

BOGUMIŁA URBANEK-KARŁOWSKA, MONIKA FONBERG-BROCZEK, DOROTA
SAWILSKA-RAUTENSTRAUCH, PAWEŁ BADOWSKI, MAŁGORZATA JĘDRA

PRZYDATNOŚĆ IMMUNOENZYMATYCZNEGO TESTU TRAIT DO
WYKRYWANIA MODYFIKACJI GENETYCZNEJ W PRODUKTACH
POCHODZĄCYCH Z SOI ROUNDUP READY

USEFULNESS OF AN IMMUNOASSAY TEST TRAIT FOR DETECTION OF
GENETICALLY MODIFIED ROUNDUP READY SOYBEAN IN FOOD PRODUCTS

Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

Do wykrywania modyfikacji genetycznej w ziarnach soi Roundup Ready oraz produktach z niej pochodzących, wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (ELISA) – zestaw analityczny „TRAIT”, amerykańskiej firmy SDI. Metoda polega na identyfikacji immunoenzymatycznej białka CP4 EPSPS powstającego w wyniku ekspresji, wprowadzonego do soi genu z Agrobacterium sp. szczep CP4.

WSTĘP

Środki spożywcze genetycznie zmodyfikowane znajdują się na rynkach europejskich od 1996 r., na rynku polskim od 1997 r. Są to jak dotychczas tylko preparaty białek sojowych: koncentraty, izolaty, teksturaty, a także produkty nieprzetworzone – mąka sojowa i ziarno soi. Są one składnikami różnych produktów spożywczych m.in. wyrobów mięsnych, piekarskich, koncentratów spożywczych. Obecne są również produkty wegetariańskie produkowane na bazie składników sojowych. Pochodzą one wyłącznie z jednej odmiany soi Glycine max L cv A5403 linia (40-3-2), o ściśle określonej sekwencji genów, charakteryzującej się odpornością na glifosat, aktywny składnik herbicydu Roundup Ready [1, 13, 14].

Zamknięte użycie organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) a także zamierzone uwolnienie GMO do środowiska reguluje ustawa z dnia 22.06.2001 r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych [6].

Ustawa o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z dnia 11.05.2001 r. określa m.in. warunki produkcji środków spożywczych oraz procedury mające na celu uzyskanie decyzji na dopuszczenie do obrotu środków spożywczych, w tym również „nowej żywności”. Według tej ustawy „nowa żywność” obejmuje substancje lub ich mieszaniny, które dotychczas nie były wykorzystywane do żywienia ludzi, w tym również środki spożywcze i ich składniki zawierające lub składające się z genetycznie zmodyfikowa-

nych organizmów lub ich fragmentów bądź otrzymywane z GMO, ale ich nie zawierające [7].

„Nowa żywność” nie może stanowić zagrożenia dla zdrowia człowieka oraz środowiska. Po wykazaniu powyższego, Główny Inspektor Sanitarny wydaje decyzję zezwalającą na podjęcie produkcji i wprowadzenie do obrotu. „Nowa żywność” składająca się z GMO lub ich części, zawierająca białka lub DNA z tych organizmów powinna być znakowana informacją „produkt genetycznie zmodyfikowany”. Również składniki żywności a także substancje dodatkowe i aromaty, jeżeli zostały wyprodukowane z GMO i zawierają białko i/lub DNA pochodzące z modyfikacji genetycznej, wymagają odpowiedniego znakowania.

Obowiązek znakowania nie dotyczy nowej żywności, w skład której wchodzi organizmy genetycznie zmodyfikowane lub produkty uzyskane z organizmów genetycznie zmodyfikowanych, jeżeli ich zawartość nie przekracza 1% danego składnika przy założeniu, że obecność białka lub DNA z organizmu genetycznie zmodyfikowanego jest przypadkowa (niezamierzona) [7].

Powyższe zasady są zgodne z przyjętymi w UE [2, 3, 4, 5, 11].

Metody analityczne konieczne do kontroli produktów GMO powinny pozwalać na wykrycie nowego białka GMO albo też nowego, wprowadzanego DNA. Konieczność dysponowania szybkimi metodami oceny żywności pod względem ich zgodności z deklarowaną przez producentów przynależnością do produktów konwencjonalnych lub GMO zainspirowała Komisję Europejską do opracowania projektu harmonizacji i walidacji w skali europejskiej dwóch wybranych metod analitycznych.

Pierwszą z nich była metoda skringowa oparta na wykrywaniu dwóch genetycznych elementów: *promotora 35S* i *terminatora nos* za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Te dwa genetyczne elementy są niezbędne do ekspresji genów obecnych w prawie wszystkich do dziś genetycznie zmodyfikowanych roślinach [8, 10]. Metoda ta została zwalidowana przez European Commission Joint Research Center dla soi Roundup Ready i kukurydzy Bt 176 [8]. Jest ona przydatna do skringowego wykrywania obecności GMO w produktach spożywczych, jednakże nie jest metodą specyficzną dla określonej linii transgenicznej właśnie ze względu na rozpowszechnienie obu ww. elementów genetycznych w transgenicznych roślinach.

Drugą metodą, która została zwalidowana w skali europejskiej jest metoda immunologiczna (Immunoassay for Detection and Quantitation of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions) ilościowego oznaczania genetycznej modyfikacji w ziarnach soi Roundup Ready a także w żywności i jej składnikach [9].

Zastosowana prosta i szybka w wykonaniu metoda immunoenzymatyczna (ELISA) wykorzystuje obecność białka CP4 EPSPS indukującego tolerancję na herbicyd glifosat, obecnego w modyfikowanych roślinach takich jak soja Roundup Ready, bawełna i inne. Walidacja tej metody wykazała, że nie daje ona fałszywie negatywnych wyników i jest przydatna do oznaczeń jakościowych, a po zastosowaniu specyficznej procedury – także ilościowych. Ograniczeniem tej metody jest konieczność reakcji niezdenaturowanego białka CP4 EPSPS z przeciwciałem monoklonalnym, dlatego też dla produktów poddawanych obróbce np. cieplnej czy chemicznej, metoda ta nie jest przydatna.

W Zakładzie Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH podjęto pracę mającą na celu sprawdzenie możliwości wykrycia modyfikacji genetycznej w ziarnie soi Roun-

dup Ready i mąkach sojowych jakościową metodą immunoenzymatyczną z wykorzystaniem zestawu analitycznego *TRAIT*.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki:

- zestaw do oznaczeń *TRAIT RUR Lateral Flow Test Kit*, firmy Strategic Diagnostics Inc. (SDI).
- Test immunologiczny ELISA, zawiera w układzie specyficzne przeciwciała przeciw białku CP4 EPSPS produkowanemu przez gen pochodzący z *Agrobacterium sp.* szczep CP-4, obecne w ziarnach soi Roundup Ready.
- wzorce referencyjne GMO – *FF Soy Flour Standard – Food Ingredient Testing USA*: 0%; 0,3%; 1,25%; 2,5% GMO.

Oznaczenia wykonano wg zaleceń podanych przez producenta testu [12].

Przeciwciała swoiste do białka CP4 EPSPS są sprzężone z odczynnikiem barwnym i unieruchomione na pasku testowym. Na pasku znajdują się zaadsorbowane dwie strefy wiążące specyficznie kompleksy białkowe: górna – nie przereagowane przeciwciała sprzężone z barwnikiem, dolna – białko CP4 EPSPS połączone z przeciwciałem sprzężonym z barwnikiem. Strefy te wychwytyjąc barwnik barwią się na różowy kolor, wiążąc nie przereagowane przeciwciała lub przeciwciała sprzężone z białkiem CP4 EPSPS (Ryc. 1).

Oznaczenie polega na umieszczeniu paska testowego w zbuforowanym ekstrakcie z badanej próbki. Po rozwinięciu paska odczytuje się liczbę stref zabarwionych na różowo. Wynik pozwala na jakościowe stwierdzenie obecności bądź braku białka GMO (wynik tak/nie), nie daje natomiast możliwości określenia jego procentowej zawartości.

Materiał testowy do badań składał się z:

- ziaren soi Roundup Ready otrzymanych z firmy Monsanto Co. Poland
- produktów znakowanych jako GMO, otrzymanych z różnych firm^{*)}
- produktów rynkowych, pobranych ze sklepów detalicznych
- wzorców wewnętrznych przygotowanych w laboratorium z materiału GMO i tradycyjnego, poprzednio zbadanego ww. testem i dającego wyniki negatywne.

Wzorce wewnętrzne oraz próbki kontrolne służyły do wykonania krzywej wzorcowej i określenia wykrywalności składnika GMO w zmielonych ziarnach soi. Zakodowane odpowiednio wzorce wewnętrzne i próby ziarna tradycyjnego służyły do sprawdzenia metody analitycznej i wykrycia ewentualnych fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników. W badaniach potwierdzenia wiarygodności wyników z zastosowaniem testu *TRAIT* brało udział niezależnie dwóch pracowników. Każdy z pracowników wykonujących test otrzymał 5 znanych i 10 nieznanymi próbek testowych. 10 nieznanymi próbek zawierało 0%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1,0%; 2,0%; 4,0% materiału GMO.

WYNIKI

W pierwszym etapie badań test immunoenzymatyczny zastosowano do wykrywania białka CP4 EPSPS, świadczącego o obecności GMO we wzorcach referencyjnych zawierających 0%; 0,3%; 1,25% i 2,5% GMO. Wyniki porównano z wynikami otrzymanymi z badania próbek zmielonej soi Roundup Ready i soi tradycyjnej. Wszystkie otrzymane wyniki wskazały prawidłowo na próbki zawierające w swym składzie materiał GMO. Na próbkach soi tradycyjnej uzyskano wyniki negatywne (Ryc. 1).

Wzorce wewnętrzne przygotowane z soi tradycyjnej i Roundup Ready zawierały od 0% do 4,0% GMO. Zostały one zbadane jako próbki o nieznanym składzie. Nie stwierdzono fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników (Ryc. 2). Próg

wykrywalności został określony na 0,1%, GMO, co jest zgodne z informacją producenta testu.

W celu sprawdzenia wpływu temperatury na powinowactwo białka CP 4 EPSPS do przeciwciał zaadsorbowanych na pasku testowym, całe ziarna oraz zmielone ziarna soi Roundup Ready ogrzewano przez 15 i 30 minut w suszarce w temp. 40, 50, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 120, 130 i 140°C. Ziarna soi ogrzewane w temp. 130°C przez 30 min. a następnie zmielone wykazywały obecność GMO w teście *TRAIT*. Ziarna ogrzewane w temp. 140°C przez 30 minut nie wykazywały reakcji, natomiast w zmielonym ziarnie już po 15 minutach ogrzewania w temp. 65°C nie stwierdzono obecności białka GMO.

PODSUMOWANIE

Test immunoenzymatyczny firmy amerykańskiej SDI przeznaczony do specyficznego wykrywania białka CP4 EPSPS w roślinach transgenicznych oraz produktach z nich pochodzących, zastosowano do materiału referencyjnego soi Roundup Ready oraz wzorców nadesłanych przez firmę Food Ra Leatherhead – USA, zawierających 0; 0,3; 1,25 i 2,5% GMO, wzorców przygotowanych w laboratorium („wzorców wewnętrznych”) oraz próbek produktów sojowych nadesłanych przez producentów i pobranych z rynku. Test immunoenzymatyczny może być wykorzystywany jako jakościowy (tak/nie); potwierdzona granica wykrywalności wynosi 0,1% GMO w przeliczeniu na suchą masę.

Badania wykazały, że ogrzewanie zmielonych ziaren soi Roundup Ready przez 15 min. w temperaturze 65°C oraz ziaren nie rozdrobnionych przez 30 min. w 140°C powoduje zanik możliwości rozpoznania białka CP4 EPSPS przez przeciwciała używane w teście *TRAIT* i brak reakcji barwnej, świadczącej o obecności białka transgenicznego. Potwierdzeniem jest brak wyniku pozytywnego tzn. reakcji barwnej w miejscu wiązania kompleksu białka CP4 EPSPS w przypadku mąki sojowej, koncentratów i izolatów sojowych pobranych z rynku, a deklarowanych przez producentów jako GMO. W procesie ich pozyskiwania miała zapewne miejsce obróbka termiczna lub proces chemiczny. A więc testu nie można zastosować do produktów przetworzonych. Natomiast próbki mąki sojowej nie ogrzewanej, pochodzącej z soi GMO, dostarczone przez jej producentów, badane testem immunoenzymatycznym wykazywały reakcję pozytywną, manifestującą się obecnością białka CP4 EPSPS.

Niektóre próbki pobrane z rynku deklarowane jako pochodzące z soi tradycyjnej wykazywały ślady (poniżej 0,3%) obecności białka GMO.

Metoda immunoenzymatyczna jest metodą szybką i niezawodną do wykrywania białka CP4 EPSPS w ziarnach sojowych i produktach sojowych nieprzetworzonych soi Roundup Ready. Może być zaproponowana jako metoda jakościowa do wykrywania specyficznej modyfikacji genetycznej obecnej w soi Roundup Ready a więc do kontroli zgodności deklaracji producenta.

WNIOSKI

1. Metoda immunoenzymatyczna z zastosowaniem zestawu analitycznego *TRAIT*, polegająca na wykrywaniu białka CP4 EPSPS w soi transgenicznej linii Roundup Ready, pozwala na detekcję 0,1% białka GMO w ziarnach i mąkach sojowych nie

poddanych obróbce termicznej. Metoda nie wykazuje fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników.

2. Produkty sojowe GMO uprzednio ogrzewane do temperatury powyżej 65°C tracą zdolność reagowania w immunoenzymatycznym teście *TRAIT*.

3. Ze względu na prostotę i szybkość wykonania badania z użyciem testu *TRAIT* metodę tę można zalecić do rutynowej kontroli produktów sojowych nieprzetworzonych.

B. Urbanek-Karłowska, M. Fonberg-Broczek, D. Sawilska-Rautenstrauch, P. Badowski, M. Jędra

USEFULNESS OF AN IMMUNOASSAY TEST *TRAIT* FOR DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ROUNDUP READY SOYBEAN IN FOOD PRODUCTS

Summary

The test based on immunoassay *TRAIT* Test for the specific detection of Roundup Ready Soybean was used for reference material in the form of dried powdered soy beans contained 0, 0,3, 1,25, 2,5% of genetically modified material, for soy beans declared as Roundup Ready and for soy products from Warsaw market.

The detection limit was approximately 0,1% GMO on dry weight basis. Experiment was also carried out on heated soybeans. The positive results was obtained since temperature was under 65°C during 15 minutes of heating grounded beans; above this temperature specific protein was not recognisable by the antibody.

The *TRAIT* Test should be regarded as a qualitative method and could be recommended for screening purposes.

Investigation demonstrated that above mentioned test was useful for detection of protein of genetically modified soybean in unprocessed products.

PIŚMIENNICTWO

1. Commission Decision 96/281/EC of 3 April 1996 concerning the placing on the market of genetically modified soya beans (*Glycine max* L.) with increased tolerance to the herbicide glyphosate, pursuant to Council Directive 90/220/EEC (Text with EEA relevance) Official Journal, 1996, L 107, 10–11
2. Council Regulation (EC) No 1139/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC, Official Journal 1998, L 159, 4–7.
3. Commission Regulation (EC) No 49/2000 of 10 January 2000, amending Council Regulation (EC) No 1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. Official Journal of the European Communities 2000, L6/13, 13–14.
4. Commission Regulation No. 50/2000 of 10 January 2000, on the labelling of foodstuffs and food ingredients containing additives and flavourings that have been genetically modified or have been produced from genetically modified organisms. Official Journal of the European Communities, 2000 L 6/15, 15–17.
5. Directive 2001/18/EC The European Parliament and of the Council of 12 March 2001, on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of European Communities 2001, L 106, 1–38.

6. Ustawa z dnia 22 czerwca 2001r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych, Dz. U. RP, Nr 76 z dn. 25.07.2001r., poz. 811, 5703–5716.
7. Ustawa o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z dnia 11 maja 2001, Dz.U. R.P. Nr 63 z dn. 22.06.2001, poz. 634, 4565–4581.
8. *Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Pauwels J., Anklam E.*: IUPAC Collaborative Trial Study of a Method To Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder. *J. AOAC Int.*, 1999, 82, 923–928.
9. *Lipp M., Anklam E., Stave J.W.*: Validation of an Immunoassay for Detection and Quantitation of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.*, 2000, 83, 919–927.
10. *Pietsch K., Waiblinger U., Brodmann P., Wurz A.*: Screeningverfahren zur Identifizierung „gentechnisch veränderter“ pflanzl. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 1997, 2, 35–38.
11. Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients, *Official Journal*, 1997, L 43, 1–7.
12. Trait RUR Lateral Flow Test, User Guide, Strategic Diagnostics Inc., USA, 27.03.2000.
13. *Urbanek-Karłowska B., Fonberg-Broczek M., Badowski P.*: Dopuszczenie do obrotu produktów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) w świetle ustawodawstwa: Materiały z sympozjum „Żywność-Lek-Zdrowie”, Ogólnopolska Sekcja Bromatologiczna Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Łódź 21–22.09.2000 r.
14. *Urbanek-Karłowska B., Fonberg-Broczek M., Badowski P.*: Badania Toksykologiczne nowej żywności – problemy metodyczne i prawne w świetle przepisów Unii Europejskiej; Materiały Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego. VII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Międzyzdroje 31.05.–02.06.2000.

Otrzymano: 2001.08.18