

## "Event" специфичен real-time PCR анализ за количествено определяне на разрешените за употреба в ЕС генетично модифицирани соеви линии в месни продукти

Петя Стефанова, Цвета Георгиева, Ангел Ангелов

*Event-specific PCR quantification of EU-authorized GM soybean events in meat products: The quantification of GM material in food products is very important to control food labeling. Therefore, event-specific PCR quantification of EU-authorized GM soybean events was conducted in 36 meat products at the Bulgarian market without GM indication on the labels. Results indicated that 36.1% of the tested products contained MON 40-3-2, while MON 89788 and A2704-12 were detected in 2.8% of the samples. The amount of MON 40-3-2 was above the threshold of 0.9% in 1 sample, while the percentage of transgenic events MON 89788 and A2704-12 in all tested products was less than 0.9%. None of the tested products contained GM soybean events MON 87701, A5547-127, DP356043 and MON 87701xMON 89788. Based on the results from the study, only one of the analyzed products was falsely labeled with regards to GM ingredients.*

**Key words:** Real-time PCR, genetically modified soybean events, meat products, EU legislation.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Генетично модифицираните организми (ГМО) представляват организми, чиито генетични характеристики са променени чрез въвеждането на модифициран ген или гени от друг организъм, използвайки техниките на генното инженерство [7]. През 1996 г. за пръв път са засети значителни площи с генетично модифицирани (ГМ) култури, като през 2014 г. общите площи с трансгенни култури са нарастнали над 100 пъти [6]. Това прави ГМО най-бързо развиващата се област в съвременното земеделие. Най-значимите трансгенни култури са соя, царевица, памук и рапица. Най-широко разпространената ГМ култура през 2014 г. остава соята (*Glycine max* (L.) Merril), заемаща над 47% от общата площ, засята с трансгенни растения [9].

До момента в ЕС са разрешени за употреба седем линии ГМ соя – MON 40-3-2, MON 89788, MON 87701 и MON 87701 x MON 89788, разработени от Monsanto Company, A2704-12 и A5547-127 (Bayer CropScience AG) и трансгенна соева линия DP 356043, разработена от Pioneer Hi-Bred International [3].

Безспорно най-модерната технология за провеждането на качествени и количествени анализи на ГМО е real-time PCR [4]. В зависимост от тяхното ниво на специфичност, PCR методите за анализ се разделят на четири групи – видово специфични, елемент специфични, конструктор специфични и "event" специфични. "Event" специфичните PCR методи се характеризират с най-високо ниво на специфичност и се използват обикновено за идентифициране и количествено определяне на дадена ГМ линия [5].

В Европейския съюз (ЕС) получаването и разпространението на ГМ храни и фуражи се регулират от Регламент (ЕО) No 1829/2003. По силата на този регламент, всяка храна, която е съставена, произведена от или съдържа повече от 0.9 % ГМО (за една съставка), следва да бъде етикетирана [2].

Това определи и целта на настоящата работа, а именно провеждането на "event" специфичен real-time PCR анализ за количествено определяне на разрешените за употреба в ЕС ГМ соеви линии в различни месни продукти с необозначено върху етикета съдържание на ГМО.

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### Изследвани продукти и референтни материали.

В настоящата работа са изследвани 36 месни продукта с необозначено върху етикета съдържание на ГМО. Продуктите са разделени в 5 групи: сурови охладени или замразени месни полуфабрикати (13 бр.), варени малотрайни колбаси (9 бр.), шунки и шункови колбаси (6 бр.), варено-пушени трайни салами (5 бр) и сурово-

сушени месни продукти (3 бр.). За построяване на стандартните криви при количественото определяне на ГМ соеви линии MON 40-3-2, MON 89788, A2704-12 и A5547-127, и като положителни контроли са използвани сертифицирани референтни материали ERM-BF 410gk и ERM-BF 410dk (IRMM, Geel, Belgium), както и CRM AOCS 0906-B, CRM AOCS 0707-B3 и CRM AOCS 0707-C3 (AOCS, USA).

### Мултиплексен PCR скрининг

Мултиплексният PCR скрининг на изследваните месни продукти е проведен съгласно Stefanova et al. [11].

### Real-time PCR количествено определяне (qPCR)

Всички анализирани проби, дали положителен сигнал за наличие на *EPSPS* гена са подложени на "event" специфичен real-time PCR анализ за количествено определяне на ГМ соеви линии MON 40-3-2 и MON 89788. Пробите от изследваните продукти, съдържащи *PAT* гена са анализирани чрез "event" специфичен qPCR метод за определяне на ГМ линии A2704-12 и A5547-127.

Real-time PCR анализът е проведен в крайни обеми от 25 µl за реакция, като всеки обем съдържа 5 µl ДНК, 1X Maxima Probe qPCR Master Mix (Fermentas, Germany), 150-200 nM от съответните праймери (Lec F и Lec R за *lec* гена, 40-3-2 AR и 40-3-2 AF за MON 40-3-2, MON 89788-F и MON 89788-R за MON 89788, SMO 001 и KVM 175 за A2704-12, и SHA 004 и SHA 003 за A5547-127) (Metabion, Germany). Използваните сонди са Lec P за *lec* гена, 40-3-2 AP за MON 40-3-2, MON 89788-P за MON 89788, TM 031 за A2704-12 и TM 058 за A5547-127 (Metabion, Germany).

PCR анализът е проведен с 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Germany) при следните условия: UNG при 50°C за 2 min; първоначална денатурация за 10 min при 95°C, 45 цикъла на денатурация за 15 s при 95°C и присъединяване и удължаване за 1 min при 60°C.

Всяка проба е анализирана в три повторности и получените резултати са представени като средни стойности със стандартните отклонения.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Мултиплексен PCR скрининг

Резултатите от проведения мултиплексен PCR скрининг са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Мултиплексен PCR скрининг на месни продукти за установяване на *lec* ген, *EPSPS* ген, *PAT* ген, *cry1Ac* ген и DP 356043 "event" специфична последователност

Продукти	<i>lec</i> ген	<i>EPSPS</i> ген	<i>PAT</i> ген	<i>cry1Ac</i> ген	DP 356043 "event"
Сурови охладени или замразени месни полуфабрикати (n = 13)	13	7	0	0	0
Варени малотрайни колбаси (n = 9)	9	2	1	0	0
Шунки и шункови колбаси (n = 6)	6	4	0	0	0
Варено-пушени трайни салами (n = 5)	5	0	0	0	0
Сурово-сушени месни продукти (n = 3)	3	1	0	0	0
Общо (n = 36)	36	14	1	0	0

От данните в таблицата се забелязва, че в ДНК екстрактите от 14 месни продукта се съдържа *EPSPS* гена, докато *PAT* гена се открива само в екстракта от един варен малотраен колбас. Характерни фрагменти, съответстващи на *cru1Ac* гена и DP 356043 "event" специфичната последователност не се установяват при нито един месен продукт, което демонстрира, че ГМ соеви линии MON 87701, MON 87701 x MON 89788 и DP 356043 все още не са навлезли широко на европейския пазар.

Получените резултати са в съответствие с данните, публикувани от други автори. След проучване на 59 соеви и месни продукта на бразилския пазар, Dinon et al. установяват наличие на *lec* ген в 54 от тях, докато в 6 от изследваните продукти е открита трансгенна ДНК от ГМ соева линия MON 40-3-2 [1]. При анализ на ГМ соя в месни продукти, Taski-Ajdukovic et al. съобщават за присъствието на трансгенна ДНК в 12 от анализиранияте проби, което съответства на 24% от месните продукти [12].

### Real-time PCR количествено определяне (qPCR)

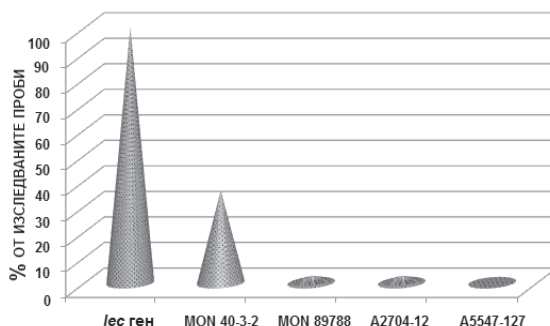
Всички анализирани проби, дали положителен сигнал за наличие на *EPSPS* гена са подложени на "event" специфичен qPCR анализ на ГМ линии соя MON 40-3-2 и MON 89788. Пробите от изследваните продукти, съдържащи *PAT* гена са анализирани чрез qPCR метод за определяне на ГМ линии A2704-12 и A5547-127. За целта са използвани две системи за амплификация: референтна система (за количествено определяне на броя копия от таксон-специфичния *lec* ген) и "event" специфична система (за количествено определяне на броя копия ДНК от съответната ГМ соева линия).

От представените в Таблица 2 резултати се забелязва високата ефективност на използваните системи за амплификация – от 92.91 до 102.18 %. Коефициентът на детерминация ( $R^2$ ) при всички стандартни криви е над 0.995. Следователно, получените стандартни криви могат да бъдат използвани за надеждно и коректно количествено определяне на горепосочените ГМ соеви линии. В допълнение, експериментално определеното процентно съдържание на анализиранияте ГМ соеви линии в положителните контроли варира от 1.01 до 1.03 %, което демонстрира точността и прецизността на използвания метод.

Таблица 2. Параметри на стандартните криви при qPCR анализ на ГМ соеви линии MON 40-3-2, MON 89788, A2704-12 и A5547-127 в изследваните месни продукти

Целева ДНК последователност	$R^2 \pm SD$	E, % $\pm SD$	1% CRM $\pm SD$
Референтна <i>lec</i> система	0.997 $\pm$ 0.002	98.60 $\pm$ 6.69	---
MON 40-3-2	0.997 $\pm$ 0.001	94.97 $\pm$ 1.43	1.02 $\pm$ 0.02
MON 89788	0.996 $\pm$ 0.003	92.91 $\pm$ 0.49	1.01 $\pm$ 0.01
A2704-12	0.998 $\pm$ 0.002	102.18 $\pm$ 0.43	1.03 $\pm$ 0.04
A5547-127	0.995 $\pm$ 0.001	94.63 $\pm$ 1.25	1.02 $\pm$ 0.01

Представените на Фигура 1 данни показват, че всички анализирани месни продукти съдържат *lec* ген, т.е. соева ДНК. В 36.1 % от пробите е открита ГМ соева линия MON 40-3-2, докато трансгенните линии MON 89788 и A2704-12 се откриват едва в 2.8% от изследваните проби. След първоначалния PCR скрининг (Таблица 1) и real-time PCR анализа (Фигура 1) е установено, че нито един от изследваните продукти не съдържа ГМ соеви линии MON 87701, A5547-127, DP356043 и MON 87701xMON 89788.



Фигура. 1. Процентно съдържание на пробите, съдържащи *lec* ген и ГМ соеви линии MON 40-3-2, MON 89788, A2704-12 и A5547-127

Резултатите от "event" специфичния real-time PCR анализ са представени в Таблица 3. Забелязва се, че процентното съдържание на трансгенната линия MON 40-3-2 е под 0.1% в три от пробите, докато в девет от тях тя варира в границите 0.1–0.9%. Следователно, не е необходимо нейното обозначаване върху етикета на съответния продукт. В един от анализирания месни продукти, съдържанието на MON 40-3-2 надхвърля допустимия праг на етикетиране от 0.9% и съгласно действащото европейско законодателство тази проба следва да бъде етикетирана като "съдържаща ГМО".

Таблица 3. Real-time PCR количествено определяне на ГМ соеви линии MON 40-3-2, MON 89788 и A2704-12 в изследваните месни продукти

ГМ соева линия	ГМО, %		
	< 0.1	0.1 – 0.9	> 0.9
MON 40-3-2	3	9	1
MON 89788	0	1	0
A2704-12	1	0	0

Процентното съдържание на ГМ соеви линии MON 89788 и A2704-12 във всички месни продукти е под 0.9% и не е необходимо тяхното обозначаване върху етикета на съответния продукт. Представените в Таблица 3 резултати показват, че съгласно действащото европейско законодателство, само един от продуктите е некоректно етикетиран по отношение на съдържанието на ГМО в него.

Получените в настоящата работа резултати са аналогични на данните, съобщени от Nikolić et al. [8], Rott et al. [10] и Ujhelyi et al. [13], които докладват, че процентното съдържание на трансгенен материал надвишава допустимия праг на етикетиране от 0.9% в малък процент от анализиранияте проби.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представените в настоящата работа резултати показват, че 36.1% от пробите съдържат ГМ соева линия MON 40-3-2, докато трансгенните линии MON 89788 и A2704-12 се откриват едва в 2.8% от изследваните проби. В нито един от анализиранияте продукти не се установяват ГМ соеви линии MON 87701, A5547-127, DP356043 и MON 87701xMON 89788. Само в един от продуктите е открита трансгенна ДНК над допустимия праг на етикетиране от 0.9% и съгласно

действащото европейско законодателство, тази проба следва да бъде етикетирана като "съдържаща ГМО".

#### ЛИТЕРАТУРА

[1] Dinon, A., D. Tremli, C. Mello, A. Arisi. Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007-2008. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23, 226-229.

[2] European Commission. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union* 2003a; L268:1-23.

[3] GMO Compass. GMO Database. Genetically modified food and feed: authorization in the EU. URL <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db>. Accessed 01.10.2014.

[4] Holst-Jensen, A., S.B. Rønning, A. Løvseth, K.G. Berdal. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 375, 985-993.

[5] Holst-Jensen, A., Y. Bertheau, M. Loose, L. Grohmann, S. Hamels, L. Hougs, D. Morisset, S. Pecoraro, M. Pla, M. Van den Bulcke, D. Wulff. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology Advances*, 2012, 30/6, 1318-1335.

[6] James, C. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014*. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY, 2014.

[7] Miraglia, M., K.G. Berdal, C. Brera, P. Corbisier, A. Holst-Jensen, E.J. Kok, H.J. Marvin, H. Schimmel, J. Rentsch, J.P. Van Rie, J. Zagon. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food Chem Toxicol.*, 2004, 42/7, 1157-80.

[8] Nikolić, Z., K. Ajducovic, A. Jetvic, D. Marinkovic. Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment of three pairs of PCR primers. *Food Research International*, 2009, 42, 439-352.

[9] Pan, T. Current status and detection of genetically modified organism. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2002, 10/4, 229-241.

[10] Rott, M.E., T.S. Lawrence, E.M. Wall, M.J. Green. Detection and quantification of Roundup Ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 5223-5232.

[11] Stefanova, P., M. Taseva, Tz. Georgieva, V. Gotcheva, A. Angelov. A modified CTAB method for DNA extraction from soybean and meat products. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2013, 27, 3803-3810.

[12] Taski-Ajdukovic, K., Z. Nikolic, M. Vujakovic, M. Milosevic, M. Ignjatov, D. Petrovic. Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. *Meat Science*, 2009, 81, 230-232.

[13] Ujhelyi, G., B. Vajda, E. Beki, K. Neszlenyi, J. Jakab, A. Janosi, E. Nemedi, E. Gelencser. Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary. *Food Control*, 2008, 19, 967-973.

#### За контакти:

Ас. д-р Петя Веселинова Стефанова, катедра "Биотехнология", Университет по хранителни технологии – Пловдив, тел.: 032 603 828, e-mail: [petya@uft-bio.com](mailto:petya@uft-bio.com);

Доц. д-р Цвета Петрова Георгиева, НЦОЗА – София, сектор ГМО, тел.: 02 8056 239, e-mail: [tzv.georgieva@ncpha.government.bg](mailto:tzv.georgieva@ncpha.government.bg);

Проф. д-р Ангел Иванов Ангелов, катедра "Биотехнология", Университет по хранителни технологии – Пловдив, тел.: 032 603 608, e-mail: [angelov@uft-bio.com](mailto:angelov@uft-bio.com)