

UDK: 577.631

UPOTREBA METODA REAKCIJE LANČANE POLIMERIZACIJE (PCR) U AGROBIOTEHNOLOGIJI

TAŠKI-AJDUKOVIĆ KSENIJA, MILOŠEVIĆ MIRJANA, NIKOLIĆ ZORICA, VUJAKOVIĆ MILKA¹

IZVOD: *Biotehnologija u poljoprivredi primenjuje metode reakcije lančane polimerizacije (PCR) u brojnim fazama formiranja novog proizvoda. PCR tehnologija se najčešće koristi tokom otkrivanja i kloniranja gena, konstrukcije vektora, identifikacije, skrininga i karakterizacije transformanta kao i tokom kontrole kvaliteta semena. Proizvođači i kompanije za proizvodnju hrane, kao i laboratorije za analizu kvaliteta prebrambenih proizvoda koriste PCR metode da bi se utvrdilo prisustvo odnosno odsustvo genetičkih modifikacija (GM) u proizvodima ili da bi se odredila količina GM materija prisutnog u proizvodu.*

U ovom radu biće opisani osnovni elementi PCR analiza i njihova primena u testiranju semena sa posebnim naglaskom na faze testiranja na koje treba posebno obratiti pažnju da bi se dobili pouzdani rezultati. U radu će biti razmatrana i pitanja vezana za analizu različitih vrsta matriksa koji takođe mogu uticati na rezultate analiza.

Ključne reči: *agrobiotehnologija, Genetički modifikovani organizmi (GMO), Reakcije Lančane Polimerizacije (PCR)*

UVOD: Biotehnologija u poljoprivredi primenjuje metode reakcije lančane polimerizacije (PCR) u brojnim fazama formiranja novog proizvoda i genetičkim analizama. PCR tehnologija se najčešće koristi tokom otkrivanja i kloniranja gena, konstrukcije vektora, identifikacije, skrininga i karakterizacije transformanta kao i prilikom kontrole kvaliteta semena. Proizvođači i kompanije za proizvodnju hrane, kao i laboratorije za analizu kvaliteta prebrambenih proizvoda koriste PCR metode da bi se utvrdilo prisustvo odnosno odsustvo genetičkih modifikacija (GM) u proizvodima ili da bi se odredila količina GM materija prisutnog u proizvodu.

Termin genetički modifikovani organizmi (GMO) je uveden da bi se opisali organizmi čiji je genetički materijal modifikovan na način koji se ne javlja u prirodnim uslovima ukrštanja odnosno prirodne rekombinacije gena. Ako se ovaj termin primeni na genetički modifikovane biljne vrste možemo reći da su to biljke u čiji je genom unešen gen/geni iz nesrodnih vrsta

metodama genetičkog inženjeringa (Taški-Ajduković K. i sar., 2005). Proces unošenja gena iz nesrodnih vrsta u genom biljke koji dovodi do promene njenih karakteristika naziva se genetička transformacija.

Reakcija lančane polimerizacije DNK (PCR)

PCR ili reakcija lančane polimerizacije DNK omogućava *in vitro* amplifikaciju DNK imitirajući fenomen *in vivo* DNK replikacije (Mullis i Falloona, 1987) koji se odvija u svim ćelijskim organizmima u kojima se molekul DNK umnožava. Za razliku od prirodne DNK replikacije, DNK umnožavanje tokom PCR ne pokriva celokupnu sekvencu originalnog DNK molekula već je ograničen na specifičan, relativno kratak, region DNK. Koji će se deo DNK lanca sintetisati *de novo* zavisi od prajmera (kratki, jednolančani, sintetski DNK molekul) koji hibridizuju na suprotnim stranama gena koji želimo da umnožavamo.

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹ Dr KSENIJA TAŠKI-AJDUKOVIĆ, naučni saradnik, dr MIRJANA MILOŠEVIĆ red.profesor, dr ZORICA NIKOLIĆ, naučni saradnik, dr MILKA VUJAKOVIĆ, naučni saradnik, Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Novi Sad. e-mail: ksenijat@zifvencs.ns.ac.yu

Na osnovu jednonolančane DNK matrice, dobijene termalnom denaturacijom native DNK, pri odgovarajućim uslovima sintetiše se novi komplementarni lanac DNK. Ponavljanjem ciklusa denaturacije DNK, hibridizacije prajmera za komplementarne sekvence u DNK i ekstenzije, male količine specifičnih fragmenata DNK se mogu umnožiti veliki broj puta. DNK replikaciju omogućavaju enzimi DNK polimeraza koja je izolovana iz bakterija koji žive u termalnim izvorima te su termostabilni i ne gube aktivnost pri visokim temperaturama neophodnim za denaturaciju DNK.

Veliki broj metoda zasnovanih na PCR je razvijen da bi se detektovali GMO. Preduslov za detekciju GMO je poznavanje tipa genetičke modifikacije, uključujući dizajn ubačenog gena kao i regulatorne elemente (promotor i terminator) koji su korišćeni.

Priprema uzorka

Uzorkovanje

Da bi se sprečili pogrešni rezultati prilikom analize GMO pomoću PCR jedna od faza na koju treba obratiti najviše pažnje je uzorkovanje (Terry i Parkes, 2000). Uzorak treba da je reprezentativan, da veličina uzetog uzorka i način uzorkovanja zadovolje zahteve homogenosti i postavljene granice detekcije GMO.

Reprezentativnost uzorka se mora očuvati u daljem postupku redukcije uzorka u laboratoriji, odnosno tokom priprema radnog uzoraka. U velikim količinama uzorka u kojima je prisutna GM (ukoliko nije izmešana tokom žetve, skladištenja ili pripreme prehrambenih proizvoda) može biti prisutan određen stepen varijabilnosti u sadržaju GM. Zbog toga pravilno uzorkovanje određuje pouzdanost ili reprezentativnost dobijenih rezultata. Stepent heterogenosti uzorka i postavljena granica detekcije, prihvatljivosti genetičke modifikacije definiše broj i veličinu uzoraka koje bi trebalo uzeti za analizu. U cilju ostvarenja reprezentativnosti uzorka, ako se zahteva nizak nivo genetičke modifikovanosti uzorka, veličina uzetog uzorka bi trebalo da raste (Gilbert 1999).

Ekstrakcija DNK i efekat matriksa

Danas su dostupni vrlo različiti metodi za ekstrakciju i prečišćavanje DNK (Anklam et al., 2002). Od kvaliteta i čistoće izolovane DNK zavisi efikasnost PCR te je vrlo važno odabrati odgovarajući metod za izolaciju u

zavisnosti od materijala iz koga je neophodno izolovati DNK. Kadkada čak i naizgled jednostavni matriksi, kao što je npr. seme kukuruza, mogu biti izazov za ekstrakciju. Tako npr. ako je seme tretirano hemikalijama koje mogu uticati ili inhibirati PCR, a ekstrakcioni metod nije prilagođen za njihovo efikasno odstranjivanje, može dovesti do lažno negativnih rezultata.

Različite supstance iz biljnog materijala i prehrambenih proizvoda biljnog porekla se mogu ekstrahovati zajedno sa DNK i inhibirati PCR reakciju (polisaharidi, proteini, lipidi, polifenoli i dr. sekundarni metaboliti) (Rossen et al., 1992; Tengal et al., 2001). Lažno negativni rezultati usled dejstva PCR inhibitora mogu se prevazići upotrebom pozitivne kontrole DNK tzv. spike kontrole. Pored uzorka koji se testira koristi se i uzorak u koji je dodat GM pozitivna DNK. Ako dođe do inhibicije u njenoj amplifikaciji može se tvrditi da su u uzorku izolovane DNK prisutni inhibitori. Dupleks PCR-om se mogu prevazići lažno negativni rezultata usled PCR inhibitora. U ovakvom PCR se pored prajmera za GM DNK koriste i prajmeri za endogenu DNK (DNK koja je uvek prisutna u određenoj biljnoj vrsti ili u svim biljnim vrstama) (Slika 1). Međutim Holden et al. (2003) su pokazali da ovakav PCR nije u potpunosti pouzdan u sprečavanju lažno negativnih rezultata zbog toga što je prisustvo endogene DNK u uzorku daleko veće od GM DNK i stoga još uvek može biti uspešno amplifikovano u delimično inhibiranoj reakciji u kojoj ne dolazi do amplifikacije GM DNK.

Pod pojmom DNK kvaliteta podrazumeva se stepen oštećenja DNK, odnosno dužina izolovanih fragmenata DNK. Tokom prerade u prehrambene proizvode, sirovine biljnog porekla se izlažu različitim tehnološkim procesima (visoka temperatura, niske pH vrednosti, hidrolize, enzimatske degradacije) usled čega dolazi do ekstrakcije i fragmentacije DNK molekula. Redukcija veličine fragmenata izolovane DNK nije poželjno jer ukoliko veliki deo fragmenata nema dovoljnu dužinu da sadrži ciljnu sekvencu neće doći do PCR amplifikacije. Takođe određeni tipovi oštećenja DNK tokom prerade hrane mogu interferirati sa sposobnošću DNK da bude amplifikovana tokom PCR.

Smanjenje količine ili oštećenje integriteta DNK koja može biti ekstrahovana iz uzorka i amplifikovana PCR recipročno povećava

detekcioni i kvantifikacioni limit izražen kao procenat GM DNK u odnosu na ukupnu biljnu DNK. U ekstremnim slučajevima samo minimalne količine DNK mogu biti izolovane iz određenih matriksa (rafinisano ulje, modifikovani škrob, lecitin soje), a kadkada se DNK ne može izolovati (šećer).

Primena PCR

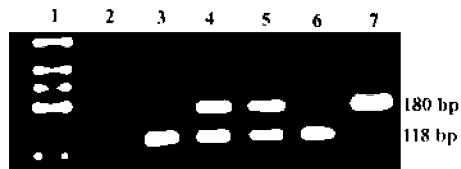
PCR može biti upotrebljen na dva načina pri analizi GM biljaka. To su tzv kvalitativni PCR koji omogućava da/ne odgovor na prisustvo GM i kvantitativni PCR koji omogućava određivanje količine prisutne GM.

Kvalitativni PCR

Tokom kvalitativne PCR analize, ako DNK uzorka sadrži ciljnu sekvencu koja se ispituje ona će se umnožavati. Uz svaki PCR neophodno je koristiti negativnu i pozitivnu kontrolu. Ako se na kraju PCR detektuje odgovarajući PCR produkt to ukazuje na prisustvo ciljne DNK sekvence u uzorku, a ako se ne detektuje da ciljna DNK nije prisutna u uzorku u količini koja se može detektovati.

Produkti PCR se obično analiziraju agaroznom ili poliakrilamidnom gel elektroforezom kojima se vrši razdvajanje DNK fragmenata na osnovu njihove dužine. Veoma veliki broj identičnih DNK fragmenata, produkata PCR, formira jasnu traku koja se upotrebom etidijum bromida ili sličnih sredstava može videti pod UV svetlom (Slika 1).

Sl. 1. Dupleks PCR sa prajmerima za lectin gen (118bp) i NOS terminator (180bp)
1. molekularni marker 2. slepa proba
3. GM negativna soja 4- 6: 1%, 0.5%, 0.1% RR Soja 7. Bt kukuruz



Na kraju PCR intenzitet traka može veoma da varira između uzoraka, ali on ne mora uvek biti u linearnoj korelaciji u odnosu na količinu ciljne DNK koja je prisutna na početku reakcije. Kada se napravi veliki broj PCR produkata, obično zbog iscrpljenja jednog ili više supstrata, dolazi do zasićenja i formiranja platoa reakcije. Zbog toga se nakon analize

PCR produkata nakon reakcije kao rezultat može se reći jedino da li su produkti detektovani ili ne (pozitivan ili negativan rezultat).

Kvalitativni PCR se koristi na dva osnovna načina. Prvi način je jednostavno testiranje da se odredi da li je DNK sekvenca koja se ispituje prisutna u uzorku. Drugi način je semikvantitativni. Ako uzorak čini seme ili druge nezavisne celine određen broj poduzoraka se može koristiti da bi se procenio broj partikula (semena) koje sadrže GM. Na primer, umesto da se testira svako seme u uzorku od 1000 semena, može se napraviti 10 poduzoraka od 100 semena. Na osnovu broja pozitivnih poduzoraka može se proračunati koliki je procenat pozitivnih semena u celokupnom uzorku. Ovaj metod se može primeniti samo kada je procenat GM semena u uzorku nizak (ispod 5%). Naprimera, ako je 5 od 10 poduzoraka pozitivno, od kojih svaki sadrži po 100 semena, tada je izračunat nivo mogućeg prisustva GM 0.69% i 95% limit pouzdanosti je 2,21 do 1,66 (ISTA web site). To je mnogo više informacija koje se mogu dobiti nego da je analiziran samo jedan zbirni uzorak, kada bi rezultat bio samo pozitivan .

Kvalitativni PCR

Postoje različite mogućnosti kvantifikacije GM u uzorku pomoću PCR. U svim slučajevima kvantifikacijom pomoću PCR određuje se količina GM DNK nasuprot DNK karakteristične za datu biljnu vrstu (npr. lektin gen za soju, zein kod kukuruza). Najpouzdanija kvantitativna analiza GM PCR je tzv Real-Time PCR.

Real-Time PCR tehnologija omogućava praćenje emisije fluorescencije koja je povezana sa amplifikovanim produktima tokom procesa PCR. Prisutni su različiti tipovi Real-Time PCR tehnologija: fluorescentne probe (TaqMan[®], FRET), Scorpion[™] prajmeri i SYBR[®] Green.

Real-time test sa TaqMan sa fluorescentnim bojama se zasniva na oligonukleotidnim probama obeleženim sa dve fluorescentne boje (Reporter i Quencher) i 5'-3'egzonukleaznoj aktivnosti Taq polimeraze. U PCR reakciji, prajmeri se vezuju na specifična mesta na DNK i polimeraza vrši amplifikaciju. U međuvremenu, fluorescentno obeležene probe se vezuju na specifično mesto na DNK koje se nalazi između mesta vezivanja prajmera. Kada polimeraza dođe do mesta vezivanja probe, ona je, da bi mogla nastaviti amplifikaciju, seče. Na taj način oslobođena

reporter boja emituje fluorescenciju. Kada je proba intaktna fluorescenciju onemogućuje druga boja tzv. Quencher. Nivo emisije se meri (Slika 2) i na osnovu njega vrši kvantifikacija (Taški-Ajduković K. i sar. 2006).

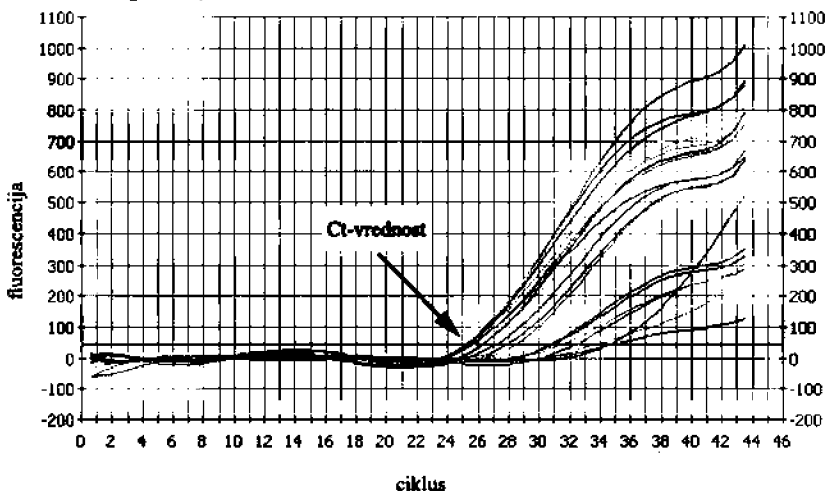
Sa Skorpion prajmerima probe nisu potrebne. Jedan od prajmera je obeležen fluorescentnom bojom i odgovarajućim quencher-om. On je konstruisan tako da formira hairpin loop strukturu (strukturu ukosnice) što omogućava da quencher bude u blizini reporter boje. Tokom faze ekstenzije scorpion prajmer se otvara da bi hibridizovao sa novonastalim lancem DNK. Hairpin loop struktura se rastavlja razdvajajući reporter boju od quencher-a što omogućava fluorescenciju.

SYBR Green kvantifikacija je u potpunosti drugačiji pristup. Ona koristi boje (SYBR Green) koje se vezuju za dvostruki lanac DNK i kvantifikuje količinu nastalog dvolančanog DNK produkta. SYBR Green kvantifikuje i

specifični i nespecifični PCR produkt. Nasuprot SYBR Green, skorpion prajmeri i fluorescentne boje hibridizuju samo sa specifičnim PCR produktom omogućujući veću specifičnost i manji background nego SYBR Green.

Real-Time analizom količina sintetisane DNK tokom PCR reakcije se procenjuje merenjem fluorescencije. Na taj način je moguće odrediti tačan broj ciklusa potrebnih da bi se proizvela određena količina ciljane DNK tokom PCR. Ta vrednost odgovara vrednosti emitovanog fluorescentnog signala i naziva se Ct-vrednost (Sl. 2). Poređenjem Ct vrednosti GMO sekvence npr Roundup Ready® soje i referentnog gena npr. lektina moguće je odrediti procenat GMO u određenom uzorku. Što je prisustvo GMO u uzorku veće Ct vrednost će biti manja, jer je potreban manji broj ciklusa da bi se proizvela određena količina DNK. Poređenjem Ct vrednosti uzorka i referentnih standarda dobija se procenat genetičke modifikacije u uzorku.

Sl. 2. Amplifikacioni dijagram GMO referentnih standarda i uzoraka soje (sa Real-time aparata)



LITERATURA

- ANKLAM E., F. GADANI P. HEINZE H., PIJNENBURG, VAN DEN EEDE G. (2002) Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Tech* 214:3-26.
- GILBERT J. (1999) Sampling of row materials and processed food for the presence of GMOs. *Food Control* 10:363-365.
- HOLDEN MJ., BLASIC JR., BUSSJAEGER L., KAO C., SHOKERE LA., KENDALL DC., FREESE L., JENKINS GR. (2003) Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *J Agricultural & Food Chemistry* 51:2468-2474.
- MULLIS K., FALOONA S., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. (1986) Specific enzy-

- matic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- ROSSEN L., NORSKOV P., HOLMSTROM K., RASMUSSEN OF. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays, and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 17:37-45.
- TAŠKI-AJDUKOVIĆ K., MILOŠEVIĆ M., NIKOLIĆ Z., VUJAKOVIĆ M. (2006) Način određivanja genetičkih modifikacija u Nacionalnoj laboratoriji za ispitivanje semena. Zbornik radova Naučni Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad 42: 391-400.
- TAŠKI K., MILOŠEVIĆ M., ZLOKOLICA M., VUJAKOVIĆ M., NIKOLIĆ Z. (2005) Polja Vojvodine - bez genetički modifikovanih useva. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 66: 209-213.
- TENDEL C., SCHÄLER P., SETZKE E., BALLE J., SPRENGER-HAUSSELS M. (2001) PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *BioTechniques* 31: 426.
- TERRY C., PARKES H. (2000) Proceedings the European Commissions Joint research Centre and International Life Science Institute Joint workshop on method development in relation to regulatory requirements for the detection of GMOs in the food chain. Brussels.

POLYMERASE CHAIN REACTION METHODS (PCR) IN AGROBIOTECHNOLOGY

TAŠKI-AJDUKOVIĆ KSENJA, MILOŠEVIĆ MIRJANA, NIKOLIĆ ZORICA, VUJAKOVIĆ MILKA

SUMMARY

The agricultural biotechnology applies polymerase chain reaction (PCR) technology at numerous steps throughout product development. The major uses of PCR technology during product development include gene discovery and cloning, vector construction, transformant identification, screening and characterization as well as seed quality control. Commodity and food companies as well as testing laboratories rely on PCR technology to verify the presence or absence of genetically modification (GM) in a product or to quantify the amount of GM material present in the product.

This article describes the fundamental elements of PCR analysis and its application to the testing of grains and highlights some of areas to which attention must be paid in order to produce reliable test results. The article also discusses issues related to the analysis of different matrixes and the effect they may have on the accuracy of the PCR analytical results.