

## EGYSZERŰ PCR MÓDSZER ÉS LATERÁLIS IMMUNKROMATOGRÁFIA ÉLELMISZER-ALAPANYAGOK GM- JELLEGÉNEK ELLENŐRZÉSÉRE

Soós József

SZTE Szegedi Élelmiszeripari Főiskolai Kar  
6724. Szeged, Mars tér 7.

### ÖSSZEFOGLALÓ

Biotechnológiai módszert már időszámításunk előtt 1800 körül használtak, amikor élesztővel kezdték kelesztetni a kenyeret és bort erjesztettek. 1860-tól növényi keresztezési kísérletek kezdődtek, amelyekből az örökíthetően jobb tulajdonságú egyedeket szaporították tovább. A legtöbb élelmiszernövény, így a rizs, zab, burgonya, kukorica, búza és a paradicsom is, évtizedek óta az előbbi tevékenység folytonos alkalmazása eredményeképpen változó, valamilyen szempontból javított formában kerülnek felhasználásra. A hagyományos keresztezés korlátait sikerült átlépni 1973-ban, amikor egyik szervezetből a másikba történő DNS-transzfer hatásos módját fedezték fel és mód nyílt adott tulajdonság(ok)ért felelős gén(ek) közvetlen átvitelére. A módosítási folyamat felgyorsult és a hagyományos nemesítésben érvényes, rokonok közötti keresztezés korlátja sem akadály a továbbiakban, mivel génátvitel (potenciálisan) bármely élő organizmusból lehetséges bármely másikba. A szándék, hogy a terméshozam növekedjen, a minőség javuljon érthető. Általános elvárás, hogy az alkalmazott kemikáliák (peszticidek, fungicidek, herbicidek) mennyisége csökkenjen. Genetikailag módosított szervezetek (GMO) megnövelt biológiai ellenálló képességgel bírhatnak: pl. Afrikában megkétszereződött az édesburgonya terméshozama rekombináns DNS (rDNS) technikával vírusellenállóvá tett vetőanyag használatával. Mielőtt közhasználatra kerülne egy biotechnológiai úton genetikailag módosított (GM) növény, sok szempontból elemzik a kockázatokat és a biztonsági kérdéseket. Az USA-ban jobb a társadalmi fogadtatás, míg Európában a GM-jelző (ehhez képest) inkább negatív értelmű. Nem a "világos"-, illetve "normál"-Zöldekkel van probléma, akik alkalmanként értelmes kritikát fogalmaznak meg, és így ténylegesen segíthetik veszélyhelyzetek elkerülését, de megalapozott érvekkel meggyőzhetőek, hanem a szigorúan egyoldalú, "sötét"-Zöldekkel... Az GM-alkalmazások elmúlt 10 évében sehol sem merült fel olyan tényező, ami miatt a GM-tevékenységet indokolt lenne felfüggeszteni. Sokszor más okok befolyásolják a társadalmi

---

megítélést: Angliában, pl. a szivacsos agyosorvadás 5-15 évig lappangó jellege alapozza meg (többek között) a bizonytalanságot, mert tartanak az esetleg nem azonosított, hosszabb idő alatt jelentkező GM mellékhatásoktól. Tény, hogy GM szervezetek előállítása, a GM szervezetekkel történő termelőtevékenység kapcsán az ebben résztvevőknek átlagosnál nagyobb a felelőssége, de megfelelő törvényekkel körülírva, a szabályokat betartva a genetikai módosítások egyértelműen pozitív hatásai érvényesülhetnek.

### **GENETIKAI MÓDOSÍTÁS (GM)**

Az *Agrobacterium tumefaciens* gyakran használt baktérium, amelynek segítségével idegen DNS-t juttatnak növényi sejtekbe. Alaphelyzetben, a baktérium növényi betegséget okozó géneket épít a fogadósejtbe, míg genetikai módosítás szándékával ezeket a géneket lecserélik a bevinni kívánt tulajdonságot meghatározó génekkel és így a betegség helyett a kívánt tulajdonság realizálódik. Búzában, kukoricában és néhány más növényben nem működik ez a modell, így ezekben az esetekben az ún. részecske bombázás technikáját alkalmazzák gyakrabban. Mikroszkópikus átmérőjű (1-5  $\mu\text{m}$ ) arany vagy wolfram részecskék felületét a kívánt információt hordozó DNS-el töltik fel, majd a növényi célsejtekbe lövik (ún. biolisztikus módszer), ahol a bevitt DNS a növényi génállományba épülhet. A módosított sejtekből teljes növényt nevelnek, amelyben már az újonnan beépített tulajdonság is kifejeződik.

Érdekes módon rovarkártevők és több betegség ellen idegen génekkel, több mint 20 különböző, ún. transzgenikus növényben magas fokú védelmet tudtak megvalósítani (pl. kukorica, burgonya, sütőtök, gyapot, szójabab, repce, paradicsom, lucerna, rizs és árpa), de baktériumok és gombák okozta növénybetegségek elleni sikeres megoldások egyelőre ritkák.

A Bt toxin, a *Bacillus thuringiensis* talajbaktérium génjeiben kódolt fehérje, ami bizonyos rovarokra mérgező. Igazán hatásos növényi rovarrezisztenciát leginkább a Bt toxin termelésére képessé tett GM változatokkal érték el. Vizsgálatok szerint a Bt toxin emberre, más emlősökre, sőt a legtöbb nem cél-rovarra nincs hatással. Újabb megközelítés, amikor a növények természetes védelmében szerepet játszó génekre koncentrálnak, amelyek termékei a rovaremésztést zavarják meg.

Vírus ellenálló-képességet sokszor úgy érnek el, hogy a patogén vírus köpenyfehérjéit kódoló szekvenciákat építik a védendő növénybe, de más megoldások is ismertek.

Gombákra vonatkozóan a növényi ellen állóképesség fokozása nevezhető egyelőre sikernek (pl. kitináza és glukánázra transzgenikus rizs). Hasonló a helyzet baktériumok okozta betegségek esetén: sikerült csökkenteni a

betegség mértékét, de teljes védelem nem alakult ki (pl. óriás selyemlepkéből a cekropin-gén átvitale dohányba). Nagyobb hatások ezen a területen akkor várható, ha az egyes esetekben meglévő természetes védelem mechanizmusa részleteiben ismert lesz.

A kereskedelmi szempontból megközelítve fontos, új tulajdonságok bevitelével kapcsolatban

- I. javuló termékminőség (eltarthatóság, szállíthatóság/fizikai tulajdonságok, éréskeletetés, a feldolgozási érték növekedése)
- II. kártevő-rezisztencia (rovar, féreg, vírus)
- III. agrártechnikai előnyök (pl. herbicid-tűrés) kategóriái különülnek el.

Az I. csoportba tartozó egyik kiváló példa a FlavrSavr paradicsom, amely az anya-növényen pirosra éretten szedhető piacra, anélkül, hogy a gyümölcsök sejtfalát legnagyobb tömegben alkotó pektint a poligalakturonáz (PG) enzim lebontaná. Normál esetben a paradicsom idő előtt felpuhulna, és kereskedelmi szempontból leértékelődne. Az említett GM-paradicsom génjébe antisense (fordított) PG-gént építettek, aminek másolata olyan mértékben semlegesíti a normális PG mRNS-t, hogy a pektinbontó-enzim szintje nagymértékben lecsökken a gyümölcsben, tehát az érett termés sokkal hosszabb ideig "állóképes" marad.

Magyarországon engedélyköteles, ellenőrzött szabadföldi kísérletek folynak pillanatnyilag, nagyzemmi GM növénytermelés bevezetését 2002-re jelzik.

Növényeken kívül GM-baktériumok (pl. *Lactobacillus* - kolbász, *Streptococcus* - joghurt starter), illetve termeltetett fehérjék (pl. kimozin - sajtgyártás), vagy számos (GM-mel összefüggésbe hozható) kisebb molekula (pl. vitaminok, olajok) használatban vannak már évek óta.

Állatok vonatkozásában kísérletek folynak, de inkább biomedikai céllal (pl. szervátültetés későbbi célzatával), élelmezési céllal egyelőre kevésbé. A növekedés gyorsítására tett próbálkozások több esetben lényeges negatív mellékhatások miatt minősíthetők sikertelennek, de a növekedést serkentő hormon-génekből több kópiát hordozó GM lazacot és pisztrángot piacépesnek valószínűsítik. Nem transzgénikus szarvasmarhák tejtermelésének fokozására baktériumokkal termeltetett szarvasmarha szomatotropint használnak az USA-ban és néhány európai (nem EU, nem Svájc) országban.

Magyarországra a ma érvényes szabályok alapján importból kerülhetnek GM élelmiszerek és élelmiszer-alapanyagok, de ezt jelezni kell a fogyasztónak. Kísérleteket végeztünk, hogy korlátozottan felszerelt laborban hogyan tudunk GM-anyagokat szemikvantitatív szinten ellenőrizni és gyors, fehérjealapú meghatározást (szilárdfázisú, laterális immunkromatográfia) kvantitatívvá tenni.

## POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ ALKALMAZÁSA (PCR)

Általános tendencia, hogy jobb paraméterek elérése érdekében mind nagyobb mértékben kerülnek forgalomba genetikailag módosított élelmiszer alapanyagok. A módosító genetikai információk mesterséges konstrukciók részeként kerülnek a célsejtekbe. A detektálás lehetséges a kötelezően beépítendő genetikai elemek (promoter és terminátor szekvenciák), marker gének, illetve géntermékek keresésével. Az EU-országok jól működő hálózatban dolgoznak a területen ([www.jrc.it](http://www.jrc.it)), Svájc és Kanada aktív közreműködésével. Általános elvárás a GMO 1 %-nál érzékenyebb kimutatása. 28 EU-igazolt GMO növényből 27 tartalmazta a fitopatogén, karfiol mozaikvírus (Caulimovirus) ún. CaMV35S promotert és az ún. NOS-terminátor szekvenciát, amit az *Agrobacterium tumefaciens* nopaline-szintáz génjének 3'-régijéből termelték ki. Ha az eredmények bizonytalanok (pl. természetes Caulimovirus fertőzés gyanúja esetén), akkor az nptII (aminoglikozid-3'-foszfortranszferáz) marker gén, illetve termékének kimutatása lehet döntő, vagy esetleg a bakteriális eredetű EPSPS-gén expressziós terméke.

Többféle kukoricát vizsgáltunk a gyakorlatban. Csíráztatás után a Zenon Biotechnológia Kft. (Szeged) tisztító kitéjével nyertünk a mintákból DNS-t, a koncentráció meghatározása spektroszkópiailag történt. A PCR reakcióelegy: V=25 µl, 1 U Taq-polimeráz, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dNTP (4), primer: 0.25 µM, DNS 12-16 ng körül. PCR-program: 94 °C/3', majd 36 ciklusban 94 °C/1', 72 °C/1', 62 °C/1'.

Az alábbi oligomereket szintetizáltattuk az MTA Szegedi Biológiai Központjában:

A 35S promoter kimutatására a sense oligonukleotid szekvencia:

5' GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3'

A 35S promoter kimutatására az antisense oligonukleotid szekvencia:

5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'

A NOS terminátor kimutatására a sense oligonukleotid szekvencia:

5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'

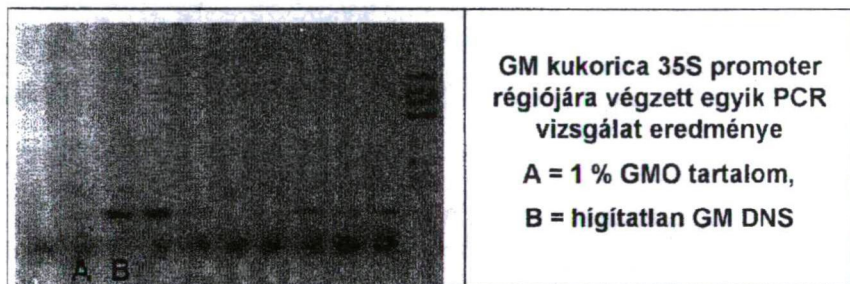
A NOS terminátor kimutatására az antisense oligonukleotid szekvencia:

5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'

A TAQ-polimerázzal előálló szekvencia 195 bázispár (bp) hosszú a 35S promoter, míg 180 bp hosszú a NOS terminátor jelenléte esetén. A megadott oligonukleotid szekvenciák GM-ellenőrzésre jól működő rendszert adtak.

Megállapítottuk, hogy egy pozitív kontrollnak kért, nagy cégtől származó kukoricából (a specifikációval ellentétben) lemaradt a NOS-terminátor, míg

eredetileg negatívnak gondolt, Szeged környéki szántóról véletlenszerűen felszedett cső úgy a 35S promotor, mint a NOS terminátor vonatkozásában pozitívnak adódott. Ez meglepett... Az érzékenységet úgy ellenőriztük, hogy az izolált GMO DNS-t garantáltan negatív DNS-el hígítottuk. 1 % alatti GMO DNS-tartalom a PCR amplifikálás után agaróz gélen, etidiumbromiddal festve jól detektálható, tehát az alapelvárásnak megfelelő válasz (az egyszerű PCR tesztet hígítással kombinálva) megadható, de további érzékenységnövekedés várható 40-szeresre növelve a PCR ciklusok számát. Természetesen ilyen vizsgálatok eredményei korlátozott érvényűek, ha pl. real time PCR-módszerek kvantitatív eredményeihez hasonlítjuk, és a hivatalosan deklarált elvárásoknak maradéktalanul kell megfelelni, de a tesztelés ára töredék esetünkben és a nyerhető információ lényege mindkét esetben azonos lehet.



**1. ábra**

További azonosítási lehetőség, hogy specifikus restrikciós hasítási helyek adódnak a PCR-termékekben (nem végeztük): a 195 bp hosszú 35S szekvencia 80 bp és 115 bp hosszú darabokat szolgáltat XmnI enzimmel, míg az NsiI enzim 84 bp és 96 bp hosszú fragmentumokat hoz létre a NOS terminátorról származó PCR-termékből.

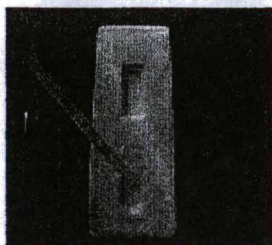
## **GMO EREDETŰ FEHÉRJÉK GYORS DETEKTÁLÁSA**

Több módszer lenne említendő, de itt fehérjék vonatkozásában immunológiai alapú tesztről lesz szó, amelyek használata nem igényel komoly laboratóriumi háttérrel, eszközigényük minimális vagy egyáltalán nincs, különösen, ha igen/nem válasszal beírjuk.

A modernebb gyorsteszték EIA vagy ELISA alapon működnek, de szilárd fázison. A szilárd fázis lehetővé teszi az antitestek koncentrációját. Az antitest koncentráció nagymértékű növelése lehetővé teszi a reakcióidők rövidítését. A tesztek típusától függően néha ki lehet hagyni (a normál EIA módszereknél szükséges) mosási lépéseket és az inkubációs idők percekről vagy órákról másodpercekre rövidülnek. Tehát az immunológiai gyorsteszték tipikusan szilárdfázisú immunreakciók kivitelezését jelentik. A

tesztek jellemzően színváltozás alapján, szabad szemmel értékelhetőek, nincs szükség műszerre vagy egyéb berendezésre.

Az általános működési elv a következő: kolloid (tipikusan 50 nm) arany felületére alkalmas pH-t és ionerősséget beállítva a kimutatandó fehérje egy adott szegmense ellen termeltetett, tisztított immunglobulint [1] kötünk, kihasználva az aranygömbök nagymértékű felületi töltését. Ez az anyag nitrocellulózra kerül az alábbi képeken az S- és T-jelű pozíciók közötti (a képen takart) területre. A T-jellel egyvonalban az azonosítandó fehérje egy másik darabja ellen termeltetett, szintén tisztított ellenanyag [2] kerül. Amikor a kimutatandó anyagot tartalmazó mintát felcseppentjük az S-jelű üregbe, akkor a folyadék kromatográfias mozgása az immunglobulinnal jelzett aranyat is mozgásba hozza, de úgy, hogy a detektálandó anyagunkat az immunglobulin megfogja. Ténylegesen tehát anyag-immunglobulin[1]-arany komplex mozog felfelé. A T-sávot elérve az anyag, az immunglobulin[2] által felismert immunaktív helyen keresztül lehorgonyozza az egész rendszert, tehát itt stabilan megjelenik a kolloid arany bíborvörös színe (a végső képlet tehát: nitrocellulózfilm-immunglobulin[2]-anyag-immunglobulin[1]-arany).



Egy tipikus, kazettás gyorseszteszt. A mintát, ami jellemzően 4-5 csepp vizes kivonatot jelent, a mintaüregbe kell juttatni (S).



A C-jelű terület az ún. kontroll sáv, amelynek jó kivitelezés esetén mindenképpen el kell színeződnie. (A T, vagy teszt-sáv szintelen, tehát itt éppen egy negatív teszteredmény látható).



A fenti (negatív) teszt nyitva: a mintaüregbe cseppentett anyag kromatográfias elven fut fel. A szilárd hordozón a T- és C-pozícióknak megfelelően, valamint az S-mintaüreg és a T-sáv között helyeztek el immunoaktív és más anyagokat.



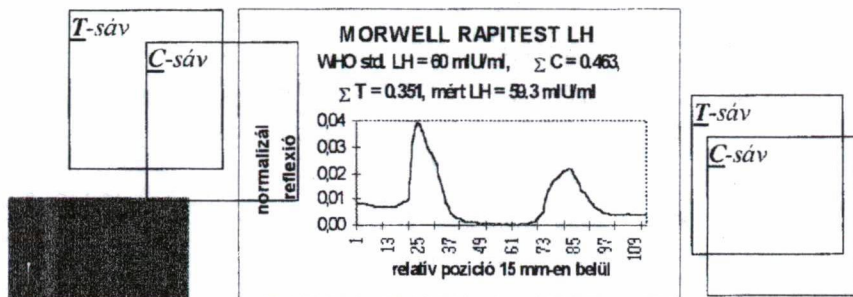
A T-vel jelzett, ún. teszt-sáv elszíneződése jellemzően pozitívítást jelent a vizsgált jellemző vonatkozásában. (haptének esetén ez nem igaz általánosságban, tehát az adott teszt működésétől függ, egyedileg kell ellenőrizni).

Az ún. strip, vagy csíktesztek azonos elven működnek, de kicsit több figyelmet igényelnek a felhasználótól: a bejelölt szinten túl nem szabad ezeket a mintába mártani. Ha ezt betartják, akkor a megbízhatóság és pontosság nem különbözik a kazettás verzió eredményétől, de az ár általában 20-30 %-kal alacsonyabb a strip-verzió esetén.

A biotechnológiai, diagnosztikai fejlődés egyre több lehetőséget biztosít egyszerű formában. Ezek mögött persze komoly tudományos ismerethalmaz és sok fáradozás áll. Kicsit hasonlít a pillanatnyi helyzet a félvezetők történetéhez: rádiócső, tranzistor, integrált áramkör. A gyorsdiagnosztika is a miniatürizálást jelenti a területen. Az automatákkal és nagyberendezésekkel bíró laborok tömegvizsgálataival árban nehéz versenyezni, de az idő- és más tényezők gyakran helyezik előtérbe a gyorsdiagnosztikai eszközöket.

A GM-ellenőrzést natív anyagon végezve az nptII marker gén termékének, az aminoglikozid-3'-foszfortranszferáznak kimutatása lehet döntő, vagy esetleg a bakteriális eredetű EPSPS-gén expressziós terméke. Természetesen hőkezelés és nyomás alkalmazása után, a fehérje denaturáció miatt nem lehet ezt a módszert használni. PCR módszerrel ilyen esetekben is nyerhető információ, mivel a DNS sok mindent kibír (természetesen törnek a nagyobb molekulák és előfordulhat, hogy 300 daltonnál kisebb DNS fragmentek maradnak csak egy kész élelmiszerben). A DNS izolálás feldolgozott GM anyagok vonatkozásában természetesen sokkal nehezebb, de pl. az amerikai PROMEGA cég "mágneses" izolálási technikája ebben is segít.

Az előbbieknél megfelelő laterális immunkromatográfias rendszerrel mennyiségi meghatározásokat végeztünk. 2\*5 W (12V) lámpával egyenletesen (kb. 10-10 mm-ről, két oldalról) megvilágítva a fehérje gyorsesztek teszt és kontroll területét, makró videofelvételeket készítettünk (Panasonic G120 kamerával). VFS200 videó-digitalizáló kártyán keresztül 24 bites RGB-fájlokként rögzítettük a képeket számítógépes feldolgozásra. A képfeldolgozás menete: a I és C-mező területének kivágása, standard 8 bites szürke konverzió, negatív képzés. Saját programmal integrálás, majd normalizált reflexiós görbe számítása. A kontroll sávnak megfelelő görbe alatti terület (a gyártó specifikációja szerint 45 mIU fehérje intenzitásnak felel meg) viszonyítása a teszt terület hasonló adataihoz. Mivel mintaként WHO standard hígításokat használtunk, ezért összehasonlítási alapként az ismert fehérje-mennyiség szolgált.



3. ábra

PÉLDAKÉNT: egy, a számítógéppel előállított negatív kép és a kiértékelési görbe

Összefoglalva: számítógéppel, a mért értékekből becsült fehérjemennyiségek (25-80 mIU/ml szinten) jellemzően  $\pm 10-12\%$ -on belül egyeznek a fehérje-standard koncentráció értékekkel, tehát laterális immunkromatográfiai tesztekkel elfogadható, gyors szemikvantitatív mérőrendszer alakítható ki.

### FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Dudits Dénes és Heszky László: Növényi biotechnológia és géntechnológia, 2. Kiadás, Agroinform Kiadó, Budapest, 2000.
2. EU Joint Research Center GMO anyagai, [www.jrc.it](http://www.jrc.it) elérhetőséggel
3. [www.rpmeqa.com/qualitymonitoring](http://www.rpmeqa.com/qualitymonitoring)



## **SIMPLE PCR METHOD AND SOLID PHASE IMMUNOCHROMATOGRAPHY FOR GM-FOOD TESTING**

**J. Soós**

SZTE University College of Food Engineering  
6724. Szeged, Mars tér 7.

### **ABSTRACT**

Simple PCR technique was used to study genetically modified (GM) corn as a semi-quantitative food-testing model. The selected oligonucleotides allow to recognize most of the officially (EU) permitted GM plants.

As an alternative, rapid immunochromatographic method can be used to detect GM-related proteins if native starting material is given. Experiments were performed to find solution for quantification of these, basically qualitative test results. The conclusion for the simple PCR and the discussed immunochromatographic methods that both can provide semi-quantitative results, found useful and economical.