

METÓDY IDENTIFIKÁCIE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANIZMOV

Na identifikáciu GMO je možné použiť dve skupiny analytických metód:

- metódy zamerané na identifikáciu proteínov - založené na imunochemickej analýze proteínov tvorených expresiou modifikovaných génov,
- metódy zamerané na identifikáciu DNA - založené na molekulárno-biologickej analýze charakteristických sekvencií DNA, ktoré sú pre GMO špecifické.

Metódy identifikácie GMO zamerané na analýzu proteínov

Metódy identifikácie GMO prostredníctvom analýzy proteínov sú založené na extrakcii proteínov zo vzorky a následnom použití protilátok špecificky reagujúcich s charakteristickým proteínom GMO. Spomedzi imunochemických metód majú najlepšie analytické parametre metódy typu sendvičovej ELISA, ktoré umožňujú kvalitatívnu i kvantitatívnu analýzu. Jednoduchšie imunochemické metódy, väčšinou vo forme reakčných prúžkov, poskytujú iba orientačné, málo spoľahlivé, a len kvalitatívne výsledky. Súpravy ELISA sú k dispozícii na kvalitatívnu analýzu viacerých GMO a sú vhodné na analýzu semien a surovín. Ich nevýhodou je nižšia citlivosť a nepoužiteľnosť v prípade zložitých alebo tepelne opracovaných vzoriek.

Metódy identifikácie GMO zamerané na analýzu DNA

Metódy identifikácie GMO prostredníctvom analýzy DNA sú založené na extrakcii DNA zo vzorky a následkom zistení prítomnosti charakteristických sekvencií DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Výhodou týchto metód je ich vysoká citlivosť, vysoká selektivita a použiteľnosť aj v prípade zložitých alebo tepelne opracovaných vzoriek.

Staršou jednoduchšou verziou sú PCR metódy v usporiadaní „end point“, pri ktorých sa po 35 - 40 cykloch zisťuje prítomnosť určeného produktu pomocou elektroforézy v agarózovom géli, na základe molekulovej hmotnosti. Vzhľadom na to, že táto identifikácia nemusí byť jednoznačná, vykonáva sa potvrdenie identity amplifikovaného fragmentu DNA pomocou restriktívnej analýzy, alebo na základe hybridizácie s DNA-sondou. PCR metódy v usporiadaní „end-point“ umožňujú citlivý kvalitatívny dôkaz sekvencií DNA charakteristický pre GMO, neumožňujú však spoľahlivú kvantifikáciu.

Kvantitatívne metódy sú založené na PCR v kinetickom usporiadaní „real-time“. V tomto prípade sa priebeh PCR priebežne fluorometricky monitoruje. Využívajú sa pritom fluorogénne oligonukleotidové sondy a real-time cyklér, v ktorom je integrovaný fluorometer. Kvantifikáciu cieľovej sekvencie DNA umožňuje časový posun amplifikačnej krivky, pretože čím je koncentrácia templátu vyššia, tým skôr dosiahne produkt amplifikácie merateľnú úroveň. V analytickej praxi sa na číselné vyjadrenie polohy amplifikačnej krivky v čase používa hodnota tzv. prahového cyklu (threshold cycle, cT), ktorá predstavuje poradové číslo cyklu, pri ktorom hodnota intenzity fluorescence dosiahne určitú prahovú hodnotu (threshold). Táto sa empiricky určí pre každý konkrétny experiment, pričom sa zohľadňuje rýchlosť amplifikácie a exponenciálny charakter amplifikácie pozitívnych vzoriek.

Real-time PCR ešte v súčasnosti nie je triviálna metóda. Existuje pri nej viacero možných zdrojov nepresností. Významným zdrojom nepresností je napr. variabilita účinnosti extrakcie DNA zo vzoriek. Ako určité východisko z núdze sa preto požívajú metódy na relatívnu kvantifikáciu, v ktorých sa kvantita cieľového fragmentu stanovuje v pomere ku kvantite referenčnej sekvencie prítomnej vo vzorke. Takýto prístup umožňuje obísť problém s nízkou

a variabilnou účinnosťou extrakcie, avšak vedie k nepresným výsledkom v prípade, že množstvo cieľovej sekvencie je voči množstvu referenčnej sekvencie veľmi malé (< 1: 10).

Ciele pre detekciu genetických modifikácií založených na PCR

