-7 x NK603, DAS-IIII15III7-1 x MON-IIIIII6III3-6, DBT418; GA21; LY038; MIR604; MON80100; MON802; MON809; MON810; MON832; MS6; NK603; T14, T25; TC1507	Syngenta Seeds, Inc., Pioneer Hi-Bred, International Inc., Bayer CropScience, Dekalb Genetics Corporation, DOW AgroSciences LLC, Monsanto	Rezistență la insecte, androsterilitate și toleranță la glufosinatul de amoniu, modificarea conținutului în aminoacizi

Prin intermediul acestei bănci de date se pot obține informații referitoare la varietatea modificată genetic, compania producătoare, țara și anul când a fost aprobată, domeniul de utilizare, securitatea introducerii acesteia în mediu, caracteristica modificării genetice, însă fără a prezenta secvența nucleotidică a alogenelor pentru a utiliza teste specifice de identificare a transgenelor (fig. 2.5.).

Dosarul de notificare a unei varietăți modificate genetic, înaintat spre aprobare de către instituțiile abilitate, privind eliberarea deliberată în mediu a OMG, trebuie să conțină toată informația necesară, inclusiv tehnicile de detecție și identificare a plantelor MG. Suplimentar, se cer informații privind modificarea genetică în scopul elaborării unor registre, care pot fi utilizate în detecția și identificarea produselor OMG pentru a facilita controlul acestora. Astfel, informația despre OMG aprobate devine accesibilă din dosarele de notificare și este inclusă ulterior într-o bază de date, unde se stochează datele despre cele mai relevante secvențe genetice a PMG. Comisia Europeană în cadrul Centrului de Cercetare Comun (European Commission's Joint Research Center's – JRC) și Institutul Federal German pentru sănătate și Protecția Consumatorilor (BGVV) dispun de această bază de date.

<i>Medicago sativa</i> Event	Company	Description
J101, J163	Monsanto Company and Forage Genetics International	Glyphosate herbicide tolerant alfalfa (lucerne) produced by inserting a gene encoding the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from the CP4 strain of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

MON-IIIH11111-8, MON-IIIH163-7 (J101, J163)

Host Organism / Variety *Medicago sativa* (Alfalfa)

Trait Glyphosate herbicide tolerance.

Trait Introduction Method *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation.

Proposed Use Production of forage (herbage) for livestock feed. This material will not be grown outside the normal production areas for alfalfa.

Company Information Monsanto and Forage Genetics International



Summary of Introduced Genetic Elements

Code	Name	Type	Promoter, other	Terminator	Copies	Form
CP4 epsps	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4)	HT	enhanced Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S; petunia HSP 70 5' untranslated leader sequence chloroplast transit peptide from <i>A. thaliana</i> EPSPS gene (CTP2)	<i>P. sativum</i> (pea) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit E9 gene	1 functional	Native

Characteristics of *Medicago sativa* (Alfalfa)

Donor Organism Characteristics

Latin Name	Gene	Pathogenicity
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	CP4 EPSPS	<i>A. tumefaciens</i> is a common soil bacterium that is responsible for causing crown gall disease in susceptible plants. There have been no reports of adverse effects on humans or animals.

Center of Origin	Reproduction	Toxins	Allergenicity
Asia Minor, Transcaucasia, Turkmenistan, and Iran	Outcrossing, insect-pollinated (bees). Hybridizes with members of the <i>M. sativa</i> complex; limited hybridization with <i>M. glomerata</i> . Seed dormancy variable, depending on amount of hard seed.	Saponins, such as medicagenic acid, which cause bloat in ruminants; coumestrol and coumestan, phytoestrogens, which can cause reproductive problems in livestock.	No known endogenous allergens

Characteristics of the Modification

Environmental Safety Considerations

Summary of Regulatory Approvals

Food and/or Feed Safety Considerations

Country	Environment	Food and/or Feed	Food	Feed	Marketing
Australia			2006		
Canada	2005		2005	2005	
Japan	2006		2005	2006	
Mexico		2005			
Philippines			2006	2006	
United States		2004			

Figura 2.5. Un exemplu de prezentare schematică a informației privind varietatea modificată genetic în baza de date AGBIOS

<http://www.agbios.com/dbase.php>

Conform informației din baza de date COMPASS (<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>), optzeci și opt de varietăți MG sunt aprobate sau au fost înaintate dosare spre aprobare de către UE pentru utilizare în alimentație și furaj. De aseme-

nea, este stocată și informația privind produsele alimentare și furajele care conțin material modificat genetic aprobat de UE. Spre deosebire de baza de date AGBIOS, această bază include secvențele-primeri specifice, care permite identificarea varietății modificate genetic aprobate (fig. 2.6.).

MAIZE	Event	Company	Trait	Scope	
Valid authorisation,	NON 863	Monsanto	Insect resistance		
ID-Number: MON-00863-5; MON-00863-5 x MON-00810-6					
Application	Presented in, Date, Legislation	Germany	2002, The application was submitted according to directive 2001/18 (Import and feed), and according to the Novel Food regulation (258/97).		
	Scope of notification	Import in the EU; Grain as feed, food;	Summary of application		
Assessment	National authority	First examination by the responsible authority in Germany. Assessment Report Scientific report of the EFSA for the safety assessment on April 2nd, 2004.			
	EFSA opinion	Conclusion: MON863 is safe as conventional maize. Brief description ; EFSA: Scientific Opinion (258/97) ; EFSA: Scientific Opinion (2001/18) ,			
Decision	Import and feed	Import and use as feed (after 2001/18) were approved by decision of the EU commission on August 8th, 2005. Commission Decision			
	Status	The commission has presented a proposal for a decision to approve food from MON863. Proposal for a decision			
	Food	Use as food were approved by decision of the EU commission on January 13th, 2006.			
	Conditions or restrictions	Labelling and traceability: According to legal regulations. Post-market monitoring: Not appropriate.			
Authorisation	Expiration date	Method of detection; the full method reports will be made available after authorisation process has been completed. Community Reference Laboratory for GM Food and Feed 07/08/2015 for feed; 12/01/2016 for food			
Status of dossiers, CRL validation processes, Detection methods validated in support to notifications submitted under Directive 2001/18/EC; Click here to access to the detection methods submitted under Art 47 of Regulation EC 1829/2003					
EUROPEAN COMMISSION , DIRECTORATE GENERAL JRC, COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR GM FOOD AND FEED					
Event	Unique identifier	Applicant	Status/Progress	Reports	Validated Method
Mon863 Maize	MON-00863-5	Monsanto	Validation completed	Validation report Published on: 16/02/2005	Validated method Published on: 16/02/2005
Event-specific method for the quantitation of maize line MON 863 using real-time PCR Method development: Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (only for the PCR part) Method validation: Joint Research Centre – European Commission Biotechnology & GMOs Unit 4.3. Primers and Probes					
Name	Oligonucleotide DNA Sequence (5' to 3')				
GMO target sequence					
MON863 F/MON863 R MON863 probe	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC/TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT 6-FAM- TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA- TAMRA				
Reference gene target sequence					
Adh1 F/Adh1 R Adh1 probe	CCAGCCTCATGGCCAAAG/CCTTCTTGCGGCTTATCTG 6-FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCCTGTTCCT-TAMRA				

Figura 2.6. Un exemplu de prezentare a informației privind varietatea modificată genetic în baza de date COMPASS

<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>

O altă relevantă bază de date privind OMG este **portalul BCH** (The Biosafety Clearing-House), care reprezintă un mecanism al activității Protocolului de la Cartagena privind Biosecuritatea. Pe site-ul oficial al BCH ([www.http://bch.cbd.int/](http://bch.cbd.int/)), accesibil în șase limbi, sunt reflectate aspectele științifice, legale și informaționale legate de securitatea biologică și OMG (fig. 2.7). BCH este o parte componentă a UNEP (United Nations Environment Programme, <http://www.unep.org/>), care are menirea de a promova la nivel global relațiile de parteneriat și de informare internaționale în diferite domenii ecologice și de mediu, inclusiv cea a biosecurității (<http://www.unep.org/biosafety/>). Pe pagina BCH este prezentă informația despre registrul OMG, registrul transgenelor și elementelor transgenice (promotori, terminatori, gene marker), incluse în OMG, sistemul automatizat de căutare a liniilor de OMG și codurile unice de identificare a fiecărei varietăți de OMG în parte (fig. 2.8). De asemenea, pe site este prezentată lista țărilor care sunt membri ai BCH și toată informația adiacentă, inclusiv Republica Moldova.

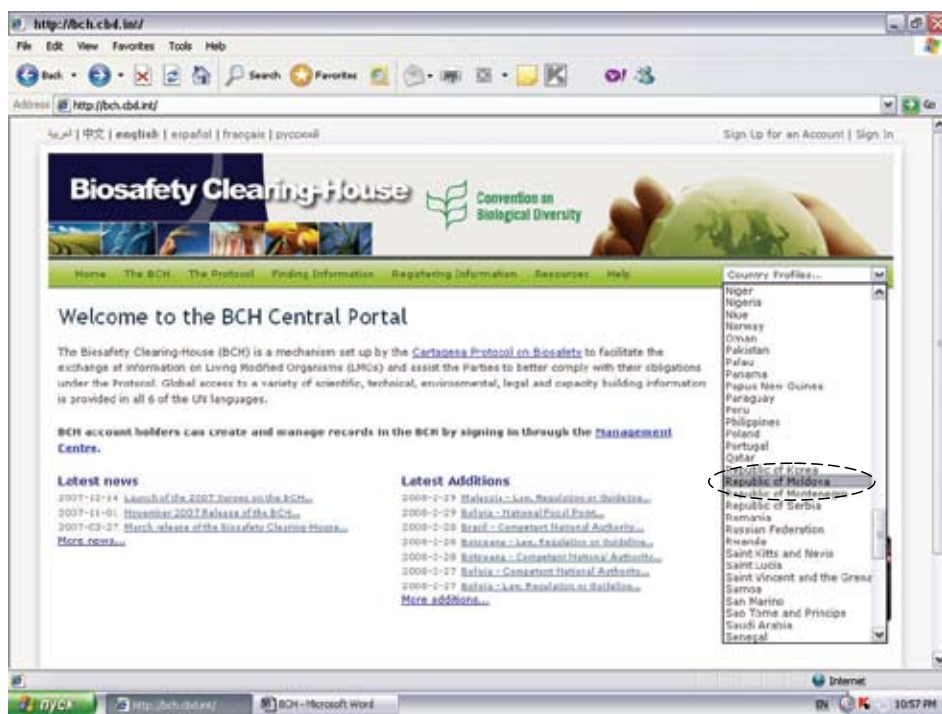


Figura 2.7. Pagina principală WEB a portalului BCH [www.http://bch.cbd.int/](http://bch.cbd.int/)

Cu scopul implementării prevederilor Protocolului de la Cartagena, Programul Națiunilor Unite pentru Mediu (UNEP) și Fondul Global de Mediu (GEF) acordă asistență tehnică Guvernului Republicii Moldova în vederea consolidării eforturilor într-o crearea unui sistem național de securitate biologică. Ca parte componentă a Proiectului UNEP-GEF „Dezvoltarea Cadrului Național de Biosecuritate în Republica Moldova”, care face parte din Proiectul Global pentru dezvoltarea cadrelor naționale de biosecuritate în mai mult de 100 de țări și cu menirea de a contribui la implementarea Protocolului de la Cartagena la nivel național, a fost elaborat și implementat proiect-

tuL UNEP-GEF „Dezvoltarea Capacităților pentru Participarea Efectivă la Mecanismul de Schimb de Informații pentru Biosecuritate” (2005-2006). Acest proiect a avut scopul de a implementa Mecanismul Schimbului de Informație pentru Biosecuritate (MSIB), stabilit prin Protocolul de la Cartagena, în Republica Moldova (fig. 2.9).



General Information
Unique Identification - MON-80200-7

Record information and status

Record ID	14786
Status	 Published
Date of creation	2006-06-05 19:39 GMT (kirsty.mclean@biodiv.org)
Date of last update	2006-06-21 18:59 GMT (kirsty.mclean@biodiv.org)
Owner	kirsty.mclean@biodiv.org

Developer / Company / Applicant

Contacts



Monsanto

Url: [Monsanto Homepage](#)

(Record #14925)

LMO Identity

Name and identity of the living modified organism YieldGard™ Maize

Unique identification of the living modified organism MON-80200-7

Recipient organism or parental organisms



Zea mays - Maize, Corn

(Record #246)

LMO information

Transformation event MON802

- **Techniques used for modification** Biolistic methods 

Gene inserts



cry1A(b) - **Lepidoptera resistance** 

Donor organism: Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki

(Record #14985)



cp4 epsps - **Glyphosate tolerance** 

Donor organism: Agrobacterium tumefaciens strain CP4

(Record #14979)



gox - **Glyphosate tolerance** 

Donor organism: Ochrobactrum anthropi

(Record #14998)



nptII - **Kanamycin resistance** 

Donor organism: Escherichia coli

(Record #15001)

Figura 2.8. Un exemplu de prezentare a informației privind varietatea modificată genetic în baza de date BCH



Figura 2.7. Niveluri de reglementare a politicii biosecurității

MSIB a fost stabilit ca un mecanism internațional pentru informarea tuturor Părților Protocolului despre utilizarea casnică și plasarea pe piață a OMG-rilor, despre mișcarea transfrontalieră pentru uzul direct ca hrană sau furaj, sau pentru prelucrare; pentru facilitarea schimbului științific, tehnic, ecologic și legal al informației și experienței cu privire la OMG și pentru promovarea și facilitarea conștientizării, educației și participării publicului cu privire la transfer, păstrare și utilizare a OMG-rilor.

Întru susținerea acestor eforturi, a fost elaborat Portalul de biosecuritate în Republica Moldova (www.biosafety.md). Pe această pagină, se poate accesa toată informația privind promovarea politicii de biosecuritate în Republica Moldova, problema OMG și testarea acestora, registrul organismelor transgenice etc. La proiectarea și crearea portalului național al biosecurității în Republica Moldova s-a ținut cont de un șir de factori, printre care:

- recomandările portalului www.bch.biodiv.org;
- accesibilitatea și performanța constrângerilor software alese;
- portabilitatea pe diferite sisteme de operare sau navigatoare Internet etc.

În acest sens, strategia care a fost implementată pentru procedurile de administrare a structurii și conținutului portalului constă în utilizarea la maximum a paginilor interactive prin intermediul cărora se asigură crearea dinamică a structurii locației și administrarea facilă a conținutului. Informația din cadrul portalului național de biosecuritate este structurată pe categorii. Categoriile sunt prezentate prin intermediul unui meniu arborescent aflat în partea stângă a portalului. Principalele categorii sunt:

- Biosecuritatea – conține informații generale privind Biosecuritatea. Prin această categorie, utilizatorul poate obține informații despre Convenția privind Biosecuritatea, Cadrul național, Comisia națională și Legea privind Biosecuritatea.

- Managementul informațional – conține informații despre Portalul central, Rețeaua Națională BCH, Registrul experți, precum și informații despre instruirea on-line. De asemenea, aici se pot obține informațiile introduse de principalele instituții-partenere.

- Cadrul instituțional – conține informații despre autoritatea națională, instituțiile-partenere, comisia națională, punctul focal, oficiul Biosecuritate, precum și informații ce țin de parteneriatul internațional.

- Cadrul legislativ – conține informații ce țin de aspectele legislative: politici și strategii, legislația națională, acte normative, tratate și legislație internaționale.

- Cadrul normativ – conține informații referitoare la decizii și rapoarte, proceduri operaționale, Registrul Național de OMG, notificări.

- Informații utile – conține link-uri către Capacități instituționale, Testare OMG, Cercetări biotehnologice, Publicații, Resurse publice, Evenimente, Referințe utile și Galerie Foto.

- Baza de date OMG – pentru gestionarea Organismelor Modificate Genetic, în Republica Moldova a fost elaborat un modul separat. Modulul dat are ca scop asigurarea posibilităților de căutare a OMG după anumite categorii, precum și afișarea tuturor OMG înregistrate în Republica Moldova.

Informația din cadrul portalului este prezentată în trei limbi: română, engleză și rusă. De asemenea, portalul și registrul OMG oferă informații într-o manieră organizată și, totodată, sunt accesibile fără nici o restricție, fiind oferite gratuit publicului larg.

2.3. Laboratoare acreditate pentru testarea OMG

În ultimii ani au fost elaborate și aprobate la nivel internațional și local un număr mare de legi și directive privind reglementarea activităților de obținere, transport, comercializare și analiză a OMG. Atât marile companii biotehnologice, autoritățile abilitate în monitorizarea și controlul produselor biotehnologice, cât și consumatorii au avut și continuă să aibă unele divergențe legate de aspectul analitic al acestor reglementări. Din aceste considerente, în decembrie 2002 la Bruxelles a fost inaugurată Rețeaua Europeană a Laboratoarelor de Analiză a OMG (The European Network of GMO Laboratories – ENGL), care reprezintă o platformă unică de activitate a experților din UE în scopul dezvoltării, armonizării și standardizării mijloacelor și metodelor pentru prelevarea probelor, detecția, identificarea și cuantificarea OMG și a produselor derivate din acestea într-o gamă largă de matrici, incluzând semințe, alimente, furaj și probe din mediu. Această rețea de laboratoare la momentul actual include peste 100 laboratoare, care reprezintă cele 27 de state membre UE, inclusiv Norvegia. De asemenea, la întrunirile acestei organizații participă și alți membri din țările candidate la UE în calitate de observatori independenți. Aceștia sunt delegați de autoritățile naționale abilitate în domeniul activităților cu OMG. Site-ul oficial al ENGL <http://engl.jrc.it/designated.htm> oferă informații privind laboratoarele care fac parte din această rețea.

Responsabilitatea pentru organizarea și managementul acestei rețele de laboratoare revine diviziunii (Unității) de biotehnologie și OMG (**Biotechnology and GMOs**) a JRC (Joint Research Centre) în cadrul Institutului pentru Sănătate și Protecția Consumatorului (**Institute for Health and Consumer Protection**). Scopul de bază în activitatea comisiei constă, pe de o parte, în dezvoltarea unei comunități biotehnologice europene competitive bazată pe un cadru legislativ sever și pe încurajarea transparenței și a comunicării cu publicul, pe de altă parte.

Principalele activități ale acestui grup de laboratoare autorizate în analiza OMG sunt:

- *elaborarea metodelor; optimizarea și ulterior validarea internațională a acestora;*
- *propunerea unor strategii pentru prelevarea probelor într-o gamă largă de matrici, incluzând semințe, alimente, furaj și probe din mediu pentru analiza celor mai mici cantități de material MG;*
- *elaborarea materialelor de referință adecvate utilizate în calitate de control în testele analitice. Schimb de informații privind datele experimentale cu structurile implicate în activitățile de control.*

Din 2004, Centrul de Cercetare Comun (JRC) în colaborare cu ENGL asigură suportul informațional și material pentru Laboratorul de Referință Comunitar pentru

Alimente și Furaj MG ([Community Reference Laboratory for GM Food and Feed](#)) în activitățile ce țin de validarea metodelor analitice de cuantificare a OMG care sunt aprobate spre comercializare.

Există un număr mare de laboratoare, care oferă servicii de analiză a OMG, cele mai recunoscute fiind: Genetic ID (SUA), Eurofins/ GeneScan (Franța), SGS/ Inst. Fresenius și CONGEN (Germania) etc.

Conform tehnicilor de testare, aprobate la nivel internațional, testarea OMG include trei etape de analiză (fig. 2.10.):

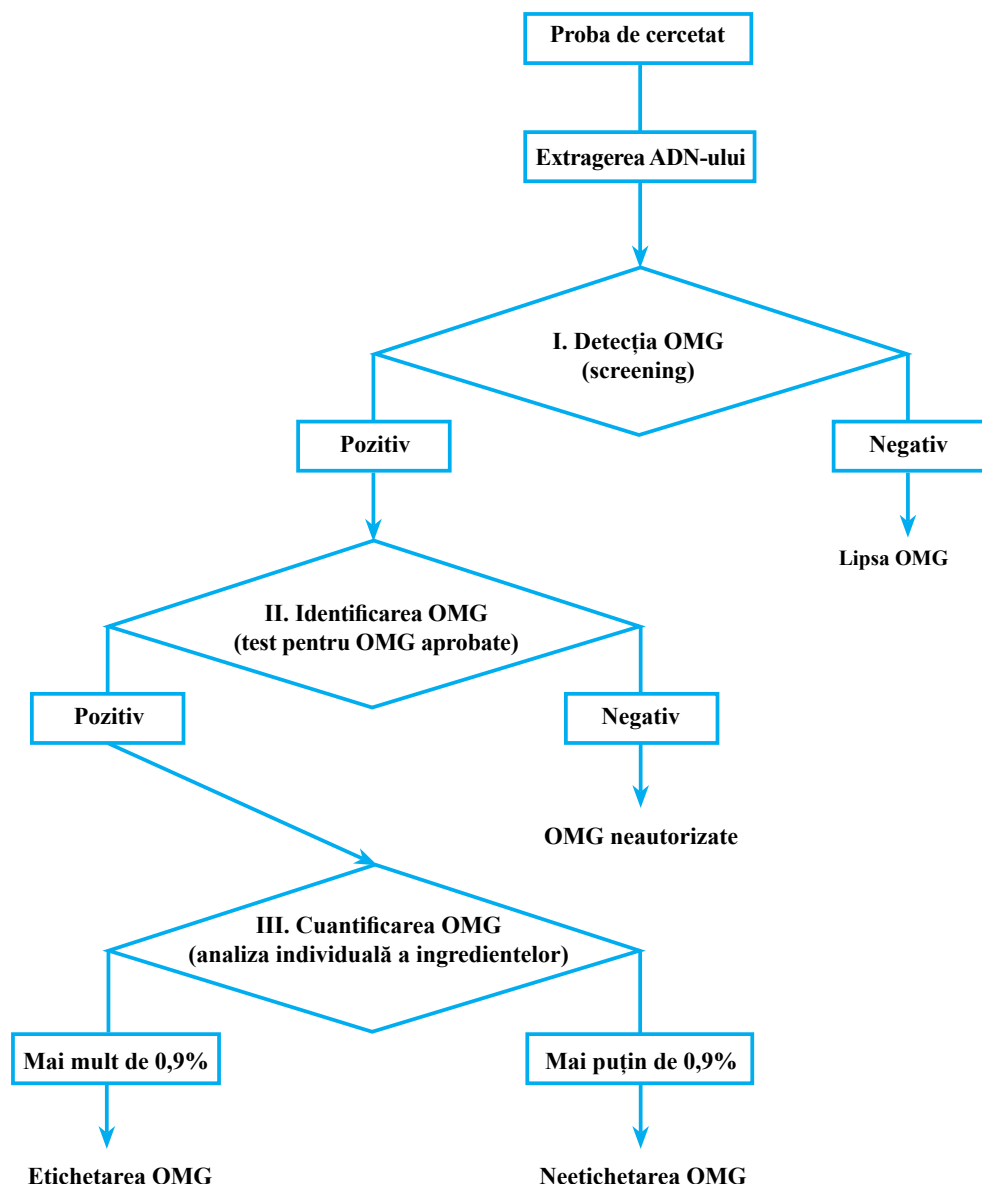


Figura 2.10. Prezentare generală a procedurii standard pentru detecția, identificarea și cuantificarea OMG

Deteția – constatarea prezenței/ lipsei elementelor transgenice (secvența codificatoare sau secvențele de reglare – promotor sau/ și terminator) în genomul plantei. Pentru deția PMG se recurge la un screening general bazat pe analizele PCR, utilizându-se primeri pentru secvențe ADN frecvent utilizate în transformare. Aceste secvențe sunt promotorul 35S (*CaMV*), secvența terminator *nos* (*Agrobacterium tumefaciens*) și gena-marker NPTII (rezistență la kanamicină). Deția PMG pe baza promotorului 35S poate fi utilizată numai la plantele care nu sunt infectate natural cu virusul mozaicului conopidei (*cauliflower mosaic virus*) în scopul excluderii rezultatelor fals-pozitive.

Identificarea – se identifică transgenele / elementele genetice modificate genetic prin PCR cu utilizarea primerilor specifici (de ex., transgene *cry*, *epsps*, *bar/pat*).

Cuantificarea – se determină conținutul elementelor modificate genetic în probă. În acest caz se apelează la metoda Real-time PCR (ADN) sau ELISA (proteine).

Conform Reglementării (EC) Nr. 1830/2003, produsul conține OMG sau produse rezultate din astfel de organisme atunci când conținutul materialului genetic modificat este mai mare de 0,9%, iar pentru semințe – 0,3-0,7%, din masa totală a produsului (http://projects_2004.jrc.cec.eu.int). De exemplu, pentru lotul de semințe de rapiță și bumbac, limita admisibilă a cantității OMG este 0,3%, pentru tomate, sfeclă, cicoare, porumb și cartof – 0,5%, soia – 0,7% și 0% în cazul culturilor neautorizate.

Eficiența și calitatea analizelor de deție, identificare și cuantificare a materialului modificat genetic, precum și a evaluării complexe a transgenelor sub aspectul riscurilor pentru sănătatea umană și mediu de către experți se realizează în baza informației cunoscute. De aceea se consideră că în cadrul unui laborator de testare a OMG trebuie să existe o bază de date, necesare pentru efectuarea testării OMG și evaluării riscului determinat de acestea. O astfel de bază de date poate include următoarele compartimente:

LISTA ORGANISMELOR MODIFICATE GENETIC

- OMG aprobate de către UE și la nivel internațional (SUA, Canada, Argentina etc.).
- Țările, suprafețele cultivate cu PMG, producțiile înregistrate (tone, %) pe ani.
- Companiile care desfășoară activități cu OMG sau a produselor obținute din aceste organisme.

INFORMAȚIA PRIVIND ORGANISMELE NON-TRANSGENICE (RECEPTOR)

- Denumirea completă (latină, sinonime); clasificarea taxonomică.
- Modul de reproducere (durata unei generații; compatibilitatea sexuală cu alte specii de plante sălbatice).
- Supraviețuirea (abilitatea de a forma structuri pentru supraviețuire sau latență).
- Diseminarea (căile și gradul de diseminare) și distribuția geografică.
- Interacțiuni semnificative potențiale ale organismului cu alte organisme din ecosistem; informații despre efectele toxice asupra oamenilor, animalelor și altor organisme.

INFORMAȚII PRIVIND DETECȚIA ȘI IDENTIFICAREA OMG

- Documentele internaționale care reglementează testarea OMG.
- Laboratoarele de testare a OMG și companiile care produc și comercializează kit-uri de detecție/analize OMG.
- Tehnici de detecție și identificare a PMG (PCR, analiza Southern/ Western, ELISA, autoradiografie, teste fenotipice).
- Markerii utilizați pentru screeningul OMG în mediu.
- Utilaj, echipament analitic, care asigură calitatea efectuării testelor.

INFORMAȚII PRIVIND ORGANISMELE MODIFICATE GENETIC

- Caracterile noi („de interes”), obținute prin tehnicile ADN-ului recombinant, inclusiv genele care determină aceste caractere. Descrierea caracterelor care au fost induse sau modificate (beneficii obținute, avantaje).
- Modificarea genetică și secvențele inserate (metodele de transformare; mărimea, structura și localizarea insertului, numărul de copii și nivelul de expresie a insertului).
- Deosebirile existente între PMG și planta nemodificată (fenotip, reproducere, diseminare, supraviețuire).
- Informații despre posibilele efecte asupra mediului în urma introducerii PMG (transferul potențial de material genetic de la PMG la alte organisme; efecte toxice/ dăunătoare asupra sănătății umane și mediului).
- Interacțiuni semnificative potențiale între PMG și organismele-țintă și non-țintă.

EVALUAREA RISCURILOR

- Informații privind evaluarea siguranței produșilor rezultați din modificarea genetică pentru sănătatea umană (proteinele toxice cunoscute, teste standard de evaluare a digestibilității, a potențialului alergen al proteinei modificate, stabilitate la digestie pe modele de digestie gastrointestinală la mamifere; concentrația proteinei în alimente).
- Verificarea echivalenței în substanțe a PMG cu planta nemodificată (proteine, glucide etc.).
- Impactul potențial asupra mediului (evaluarea impactului asupra mediului – pozitiv/ negativ; mare/ redus).
- Modificarea competitivității (persistență, invazivitate), probabilitatea producerii fluxului genic și interacțiunile cu organismele vizate/ nevizate.

2.4. Norme și legi ce reglementează testarea OMG

Politica și legislația internațională privind organismele modificate genetic devin tot mai restrictive și mai transparente. Identificarea, detecția și cuantificarea OMG trebuie să se realizeze conform unor standarde autorizate.

Comitetul European de Standardizare (CEN, www.cenorm.be) prin CEN/TC 275, Food analysis – Horizontal methods, în colaborare cu Organizația Internațională de Standardizare (ISO, www.iso.org), ISO/TC 34, Food products, a elaborat standardul **ISO 24276:2006/ EN ISO 24276:2006 Foodstuffs. Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products. General requirements and definitions**, care a fost publicat de ISO și CEN în februarie 2006. Standardul prezintă metode de analiză pentru detectarea organismelor modificate genetic și a produselor derivate.

Scopul unor astfel de analize este de a identifica și cuantifica elementele genetice sau proteinele organismelor modificate genetic. Acest standard este destinat matricelor pentru produsele alimentare, dar poate fi aplicat și altor tipuri de matrici (de exemplu, pentru semințe și plante din mediul înconjurător). Standardul conține definiții și cerințe generale pentru înființarea laboratoarelor, descrierea și validarea metodelor.

Detectarea originii transgenice a ingredientelor se realizează prin parcurgerea unor etape succesive (sau simultane): prelevarea probelor reprezentative pentru matrice, extracția proteinelor sau acizilor nucleici din eșantionul analizat, detectarea și/sau determinarea calitativă/ cantitativă a acizilor nucleici sau a proteinelor specifice obținute din organismele modificate genetic aflate în studiu. Aceste etape sunt prezentate în următoarele standarde:

- **EN ISO 21569:2005, Foodstuffs** – *Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods;*
- **EN ISO 21570:2005, Foodstuffs** – *Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods;*
- **EN ISO 21571:2005, Foodstuffs** – *Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction;*
- **EN ISO 21572:2004, Foodstuffs** – *Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods.*

Scopul standardului **EN ISO 24276:2006** este de a arăta cum se aplică aceste standarde și de a explica relațiile dintre ele în procesul de analiză a materialului modificat genetic din produsele alimentare.

2.5. Metode validate aprobate pentru testarea OMG

Necesitatea de a monitoriza și verifica prezența și cantitatea materialului modificat genetic în culturile agricole MG și în produsele derivate a generat o cerere crescândă de metode analitice de detecție, identificare și cuantificare a secvenței de nucleotide inserate și a produșilor de expresie a transgenei, deoarece anume aceste componente sunt considerate ca fiind contituenți de bază.

Unele laboratoare au elaborat metode de analiză bazate pe detecția ADN-ului utilizând tehnica de amplificare PCR (Polymerase Chain Reaction) ori pe proteine, apelând la analizele imunoenzimatic ELISA (enzyme linked immunosorbent assays), care se deosebesc prin unele avantaje și dezavantaje în funcție de scopul cercetării și de posibilitățile laboratorului (tab. 2.2. și fig. 2.11.).

Tabelul 2.2.

Metodele utilizate cel mai des în testarea materialului modificat genetic

Metoda	Testul	Costul/probă	Durata	Caracteristici	Rezultate
Biotest (rezistența la erbicide)	Toleranță	\$10-12	5-7 zile	Necesită abilități moderate de lucru în laborator	Constatarea rezistenței la erbicide
ELISA	Proteine	\$75-100	2-4 zile	Necesită abilități moderate de lucru în laborator și echipament	Determinarea cantitativă a proteinelor
Lateral Flow Strip	Proteine	\$8-10	10-20 min.	Training redus și nu necesită echipament special	Determinarea prezenței proteinelor
PCR	ADN	\$200-600	5-14 zile	Metodă dificilă, necesită training și echipament special	Teste calitative/ semi-cantitative ale prezenței OMG
Southern Blot	ADN	\$100-300	4-6 zile	Metodă dificilă, necesită training și echipament special	Identificarea secvențelor specifice de ADN

Alte laboratoare s-au orientat spre dezvoltarea unor tehnologii analitice care pot oferi soluții alternative la metodele de testare a OMG existente. Acestea includ masspectrometria, cromatografia, tehnologia ADN - chip, *Electro spray ionisation* (ESI), spectroscopia infraroșie apropiată etc. (fig. 2.11.).

Metoda cromatografică permite identificarea OMG la nivelul metaboliților – dizaharide (trehaloza, maltoza și izomaltoza), alcoolii (maltitolul) sau al diferențelor depistate în profilul chimic, constatate la analiza uleiului provenit din rapița modificată genetic. Combinarea metodelor de cromatografie lichidă și masspectrometrie au permis evidențierea diferențelor din cadrul paternelor de trigliceride. Rapiditatea, sensibilitatea înaltă și analiza cantitativă a diferitor metaboliți, implicați în metabolismul carbonului (glucidele di- și trimere), azotului (aminele, aminoacizi, acizi organici), oferă posibilitatea identificării simultane a diferitor metaboliți într-o singură probă, fără a impune o separare ulterioară a acestora.

Spectroscopia infraroșie apropiată (SIA) are o gamă largă de aplicare în agricultură, industria farmaceutică, controlul produselor alimentare etc. și reprezintă o metodă analitică rapidă, care permite măsurarea compoziției chimice a materialelor. Legăturile covalente dintre atomii de C, N, H, O și P absorb energia în regiunea infraroșie, în care posedă frecvențe oscilatorii specifice, iar combinațiile formate sunt detectabile la lungimea de undă de 400 - 2500 nm, adică în regiunea infraroșie. Unele transgene pot modifica structura fibrelor în plante, diferențe care nu pot fi evidențiate după conținutul de proteine sau ulei, însă se evidențiază cu ușurință prin SIA.

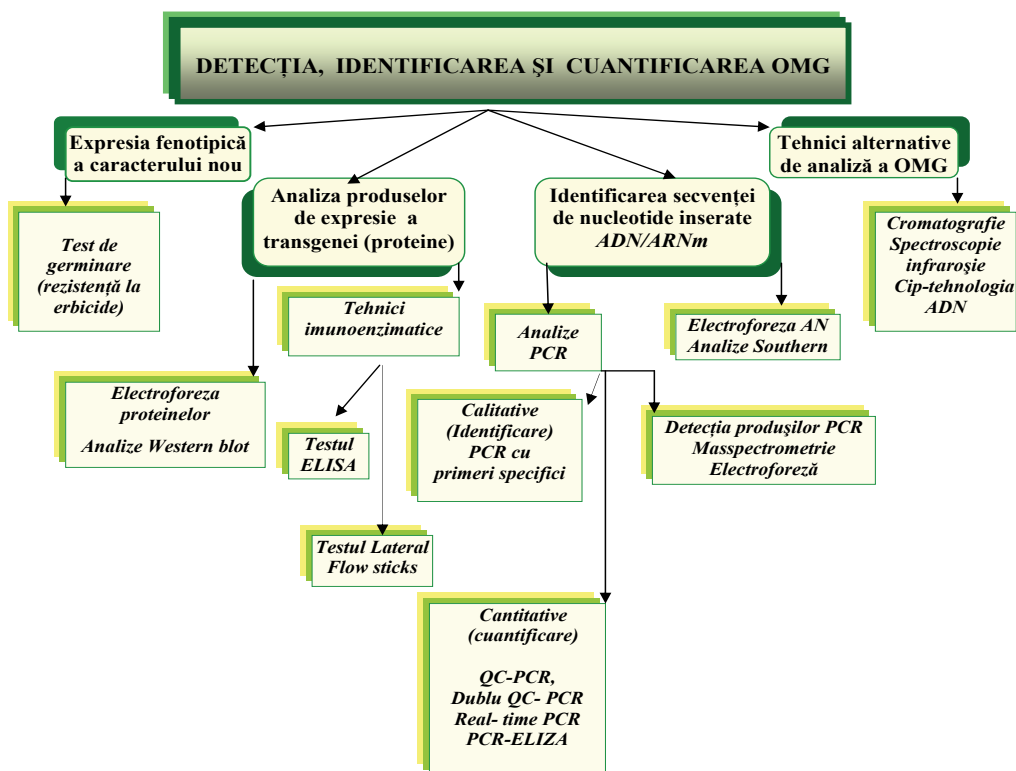


Figura 2.11. Tehnologii analitice utilizate în detecția, identificarea și cuantificarea OMG

În selectarea tehnicilor de lucru se recomandă ca laboratoarele să utilizeze metode validate în acord cu criteriile internaționale recunoscute (de exemplu, ISO 5735-1/ 1994, ISO 5725), iar analizele (unde este posibil), să includă material de referință certificat, întrucât unele dintre aceste metode (de exemplu, testul expresiei fenotipice a transgenei, metode calitative, metode imunoenzimatice) sunt mai adecvate pentru analiza semințelor și probelor din cereale, decât pentru analiza produselor procesate. De asemenea, se știe că metodele bazate pe ADN sau proteine, precum și testul fenotipic dau uneori rezultate diferite.

Elaborarea și utilizarea metodelor analitice de testare a plantelor MG este esențială în implementarea regulilor de etichetare. Strategiile adecvate de prelevare și preparare a probelor în combinație cu metodele de testare trebuie să fie supuse unor criterii de validare internațională și evaluare a performanței. Întrucât materialul de referință este o parte indispensabilă a oricărui protocol analitic, criteriile de producere a unor astfel de standarde de referință trebuie, de asemenea, să fie validate. Pentru a crea un nivel de încredere înalt al procedurii de testare în conformitate cu cerințele înaintate a fost elaborată procedura de validare și recunoaștere oficială la nivel internațional a tehnicilor de analiză. Până la momentul actual, mai multe metode de testare au fost înaintate pentru validare – proces prin care se demonstrează că procedura de izolare, preparare și analiză a probelor va da rezultate semnificative și reproductibile în cazul unei matrici și al testului dat. Succesul validării unei metode analitice este determinat de demonstrarea caracteristicilor performante, care include: specificitate, sensibilitate, limita de detecție, eficiența de extragere, precizie, reproductibilitate în cazul activităților de identificare/ screening (detecția calitativă) și suplimentar: acuratețe, limita de cuantificare, liniaritate, coeficient de variație la evaluarea sistemelor de detecție cantitativă (EMEA-guidelines CPMP/ICH/281/95 - <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf> și 381/95 - <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf>). Conform experților în metodele analitice, criteriile de validare reprezintă:

Specificitatea – probabilitatea obținerii unui rezultat negativ în cazul lipsei OMG și este determinată de contaminarea probei cu virusuri sau bacterii, care conțin elemente genetice similare cu cele utilizate în transgeneză (promotori, terminatori). Se recomandă de testat mai multe probe de control-negativ pentru a evalua specificitatea primerului. Produsul de amplificare obținut trebuie evaluat prin determinarea exactă a dimensiunii, secvenței de nucleotide, profilului restricțional, hibridării.

Sensibilitatea – probabilitatea obținerii unui rezultat pozitiv în caz de prezență a OMG. Excluderea rezultatelor fals-negative, de exemplu, calitatea joasă a matriciei (ADN) poate fi exclusă prin coamplificarea unui control intern. Trebuie utilizate două probe de control: un control negativ pentru a exclude contaminarea cu alt material genetic și un control pozitiv cu o limită de detecție adecvată în calitate de test de sensibilitate.

Precizia (reproductibilitatea) – include nivelul de variație (devierea standardă, coeficientul de variație, intervalul de încredere etc.) a rezultatelor în cadrul aceleiași experiențe și gradul lor de reproductibilitate în diverse laboratoare cu diferit echipament și diferiți experimenteratori.

Limita de detecție (Limit of detection – LOD) – este determinată prin analiza unei probe cu o concentrație cunoscută a ADN-ului alogen și stabilirea unui nivel-limită a cantității, care poate fi detectat cu siguranță. În conformitate cu EMEA-guideline CPMP/ICH/281/95 (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf>), LOD = (3,3 sigma): S, unde „sigma” este devierea standardă, iar „S” este un coeficient al curbei de calibrare. Limita de detecție poate fi definită drept concen-

trația la care 95% din experiențe indică un nivel de sensibilitate de 95% și care este experimental determinată prin cel puțin trei serii de diluții ale concentrației ADN, iar fiecare concentrație trebuie să fie analizată în 8 repetiții.

Limita de cuantificare (Limit of Quantification – LOQ) – este determinată prin analiza unei probe cunoscute și stabilirea unui conținut minim al transgenelor, care poate fi cuantificat. LOQ este descris ca $LOQ = (10 \text{ sigma}): S$, unde „sigma” și „S” sunt definiți ca și în cazul LOD.

Utilizarea metodelor validate de testare reprezintă o condiție obligatorie în acceptarea datelor experimentale obținute de laborator. Laboratoarele implicate în activități de control trebuie să utilizeze metode validate, ceea ce constituie o cerință pentru toate laboratoarele care au drept scop acreditarea lor. Fiecare metodă nouă, care urmează a fi validată este supusă unei testări de către mai multe laboratoare pe probe identice pentru a demonstra reproductibilitatea, sensibilitatea și specificitatea rezultatelor. Design-ul experimental, inclusiv modul de analiză a rezultatelor, reprezintă un moment crucial în succesul testării PMG. Programele de testare urmăresc să includă cele mai performante tehnologii, iar eforturile comune de colaborare a mai multor structuri în domeniu vor facilita elaborarea și dezvoltarea unor teste validate acceptate de utilizatori și de cei care reglementează activități cu OMG. Până acum sunt standardizate și validate mai multe metode de detecție, identificare și cuantificare a materialului MG. De exemplu, o metodă de extragere a ADN-ului din semințele de soia a fost elaborată și validată de către Bayer CropScience GmbH, care ulterior a fost testată și confirmată de Community Reference Laboratory, Biotechnology and & GMOs Unit, 2007. Metoda de identificare și cuantificare a liniei de porumb MON 863 utilizând real-time PCR a fost elaborată de Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences și validată de Joint Research Centre – European Commission Biotechnology & GMOs Unit, 2005. Metoda ELISA a fost validată pentru testarea comercială a semințelor de soia Roundup Ready™ de către JRC, 2000. Baza de date COMPASS (<http://gmo-crl.jrc.it>) include toate dosarele și metodele de testare a PMG (Detection methods validated in support to notifications submitted under Directive 2001/18/EC) (tab. 2.6). Protocoalele sunt accesibile publicului larg pe site-ul <http://www.gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm> și <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>.

Principii de determinare cantitativă a OMG. Conținutul de OMG poate fi exprimat ca și cantitatea de material modificat genetic din tot materialul analizat. Pentru a determina această valoare prin metoda Real-time PCR, este necesar de determinat numărul de secvențe de ADN transgenic incluse în genom în raport cu o genă de referință. Gena de referință trebuie aleasă ținând cont de specia analizată care trebuie să fie într-o singură copie în genom. Ca gene de referință pentru porumb se utilizează gena zeinei, iar pentru soia – gena lectinei.

La moment nu este elucidat concret ce se subînțelege sub noțiunea de % OMG. Conținutul MG (procentajul, %) include cantitatea de ingredient transgenic din totalul de ingredient (de ex., cantitatea de semințe de porumb MG din tot lotul de

porumb). Determinarea conținutului de OMG se poate efectua după curbele care aparțin secvenței transgenice și celei de referință, iar procentajul este calculat după raportul dintre secvențele MG și secvențele de referință ($MG/referință \cdot 100$).

Din punct de vedere analitic, este convenabil de calculat procentajul OMG după cantitatea de ADN-țintă raportat la secvențele specifice de taxon. Însă nu se ține cont de particularități precum:

- poliploidia (este posibil ca unele culturi de OMG să fie poliploide);
- zigoția (transgenele se pot moșteni homozigot sau heterozigot);
- numărul de transgene integrate în genom (de obicei, o copie, în unele cazuri, mai multe).

CAPITOLUL 3

PRELEVAREA ȘI OBTINEREA PROBELOR PENTRU ANALIZE GENETICE

- 3.1. Principii și norme de selectare a materialului experimental pentru testare
- 3.2. Izolarea și purificarea proteinelor și ADN-ului vegetal
- 3.3. Electroforeza proteinelor și a acizilor nucleici
- 3.4. Estimarea conținutului de proteine și de ADN
- 3.5. Exemple de protocoale



ASPECTE ALE ACTIVITĂȚII LABORATORULUI SECURITATE BIOLOGICĂ

Capitolul 3. PRELEVAREA ȘI OBTINEREA PROBELOR PENTRU ANALIZE GENETICE

Testarea PMG se realizează efectuând un număr mare de experimente, care includ atât antrenarea mijloacelor simple, ce permit detecția modificărilor genetice, cât și o serie de tehnici clasice și moderne, utilizate pentru identificarea și cuantificarea acestora.

3.1. Principii și norme de selectare a materialului experimental pentru testare

Prelevarea și prepararea probelor sunt doi factori determinanți în testarea materialului modificat genetic. Procedura de prelevare a eșantionelor determină nivelul de reprezentativitate a datelor experimentale, în timp ce prepararea probei influențează calitatea și cantitatea materialului analizat. Se consideră că erorile în detecția și cuantificarea OMG pot interveni din cauza:

- schemei de prelevare a probelor;
- schemei de testare; și
- preciziei metodelor analitice utilizate.

Într-un lot de semințe pot avea loc diverse contaminări sporadice și de aceea prelevarea unui eșantion mic nu va fi reprezentativ statistic. Conform Organizației Naționale Franceze de Validare (AFNOR), este necesar de a utiliza în analiză un număr determinat de semințe în conformitate cu echivalentul lor în masă (de exemplu, 10 000 semințe). Însă unii cercetători recomandă prelevarea semințelor în cantitate de aproximativ 1500 - 3000 g pentru a detecta un nivel foarte mic de MG. Reprezentativitatea eșantionului trebuie menținută în toate etapele ulterioare de analiză, începând cu prelevarea probelor în câmp și analiza lor în laborator. Modul de prelevare, dimensiunea și omogenitatea eșantionului trebuie să fie relevante pentru întreg lotul de semințe sau pentru toată suprafața cultivată și să permită identificarea sursei de contaminare. Această condiție este o particularitate esențială în detecția PMG neautorizate.

Pentru utilizarea metodelor standardizate de prelevare a semințelor, Agenția internațională de testare a semințelor (International seed testing agency – ISTA) a elaborat un ghid de prelevare a probelor – *ISTA Handbook on seed*. Conform acestui ghid, principiile de prelevare a probelor în scopul controlului autorizat privind modificarea genetică sunt:

- Prelevarea probelor de pe plante se efectuează randomizat pe toată suprafața câmpului de cultivare. Plantele de pe care s-au colectat probele trebuie marcate pentru observații în cazul unor posibile repetări. În cazul plantelor cu creștere activă se colectează frunzele apropiate de apex și se transferă în tuburi sterile, utilizând mănuși. Numărul de probe supuse controlului în vederea unei posibile contaminări va depinde de nivelul de contaminare suspectat sau de nivelul de siguranță statistică cerut. Sunt autorizate următoarele dimensiuni ale eșantionului necesare în detectarea contaminărilor cu material modificat genetic cu nivelul de semnificație de 95%:

- 100 plante pentru a detecta un nivel de contaminare de 3%;
 - 200 plante pentru a detecta un nivel de contaminare de 1,5%;
 - 300 plante pentru a detecta un nivel de contaminare de 1,0%;
 - 3000 plante pentru a detecta un nivel de contaminare de 0,1% .
- Prelevarea probelor din loturile de semințe trebuie să se realizeze în conformitate cu art. 7 al directivei 66/400/EEC referitoare la regulile ISTA și conform standardelor: ISO standard 6644; ISO standard 13690; ISO standard 5725 elaborate de Organizația Internațională de Standardizare.
 - Dimensiunea eșantionului se selectează în funcție de cerințele metodelor de testare utilizate în detecția MG și de certificare a semințelor. JRC a revăzut diferite modalități de prelevare a probelor pentru loturile de semințe, prezentând concluziile într-o serie de documente a ISTA, USDA/GIPSA, CEN, ISO, WHO/FAO și o directivă a UE specifică (98/53). Astfel, conform acestora, fiecare eșantion analizat în laborator în scopul testării OMG trebuie să includă între 2400 și 10 000 semințe.

3.2. Izolarea și purificarea proteinelor și ADN-ului vegetal

Prepararea extractelor proteice. Izolarea și purificarea proteinelor reprezintă o etapă esențială în procesul de cuantificare și studiere calitativă a acestora. Există o varietate largă de metode de extracție, cu diferențe în etapele de lucru, în compoziția soluțiilor chimice folosite, în molaritatea și pH-ul soluțiilor-tampon (Popescu, 1990; Полевой, 1996; Reva și al., 2001). Strategia separării și purificării proteinelor se elaborează în funcție de scopul cercetării, care prevede analiza proteinelor:

- în condiții native, atunci când avem ca obiectiv activitatea proteinei (enzimă, antigen, anticorp, hormon, receptor etc.);
- în condiții denaturante, când ne interesează structura primară, conținutul sau diversitatea moleculară a anumitor fracții proteice.

Proteinele sunt heteropolimeri cu masă moleculară mare (de la 6 mii până la câteva mln) formați din α -aminoacizi, uniți prin legături peptidice. Cantitatea de proteine variază în funcție de țesut și organ, în frunze constituind 10-20% din masa uscată. Proteinele vegetale sunt concentrate în citoplasmă, deosebindu-se prin solubilitate, proprietăți fizico-chimice, dimensiuni, capacități de interacțiune specifice cu alți polimeri etc. Pe aceste criterii se bazează metodele de fracționare a polimerilor proteici.

Solubilitatea este o particularitate esențială, după care proteinele pot fi fracționate. În conformitate cu gradul de solubilitate, proteinele pot fi clasificate în aposolubile (albumine), salinosolubile (globuline) și alcalinosolubile (gluteline). Indiferent de modul de extragere a proteinelor, următoarea etapă este precipitarea (reversibilă sau ireversibilă) cu etanol, acetona, acid tricloracetic (ATA), tanine, săruri ale metalelor grele, sulfat de amoniu etc. Unele din aceste componente provoacă denaturarea proteinei și sunt folosite în cazurile în care se solicită eliminarea acestor

compuși (cercetarea componentelor neproteice din extract) sau în cazurile în care starea nativă a proteinei nu are o mare importanță (analiza proteinelor prin electroforeză-SDS). Deoarece majoritatea proteinelor (până la 40%) sunt concentrate în soluția din citoplasma celulei, acestea pot fi solubilizate în concentrații fiziologice ale sărurilor de 0,8-1% cu valori neutre ale pH-ului.

În procesul de omogenizare a țesuturilor vegetale, care precedă extragerea proteinelor, are loc acidularea citoplasmei ca rezultat al eliminării sucului celular acid din vacuole, al pătrunderii oxigenului atmosferic și al activității oxidazelor, peroxidazelor etc. Pentru a păstra starea nativă a proteinelor, este necesar de menținut acele condiții fizico-chimice care au existat în protoplasmă înainte de omogenizare. Un parametru important este pH-ul, valorile cărora pot fi menținute cu ajutorul soluțiilor-tampon cu pH 7,5-8,5 (fosfați, borați, Tris).

Flavonoizii și taninele eliberate din vacuole la omogenizarea țesuturilor vegetale pot să inhibe unele enzime, să se unească cu proteina prin legăturile de hidrogen sau să formeze legături covalente cu grupările funcționale laterale ale unor aminoacizi (serina, treonina, cisteina, lizina, arginina, acizii aspartic și glutamic). Pentru a preîntâmpina aceste efecte, este folosit polivinilpirolidonul în calitate de adaos la soluțiile-tampon, care formează complexe cu flavonoizii și taninele, ulterior fiind ușor eliminate prin centrifugare. Pentru reducerea proceselor oxidative, în primul rând oxidarea polifenolilor de către oxidaze, se adaugă 2-mercaptoetanol, ditiotreititol, cisteină, acid ascorbic etc. Mercaptoetanolul este adăugat în soluția-tampon și în scopul protejării grupelor sulfhidril ale proteinelor față de oxidare. Menținerea unei concentrații reduse a ionilor polivalenți este esențială pentru proteinele native și se poate realiza prin adăugarea în extragent a etilendiamintetraacetatului (EDTA, 3-5 mM), care formează complexe chelatice cu metalele grele.

Denaturarea și hidroliza proteinelor poate fi evitată dacă izolarea se va realiza la temperatura de $0 \div +4^{\circ}\text{C}$ cu adăugare de inhibitori ai proteolizei. De asemenea, în cazul proteinelor native (mai ales în obținerea enzimelor) se utilizează numai material proaspăt prelevat. Dacă apare necesitatea ca materialul să fie păstrat mai mult timp, atunci el se îngheață și se păstrează la temperaturi scăzute ($-20 \div -70^{\circ}\text{C}$) sau în unele cazuri se liofilizează.

Extragerea proteinelor din omogenatul de țesuturi vegetale în scopul analizei acestor compuși în condiții denaturante se poate realiza fracționat sau nefracționat cu obținerea unui extract sumar de proteine ușor solubile (Duca și al., 2001; Reva și al., 2001). În acest caz, obținerea extractului proteic din omogenatul de țesuturi vegetale se realizează în soluție-tampon Tris-HCl 62,5 mM, pH-6,8 ce conține: glicerină 5%, mercaptoetanol 1%, EDTA 0,1%, inhibitor al proteazelor în raport de 1 g probă : 5 ml timp de 30 min. - 1 oră cu agitare. În supernatantul obținut în urma centrifugării timp de 15 min. la o turație de 10 000 rot/min. se adaugă acid tricloracetic de 50% până la o concentrație finală de 5% pentru precipitarea proteinelor. Sedimentul rezultat prin centrifugare 10 min. la o turație de 10 000 rot/min. se supune unor operații de purificare prin spălări cu: etanol 70% conținând Tris-HCl 10

mM de două ori; acetonă răcită de 80%, de două ori; etanol 96%, de două ori și în final cu eter etilic, fiecare dintre aceste operații fiind urmată de o centrifugare de 10 min. la 10000 rot/min. Precipitatul obținut se usucă în curent de aer și se dizolvă în soluție-tampon înainte de a fi supus fracționării prin electroforeză.

Izolarea și purificarea ADN-ului. Macromolecula de ADN este o structură inertă chimic, grupările potențial reactive fiind situate în centrul helixului, unite prin legături de hidrogen, fapt ce conferă rezistență și durabilitate chimică, permițând analiza macromoleculi de ADN și după perioade lungi de timp de la momentul izolării din probe.

În literatura de specialitate există numeroase metode de izolare a ADN-ului, diversitatea cărora depinde de materialul experimental – celule de tip eucariot sau procariot, culturi de celule sau țesuturi proaspete, țesut de plante sau animale etc. Izolarea și purificarea ADN-ului este prima etapă care stă la baza tuturor procedeelelor de inginerie genetică și a studiilor de genetică moleculară, inclusiv în efectuarea testării PMG. ADN-ul genomic se obține în formă fragmentată, generându-se fragmente cu lungimi care variază de la 100 kb pînă la 150 kb. În această formă, ADN-ul îndeplinește toate condițiile pentru a fi utilizat cu succes în analize de tip Southern blot, în reacții de amplificare prin polimerizare în lanț și pentru construirea librărilor de ADN genomic. Însă eficiența utilizării ADN-ului în analizele ulterioare este determinată de puritatea și de integritatea acestuia.

Procedeele clasice de izolare a ADN-ului implică digestia celulelor eucariote sau a țesuturilor cu proteinază K, în prezență de EDTA, care leagă cationii bivalenți și inhibă ADN-azele. Concomitent, are loc solubilizarea membranelor și denaturarea proteinelor cu detergenți de tip SDS (dodecil sulfat de sodiu). Acizii nucleici sunt apoi purificați prin extracții cu solvenți organici, ARN contaminant fiind eliminat prin digestie cu ARN-aze. Succesul izolării ADN-ului intact, indiferent de metoda utilizată, depinde de:

- eficiența degradării celulelor și țesuturilor;
- denaturarea complexelor nucleoproteice;
- inactivarea ADN-azelor;
- purificarea ADN-ului.

Majoritatea metodelor de izolare și purificare a acizilor nucleici includ o schemă experimentală de bază cu etape similare și utilizarea unui șir de reagenți speciali. Selectarea soluției-tampon și a diferitor adaosuri se face în funcție de dificultățile de izolare și purificare determinate de particularitățile anatomice și biochimice ale materialului vegetal utilizat. Se deosebesc câteva grupe de reagenți indispensabili unei proceduri de extragere și purificare a ADN-ului – soluții-tampon, detergenți, antioxidanți, chelatori de metale, agenți de precipitare și purificare a ADN-ului.

Schema oricărui protocol de izolare a acizilor nucleici include următoarele etape de bază:

- **Liza celulară.** Tehnica de extragere a acizilor nucleici are ca primă etapă liza celulelor, care poate fi realizată pe cale *mecanică* (mojarare cu nisip), *fizică* (ultrasoni-

care) sau *chimică* (tratare cu detergenți specifici: SDS, Triton X 100, Nonidet, Tween și/sau enzime, care atacă peretele celular: proteinaza K, pronaza E, lizozim).

- **Deproteinizarea.** Separarea fazei organice, respectiv înlăturarea prin precipitare a proteinelor și a resturilor celulare, se realizează prin tratamente chimice, urmate de centrifugare. Modul standard de înlăturare a proteinelor din soluțiile de acizi nucleici este extracția fenolică sau cu amestec cloroform : alcool izoamilic (24:1), care stabilizează faza organică dintre cele două faze lichide.

- **Extracția ADN-ului.** Principiul acestei etape reprezintă utilizarea solubilității diferențiate a moleculelor de acizi nucleici/ contaminanți între două faze nemiscibile. Soluția de acizi nucleici este viguros amestecată cu o fază non-miscibilă (fenol, cloroform, eter, izobutanol, NaCl 6M) timp de câteva minute. Faza apoasă, care conține acizii nucleici, este recuperată atent cu pipeta, după centrifugare.

- **Precipitarea ADN-ului.** Precipitarea se realizează cu izopropanol sau alcool etilic la o forță ionică înaltă. În aceste condiții, acizii nucleici sunt total precipitați. Pentru concentrațiile scăzute de ADN (<50 μg/ml) timpul de precipitare trebuie să fie foarte lung (> 10 ore). Alcoolul etilic trebuie să fie foarte rece, deoarece precipitățile sunt accelerate prin răcire (de la -20°C la -70° C). Precipitatul este recuperat prin centrifugare. După ambele tipuri de precipitare, sedimentul se spală cu etanol 70%, pentru îndepărtarea sării sau a urmelor de izopropanol, apoi se usucă.

ADN-ul obținut este resuspendat într-o soluție-tampon TE (Tris 10 mM și EDTA 0,1 la 1 mM) sau apă bidistilată și se poate păstra la 4°C. Concentrația de EDTA poate fi crescută pentru a evita riscul digestiei de către nucleazele contaminante dar, în acest caz, va fi necesară îndepărtarea acestuia înainte de a analiza ADN-ul, deoarece enzimele sunt inhibate de către EDTA. Preferabil este să nu se congeleze ADN-ul genomic, deoarece congelarea și decongelarea frecventă provoacă degradări mecanice ale ADN-ului.

Procedeele aplicate în extragere și reagenții utilizați condiționează calitatea ADN-ului. Prezența unui șir de substanțe, ce se pot conține în ADN după izolarea acestuia, pot diminua reacțiile de polimerizare sau chiar induce inhibarea completă a reacției PCR (tab. 3.1.).

Tabelul 3.1.

Substanțe cu rol de inhibare a reacției PCR

Inhibitorul	Concentrația de inhibare
<i>SDS</i>	> 0,005%
<i>Fenol</i>	> 0,2%
<i>Etanol</i>	> 1%
<i>Izopropanol</i>	> 1%
<i>Acetat de sodiu</i>	> 5 mM
<i>NaCl</i>	> 25 mM
<i>EDTA</i>	> 0,5 mM
<i>Uree</i>	> 20 mM

Unul din protocoalele cel mai des utilizate pentru izolarea moleculelor de ADN cu utilizarea soluțiilor-stoc se bazează pe utilizarea soluției-tampon cu detergen-tul cetiltrimetilamonium bromid ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ (CTAB) după Murray și Thompson (1980).

Principiul metodei: CTAB lizează celulele, formând un complex insolubil cu acizii nucleici la concentrație redusă de săruri (mai mici de 0,5 M). În aceste condi-ții, polizaharidele, compușii fenolici și alte substanțe rămân în supernatant și pot fi eliminate ulterior. ADN-ul poate fi solubilizat prin creșterea concentrației de sare și precipitat cu alcool (etanol sau izopropanol). Etapele de izolare și purificare a ADN-ului conform acestei metode sunt rezumate în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2.

Etapele de izolare a ADN-ului după Murray și Thompson (1980)

Etapa	Descrierea etapei
1. Omogenizarea și liza celulelor	Materialul vegetal (2-5 g) se omogenizează în azot lichid până la obținerea unui praf (pudră) de culoare verde deschis, care se transferă rapid în soluția-tampon în prealabil încălzită până la 65°C de CTAB 2X în raport de 25 ml soluție pentru 2-5 g țesut, urmat de agitare.
2. Extragerea acizilor nucleici	Extragerea ADN-ului se realizează prin incubarea probelor la 65°C timp de cel puțin 20 minute (rezultate mai bune sunt obținute în urma incubării îndelungate de 1-3 ore).
3. Izolarea și operații multiple de purificare a ADN-ului	La extractul răcit până la temperatura camerei se adaugă un volum egal de amestec de cloroform : alcool izoamilic (24:1) și se agită 20 minute la temperatura camerei, după care se centrifughează la 5000 g timp de 10 minute. La faza apoasă astfel separată se adaugă 0,2 volume de CTAB 5X, se agită și se incubează 10 minute la temperatura de 65°C.
<i>3.1. Purificarea ADN-ului</i>	ADN-ul se precipită cu 0,5 ml etanol absolut (100%) prin inversarea eprubetelor de 5-8 ori, apoi se lasă la temperatura camerei 1-3 minute. Se adaugă un volum egal de amestec de cloroform : alcool izoamilic (24:1). Se agită 10 minute la temperatura camerei și se centrifughează la 5000 g timp de 10 minute. Dacă faza apoasă nu este străvezie sau interfaza este mare, ultima procedură se repetă.
<i>3.2. Obținerea precipitatului de ADN urmat de resuspendarea lui în soluție</i>	La supernatant se adaugă un volum egal (se admite și 2-3 volume) de soluție-tampon de precipitare, se agită și se lasă la temperatura camerei pentru o oră sau peste noapte. Obținerea sedimentului se realizează prin centrifugare la 8000 g timp de 20 minute. La precipitat se adaugă 1-2 ml soluție tampon TE. Uneori pentru o dizolvare completă este necesară încălzirea soluției până la 65°C.
<i>3.3. Precipitarea repetată a ADN-ului</i>	La soluția ce conține ADN-ul solubilizat se adaugă două volume de alcool etilic (100%). Se lasă pentru 1-2 ore la temperatura de -20°C sau 30 minute la -70°C, după care se centrifughează la 8000 g timp de 10 minute la temperatura de 4°C. La precipitat se adaugă 200 μl H ₂ O distilată și 100 μl NH ₄ Ac 7,5 M (pH 7,5). Se lasă pentru 20 minute la temperatura de 0°C după care se centrifughează la 13.000 g timp de 10 minute la temperatura de 4°C.
<i>3.4. Precipitarea repetată a ADN-ului</i>	La soluția ce conține ADN-ul solubilizat se adaugă două volume de alcool etilic (100%). Se lasă pentru 20 minute la -70°C, apoi se centrifughează la 13 000 g timp de 10 minute la temperatura de 4°C.
<i>3.5. Ultima etapă de purificare a ADN-ului</i>	La sedimentul obținut se adaugă 1 ml etanol 80% și se centrifughează la 13 000 g timp de 10 minute la temperatura de 4°C.
4. Solubilizarea și păstrarea ADN-ului	Sedimentul de ADN se dizolvă în apă bidistilată, sterilă sau NaOH 8 mM. Soluția de ADN poate fi păstrată la temperatura de -20°C timp de mai multe luni.

Pentru izolarea ADN-ului prin tehnologia descrisă anterior sunt necesare următoarele soluții-tampon:

1. CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-Cl pH 8,0 0,1M, EDTA 20 mM).
2. CTAB 5X (CTAB 5%, EDTA 350 mM).
3. de precipitare (CTAB 1%, Tris-Cl pH 8,0 50 mM, EDTA 10 mM).
4. TE (NaCl 1 M, Tris Cl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM).

Actualmente, sunt cunoscute un șir de protocoale, bazate pe utilizarea kit-urilor speciale, care simplifică și reduc timpul izolării ADN-ului. Izolarea ADN-ului cu DNAzol (Plant DNAzol® Reagent, SUA, patent nr. 5,945,515) combină siguranța și eficiența incluse într-un protocol foarte simplu și rapid (tab. 3.3.). Toate etapele de izolare prin această metodă decurg la temperatura camerei, iar centrifugarea poate fi realizată la temperatura de la 4°C până la 25°C.

Tabelul 3.3.

Etapele de izolare a ADN-ului cu DNAzol

Denumirea etapei	Descrierea etapei
1. Omogenizarea și liza celulelor	Materialul vegetal (de obicei 0,1 g) se omogenizează direct în eprubeta tip Eppendorf, care conține 0,3 ml DNAzol, utilizând o baghetă din plastic.
2. Extragerea acizilor nucleici	Extragerea ADN-ului se realizează prin incubarea probelor la 25°C timp de 5 minute cu agitare.
3. Izolarea și operații de purificare a ADN-ului	La extractul ce conține ADN se adaugă 0,3 ml cloroform, se agită atent timp de 5 minute la temperatura de 25°C, după care se centrifughează la 12 000 g timp de 10 minute. Faza se separă și se transferă într-un tub nou. Pentru astfel de tehnologii, cum ar fi PCR-ul, care necesită cantități limitate de ADN, adăugarea cloroformului este opțională.
<i>3.1. Precipitarea ADN-ului</i>	ADN-ul se precipită cu 0,225 ml etanol absolut (100%) și se agită foarte atent prin inversarea tuburilor de 6-8 ori, după care probele se incubează la temperatura camerei pentru 5 minute, apoi se centrifughează la 5000 g timp de 4 minute la temperatura de 4°C. Uneori precipitatul nu este vizibil până la centrifugare.
<i>3.2. Purificarea ADN-ului</i>	Pentru purificarea ADN-ului se adaugă 0,3 ml amestec DNAzol : etanol absolut (în raport de 1 : 0,75), după care probele se vortexează, se incubează la temperatura camerei pentru 5 minute, apoi se centrifughează la 5000 g timp de 4 minute. În cazul în care din materialul vegetal se extrag cantități mici de ADN, soluția de spălare (DNAzol : etanol absolut) poate fi redusă la 50%.
<i>3.3. Spălarea repetată a ADN-ului</i>	La sedimentul de ADN se adaugă 0,3 ml etanol 75% și se agită atent, după care se centrifughează la 5000 g timp de 4 minute. După centrifugare, supernatantul se înlătură prin decantare. Pentru probele > 5g se recomandă o spălare suplimentară cu etanol, care este necesară pentru a înlătura excesul de cloroform și unii pigmenti din sedimentul de ADN.
4. Solubilizarea și păstrarea ADN-ului	Sedimentul de ADN se dizolvă în 70 μl soluție-tampon TE pH 8,0. Dacă sedimentul de ADN nu se dizolvă, atunci precipitatul se centrifughează din nou la 12 000 g timp de 4 minute și se dizolvă în soluție de NaOH 8 mM. Soluția de ADN poate fi păstrată la temperatura de -20°C timp de mai multe luni. Țesuturile vegetale resuspendate în DNAzol pot fi păstrate cel puțin o săptămână la temperatura camerei și cel puțin o lună sau un an la temperatura de 4°C sau -20°C. Sedimentul de ADN poate fi păstrat în soluție-etanol (95%) timp de cel puțin o săptămână la temperatura camerei sau un an la 4°C.

ADN-ul izolat cu DNazol poate conține ARN. Pentru a evita contaminarea se recomandă de a adăuga ARNase la soluția de DNazol la etapele inițiale de extragere a ADN-ului (100 μg ARNase/ml DNazol).

3.3. Electroforeza proteinelor și a acizilor nucleici

Electroforeza reprezintă o metodă analitică de separare, bazată pe fenomene fizico-chimice de migrare diferențiată a diferitor specii de particule încărcate electric sub acțiunea câmpului electric. Deplasarea se face spre unul din electrozi, iar între electrozi și componentele de separat nu au loc reacții. O macromoleculă cu o sarcină electrică dată, în deplasarea sa într-un câmp electric uniform și omogen, va fi mai mult sau mai puțin „frânată”, în funcție de dimensiunile sale și ale „porilor” gelului, fiind caracterizată prin mobilitatea electroforetică. Mobilitatea electroforetică depinde de factorii care sunt proprii macromoleculei (dimensiuni, formă, sarcină electrică, concentrație, grad de hidratare și disociere), proprii mediului de separare (viscozitate în corelație cu dimensiunile porilor, pH, forță ionică, temperatură) și, de asemenea, depinde de intensitatea câmpului electric și de timpul de migrare (Popescu, 1990; Reva și al., 2001).

În funcție de proprietățile proteinei sau ale proteinelor luate în studiu, pe de o parte, și de scopul concret urmărit, pe de altă parte, se precizează următoarele aspecte ale protocolului de lucru:

- compoziția chimică, concentrația și structura gelului (omogen sau gradient);
- forma gelului (cilindric sau plat);
- condițiile de separare (denaturante sau nedenaturante, disociative sau nedisociative);
- sistemul-tampon (continuu sau discontinuu);
- forța ionică și pH-ul sistemului-tampon.

De cele mai multe ori sunt necesare experiențe-test preliminare pentru a defini-tiva procedura optimă de lucru.

Electroforeza proteinelor în geluri de poliacrilamidă în prezență de SDS.

Pentru fracționarea de înaltă rezoluție a amestecurilor de proteine din țesuturile vegetale în condiții disociative (denaturante), se apelează, de obicei, la sistemul-tampon discontinuu care conține SDS, tehnică descrisă de Laemmli (1970).

Reagenți necesari: toate soluțiile-stoc se prepară cu reactivi de puritate analitică și cu apă bidistilată și filtrată prin filtru de 0,45 μm. Soluțiile-stoc, care se păstrează la rece, se aduc la temperatura camerei înainte de folosire (tab. 3.4.).

Proteinele sunt separate în geluri de poliacrilamidă cilindrice sau plate pe baza masei moleculare.

Prima etapă în efectuarea electroforezei este asamblarea matriței. Matrița este alcătuită din două plăci de sticlă (perfect plane și fără zgârieturi) și două distanțatoare („spacers”) confecționate din material plastic flexibil de diferite grosimi (gro-

simea gelului este determinată de grosimea distanțatoarelor). Pieptenele servește la obținerea „godeurilor” („sample wells”) în care se aplică probele proteice.

Tabelul 3.4.

Reagenți utilizați în electroforeza proteinelor în geluri de poliacrilamidă în prezență de SDS

Soluții-stoc	Componență și modul de preparare
Reactivul 1. Soluție-tampon pentru gelul de separare (tris-HCl 1,88 M pH = 8,8)	Se dizolvă 22,7 g Tris în 75 ml H ₂ O; se ajustează pH-ul la 8,8 cu HCl concentrat și se completează volumul final la 100 ml; se păstrează la 4°C. Soluția este stabilă mai multe luni.
Reactivul 2. Soluție-tampon pentru gelul de concentrare (Tris-HCl 0,638 M, pH = 6,8)	16,65 ml reactivul nr. 1 se diluează în raport de 1 : 2 se ajustează pH-ul la 6,8 cu HCl 6 și se completează volumul la 50 ml. Soluția se păstrează la 4°C. Soluția este stabilă mai multe luni.
Reactivul 3. Soluție-tampon pentru probe	5 ml reactivul nr. 2 se diluează în raport de 1 : 5; în soluția obținută se dizolvă succesiv 2,12 g SDS, 3 ml β-mercaptoetanol, 10 g zaharoză. 0,002 g albastru de bromfenol: volumul final se completează la 50 ml cu H ₂ O. Soluția este stabilă mai multe luni în congelator.
Reactivul 4. Soluție de acrilamidă și bisacrilamidă	În 30 ml se dizolvă 24,35 g acrilamidă și 0,6494 g bisacrilamidă la temperatura camerei; se aduce volumul final la 50 ml. Soluția-stoc se păstrează în sticlă brună la 4°C. Soluția este stabilă cel puțin 30 zile.
Reactivul 5. Soluție de SDS (1%).	În 25 ml H ₂ O se dizolvă 250 mg de SDS.
Reactivul 6. Soluție de TEMED (0,48%)	0,48 ml de TEMED se completează cu H ₂ O la 100 ml.
Reactivul 7. Soluție de persulfat de amoniu (0,5 %)	În 10 ml H ₂ O se dizolvă 50 mg persulfat de amoniu.
Reactivul 8. Soluție-tampon de migrare pentru rezervorul superior	În 100 ml H ₂ O se dizolvă succesiv: 1,815 g Tris, 8,64 g glicină și 600 mg SDS; se completează volumul final la 600 ml; pH-ul soluției trebuie să fie 8,3 (nu este necesară ajustarea). Soluția este stabilă mai multe săptămâni.
Reactivul 9. Soluție-tampon de migrare pentru rezervorul inferior	În 580 ml H ₂ O se dizolvă 1,815 g Tris; se ajustează pH-ul la 8,3 cu HCl concentrat și se completează volumul final la 600 ml.
Reactivul 10. Soluție pentru fixarea peptidelor în gel	La 250 ml izopropanol și 100 ml acid acetic glacial se adaugă 650 ml H ₂ O.
Reactivul 11. Soluție pentru colorare	În 223,1 ml H ₂ O se dizolvă 100 mg colorant „Coomase blue G-250” prin agitare timp de 30 minute; se adaugă 26,9 ml HClO ₄ 32,5%, 5 min. se agită; se filtrează.
Reactivul 12. Soluție de acid acetic de 7%	35 ml acid acetic glacial se dizolvă în 465 ml H ₂ O distilată.

Electroforeza în sistem-tampon discontinuu presupune pregătirea a două geluri, care diferă între ele prin dimensiunea porilor, forța ionică și valoarea pH-ului.

- **Gelul de separare omogen.** Cantitățile din soluție (în ml) necesare pentru amestecul de polimerizare, de exemplu, obținerea gelurilor de concentrația 12,5% cu utilizarea matritelor cu dimensiuni de 10 cm x 12 cm sunt următoarele: 4 ml reactiv nr. 1; 5 ml reactiv nr. 4; 5ml reactiv nr. 6; 2 ml reactiv nr. 5;

2 ml H₂O distilată; 2 ml reactiv nr. 7; amestecul se agită ușor. Se recomandă degazarea timp de 10 - 15 min., înainte de adăugarea persulfatului de amoniu și a TEMED. Amestecul de polimerizare se transferă în matricea asamblată, evitându-se formarea bulelor de aer; nivelul soluției, care prin polimerizare va forma gelul de separare, trebuie să fie la 1 - 1,5 cm distanță de dinții pieptenului. Imediat, cu o pipetă se acoperă cu multă atenție partea superioară a viitorului gel cu un strat (0,5 - 1 cm) de apă distilată. Apa se adaugă pentru a se obține o față perfect plană a părții superioare a gelului de separare.

- **Gelul de concentrare.** Gelul de concentrare se pregătește cu 45 - 60 min. înainte de aplicarea probelor proteice. Se îndepărtează complet stratul de lichid de la partea superioară a gelului de separare. Se prepară 3 ml amestec de polimerizare: 0,6 ml reactiv nr. 2; 3 ml reactiv nr. 4; 0,75 ml reactiv nr. 6; 0,3 ml reactiv nr. 5; 0,45 ml H₂O distilată; 0,6 ml reactiv nr. 7. Amestecul se pipetează în matrice; polimerizarea este completă după 30 - 45 min. Pieptenele se îndepărtează, având grijă să nu se deformeze gelul de concentrare.

Pregătirea, aplicarea și separarea probelor proteice se începe cu dizolvarea precipitatului proteic uscat (în raport de 10 : 1) în soluție-tampon tris-HCl pH 6,8 (reactivul nr. 3), urmată de fierbere pe o baie de apă timp de 2 - 5 min. Extractele proteice astfel obținute sunt stabile mai multe săptămâni, dacă se păstrează la temperaturi joase în congelator (cel puțin - 10° C), totuși trebuie avut în vedere că înghețările repetate duc la degradarea proteinelor. Probele proteice fierte și răcite la temperatura camerei se aplică „sub soluția-tampon de migrare” direct în godeuri (5 - 7,5 μl).

Matricea cu probele proteice se introduce în cuva aparatului de electroforeză cu electrozii de platină asamblați; se umplu cu soluția-tampon de migrare rezervoarele superior (reactivul nr. 9) și inferior (reactivul nr. 10). Electrozii din cele două rezervoare se conectează la sursa de curent continuu; în prima oră de electroforeză, până când frontul colorat albastru intră în gelul de separare, se lucrează la 15 mA și 80 V, iar în continuare la 30 mA, 180 V până când frontul colorantului a ajuns la 1 cm de marginea inferioară a gelului de separare (cca 3 - 4 ore).

Se deconectează cuva aparatului de electroforeză de la sursa de curent continuu, se detașează și se dezassemblează matricea, iar gelul separat este supus operațiilor de fixare (reactivul nr. 9 timp de 2 ore), colorare (timp de 1-2 ore în reactivul nr. 10), decolorare (reactivul nr.11), fotografiere etc.

Pentru determinarea masei moleculare relative a fracțiilor polipeptidice separate, se efectuează electroforeza în condiții identice unor probe cu martori, având mase moleculare cunoscute. Pe baza electroforegramei obținute în fiecare caz, se realizează o curbă de calibrare în coordonate Rf și Ln Mr, cu ajutorul căreia se determină logaritmi normalii (Ln) ai maselor moleculare relative ale fracțiilor separate, în funcție de indicii mobilității electroforetice (Rf).

Electroforeza ADN-ului se realizează pentru a determina calitatea ADN-lui, separarea fragmentelor de restricție, transferul pe membrană urmate de hibridări, separarea produselor de amplificare PCR (ampliconilor) etc. și se efectuează în gel de:

- **agaroză** (pentru fragmentele care au în medie 1 kb); și
- **poliacrilamidă** (pentru fragmentele mici – până la 500 pb).

Concentrația gelului depinde de dimensiunea fragmentului analizat. Cu cât fragmentul este mai mare, cu atât concentrația gelului va fi mai mică. De exemplu, pentru electroforeza ADN-ului total (genomic) în scop de estimare a calității și indirect a calității probei se utilizează gelul de agaroză cu concentrația de 0,8-1,0%, iar electroforeza ampliconilor se realizează în gel de agaroză de 1,4 - 2,0%. Gelul din poliacrilamidă permite separarea și vizualizarea fragmentelor mai mici de ADN, comparativ cu gelul din agaroză.

Separarea electroforetică a ADN-ului se efectuează utilizând aparate electroforetice **orizontale** (fig. 3.1. A) în cazul gelurilor de agaroză sau **verticale** (fig. 3.1. B) pentru gelurile de acrilamidă.

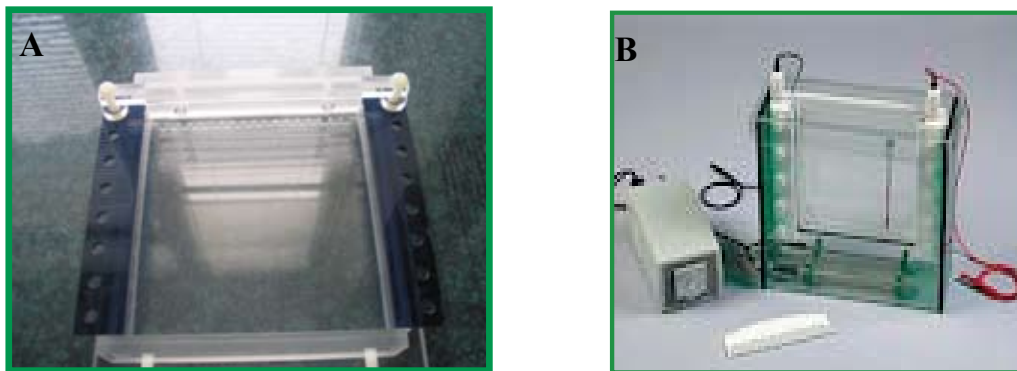


Figura 3.1. Camera de electroforeză de tip orizontal (A) și vertical (B)

Conform metodei standard (Sambrook și Russell, 2001) fracționarea ADN-ului se realizează în câteva etape (fig. 3.2.).

În calitate de sistem-tampon de migrare de cele mai dese ori se prepară TBE (în bază de Tris-borat) sau TAE (în bază de Tris-acetat) cu pH-ul 8,0. Este important ca în ambele rezervoare ale cuvei de electroforeză și gel să fie utilizată aceeași soluție-tampon. Chiar cele mai mici diferențe în tăria ionică sau pH creează fronturi în gel, care pot afecta semnificativ mobilitatea electroforetică a fragmentelor de ADN. În cazul determinării dimensiunilor fragmentelor necunoscute de ADN, trebuie să ne asigurăm că toate probele au fost depuse în godeuri în aceeași soluție-tampon. Concentrația mărită a sărurilor în anumite soluții-tampon destinate enzimelor de restricție (de exemplu, *BamHI* și *EcoRI*) diminuează mobilitatea ADN-ului.

Concentrațiile agarozei necesare separării ADN-ului de diferite dimensiuni sunt incluse în tabelul 3.5.

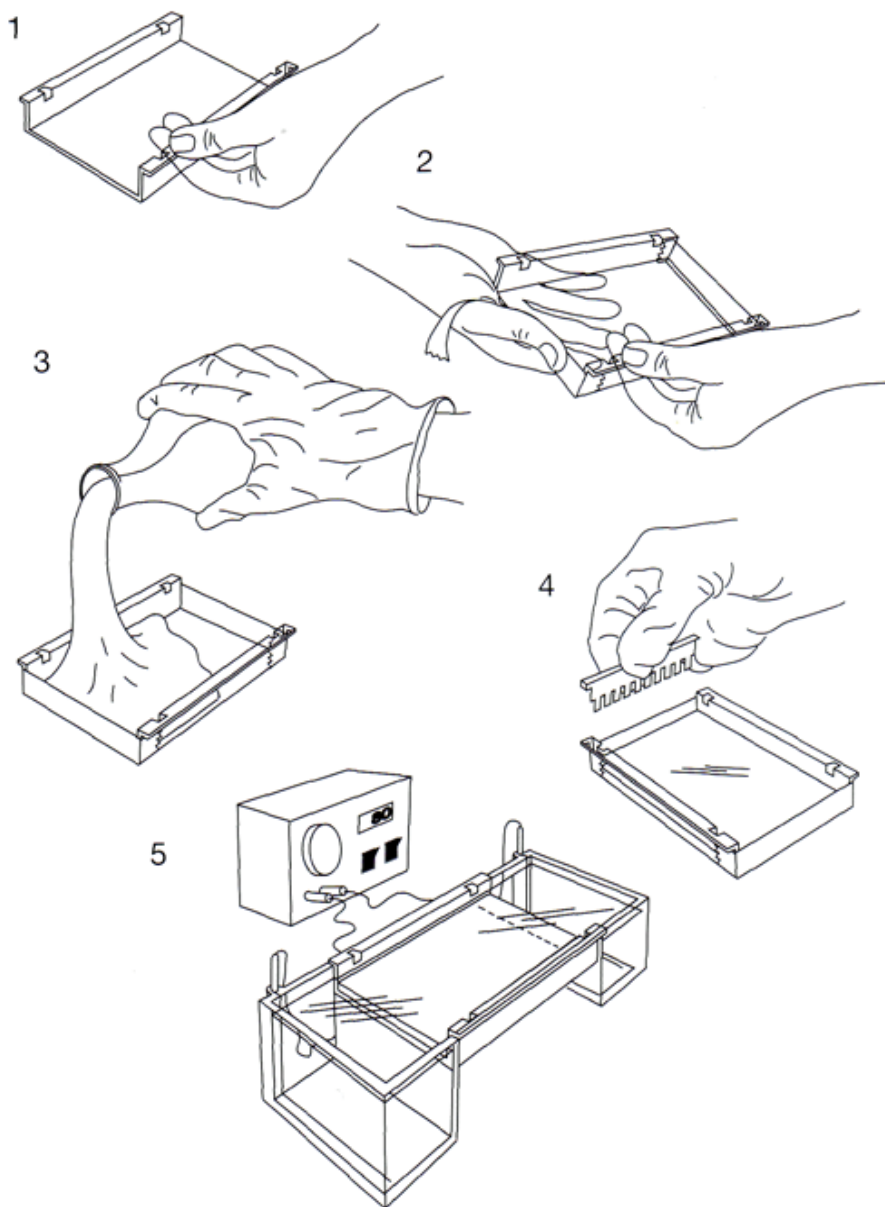


Figura 3.2. Principalele etape în realizarea electroforezei orizontale

1,2 – asamblarea matricei;

3 – distribuirea gelului în matricea asamblată;

4 – fixarea pieptenului pentru obținerea godeurilor;

5 – conectarea cuvei de electroforeză la sursa de curent electric.

Tabelul 3.5.**Dependența dintre concentrația gelului de agaroză și dimensiunea moleculelor de ADN**

Concentrația agarozei în gel (% [W/V])	Mărimea fragmentelor de ADN (kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Gelul se prepară prin dizolvarea agarozei în apă distilată la temperaturi înalte. Pentru aceasta se utilizează cuptorul cu microunde și mănuși. Întrucât soluția de agaroză poate deveni foarte fierbinte și poate începe fierberea brusc prin formarea bulelor mari de aer și revărsarea soluției din vas, încălzirea ei are loc cu precauție. Încălzirea poate fi întreruptă și repetată, până la dizolvarea completă a agarozei. Agitarea manuală a vasului va ajuta spălarea de pe pereții vasului a cristalelor de agaroză. Dizolvarea completă este determinată de transparența soluției. În cazul unei încălziri îndelungate poate scădea volumul soluției în urma evaporării intense, măbind concentrația gelului, de aceea se recomandă de a verifica volumul soluției și în caz de necesitate suplinirea lui cu apă distilată. Soluția preparată se răcește la temperatura camerei până la 55°C, după care se adaugă bromură de etidiu cu o concentrație finală de 0,5 μg/ml. Pentru omogenizare se utilizează agitatorul magnetic.

Distribuirea soluției de agaroză în matrice trebuie să fie uniformă și fără bule de aer, iar grosimea recomandată este de 3 - 5 mm. Pentru aceasta, cuva de electroforeză se va plasa pe o suprafață plană. Fixarea pieptenului în gel va contribui la formarea godeurilor, în care vor fi plasate probele de ADN. Polimerizarea deplină a gelului are loc după 30 - 45 minute la temperatura camerei, după care gelul este acoperit cu soluția-tampon.

La probele de ADN care urmează a fi separate electroforetic se adaugă 0,20 volume soluție-tampon pentru probe („loading buffer”) 6X. Cu ajutorul micropipetei probele sunt plasate în godeuri. Cuvă de electroforeză se acoperă cu capacul și se conectează la sursa de curent stabilindu-se tensiunea de 1-5 V/cm (distanța se măsoară dintre electrodul pozitiv și cel negativ).

Întrucât ADN-ul este încărcat negativ, migrarea moleculelor va avea loc de la polul „-” la polul „+”. Intensitatea curentului depinde de natura soluției-tampon, de tipul și lungimea gelului și de obicei se include în intervalul 100 și 120 V.

Timpul de migrare a ADN-ului (sau ampliconilor) depinde de intensitatea curentului, de concentrația gelului și de dimensiunile moleculelor supuse separării. Separarea se consideră terminată atunci când albastrul de bronfenol sau xilen cianolul ajunge la marginea opusă a gelului. Cuvă de electroforeză se deconectează de la

sursa de curent, se scoate capacul, iar gelul se vizualizează la transiluminator. Pentru vizualizarea atât a ADN-ului, cât și a ampliconilor se utilizează coloranți speciali fluorescenți, care sunt adăugați în cantități mici în gel. Cel mai des, se aplică *bromura de etidiu* (EtBr), care se intercalează cu bazele azotate ale ADN-ului și permite detectarea prin fluorescență a fragmentelor (fig. 3.3.). EtBr posedă absorbție maximă în spectrul ultraviolet la lungimea de undă de 300 și 360 nm. Adicional, el poate absorbi energia de la nucleotidele excitate de absorbția radiației la lungimea de undă de 260 nm. EtBr reemite această energie ca lumină galbenă/ portocalie centrată la 590 nm. Fluorescența EtBr în soluții apoase este semnificativ mai joasă decât în colorantul intercalat. Utilizarea EtBr permite vizualizarea ADN-ului în concentrație de 1-5 ng/bandă electroforetică.

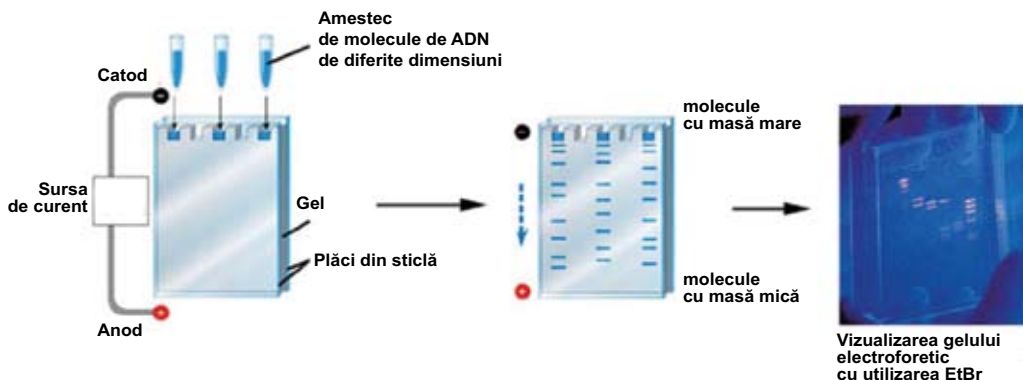


Figura 3.3. Principiul separării electroforetice

www.fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm

În scopul documentării finale a experimentului și posibilității de consultare a rezultatelor obținute, se recomandă fotografierea gelurilor, utilizând transiluminarea cu raze UV, care facilitează vizualizarea. Prezența unei benzi distincte (fig. 3.4.) denotă faptul că ADN-ul extras este de calitate bună, iar benzile precedate de urme sub formă de „cozi” sau „comete” demonstrează prezența impurităților în ADN-ul extras sau denaturarea acestuia.

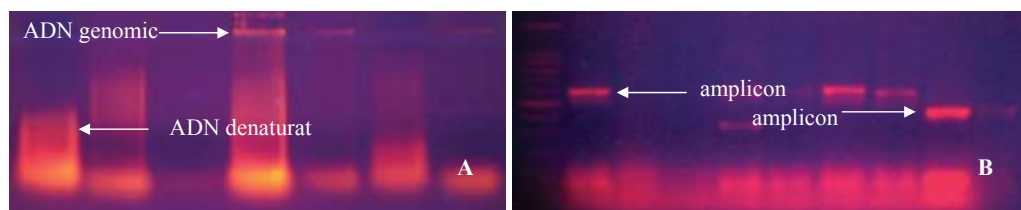


Figura 3.4. Electroforeza diferitor fragmente de ADN (rezultate obținute în cadrul LSB)

Electroforeza ADN se realizează concomitent cu un amestec de fragmente de ADN cu greutatea moleculară cunoscută – markeri moleculari în raport cu care se estimează dimensiunea fragmentelor de ADN (exprimată în pb) (fig. 3.5.).

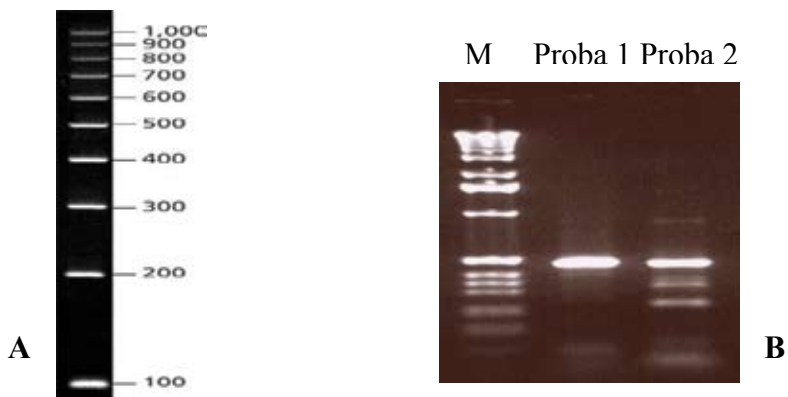


Figura 3.5. Exemple de markeri și de prezentare a rezultatelor obținute

- A. Markeri PCR 100 bp Low Ladder, (Sigma) ce conține 10 benzi (100 – 1000 pb)
 B. Exemplu de prezentare a rezultatelor unui screening OMG. M – marker ADN

<http://www.bioprofilelabs.com/WebFlyer.htm>

3.4. Estimarea conținutului de proteine și de ADN

Conținutul în proteine al unui produs biologic se determină prin mai multe metode: după conținutul de azot constituent, tehnici foto- și spectrometrice deosebindu-se prin sensibilitate și specificitate.

Dacă soluțiile de proteină sunt pure (nu conțin acizi carbonici, fenoli, alcooli, bicarbonați, care absorb lumina în zona ultravioletă a spectrului), mai simplu, rapid și cu o precizie mare se determină după metoda spectrofotometrică, ce se bazează pe proprietatea aminoacizilor aromatici de a absorbi lumina cu lungimea de undă de 280 nm, însă o atare metodă depinde de conținutul acestor aminoacizi în molecula proteică. Prezența în mediul experimental a fosfaților în concentrație de 5 mM, a clorurii de sodiu 0,9%, a sulfatilor 50 mM nu influențează rezultatele măsurării. De asemenea, nivelul de absorbție în ultraviolet depinde puțin de pH-ul mediului în diapazonul pH-ului de 2-10.

Densitatea optică a soluțiilor proteice în care solventul este: apa, NaCl 0,1-1M sau soluția-tampon fosfat de concentrație mică se determină la lungimea de undă de 280 nm în comparație cu proba-martor (solvent fără proteine). Probele se spectrofotometrează și pe baza curbei-etalon (pentru construcția căreia se utilizează soluție de proteină pură cu concentrația de 0,05-2,0 mg/ml) se determină concentrația de proteine în soluție.

Densitatea optică $E_{\frac{1 \text{ mg/ml}}{280 \text{ nm}}}$ variază de la 0,4 până la 1,5, în funcție de conținutul triptofanului și al tirozinei.

O altă metodă de cuantificare a proteinelor utilizată pe larg este metoda fotometrică după Bradford, care se bazează pe adsorbția specifică în mediu acid a

colorantului *Coomassie G-250* în urma interacțiunilor grupărilor amidice și sulfhidrilice ale proteinelor cu colorantul. Ca rezultat al adsorbției colorantului, soluția proteică devine de culoare albastră, a cărei intensitate este proporțională cu concentrația proteinei în soluție. Se supune analizei atât extractul proteinelor sumare, cât și cel al fracțiilor proteice.

La o alicotă de extract proteic, de exemplu, 0,1 ml, se adaugă 1/2 volume (0,05 ml) de acid tricloracetic 15% pentru precipitarea completă a proteinelor, care se efectuează timp de 15 minute la rece. Soluția cu proteine denaturate se centrifughează timp de 10 - 15 min. la 7 000 - 10 000 rot./min. Precipitatul se spală de 3 ori cu 0,5 ml ATA 5%, centrifugând de fiecare dată. Sedimentul proteic se dizolvă în 0,5 ml NaOH 0,3 N. După dizolvarea completă a proteinelor, pentru neutralizarea excesului de bază se adaugă 0,5 ml HCl 0,3 N.

Mediul de reacție: 0,06 ml soluție proteică, 0,24 ml NaCl 0,15 N și 3 ml reactiv *Coomassie*. Se agită bine și peste 20 minute se colorimetrează la fotoelectrocolorimetru la lungimea de undă 595 nm. În calitate de martor servește eprubeta, în care se introduc 0,06 ml H₂O distilată, 0,24 ml NaCl de 0,15 N și 3 ml reactiv *Coomassie*.

Atunci când valorile coeficientului de extincție a soluției proteice (mediului de reacție) se încadrează în limitele 0,050 - 0,600, concentrația proteinei μg/ml în probă se determină după formula (Полевой, 1996):

$$C = \frac{E_{595} \times V_1}{0,060 \times V_2}$$

Unde: C – concentrația proteinei în probă (μg/ml);
E – densitatea optică la λ=595 nm;
V₁ – volumul mediului de reacție, ml;
V₂ – volumul probei proteice, ml.

Concentrația proteinelor în probele care înregistrează densități optice mai mari sau mai mici decât cele indicate mai sus se calculează reieșind din curba-etalon, construită în prealabil, utilizând albumina serică bovină.

Pentru prepararea reactivului de colorare, se dizolvă 100 mg colorant *Coomassie brilliant G-250* în 50 ml C₂H₅OH (96%), apoi se adaugă 100 ml H₃PO₄ de 95% sau 111,76 ml H₃PO₄ de 85%. Soluția obținută se completează până la volumul de 1000 ml, se filtrează și se păstrează în vase de culoare închisă timp de două săptămâni la temperatura camerei.

Determinarea conținutului de ADN în probe este o etapă esențială în analiza ulterioară a lui, întrucât concentrațiile mici nu vor fi suficiente pentru reacțiile ulterioare (de exemplu, PCR), iar concentrațiile mari vor induce inhibarea acestora.

Concentrația de ADN poate fi determinată la fluorometru sau spectrofotometru, care permit cuantificarea ADN-ului până la nivel de nanograme (ng/μl).

ADN-ul poate fi detectat cantitativ direct în soluțiile apoase cu o concentrație slabă de săruri, înregistrând absorbția (densitatea optică – DO) în spectrul ultraviolet, la lungimea de undă de 260 nm. Pentru a calcula cantitatea de ADN în soluție, se consideră că o unitate de densitate optică la 260 nm corespunde pentru:

- soluția cu ADN dublu catenar – 50 $\mu\text{g/ml}$,
- soluția cu ARN sau ADN monocatenar – 40 $\mu\text{g/ml}$.

În calculul final al cantității de ADN se ține cont de diluție.

Pentru a evalua nivelul de contaminare a soluției de ADN cu proteine (proteinele absorb în lungimea de undă 280 nm și 260 nm), aceleași probe se spectrofotometrează și la $\lambda = 260$ nm. Se consideră că în cazul unei probe de ADN de o calitate bună, raportul $A_{260/280}$ trebuie să fie inclus în limitele 1,8 - 2,0. O contaminare cu fenol se analizează la $\lambda = 270$ nm. Contaminările condiționează o supraestimare a concentrației reale și pot inactiva enzimele utilizate în studiul ADN-ului. Soluția de ADN nu trebuie să fie foarte concentrată, prezintă o vâscozitate înaltă, cauzând erori de volum la pipetare.

Cantitatea ADN-ului poate fi estimată indirect cu valori aproximative în baza gelului electroforetic al ADN-ului utilizând markeri cantitativi. Însă în cazul Real-time PCR sau RCR-ului semicantitativ este necesară cunoașterea concentrației exacte a ADN-ului.

3.5. Exemple de protocoale



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JOINT RESEARCH CENTRE
INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION
COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR GM FOOD AND FEED



SAMPLING AND DNA EXTRACTION OF MAIZE TC1507

**Report from the Validation of the
„CTAB/Wizard” method for DNA extraction from ground maize grain/seed**

Validated method

Published on: **28/02/2005**

**Method development
and single laboratory validation:**
Pioneer Hi-Bred International
GeneScan Analytics GmbH

Method testing and confirmation:
Joint Research Centre – European
Commission, Biotechnology & GMOs Unit

PRELEVAREA PROBELOR ȘI EXTRAGEREA ADN-ului DIN PORUMBUL TC1507

REZUMAT

Scop și aplicare: Metoda „CTAB/Wizard” pentru izolarea ADN-ului este potrivită pentru izolarea ADN-ului genomic dintr-un număr mare de varietăți și matrice. Însă aceste date sînt validate pentru semințele de porumb. Aplicarea acestei metode la alte matrice necesită optimizare și validare specifică.

Prelevarea probelor de semințe de porumb TC1507 se va face în conformitate cu ghidul tehnic și protocoalele descrise de Commission Recommendation 2004/787/EC în contextul Regulation (EC) No 1830/2003.

Principiul de bază în izolarea ADN-ului constă în obținerea extractului apos cu o purificare ulterioară a ADN-ului de inhibitorii reacției PCR. Metoda „CTAB/Wizard” include lizarea celulelor în prezența CTAB, EDTA și proteinazei K urmată de înlăturarea ARN-ului prin digestie cu ARN-aza A și purificare de contaminanți cu ajutorul cloroformului. Sedimentarea ADN-ului se realizează prin precipitare cu izopropanol. Acest extract este în continuare purificat utilizând două produse comerciale disponibile: Wizard® DNA Clean-Up System (Promega) și gelfiltrare prin coloana S-300 HR MicroSpin Columns (Amersham Pharmacia).

DNA EXTRACTION

EXTRAGEREA ADN-ului

Metodă recomandată de MONSANTO, 2004. EC 1829/2003

www.gmo-crl.jrc.it/detectionmethods/MON-Art47-dnaextraction.pdf

REZUMAT AL ETAPELOR DE IZOLARE ȘI PURIFICARE A ADN-ului

Etape	Descrierea etapei și modul de lucru
I. Omogenizarea, liza țesuturilor și extragerea ADN-ului	6 g material vegetal se omogenizează cu 25 ml soluție de extragere ce conține: 24,25 ml soluție-tampon CTAB de extragere a ADN-ului (în prealabil încălzit până la 55°C), 0,5 ml 2-mercaptoetanol (2-ME) și 0,25 ml soluție 10 mg/ml proteinaza K, pentru ca concentrația finală a 2-ME să fie 2%, iar a proteinazei K-100 μg/ml. Probele se incubează la temperatura de 55°C, 60 min., după care timp de 10 min. soluția se aduce la temperatura camerei.
II. Deproteinizarea și purificarea de pigmenți și polizaharide	Se realizează cu 20 ml amestec de fenol: cloroform: alcool izoamilic (25 : 24 : 1). Tuburile se inversează sau vortexează atent. Se colectează faza apoasă în urma separării fazelor prin centrifugare timp de 10 min., la 13 000 g la temperatura de 20 - 25°C. Această etapă se poate repeta de două sau de mai multe ori, în funcție de gradul de contaminare a ADN-ului.
III. Izolarea ADN-ului prin sedimentare	La faza apoasă se adaugă 2/3 volum de izopropanol (răcit), fiind posibilă păstrarea în această formă de la 30 min. până la 3 zile. Se centrifughează la 13 000 g 20 min., la temperatura de 4°C.
IV. Resuspendarea ADN-ului și eliminarea ARN-ului	Sedimentul se dizolvă în 4 ml tampon TE cu pH-ul 8,0 la care se adaugă 40 μl ARN-aze 10 mg/ml și se incubează la 37°C, timp de 30 min.
V. Procedee repetate de purificare	Se adaugă 4 ml soluție cloroform: alcool izoamilic (24 : 1) și se centrifughează 10 min. la 13 000 g la temperatura camerei. Se transferă faza apoasă superioară în alt tub. Această etapă se repetă, apoi se adaugă atent jumătate de volum de acetat de amoniu 7,5 M și se amestecă prin inversare.
VI. Ultima etapă de purificare a ADN-ului	Se adaugă 2 volume de etanol 100%, se inversează atent și se menține la -20°C, timp de 30 min. sau se lasă peste noapte. Probele se centrifughează la 1 300 g timp de 20 min. la 4°C pentru a precipita ADN-ul. Sedimentul se spală de două ori cu etanol de 70%.
VII. Solubilizarea și păstrarea ADN-ului	ADN-ul se dizolvă în 1 ml soluție-tampon TE pH 8,0 și se incubează la 65°C timp de 1 oră cu agitare atentă. Probele se centrifughează la 16 000 g, timp de 10 min. la 4°C. Faza apoasă se transferă într-un nou tub și se păstrează la 4°C.

Reagenții necesari:

- **Soluție-tampon CTAB de extragere (2%)**: pentru 500 ml (poate fi păstrat la temperatura camerei, 5 ani): 10 g CTAB (1,5% w/v), 50 ml 1M Tris HCl, pH 8,0 (75 mM), 20 ml 0,05 M EDTA pH 8,0 (100 mM); 140 ml NaCl (5M); 290 ml apă distilată și autoclavată.
- **TE**, pH 8,0, pentru 250 ml (păstrare la temperatura camerei, până la 5 ani): 2,5 ml 1M Tris HCl (10 mM), 0,5 ml 0,5 M EDTA (1 mM). Se adaugă apă până la 250 ml, se filtrează și se sterilizează.
- **Etanol 70%** (pentru 200 ml): 140 ml etanol 100% cu 60 ml apă.
- **Proteinaza K** (10 mg/ml,) pentru 5 ml: 5 ml apă și 0,05 g proteinaza K.
- **ARNaze** (10 mg/ml), pentru 5 ml: 5 ml apă cu 0,05 g ARNaze, fiert 10 min.

DNA EXTRACTION

EXTRAGEREA ADN-ului

Metodă recomandată de JOINT RESEARCH CENTRE, 2004

(Soma M. *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms.*

Extraction and purification of DNA. Session 4, 2004, 18 p.)

Etape	Descrierea etapei și modul de lucru
I. Omogenizarea, liza țesuturilor și extragerea ADN-ului	Într-un tub Eppendorf se iau 100 mg material vegetal la care se adaugă 300 μl apă sterilă, deionizată și se agită. Ulterior sunt adăugate 500 μl soluție-tampon CTAB de extragere și se omogenizează, apoi se adaugă 20 μl proteinaza K (20 mg/ml), se agită și se incubează la 65°C, timp de 30-90 min. Ulterior probele se tratează cu 20 μl ARNazea A (10 mg/ml), se agită și se incubează la 65°C, timp de 5-10 min., după care se centrifughează la 16 000 g timp de 10 min. Supernatantul se transferă într-un tub nou.
II. Deproteinizarea și purificarea de pigmenți și polizaharide	La supernatant se adaugă 500 μl cloroform și se agită prin inversarea lentă a tuburilor timp de 30 secunde. Apoi se centrifughează la 16 000 g, 10 min., pentru a separa fazele. Se transferă 500 μl fază apoasă superioară într-un tub nou, care conține 500 μl cloroform, se inversează și apoi iarăși se centrifughează timp de 5 min. la 16 000 g., colectând faza superioară.
III. Izolarea ADN-ului prin sedimentare	La faza superioară colectată se adaugă 2 volume soluție-tampon CTAB de precipitare și se amestecă prin pipetare, după care se incubează timp de 60 min. la temperatura camerei. Probele sunt supuse centrifugării timp de 5 min. la 16 000 g. Supernatantul se aruncă.
IV. Resuspendarea ADN-ului și eliminarea ARN-ului	Precipitatul se dizolvă în 350 μl NaCl (1,2 M). Se adaugă 350 μl cloroform și se agită 30 secunde, după care se centrifughează timp de 10 min. la 10 000 g. Faza apoasă se transferă într-un tub nou la care se adaugă 0,6 volume de izopropanol și se agită. Separarea precipitatului are loc prin centrifugare timp de 10 min. la 16 000 g. Se înlătură supernatantul, iar la precipitat se adaugă 500 μl etanol 70% și se agită atent. Probele sunt supuse din nou centrifugării timp de 10 min., la 16 000 g. Supernatantul se aruncă.
V. Solubilizarea și păstrarea ADN-ului	Sedimentul ce conține ADN se dizolvă în 100 μl apă sterilă, deionizată. Soluția de ADN poate fi păstrată la - 4°C până la 2 săptămâni, iar la temperatura - 20°C, un timp mai îndelungat.

Reagenții necesari:

– Soluție CTAB de extragere:

- 20 g/l CTAB – 4 g
- 1,4 M NaCl – 16,4 g
- 0,1 M Tris HCl – 3,15 g
- 20 mM Na₂EDTA – 1,5 g
- Se adaugă 100 ml apă, pH-ul se aduce la 8,0 cu NaOH 1M. Soluția se aduce la 200 ml și se autoclavează.

– Soluție CTAB de precipitare:

- 5 g/l CTAB – 1 g
- 0,04 M NaCl – 0,5 g
- Se aduce la 100 ml cu apă, se ajustează pH la 8,0 cu NaOH 1M și se aduce la cotă până la 200 ml cu apă. Se autoclavează.



**THE ANALYSIS OF FOOD SAMPLES FOR THE PRESENCE
OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS. AGAROSE GEL
ELECTROPHORESIS.**

Metodă recomandată de Soma și Querci (*The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Agarose Gel Electrophoresis. Session 5, 2004, 18 p.*).

**TESTAREA PREZENȚEI ORGANISMELOR MODIFICATE GENETIC ÎN
PROBE ALIMENTARE. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AGAROZĂ**

REZUMAT

Electroforeza ADN-ului este ultima etapă în efectuarea screening-ului PMG. Ea servește pentru determinarea purității ADN-ului extras și electroforeza produselor de amplificare PCR (ampliconilor).

Etapele de preparare a gelului:

1. Prepararea gelului cu concentrația 0,8 - 2,0% (0,8 - 1% – ADN genomic, 2% – ampliconi). Tamponul pentru gel se prepară din TBE stoc de 10X până la concentrația finală de 0,5X. În funcție de concentrația gelului, se cântărește cantitatea respectivă de agaroză omogenizată cu volumul necesar de tampon 0,5X.
2. Amestecul se fierbe (3 ori) și se agită 3 min. Se răcește până la temperatura 40 - 50°C și se adaugă 2 - 4μl EtBr cu concentrația de 10 mg/ml. Amestecul se agită lent, timp de 1 - 3 min.
3. Gelul se toarnă în camera de electroforeză, în prealabil asamblată și uscată. Grosimea gelului este de 3 - 5 mm. Polimerizarea depinde de temperatură și durează 30 - 60 min.
4. Pieptenele se scoate, deasupra gelului adăugându-se apă sau tampon de migrare, ca să nu se deterioreze godeurile.
5. Gelul este plasat în camera de electroforeză, la care se adaugă tampon de migrare 0,5X TBE.
6. Pentru electroforeză se iau 10 μl probă cu ADN-genomic (3 μl apă, 2 μl de soluție de diluare a probei 6X („loading buffer”) și 5 μl ADN), iar în cazul ampliconilor – 2 μl SDP 6X și – 8 μl probă PCR și se aplică în buzunărașele gelului.
7. Se recomandă tensiunea de 5 - 10 V/cm.

Reagenții necesari:

Soluția-tampon stoc 10x TBE (1000 ml): Tris(hidroximetil)-aminometan (Tris) – 54,0 g; acid boric 27,5 g; Na₂EDTA 7,44 g. După dizolvarea completă se aduce la 1000 ml (pH= 8,3).

Soluția-tampon pentru probe 6x („loading buffer”) (10 ml): xilen cianol FF (0,025 g) și sucrosă (4 g).

CAPITOLUL 4

DETECȚIA PMG LA NIVEL DE EXPRESIE FENOTIPICĂ A TRANSGENELOR

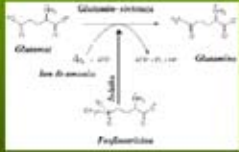
- 4.1. Genele-marker și raportoare utilizate în selecția PMG
- 4.2. Biotestul fenotipic al PMG
- 4.3. Exemple de protocoale

ERBICIDUL BASTA. Acțiunea fiziologică asupra plantelor


Erbicidul Basta conține, în calitate de component toxic, glufosinatul de amoniu sau fosfinitricină.

Este produs de către firmele: Bayer Crop Science, Seika, Monsanto, Aventis, etc.

Erbicidul a fost autorizat în Republica Moldova cu numărul de înregistrare 0044 (30.11.95).

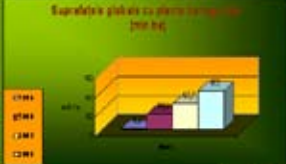



Schema de acțiune a glufosinatlui
Glufosinatul inhibă ireversibil enzima glutamin sintetaza




Erbicidul Basta, comercializat de Aventis

PMG în continua expansiune

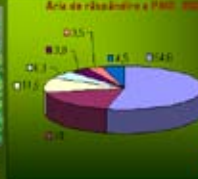



Ulaşaș de PMG, Argentina, 2002



VSG - Orleșu Impigresol, SLU, 2003

Aria de răspândire a PMG - 2006 (ha)



Țară	Procentaj (%)
Italia	49,2
Argentina	29,1
Chile	11,7
Spania	7,5
Franta	2,5
Alte țări	7,8

Genă bar codifică enzima PAT

Genă bar conține 550 pb. codifică și este integrată în nucleul PMG. A fost izolată de la microorganismul *Sphaerobacter hydranthus* (Llano et al., 1982).

Fosfinotric-N-acetiltransferaza este compusă din 162 de aminoacizi, are masa moleculară de 20,6 kDa. La electroliza în gel de poliacrilamidă, în prezența SDS, are pKa moleculară de 22-23 kDa.

PAT este capabilă să neutralizeze glufosinatul prin scindarea amino-grupului de acetoil.

ASPECTE DIN ACTIVITATEA LABORATORULUI SECURITATE BIOLOGICĂ

Capitolul 4. DETECȚIA PMG LA NIVEL DE EXPRESIE FENOTIPICĂ A TRANSGENELOR

Eficiența transformării genetice, indiferent de metoda de transfer utilizată, este extrem de redusă. Doar o parte dintre celule pot integra în genomul său genele străine, iar dintre acestea doar celulele totipotente regenerează o nouă plantă transgenică. Reieșind din aceste considerente, la fiecare etapă a procesului de modificare genetică sunt necesare sisteme eficiente de selecție, bazate pe gene-marker și gene raportoare.

4.1. Genele-marker și raportoare utilizate în selecția PMG

Selecția celulelor transformate reprezintă o componentă esențială a unui protocol de transformare, genele „de interes” fiind cointegrate, în construcțiile genetice, cu genele-marker. În unele cazuri, genele-marker reprezintă în același timp și gene „de interes” (de exemplu, genele de rezistență la erbicide). Frecvența de cotransfer al ambelor tipuri de gene este de 100% în cazul înlănțuirii acestora și de 50%, în cazul transferului în vectori separați. Ca și genele „de interes”, genele-marker sunt puse sub controlul promotorilor constitutivi: 35S CaMV, P-nos, P-FMV etc. (fig. 4.1.).

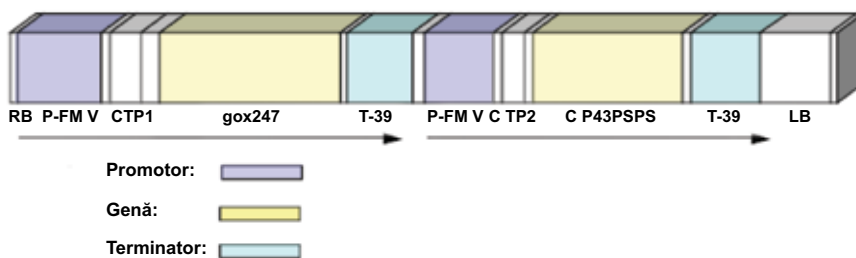


Figura 4.1. Harta liniară a regiunii ADN-T din constructul genetic PV-BNGT04 utilizat în obținerea rapiței modificate genetic GT73 tolerantă la erbicidul glifosat conferită de două gene-marker, CP4 EPSPS și goxv247.

(US-Patent-N^o: 6 248 876) <http://www.bats.ch/bats/en/index.php>

Genele-marker pentru selecția transgenelor sunt genele de rezistență la antibiotice sau erbicide, care permit creșterea și dezvoltarea celulelor transformate. Printre cele mai utilizate gene-marker se numără:

- gena *npt II* sau *neo* izolată din transpozonul Tn5 de la *E. coli K12*. Această genă codifică *neomicinofosfotransferaza II*, enzimă implicată în neutralizarea unor antibiotice aminoglucozidice ca neomicina și kanamicina. Pentru selecția PMG se recomandă concentrația de 100 mg/l kanamicină;
- gena *spt* izolată de la transpozonul Tn5 (Genbank: L19385) codifică *streptomycin-fosfotransferaza* și oferă rezistență la *streptomycină* la concentrația de 1 mg/ml;
- gena *npt* sau *hph* (Genbank: VO1499), care codifică enzima *higromicin-fosfotransferaza*, izolată de la bacteria *E. coli* și oferă rezistență la antibioticul aminoglicozidic higromicina B la concentrația 50 mg/l;

- Fosfinotricin-acetiltransferaza codificată de gena *bar* oferă rezistență la bi-alafos (fosfinotricină sau PPT) (Genbank: A02804). Concentrația recomandată este de 50 mg/l PPT.

- gena *epsps* codifică enzima *enolpiruvilșikimat-3-fosfatintaza* (EPSPS), ce conferă rezistență la glifosat. Rezistența plantelor la acest erbicid este conferită și de gena *aroA*, care codifică o altă enzimă EPSPS (Genbank: X63374). Selecția *in vitro* a celulelor are loc la concentrația de 0,5 mM glifosat.

Tabelul 4.1.

Principalele gene-marker folosite în selecția PMG

Agentul de selecție	Gena-marker	Markerul de selecție
kanamicină	<i>nptII (APH3'II)</i>	neomicinofosfottransferaza II
gentamicină	<i>aacC3, aacC4</i>	gentamicin-3-N-acetiltransferaza
higromicină	<i>hph, hpt (APH4)</i>	higromicinfosfottransferaza
metotrexat	<i>dhfr</i>	dihidrofolatreductaza
spectinomycină	<i>aadA</i>	aminoglicozidă-3-adeniltransferaza
blasticidină	<i>bsr</i>	blasticidin S deaminaza
sulfonamidă	<i>sul</i>	dihidropteratsintaza
fosfinotricină	<i>bar</i>	fosfinotricinacetiltransferaza
clorsulfuron	<i>als, csr-1</i>	acetolactatsintetază
bromoxinil	<i>bxn</i>	bromoxinilnitrilaza
glifosat	<i>gox</i>	glifosatoxidaza
2,4-D	<i>tfdA</i>	2,4-diclorfenoxiacetat monooxygenaza
ampicilină	<i>bla</i>	β- lactamaza

Genele raportoare sunt gene care codifică proteine/ enzime detectabile în celule sau extracte celulare, utilizate ca markeri pentru vizualizarea expresiei spațiale a genelor la un spectru larg de procariote și eucariote.

În calitate de gene raportoare se utilizează:

- gena *gus (uidA)*, care codifică enzima *β-glucuronidaza*, izolată de la *E. coli K12*. Conform datelor lui Jefferson R. A. și col. (1987), activitatea enzimei, aflată sub controlul promotorului 35S CaMV, este mai activă în țesuturile bătrâne comparativ cu cele tinere. Reacțiile catalizate de enzima GUS sunt:

1. *4-metilumbeliferyl-β-D-glucuronida (4-MUG) → 4-metilumbeliferonă (4-MU) + acid glucuronic*
2. *acid 5-brom-4-clor-3-indolil-β-glucuronic (X-gluc) + apă → acid uronic + 5-bromo-4-cloroindolil → (5-bromo-4-cloro)indigo*

- gena *luc*, care codifică enzima *luciferaza* și scindează luciferina ca substrat, rezultând bioluminescență, care poate fi cuantificată. Gena *luc* a fost izolată de la o specie de licurici (*Photinus pyralis*) din America de Nord, fiind exprimată și în plante. Enzima are masa moleculară de 61 kDa și reprezintă un monomer. Reacțiile de apariție a luminescenței, în urma oxidării luciferinei în prezența ATP, ionilor de calciu și enzimei luciferaza, au loc în două etape:

1. $\text{Luciferin\u0103} + \text{ATP} \rightarrow \text{Luciferiladenilat} + \text{PP}_i$
2. $\text{Luciferiladenilat} + \text{O}_2 \rightarrow \text{oxiluciferin\u0103} + \text{AMP} + \text{lumin\u0103}$

• gena *gfp* pentru proteina cu fluorescen\u0219\u0103 verde (Green Fluorescent Protein GFP) este izolată de la meduza *Aequorea victoria*. Se eviden\u0219iaz\u0103 \u00een \u0161esuturi intacte *in vitro* \u015fi *in vivo* \u00een lipsa oric\u0103rui substrat datorit\u0103 prezen\u021bei unui cromofor fluorescent, care emite luminescen\u0219\u0103 verde \u00een urma excit\u0103rii la lumina albastr\u0103 sau UV (maximum de adsorb\u021bie la $\lambda = 395$ nm). Poate fi fuzionat\u0103 cu alte proteine, permi\u0219\u00e2nd monitorizarea transportului \u015fi metabolismului acestora. \u00cens\u0103 gena *gfp*, ca \u015fi gena *luc*, nu se con\u021bine \u00een PMG aprobate pentru agricultura biotehologic\u0103, fiind utilizate doar pentru atestarea transgenezei organismelor utilizate \u00een cercet\u0103rile fundamentale.

Pentru viitor, se pune problema elimin\u0103rii complete a genelor-marker, care confer\u0103 rezisten\u0219\u0103 la antibiotice \u015fi erbicide. Eventualele consecin\u021be negative ale utiliz\u0103rii acestora asupra s\u0103n\u0103t\u0103\u021bii omului \u015fi protec\u021biei mediului ambiant, precum \u015fi riscul inser\u021biei lor \u00een genomul bacteriilor patogene au stimulat dezvoltarea unor strategii noi de selec\u021bie, bazate pe procese metabolice celulare endogene – **selec\u021bia pozitiv\u0103** (tab. 4.2.).

Cel mai frecvent utilizat sistem de selec\u021bie pozitiv\u0103 la cereale include gena-marker, care codific\u0103 enzima *fosfomanoz-izomeraza* (*man A* sau *pmi*) \u015fi manoz\u0103 \u00een calitate de factor de selec\u021bie. Celule transformate genetic posed\u0103 abilitatea de a izomeriza manoz\u0103-6-fosfat \u00een *fructozo-6-fosfat*, care poate fi imediat \u00e2ncorporat\u0103 \u00een c\u0103ile metabolice, \u00een timp ce cele non-transgenice acumuleaz\u0103 niveluri citotoxice ale *manoz\u0103-6-fosfat*, induc\u00e2ndu-se astfel \u00e2ncetinirea cre\u015fterii \u015fi \u00een final moartea celulelor (Reed \u015fi al., 1999; Brinch-Pedersen \u015fi al., 1999).

Tabelul 4.2.
Genele-marker utilizate pentru selec\u021bia pozitiv\u0103 a OMG
(Barcelo \u015fi al., 2001; Aragao \u015fi al., 2002)

Agentul de selec\u021bie	Gena	Enzima codificat\u0103	Reac\u021bia/ mecanismul de rezisten\u0219\u0103
Manoz\u0103	<i>manA (pmi)</i>	fosfomanoz-izomeraza	Manozo-6-fosfat \u2192 fructozo-6-fosfat
Xiloza	<i>xylA</i>	xiloizoizomeraza	Xiloza utilizat\u0103 ca surs\u0103 de C \u015fi H
Lizina \u015fi treonina	<i>lysC</i>	aspartatkinaza	Permite supravie\u021buirea celulelor MG datorit\u0103 sintezei metioninei
–	<i>lec</i>	–	Intensificarea proceselor de embriogeneza somatic\u0103 \u015fi regenerare
Citochinine sintetizate din izopentinil AMP ca precursor al acestora	<i>ipt</i>	izopentiniltransferaza	IPT \u2192 izopentinilAMP
–	<i>DOG^R1</i>	Deoxiglucizo-6-fosfatfosfataza (2-DOG-6-P)	DOG ^R 1 ofer\u0103 rezisten\u0219\u0103 la 2-deoxiglucoz\u0103

Pentru a evita transferul genelor de rezistență la antibiotice, a fost elaborat sistemul Cre-Lox, care reprezintă o recombinare situs-specifică (Du Pont, 1980), ce permite eliminarea genelor-marker după obținerea PMG la acțiunea unor stimuli specifici (fig. 4.2.). Mecanismul acestui proces constă în clivarea situsurilor *lox P*, de către enzima *Cre*, care flanchează ADN-ul-țintă, de exemplu gena-marker. Acest sistem este inclus în linia de porumb LY 038, ce conține gena *nptII*, înaintată pentru aprobare de UE.

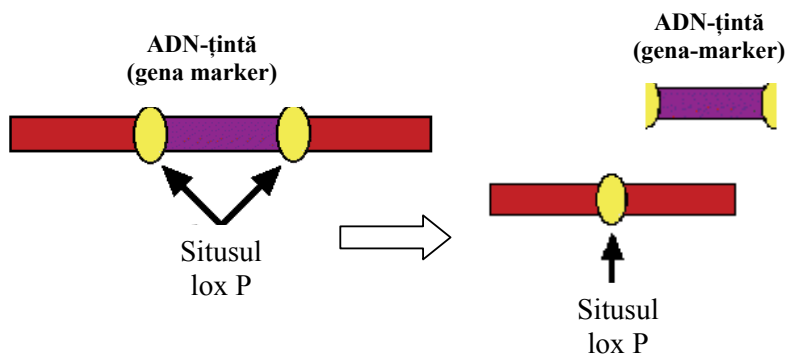


Figura 4.2. Mecanismul Cre/Lox de eliminare a genei-marker din genom

<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/CreLoxP.html>

4.2. Biotestul fenotipic al PMG

Prezența unor transgene introduse în genomul plantei poate fi atestată la diferite faze de dezvoltare prin utilizarea biotestelor aplicate atât în condiții *in vitro*, cât și *in vivo*. Vizualizarea fenotipică a expresiei genelor-marker, care conferă rezistență față de erbicide (de exemplu, Basta, Roundup) sau antibiotice (kanamicina, neomicina etc.), precum și a celor raportoare, prin monitorizarea produselor reacției enzimatică cu substratul specific (testul GUS și GFP), reprezintă metode preliminare de screening al PMG.

Testul aplicat plantelor cultivate *in vitro* se bazează pe creșterea și dezvoltarea materialului vegetal modificat genetic (semințe, explante de frunze, calus etc.) pe medii nutritive universale sau speciale, suplimentate cu factorul de selecție (erbicid, antibiotic etc.). În calitate de criteriu de apreciere a prezenței transgenelor servesc plantele dezvoltate normal, datorită toleranței față de agentul de selecție.

Aplicarea testului de expresie fenotipică a alogenelor, la care se poate apela cu ușurință în lipsa unui echipament și a reagenților speciali sau în cazul în care activitatea alogenei se manifestă la o anumită etapă de dezvoltare, reprezintă selectarea plantelor cultivate *in vivo* tratate exogen cu factorul de selecție prin stropire foliară. În acest caz, plantele susceptibile vor manifesta simptome de cloroză sau necroză. Spre exemplu, prezența genei marker *nptII* este confirmată prin imersarea frunzelor în soluții cu *kanamicină*, vizualizând procesul de depigmentare a frunzelor. Pentru selectarea semințelor transgenice se recomandă germinarea lor în prezența concentrației 100 mg/l *kanamicină*, analiza rezultatelor fiind efectuată după 1-2 zile, în baza numărului de semințe germinate ale PMG față de control.

Testele bazate pe germinarea semințelor sunt utilizate și pentru testarea și identificarea soiei rezistente la *glifosat* Roundup Ready. Se recomandă de germinat semințele timp de 16 ore la temperatura de 25°C, pe un substrat cu concentrația de 0-1,5% erbicid sau timp de o oră, la temperatura de 30°C, pe un substrat cu concentrația de 0-0,48% erbicid. În calitate de indici de evaluare servesc: facultatea de germinare, dimensiunile hipocotilului, rădăcinii și ale plantei întregi (fig. 4.3.).

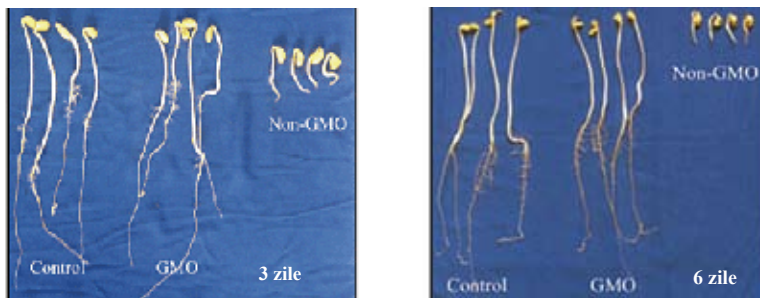


Figura 4.3. Biotestul semințelor de soia RR efectuat în diferite intervale de timp (3 și 6 zile) (Tillmann și al., 2004)

O metodă fenotipică de detectare a PMG, larg răspândită în transgeneză, o reprezintă identificarea histochimică a **genei gus**, bazată pe evidențierea produsului de reacție (compus albastru, stabil, bine pronunțat), obținut în urma activității enzimelor β -glucuronidaza în prezența unui substrat cromogen – *acidul 5-brom-4-clor-3-indolil- β -glucuronic* sau *X-gluc* (fig. 4.4. și fig. 4.5.).

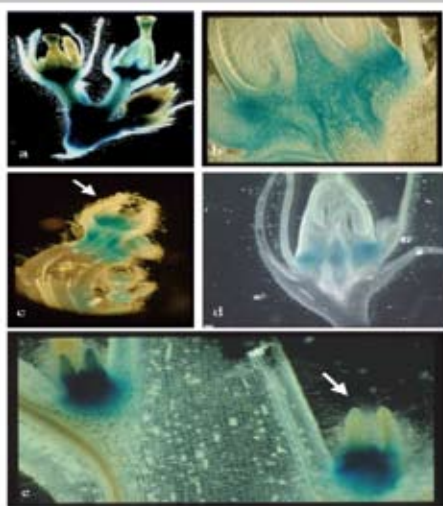


Figura 4.4. Detectarea histochimică a expresiei genei gus în diferite țesuturi și organe ale tutunului

Activitatea enzimatică este localizată în meristemele vegetative și reproductive active, a-d) la bazele florale și e) în ramurile vegetative emergente

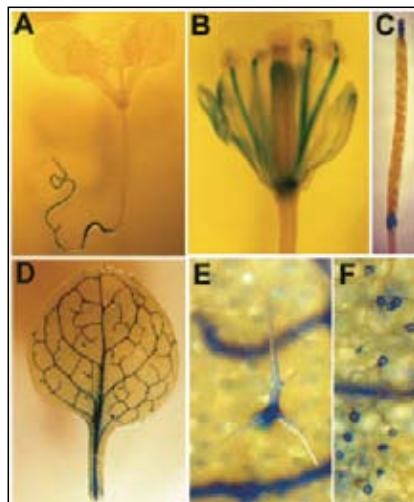


Figura 4.5. Testul GUS la plantele transgenice de *Arabidopsis thaliana*

A. – semințe germinate, B. – inflorescență, C. – silică, D. – frunză, E. – trihom, F. – celulele stomatice

De asemenea, monitorizarea produselor de reacție se bazează și pe identificarea transgenei **green fluorescent protein** (GFP), care pentru prima dată a fost aplicată în practică la nematoda *Caenorhabditis elegans* pentru studiul expresiei genelor *in vivo* (Tsien, 1998). Includerea și expresia genei *gfp* s-a realizat la conifere, citruși, *Arabidopsis*, tutun, grâu, porumb și sfecla de zahăr. Aceste proteine globulare compacte (se cunosc circa 20 tipuri de GFP cu masa moleculară aproximativă de 27 kDa) servesc drept markeri fluorescenți (fig. 4.6.) ai expresiei genelor în celulele intacte, în organismele animale, vegetale și bacteriene (Зубова, 2003).

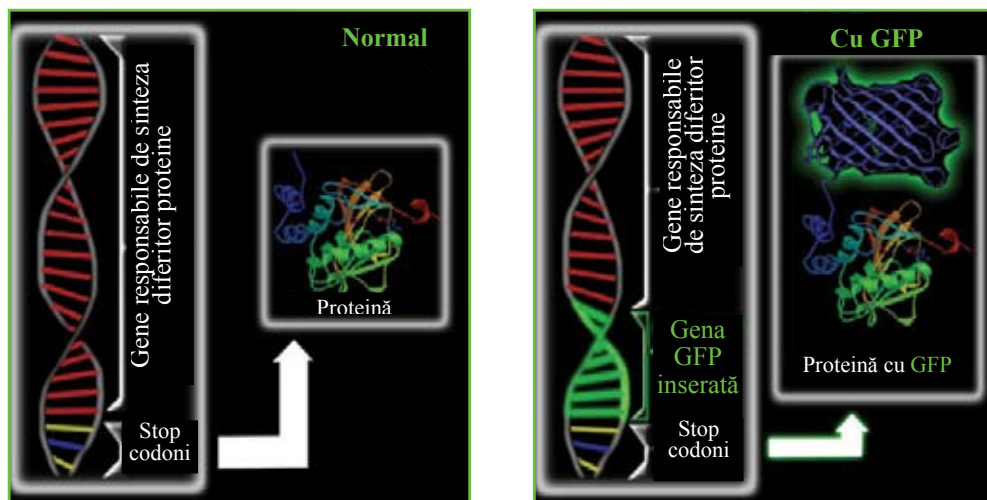


Figura 4.6. Inserarea genei GFP și vizualizarea expresiei acestei gene

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>

Identificarea GFP se bazează pe prezența unui cromofor fluorescent (fig. 4.7.), format ca rezultat al modificării prin ciclizarea a trei aminoacizi (*Ser-Tyr-Gly*) din pozițiile 65 - 67 ale polipeptidului nativ, care emite luminescență verde (maximum de absorbție la 509 nm) în urma excitării la lumina albastră sau UV cu maximum de absorbție la 395 nm (fig. 4.8.).

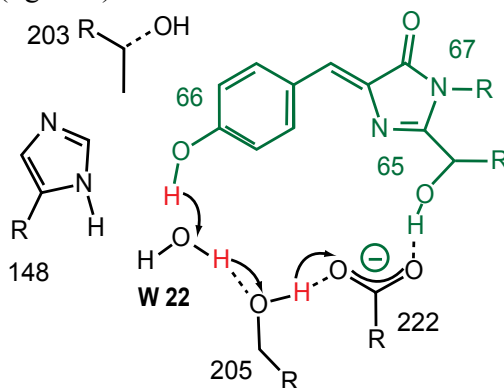


Figura 4.7. Structura cromoforului la GFP
(Tsien, 1998)

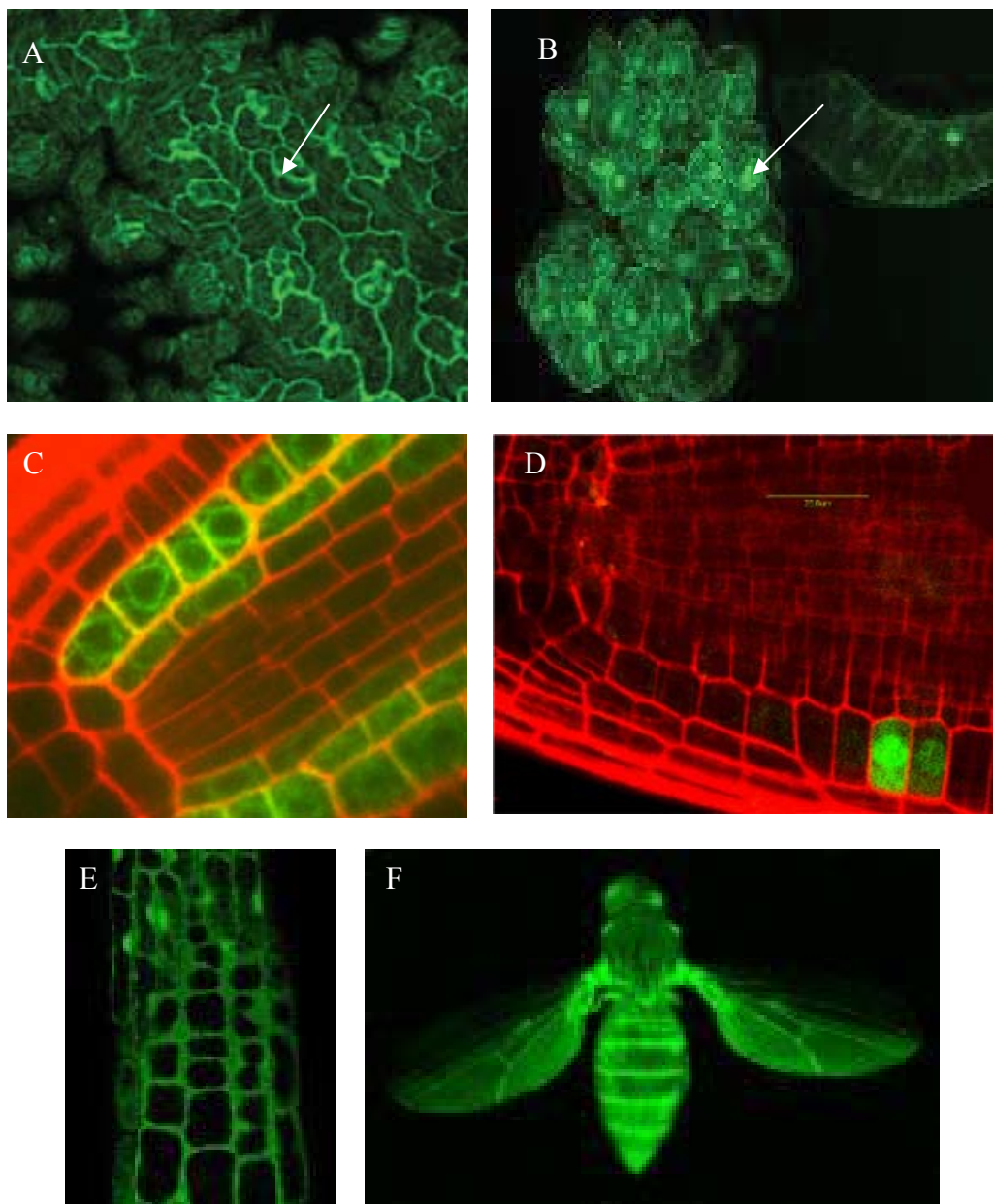


Figura 4.8. Detectarea *in vivo* a proteinei GFP la diferite organisme (săgeata indică prezența GFP)

Astfel, utilizarea testelor de selecție bazate pe evidențierea unui *marker genetic*, respectiv a unei proprietăți de care este responsabilă gena străină în planta-gazdă, prezintă una din primele etape în detecția PMG, care permite stabilirea prezenței caracterelor ce conferă toleranță la erbicide.

4.3. Exemple de protocoale

GUS GENE ASSAY IN TRANSFORMED TISSUES

TESTUL GUS APLICAT ȚESUTURILOR TRANSFORMATE GENETIC

Metodă recomandată de Dr. Paul J. Bottino, 2001

http://www2.biologie.fu-berlin.de/lampart/gp03/GUS_assay.html

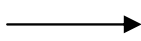
Analiza calitativă

Principiul metodei constă în identificarea produselor de expresie a genei *GUS* (*uidA*) printr-un test histochimic. Enzima β -glucuronidaza codificată de gena *uidA* utilizează ca substrat acidul 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronic (X-GLUC), cu formarea compusului (5-bromo-4-cloro) indigo de culoare albastră intensă și stabilă în apă și în mulți dizolvanți.

REZUMAT AL ETAPELOR TESTULUI CALITATIV GUS

Etapa	Descrierea etapei
I. Prepararea probei	Pentru analiză sunt luate 1-2 frunze, tăiate în secțiuni mici, care se incubează în 0,5 ml X-GLUC (5 mg X-GLUC dizolvat în 1,0 ml dimetil-formamidă, ajustat cu 50 mM NaPO ₄ pH 7,0 până la volumul 10 ml), timp de 1 oră sau 24 de ore, la temperatura de 37°C.
II. Spălarea probei	Spălarea secțiunilor cu etanol de 70% timp de cel puțin 5 minute, iar în cazul țesuturilor lipsite de clorofilă sunt necesare 4 ore.
III. Evaluarea rezultatului	Identificarea produselor de reacție ale transgenei se efectuează prin prezența culorii albastre, care poate fi vizualizată cu ochiul liber sau la microscop.

Test negativ



Test pozitiv

Evaluarea rezultatelor testului GUS

GUS GENE ASSAY IN TRANSFORMED TISSUES

TESTUL GUS APLICAT ȚESUTURILOR TRANSFORMATE GENETIC

Metodă recomandată de Dr. Paul J. Bottino, 2001

http://www2.biologie.fu-berlin.de/lampart/gp03/GUS_assay.html

<http://arabi4.agr.hokudai.ac.jp/ArabiE/protocols/general/transgen/leafgus.html>

Analiza cantitativă (Fluorimetric assay)

Principiul metodei constă în cuantificarea fluorometrică la $\lambda = 360$ nm a compusului fluorescent *4-metilumbeliferonă* (4-MU) rezultat în urma reacției enzimaticе dintre GUS și substratul *4-metilumbeliferil- β -D-glucuronida* (MUG).

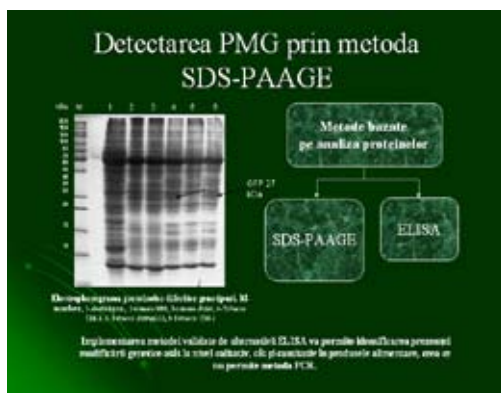
REZUMAT AL ETAPELOR TESTULUI CANTITATIV GUS

Etapa	Descrierea etapei
I. Prepararea probei	Se omogenizează 100 mg țesut vegetal în 100 μ l soluție de extragere (50 mM NaPO ₄ , pH 7,0; 10 mM ditiotreitol (DTT); 1 mM Na ₂ EDTA; 0,1% Sodium Lauryl Sarcosine, 0,1% Triton X 100) în tuburil Eppendorf, care se supun centrifugării timp de 5 min. la 4°C la 15 000 rot./min.
II. Incubarea	Se incubează cu 0,5 ml 1mM MUG la 37°C.
III. Omogenizarea	Se adaugă 50 μ l extract la 0,5 ml 1mM MUG și se omogenizează bine. La intervale de 30 min. - 1 oră se divizează în alicote a câte 100 μ l, în tuburi Eppendorf, care conțin 0,9 ml Na ₂ CO ₃ 0,2 M.
VI. Evaluarea rezultatelor	Se măsoară fluorescența probelor la fluorimetru și se determină cantitatea în nmol a 4-MU. Datele obținute se exprimă în nmol 4-MU/mg proteină/min.).

CAPITOLUL 5

ANALIZA MODIFICĂRILOR GENETICE LA NIVEL DE PROTEINE

- 5.1. Analiza proteinelor prin metoda ELISA
- 5.2. Analiza proteinelor prin testul „Lateral Flow Sticks”
- 5.3. Exemple de protocoale



ASPECTE DIN ACTIVITATEA LABORATORULUI SECURITATE BIOLOGICĂ

Capitolul 5. ANALIZA MODIFICĂRILOR GENETICE LA NIVEL DE PROTEINE

Procesele de obținere a PMG includ introducerea transgenelor a căror activitate se manifestă prin codificarea proteinelor specifice sintetizate *de novo*. Detectarea acestora prin diverse sisteme analitice cantitative și calitative constituie o cale de identificare a plantelor modificate genetic.

5.1. Analiza proteinelor prin metoda ELISA

Tehnologiile imunologice, bazate pe utilizarea anticorpilor, au devenit metode indispensabile în monitorizarea proteinelor sintetizate de transgene. Cel mai des utilizată este metoda bazată pe folosirea anticorpilor care „recunosc” proteinele specifice, formând complexul antigen-anticorp, care poate fi vizualizat prin adăugarea unui anticorp secundar sau marcat.

Testul de marcarea enzimatică (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (metoda ELISA) este unul de alternativă PCR (vezi cap. 6.) și permite identificarea proteinelor (enzimelor) codificate de transgene, cum ar fi, de exemplu, neomicin-fosfotransferaza (nptII), EPSPS, proteinele Bt, enzima PAT etc.

Metoda ELISA are ca principiu utilizarea unui marker enzimatic legat de un anticorp, antigen sau haptenă (substanță care reacționează cu anticorpul, dar nu induce sinteza de anticorpi – adică nu determină un răspuns imun). Prezența markerului enzimatic permite detectarea reacției antigen-anticorp. Deci antigenele sau anticorpul sunt cuplați covalent cu o enzimă (în locul radioizotopului sau fluorocromului). Cuplarea markerului enzimatic cu antigenele sau cu anticorpul se face cu ajutorul unor molecule

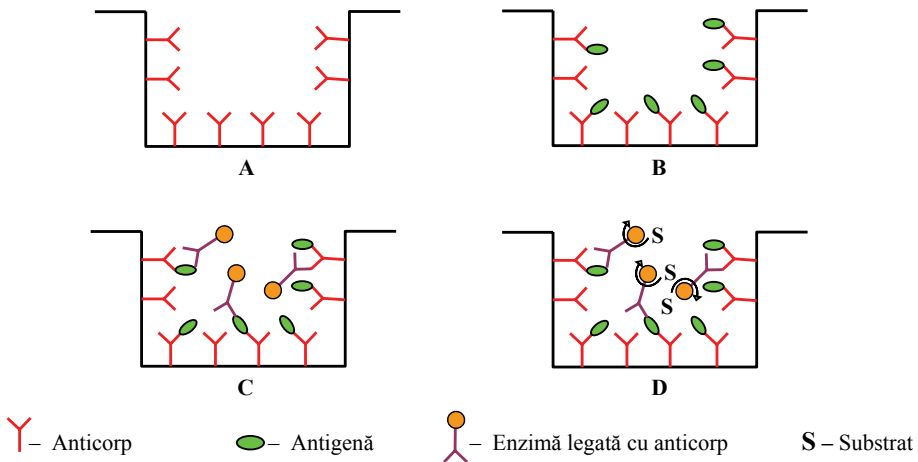


Figura 5.1. Prezentare schematică a principiului testului ELISA

A – Anticorpul specific antigenelor se atașează de suprafața solidă;
B – Adăugarea probei în care se pot conține sau pot lipsi antigenele;
C – Adăugarea enzimelor legate de anticorpi și conjugarea lor;
D – Adăugarea substratului cromogenic. În prezența enzimei se formează produși de reacție cu culoare modificată, care poate fi măsurată spectrofotometric.

bifuncționale care leagă cei doi compuși (fig. 5.1.). Evidențierea reacției antigen-anticorp se realizează prin degradarea unui substrat specific (marker enzimatic), urmată de o modificare de culoare, măsurată spectrofotometric. De exemplu, paranitrofenil fosfatul (galben) se utilizează pentru fosfataza alcalină; 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (galben) sau 3-Amino-9-etilcarbazolul (roșu) – pentru peroxidaza (tab. 5.1.).

Anticorpii – proteine „străine”, utilizați în astfel de analize, sunt obținuți în cantități suficiente prin sinteză în celulele organismului-gazdă (iepuri, șoareci etc.) drept rezultat al injectării substanței ce urmează a fi detectată (de exemplu, proteina CP4 EPSPS, care conferă rezistență la erbicidul Roundup). Ulterior, anticorpii sunt purificați și utilizați ca reagenți în detectarea substanțelor respective.

Tabelul 5.1.

Substratele enzimatice utilizate în testul ELISA

Substratul primar	Soluția-tampon/ Substratul secundar	Reagentul de stopare a reacției	Solubilitatea produsului format	Culoarea produsului format	Lungimea de undă pentru cuantificare
<i>Fosfataza alcalină</i>					
p-Nitrofenil fosfat (pNPP)	Na ₂ CO ₃ , pH 9,8 cu MgCl ₂	NaOH, 2M	Solubil	Galben	405 nm
Bromocloroindolil fosfat-nitro albăstru Tetrazoliu (BCIP/ NBT)	NaCl, MgCl ₂ , Dietanolamină	EDTA	Insolubil	Negru	–
<i>Peroxidaza</i>					
3,3',5,5'- Tetrametil-benzidină (TMB)	30% Peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂)	Acid sulfuric 1 M (H ₂ SO ₄)	Solubil	Galben	450 nm
o-Fenil-Diamină (OPD)	Soluție-tampon citrat-fosfat, 0,02% H ₂ O ₂	Acid sulfuric	Solubil	Portocaliu-cafeniu	492 nm
2,2'-azinodietil-benzotiazolin sulfonat (ABTS)	Soluție-tampon citrat-fosfat, 30% H ₂ O ₂	20% SDS / 50% DMF	Solubil	Verde	410 nm, 650 nm
Clornaftol	30% H ₂ O ₂	PBS	Insolubil	Albastru-negru	–
3-Amino-9-etilcarbazol (AEC)	30% H ₂ O ₂	PBS	Insolubil	Roșu	–
Diaminobenzidină (DAB)	30% H ₂ O ₂	PBS	Insolubil	Cafeniu	–

Actualmente, există mai multe tipuri ale acestei metodologii, și anume procedeul „Sandwich” ELISA și ELISA competitivă.

Metoda „sandwich” ELISA. O varietate a tehnicii imunoenzimatică este procedeul ELISA cu utilizarea a doi anticorpi („sandwich” ELISA) (fig. 5.2.), fiind unul dintre cel mai des utilizat în analiza transgenelor. Acest procedeu este rapid și simplu în efectuare. Dacă antigena standard purificată este competentă, atunci tehnologia permite și determinarea cantitativă a antigenului în proba cercetată. Testul dat necesită doi anticorpi, unul numit **anticorp de captare** și altul **de detectare**. Denumirea „sandwich” a acestei variante de ELISA provine de la complexul format dintre cei doi anticorpi între care se află legată antigena. Produsele formate sunt cuantificate prin măsurarea cantității de anticorpi secundari legați de matrice, utilizând substrat colorimetric.

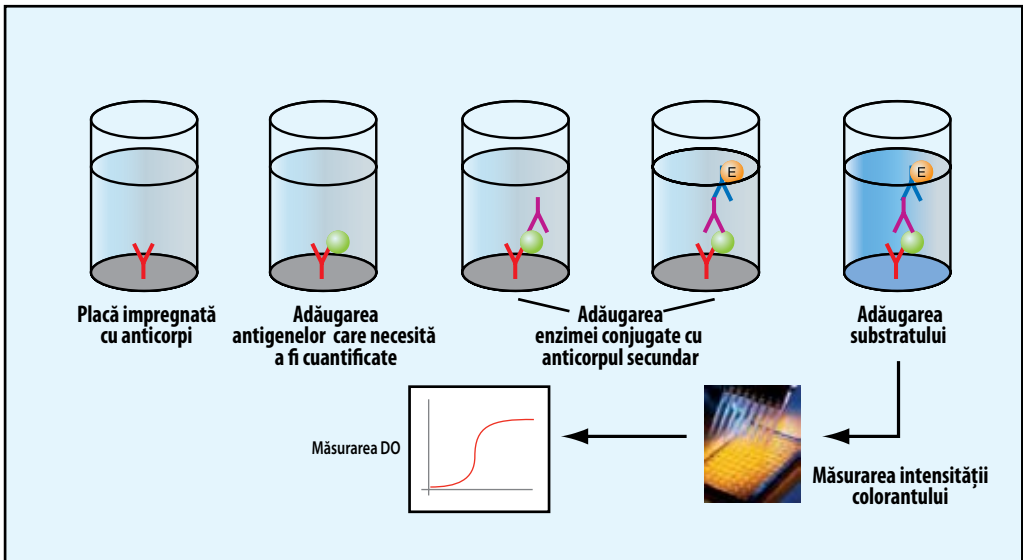


Figura 5.2. Etapele principale ale metodei „sandwich” ELISA

<http://images.google.md/imgres?imgurl=http://www.chemicon.com/images/ant101/A2ELIS>

Avantajele majore ale acestei tehnologii constau în specificitatea înaltă și în simplificarea etapelor de analiză, iar antigena nu necesită a fi purificată în prealabil înainte de utilizare. Dezavantajul metodei este că nu toți anticorpii pot fi utilizați. Combinările anticorpilor monoclonali trebuie să fie similare unei perechi compatibile, ceea ce înseamnă că ei pot recunoaște separat locurile specifice de legare cu antigena.

Sensibilitatea testului „sandwich” ELISA depinde de patru factori, și anume:

1. Numărul de molecule de anticorpi de captare, care sunt legați de faza solidă.
2. Reactivitatea primului anticorp față de antigenă.
3. Reactivitatea celui de al doilea anticorp față de antigenă.
4. Activitatea specifică a anticorpului de detectare.

Metoda ELISA competitivă. În cazul în care o pereche de anticorpi nu sunt potriviți pentru scopul propus, există o altă varietate a tehnologiei imunoenzimatică, și anume testul ELISA tip competitiv (fig. 5.3.). Pentru utilizarea acestui tip de ELISA, este necesar ca un reagent să fie conjugat cu enzima de detecție. Enzima poate fi linkată cu altă imunogenă sau anticorpi primar.

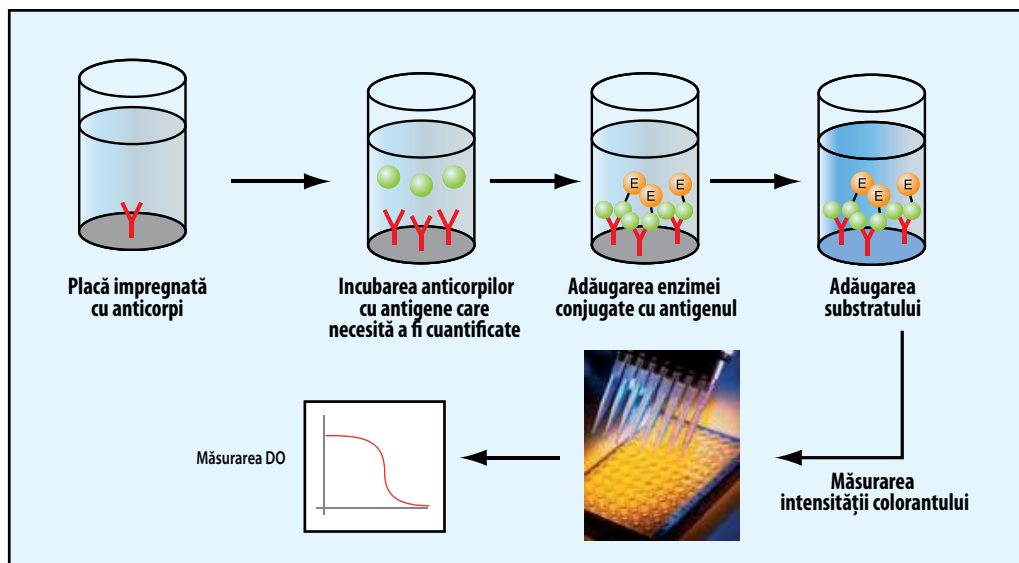


Figura 5.3. Etapele principale ale metodei ELISA competitivă

<http://images.google.md/imgres?imgurl=http://www.chemicon.com/images/ant101/A2ELISA>

Informații privind diverse aspecte referitoare la metodele ELISA de testare a PMG sunt accesibile pe site-ul <http://biotech.jrc.it/home/ict/methodsdatabase.htm#Database>, care include următoarele secții:

1. „General Data” – conține informații generale despre PMG.
2. „ELISA Methods Data” – include informația despre metodă, tipul de analiză necesar pentru efectuarea testării, descrierea proteinelor și anticorpilor.
3. „Validation Data” – referință la articole sau raportul de validare.

Limita de detecție în cazul metodei ELISA variază între 0,1 - 5,0% din conținutul total de proteine solubile. Cel mai des, testul ELISA este utilizat în detecția soiului RR, care conține proteina CP4-EPSPS, metodă implementată în 38 laboratoare ale UE și Elveției, și a porumbului Mon 810, ce conține proteina Cry1(AB), implementată în 20 laboratoare din 20 de state.

Actualmente, diferite companii comercializează kit-uri pentru testul ELISA în scopul detectării proteinelor specifice din produsele agricole. Frecvent utilizate sunt kit-urile destinate identificării unor proteine precum Bt, Cry1Ac, Cry1C, Cry3A, Cry2A, Cry9C, CP4 EPSPS și PAT.

5.2. Analiza proteinelor prin testul „Lateral Flow Sticks”

Testul „Lateral Flow Sticks” reprezintă o metodă calitativă și semicantitativă de determinare a proteinelor „străine” (de exemplu, CP4-EPSPS). Utilizarea acestei analize permite cuantificarea până la 0,15% PMG în lotul analizat, la un nivel de încredere de 99%.

Metoda dată poate fi utilizată pentru detectarea PMG, folosind ca material de cercetare frunze, semințe sau boabe. Panglicile din hârtie sau plastic servesc drept suport pentru captarea anticorpului și reprezintă locul de reacție. Principiul metodei constă în reacția de culoare obținută la interacțiunea dintre complexul proteina „străină” - anticorp și reagenții specifici de colorare. Apariția a două benzi de culoare roșiatică denotă prezența proteinei căutate (test pozitiv), iar depistarea doar a unei benzi (linia de control) denotă lipsa acesteia (test negativ) (fig. 5.4.).

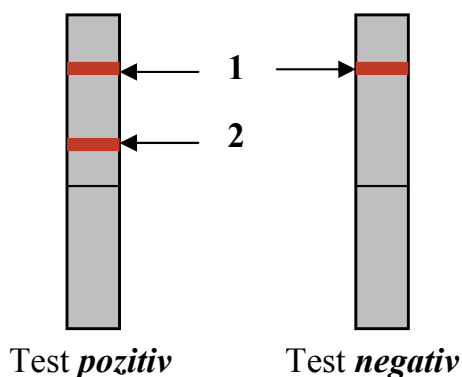


Figura 5.4. Rezultatul schematic al testării prin metoda „Lateral Flow Sticks”

- 1 – linia de control.
- 2 – linia ce denotă prezența proteinei căutate.

5.3. Exemple de protocoale



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JRC
JOINT RESEARCH CENTRE
INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTEC

VALIDATION OF IMMUNOASSAY FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN IN FOOD AND FOOD FRACTIONS USING

IDENTIFICAREA SOIEI TRANSGENICE PRIN METODA *ELISA*

Metodă propusă de către Lipp, Anklam și Stave

(Reference Materials. Journal of AOAC International, 2000, 83, p. 919-927)

și descrisă de Eyquem *(The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms, Session 12, Quantitative detection of Roundup Ready® Soybean by ELISA, 21 p.)*.

Principiul metodei constă în detectarea imunoenzimatică a proteinei CP4-EPSPS, care se află la linia de soia Roundup Ready®. Această metodă permite detectarea proteinelor în limitele 0,05 - 5% (w/w) în produsele alimentare, care conțin soia transgenică, procesate la temperatura nu mai mare de 65°C și nu mai mult de 60 min. Pentru testare se utilizează kit-ul (GMO food ingredient testing soia kit user's guide strategic diagnostics, Inc. Rev., 052099, Vers. 1.8.), destinat analizei imunoenzimatică a mediului de incubare în limitele de temperatură 15 - 30 °C.

Extragerea proteinelor se realizează din 0,5 g material în 4,5 ml tampon de extracție, urmată de agitare timp de 10 secunde și de centrifugare la 5 000 rot./min., timp de 15 min. Colectarea supernatantului se efectuează la temperatura de 2 - 8°C. Diluarea probelor se face în raport de 1 : 300 sau 1 : 10.

Procedura ELISA include următoarele etape:

- probele, materialul de referință standard și soluția-tampon se adaugă în godeurile plăcii de efectuare a reacției (volum 100 μl);
- incubarea probelor timp de 1 oră, la 37°C;
- spălarea de trei ori cu soluție-tampon;
- prepararea și distribuția anticorpilor conjugați în fiecare godeu al plăcii destinat testării (volum 100 μl);
- incubarea probelor timp de 1 oră, la 37°C;
- spălarea de trei ori cu soluție-tampon;
- distribuirea soluției de colorare în fiecare godeu (volum 100 μl);
- incubarea probelor timp de 10 min. la temperatura camerei;
- distribuirea soluției de stopare (stop solution) în fiecare godeu (volum 100 μl);
- măsurarea absorbției probelor din plăcile imunoenzimatică la $\lambda = 450 \text{ nm}$.

PRC-ELISA FOR THE CAMV-35S PROMOTER AS A SCREENING METHOD FOR GENETICALLY MODIFIED ROUNDUP READY SOYBEANS

SCREENING-UL OMG PRIN METODA PCR-ELISA DUPĂ PROMOTORUL 35S CaMV

Metodă recomandată de Brunnert, Spender și Borrchers (*PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. Eur Food Res Technol, 213, 2001, p. 366-371*).

Principiul metodei constă în hibridizarea specifică a produsului de amplificare PCR biotinitat cu probe dioxogenilate, colorimetrare prin imunodectare prin metoda ELISA. Metoda permite detectarea la 0,1 ng ampliconi timp de 2 ore.

Izolarea ADN-ului se recomandă de efectuat după metoda standard CTAB sau Wizard. Secvența primerilor 35S CaMV este accesibilă în baza de date Geen Bank (V00141) și publicația respectivă (Brunnert, Spender și Borrchers, 2001). Primerul 35S3-Bio conține la capătul 5' biotină. Produsul de amplificare este 191 pb în cazul combinației primerilor 35S3-Bio/35S2 și 136 pb – în cazul combinației primerilor 35S3-Bio/35S4-Dig. Limita de cuantificare este cuprinsă între 0,1-2%.

Mixul de reacție (volum final 25 μl)

<i>Reagentul</i>	<i>Concentrația</i>
AmpliTaq gold DNA polimeraza	0,5 u
tampon 10X	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,5 μM
primer	0,4 μM
ADN	1 μl

Programul PCR

<i>Etapele PCR</i>		<i>Condițiile</i>	
1.	Denaturare	95°C/10 min.	
2.	30-35 cicluri	Denaturare	95°C/30 sec.
		Extincție	55°C/30 sec.
		Elongare	72°C/60 sec.
3.	Elongare finală	72°C/5 min.	

Produsele de amplificare sunt separate în gel de agaroză de 1%, ce conține bromură de etidiu. Produsele de amplificare PCR sunt supuse procedurii *Southern blot* și ELISA. Pe parcursul procedurii PCR-ELISA, produsele biotinite PCR sunt legate la streptavidina atașată la suprafața plăcii de microtitrare. După hibridarea probei 35S4-Dig și imunodectării ulterioare prin metoda ELISA cu enzima conjugată *anti-Dig-Fab-fragment*, convertirea *p-nitrofenilfosfatului* în *p-nitrofenol* rezultă în semnal-ELISA la $\lambda = 405$ nm, care este proporțional cu cantitatea produselor PCR imobilizate.

TRAIT RUR LATERAL FLOW TEST USER GUIDE
TESTAREA PMG DUPĂ METODA „LATERAL FLOW STICKS”
Metodă recomandată de Strategic Diagnostics Inc., 2002

www.sdix.com/PDF/Products/7000026%20User%20Guide%20TraitChk%20Bt1%205min%20LeafSeed%20100T%20v1.0.pdf

Principiul metodei constă în cuplarea anticorpilor specifici pentru proteina transgenică CP4-EPSPS cu reagentul colorat de la unul din capetele panglicii destinate testului „Lateral Flow Sticks”. Când fâșia este imersată într-o cantitate mică de extract al PMG ce conține proteina respectivă, anticorpii sunt legați de colorant. Fâșiile conțin două zone de captare, una pentru proteinele codificate de transgena respectivă, alta pentru manifestarea colorantului specific. Prezența unei singure linii (linia de control) pe membrană indică testul negativ, iar prezența a două benzi – testul pozitiv.



Prima etapă a procedurii „Lateral Flow Sticks” este prepararea probei. Semințele de soia au greutatea diferite (0,076 - 0,293 g). Se recomandă efectuarea următorului calcul: se alege 100 semințe, care se cântăresc pe cântarul cu precizia de 0,01 g și se află media masei acestora. Se clasifică semințele după greutate. De exemplu, 100 semințe au masa de 1500 g, respectiv media va fi de 0,15 g. Se înmulțește cifra 0,15 cu numărul de semințe din fiecare grupă.

	<i>Clasificarea</i>			
Numărul de semințe de soia	60	125	250	700
Greutatea	9,00	18,75	37,50	105,0

Tabelul de mai jos conține informația privind volumul de apă adăugat și timpul necesar pentru mojararea materialului.

<i>Numărul de semințe</i>	<i>Volumul de apă (ml)</i>	<i>Timpul de mojarare (sec.)</i>
60	70	10
125	70	10
250	140	20
700	350	30
1000	700	30

Se iau 0,5 ml extract din probă și se transferă într-un tub de 1,5 ml în care se plasează un capăt al fâșiei și se menține 5 minute. Apariția a două linii indică testul pozitiv.

DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ELISA PROCEDURE (DAS-ELISA) PROCEDURA DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ELISA (DAS-ELISA)

Metodă recomandată de GreenPeace

www.greenpeace.org/raw/content/espana/reports/que-cantidad-de-toxina-bt-pro.pdf

Principiul metodei constă în determinarea cantitativă a proteinei Bt (Cry1Ab) în porumbul MG MON810 prin metoda DAS-ELISA.

Etapele de analiză includ:

Prepararea probelor. Frunzele de porumb se congelează la temperatura de -20°C pentru păstrare. Pentru analiză se iau 200 mg țesut vegetal omogenizat cu 3 ml soluție-tampon de extragere PBST (www.agida.com, SUA). Ulterior, 1,75 ml omogenat se toarnă în tubul de reacție cu volumul de 2 ml, se centrifughează timp de 10 minute la 12 mii rot./min. Supernatantul obținut, utilizat pentru analizele ulterioare, este transferat în alt tub, de 1,5 ml.

Testul ELISA. La 15,5 μl IgG nediluată se adaugă la 25 ml tampon (50 mmol/l carbonat, NaN_3 3 mmol/l, pH 9,6), amestecat bine. Apoi, 220 μl soluție IgG și soluție-tampon se pipetează în godeurile plăcii de imunoprecipitare, fiind acoperite apoi cu parafilm și incubate la 30°C , pentru 4,5 ore. După aceasta, soluția-tampon este transferată într-un alt vas destinat colectării, placa fiind spălată de două ori cu apă deionizată și apoi uscată.

Prepararea cubei de calibrare și probelor. 100 mg/ml proteină standard Cry1Ab este diluată în concentrații diferite (0,1-0,00001 $\mu\text{g/ml}$). 200 μl omogenat și concentrațiile de referință se adaugă în godeurile plăcii, acoperite apoi cu parafilm și incubate la temperatura de 10°C , timp de 16 ore.

După incubare, omogenatele cu proba se toarnă în vase de colectare, godeurile clătite cu apă deionizată utilizând pipeta multicanal (fără a rămâne picături de apă).

Prepararea soluției de conjugare (SDC) și spălarea: SDC are următoarea componență: 0,05 g albumină serică bovină, 0,5 g polivinilpirolidonă (PVP), 0,005 g MgCl_2 , 12,5 μl Tween 20, 25 ml PBS (fosfat 10 mmol/l, NaCl 137 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, NaN_3 3 mmol/l, pH 7,4) și 16,5 μl AP-marcant cu Ig.

200 μl SDC se pipetează în fiecare godeu, ulterior placa este acoperită cu parafilm și incubată la 30°C , 5,5 ore. După incubare, soluția este aruncată în vasul de colectare, placa spălată de 7 ori cu soluție PBST cu ajutorul pipetei multicanal. Se recomandă ca soluția PBST să stea în godeu 1 minut, după care soluția este înlăturată (fără a rămâne picături de apă).

Adăugarea soluției-substrat preparată conform rețetei: 25 mg 4-nitrofenil-fosfat diluate în 25 ml soluție (DEA 1 mol/l, NaN_3 3 mmol, pH 9,8) și amestecate 3 minute. Fiecare godeu al plăcii este umplut cu 200 μl soluție substrat cu ajutorul pipetei multicanal.

Evaluarea rezultatelor. După colorarea soluției, plăcile sunt supuse analizei la Microplate reader computer, pentru a măsura densitatea optică și a determina concentrația proteinei Bt.

CAPITOLUL 6

IDENTIFICAREA OMG LA NIVEL DE ADN – ANALIZA CALITATIVĂ

- 6.1. Analiza PCR
- 6.2. Screening-ul general al PMG
- 6.3. Exemple de protocole



PCR screening with NOS-Terminator

The diagram shows the NOS Terminator construct with 'Green gene M' and 'NOS terminator' regions. Below it, a table lists primer sequences and their efficiencies. To the right, images show plant seedlings and a gel electrophoresis image with lanes labeled M, N, Z, 2, 3, 4, 5, 7.

Primer	Nucleotide sequence	Conservation	Eff.	GC%
Forward	GATTCCTTAAACCTCC	95.000%	80%	52%
Reverse	CTCAAGCAATTCCTTTT	95.000%	92%	53%

PCR screening with CaMV35S

The diagram shows the CaMV35S construct with primer sequences for Forward and Reverse. Below it, a gel electrophoresis image shows bands for lanes A, M, C, P, T, G, F, A. The gel has two sections, each with lanes labeled M, G, P, T, E, P, M, C.

Primer	Sequence	Product size (bp)
Forward	TCAATTTCAGCAAGCCACTA P	336
Reverse	TTATGGTCACCAATTCCTTC	336
Forward	TTCAGGAGCAAGCAGGCAAT P	336
Reverse	TCTGAGAGTGTCTTCAAGGAA	336
Forward	TACTATGTTGAGGAGAGAG P	336
Reverse	TCTATAGTGGATGATAGTAT P	336

ASPECTE DIN ACTIVITATEA LABORATORULUI SECURITATE BIOLOGICĂ

Capitolul 6. IDENTIFICAREA OMG LA NIVEL DE ADN – ANALIZA CALITATIVĂ

În detecția și identificarea modificărilor genetice se utilizează în mod preponderent metode de analiză bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR). Metodele date se caracterizează prin sensibilitate și eficiență înaltă.

6.1. Analiza PCR

Reacția de polimerizare în lanț (Polimerase Chain Reaction – PCR) a fost elaborată în 1983 de către K. Mullis și reprezintă o metodă de replicare *in vitro* a unei regiuni de ADN cu o secvență nucleotidică cunoscută pentru atașarea primerilor în prezența *ADN-polimerazei*, care folosește una dintre catene ca matrice pentru sinteza catenei complementare noi.

Inițial, molecula de ADN este denaturată prin majorarea temperaturii, apoi are loc răcirea până la temperatura de aliniere a primerilor la regiunile-țintă, iar polimeraza assemblează nucleotidele (dNTP) conform principiului de complementaritate (fig. 6.1.). Astfel, în urma PCR, dintr-o moleculă de ADN se pot obține milioane de copii de fragmente specifice numite **ampliconi**.

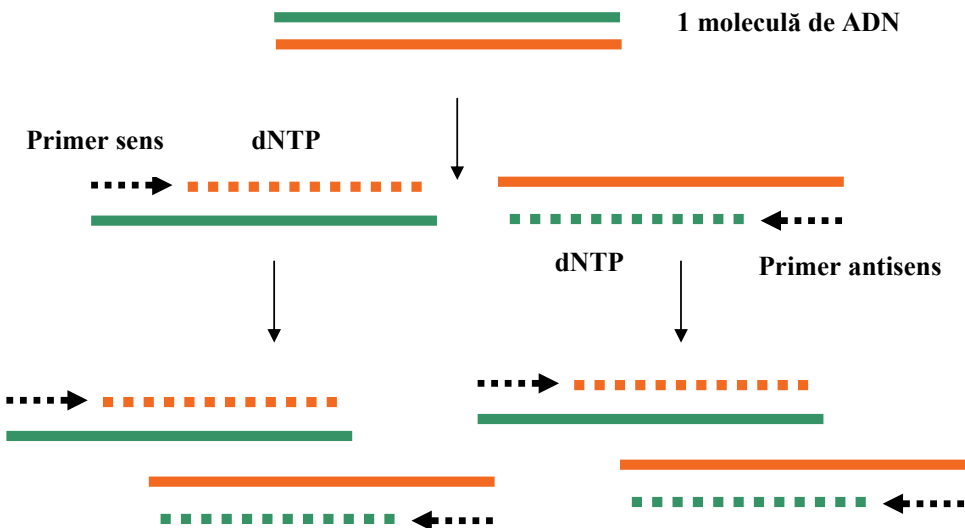


Figura 6.1. Schema generală a reacției PCR

Reacția PCR se realizează într-un aparat special numit **amplificator** sau **termocicler**, în condiții de sterilitate maximă a încăperii în care se lucrează. Soluția de reacție (mixul) conține un complex de componente:

1. **ADN-țintă.** Cantitatea de ADN utilizată în calitate de matrice depinde de mărimea genomului analizat (0,1 - 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ mediu de reacție). Surplusul de ADN poate inhiba reacția.
2. **ADN-polimeraza** (cel mai des se utilizează *Taq-polimeraza*, izolată de la bacteria *Thermus aquaticus*) – enzime termostabile, active la temperaturi

de 75 - 85°C (rezistente la 95°C). Pentru o reacție se utilizează între 0,5 - 2,5 unități enzimatiche.

- 3. Soluția-tampon pentru enzima ADN-polimeraza.** Parametrii acestui mediu depind de tipul de enzimă utilizată. Soluția-stoc se comercializează în concentrația de 10X și conține KCl sau MgCl₂ și Tris HCl cu pH-ul optimal pentru activitatea enzimei (circa 8,3). Ionii de Mg²⁺ stimulează activitatea enzimei, însă excesul lor (concentrația de 10 mM inhibă enzima cu 40 - 50%) poate scădea specificitatea enzimei. Se recomandă concentrația de 1,5 - 5,0 mM ioni Mg²⁺.
- 4. dNTP** reprezintă cele patru tipuri de dezoxiribonucleotide (ATP, GTP, CTP, TTP) necesare în cantități egale pentru sinteza ampliconilor ADN. Concentrația recomandată este de 20-200 μM (0,2 mM). Dacă numărul de cicluri este mai mare, atunci concentrația poate fi majorată până la 500 μM.
- 5. Apa** se utilizează pentru ajustarea volumului reacției până la 10 - 100 μl. Se recomandă de utilizat apă bidistilată, autoclavată și trecută prin filtre speciale (milipor). Pregătirea mediului are loc în tuburi sterile de tip Eppendorf.
- 6. Primerii** (tab. 6.1.) sunt secvențe scurte de ADN monocatenar (8 - 25 baze), complementare cu regiuni specifice ale ADN-ului, care necesită a fi replicate. Primerii sens și antisens trebuie să posede temperaturi de topire cu valori apropiate și o succesiune a nucleotidelor terminale care să evite alinierea lor reciprocă. Pentru 30 de cicluri de amplificare este suficientă o cantitate de 1 μM primer.

Design-ul primerilor reprezintă un aspect crucial în succesul PCR și se realizează cu utilizarea programelor software (Meyer, 1995), conform anumitor criterii:

- specificitatea maximă a primerilor;
- lungimea primerilor nu trebuie să depășească 18-30 nucleotide;
- evitarea primerilor bogați în G și C, repetitivi sau secvențe autocomplementare;
- selectarea primerilor cu temperatura înaltă de aliniere;
- evitarea utilizării primerilor - dimeri.

Procesul de replicare sau amplificare decurge conform unui program cu parametri strict determinați (fig. 6.2.):

1. Ciclul I. Denaturarea inițială a ADN-ului, care decurge la temperatura de 95°C timp de 1 - 5 minute. În această etapă catenele de ADN se despiralizează.

2. Ciclul II include trei pași:

- **Denaturarea** are loc la temperatura de 95°C și durează de la 30 secunde până la 2 minute (dacă raportul G/C este prea mare, atunci denaturarea decurge pe parcursul a 3 - 4 minute).
- **Alinierea** durează de la 30 secunde până la 2 minute, iar temperatura de aliniere (*T_a*) depinde de temperatura de topire a primerilor (*T_m*).

**Lista celor mai utilizați primeri în testarea PMG
și mărimea produselor de amplificare (ampliconilor)
(CORESTA, Baza de date JRC)**

<http://www.biotech.jrc.it/home/ict/methodsdatabase.htm#Database>

Nr. d/o	Denumirea primerului	Mărimea ampliconului	Sucesiunea nucleotidică a primerului
1.	<i>35S CaMV</i>	195 pb	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'
2.	<i>35S CaMV</i>	123 pb	5'-CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG-3' 5'-TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3'
3.	<i>35S CaMV</i>	207 pb	5'-CCTACAAATGCCATCATTGCG-3' 5'-GGGTCTTGCGAAGGATAGT-3'
4.	<i>35S CaMV</i>	227 pb	5'-AAGGGTCTTGCGAAGGATAG-3' 5'AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT-3'
5.	<i>35S CaMV</i>	195 pb	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' 5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG-3'
6.	<i>NOS-terminator</i>	180 pb	5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG-3' 5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA-3'
7.	<i>NOS-terminator</i>	118 bp	5'GCATGACGTTATTTATGAGATGGG-3' 5'GACACCGCGCGCGATAATTTATCC-3'
8.	<i>Higromicin fosfotransferaza (hph)</i>	839 pb	5' CGC CGA TGG TTT CTA CAA-3' 5' GGC GTC GGT TTC CAC TAT-3'
9.	<i>Higromicinfosfo-transferasa</i>	839 pb	5'-CGCCGATGGTTTCTACAA-3' 5'-GGCGTCGGTTTCCACTAT-3'
10.	<i>CryIA (b)</i>	211 pb	5'-CTCTCGCCGTTTCATGTCCGT-3' 5'-GGTCAGGCTCAGGCTGATGT-3'
11.	<i>Regiunea 5' de fuzionare a genomului porumbului și 35S CaMV promotor</i>	170 pb	5'-TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG-3' 5'-TCCATCTTTGGGACCCTGTGC-3'
12.	<i>Fosfinotricin N-acetiltransferaza (PAT) și 35S CaMV terminator</i>	209 pb	T25-F7 5'-ATGGTGGATGGCATGATGTTG-3' T25-R3 5'-TGAGCGAAACCCTATAAGAACCC-3'
13.	<i>Neomicinfosfotransferaza (nptII)</i>	173 pb	5' GGA TCT CCT GTC ATC T-3' 5' GAT CAT CCT GAT CGA C-3'
14.	<i>nptII</i>	215 pb	5'-CTCACCTTGCTCCTCCGAGA-3' 5'-CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG-3'
15.	<i>nptII</i>	173 pb	5'-GGATCTCCTGTCATCT-3' 5'-GATCATCCTGATCGAC-3'
16.	<i>Poligalacturonaza (PG) și NOS-terminator</i>	350 pb	5'-GGATCCTTAGAAGCATCTAGT-3' 5'-CATCGCAAGACCGGCAACAG-3'
17.	<i>Poligalacturonaza și NOS-terminator</i>	351 pb	5'-GGATCCTTAGAAGCATCTAGT-3' 5'-CATCGCAAGACCGGCAACAG-3'

- La această etapă primerii sunt atașați la catena de ADN-matrice. De obicei, în majoritatea cazurilor *Ta* este de 55 - 65°C. Dacă *Ta* va fi mai mare decât cea recomandată, atunci amplificarea nu va avea loc, iar în cazul în care ea va fi mai mică, vor apărea ampliconi nespecifici. Se recomandă ca *Ta* să fie cu 1 - 5°C mai mică decât *Tm*. Valorile *Tm* se calculează după formula:

$$Tm = 2(A + T) + 4(G + C)$$

- **Extincția (elongarea)** reprezintă sinteza catenelor complementare de către ADN-polimeraza. De obicei, această reacție decurge la temperatura de 72 - 75°C. Timpul de elongare depinde de lungimea fragmentului amplificat, fiind de circa 1 min. Enzima are o viteză de asamblare de 2 - 4 kb/min.

Numărul de repetări variază între 25 - 40 și depinde de concentrația soluției de amplificare.

3. Ciclu III. Extincția finală durează 5 - 15 min., la temperatura de 72 - 75°C. Dacă în ADN predomină A și T, temperatura recomandată este de 60°C.

În urma efectuării reacției PCR se obțin **ampliconi**, a căror mărime depinde de distanța la care s-au aliniat cei doi primeri și se exprimă în perechi de baze (pb). Amplificonii pot fi păstrați la 4°C, iar timpul de păstrare trebuie redus la minim.

Pentru confirmarea reacției PCR, se utilizează două tipuri de teste:

- *testul pozitiv; și*
- *testul-negativ.*

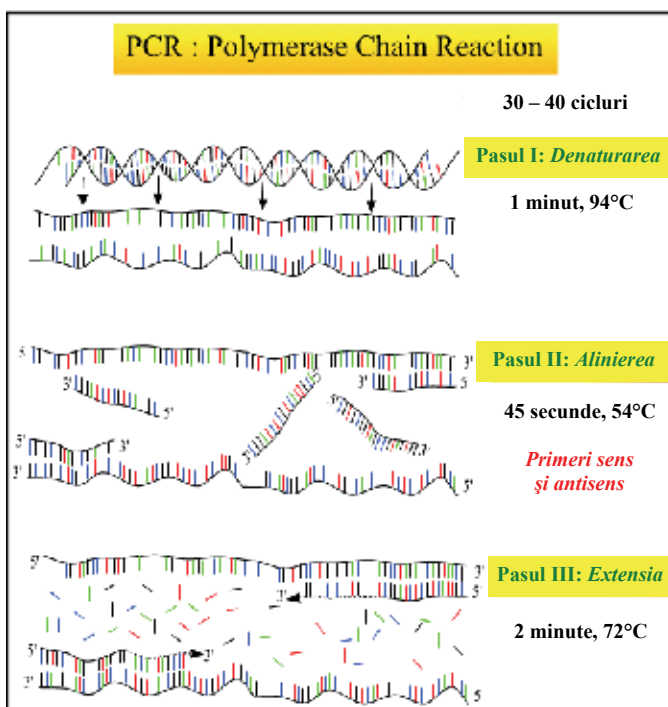


Figura 6.2. Prezentare schematică a reacției de polimerizare în lanț

În calitate de test pozitiv se comercializează diverse kit-uri cum ar fi **GMO Genomic DNA Standard Set**, care includ ADN-ul de la porumbul transgenic GA21, CBH-351 și NK-603. Fiecare probă conține 250 ng de ADN, ce însumează diverse elemente transgenice: *35S CaMV promotor* (NK-603 și CBH-351) și *NOS-terminator*. În calitate de *test pozitiv* poate fi utilizat și ADN-ul extras din linii de plante transgenice sau vectori de transformare, utilizați în obținerea PMG, cum este, de exemplu, pCambia 3300, care conține gena *bar* (fig. 6.3.).

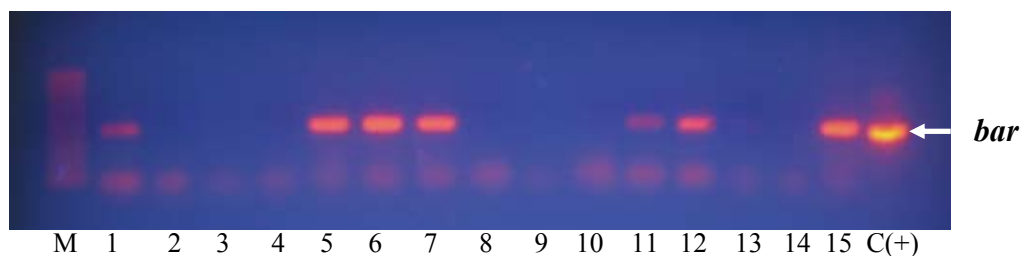


Figura 6.3. Electroforeza produselor de amplificare ale genei *bar*

M – Marker, C(+)- control pozitiv (plasmidul pCambia 3300)

Testul negativ reprezintă proba care conține toate componentele necesare pentru PCR, cu excepția ADN-ului. Dacă în urma efectuării reacției apar ampliconi, rezultă că sunt nesterili reagenții, vesela.

6.2. Screening-ul general al PMG

În ultimul timp sunt elaborate diverse variații ale metodei PCR de detecție a PMG, inclusiv Multiplex PCR, care permit identificarea mai multor secvențe de ADN în aceeași reacție de amplificare (fig. 6.4.). Însă cel mai frecvent utilizată rămâne a fi metoda clasică a reacției PCR, cu utilizarea primerilor complementari cu secvențele genetice incluse în genom (de obicei, promotor și/sau terminator) și analiza rezultatelor în baza electroforezei ampliconilor obținuți.

În majoritatea cazurilor, în transformarea genetică a plantelor se utilizează promotorii *35S CaMV*, *NPTII*, *Act*, iar în calitate de secvențe terminator al transcripției – *NOS* terminatorul genei nopalinsintaza din plasmida Ti al *A. tumefaciens* (vezi cap. 1.), ceea ce a determinat utilizarea acestora pentru detectarea sau **screening-ul PMG**.

Utilizarea acestor elemente transgenice în detecția PMG posedă atât avantaje, cât și dezavantaje (tab. 6.2.), care trebuie luate în considerație la efectuarea analizelor.

Testarea PMG după secvența 35S

CaMV permite detectarea tuturor liniilor de soia, orez și unele linii de porumb MG. Testul după două secvențe, *35S CaMV* și *NOS*, permite identificarea tuturor liniilor de porumb, soia, orez, tomate, sfeclă de zahăr și a unor linii de bumbac. Detectarea simultană a secvențelor *NOS* și *35S CaMV*, în plantele supuse testării, sporește probabilitatea identificării alogenelor (tab. 6.3.).

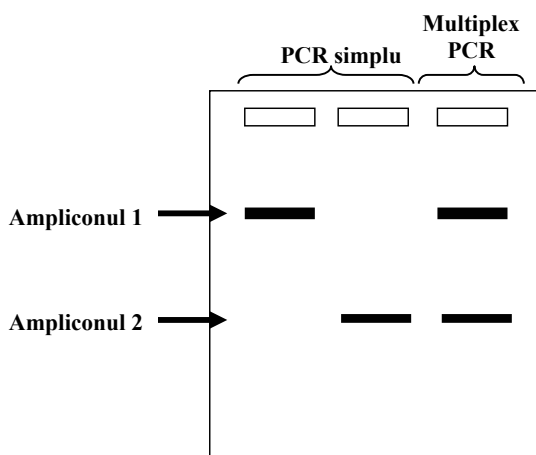


Figura 6.4. Exemplu comparativ al rezultatelor obținute prin PCR clasic și Multiplex-PCR

Tabelul 6.2.

Aspecte comparative ale elementelor transgenice conținute în PMG

www.coresta.org

Secvența	Avantaje	Dezavantaje
35S CaMV promotor	Sunt în majoritatea PMG	Nu este detectat în toate cazurile posibile
	Există tehnologii de identificare bine puse la punct	
	Puține culturi sunt afectate de virusul ce conține 35S	
nptII	Marker utilizat des în PMG	Nu este detectat în toate cazurile posibile
		Se conține în bacterii
		Poate avea omologi endogeni
NOS terminator	Comun pentru multe PMG	Nu este detectat în toate cazurile posibile
	Există metode de detectare bine puse la punct	Se conține și în <i>Agrobacterium</i>
Transgene specifice	Sunt specifice fiecărei linii de PMG	Uz limitat

Tabelul 6.3.

**Detectarea unor linii de PMG cu ajutorul secvențelor
35S CaMV și NOS terminator
(Elke Anklam si al., 2002)**

Linia	35S CaMV	NOS
Tomate		
Flavr Savr	+	-
B, Da (TGT4)F	+	+
1345-4	+	+
8338	+	-
35 1N	-	-
Event 5345	+	?
Soia		
Roundup Ready	+	+
Porumb		
Bt 11	+	+
MON 810	+	+
NK 603	+	+
Bt 176	+	-
T 14, 25	+	-
GA 21	-	+
MON 863	+	+
B 16	+	-
MS 3	+	+
MON 809	+	+
Bt xtra	+	-
CBH 351	+	+
MS 6	+	+
MON 830	+	+

Notă: „+” secvența este prezentă, „-” secvența lipsește, “?” – nu se cunoaște

Eforturile savanților biologi din întreaga lume sunt orientate spre acumularea de rezultate și spre completarea bazelor de date, care servesc la cercetări fundamentale și aplicative. Astfel, sunt cunoscute secvențele diferitor primeri și dimensiunea ampliconilor obținuți în urma reacției PCR pentru detectarea mai multor PMG (tab. 6.4.).

Tabelul 6.4.

**Secvența primerilor și dimensiunea ampliconilor obținuți în urma reacției
PCR pentru detectarea PMG (Hemmer, 1997)**

<i>Secvența-țintă</i>	<i>Primer 1 (5' => 3')</i> <i>Primer 2 (5' => 3')</i>	<i>Amplicon (pb)</i>	<i>Culturile PMG detectate</i>
PG antisens P-35S	AGGGGAAAGTGGAAAACCATC CCACTGACGTAAGGGATGACG	427	Tomate
PG antisens P-35S	TTTGGAGCTAAGGGTGATGGA AGTTCATTTCATTGGAGAGGACA	472	
PG sens P-35S	GAAGATCTGCATGGACCTGAAAA AGTTCATTTCATTGGAGAGGACA	478	
nptII P-nos	GAACTCGTCAAGAAGGCGATA GTTCAAATGCGCCTAAGGTC	943	Cartof
gena IIIA nos 3'	CTACTGATTACGGTGCTGCTA TGAATCCTGTTGCCGGTCTTG	658	
P-35S PVX cp	CCACTGACGTAAGGGATGACG CCAGTTCATACCCTGGAGC	502	
P-35S CTP (CP4 epsps)	TGATGTGATATCTCCACTGACG TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT	172	Soia
P-35S dhfr	ATCATTGCGATAAAGGAAAAGGC CTGCCTCGACTATCCAAACCA	540	Porumb
P-35S dhfr	ATCATTGCGATAAAGGAAAAGGC AAAGCCACAAAAGTCCCAT	840	
P-35S nos 3'	CAATCCCCTATCCTTCGC CATCGCAAGACCGGCAACAG	890	Tomate
cat lacZ	TTTGTATTCTGAGCATAGTGA ATAGCGACGAGAGTTAG	623	Microorganismе
kat A cat	CAGCGACTTGAGAAAAACGAGTG TGTCAGATAGGCCTAATGACTG	1321	
nptII ocd	TATCGCCTTCTTGACGAGTTC CTGTGGCGGGAACCTCCACGA	401	Tomate
ocd gena IIIA	CGATCCTGAGCGACAATATGA TAGCAGCACCGTAATCAGTAG	660	
als	CAGGTCAAGTGGCAGCTAGGATG GGCTGCTGTCTTCCAATCT	642	Bumbac
aphIV (higromicin- fosfotransferaza)	CGCCGATGGTTTCTACAA GGCGTCCGTTTCCACTAT	839	Cartof
barnase	CTGGGTGGCATCAAAAGGGAACC TCCGGTCTGAATTTCTGAAGCCTG	160	Porumb
barstar	TCAGAAGTATCAGCGACCTCCACC AAGTATGATGGTGATGTCGACGCC	235	
gus	TCCGTAGAAAACCCAACC GCTAGCCTTGTCATTG	674	Papaia
gus	ACGTCCTGTAGAAAACCCCAA CCCCTTCGAAACCAATGCC	1097	Lucernă
nptII	GAACAAGATGGATTGCACGC GAAGAACTCGTCAAGAAGGC	785	
nptII	GGATCTCCTGTCACT GATCATCCTGATCGAC	173	Tomate, cartof
nptII	GGTGCCCTGAATGAACTG TAGCCAACGCTATGTCTT	ca. 500	Microorganismе
nptII	CTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAG AAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCAT	489b	
nptII	CCGACCTGTCCGGTGCCC CCGCCACACCCAGCCGGCC	475	Soia
PG (poligalacturonaza)	CGTTGGTGCATCCCTGCATGG GGATCCTTAGAAGCATCTAGT	180 (380)a	Tomate
P-TA29	CTTTTTGGTTAGCGAATGC CTACCATGGTAGCTAATTTT	880	Tutun
T-nos (= nos 3')	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG TTATCCTAGTTTGGCGGCTA	180	Soia

Doar pentru identificarea liniilor de porumb modificat genetic (tab. 6.5.) sunt selectați numeroși primeri folosiți în funcție de tipul transgenelor utilizate.

Tabelul 6.5.

Lista primerilor utilizați pentru detectarea PMG
(Lih-Ching Chiueh si al., 2002)

<i>Primerul</i>	<i>Secvența 5'-3'</i>	<i>Transgena</i>	<i>Ampliconul (pb)</i>
CDPK-cry 03	CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT	CDPK-pro/ sens	211
CDPK-cry 04	GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT	<i>cryIA(b)</i> / antisens	
HS01-cry	AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT	<i>hsp70</i> / sens	194
CR01	GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT	<i>cryIA(b)</i> / antisens	
CM03	CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA	CaMV/ sens	231
PA01	AGA TCA TCA ATC CAC TCT TGT GGT G	<i>pat</i> / antisens	
T25 1-5'	GCC AGT TAG GCC AGT TAC CCA	<i>pat</i> / sens	149
T25 1-3'	TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CCT	35S terminator/ antisens	
Bt11 1-5'	CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C	<i>adh1-1S</i> IVS6/ sens	110
<i>cryIA</i> 1-3'	TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC	<i>cryIA(b)</i> / antisens	
GA21 1-5'	ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG	OTP/ sens	270
GA21 1-3'	TCT CCT TGA TGG GCT GCA	<i>m-epsps</i> / antisens	
CM03	CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA	CaMV/ sens	170
CBH02	GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT	<i>cry9C</i> / antisens	
ZE01	TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG	<i>Ze 1</i> / sens	329
ZE02	GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT	<i>Ze 1</i> / antisens	

Reușita analizei PCR poate fi verificată prin mai multe căi, și anume:

1. **Electroforeza ampliconilor**, care permite stabilirea mărimii aproximative (utilizând markeri ADN) a produselor de amplificare și compararea ei cu mărimea teoretică așteptată.
2. **Analiza Southern Blot** – separarea electroforetică a ampliconilor, transferul lor pe membrană și hibridarea cu ADN-ul specific. Analiza de hibridare permite determinarea secvențelor transgenice aplicând procedeul de hibridare a ADN-ului cu o sondă marcată pe bază de *denaturare-renaturare*, proprietate ce permite formarea moleculelor hibride dintre ADN/ADN, ADN/ARN sau ARN/ARN în baza complementarității bazelor azotate. Principiul de hibridare permite detectarea cu mare eficiență a genelor încorporate în vectorii de clonare prin teste de hibridare, ce utilizează „sonde” moleculare marcate radioactiv (de obicei, cu izotopi ^{32}P), care sunt evidențiate prin autoradiografie.
3. **Efectuarea PCR-ului repetat (Nested PCR)**. Principiul metodei constă în utilizarea a două seturi de primeri și a două programe diferite de amplificare. În prima etapă, o pereche de primeri este utilizată pentru obținerea ampliconului, care va servi ulterior ca matrice-țintă pentru sinteza ampliconului doi, conform programul doi de amplificare (fig. 6.5.). Astfel, în gelul de electroforeză

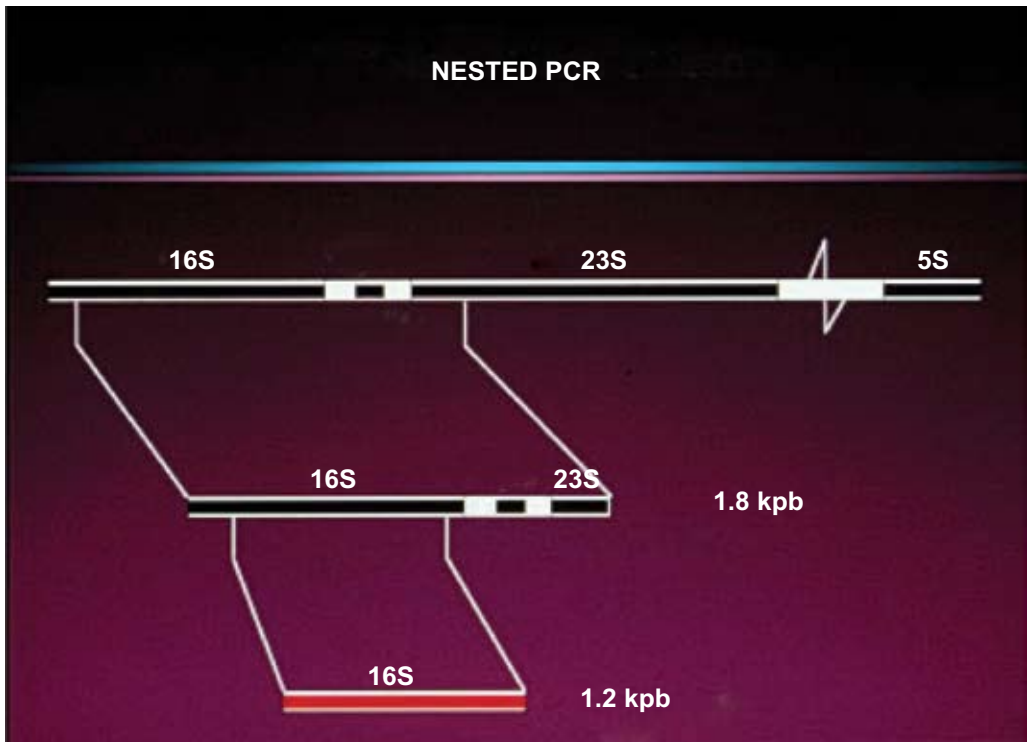


Figura 6.5. Exemplu de Nested-PCR în baza genei 16S

<http://www.ars.usda.gov/pandp/docs.htm?docid=11318>

se vor vizualiza doi ampliconi, unul cu masă mai mare și altul cu masă mai mică. Această metodă reduce substanțial amplificările nespecifice.

4. Secvențierea nucleotidică a ampliconilor și compararea cu baza teoretică de date reprezintă cea mai eficientă verificare a rezultatelor PCR. Analiza succesiunii nucleotidelor din cadrul secvenței amplificate permite identificarea cu exactitate a tipului transgenei incluse în genom.
5. Analiza restricțională a ampliconilor obținuți în urma reacției PCR cu ajutorul enzimelor endodezoxiribonucleazice. Ca exemplu de aplicare a enzimelor de restricție în analiza PCR servește analiza ampliconului obținut în urma PCR (130 pb) specific porumbului Bt10 (fig. 6.6.). Acesta este digerat cu ajutorul enzimei SspI (incubată 1 oră, la 37 °C) și supus electroforezei în gel de agaroză de 3%. În urma digestiei sunt obținute 2 fragmente: unul de 77 pb și altul de 53 pb.



Figura 6.6. Succesiunea de nucleotide a produsului de amplificare PCR a genei Bt10. Enzima SspI recunoaște situsul AATATT



6.3. Exemple de protocoale

EUROPEAN COMMISSION
 DIRECTORATE GENERAL JOINT RESEARCH CENTRE
 INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION
 COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR GM FOOD AND FEED



DETECTION METHOD FOR EVENT BT 10 USING A QUALITATIVE PCR ASSAY DETECȚIA CALITATIVĂ A PORUMBULUI BT 10 PRIN PCR

Metodă elaborată de:
 Syngenta Crop Protection AG
Metodă validată: 22-04-2005

Joint Research Centre – European Commission, Biotechnology & GMOs Unit
 JRC a validat această metodă de testare conform regulamentului EC 1829/2003 și deciziei din 18 aprilie, 2005 (2005/317/EC) privind testarea liniei neautorizate de porumb Bt10.

<http://gmo-crl.jrc.it/statusof doss.htm>

Principiul metodei constă în testarea liniei de porumb Bt 10 prin metoda standard PCR, utilizând primeri specifici pentru gena Bt10.

Probele de ADN utilizate în testul screening sunt obținute prin extragere după metoda Nucleospin Food (Macherey-Nagel GmbH, cat n.740 945.250).

Concentrația ADN-ului este determinată la fluorometru cu reactivul-kit PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes). Soluția de lucru are concentrația de 10 ng ADN/μl. Calitatea ADN-ului este verificată în urma efectuării electroforezei în gel de agaroză de 1,2%, utilizând 3 μl probă. Mărimea ampliconului obținut în urma reacției PCR este de 130 pb. Analiza ampliconilor se face în gel de agaroză 2,7%. Sensibilitatea metodei este de sub 0,1%, iar limita absolută de detecție este sub 20 copii.

Mixul de reacție

Reagentul	Concentrația-stoc	Concentrația finală	μl la probă
Apă			15,38
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,50
Soluție-tampon	10x	1X	2,50
dNTP	25 mM fiecare	160 μM	0,16
Primer sens	100 μM	0,6 μM	0,15
Primer antisens	100 μM	0,6 μM	0,15
Taq-polimerază	5U/μl	0,032 U/μl	0,16
ADN	10 ng/μl	50 ng/probă	5,00
Volumul final			25,00

Secvența primerilor

primer sens (JSF3)	5'-CACACAGGAGATTATTATAGGG-3'
primer antisens (JSF3)	5'-GGGAATAAGGGCGACACGG-3'

Condițiile de amplificare

Etapile PCR		Condițiile	
1.	Denaturare	94°C/10 min.	
2.	40 cicluri	Denaturare	94°C/25 sec.
		Extincție	62°C/30 sec.
		Elongare	72°C/45 sec.
3.	Elongare finală	72°C/7 min.	

DETECTION OF EXOGENOUS GENES IN GENETICALLY MODIFIED PLANTS WITH MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION SCREENING-UL PMG PRIN METODA MULTIPLEX PCR

Metodă elaborată de Zhen Tao, Xing-Feng Cai, Sheng-Li Yang și al.

(Detection of exogenous genes in genetically modified plants with multiplex polymerase chain reaction. Plant Molecular Biology Reporter, 19, 2001, p. 289-298)

Principiul metodei constă în utilizarea simultană a 7 perechi de primeri, destinați detectării respectiv a 7 secvențe genetice diferite, incluse în genomul PMG prin metoda PCR. Cu ajutorul protocolului respectiv, pot fi detectați în același timp promotorul, terminatorul, gena de selecție, gena raportoare și gena „de interes”.

Mixul de reacție

Reagentul	Concentrația-stoc
Soluție-tampon pentru enzimă	1x
Ioni Mg ²⁺	2 mM
dNTP	200 μM
Taq-polimeraza	2,5 U
Primerii (secvența disponibilă în articolul original)	0,2; 0,4 sau 0,6 μM
ADN	1 - 10 ng
Volumul total	25 μl

Condițiile de amplificare

1.	Denaturare	99°C/5 min.
2.	8 cicluri	95°C/5 sec.
		56°C/15 sec.
	32 cicluri	95°C/5 sec.
		6°C/15 sec.
3.	Elongare finală	72°C/2 min.

Produsele de amplificare (ampliconii) au următoarele dimensiuni totale și dimensiuni ale fragmentelor de restricție tăiate cu enzimele respective:

Primeri	Amplicon	Enzima de restricție	Ampliconii obținuți în urma restricției
P35S	210 pb	<i>Xmn I</i>	98 și 112 pb
PNOS	110 pb	<i>Nsi I</i>	39 și 71 pb
TNOS	159 pb	<i>Alu I</i>	98 și 61 pb
NPTII	295 pb	<i>Alu I</i>	114 și 181 pb
GUS	318 pb	<i>Alu I</i>	138 și 180 pb
EPSPS	175 pb	<i>Alu I</i>	134 și 41 pb
CpTI (cowpea trypsin inhibitor)	249 pb	<i>EcoRI</i>	141 și 108 pb

Enzimele de restricție (10 - 15 U) sunt adăugate la 15 μl de ADN amplificat, incubat timp de 2 ore, la 37°C, iar separarea fragmentelor este efectuată în gel de agaroză de 3%.

SCREENING FOR GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN FOOD

SCREENING-UL ORGANISMELOR MODIFICATE GENETIC ÎN PRODUSELE ALIMENTARE

Metodă elaborată de Spoth și Strauss

(*Screening for Genetically Modified Organisms in Food Using Promega's Wizard® Resin*, www.promega.com, p. 23-25).

Principiul metodei constă în identificarea OMG prin metoda PCR, utilizând primeri specifici pentru promotorul 35S CaMV și NOS-terminator.

Ampliconii obținuți în urma reacției PCR în cazul 35S CaMV au dimensiunile de 195 pb, iar în cazul NOS – 180 pb. Electroforezei sunt supuse 10 μl volum de reacție PCR și 2 μl soluție-tampon pentru probe (loading buffer 6X). Electroforeza este efectuată în gel de agaroză 1% cu soluție-tampon TAE 1X. Expresia benzii depinde de % de ADN, ce conține aceste elemente transgenice. Utilizarea protocolului dat permite detectarea OMG la limita de detecție 0,1%.

Mixul de reacție

O reacție	O reacție	10 Reacții PCR
PCR (μl)		Mixul (μl)
ADN (5–10 ng/μl)	5	--
Primerul 1 (50 pmol/μl)	1	10
Primerul 2 (50 pmol/μl)	1	10
10X tampon de reacție	10	100
MgCl ₂ (25 mM soluție)	6	60
dNTP (10 mM)	2	20
<i>Taq</i> ADN polimeraza (5 u/μl)	0,5	5
Apă	74,5	745
Volumul total	100	950

Secvența primerilor

Primerii pentru promotorul 35S CaMV și NOS-terminator	
35S CaMV	
Sens:	5' GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3'
Antisens:	5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'
NOS-terminator	
Sens:	5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'
Antisens:	5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'

Condițiile de amplificare

Etapile PCR		promotorul 35S CaMV	NOS-terminator
1.	Denaturare	98°C/2-3 min.	95°C/3-4 min.
2.	40 cicluri	Denaturare	95°C/20-50 sec.
		Extincție	54°C/30-40 sec.
		Elongare	72°C/40-60 sec.
3.	Elongare finală	72°C/3 min.	72°C/3min.

STUDY ON THE DETECTION METHOD OF SIX VARIETIES OF GENETICALLY MODIFIED MAIZE

DETECTAREA A ȘASE VARIETĂȚI DE PORUMB TRANSGENIC

Metodă elaborată de Lih-Ching Chiueh și al. (*Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods. Journal of Food and Drug Analysis, 2002, 10(1), p. 25-33*).

Principiul metodei constă în efectuarea unei simple reacții PCR, utilizând primeri specifici pentru detectarea liniilor de porumb: Event 176 (Novartis), Bt11 (Novartis), MON810 (Monsanto), T25 (AgrEvo), CBH-351 (AgrEvo), și GA21 (Monsanto) la limita de detecție mai mică de 0,1% (w/w).

Mixul de reacție

Soluția stoc	Cantitatea, μl
Primeri (100 μM)	2 (fiecare primer)
ADN-polimeraza (2,5 unit/ μL)	2
dNTP (200 μM)	8
Soluție-tampon Mg^{2+} (1,5 mM)	5
Apă	21
ADN	10 (aproximativ 100 ng)

Secvența primerilor

Primerul	Secvența 5'-3'	Transgena	Ampliconul (pb)
CDPK-cry 03	CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT	CDPK-pro/sens	211
CDPK-cry 04	GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT	<i>cryIA(b)</i> /antisens	
HS01-cry	AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT	<i>hsp70</i> /sens	194
CR01	GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT	<i>cryIA(b)</i> /antisens	
CM03	CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA	CaMV/sens	231
PA01	AGA TCA TCA ATC CAC TCT TGT GGT G	<i>pat</i> /antisens	
T25 1-5'	GCC AGT TAG GCC AGT TAC CCA	<i>pat</i> /sens	149
T25 1-3'	TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CCT	35S terminator/antisens	
Bt11 1-5'	CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C	<i>adh1-1S IVS6</i> /sens	110
<i>cryIA</i> 1-3'	TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC	<i>cryIA(b)</i> /antisens	
GA21 1-5'	ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG	OTP/sens	270
GA21 1-3'	TCT CCT TGA TGG GCT GCA	<i>m-epsps</i> /antisens	
CM03	CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA	CaMV/sens	170
CBH02	GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT	<i>cry9C</i> /antisens	
ZE01	TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG	<i>Ze 1</i> /sens	329
ZE02	GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT	<i>Ze 1</i> /antisens	

Programul de amplificare pentru primerii:

- **HS01-cry, CM03-PA01, ZE01-ZE02, Bt11/1-5'-cryIA/1-3', și T25/1-5'-T25/1-3'** este următorul: denaturare inițială – 95°C, 3 min., urmată de 40 cicluri de amplificare (95°C, 1 min., 60°C, 1 min. și 72°C, 1 min.), elongarea finală: 72°C, 7 min.
- **GA21/1-5'– GA21/1-3'** este următorul: denaturare inițială: 95°C, 3 min., 40 cicluri de amplificare (95°C, 1 min., 57°C, 1 min. și 72°C, 1 min.), elongarea finală: 72°C, 7 min.
- **CDPK-cry** include: denaturarea inițială, 95°C, 12 min., urmată de 40 cicluri de amplificare (95°C, 30 sec., 63°C, 30 sec. și 72°C, 30 sec.), elongare finală: 72°C, 10 min.
- **CM03-CBH02:** denaturarea inițială 95°C, 10 min., urmată de 40 cicluri (fiecare constând din etapele: 95°C, 30 sec., 60°C, 30 sec. și 72°C, 30 sec.), elongarea finală: 72°C, 7 min.

NESTED MULTIPLEX POLIMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETERMINATION OF DNA FROM GENETICALLY MODIFIED CORN AND SOYBEANS

METODA NESTED-MULTIPLEX PCR PENTRU DETERMINAREA PORUMBULUI ȘI SOIA MODIFICATE GENETIC

Metodă elaborată de Mark A. Jensen

<http://www.iscpubs.com/articles/abl/b0403jen.pdf>

Principiul metodei constă în analiza produselor de amplificare PCR cu ajutorul tehnologiei LabChip, la dispozitivul Agilent 2100.

Izolarea ADN-ului este efectuată cu ajutorul DNeasy plant mini kit, Wizard sau procedura CTAB (descrisă în detaliu în protocolul original). Probele ADN-ului sunt diluate la concentrațiile de 5 - 50 ng/μl.

Biosmart Allin 1,0 GMO screening system este un kit multiplex PCR, care permite obținerea ampliconilor cu lungimea de 118 pb (lectina), 150 pb (35S CaMV), 217 pb (amplicon, obținut în baza primului produs de amplificare de 278 pb) și 278 pb (zeina). Ca material de referință servește porumbul/ soia MG 0 - 5%.

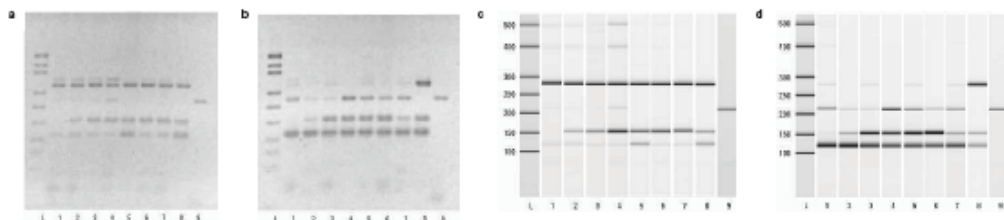
Produsele de amplificare sunt analizate cu ajutorul dispozitivului Agilent 2100 și electroforeza în gel 4% NuSieve 3:1 plus gel. Metoda este capabilă de a percepe promotorul 35S CaMV la nivelul de 0,1%.

Condițiile de amplificare a primei etape

Etapale PCR		Condițiile
1.	Denaturare	95°C/15 min.
2.	39 cicluri	Denaturare
		Aliniere
		Elongare
3.	Elongare finală	72°C/3 min.

Condițiile de amplificare a ultimei etape

Etapale PCR		Condițiile
1.	Denaturare	95°C/15 min.
2.	39 cicluri	Denaturare
		Aliniere
		Elongare
3.	Elongare finală	72°C/3 min.

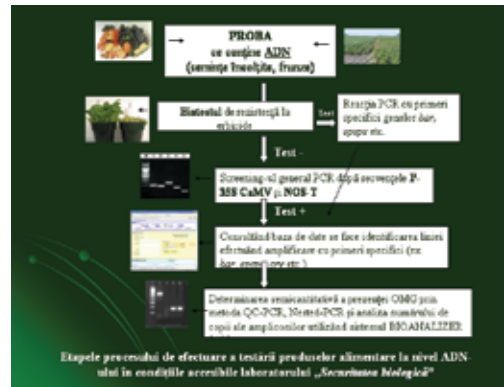
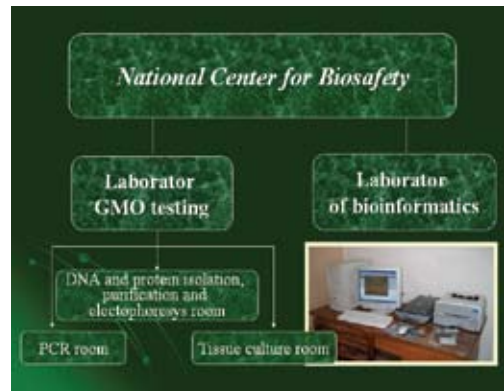


Rezultatele PCR în gel 4% (a și b) și analizate la Bioanalizator Agilent 2100 (c și d)

CAPITOLUL 7

METODE PCR DE CUANTIFICARE A PMG

- 7.1. Real-time PCR
- 7.2. RCR-ul cantitativ competitiv (QC-PCR)
- 7.3. Exemple de protocoale



ASPECTE ALE ACTIVITĂȚII LABORATORULUI SECURITATE BIOLOGICĂ

Capitolul 7. METODE PCR DE CUANTIFICARE A PMG

Pentru determinarea cantitativă a prezenței modificărilor genetice în PMG se aplică două metode bazate pe principiul PCR:

- Real-time PCR; și
- PCR-ul cantitativ competitiv (QC-PCR).

7.1. Real-time PCR

Real-time PCR reprezintă o metodă rapidă (20 min. - 2 ore), cu o sensibilitate și specificitate înaltă de cuantificare a produselor de amplificare în *timp real*. Tehnologia permite determinarea cantității de secvențe amplificate, evitând etapa de electroforeză, întrucât cinetica acumulării ampliconilor depinde direct de numărul de copii ale ADN-matrice. Principiul metodei constă în determinarea fluorimetrică a probei în timpul reacției. Intensitatea emisiilor de fluorescență până la atingerea etapei de saturare va fi proporțională cu numărul de amplificări. Emisia de fluorescență poate fi percepută după numărul minim de amplificări *Ct*, iar nivelul de la care se identifică acest proces se numește **prag de fluorescență**.

Astfel, cinetica reacției este reprezentată de o curbă (fig. 7.1.) ce constă din trei etape:

- 1) **inițiere** (când produsele PCR nu pot fi detectate);
- 2) **exponențială** (gradul de fluorescență este proporțional cu numărul de cicluri); și
- 3) **saturare** (gradul de fluorescență devine constant și nu depinde de numărul de cicluri).

Realizarea cu succes a screening-ului PMG cu utilizarea Real-time PCR necesită condiții specifice, cu descrierea primerilor și probelor fluorescente pentru fiecare caz în parte (tab. 7.1.).

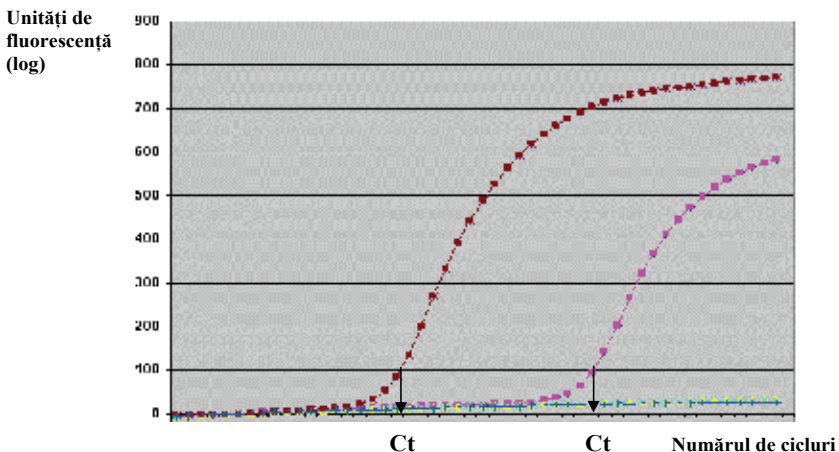


Figura 7.1. Cinetica reacției Real-time PCR

Ct – numărul minim de amplificări la care emisia poate fi percepută.

www.molbiol.ru

Tabelul 7.1.

Primerii și probele fluorescente pentru efectuarea Real-time PCR după 35S, NOS și secvențe specifice pentru soia și porumb

(<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/37/table/T>)

Ținta /mărimea ampliconului/	Specificitatea	Primerul și secvența marcată	Primerul/ secvența	Lungimea (pb)
Lectina 81 pb	Soia (Nr. K00821)	TM-Lectin-F TM-Lectin-R Lectin-FAM	5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3' 5'-GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA-3' 5'-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-TAMRA-3'	19 24 23
Invertaza 79 pb	Porumb (Nr. U16123)	ivr1-TM1 ivr1- TM2 ivr	5'-TGG CGG ACG ACG ACT TGT-3' 5'-AAA GTT TGG AGG CTG CCG T-3' 5'-VIC- CGA GCA GAC CGC CGT GTA CTT CTA CC-TAMRA-3'	18 19 26
p35S 82 pb	p35S promotor (Nr. V00141)	TM-35S-1 TM- 35S-2 35S	5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT-3' 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3' 5'- FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3'	18 22 22
tNOS 151 pb	tNOS terminator (Nr. V00087)	tNOSF tNOSR tNOSpro	5'-GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG-3' 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T-3' 5'-FAM AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA-TAMRA-3'	29 25 30
GTS 40-3-2 soia 83 pb	construct specific (Nr. AB209952)	RRS-F RRS-R RRS	5'-GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT-3' 5'-GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C-3' 5'-FAM-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-TAMRA-3'	23 25 33
MON810 porumb 115 pb	specific (Nr. AF434709)	Mon810F1311 Mon810R1311 Mon810pro1311	5'-CCT TCA TAA CCT TCG CCC G-3' 5'-AAT AAA GTG ACA GAT AGC TGG GCA-3' 5'-FAM-ACG AAG GAC TCT AAC GTT TAA CAT CCT TTG CCA-TAMRA-3'	19 24 33

Actualmente, se disting mai multe metodologii ale procedurii Real-time PCR. Printre acestea se numără tehnologia **TaqMan Assay**. Metoda respectivă este bazată pe utilizarea ADN-polimerazei cu activitate 5'-exonucleazică. În volumul de reacție sunt adăugate sonde ADN, în componența cărora intră o particulă marcată fluorescent, notată ca R (dispusă la capătul 5') și un inhibitor al fluorescenței, notat ca Q (dispus la capătul 3'), precum și o grupare fosfat în poziția 3', care blochează polimeraza (fig. 7.2.). Sondele sunt complementare cu regiunea secvenței de ADN amplificată. Atunci când particula fluorescentă este dispusă în vecinătatea inhibitorului, fluorescența nu este detectată. În procesul reacției PCR, la etapele inițiale, are

loc alipirea sondei la secvența complementară de ADN. Cu cât mai multe produse de amplificare în reacția PCR se vor forma, cu atât mai multe sonde se vor lega la ampliconul respectiv. În procesul etapei de elongare, polimeraza sintetizează catena complementară de ADN care, ajungând la sondă, începe scindarea acesteia, eliminând și îndepărtând particulele fluorescente de la inhibitor, astfel încât, concomitent cu procesul de amplificare, are loc emanarea fluorescenței, care este detectată de amplificator. Cu cât numărul de ampliconi va fi mai mare, cu atât intensitatea fluorescenței va crește.

Parametrii sondei TaqMan: raportul G/C – de circa 20 - 80 %, T_m – de 68 - 70 °C, să nu conțină mai mult de 4 nucleotide de același fel, care se repetă consecutiv.

Parametrii primerilor: raportul G/C – de 20 - 80%, T_m – de 58 - 60 °C, să formeze ampliconi de circa 50 pb, lungimea primerilor – de 20 - 30 nucleotide.

Parametrii reacției de amplificare: primerii (300 nM fiecare), sonda (250 nM), $MgCl_2$ (3,5 nM), AmliTaqGold-polimeraza (www.molbiol.ru).

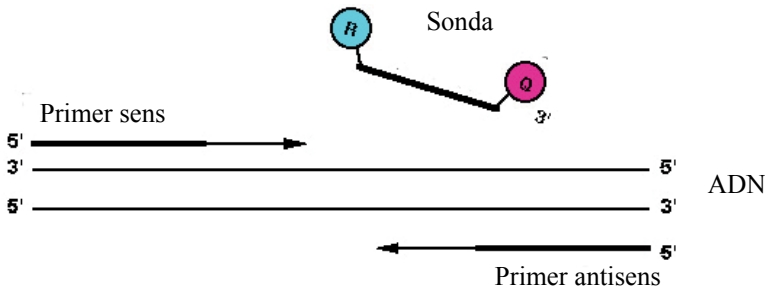


Figura 7.2. Mecanismul reacției Real-time PCR după tehnologia TaqMan Assay

www.molbiol.ru

O altă varietate a Real-Time PCR-ului este *tehnologia Molecular Beacons*, în cadrul căreia se utilizează sonde cu capetele terminale complementare, care la temperatura de topire a primerilor se unesc și formează complexe (fig.7.3.). Întrucât secvența medie a sondei este complementară cu ADN-ul amplificat, la această etapă sondele care nu s-au atașat la ADN matrice rămân în stare legată și nu emit fluorescență, deoarece agentul fluorescent și atenuatorul fluorescenței sunt vecini. Sondele care s-au hibridat cu ADN-matrice sunt în stare „desfășurată” și astfel emit fluorescență, fiind înregistrate de amplificator.

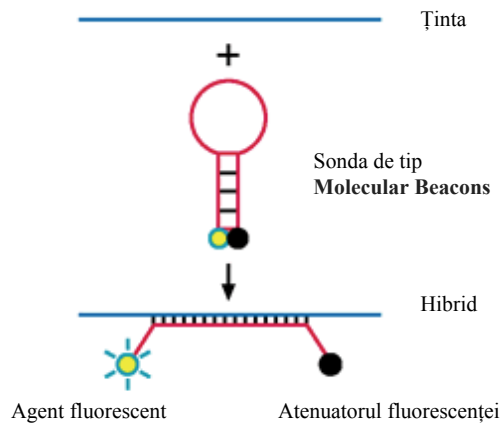


Figura 7.3. Tehnologia Real-time PCR de tip Molecular Beacons

www.molbiol.ru

O altă tehnologie Real-time PCR include utilizarea a două sonde cu transfer de energie prin rezonanță (*Light Cycler assay*). Principiul metodei constă în faptul că energia se transferă de la un fluorofor dispus la capătul 3' al primei sonde spre al doilea fluorofor dispus la capătul 5' al celei de-a doua sonde. Distanța dintre sonde este de 1 - 3 nucleotide. La alipirea simultană a celor două sonde la ADN, energia eliminată de primul fluorofor este transmisă celui de-al doilea fluorofor, iar fluorescența este detectată de amplificator (fig. 7.4.).

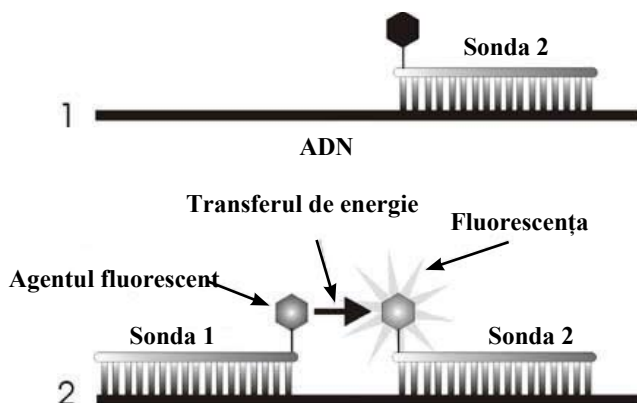
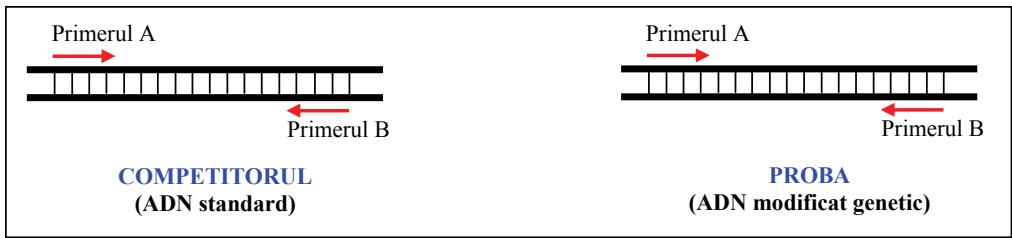


Figura 7.4. Tehnologia Real-time PCR *Light Cycler assay*
http://www.pcr.ru/bibliogr/articles/article_18.htm

Utilizarea **agenților de intercalare** reprezintă o altă varietate a tehnologiei Real-Time PCR. Metoda este bazată pe creșterea semnificativă a fluorescenței odată cu includerea *bromurii de etidiu* sau *SYBR Green I* în moleculele de acizi nucleici și astfel se poate analiza amplificarea ADN-ului la nivel cantitativ.

7.2. PCR-ul cantitativ competitiv (QC-PCR)

Tehnologia QC-PCR reprezintă o metodă semicantitativă bazată pe PCR, care include coamplificarea ADN-ului-țintă transgenic cu un competitor, de obicei o genă de referință anumită, care există în mod normal la planta respectivă (de exemplu, gena *zeinei*), cantitatea inițială a fragmentului competitor fiind prealabil cunoscută (fig. 7.5.). Raportul dintre cei doi produși ai PCR, determinați prin electroforeză, arată cantitatea aproximativă de secvențe modificate genetic.



COAMPLIFICARE



ELECTROFOREZA
(gel de agaroză)

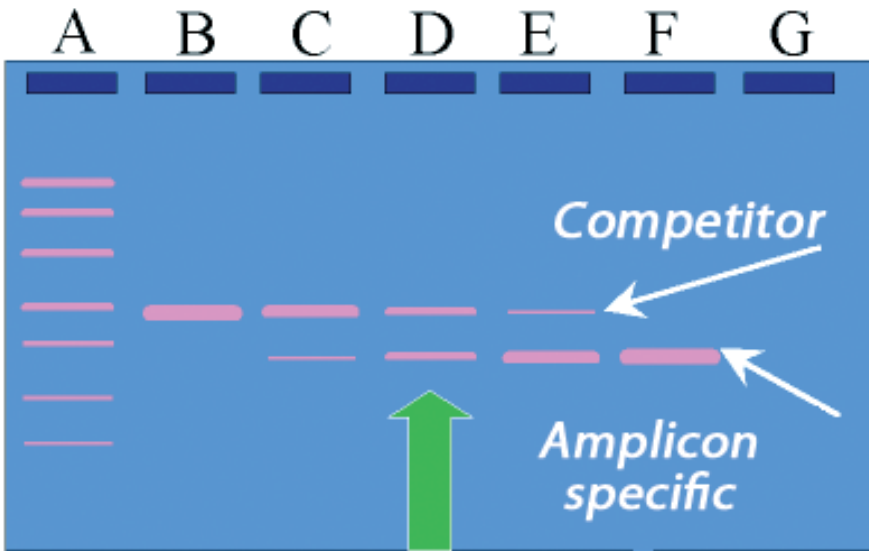


Figura 7.5. Principiul metodei QC-PCR



REAL-TIME PCR DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED CORN MON 863
REAL-TIME PCR PENTRU TESTAREA PORUMBULUI MODIFICAT GENETIC MON 863

Metodă elaborată de:

Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences

Metodă validată:

Joint Research Centre – European Commission, Biotechnology & GMOs Unit

Protocol MON 863 – Community Reference Laboratory 2/17 16/02/2005

<http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>

Principiul metodei este bazat pe procedura TaqMan® PCR de detectare a cantității OMG în linia de porumb MON 863.

Procedura include următorii moduli: a) extragerea ADN-ului cu ajutorul CTAB (Murray and Thompson (1980)); b) cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total; c) metodologia Real-time PCR specifică pentru NK603.

Procedeele PCR a fost optimizat pentru sistemul ABI Prism® 7700. Se recomandă utilizarea a 200 ng ADN per reacție. În urma reacției PCR, ampliconul secvenței-țintă specifică PMG constă din 84 pb. Ca secvență de referință este gena *adh1* și fragmentul de 70 pb, obținut în urma reacției PCR. Limita minimă de detecție este 0,5%, iar limita de cuantificare – 0,1%.

Mixul de reacție

Componenta	Concentrația finală	μl/reacție
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)	1x	25 μl
Primerul MON863-F/adh1-F	150 nM	-
Primerul MON863-R/adh1-R	150 nM	-
Probe MON863/adh1	50 nM	-
Apă eliberată de nucleaze		Până la 50 μl
ADN (maximum 280 ng)		5 μl

Secvența primerilor

Primerul	Secvența de nucleotide (de la 5' spre 3')
<i>Primerii pentru transgenă</i>	
MON863 F	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC
MON863 R	TGTTACGGCCTAAATGCTGAAC
MON863 sondă	6-FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA-TAMRA
<i>Primerii pentru gena de referință</i>	
<i>Adh1</i> F	CCAGCCTCATGGCCAAAG
<i>Adh1</i> R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG
<i>Adh1</i> sondă	6-FAM-CTTAGGGGCGAGACTCCCGTGTCCCT-TAMRA

Condițiile de amplificare

Etapa	T°C	Timpul	Numărul de cicluri
1	50 °C	120 sec.	1
2	95 °C	10 min.	1
3	95 °C	15 sec.	45
4	60 °C	60 sec.	

A RECOMENDED PROCEDURE FOR REAL-TIME QUANTITATIVE TaqMAN PCR FOR GMO

CUANTIFICAREA DIFERITOR LINII DE OMG PRIN TaqMAN REAL-TIME PCR

Metodă elaborată de:

compania Monsanto și JRC, Conform Art. 47 al CE 1829/2003

Metodă optimizată de:

compania Monsanto pentru ABI Prism® 7700 sequence detection system
<http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>

Principiul metodei constă în determinarea cantitativă a PMG (Canola RT73, porumb NK603 și GA21) prin procedura TaqMan Real-time PCR.

Se recomandă izolarea ADN-ului după una din metodele descrise anterior, unde cantitatea de ADN transgenic în soluțiile standard trebuie să fie 50,0; 25,0; 5,0; 2,5; 0,5; 0,25; 0,05 și 0 ng/μg respectiv.

Mixul de reacție

Nr.	Reagentul	Volumul (μl)	Concentrația finală
1.	Apă eliberată de nucleaze	19,00	-
2.	TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	25,00	1X
3.	Primerul 1 (10 μM)	0,75	150 nM
4.	Primerul 2 (10 μM)	0,75	150 nM
5.	Proba TaqMan (5 μM)	0,50	50 nM
6.	ADN (50 ng/μl)	4,00	200 ng

Notă: se recomandă păstrarea reagenților la rece.

Secvența primerilor

Linia	Primerul	Secvența (5' → 3')	Amplicon (pb)
Canola RT73	RT73 primerul 1	CCATATTGACCATCATACTCATTGCT	108
	RT73 primerul 2	GCTTATACGAAGGCAAGAAAAGGA	
	RT73 proba	6-FAM-ITCCCGGACATGAAGATCATCCTCCTT-TAMRA	
	<i>FatA</i> primerul 1	GGTCTCTCAGCAAGTGGTGAT	76
	<i>FatA</i> primerul 2	TCGTCCCGAACTTCATCTGTAA	
<i>FatA</i> proba	6-FAM-ATGAACCAAGACACAAGCGCGCTTCA-TAMRA		
Porumb NK603	NK603 primerul 1	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA	108
	NK603 primerul 2	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT	
	NK603 proba	6-FAM-TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC-TAMRA	
	<i>adh1</i> primerul 1	CCAGCCTCATGGCCAAAG	70
	<i>adh1</i> primerul 2	CCTTCTGGCCGGTTATCTG	
<i>adh1</i> proba	6-FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCGTGTTCCT-TAMRA		
Porumb GA21	GA21 primerul 1	CTTATCGTTATGCATTGCAACTTAGA	112
	GA21 primerul 2	TGGCTCGCATCCTCCT	
	GA21 proba	6-FAM-CATATACTAACTCATATCTCTTTCTCAACAGCAGGTGGGT-TAMRA	
	<i>adh1</i> primerul 1	CCAGCCTCATGGCCAAAG	70
	<i>adh1</i> primerul 2	CCTTCTGGCCGGTTATCTG	
<i>adh1</i> proba	6-FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCGTGTTCCT-TAMRA		

Condițiile de amplificare

Etapa	Cicluri	Temperatura, durata	Înscrierea datelor
1	1	50°C/ 2 min.	Nu
2	1	95°C/ 10 min.	Nu
3	45	95°C/ 15 sec. 60°C/ 1 min.	Nu Da

QUANTITATIVE DETECTION OF THE 35S PROMOTER AND THE NOS TERMINATOR USING QUANTITATIVE COMPETITIVE PCR

DETECTAREA SEMICANTITATIVĂ A SECVENȚELOR 35S CAMV-P ȘI NOS-T UTILIZÂND QC-PCR

Metodă elaborată de Hardegger, Brodmann și Herrmann (*Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. Eur. Food Res. Technol., 1999, 209, p. 83-871999*).

Principiul metodei constă în identificarea semicantitativă a secvențelor P-35S CaMV și NOS-T prin procedeul QC-PCR.

În calitate de ADN competitor sunt construite standarde (plasmide), care conțin secvențele 35S și NOS. Oligonucleotidele utilizate pentru detectarea ADN-competitor sunt incluse în tabelul de mai jos. Produsele PCR sunt separate în gel de 2% agaroză. Dimensiunea produselor de amplificare sunt 227 pb (35S), 267 pb (competitor pBS-35Si), 187 pb (competitor pKS-35Sd), 180 pb (NOS terminator) și 220 pb (competitor pKS-NOSi).

Mixul de reacție

Reagentul	Soluția-stoc
Soluția-tampon pentru enzimă	1x
MgCl ₂	2,5 mM
BSA	2,0 mg/ml
dNTP	0,2 mM
Oligonucleotide	0,5 mM
Taq ADN polimeraza	2,0 unități
volum final	100 μl

Secvența primerilor

Primerii	Secvența
Primerii pentru proba de ADN competitor	35Sif 5'-ATCCTGAATAGATCTTGGACAAGCGTTAGGCCTATCTGGA-3' 35Sir 3'-TAGGACTTATCTAGAACCTGTTTCGCAATCCGGATAGACCT-5' NOSif 5'-CCTGAATAGATCTTGGACAAGCGTTAGGCCTATCTGTGCA-3' NOSir 3'-ACGTGGACTTATCTAGAACCTGTTTCGCAATCCGGATAGAC-5'
Secvențele primerilor utilizați pentru reacția QC-PCR	35S-A 5'-AAGGGTCTTGC GAAGGATAG-3' 35S-B 5'-AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT-3' NOS-1 5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3' NOS-3 5'-TTATCCTAGTTTGC GCGCTA-3'

Cu **bold** sunt date site-urile de restricție pentru enzimele *BglII* (AGATCT) și *StuI* (AGGCCT).

Condițiile de amplificare QC-PCR

Etapile PCR		Condițiile	
1.	Denaturare	95°C / 3 min.	
2.	40 cicluri	Denaturare	95 °C / 36 sec.
		Extincție	60 °C (35S) / 54 °C (NOS terminator) 72 sec.
		Elongare	72 °C / 84 sec.
3.	Elongare finală	72 °C / 3 min.	

GMO SPECIFIC REAL-TIME PCR SYSTEM

DETERMINAREA PORUMBULUI *Bt 11* PRIN METODA Real-Time PCR

Metodă elaborată de Comisia Europeană – DG JRC (2003)
gmo-crl.jrc.it/summaries/Bt11-protocol.pdf

Principiul metodei constă în determinarea cantitativă a modificărilor genetice ale porumbului Bt11 utilizând procedura standard TaqMan Real-time PCR.

Ca genă de referință servește gena *adh1*. Se recomandă utilizarea sistemului de detecție ABI Prism 7700. Alte sisteme pot fi utilizate, dar condițiile de amplificare trebuie revăzute. Amplificarea secvențelor *adh1* și *Bt11* are loc separat.

Mixul de reacție pentru sistemul *adh1*

Componenta	Concentrația finală	μl/reacție
TaqMan Universal Master Mix 2X	1x	12,5
ADH-F3 primer (20 μM)	300 nM	0,375
ADH-R4 primer (20 μM)	300 nM	0,375
ADH-MDO proba (10 μM)	200 nM	0,5
Apă eliberată de nucleaze	#	5,25
ADN (maximum 250 ng)	#	6
Volumul total		25 μl

Mixul de reacție pentru sistemul *Bt11*

Componenta	Concentrația finală	μl/reacție
TaqMan Bufer A 10x	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	4
dNTP ^a 10 mM fiecare	0,2 mM fiecare	0,5 fiecare
dUTP 20 mM	0,4 mM	0,5
Bt 113J primer sens (20 μM)	750 nM	0,9375
Bt 113J primer antisens (20 μM)	750 nM	0,9375
Bt proba (10 μM)	250 nM	0,625
AmpErase UNG (UNG 1 U/μl)	0,3 U	0,25
Ampli Taq Gold (5 U/μl)	1,5 U	0,25
Apă eliberată de nucleaze	#	7,5
ADN (≤250 ng pentru standard, maximum 200 ng pentru ADN necunoscut)	#	6
Volumul total		25 μl

Secvența primerilor

Genă	Secvența
Adh1:	ADH-F3 sens 5' – CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3' ADH-R4 antisens 5' – CCACTCCGAGACCCTCAGTC-3' ADH1- proba 5' – FAM-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-TAMRA-3'
Bt 11:	Bt 113J sens – 5' – GCGGAACCCCTATTTGTTA-3' Bt 113J antisens – 5' – TCCAAGAATCCCTCCATGAG- 3' Bt 113J proba – 5' – FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA-TAMRA-3'

Condițiile de amplificare

Pasul	Etapa	T°C	Timpul, sec.	Achiziție	Cicluri
1.	UNG	50	120	Nu	1x
2.	Denaturarea inițială	95	600	Nu	1x
3.	denaturare	95	15	Nu	50x
4.	Amplificarea	60	60	măsurare	
	alinierea și extincția				

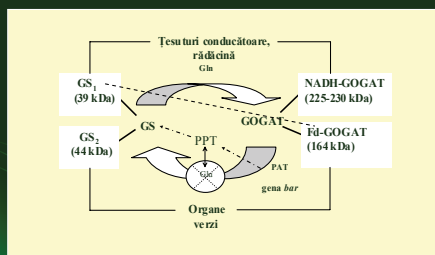
CAPITOLUL 8

CAPACITĂȚI NAȚIONALE PENTRU TESTAREA PMG

- 8.1. Structura și potențialul tehnico-științific al laboratorului *Securitate Biologică*
- 8.2. Detecția PMG la nivel de expresie fenotipică a transgenelor
- 8.3. Identificarea unor transgene la nivel de proteine
- 8.4. Screening-ul PMG prin PCR



Mecanismul genetic propus al acțiunii erbicidului Basta



Obiectul de studiu

13 linii de tutun transgenic (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi, 2n=48): 2, 5, 6, 7A, 8, 10, 13, 14, 19A, 23, 24, 25 și 30, ce conțin gena-marker *bar* (0.5 kb), responsabilă de sinteza enzimei fosfinotricin-N-acetyltransferaza (PAT) și gena *leafy* (2.2 kb) de la *Citrus sinensis* ce codifică proteina *CsLFY*, aflate sub controlul promotorului constitutiv 35S CaMV și orientate *sens*.



Germinarea semințelor a avut loc pe mediu MS (Murashige and Skoog, 1962), în lipsa și prezența 0.005 mM erbicid Basta, la temperatura de 21-22°C, fotoperioda 8 ore.



Plantele au fost cultivate în în vase de vegetație, la temperatura de 21-22°C și fotoperioda de 8 ore, până la câteva faze de creștere („aruncându” rădăci și internodii)

ASPECTE DIN ACTIVITATEA LABORATORULUI SECURITATE BIOLOGICĂ

Capitolul 8. CAPACITĂȚI NAȚIONALE PENTRU TESTAREA PMG

Utilizarea OMG și a alimentelor noi – rezultat al biotehnologiilor de ultima oră – are un impact esențial asupra științei și mediului cu implicații economico-sociale și etice. Biosecuritatea alimentară și protecția biodiversității reprezintă unele dintre problemele esențiale generate de introducerea în mediu a plantelor transgenice, fapt ce impune investigații comparative ale OMG în raport cu cele non-OMG (recipient) și implementarea diferitor metode de testare și monitorizare a culturilor modificate genetic și a produselor agroalimentare derivate din acestea.

Aceste domenii de cercetare rămân a fi o prioritate și necesitate strategică atât pentru comunitatea internațională, cât și pentru Republica Moldova.

Deși în Moldova nu există centre științifice care ar obține organisme modificate genetic, acestea pot ajunge la consumatori prin importul în țară a produselor alimentare, fructelor, legumelor etc., iar pe câmpurile agricole – prin procurarea din străinătate a materialului semincer.

8.1. Structura și potențialul tehnico-științific al laboratorului *Securitate Biologică*

În temeiul prevederilor Convenției privind securitatea biologică (Rio de Janeiro, 1992; <http://www.cbd.int/biosafety/>) și Protocolului de la Cartagena (<http://bch.biodiv.org/default.aspx>) privind diversitatea biologică, semnat la New York la 14 februarie 2001, Republica Moldova a elaborat Legea privind Securitatea Biologică, aprobată de către Parlamentul Republicii Moldova la 21 decembrie 2002, nr. 755-XV. Prezenta lege reglementează activitățile legate de obținerea, testarea, utilizarea și comercializarea organismelor modificate genetic. Cadrul instituțional de autorizare și administrare a activităților menționate are menirea să asigure desfășurarea lor în condiții de *securitate biologică* în care pot fi prevenite, eliminate sau reduse riscurile de producere a unor efecte negative generate de organismele modificate genetic asupra sănătății umane, echilibrului ecologic și calității mediului.

Reieșind din aceste considerente, în cadrul USM a fost constituit *Centrul de Securitate Biologică* (CSB), în baza deciziei senatului Universității de Stat din Moldova (USM) (proces-verbal nr. 8 din 27.01.2004) și ordinului interministerial încheiat între Ministerul Ecologiei, Construcțiilor și Dezvoltării Teritoriului și Ministerul Educației (nr. 28/61 din 18.02.2004) ca subdiviziune a *Facultății de Biologie și Pedologie*, ce avea drept scop efectuarea testelor PMG și produselor derivate din acestea (semințe, fructe etc.), privind prezența transgenelor, cercetarea științifică și evaluarea riscurilor legate de PMG. Importanța fondării acestui Centru a fost condiționată de lipsa unei baze informaționale de date privind organismele modificate genetic, a unui laborator acreditat la nivel național conform standardelor internaționale și europene, care să

testeze prezența materialului transgen în produsele alimentare – componente indispensabile funcționării unui cadru de reglementare a activităților cu OMG.

Activitățile CSB au fost axate inițial pe:

- crearea unui sistem informațional-instrumental activ prin baza de date, care să permită acumularea și consultarea materialului științific în domeniu, sub formă de cărți, softuri etc.;
- crearea unui laborator de testare a OMG și a produselor alimentare derivate din acestea;
- efectuarea cercetărilor ce țin de evaluarea riscurilor pentru sănătatea omului și pentru mediu, asociate introducerii OMG în ecosistem.

Actualmente, CSB a fost reorganizat în *Laboratorul Securitate Biologică (LSB)*, care este parte componentă a Centrului de Cercetare „Științe ale Vieții”, organizat în baza ordinului nr. 163 din 23.05.2006 din cadrul facultății, Biologie și Pedologie, USM.

În activitatea LSB sunt implicați 14 specialiști competenți în domeniu (un doctor habilitat, 6 doctori în biologie, 3 doctoranzi etc.), care au realizat mai multe training-uri de trei luni: proiectul COBASE, 001028-001, 2005 „*The influence of GA₃ on the expresion of genes*” (UCR, SUA); proiectele MTFP-04-08, 2005 și MTFP-15-05, 2006 „*Genetically modified plants, obtaining, research, testing*” (MRDA-CRDF, SUA); MTFP-1017A, 2006 „*Some Molecular Aspects of Cell Genes at Sunflower’s Different Genotypes*” (MRDA-CRDF, SUA). De asemenea, colaboratorii laboratorului au participat la training-uri privind activități de reglementare, testare și evaluare a riscurilor asociate introducerii în mediu a OMG, organizate la nivel internațional în Anglia, Rusia și România:

- *Study tour Great Britain organized by British Embassy in the frames of the project UNEP/GEF, Support for the Development of the National Biosafety Framework for the Republic of Moldova”, 16-22 November 2003.*
- *OECD Workshop on the Assessment of Novel Foods and Feeds, Moscow, Russian Federation, 16-18 September 2002.*
- *Training workshop „Handling requests for releases of GMOs into the environment”, 13-15 September, 2001, Bucharest, Romania.*

În cadrul colaborării cu Universitatea din California, Riverside SUA (IA-ASLJ-G9190241), Catedra Biologie Vegetală a fost vizitată de numeroși profesori (I. Kaloshian, C. Lovatt, M. Orozco-Cardenas, S. Van Gundy etc.), care au realizat seminare și au contribuit la dezvoltarea direcțiilor noi în cercetare și educație, oferind donații de cărți și cursuri. Unul din rezultatele colaborării internaționale a fost elaborarea unui manual de laborator *Tehnici de cercetare în biologie moleculară* autori: profesor Maria Duca și profesor I. Kaloshian (UCR, SUA), care reprezintă o sursă valoroasă pentru studenții universitari și postuniversitari ce frecventează orele de inițiere sau cursuri de tehnici avansate de laborator în biologia moleculară.

Recent a ieșit de sub tipar manualul Biologie moleculară destinat studenților care studiază la specialitatea biologie moleculară. În lucrare sunt abordate diferite aspecte legate de domeniul genetica moleculară, ingineria genetică, îmbătrânirea organismelor, transducția semnalelor etc.

În urma colaborării cu Dr. Martha Orozco-Cardenas, directorul *Centrului de Transformare Genetică a Universității din California-Riverside (CTGUCR)*, SUA, colaboratorii LSB (prof. Duca M., Dr. Port A., Dr. Glijin A.) au efectuat stagieri pentru însușirea metodelor de obținere și testare a PMG, iar rezultatele obținute sunt reflectate în publicațiile comune. Materialul biologic (tutun MG, ce conține genele *leafy* și *bar*) oferit de către CTGUCR este utilizat ca test de referință în analize și efectuarea cercetărilor fundamentale cu PMG în LSB, iar 13 linii de tutun transgenic *Nicotiana tabacum* L., var. Xanthi (2n=48) – pentru procesul de instruire a studenților și implementarea tehnicilor de testare a PMG.

Activitatea LSB a fost inițiată în 2002 prin procurarea de către USM a unui minilaborator PCR, Biokom, Rusia. Dotarea cu echipament (fig. 8.1.) și reagenți a continuat în baza temelor de cercetare („*Identificarea și implementarea unor markeri moleculari în ameliorarea florei-soarelui*”(32006C), 2003-2004; „*Determinarea gradului de hibridare în F₁ și purității genetice a liniilor de floarea-soarelui în baza diferitor tehnici fiziologo-biochimice și moleculare de cercetare*” (2B17) din cadrul Programului de Stat „*Biotehnologii agricole, fertilitatea solului și securitatea alimentară*”, 2006-2010) și a proiectelor naționale și internaționale (BPP-0406 *Testarea și identificarea unor genotipuri de floarea-soarelui cu rezistență maximă față de Orobanche cumana*, MTFP-04-08, MTFP-015-05, MTFP-1017A, MERL-1300 finanțate de CRDF/MRDA. În cadrul LSB sunt utilizate o serie de metode pentru testarea PMG, bazate pe PCR cu primeri specifici și screeningul general, care sunt validate la nivel internațional. În proces de implementare se află metoda ELISA (fig. 8.1., G).

În prezent în laborator se efectuează analize de testare a PMG bazate pe:

- **selecția plantelor rezistente față de erbicide (biotestul fenotipic al expresiei transgenei);**
- **detecția produsului de expresie a transgenelor (proteinele GFP, PAT);**
- **tehnica PCR, cu utilizarea primerilor-screening: 35S - CaMV și nos-terminator.**



Figura 8.1. Echipamentul din cadrul LSB

8.2. Detecția PMG la nivel de expresie fenotipică a transgenelor

Marea majoritate a culturilor agricole MG (soia, tutun, tomate, cartof, orez, porumb etc.) sunt tolerante la erbicide sistemice, care conțin în calitate de substanță activă *glufosinatul* (de amoniu), *fosfinitricina* (PPT) sau *bialaphos-ul* (fig. 8.2.), comercializate sub denumirea de Basta®, Buster®, Dash® etc. Actualmente, acest erbicid se aplică în combaterea buruienilor mono- și dicotiledonate în peste 40 de țări. În Republica Moldova, erbicidul a fost autorizat la 30.11.1995 cu numărul de înregistrare 0044.

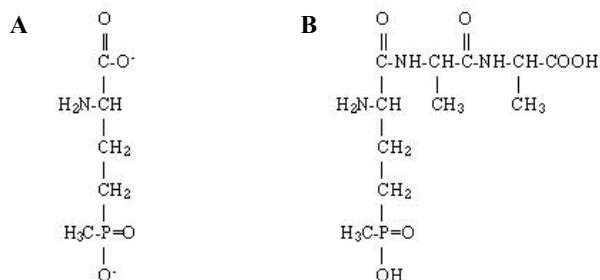


Figura 8.2. Structura fosfinitricinei (A) și bialaphos-ului (B)

www.plant-tc.coafes.umn.edu/maize-tc/pptbial.jpg

L-izomerul PPT este un analog structural al acidului L-glutamic (glutamatului) și neselectiv inhibă enzima *glutaminsintetaza* (GS) bacteriilor și plantelor superioare (fig. 8.3.). *Bialaphos-ul* (bialanil PPT) este un antibiotic tripeptid, ce constă dintr-un rest de PPT și două de L-alanină. În celulă, tripeptidul este scindat de către peptidaze, ce eliberează forma activă a PPT, care și inactivează enzima GS (fig. 8.3.).

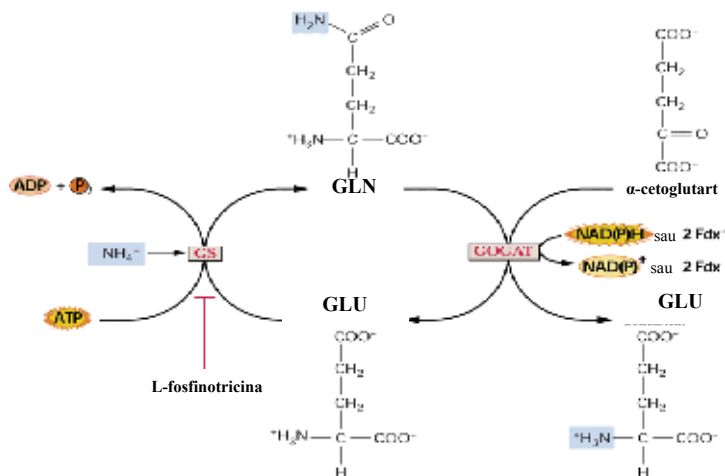


Figura 8.3. Mecanismul inhibării enzimei GS de către PPT

<http://www.uky.edu/~dhild/biochem/24/lect24.html>

Toleranța la glufosinat a plantelor modificate genetic este determinată de transgenele *pat* sau *bar*, care codifică enzima *fosfinotricin-N-acetiltransferaza* (PAT, E.C. 2.3.1.-), ce neutralizează erbicidul prin acetilare (fig. 8.4.).

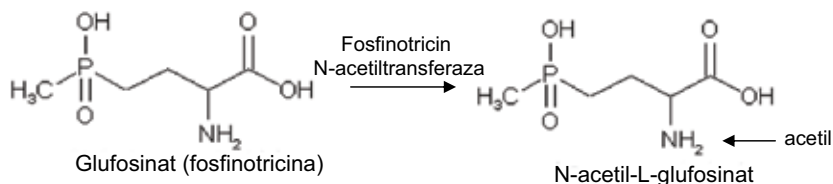


Figura 8.4. Structura chimică a glufosinatului și mecanismul de neutralizare a acestuia de către enzima PAT

Plantele susceptibile, non-OMG, fiind tratate cu acest erbicid, prezintă o serie de simptome de afectare a creșterii și dezvoltării caracteristice, care pot fi depistate cu ușurință la plantele cultivate *in vivo* (stropiri foliare) sau cultivate *in vitro* (prin suplimentarea mediului nutritiv cu erbicidul în cauză).

Astfel, în cadrul laboratorului *Securitate Biologică* este implementată metoda fenotipică de testare a PMG bazată pe detecția genei rezistenței la erbicidul Basta. Biotestul plantelor de tutun transgenic, cultivate *in vitro* în prezența a 0,005 mM erbicid Basta, la temperatura de 21 - 22°C, fotoperioada 8 ore a pus în evidență diferite niveluri de susceptibilitate a plantelor de tutun nemodificate genetic față de erbicid exprimată prin inhibarea germinării semințelor și încetinirea creșterii plantulelor, inducând necroza și moartea țesuturilor (fig. 8.5. și fig. 8.6.).

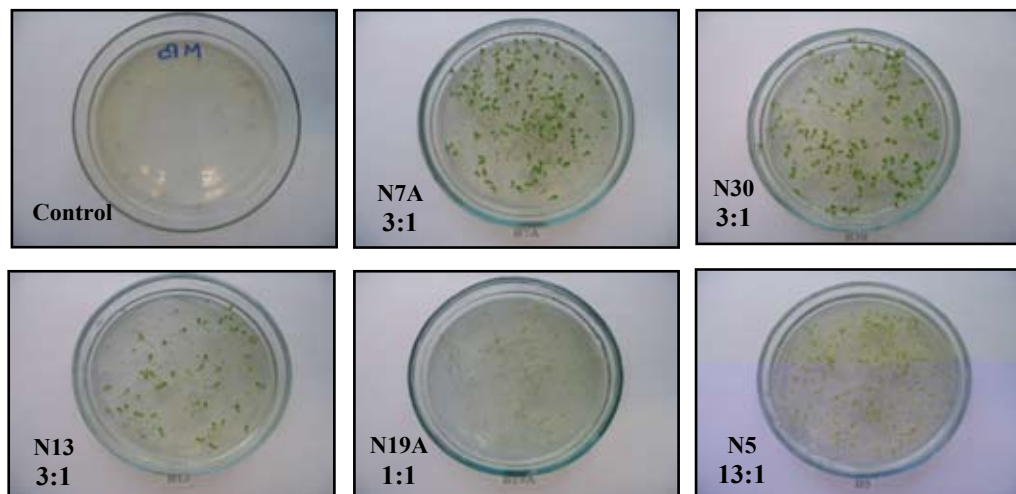


Figura 8.5. Germinarea semințelor de tutun nemodificat (control) și modificat genetic (N 7A, 30, 13, 19A și 5), ce conține gena *bar*, cultivate *in vitro* în prezența erbicidului Basta (0,005 mM).

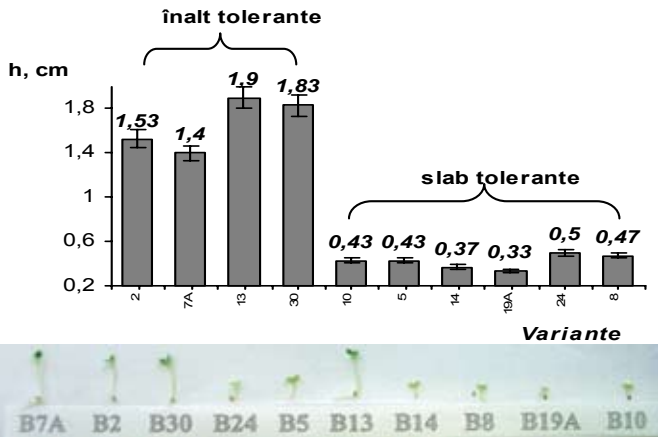


Figura 8.6. Înălțimea plantulelor de tutun cultivate *in vitro* pe mediul MS, ce conține Basta (0,005 mM), peste 14 zile

Efecte de fitotoxicitate similare care demonstrează eficiența utilizării acestui tip de analize în testarea preventivă a PMG reprezintă și aplicarea exogenă a erbicidului Basta asupra plantelor în faza de răsad. La această etapă, erbicidul (în concentrație 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, concentrație recomandată pentru testarea și selecția plantelor de tutun, care poartă gena *pat* sau *bar* (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/1204.html>) induce cloroza și necroza țesuturilor soldate cu moartea ulterioară doar a plantelor care nu posedă rezistență față de acest erbicid, adică a plantelor genomul cărora nu conține transgena *bar* (fig. 8.7.).

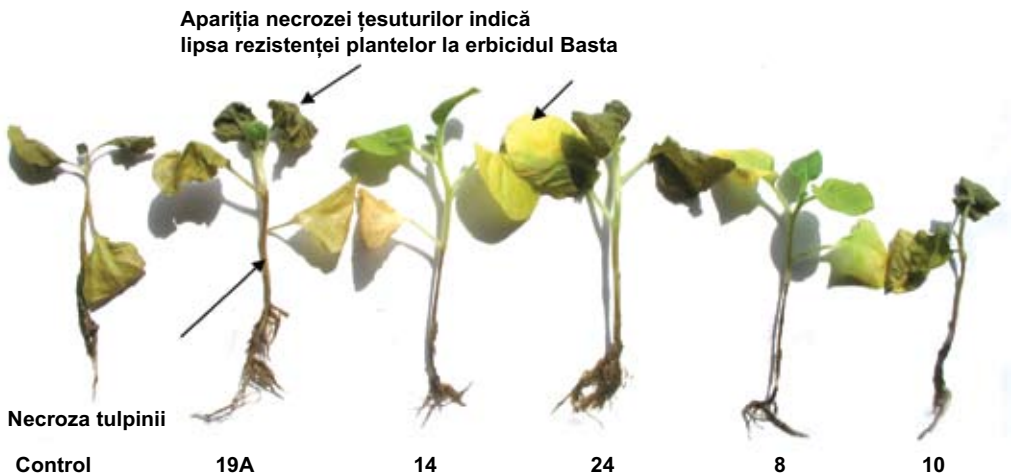


Figura 8.7. Liniile de tutun susceptibile la acțiunea erbicidului Basta (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Prin urmare, rezultatele obținute au confirmat posibilitatea și veridicitatea utilizării acestei metode în detectarea PMG rezistente la erbicide.

8.3. Identificarea unor transgene la nivel de proteine

Ca rezultat al expresiei transgenelor are loc biosinteza *de novo* a proteinelor specifice, care modifică structural sau funcțional procesele metabolice celulare, contribuind la apariția unor noi caractere. Detecția diferențelor (prezența unor compuși noi) între paternul proteic al PMG și cel al plantelor nemodificate genetic se realizează prin SDS-PAAGE, iar ulterior, pentru identificarea acestora, se recurge la purificare, fracționare și analiză prin massspectrometrie a proteinei „de interes”.

Analiza unor proteine codificate de transgene în scop de detecție a prezenței transgenelor a fost implementată în cadrul LSB ca rezultat al cercetărilor efectuate asupra proteomului diferitor linii de tutun transgenic cu trei alogene (*CsLFY*, *bar* și *gfp*), incluse în genom.

Rezultatele fracționării în gel de poliacrilamidă a proteinelor totale, ușor solubile, izolate din frunzele liniilor de tutun transgenic 2, 7A, 13 și 30, au relevat un profil electroforetic al PMG diferit de cel al plantelor-martor, prin prezența polipeptidelor cu Mr 44 kDa și 23 kDa, care pot fi considerate ca produse de expresie ale genei *CsLFY* și respectiv genei *bar* (fig. 8.8.). Schema de prelevare a probelor a permis efectuarea unei concluzii suplimentare, privind localizarea spațială a expresiei transgenelor prin identificarea polipeptidelor, analizate în limbul foliar, pețiol, tulpină și rădăcină (fig. 8.8.).

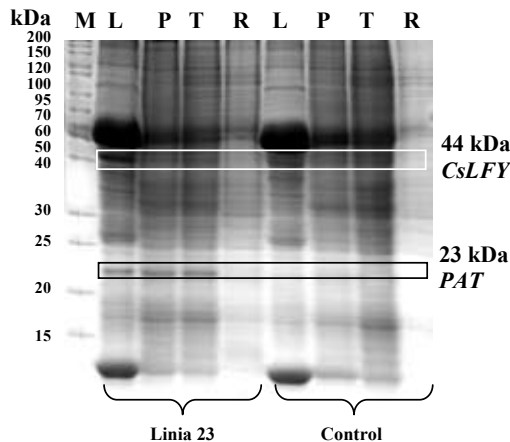


Figura 8.8. Evidențierea polipeptidelor cu Mr 44 kDa și 23 kDa în diferite organe ale tutunului transgenic și control

M – markeri proteici, L – limb, P – pețiol, T – tulpină, R – rădăcină

O altă proteină-marker, detectată în PMG efectuată în cadrul laboratorului, a fost produsul expresiei genei *gfp* în genotipurile de tutun transgenic TM-1 și TM-2 ce expresau gena *gfp*, a relevat prezența benzii cu Mr 27 kDa, care teoretic aparține proteinei GFP și care lipsește în tutunul nemodificat genetic (*control*) (fig. 8.9.).

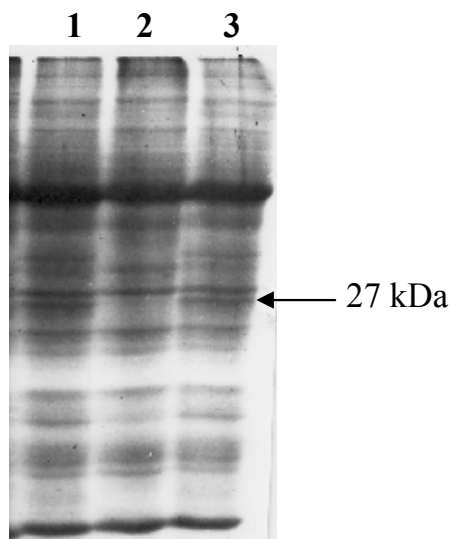


Figura 8.9. Electroforegrama proteinelor izolate din tutunul MG (1 și 3) și control (2)

Datele obținute pot fi considerate ca un argument în favoarea utilizării acestei metode în calitate de detecție a prezenței unor transgene în genomul vegetal prin produsul de expresie – proteinele.

Recent, a fost procurat utilajul necesar screening-ului la nivel de proteine prin tehnologia ELISA. Acest procedeu va lărgi posibilitățile LSB în testarea PMG prin metode validate și aprobate la nivel internațional.

8.4. Screening-ul PMG prin PCR

Actualmente, potențialul LSB permite realizarea screening-ului PMG bazat pe PCR cu utilizarea primerilor necesari pentru identificarea următoarelor secvențe specifice: P-35S CaMV, NOS-T, bar, nptII, GUS, LacZ, epsps-cp4, Cry IA, higromicinei (tab. 8.1.). În calitate de teste pozitive servește ADN-ul liniilor de porumb MG GA21, NK603 și CBH351 (Fluka).

Secvențe 35S CaMV și NOS (www.coresta.org) sunt prezente în 86% din culturile aprobate de PMG (Ahmed, 2002; Kuiper, 1999). Abilitatea de a depista aceste secvențe permite detectarea majorității culturilor de PMG.

Implementarea și optimizarea metodei de testare a PMG după secvențele NOS și 35S CaMV în conformitate cu posibilitățile laboratorului a inclus ca probe (matrice): ADN-ul genomic extras din plantulele de porumb (oferit pentru analiză de către fabrica de amidon din Tighina) și tomate (soi Gloria), crescute în condiții de laborator, la temperatura 25-27°C, timp de 22 zile, precum și material prelevat din fructe, procurate de la piață: roșii (din Băcioi și Ialoveni) și cartofi (Criuleni). Ca test pozitiv a servit ADN-ul liniei de porumb GA21, care conține secvența NOS-terminator.

Tabelul 8.1.

Primerii *sens* și *antisens* pentru secvența NOS-terminator, 35S CaMV și bar

Primer	Secvența de nucleotide	Amplicon
NOS-sens	GAATCCTGTTGCCGGTCTT	170 pb
NOS-antisens	TTGCGCGCTATATTTTGTTTT	
35S CaMV-sens	CATGTTGGCAAGCTGCTCTA	209 pb
35S CaMV-antisens	TATCCGCTCACAAATCCACA	
35S CaMV-sens	TGACAGATAGCGGGCAATG	175 pb
35S CaMV-antisens	CAACCACGTCTTCAAAGCAA	
Bar-sens	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC	242 pb
Bar-antisens	AGTCGACCGTGTACGTCTCC	
NPTII	AGTGACAACGTCGAGCACAG	176 pb
NPTII	AGACAATCGGCTGCTCTGAT	
Higromicină	TCGCTAAACTCCCAATGTC	163 pb
Higromicină	GCGAATCTCGTGCTTTC	
GUS	CTGATAGCGCGTGACAAAAA	208 pb
GUS	GGCACAGCACATCAAAGAGA	
CRY1A	ACCATCAACAGCCGCTACAACGACC	184 pb
CRY1A	TGGGGAACAGGCTCACGATGTCCAG	
EPSPS	TGGCGCCCAAAGCTTGCATGGC	356 pb
EPSPS	CCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGT	

Rezultatele analizei PCR au atestat prezența secvenței NOS-terminator în proba-marker GA21 prin apariția unui amplicon de 170 pb și lipsa acestuia în celelalte probe analizate (fig. 8.10.). Ca markeri moleculari au servit secvențele de 50-3000 pb (DNA Step Ladder, Sigma).

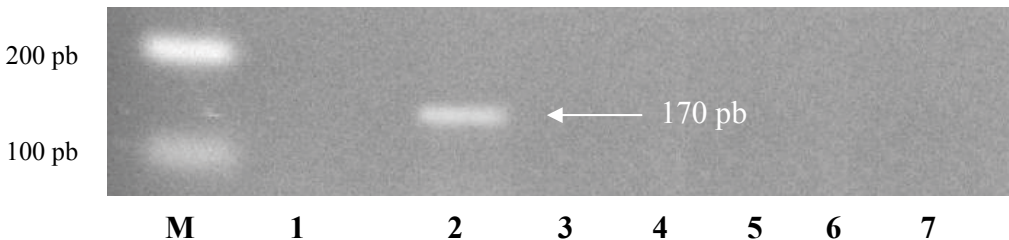
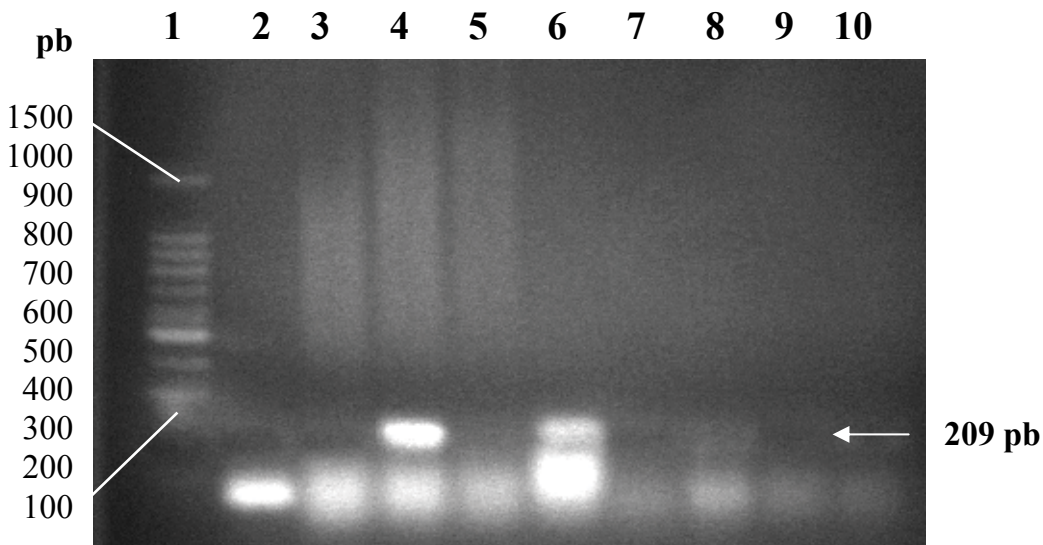


Figura 8.10. Rezultatele screening-ului plantelor după secvența NOS-terminator

M – marker, 1 – test negativ, 2 – GA-21 (test pozitiv), 3 – porumb, 4 – tomate „Gloria”, 5 – tomate, Băcioi, 6 – tomate, Ialoveni, 7 – cartof „Irga”

Screening-ul după promotorul 35S CaMV a produselor vegetale derivate de la tomate (fructe) și cartof (tuberculi), procurate de la un supermarket din Chișinău, nu a atestat prezența acestuia (fig. 8.11). În calitate de control pozitiv a fost analizat ADN-ul extras de la diferite linii de plante transgenice. Produsul de amplificare de 209 pb (amplicon cu dimensiune prevăzută), care atestă prezența promotorului 35S CaMV, a fost atestat doar în două cazuri – linia MG 10 și linia de TM-1. În produsele alimentare secvența promotor 35S CaMV nu a fost atestată.



**Figura 8.11. Electroforgrama ampliconilor
PCR cu primerii 35S CaMV**

(1 - M; 2 – test negativ; 3 – linia de tutun Nr 6; 4 – linia de tutun MG Nr 10;
5 – tutun MG Nr 2; 6 – linia TM-1 ; 7 – tomate 1; 8 – tomate 2;
9 – cartof 1; 10 – cartof 2)

Conform acestei analize de screening, produsele vegetale comercializate pe piața Republicii Moldova (fructe de tomate și tuberculi de cartof) utilizate în calitate de matrice nu conțin transgene în genom.

GLOSAR DE TERMENI

- Agaroză** – gel coloidal format de către o polizaharidă (agar-agar) extrasă din alge roșii. Este utilizat pentru obținerea de medii de cultură solide (geloze), sau ca fază staționară în cromatografie și electroforeză.
- Agricultură durabilă** – agricultură care presupune creșterea sau menținerea producției agricole timp îndelungat, odată cu conservarea resurselor naturale și a mediului.
- Alelă (alelomorf)** – formă alternativă a unei gene care se găsește în același locus pe cromozomi omologi.
- Alele multiple** – existența a mai mult de două alele pentru un locus specific dintr-o populație.
- Alogene** – gene de altă origine introduse într-un organism (transgenă).
- Aminoacid** – un compus organic care conține atât gruparea carboxil (-COOH), cât și grupări amino (-NH₂), reprezentând monomerul polipeptidelor.
- Amplificarea genelor** – proces din cadrul celulelor tumorale, în care se produc copii multiple ale anumitor gene; echivalentul citogenetic este reprezentat de regiunile colorate omogen și cromozomii dublu-minute.
- Amplificator** – secvența de ADN care amplifică transcripția unei gene (enhancer). Dispozitiv destinat pentru efectuarea reacției PCR (thermocycler).
- Amprenta ADN** – modelul unui tandem de repetări ADN hipervariabil ale unei secvențe din nucleu, unică pentru fiecare individ.
- Amprentare** – fenomen în care o genă sau o regiune a unui cromozom prezintă exprimare diferită în funcție de părintele de la care provine.
- Amprentare genomică** – expresia diferită a materialului genetic, dependentă de sexul părintelui transmițător.
- Analiză cromozomială** – procesul de numărare și analiză a modului de bandare a cromozomilor unui individ.
- Aneuploid** – un număr de cromozomi care nu este un multiplu exact al numărului haploid, de exemplu, 2N-1 sau 2N+1, unde N este numărul haploid de cromozomi.
- Antibiotice** – substanțe care împiedică dezvoltarea sau omoară microorganismele în a căror celulă pătrund, prin perturbarea anumitor căi metabolice, ca de ex. anabolismul componentelor peretelui celular. Sunt produse de către microorganisme. Ex. penicilina, streptomcina, tetraciclina, eritromicina, kanamicina.
- Anti-codon** – tripletul complementar din molecula de ARNt.
- Anticorp (imunoglobulina)** – proteină serică, formată ca răspuns la un stimul antigenic și care reacționează specific cu antigenul respectiv.
- Anticorpi monoclonali** – anticorpi omogeni, care descind dintr-o clonă celulară unică și recunosc numai o anumită structură chimică specifică. Putând fi produși în cantități mari și având o specificitate deosebită, sunt mult utilizați în scopuri medicale. Se obțin prin culturi de celule sau din ascite induse la șoareci.
- Antigen** – substanță care induce producerea de anticorpi.
- Antiparalel** – orientare opusă a celor două spirale ale unui duplex ADN, unul în direcția de la 3' la 5', celălalt în direcția de la 5' la 3'.

Antiser –	ser sangvin care conține anticorpi proveniți de la animale inoculate cu antigen, care prin administrare la alte animale produce imunitate pasivă.
Apoptoză –	involuția sau moartea programată a celulelor dintr-un țesut în dezvoltare sau dintr-un organ al unui corp.
ARN mesager (ARNm) –	o singură catenă spiralată complementară cu una din catenele ADN-ului dublu catenar, sintetizată în procesul de transcripție și care transmite informația genetică din ADN la ribozomi pentru sinteza proteinelor.
ATP –	adenozin-trifosfat, nucleotid constituit dintr-o bază azotată – adenină, o pentoză – riboza și trei grupări fosfat, atașate de al cincilea atom de carbon. Prin hidroliza legăturilor de fosfat se eliberează cantități mari de energie. Este transportator de acid fosforic în reacțiile de transfosforilare.
Autozomi –	chromozomii non-sex. Genotipul uman posedă 22 autozomi.
Bacteriofag –	virus care infectează bacteriile.
Bază azotată –	prescurtare de la baze azotate din molecule de acid nucleic (A = Adenină; T = Timină; U = Uracil; C = Citozină; G = Guanină).
Biblioteca ADN –	colecție de molecule de ADN recombinante de la o sursă specifică, de exemplu ADN genomic sau ADN complementar.
Bioetică –	știința care, utilizând o metodologie interdisciplinară, are drept obiect examenul sistematic al comportamentului uman în domeniul științelor vieții și al sănătății, examinat în lumina valorilor și principiilor umane.
Bioinginerie –	ansamblu de concepte, metode și mijloace materiale prin care se realizează biotehnologiile.
Caractere <i>input</i> –	caractere care generează valoare, asigurând creșterea producției prin protejarea culturilor (ex. rezistență la erbicide, insecte, virusuri etc.).
Caractere <i>output</i> –	produse vegetale cu însușiri nutritive ameliorate (ex. modificări ale conținutului de amidon, proteine, uleiuri, modificarea însușirilor de panificație la grâu etc.).
Cariograma –	aranjarea cromozomilor în ordinea descrescătoare a mărimii acestora.
Cariotip –	aranjarea cromozomilor unui individ conform schemei standard; se pot evidenția astfel numărul, mărimea, forma și modelul de benzi al cromozomilor, permițând astfel diagnosticul citogenetic.
CE –	abreviere de la Comunitatea Europeană.
Celule blastice –	celule sangvine aflate în stadiu timpuriu al dezvoltării celulare, înainte de apariția caracteristicilor definitive ale celulei.
Celule competente –	capacitatea celulelor bacteriene de a capta ADN exogen și de a-l integra în propriul lor genom, celula-gazdă devenind o celulă transformată.
Celule eucariote –	din gr. <i>eu</i> „adevărat”, <i>karyion</i> „nucleu” – celule diferențiate cu nucleu bine definit, ADN organizat în cromozomi, pereți celulari cu structură complexă și variată (celuloză la plante, chitină la unele specii de insecte), mitocondrii și cloroplaste, organite celulare diferențiate. Celulele eucariote se divid prin mitoză și meioză. Organisme eucariote sunt plantele și animalele.
Celule germinative –	celule ale corpului care transmit informația genetică generației următoare.

Celule procariote –	din gr. <i>pro</i> „înainte”, <i>karyion</i> „nucleu” – celule fără nucleu, cu o structură genetică simplă, un filament de ADN în citoplasmă, cu perete celular format din zaharuri și peptide. Principalele organisme procariote sunt bacteriile, algele cianofite. Se înmulțesc asexuat.
Celule somatice –	celulele non-germinative ale corpului. Ex. celulele epiteliale, nervoase, musculare.
Celule totipotente –	celule nediferențiate sau diferențiate, cărora li se poate reorienta diferențierea printr-un aport de factori de creștere în mediul lor de dezvoltare. Fenomenul de totipotență împreună cu fenomenul de diferențiere asigură regenerarea plantelor.
Centimorgan –	unitate folosită la măsurarea distanțelor pe harta genică a cromozomilor, echivalentă cu o șansă de recombinare (încrucișare) de 1%.
Centrifugare –	tehnică de sedimentare, care folosește accelerația centrifugă produsă într-un rotor, permițând separarea fracțiilor solide sau moleculelor organice dintr-o suspensie.
Centromer –	punctul în care se unesc cele două cromatide ale unui cromozom, precum și regiune a cromozomului care se atașează de fusul de diviziune în timpul diviziunii celulare.
CI –	abreviere, de la Consumers International, Federația Mondială a Asociațiilor de Consumatori.
Citocinetică –	divizarea citoplasmei pentru a forma două celule-fiice în meioză și mitoză.
Citogenetică –	ramură a geneticii care se ocupă, în principal, de studiul cromozomilor.
Citogenetică de interfază –	studiul cromozomilor în decursul interfazei, de obicei prin metoda FISH.
Citoplasmă -	substanța de bază a celulei în care se află nucleul, reticulul endoplasmatic, mitocondriile etc.
Clonă –	grup de celule, derivate dintr-o singură celulă prin mitoze repetate și având aceeași informație genetică.
Clonare –	amplificarea fragmentelor ADN, a genelor.
Cod genetic –	triplete de nucleotide ale ADN-ului, care codifică diferiți aminoacizi ai proteinelor.
Cod triplic –	o serie de trei baze azotate din molecula de ADN sau ARN, care codifică un aminoacid specific.
Codominanță –	cazul în care ambele alele sunt exprimate la un individ heterozigot.
Codon –	secvența de trei nucleotide adiacente, care codifică un aminoacid sau terminarea unui lanț.
Codon terminator –	unul din cei trei codoni (UAG, UAA și UGA), care determină oprirea sintezei proteinelor în procesul de translație.
Colonie –	grupare de celule, derivată dintr-una singură, care se dezvoltă în/ sau pe un mediu solid.
Cromatidă –	în timpul diviziunii celulare, fiecare centromer se divide, longitudinal, în două spirale sau cromatide, ținute la un loc de centromer.
Cromatină –	înfășurarea terțiară a nucleosomilor cromozomilor cu proteine asociate.
Cromozom artificial Yeast –	vector care conține secvențe ADN pentru centromer, telomer și locusuri pentru replicare cromozomială autonomă; permite clonarea fragmentelor mari de ADN cu o lungime de până la 2 - 3 milioane perechi de baze.

Cromozomi –	corpusculi de culoare închisă, de formă fibrilară, aflați în nucleu, alcătuiți din ADN și proteine, care poartă informația genetică.
Cromozomi omologi –	cromozomi care se împerechează în meioză și conțin locusuri identice.
Culturi Bt –	plante transgenice cu rezistență la insecte mediată de proteina Bt de la <i>Bacillus thuringiensis</i> . În celulele plantelor modificate genetic, care exprimă o genă modificată de la această bacterie, se sintetizează o prototoxină inactivă care, după ingerarea ei de către larvele sensibile, este clivată de proteazele din intestinul insectei într-un fragment activ. Toxina acționează prin legarea de către receptorii de la suprafața celulelor intestinale blocându-le funcționarea.
De novo –	traducere cuvânt cu cuvânt a termenului „nou“, opus termenului „ereditar“.
Deleție –	tip de aberație sau mutație cromozomială la nivelul ADN-ului, în care se pierde parțial un cromozom, unul sau mai multe nucleotide.
Denaturarea ADN –	proces reversibil de separare a celor două catene de ADN sub acțiunea unor factori fizici (temperatură, pH etc.).
Diploid –	starea în care celula conține două seturi de cromozomi; starea normală a celulelor somatice la om în care numărul diploid (2N) este 46.
Dogma centrală –	conceptul conform căruia informația genetică este, de obicei, transmisă numai de la ADN sau ARN la proteină.
Dominanță –	caracteristică (trăsătură) exprimată la indivizi heterozigoți pentru o alelă specifică.
Dominanță autosomală –	genă de pe unul din cromozomii autozomi (non-sex), care se manifestă în stare heterozigotă.
Efect de poziție –	efect pe care îl are o genă în funcție de poziția sa în cromozom. O genă care are activitate normală într-o regiune eucromatică este inactivată sau își modifică efectul în ipoteza în care este translocată în apropierea unei regiuni heterocromatice. Se manifestă mai multe tipuri de efect de poziție: variegat, difuz, stabil.
Efect pleiotropic –	totalitate a efectelor fenotipice ale unei singure gene (mutante).
Electroforeză –	deplasarea particulelor cu sarcină electrică printr-un lichid staționar situat într-un câmp, care permite separarea moleculelor pe baza vitezei de migrare determinată de sarcina, volumul și forma lor.
Electroporație –	tehnică de utilizare a unui curent electric pulsatoriu de intensitate mică pentru a fragiliza membrana unei celule în vederea fie a transformării ei cu fragmente de ADN - heterolog, fie a realizării de fuziuni între celule.
ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>) –	test de detectare a unei proteine, utilizând un marker enzimatic legat de un antigen sau anticorp.
Embriogeneză –	din gr. „ <i>embryon</i> ” – embrion și „ <i>genesis</i> ” – descendență – procese de formare și dezvoltare a embrionului; dezvoltarea embrionului din zigot.
Enzimă –	proteina care acționează ca un catalizator în sistemele biologice.
Erbicid –	agent chimic care inhibă selectiv dezvoltarea plantei (ex. Basta).

Ereditate mitocondrială –	transmiterea unei trăsături mitocondriale exclusiv pe linie feminină.
Eucariot –	celule cu nucleu bine diferențiat.
Eucromatine –	regiuni ale cromozomilor active genetic.
Eugenie –	„știință” care promovează îmbunătățirea însușirilor ereditare ale unei rase sau ale unei specii.
Evaluarea riscurilor –	evaluarea efectelor, directe sau indirecte, imediate sau întârziate, ale introducerii în mediu a organismelor modificate genetic sau a părților componente ale acestora asupra sănătății umane și mediului.
Exon (secvență exprimată) –	regiune a unei gene care nu este eliminată în transcripție, formând parte a ARN-mesager matur și deci codificând structura primară a produsului genetic – proteina.
Expansiune –	creșterea numărului secvențelor repetitive ale unor trinucleotide în diferite boli, din cauza mutațiilor dinamice sau instabile.
Expresia genei –	ansamblu de mecanisme care asigură transcripția unei gene și traducerea ei într-o proteină, reprezentând o informație transportată, reglabilă la diferite niveluri.
Factori de creștere –	substanța care trebuie să fie prezentă în mediul de cultură pentru a permite multiplicarea celulelor sau substanțe implicate în promovarea creșterii anumitor tipuri de celule, țesuturi sau părți ale corpului în dezvoltare, de exemplu, factor de creștere fibroblastică.
Fag –	abreviere pentru Bacteriofag.
Fals negativ –	cazuri afectate ratate de un test de diagnostic sau de screening.
Fals pozitiv –	cazuri neafectate diagnosticate incorect ca afectate printr-un test de diagnostic sau de screening.
Familii multigene –	gene cu similaritate funcțională și/sau de secvență.
FAO –	organizației pentru alimentație și agricultură (Food and Agriculture Organization); reprezintă cea mai mare agenție a Națiunilor Unite care coordonează agricultura, silvicultura, piscicultura și dezvoltarea rurală. Include 183 țări membre.
Fenocopie –	condiție cauzată de factori de mediu, dar care se aseamănă cu una genetică.
Fenotip –	trăsăturile (fizice, biochimice și fiziologice) ale unui individ, rezultate în urma interacțiunii mediului cu genotipul.
Fitoestrogeni –	compuși naturali, prezenți în multe produse alimentare legumicole, care pot avea un impact considerabil asupra sănătății. Se consideră că aceștia au și efecte asupra estrogenilor umani prin competiție cu cei mamari: estradiol și estronă, prin legarea la receptorii lor.
Flux de gene –	schimbul de gene la o rată joasă între două populații, ca rezultat al dispersiei gameților sau migrării indivizilor.
Fracție de recombinare –	măsură a distanței care separă două locusuri și care este determinată de posibilitatea de apariție a unui crossing-over între ele.
Genă –	o parte din molecula de ADN a unui cromozom, care conține informația genetică pentru sinteza unui lanț polipeptidic specific.

Gene antisens –	gene care sunt orientate cu 180° față de gena sens. ARNm antimesager fiind complementar cu ARNm sens, se hibridează și astfel neavând loc translarea. Strategia antisens se aplică pentru silențierea (inactivarea) expresiei unei gene.
Genă recesivă autosomală –	genă localizată pe unul din cromozomii autozomi, care se manifestă în stare homozigotă.
Genă reglatoare –	o genă reglatoare sintetizează o substanță repressoare, care inhibă acțiunea unei anumite gene operatoare.
Genă-marker –	secvență detectabilă de ADN. Detectarea se poate efectua fie prin observarea acestui segment de ADN, care conține una sau mai multe gene cu expresie fenotipică cunoscută (de ex. rezistența la antibiotice), fie prin hibridarea acestei secvențe cu o sondă complementară.
Genele raportoare –	spre deosebire de genele-marker, nu conferă celulelor rezistență la un anumit compus și codifică proteine care pot fi detectate direct sau catalizează reacții specifice ai căror produși pot fi detectați prin metode relativ simple. Cele mai importante gene-marker sunt: <i>gus</i> , <i>gfp</i> , <i>luc</i> .
Genom –	totalitatea genelor purtate de o celulă.
Genotip –	structura genetică a unui individ, totalitatea caracterelor.
Haploid –	condiția în care celula conține un set înjumătățit de cromozomi, de ex., 23 la om. Acesta este numărul de cromozomi într-un gamet.
Haptenă –	moleculă de mici dimensiuni lipsită, ca atare, de imunogenitate, dar de dimensiuni mai mari denumită PURTĂTOR (CARRIER).
Heterocromatină –	regiune a cromozomilor inertă sau inactivă genetic.
Heteromorfism –	polimorfism structural ereditar al unui cromozom.
Heterozigot (= purtător) –	individ cu două alele diferite pentru un locus specific de pe o pereche de cromozomi omologi.
Heterozigot dublu –	un individ care este heterozigot pentru două locusuri diferite.
Hibridare moleculară –	împerecherea unor lanțuri de acizi nucleici complementari (ADN și ARN), formarea zonelor de dublare constituind un indiciu asupra complementarității lanțurilor. Rezultatul acestei împerecheri este un hibrid ADN-ARN.
Hibridizare <i>in situ</i> prin fluorescență (Fluorescent <i>in situ</i> hybridisation –FISH) –	utilizarea unei singure secvențe ADN, marcate fluorescent pentru a se hibridiza cu secvența-țintă complementară existentă în cromozomi, permițând vizualizarea ei la raze ultraviolete.
Himeră –	individ cu două populații celulare cu genotipuri diferite.
Histocompatibilitate –	similaritatea testului la indivizi diferiți. Nivelul de histocompatibilitate prezintă gradul de compatibilitate dintre gazdă și donor. Determinanții principali ai histocompatibilității sunt antigenii leucocitari umani (HLA). Tipizarea HLA se realizează între donorul de măduva osoasă potențial și receptor, pentru a determina cât de compatibili sunt. Cu cât este mai mare gradul de compatibilitate, cu atât mai puțin vor reacționa măduva donată și corpul gazdei unul împotriva celuilalt.
Histone –	tip de proteine bogate în lizină și arginină, care se găsesc în asociație cu ADN-ul din cromozomi.
Homozigot –	individ care are două alele identice într-un locus specific de pe o pereche de cromozomi omologi.

Idiogramă –	reprezentare idealizată a unui obiect, de exemplu, idiograma unui cariotip.
Incidență –	rata la care se petrec cazuri noi, raportată la 1000 de cazuri.
Incompatibilitate –	donorul și gazda sunt incompatibili dacă gazda refuză greșea de la donator.
Inginerie genetică –	ansamblul de concepte, metode și tehnici care permit efectuarea de modificări ale patrimoniului ereditar al unei celule prin manipularea și transferul genelor, determinând introducerea unor anumite caracteristici într-o celulă.
Instabilitate cromozomială –	prezența unor rupturi sau unor locuri optice goale în cromozomii indivizilor care suferă de mai multe boli asociate cu un risc de neoplazie.
Introducere deliberată în mediu –	orice introducere intenționată în mediu a unui organism modificat genetic sau a unei combinații de astfel de organisme, care se caracterizează printr-un grad înalt de securitate pentru oameni și mediu, fără să fie necesare măsurile specifice de izolare.
Introducere pe piață –	furnizarea organismelor modificate genetic sau a produselor rezultate din acestea, contra plată sau gratuit, către terți.
Inversie –	tip de aberație sau mutație cromozomială, în care o parte dintr-un cromozom sau dintr-o secvență ADN are ordinea inversată.
In vitro –	(din latină – în sticlă), experiențe efectuate în afara organismului, în condiții de laborator. Culturile de celule <i>in vitro</i> se efectuează pe medii artificiale.
In vivo –	experiențe din cadrul sistemului viu.
Kilobază –	unitate de măsură pentru lungimea fragmentelor de ADN, egală cu o mie de perechi de baze.
Lipozomi –	structuri de tip celular preparate artificial, în care unul sau mai multe straturi bimoleculare de fosfolipide conțin unul sau mai multe compartimente lichidiene, care pot include proteine.
Locus –	poziția ocupată de o genă sau marker genetic în cromozom.
Marker –	termen larg folosit pentru o grupă de sânge, polimorfism biochimic sau ADN, care, dacă se demonstrează că este legat de locusul de interes al bolii, se poate folosi în diagnosticul presimptomatic, determinarea statusului de purtător de genă patologică și în diagnosticul prenatal.
Meioză –	tip de diviziune celulară în care are loc formarea gameților prin înjumătățirea numărului de cromozomi din celula somatică, astfel încât fiecare gamet este haploid.
Microdeleție –	o mică deleție cromozomială, detectabilă prin analiza cromozomială de rezoluție înaltă în prometafază.
Minicromozomi –	cromozomi creați artificial, ce conțin elemente centromerice și telomerice, care permit replicarea ADN-ului străin ca entitate separată.
Mitoză –	tip de diviziune celulară care are loc în replicarea celulelor somatice.
Mutagen –	radiație ionizantă naturală sau artificială, agenți chimici sau fizici, care induc modificări în ADN.
Mutație –	modificare a materialului genetic, fie a unei singure gene, fie a numărului sau a structurii cromozomului; mutația care apare în gameți (mutație germinală) este ereditară, în timp ce mutația din celulele somatice (mutație somatică) nu este ereditară.

MVKGID (МБКГИД) –	Comisia internă care reglementează activitățile în domeniul ingineriei genetice.
Nucleotid –	monomerul acizilor nucleici ce constă dintr-o bază azotată, pentoză și un grup fosfat.
Nucleu –	organit bimerbrantar, specific celulei de tip eucariot, care conține cromozomii și nucleolul.
OECD –	Organizația pentru Cooperare Economică și Dezvoltare.
OMS –	Organizația Mondială a Sănătății.
ONU –	Organizația Națiunilor Unite, organizație internațională, care include 185 de țări. A fost creată la 24 octombrie 1945 în scopul asigurării păcii și securității la nivel internațional, promovării progresului social și drepturilor omului, dezvoltării relațiilor de prietenie dintre națiuni.
Organogeneză –	gr. <i>organon</i> ; <i>genesis</i> – descendență – formarea, diferențierea, dezvoltarea organelor.
pb –	perechi de baze azotate (1000 pb = 1 kb (kilobază)).
Reacția de polimerizare în lanț –	(<i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR) reacție repetitivă în serie, care presupune utilizarea primerilor oligonucleotidici și a enzimei ADN-polimeraza folosită la amplificarea unei secvențe ADN de interes.
Pictarea cromozomială –	(<i>Chromosome painting</i>) variantă a metodei de hibridizare <i>in situ</i> , folosind probe marcate cu fluorocromi, care permit colorarea diferită a fiecărei perechi de cromozomi.
Pierderea heterozigoției constituțional (PHC) –	pierderea unei alele moștenite de la un părinte, deseori considerată drept un pas necesar în tumorigeneză.
Pirimidină –	bază azotată de tipul citozină, uracil, timină.
Plasmidă –	formațiune extracromozomială, capabilă de replicare independentă. Conține 0,5 - 2% din totalul ADN-lui celular. ADN-ul plasmidic este un duplex circular, lipsit de histone. Sunt caracteristice bacteriilor, dar au fost găsite și la porumb etc. Plasmidele diferă de la o specie la alta prin dimensiuni și conținut în ADN. Conțin un număr redus de gene implicate în unele procese metabolice și în rezistența la antibiotice. Sunt folosite ca vectori în ingineria genetică.
Polilinker –	secvență din cadrul plasmidei, ce conține situsuri unice de restricție pentru enzimele de restricție. Pentru fiecare tip de restricție există un singur situs de restricție.
Polimorfism –	prezența, în cadrul unei populații, a două sau mai multe forme determinate genetic în asemenea frecvență încât cea mai rară dintre ele nu poate fi menținută numai prin mutație.
Poliploid –	orice multiplu al numărului haploid de cromozomi, de exemplu, 3N, 4N etc.
Primer –	secvență scurtă de nucleotide, complementară unui fragment de ADN. De sonda de hibridare se deosebește prin faptul că nu este marcată și are dimensiuni mai mici.
Probabilitate –	de câte ori are loc un rezultat într-o serie de evenimente.
Procedeul BLOTT –	transferul moleculelor de ADN (<i>Southern</i>), ARN (<i>Northern</i>) sau proteine (<i>Western</i>) din gel pe o membrană de nailon sau nitroceluloză.
Procesare –	modificarea ARN-mesager, care se petrece în transcripție, inclusiv îmbinarea, capping și poliadenilarea.
Produce rezultate din organisme modificate genetic –	produce, constând dintr-un organism modificat genetic sau dintr-o combinație de asemenea organisme, care se introduc pe piață.

Proteină –	compus organic complex, alcătuit din sute sau mii de aminoacizi, cu conformație structurală definită.
Purină –	bază azotată de tipul adenina sau guanina.
Radiații ionizante –	unde electromagnetice de lungime foarte scurtă (raze X și λ) și particule cu energie crescută.
Rata mutației –	numărul de mutații dintr-un locus specific, care au loc într-un gamet într-o generație.
Recombinare –	crossing-over (încrucșare) între două locusuri legate (se transmit împreună în meioză).
Reparare ADN –	ADN-ul deteriorat printr-o varietate de mecanisme poate fi îndepărtat și reparat printr-un set complex de procese.
Replicare –	procesul de copiere a ADN-ului dublu catenar al cromozomilor.
Replicare ADN –	procesul de copiere a secvenței de nucleotide a genomului; permite transmiterea informației genetice de la o celulă la alta.
Represor –	produsul unei gene reglatoare a unui operon, care inhibă gena operatoare.
Restrictaze –	enzime care digeră specific molecula de ADN, în anumite locusuri (site-uri de restricție) de tip palindromic (secvențe inversate).
Reverstranscripție –	sinteza catenei ADNc de pe ARNm cu ajutorul enzimei revertazei sau reverstranscriptazei.
Ribozomi –	structuri sferice mici, din citoplasmă formate din două subunități, bogate în ARN ribosomal; locul sintezei proteinelor.
Screening –	identificarea PMG dintr-o probă utilizând primeri specifici secvențelor 35S și NOS prin metoda PCR.
Segregare –	separarea alelelor în meioză, astfel încât fiecare gamet să conțină numai un membru al fiecărei perechi de alele.
Sensibilitate –	termen referitor la proporția de cazuri detectate; măsurarea sensibilității se poate face prin determinarea proporției rezultatelor fals negative, adică numărul de cazuri nedetectate.
Serviciul de consiliere a consumatorilor –	serviciu prestat de un organ de stat sau o organizație de consumatori.
Situs (site) de restricție –	secvențe specifice de nucleotide, recunoscute și clivate (tăiate) de endonucleaze sau restrictaze. Fiecare enzimă posedă propriul situs specific de restricție.
Sondă de hibridare –	secvență de nucleotide, complementară unei secvențe din ADN sau ARN, marcată radioactiv (sonde calde) sau neradioactiv (sonde reci).
Southern BLOT –	tehnică utilizată în ingineria genetică pentru efectuarea testelor de hibridare ADN-ADN, constând din două faze: transferul fragmentelor de ADN separate prin electroforeză pe gel de agaroză într-o membrană de nitroceluloză; hibridarea membranei astfel încărcate cu o soluție de acid nucleic monocatenar – în cazul în care acesta din urmă este radiomarcant. Zona de hibridare poate fi vizualizată prin autoradiografie.
Splicing-ul ARN-ului mesager –	excizia secvențelor necodante ale intronilor din ARN-mesager primar, ducând la aranjarea exonilor nonadiacenți (non-contigui), pentru a forma un ARN-mesager matur mai scurt înainte de a fi transportat la ribozomii din citoplasmă, pentru translație.
Substituție –	înlocuirea unui nucleotid prin altul.

Superfamilii de gene –	familii de multigene care au o omologie secvențială limitată, dar sunt legate din punct de vedere funcțional.
T-capete –	secvențe specifice de nucleotide care flanchează capetele T-ADN-lui ce permite integrarea ultimului în cadrul genomului vegetal.
Tehnologia FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) –	marcarea sondelor de hibridare cu agenți fluorescenți. Principiul metodei se bazează pe legarea de ADN-ul sondei, fie a biotinei, fie a unei heptane, care le face vizibile după hibridare, de pildă cu un anticorp marcat cu un fluorocrom.
Telomer –	porțiunea distală a brațelor cromozomiale.
Terminator –	secvența de nucleotide în ADN, care codifică terminarea transcripției ARN-mesager.
Testare în câmp –	experiment constând în studierea organismelor modificate genetic în câmp, în condiții de mediu aflate sub control, avându-se certitudinea că aceste organisme nu vor persista în mediu după încheierea experimentului.
Transcripția inversă PCR (RT-PCR) –	utilizarea unui primer special care conține un promotor și un inițiator de translație și folosind PCR-ul se poate obține ADN complementar plecând de la ARN-mesager.
Transcripție –	copierea nucleotidelor de pe matricea ADN pe catena ARN în formare, în succesiune complementară: adenină-uracil, guanină-citozină. De pe catena ADN informația genetică se transmite pe ARNm.
Transfer orizontal al genelor –	proces care implică transferul informației genetice între organisme aparținând unor taxoni diferiți, oricât de diverși ar fi.
Transformare –	recombinare genetică în bacterii în care ADN-ul străin introdus în bacterie este încorporat în cromozomul bacteriei recipient; de asemenea, transformarea unei celule normale într-o celulă malignă, de exemplu, așa cum rezultă la infecția celulelor normale cu virusuri oncogene.
Translație –	conversiune a informației genetice, conținută în ARNm, într-o secvență de aminoacizi. Sinteza se desfășoară în mai multe etape: activarea aminoacizilor de către aminoacil-sintetaze pentru a forma aminoacizi adenilați, în care grupul carboxil se leagă de un grup de acid adenilic; atașarea aminoacidului activat de ARNt, transferul fiind asigurat de aceeași enzimă, care are astfel dubla proprietate de a recunoaște un aminoacid și un ARNt – la extremitatea 3' a ARNt, de adenină terminală. Sinteza are loc în ribozomi.
Translocație –	transferul materialului genetic de la un cromozom la altul; dacă există și un schimb de material genetic între doi cromozomi, atunci acesta este denumit <i>translocație reciprocă</i> ; translocația dintre doi cromozomi acrocentrici prin fuziune la centromeri se numește <i>translocație robertsoniană</i> .
Vector –	plasmid, bacteriofag sau cosmidă în care se poate insera ADN străin pentru clonare.
Virion –	particulă virală infecțioasă.
Virus –	organism care conține ADN sau ARN învelit în capsula proteică și care este capabil de replicare numai în cadrul celulelor bacteriene sau eucariote.
Zigot –	ovul fertilizat.

Bibliografie

1. ABEBE T. GUENZI A.C., MARTIN B. et al. *Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity*. Plant Physiology, 2003, 131, p. 1748-1755.
2. AHEMD F.E. *Detection of Genetically Modified Organisms in Foods*. Trends in Biotechnology, 2002, 20 (5), p. 2215-2223.
3. AHOKAS H. *Transfection of germinating barley seed electrophoretically with exogenous DNA*. Theor. Appl. Genet., 1989, 77, p.469-472.
4. AKHILESH K. TYAGI. *Plant genes and their expression*. Current Science, 25 January, 2001, 80(2), p. 161-169.
5. ALBAN C., JOB D., DOUCE R. *Biotin metabolism in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2000, 51, p. 17-47.
6. ANKLAM E., GADANI F., HEINZE P. et al. *Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products*. Eur Food Technol, 2002, 214, p. 3-26.
7. *Autorizarea activităților legate de Organismele Modificate Genetic (OMG) (Ghid practic)*, Chișinău, 16 p. 2004.
8. ARAGAO F.J.L, BRASILEIRO C.M.B. *Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection*. Braz. J. Plant Physiol., 2002, 14(1), p. 1-10.
9. *Australian Pilot Survey of GM Food Labeling of Corn and Soy Food Products*. The TAG Working Group on GM Food Labeling. June, 2003, 24 p.
10. BADEA E.M., SĂNDULESCU D. *Biotehnologii vegetale*, București, 2001, 295 p.
11. BARCELO P., RASCO-GAUNT S., THORPE C. et al. *Transformation and gene expression*. Advances in Botanical Research, 2001, 34, p. 60-125;
12. BERTHEAUX Y. *Programme de recherche. Pertinence économique et faisabilité d'une filière, sans utilisation d'OMG*, INRA, 2001, 48 p.
13. BIDNEY D., SCELONGE C., MARTICH J. et al. *Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molec. Biol., 1992, 18, p. 301-313.
14. *Biosecuritatea în Republica Moldova. Aspecte instituțional-legislative*, Chișinău, 2003.
15. BONFINI L., HEINZE P., KAY S., et al. *Review of GMO detection and quantification techniques*. Italy, 2001, 67 p.
16. BRAY E.A., BAILEY-SERRES J. and WERETILNYK E. Responses to abiotic stresses. 2000, p. 1158-1249. In W. Gruissem et al. (ed.) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Am. Soc. of Plant Physiol., Rockville, MD.
17. BRINCH-PERESEN H., OLSEN O., KNUDSEN S. și al. *An evaluation of feed-back insensitive aspartate kinase as a selectable marker for barley (Hordeum vulgare L.) transformation*, Hereditas, 131, 1999, p. 239-245.
18. BRUNNERT H-J., SPENDER F., BORRCHERS T. *PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans*. Eur Food Res Technol, 213, 2001, p. 366-371.
19. *CADRUL NAȚIONAL ÎN DOMENIUL SECURITĂȚII BIOLOGICE*, Chișinău, 2004, 47 p.
20. CHOMCZYNSKI P., MACKEY K., DREWS R. and WILFINGER W. *DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA*. BioTechniques, 1997, 22, p. 550-553.
21. CLIVE J. *Global status of commercialized Biotech/GM crops*. www.isaaa.org.
22. CONKLIN P. *Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants*. Plant Cell Environ 2001, 24, p. 383-394.
23. CORESTA Task Force *Genetically Modified Tobacco-Detection Methods*. www.cores-ta.org, 41 p.

24. CORPILLO D., GARDINI G., VAIRAA.M. et al. *Proteomics as tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus – resistant tomato*. Proteomics, 2004, 4, p. 193-200.
25. CROSSWAY A., OAKES J.V., IRVINE J.M., et al. *Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts*. Molecular and General Genetics, 1986, 202, p. 179-185.
26. CUNNINGHAM F.X., GANTT E. *Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol., 1998, 49, p. 557-583.
27. DATTA K., BAISAKH N., THET K.M. et al. *Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight*. Theor. Appl. Genet. 2002, 106, p.1-8.
28. DAVEY M.R., RECH E.L., MULLIGAN B.J. *Direct DNA transfer to plant cells*. Plant Mol. Biol., 1989, 13, p. 273-285.
29. DE BLOCK M., BOTTERMAN J., VANDEWIELE M. et al. *Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme*. EMBO J., 1987, 6(8), p. 2513-2518.
30. De WET J.M.J., De WET A.E., BRINK D.E. et al. *Gametophyte transformation in maize. (Zea Mays, Gramineae.)*. In Biotechnology and Ecology of Pollen, edited by D.C. Mulcahy, 1986, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 59-64.
31. DUCA M., GLIJIN A., LUPAȘCU V., PORT A., LEVIȚCHI A. *Genetic control of GMP using NOS terminator*, The Third International Conference Ecological Chemistry, Chișinău, 2005, p. 398-399.
32. DUCA M., GLIJIN A., LUPAȘCU V., PORT A., LEVIȚCHI A. *The evidence of marker GFP in transgenic plants*, The Third Internațional Conference Ecological Chemistry, Chișinău, 2005, p. 398.
33. DUCA M., KALOSHIAN I. *Tehnici de cercetare în biologia moleculară*, Chișinău, CE USM, 2002, 71 p.
34. DUCA M., SAVCA E., PORT A. *Fiziologia vegetală. Tehnici speciale de laborator*, USM, 2001, 173 p.
35. DUCA M., TELEUȚĂ A., PORT A. *Plante modificate genetic. Beneficii și riscuri*, Chișinău, 2003, 96 p.
36. DUCA M., TELEUȚĂ A., PORT A., *Organismele modificate genetic. Prezent și viitor*, Chișinău, 2004, 31 p.
37. DUCA M., LUPAȘCU V., GLIJIN A., PORT A., CARDENAS-OROZCO M. *Expresia și moștenirea genei Basta la tutunul transgenic*, Buletinul AȘM, Științe ale vieții, 2(299), Chișinău, 2006, p. 70-76.
38. DUCREUX L.J.M., MORRIS W.L., HEDLEY P.E. et al. *Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein*. J. Exp. Bot. 2004, 56, p. 81-89.
39. EBINUMA H., SUGITA K., MATSUNAGA E. and YAMAKADO M. *Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA., 1997, 94, p. 2117-2121.
40. EYQUEM F. *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*, Session 12, Quantitative detection of Roundup Ready® Soybean by ELISA, 21 p.
41. FISCHER R., EMANS N. *Molecular farming of pharmaceutical proteins*. Transgenic Res. 2000, 9, p. 299.
42. FLOWERS T.J. *Improving crop salt tolerance*. J. Exp. Bot. 2004, 55, p. 307-319.
43. *Genetically modified GM (crops) molecular and regulatory details*. Version 2, 30/06/2003, BATS, 199 p.
44. GIDDINGS G., ALLISON G., BROOKS D., CARTER A. *Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals*. Nat Biotechnol. 2000, 18, p. 1151-1155.

45. GILBERT B., ERIC J., FREDERIC D. *Détection, identification et quantification des transgènes dans les aliments par amplification génique*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2000, 4 (4), p. 208-213.
46. GONSALVES D. *Transgenic papaya: a cause study on the theoretical and practical application of virus resistance*. 2003, p. 115-118. In I.K. Vasil (ed.) *Plant biotechnology 2002 and beyond*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands.
47. GRIFFITHS K., et al. *Review of Technologies for Detecting Genetically Modified Materials in Commodities and Food*, Australian Government Analytical Laboratories, 2002.
48. GRUSAK M.A., DELLA PENNA D. *Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999, 50, p. 133-161.
49. GIULIANO G., AQUILANI R., DHARMAPURI S. *Metabolic engineering of plant carotenoids*. Trends Plant Science, 2005, 10, p. 406-409.
50. HARDEGGER M., BRODMANN P., HERRMANN A. *Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR*. Eur. Food Res. Technol., 1999, 209, p. 83-87.
51. HEMMER W. *Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods*, BATS, http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/index.php.
52. HERBES K., SONNEWALD U. *Production of new/modified proteins in transgenic plants*. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10, p. 163-168.
53. ISHIDA, Y., SAITO, H., OHTA, S. et al. *High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology, 1996, 14, p. 745-750.
54. JAIN A.K., NESSLER C.L. *Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants*. Mol Breeding, 2000, 6, p. 73-78.
55. JAUHAR P.P. *Cytogenetic architecture of cereal crops and their manipulation to fit human needs: opportunities and challenges*. 2006, p. 1-25.
56. JEFFERSON R. A. *Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system*. Plant Mol. Biol. Rep., 1987, 5, p. 387-405.
57. JEFFERSON R.A., KAVANAGH T.A., BEVAN M.W. *GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J., 1987, 6, p. 3901-3907.
58. JOERSBO M., OKKELS T. *A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection*. Plant Cell Rep., 1996, 16, p. 219-221.
59. JOERSBO M. and OKKELS F.T. *A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection*. Plant Cell Reports, 1996, 16, p. 219-221.
60. KAEPLER, H.F., SOMERS, D.A., RINES, H.W. et al. *Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells*. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84, p. 560-566.
61. KAPUSTA J, MODELSKA A, FIGLEROWICZ M. et al. *A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus*. FASEB J., 1999, 13, p. 1796-1799.
62. KRENS F.A., MOLENDIJK L., WULLEMS G.J., SCHILPEROORT R.A. *In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA*. Nature, 1982, 296, p. 72-74.
63. KUIPER H.A. *Summary report of the ILSI Europe Workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms*. Food control, 1999, 10 (6), p. 339-343.
64. KUIPER H.A., GIJS A.K. HUB P.J. et al. *Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods*. The Plant Journal, 2001, 27(6), p. 503-528.
65. LAEMLI U.K. *Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4*, Nature, 1970, 227, p. 680-685.
66. LANGRIDGE P., BRETTSCHEIDER R., LAZZERI P. and LOERZ H. *Transformation of cereals via Agrobacterium and the pollen pathway: A critical assessment*. The Plant Journal, 1992, 2, p. 631-638.

67. LI F., DEY M., HE C. et al. *Rapid PCR-based determination of transgene copy number rice*. Plant Molecular Biology Reporter, March 2003, 21, p. 73-80.
68. LIPP M., ANKLAM E și STAVE J.W. *Reference Materials*. Journal of AOAC International, 2000, 83, p. 919-927.
69. LIN-CHING C., YEN-LING C., DANIEL Y.S. *Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods*. Journal of Food and Drug Analysis, 2002, 10(1), p. 25-33.
70. LOZAN A., CĂLDĂRUȘ V., MEREUȚĂ N. și al. *Suport pentru dezvoltarea cadrului național de biosecuritate al Republicii Moldova*, Chișinău, 2005, 40 p.
71. LUBECK M. *Detection of genetically modified plants-methods to sample and analyze GMO content in plants and plant products*. www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm, 32 p.
72. LUO Z. and WU R. *A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway*. Plant Molecular Biology Reporter, 1988, 6, p. 165-174.
73. LUPAȘCU V. *Detectarea plantelor modificate genetic utilizând secvența NOS-terminator*. Lucrări științifice, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, vol. 13., 2005 p. 138-141.
74. LUPAȘCU V. *Aspecte în evaluarea plantelor modificate genetic (Nicotina tabacum var. Xanthi) și metode de identificare a acestora. Autoreferat al tezei de doctor în biologie*, Chișinău, 2007 p. 24 (www.cnaa.acad.md)
75. MAYER J., SHARPLES J., NOTTEMBURG C. *Resistance to phosphinothricin*, „The Team”, Cambia, 2004, 43 p.
76. MAYNE S.T. *β-carotene, carotenoids and disease prevention in humans*. FASEB J 1996, 10, p. 690-701.
77. MEYER R. *Nachweis gentechnologisch veränderter Lebensmittel mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)*. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 1995, 86, p. 648-656.
78. MIELE L. *Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations*. Trends Biotechnol., 1997, 15, p. 45-50.
79. MILICĂ C. I. *Biotehnologiile viitorului*. Iași, Ed. „Ion Ionescu de la Brad”, 1999, 351 p.
80. MOLDOVEANU D., MILITARU C., MOLDOVEANU I. *Microbiologie și inginerie genetică*, Ed. FIAT LUX, 2001, 351 p.;
81. MURRAY M.G. and THOMPSON W.F. *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nucleic Acids Research, 8(19), 1980, p. 4321-4325.
82. NAUERBY B., BILLING K. and WYNDAELE R. *Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 1997, 123, p. 169-177.
83. *Organisme modificate genetic: beneficii și riscuri* (broșură), 8 p.
84. *Organisme modificate genetic – opinii privind biosecuritatea*, Chișinău, 2004, 20 p.
85. PALII A., COMAROV G., LOZAN A. și al. *Biotehnologii moderne în fitotehnie și biosecuritate*. Chișinău, 2004, 229 p.
86. PATTON D. *Transgenic plants having increased biotin content*. US 5869719 (Novartis) 1997.
87. PERL A., LOTAN O., ABU-ABIED M. and HOLLAND D. *Establishment of an Agrobacterium-mediated transformation system for grape (Vitis vinifera L.): the role of antioxidants during grape-Agrobacterium interactions*. Nature Biotechnology, 1996, 14, p. 624-628.
88. POPESCU O.V. *Electroforeza proteinelor în geluri de poliacrilamidă*, București, Ed. Tehnică, 1990, 268 p.
89. PICARD E., JACQUEMIN J.M., GRAINER F., et al. *Genetic transformation of wheat (Triticum aestivum) by plasmid DNA uptake during pollen tube germination*. In Proceedings of the 7th International Genetics Symposium, IPSR, Cambridge, 1988, p. 779-787.

90. *Primul raport național cu privire la diversitatea biologică*, Chișinău, 2000.
91. RAICU P. *Genetica: genetică moleculară și inginerie genetică*. Partea II, București, 1997, 250 p.
92. RAKOSY-TICAN L. *Progrese recente în cercetările de transformare genetică a plantelor. Progrese în biotehnologie*. Ars Docendi, 2002, vol. 2. p. 37-50.
93. REED J.N., CHANG Y.F., McNAMARA D.D. și al. *High frequency transformation of wheat with the selectable marker mannose-6-phosphate isomerase (PMI)*. In vitro, 1999, 35, p. 57.
94. REVA V., CIOBANU V., MUELLER-URI F. *Strategia și tactica izolării și purificării proteinelor*. USM. 2001, p. 40-44.
95. ROA-RODRIGUEZ C. *Promoters used to regulate gene expression*, „The Team”, Cambia, 2003, 210 p.
96. ROESSNER U., WAGNER C., KOPKA J. et al. *Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry*. The Plant Journal, 2000, 23(1), p. 131-142.
97. SAHRAWAT A.K., BECKER D., LUTTICKE S. et al. *Genetic improvement of wheat via alien gene transfer; an assessment*. Plant Sci. 2003, 165, p. 1147-1168.
98. SALA F., RIGANO M.M., BARBANTE A., et al. *Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives*. Vaccine, 2003, 21, p. 803-808;
99. SAMBROOK J., FRITSCH E.F. and MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York chapter 6, 1989.
100. SAMBROOK J., RUSSELL D., *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol. I-III, 2001.
101. SANDMANN G. *Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements*. Trends Plant Science, 2001, 6(1), p. 14-17.
102. SANFORD J.C., KLEIN T.M., WOLF E.D. and ALLEN N. *Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process*. Particulate Science and Technology, 1987, 5, p. 27-37.
103. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., BROWN, S. et al. *Characterization of competent cells and early events of Agrobacterium-mediated genetic transformation in Arabidopsis thaliana*. Planta, 1992, 188, p. 439-456.
104. SCORPAN V., LOZAN A. *Dicționar de termeni biotehnologici*, Chișinău, 2005, 182 p.
105. SHARMA H.C., SHARMA K., and CROUCH J. *Genetic transformation of crops for insect resistance: potential and limitations*. Crit. Rev. Plant Sci., 2004, 23, p.47-72.
106. SOMA M. *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*. Extraction and purification of DNA. Session 4, 2004, 18 p.
107. SOMA M., QUERCI M. *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*. Agarose Gel Electrophoresis. Session 5, 2004, 18 p.
108. SPOTH B., STRAUSS E. *Screening for Genetically Modified Organisms in Food Using Promega's Wizard® Resin*, www.promega.com, p. 23-25.
109. STANTON B.G. *Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2000, 51, p. 223-256.
110. *Strategia Națională și Planul de Acțiune în domeniul Conservării Diversității Biologice*, Chișinău, 2002.
111. STRATAN N., LOZAN A., CIOBANU S. *Protocolul de la Cartagena privind biosecuritatea* (compendium), Chișinău, 2004, 19 p.
112. STRATAN N., LOZAN A., CĂLDĂRUȘ V., CIOBANU S. *Autorizarea activităților legate de organismele modificate genetic (OMG) (Ghid practic)*, Chișinău, 2004, 16 p.
113. STOGER E., SACK M., PERRIN Y. et al. *Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems*. Mol Breed, 2000, 9, p. 149-158.
114. *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*. Joint Research Centre. Sessions 1-12, 2004.

115. THION L., VOSSEN C., COUDERC B. et al. *Detection of genetically modified organisms in food by DNA extraction and PCR amplification*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2002, 30(1), p. 51-55.
116. TILLMANN M. Â. A., WEST S. *Identification of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate*, Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), 61(3), Piracicaba May/June 2004, p. 336-341.
117. TRAPMANN S. and EMONS H. *Reliable GMO analysis*. Anal Bioanal Chem. 2005, 381, p. 72-74.
118. TSIEN R. Y. *The Green Fluorescent Protein*. Annu. Rev. Biochem., 1998, 67, p. 509-544.
119. TWYMAN RM, STPGER E, SCHILLBERG S. et al. *Molecular farming in plants: host systems and expression technology*. Trends Biotechnol., 2003, 21, p. 570-578.
120. VAN DER GRAAFF E., den DULK-RAS A. and HOOYKAAS P.J.J. *Deviating T-DNA transfer from Agrobacterium tumefaciens to plants*. Plant Molecular Biology, 1996, 31, p. 677-681.
121. VAN ERD L.L., HOAGLAND R. E., ZABLOTOWICZ R. M. et al. *Pesticide metabolism in plants and microorganisms*. Weed Science, 2003, 51, p. 472-495;
122. VAN HAAREN M.J.J., SEDEE, N.J.A., KRUL M., et al. *Function of hetero-logous and pseudo border repeats in T region transfer via the octopine virulence system of Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology, 1988, 11, 773-781.
123. VLAIC A. *Inginerie genetică. Realizări, speranțe și neliniști*. Cluj-Napoca, 1997.
124. WANG K., HERRERA-ESTRELLA A. and VAN MONTAGU, M. *Over expression of virD₁ and virD₂ genes in Agrobacterium tumefaciens enhances T-complex formation and plant transformation*. Journal of Bacteriology, 1990, 172, p. 4432-4440.
125. WANG K., HERRERA-ESTRELLA L., VAN MONTAGU M. and ZAMBRYSKI, P. *Right 25-bp terminus sequences of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from Agrobacterium to the plant genome*. Cell, 1984, 38, p. 455-462.
126. WATERS V.L. and GUINEY D.G. *Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication*. Molecular Microbiology, 1993, 9, p. 1123-1130.
127. WILMINKAND J.J.M. *Dons Selective Agents and Marker Genes for Use in Transformation of Monocotyledonous Plants*. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11 (2), p. 165-185.
128. WOLFRAM HEMMEZ. *Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*. BATS, 59 p.
129. ZENG J., WANG D., WU Y., et al. *Transgenic wheat plants obtained with pollen tube pathway method*. Science in China, 1994, 37(3), p. 319-325.
130. ZHEN TAO, XING-FENG CAI, SHENG-LI YANG et al. *Detection of exogenous genes in genetically modified plants with multiplex polymerase chain reaction*. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19, p. 289-298.
131. ГЛЕБА Ю.Ю. *Биотехнология растений*. Сорковский образовательный журнал, серия Биология, 1998, 6, с. 3-8.
132. ЗУБОВА Н.Н., БУЛАВИНА А. Ю., САВИЦКИЙ А.П. *Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков*. Успехи биологической химии, 2003, 43, с. 163-224.
133. ЗВЕРЕВА С. Д., РОМАНОВ Г. А. *Репортерные гены для генетической инженерии растений. Характеристика и методы тестирования*. Физиология растений, 2000, Т. 47. 3, с. 479-488.
134. МАНИАТИС Т., ФРИЧ, СЭМБРУК Дж., *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. Москва Мир, 1984. 500 с.
135. *Практикум по биохимии растений*. Под ред. Щипарева С.М. Санкт-Петербург, 1996, 197 с.
136. ПОЛЕВОЙ В.В. *Физиология растений*. М., Высшая школа, 1989, 464 с.

Pagini WEB

136. <http://www.aberdeeen.k12.sd.us/dsc/departments/foundation/wish%20list%20images/SPECTROPHOTOMETER.jpg>.
137. <http://www.agbios.com/dbase.php>.
138. <http://www.aphis.usda.gov>.
139. <http://www.ars.usda.gov/pandp/docs.htm?docid=11318>.
140. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/37/table/T4>.
141. http://www2.biologie.fu-berlin.de/lampart/gp03/GUS_assay.html.
142. <http://www.biosafety.md>
143. <http://www.bats.ch/bats/en/index.php>.
144. <http://biotech.jrc.it/home/ict/methodsdatabase.htm#Database>.
145. <http://www.cambia.org/daisy/cambia/1204.html>.
146. www.cenorm.be.
147. <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>.
148. <http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=965410145&do>.
149. <http://engl.jrc.it/designated.htm>.
150. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf> și [381/95](http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf).
151. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf>.
152. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf>.
153. <http://www.emediawire.com/prfiles/2005/03/08/216266/AdvancedInstrumentsFLM>
154. www.fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm.
155. <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>.
156. <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>.
157. <http://gmo-crl.jrc.it>.
158. gmo-crl.jrc.it/summaries/Bt11-protocol.pdf.
159. www.gmo-crl.jrc.it/detectionmethods/MON-Art47-dnaextraction.pdf.
160. <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>.
161. <http://www.gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>.
162. www.greenpeace.org/raw/content/espana/reports/que-cantidad-de-toxina-bt-pro.pdf.
163. www.monsanto.com/monsanto/content/products/technicalAndSafety/yieldgard_corn/dna_dm.pdf.
164. http://projects_2004.jrc.cec.eu.int.
165. www.plant-tc.coafes.umn.edu/maize-tc/pptbial.jpg.
166. http://www.pcr.ru/bibliogr/articles/article_18.htm.
167. www.isaaa.org.
168. www.molbiol.ru.
169. <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr13-16b.htm>.
170. <http://www.iscpubs.com/articles/abl/b0403jen.pdf>.
171. www.iso.org.
172. <http://www.life.uiuc.edu/biochem/355/articles/GMObeansPCR.pdf>.
173. <http://www.olis.oecd.org/bioprod.nsf>.
174. <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/24/lect24.html>.

Abrevieri

BAC – Bacterial artificial chromosome
BATS – Centre for biosafety and sustainability
BPP – Business Partnership Program
CaMV – Cauliflower Mosaic Virus
COBASE – Collaboration in Basic Science and Engineering
CRDF – Civilian Research and Development Foundation
CSB – Centrul de Securitate Biologică
CTAB – cetiltrimetilamonium-bromid
ELISA – enzyme linked immunosorbent assays
ENGL – The European Network of GMO Laboratories
EPSPS – 5-enolpiruvil-șikimat-3-fosfat sintaza
GFP – green fluorescent protein
GUS – β-glucoronidaza
ISAAA – International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
JRC – European Commission’s Joint Research Center’s
LUC – luciferaza
MERL – Major Equipment for Research Laboratories
MG – modificat genetic
MRDA – Moldovan Research and Development Association
MTFP – Moldovan Travel Fellowship Program
NOS – nopalinsintetaza
NPTII – neomicin-fosfotransferaza II
NSF – National Science Foundation
OECD – Organization for Economic Cooperation and Development
OMG – organisme modificate genetic
PAT – fosfinotricin-acetiltransferaza
PCR – Polymerase Chain Reaction
PEG – polietilenglicol
PMG – plante modificate genetic
PPT – fosfinotricină
Ri – root inducing
RR – Roundup Ready
Ti – tumor inducing
USM – Universitatea de Stat din Moldova
YAC –Yeast Artificial Chromosome