

Lecția 15. DETECȚIA, IDENTIFICAREA ȘI CUANTIFICAREA OMG

CONȚINUT

1. Norme și legi ce reglementează testarea OMG
2. Laboratoare acreditate în identificarea materialului modificat genetic
3. Metode și tehnici utilizate în detecția identificarea și cuantificarea OMG



1. Norme și legi ce reglementează testarea OMG

Comercializarea culturilor modificate genetic are 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.

În rețeaua de market din lume există din ce în ce mai multe varietăți cu caractere modificate, fapt care impune monitorizarea materialului transgen, chiar și în cele mai mici cantități.

Asigurare securității eliberării OMG 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 contribuie 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.

Comitetul European de Standardizare (CEN, www.cenorm.be) 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 proteinei 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 method.

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. LABORATOARE ACREDITATE ÎN IDENTIFICAREA MATERIALULUI MODIFICAT GENETIC

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 reglementărilor activităților cu OMG.

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 include peste 100 laboratoare, care reprezintă statele membre UE. La întrunirile acestei organizații participă și alți membri din țărilor candidate de UE în calitate de observatori independenți.

Site-ul oficial al ENGL <http://engl.jrc.it/designated.htm> oferă informații privind laboratoarele, care fac parte din această rețea.

Principalele activități al 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

Începând 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
- CONGEN (Germania) etc.

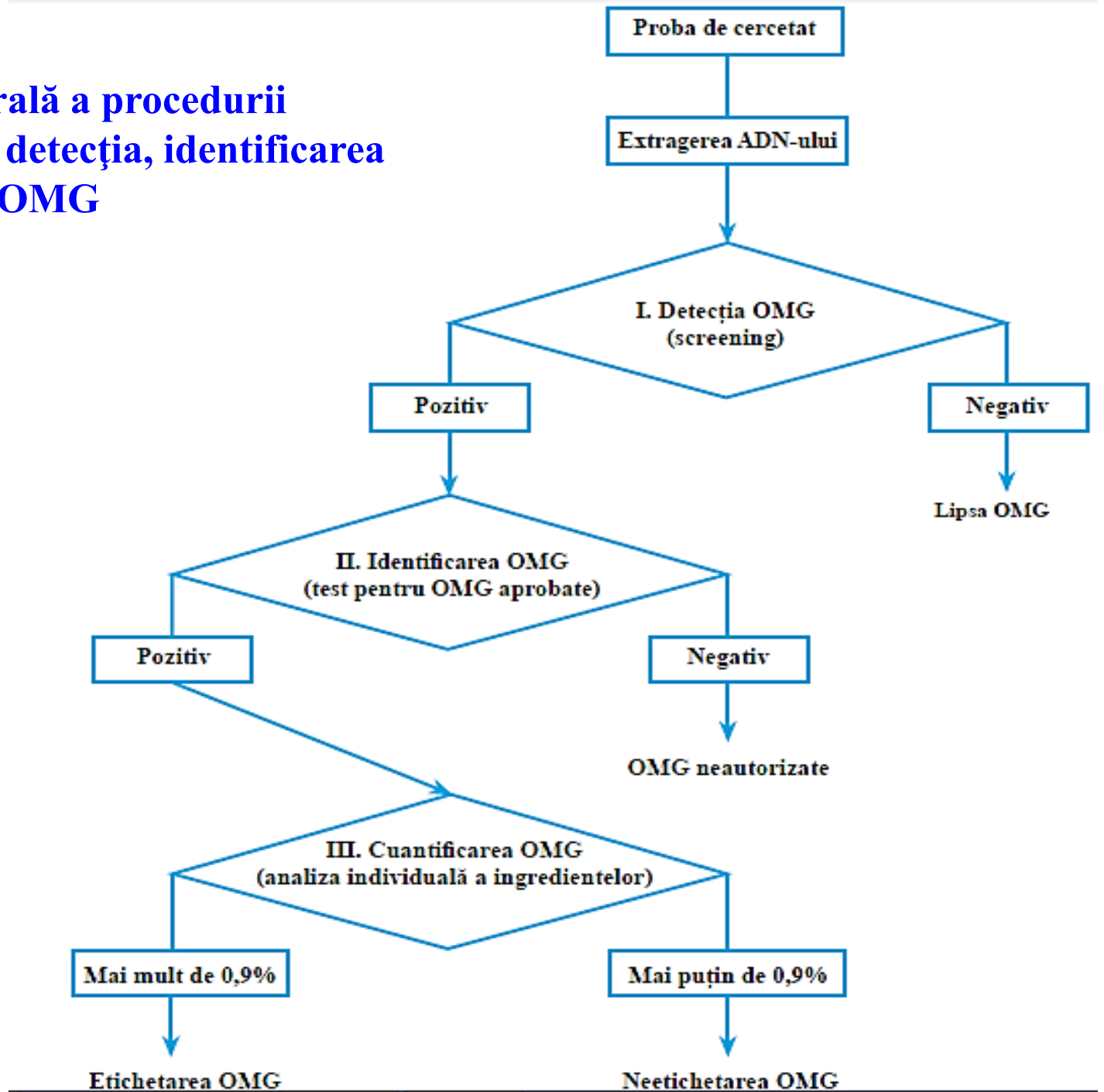
Testarea OMG include trei etape de analiză

Detectia – constatarea prezenței/ lipsei elementelor transgenice (secvența codificatoare sau secvențele de reglare – promotor sau/ și terminator) în genomul plantei. Pentru detectia 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 canamicină). Detectia 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*).

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

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



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 detecție, 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.

3. METODE ȘI TEHNICI UTILIZATE ÎN DETECȚIA IDENTIFICAREA ȘI CUANTIFICAREA OMG

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:

PRINCIPIU DE SELECTARE A TESTELOR PRIVIND OMG

Se cunoaște informația
despre secvențele
inserate

Se utilizează teste specifice calitative/
cantitative de analiză OMG

Nu se cunoaște
informația despre
secvențele inserate

Se determină prezență/ lipsa OMG prin
PCR cu primerii-screening (35S CaMV,
NOS, *nptII*)

Se identifică prin PCR cu utilizarea
primerilor arbitrari în combinație cu
primerii-screening

Unele laboratoare au elaborat metode de analiză bazate pe detecția ADN utilizând tehnica de amplificare PCR ori pe bază de proteine - analizele imunoenzimatică (enzyme linked immunosorbent assays – ELISA) care se deosebesc prin unele avantaje și dezavantaje în funcție de scopul cercetării și de posibilitățile laboratorului.

Metoda	Testul	Costul/probă	Durata	Caracteristici	Rezultate
Biotest (rezistența la erbicide)	Toleranță	\$10-12	5-7 zile	Necesită abilități generale de lucru în laborator	Constatarea rezistenței la erbicide
ELISA	Proteine	\$75-100	2-4 zile	Necesită abilități generale de lucru în laborator și echipament	Determinarea cantitativă a proteinelor
Lateral Flow Strip	Proteine	\$8-10	10-20 min.	Nu necesită echipament specializat	Determinarea prezenței proteinelor
PCR	ADN	\$200-600	5-14 zile	Metodă dificilă, necesită training și echipament special	Teste calitative/ semi-cantitative a 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, spectroscopia infraroșie apropiată** etc.

Metoda cromatografică permite identificarea OMG la nivelul metaboliților – dizaharide (trehaloza, maltoza și izomaltoza), alcooli (maltitolul) sau al diferențelor depistate în profilul chimic, constatate la analiza uleiului provenit din rapița modificată genetic.

Combinarea metodelor de cromatografie lichidă și masspectrometrie permit evidențierea diferențelor din cadrul patternelor 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.

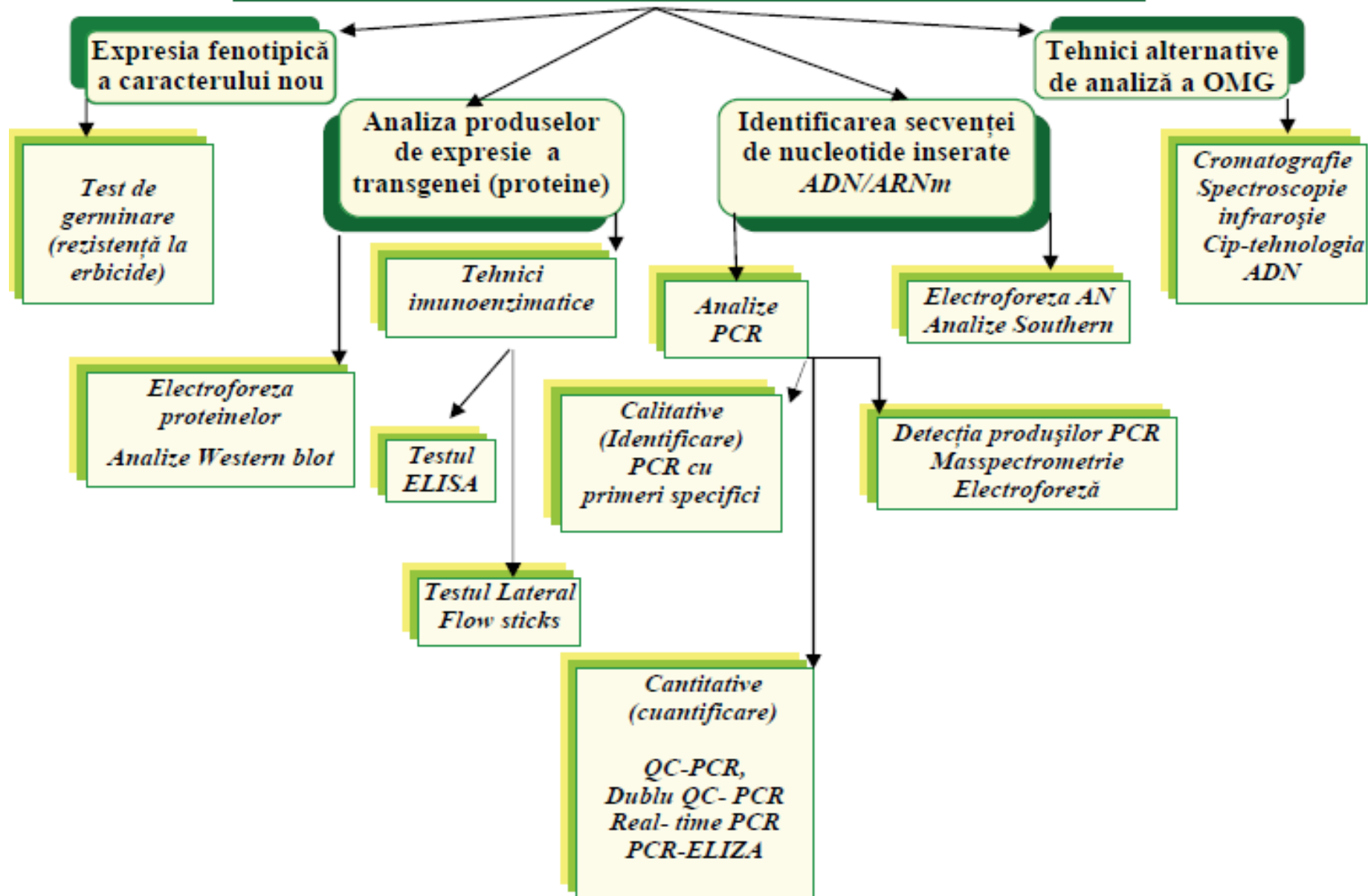
Spectroscopia infraroșie apropiată (SIA)

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, (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.

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 referență certificat, întrucât unele dintre aceste metode (de exemplu, testul expresiei fenotipice a transgenei, metode calitative, metode imunoenzimatic) sunt mai adecvate pentru analiza semințelor și probelor din cereale, decât pentru analiza produselor procesate.

Metodele bazate pe ADN sau proteine, precum și testul fenotipic relevă uneori rezultate diferite

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: **accuratețe, 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>).

Specificitate – 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, profilul restricțional, hibridare.

Sensibilitate – probabilitatea obținerii unui rezultat pozitiv în caz de prezență a OMG. Excluderea rezultatelor fals-negative de exemplu, calitatea joasă a matriței (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.

Precizie (reproductibilitate) – include nivelul de variație (devierea standardă, coeficient 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 experimenter.

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 ca concentrația 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.

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.

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](#)).



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**

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).
