

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szójatartalmú élelmiszerekben előforduló glifozát
toleráns szója szennyezés és a szervezetbe kerülés
kockázatának vizsgálata PCR módszerrel

Ujhelyi Gabriella

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Budapest

2009

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter,
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

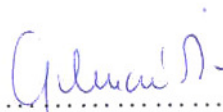
Témavezető: Dr. Gelencsér Éva
Főosztályvezető, címzetes egyetemi tanár, CSc
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Élelmiszerbiztonsági Főosztály, Biológia Osztály

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.



.....
Dr. Fodor Péter
iskolavezető



.....
Dr. Gelencsér Éva
témavezető

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. február 10-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS, BCE

Tagjai

Deák Tibor, DSc, BCE

Kiskó Gabriella, PhD, BCE

Kovács Erzsébet, CSc, SZTE

Dallman Klára, PhD, Biomi Kft.

Opponensek

Maráz Anna, CSc, BCE

Kiss Erzsébet, CSc, SZIE

Titkár

Kiskó Gabriella, PhD, BCE

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldalszám
1. BEVEZETÉS.....	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A GMO-król általában – GMO-k szabályozása.....	3
2.1.1. A géntechnológiailag módosított növényekről.....	4
2.1.2. Glifozát toleráns GM növények előállítása	5
2.2. GMO-k kimutatásának lehetőségei	6
2.2.1. Transzgenikus minták fehérje alapú kimutatása	6
2.2.2. DNS alapú detektálási módszerek	7
2.2.2.1. A polimeráz láncreakció (PCR).....	7
2.2.2.2. GMO kimutatási technikák csoportosítása az azonosítani kívánt célszekvencia szerint.....	9
2.2.2.3. Kvalitatív GMO analitika	10
2.2.2.4. Félkvantitatív GMO analízis.....	14
2.2.2.5. Kvantitatív GMO analitika	17
2.2.2.6. Makro-, mikro-array és egyéb alternatív módszerek a GMO detektálásra	22
2.3. A DNS izolálás és problémaköre.....	23
2.3.1. PCR inhibitorok.....	23
2.3.2. Élelmiszerekből történő GMO kimutatásra alkalmas DNS izolálási módszerek	24
2.3.3. A háromfázisú megoszlás módszere.....	28
2.3.4. DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfia.....	29
2.4. GMO felmérések kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerminták esetében ...	30
2.5. DNS túlélése a bélcsatornában és onnan más szervekbe való bejutásának kockázata	33
2.5.1. A 35S promóter és esetleges veszélyei.....	33
2.5.2. Horizontális génátvitel, idegen DNS átjutása a bélfalon és integrálódása a szervezetbe.....	36
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	43
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	45
4.1. Vizsgálati anyagok, előállításuk és mintavételezés.....	45
4.1.1. Roundup Ready szója kimutatásának vizsgálata élelmiszermintákból.....	45
4.1.1.1. Félüzemi körülmények között előállított modell húsminták	45
4.1.1.2. Kereskedelemről származó mintacsoportok.....	46

4.1.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetési kísérletben – vizsgálati minták.....	47
4.1.3. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata csirkeetetési kísérletekben - vizsgálati minták.....	47
4.2. Oldatok és reagensek.....	48
4.2.1. Oldatok és reagensek a DNS izoláláshoz.....	48
4.2.2. Oldatok és reagensek a polimeráz láncreakcióhoz	49
4.2.3. Oldatok és reagensek a termékanalízishez.....	49
4.3. Vizsgálati módszerek	50
4.3.1. DNS izolálás.....	50
4.3.2. A kivont DNS tisztaságának meghatározása.....	54
4.3.3. DNS sokszorozás.....	54
4.3.3.1 Kontroll PCR	54
4.3.3.2. GMO specifikus reakciók.....	57
4.3.4. Termékanalízis.....	58
4.3.5. Real-time (valós idejű) PCR (Q-PCR).....	58
5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK	60
5.1. Félüzemi körülmények között előállított modell húsminták és kereskedelmi forgalomból származó élelmiszer-minták vizsgálatának eredményei.....	60
5.1.1. Modell és élelmiszer-minták DNS izolálási eredményei.....	60
5.1.1.1. Félüzemi modell húsminták DNS izolálási eredményei	60
5.1.1.2. Kereskedelmi forgalomból származó különböző mintacsoportok DNS izolálásának eredményei.....	61
5.1.1.3. Háromfázisú megoszláson (HFM) alapuló DNS izolálási módszer továbbfejlesztése élelmiszeranalitikai célokra.....	69
5.1.2. Modell és élelmiszer-minták PCR vizsgálatának eredményei.....	74
5.1.2.1. Szója tartalmú modell húsminták kontroll lektin PCR-jének és GMO vizsgálatának eredményei.....	74
5.1.2.2. Kereskedelembeől származó élelmiszerminták kontroll lektin PCR-jének és GMO vizsgálatának eredményei.....	81
5.1.2.3. Háromfázisú megoszláson (HFM) alapuló DNS izolálási módszerrel kinyert DNS sokszorozhatóságának vizsgálata.....	87
5.1.2.4. Kakaó tartalmú minták ioncserés kromatográfiával kinyert DNS sokszorozhatóságának vizsgálata.....	90

5.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetési kísérletekben.....	93
5.2.1. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetési kísérletekben - DNS izolálás eredményei.....	93
5.2.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetési kísérletekben – PCR vizsgálatok eredményei...	94
5.3. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata - csirkeetetési kísérletekben.....	98
5.3.1. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata csirkeetetési kísérletekben - DNS izolálás eredményei.....	98
5.3.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata csirkeetetési kísérletekben – PCR reakciók eredményei.....	101
5.4. Új tudományos eredmények.....	106
6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	107
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	109
8. SUMMARY.....	114
9. MELLÉKLETEK.....	118
M1 Irodalomjegyzék.....	118
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	139

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bp	Bázispár, Base pair
Bt toxin	<i>Bacillus thuringiensis</i> baktérium toxin <i>Bacillus thuringiensis</i> bacterium toxin
DNS (DNA)	Dezoxiribonukleinsav, Deoxyribonucleic acid
CaMV promóter	Karfiolmozaik vírus 35 S promóter Cauliflower mosaic virus 35S promóter
CP4-EPSPS	5-enolpiruvil-sikimát-3-foszfát-szintáz enzim, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase enzyme
Ct	Küszöb ciklus szám, Threshold cycle
CTAB	Cetil-trimetil-ammónium-bromid, Cetyltrimethylammonium bromide
CTP	Kloroplaszt tranzit peptid, Chloroplast Transit Peptide
DEAE-cellulóz	Dietil-amino-etil-cellulóz, Diethylaminoethyl cellulose,
dNTP	Dezoxi-nukleozid-trifoszfát, Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav, Ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal European Food Safety Authority,
ELISA	Enzimhez kapcsolt immunsorbens vizsgálatok, Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Európai Unió, European Union
FRET	Förster-féle rezonancia-energia-transzformáció Förster resonance energy transfer
GM	Géntechnológiailag Módosított, Genetically Modified
GMO	Géntechnológiailag Módosított Organizmus Genetically Modified Organisms
HFM (TPP)	Háromfázisú megoszlás (Three-phase partitioning)
JRC	Közös Kutatóközpont, Joint Research Center

<i>nos</i> terminátor	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> nopalin szintáz terminátor <i>Agrobacterium tumefaciens</i> nopalin synthase terminator
nt	Nukleotid, Nucleotide,
PAGE	Poliakrilamid-gélelektroforézis, Polyacrylamide gel electrophoresis
RR szója	Roundup Ready glifozát toleráns szója Roundup Ready glyphosate tolerant soy
PCR	Polimeráz láncreakció, Polymerase chain reaction
SDS	Nátrium-lauril-szulfát, Sodium dodecyl sulphate
TaqMan, SYBR Green, Molecular beacon, Scorpions, Minor Groove Binder (MGB)	Real-Time PCR-hez tervezett próbák Designed probes for Real-Time PCR
TBE puffer	Trisz-bórsav- EDTA puffer, Tris-borate EDTA buffer
TNE puffer	Trisz-Nátrium-klorid-EDTA puffer, Tris-sodium EDTA buffer
TE puffer	Trisz-EDTA puffer, Tris-EDTA buffer
TEMED	N,N,N',N' tetrametilén-diamin, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
T _m	Olvadási hőmérséklet, Melting temperature,
TRIS-HCL	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid, Tris (Hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride
Wizard/Wizard magnetic, Quagene, DNA Stool Mini, Genespin, Dneasy, Nucleon PhytoPure, PrepMan Ultra	Kereskedelmi forgalomból származó DNS izolálási kittek DNA isolation kits from commercial

1. BEVEZETÉS

A géntechnológiailag módosított organizmusok (Genetically Modified Organisms, GMO), olyan élő szervezetek, amelyekben az örökítő anyagot, a DNS-t, a természetben elő nem forduló módon változtatták meg. Az első genetikailag módosított növényt 1984-ben állították elő és azóta 60 különböző fajon – közülük a legtöbb fő élelmiszer növényen - végeztek genetikai módosítást és vonták őket kísérleti, illetve szántóföldi termesztésbe. A géntechnológiai módosítás alkalmazásával lehetőség nyílt nem rokon fajok génjeinek átvitelére is. A genetikailag módosított növényeknek első, másod és harmad generációját különböztetjük meg. Az első generációs GM növények közé a biotikus (melyek közül a legelterjedtebbek a rovarkártevőkkel szemben ellenálló) és abiotikus stressz rezisztens növények (pl. gyomirtó szerekkel szemben toleráns GM növények) tartoznak. Közülük leggyakrabban a szója, kukorica, repce és gyapot módosításával találkozhatunk. Élelmiszeripari szempontból a szója felhasználása a legjelentősebb, különösen a húsiparban, ahol nagyobb mennyiségben használják a különböző szója készítményeket fehérje pótlóként, illetve állományjavítóként. A második generációs transzgenikus növények fejlődésben és anyagcserében módosítottak, míg a harmadik generációs transzgenikus növényeket az ún. „bioreaktor” növények alkotják, amelyeket már nem élelmiszeripari célra, hanem például gyógyszerhatóanyag-termelésre fejlesztik.

A GM növények társadalmi megítélése nem egységes, ezért biztosítani kell a termeszőknek és fogyasztóknak a szabad választás lehetőségét, hogy dönthessenek a GM növények termesztése, felhasználása (pl. takarmány) vagy fogyasztása ellen illetve mellette. Mindezeket figyelembe véve az Európai Unió rendeletekkel szabályozza a genetikailag módosított termények, szervezetek kibocsátását, forgalmazását, nyomon követését és jelölését. Az 1829/2003-as Európai Közösségi (EK) rendelet a GM élelmiszerek és takarmányok engedélyezéséről, felügyeletéről és címkézéséről rendelkezik. A 1830/2003-as Európai Közösségi rendelet értelmében a 0,9%-nál nagyobb részarányban genetikailag módosított alkotót tartalmazó termékek jelölése az EU tagállamaiban kötelező. A törvény által előírt határértékek, valamint a GMO mentesség ellenőrzésére Uniós szinten különböző analitikai módszerek állnak rendelkezésre. Ezek a módszerek azonban leginkább növényi minták (vetőmagok, takarmányok, élelmiszeripari nyers- és alapanyagok) vizsgálatára alkalmasak. A feldolgozott élelmiszerekből történő DNS izolálás és GMO kimutatás viszont már számos nehézségbe ütközhet. Egyes élelmiszeripari termékeknél az élelmiszer-mátrixban található fehérjék, zsírok, poliszaharidok, polifenolok és egyéb másodlagos komponensek számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal.

Másrészt a különböző élelmiszer előállítási folyamatok során fellépő fizikai, kémiai hatások is degradálhatják a bennük található DNS-t. A fent említett okok miatt fontos a már meglévő módszerek feldolgozott élelmiszer-mátrixban történő folyamatos tesztelése, adaptálása és továbbfejlesztése mind a DNS izolálás, mind a GMO kimutatás területén.

A géntechnológiailag módosított organizmusokból álló, azt tartalmazó vagy azok felhasználásával készülő élelmiszerek esetében, a különböző környezetvédelmi és etikai aggályok mellett, számos élelmiszerbiztonsági probléma merülhet fel, mivel az elfogyasztott GMO-k vagy az ezt tartalmazó élelmiszerek állati és emberi szervezetre gyakorolt hatása nem egyértelműen tisztázott.

Egy GM növény engedélyezése során a piacra kerülés előtt számos kockázat-becslési vizsgálatot kell végrehajtani. A GM élelmiszerekre (takarmányokra) alkalmazható kockázat-becslési stratégia kidolgozásában a biotechnológiai ipar, a termesztők és a szabályozó hatóság megosztott felelősséggel vesznek részt. Számos nemzetközi szervezet is állást foglalt, köztük meghatározó szerep jutott a Codex Alimentarius rekombináns-DNS-t hordozó növényekből származó élelmiszerekkel kapcsolatos útmutatójának. Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal (European Food Safety Authority, EFSA) GM szervezetekkel foglalkozó szakértői paneljének módszertani útmutatója is a Codex elvekre épül. Napjainkban a GM növények engedélyezési eljárása során mérlegelni kell, hogy milyen céllal történik a módosítás és milyen új, előnyös tulajdonságokat hordoz majd a rekombináns DNS-t tartalmazó új terményvonal. A GM terményvonal új, integrált kockázat-becslésének megközelítésében szerepelni kell a szülői termény jellemzőinek (eredet, biztonságos felhasználási történet), a donor és a transzgén beillesztés módjának (donor és vektor leírása, beillesztett DNS jellemzése), a géntermékek jellemzésének (szerkezet, eredet jellemzése, hatásmód, toxicitás, allergenitás), az új GM termény vonal élelmiszer-biztonsági jellemzésének (összetétel vizsgálat, táplálkozási vizsgálat, biztonsági értékelés állatkísérletekkel), valamint a környezeti kockázat becslésének és a környezeti hatás folyamatos figyelemmel kísérésének és felügyeletének (GELENCSÉR and BÁNÁTI 2007).

Élelmiszerbiztonsági szempontból az egyik legnagyobb potenciális veszélyt a fogyasztók szempontjából a génmódosításhoz használt vírus promóterek használata jelenti. Egyes biotechnológusok kutatási eredményei alapján nem zárhatjuk ki annak lehetőségét sem, hogy a karfiol mozaikvírus promóter nyugvó vírusokat aktiválhat, új rekombináns vírusok kifejlődéséhez vezethet, vagy elképzelhető, hogy egyes gének fokozott működését eredményezheti. Ennek bizonyítása azonban még nem történt meg, további vizsgálatokat igényel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A GMO-król általában – GMO-k szabályozása

2006-ban világszerte 22 országban 102 millió hektáron termelt génmódosított növény. A GM fajták területi részesedése az USA-ban a legnagyobb (54,6 millió ha), Argentínában (18 millió ha), Kanadában (6,1 millió ha), Indiában (3,8 millió ha) és Kínában (3,5 millió ha). Becslések szerint 2015-re a genetikailag módosított növényekkel bevetett terület eléri a 200 millió hektárt. A legnagyobb mennyiségben szóját, kukoricát, gyapotot, papayát, repcét, paradicsomot termesztnek. A genetikailag módosított szervezetek 1996-ban kerültek először az európai élelmiszerpiacra, ahol az első GM-paradicsom sűrítmény az Egyesült Királyságban került forgalmazásra. A kukoricamolynak ellenálló transzgénikus Bt kukorica és a herbicid rezisztens glifozát-toleráns Roundup Ready szója (RR-szója) forgalmazását az USA-ban 1995-ben, az EU országokban 1996-ban engedélyezték.

Az EU már az 1990-es évek elejétől megkezdte a GMO-kra vonatkozó jogi szabályozás kidolgozását és specifikus jogszabályokat vezetett be a fogyasztók egészsége és a környezet védelme érdekében. Az első jogszabály 1990-ben született meg (90/220/EGK irányelv), mely a genetikailag módosított szervezetek szabad környezetbe történő kibocsátását szabályozta. A 258/97/EC rendelettel az új élelmiszerek és élelmiszer-összetevők piacra kerülését szabályozták. Kötelezővé tették a genetikailag módosított termékekből készített, illetve a genetikailag módosított összetevőt tartalmazó élelmiszerek esetében a módosítás tényének jelölését a termék címkéjén, amennyiben az adott összetevő 2%-nál nagyobb mennyiségben volt megtalálható az élelmiszerben. Mivel a RR szója és a Bt176 kukorica forgalmazását már a rendelet hatályba léptetése előtt engedélyezték, ezért ezen GMO-k esetén a jelölési kötelezettséget a EC/1139/98 számú rendelet fogalmazza meg. Két évvel később a 49/2000 EK rendelet 1%-os határértékben szabta meg a GMO-k kontaminációs szintjét. 2001/18/EK irányelv a géntechnológiával módosított szervezetek szándékos környezeti kibocsátásáról szól és hatályon kívül helyezte a 90/220 számú irányelvet. Az 1830/2003-as EK rendelettel az Európai Unió döntéshozói csökkentették a határértéket és a 0,9%-nál nagyobb részarányban genetikailag módosított alkotót tartalmazó termékek jelölését tették kötelezővé. A címkézést azokra az élelmiszerekre nem kell alkalmazni, amelyek az egyes összetevők vagy az egyetlen összetevőből álló élelmiszer legfeljebb 0,9 százalékos arányában olyan anyagot tartalmaznak, amely GMO-kat tartalmaz, azokból áll vagy állították elő, feltéve, hogy ez az előfordulás véletlen és technikailag elkerülhetetlen.

Ha például egy termék Roundup Ready szója tartalma 0,9%, az azt jelenti, hogy a termékben lévő összes szója GMO tartalma 0,9%, tehát a GMO tartalom nem a teljes termék mennyiségére, hanem az adott komponensre (jelen esetben a szójára) vonatkoztatják

A 1946/2003/EK rendelet a géntechnológiával módosított szervezetek országhatárokon történő átviteléről szól.

2004/787/EK ajánlása a GM szervezetek és a GM szervezetekből előállított anyagok vagy e termékekből történő mintavételre és kimutatásra ad technikai útmutatást. A 641/2004/EK rendelet pedig az új, GM élelmiszerek és takarmányok engedélyezése iránti kérelem, a létező termékek bejelentése és a kockázatértékelés során kedvező eredményt mutató, géntechnológiával módosított anyagok véletlen vagy technikailag elkerülhetetlen jelenléte tekintetében történő végrehajtására vonatkozó részletes szabályokról szól. Mivel Magyarország 2004. május 1. óta az Európai Unió tagjává vált, így a fent említett jogszabályok, rendeletek hazánkra is vonatkoznak.

Magyarországon a 148/2003 (IX. 22.) Kormány rendelete alapján a jelölési kötelezettség elmulasztása esetén a géntechnológiai bírság mértéke első esetben háromszázezer forinttól tízmillió forintig terjedhet.

A világ országaiban eltérőek a GMO jelölési kötelezettségek a termékek címkéjén kötelezően feltüntetendő határértékekre vonatkozóan. Míg az EU-ban, Svájcban és Oroszországban 0,9% feltüntetését teszi kötelezővé jogszabály, úgy Koreában ez 3%, Japánban 5%, Braziliában, Ausztráliában és Új-Zélandon 1%, Norvégiában pedig 2% (BROD et al. 2007, GRYSON et al. 2007a).

2.1.1. A géntechnológiailag módosított növényekről

A géntechnológiai módosítás során a növény örökítő anyagába, biotechnológiai úton olyan géneket vezetünk be, amelyek az adott növényt rezisztenssé teszik, rovarokkal, gombákkal, baktériumokkal, vírusokkal szemben, avagy gyomirtó szerekkel szemben válnak toleránssá olyan módon, ahogy az természetes körülmények között nem történt volna. A géntranszformáció során a célszervezet genomjába juttatják be az „idegen” génszakaszt (vektort), mely a kívánt tulajdonságot is hordozza. A genetikailag módosított növények esetében a beépített vektor több régióból áll.

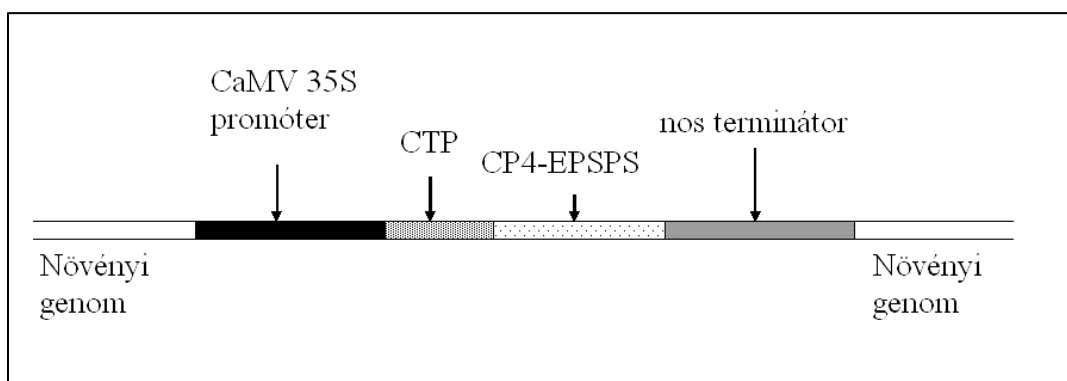
Az ún. promóter régió a gén működését határozza meg, melynek segítségével szabályozni lehet, hogy a GM növényben a transzgén a növény élete során mikor, mely szövetben és szervben íródjon át.

A gazdaságilag jelentős gén vagy gének kódolják az új tulajdonságot vagy tulajdonságokat. A marker génnel (pl.: antibiotikum rezisztencia gének) a sikeres transzformáció tényét sejt szinten bizonyítják, a riporter génnel pedig a transzgén expresszióját vizualizálják (GFP gén - green fluorescent protein). A vektor gyakran tartalmaz ún. célba juttató szekvenciákat, tranzit peptideket, melyek a transzgén célba jutását segítik a kloroplasztiszba, a vakuolumba, sejt közötti járatokba, ahol a beépült gazdaságilag jelentős gén által kódolt fehérje elvégzi tényleges feladatát. Számos esetben a gazdaságilag jelentős gén elé intron régiót is beépítenek, hogy fokozzák annak expressziós hatékonyságát. A vektor végén a terminátor régió található, mely az expressziós vektor által kódolt genetikai információ végét jelzi. Az expressziós vektor növényi sejtbe történő bejuttatására számos indirekt (*Agrobacterium* fajokkal) és direkt módszer (pl.: gēnpuska, ultrahangos transzformáció, elektroporáció) áll rendelkezésre. A genetikailag módosított növények előállítása során a következő lépés a transzgénikus sejtek szelekciója, amelynek során markergén (antibiotikum rezisztencia gén) segítségével választják ki a transzformáns sejteket. Ezt követi a transzgénikus sejtekből történő növényregenerálás, majd az átvitt gének integrációjának, működésének és öröklődésének bizonyítása (Southern-, Northern- és Western hibridizációval). Ezt követően hagyományos nemesítési módszereket használnak a különböző GM fajták előállítására (HESZKY and KISS 2005).

2.1.2. Glifozát toleráns GM növények előállítása

Az első generációs transzgénikus növények esetében különböző abiotikus (gyomirtó szer tolerancia) és biotikus (vírus, baktérium, gomba és rovar) rezisztencia kialakítása volt a cél. Ezek közül a takarmányozás és élelmezés szempontjából, világviszonylatban is elsődleges helyet foglalnak el a herbicid toleráns GM növények, mint a szója, a kukorica, a repce, és a gyapot. A totális gyomirtókkal szembeni tolerancia három különböző mechanizmussal érhető el: 1. a herbicid hatóanyaga által károsított fehérje túltermeltetése, 2. a károsított fehérje aminosav sorrendjének megváltoztatása (mutáns gén), 3. a herbicid hatóanyagának kémiai módosítása (detoxifikáló gén), amely meggátolja a hatóanyag fehérjéhez való kapcsolódását. Stabil toleranciát azonban csak az utóbbi kettővel lehet kialakítani. Mivel a dolgozat célja a Roundup Ready (RR) szója különböző élelmiszerekből történő kimutatása és élelmiszerbiztonsági vizsgálata, ezért a továbbiakban e GM növény előállítása kerül részletezésre.

A glifozát egy totális gyomirtó szer, mely állatra nem toxikus és a talajban gyorsan lebontják a baktériumok. A mutáns génre alapozott stratégia a herbicid által károsított enzim mutáns változatát eredményezi, oly módon, hogy a módosított enzim fehérjében bekövetkezett változás miatt a hatóanyag-fehérje kapcsolat létrejötte gátolt legyen. Ezzel a technológiával előállított, állati és emberi fogyasztásra is engedélyezett glifozát toleráns növény az RR szója. A glifozát hatóanyaga az aromás aminosavak bioszintézisét állítja le a kloroplasztiszban, azáltal, hogy gátolja az egyik kulcsenzimjének az EPSP-szintáz (5-enolpiruvil-sikimát-3-foszfát) működését, így a sejtben leáll az enzim által katalizált fehérje szintézise. Az EPSP a sejtmagban van kódolva, de a kloroplasztiszban működik. A Monsanto cég által kifejlesztett RR szója az 5-enolpyruvylshikimate-3-foszfát szintáz (EPSPS) gén módosított változatát tartalmazza, mely az *Agrobacterium* CP-4 törzsből származik. Ahhoz, hogy a bevitt gén expresszáldjon a szója növényben, a 1. ábrán látható génkonstrukciót kell a gazdanövénybe juttatni. A 35S promóter a karfiol mozaikvírusból származik, a *nos* terminátor pedig az *Agrobacterium tumefaciens* nopalin szintáz terminátora. A vektor ezen felül, tartalmaz egy petúniából származó kloroplaszt tranzit peptid gént (CTP), mely a transzgén fehérje célba juttatását segíti a működési helyére, a kloroplasztiszbba (VAN HOEF et al. 1998).



1. ábra Génkonstrukció a Roundup Ready szójában

2.2. GMO-k kimutatásának lehetőségei

2.2.1. Transzgénikus minták fehérje alapú kimutatása

A kimutatás a beépített transzgén által kódolt fehérje közvetlen kimutatásán alapszik immunológiai reakcióval (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok). A technika előnye, hogy meglehetősen gyors és különböző növényi és állati mintákból is lehetővé teszi a vizsgálatokat. Néhány kereskedelmi forgalomból származó kit kvantitatív eredményeket is szolgáltat. Hátránya, hogy a feldolgozás során degradálódott fehérje kimutatására már nem alkalmas, mivel a fehérje építője megváltozik és így nem ismeri fel az antitestet.

További hátránya, hogy minden különböző transzgénikus fehérje kimutatásához más és más teszt elvégzésére van szükség. A monitorozásra ún. lamináris áramlású teszt csíkok (strippek) is rendelkezésre állnak, melyek gyorsak, olcsóak és igen könnyű elvégezni velük a mérést. A módosult fehérjék kimutatása gélkromatográfiával, gélelektroforézissel és enzimaktivitás méréssel is lehetséges (SPIEGELHALTER et al. 2001).

2.2.2. DNS alapú detektálási módszerek

2.2.2.1. A polimeráz láncreakció (PCR)

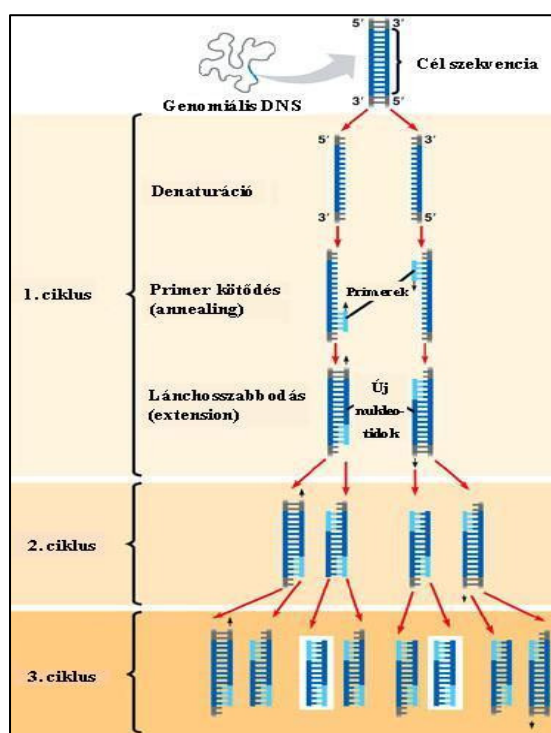
Az elmúlt években egyre szélesebb körben alkalmazzák a molekuláris biológiai módszereket az élelmiszerbiztonsági és -minőségi vizsgálatok során, de egyre nagyobb a jelentősége a diagnosztikában, kriminalisztikában és környezetvédelmi vizsgálatokban. Különösen elterjedtek a DNS alapú módszerek, melyek közül jelenleg a legfontosabb a nagy érzékenységgel és specificitással bíró PCR technika. A PCR módszert széles körben alkalmazzák hús- és növényeredet, élelmiszerhamisítások, allergének és GMO-k kimutatására, valamint mikroorganizmusok azonosítására.

A PCR technikával történő GMO kimutatás több lépcsőből álló folyamat. A minták előkészítése és homogenizálása után, az előkészített mintákból DNS-t kell izolálni (részletezve 2.3 fejezet), majd ha a DNS tisztasága és koncentrációja megfelelőnek bizonyult végrehajtható a DNS sokszorozása PCR technikával.

A polimeráz láncreakció specifikus nukleinsav szekvenciák *in vitro* sokszorozására alkalmas eljárás, amelynek segítségével kis mennyiségű DNS, akár 1 kópia is kimutatható. A PCR analízis során, az intakt állapotú DNS szálakat hőkezeléssel denaturálják, ekkor azok kettős spirálszerkezete felbomlik és egyszálúvá válik. A denaturálást 95°C körüli hőmérsékleten végzik. A kezdeti denaturálás után a cél DNS-t 20-40-szer ismétlődő, három lépésből (denaturálás, primer kapcsolódás, lánchosszabbítás) álló ciklusban sokszorozzák (2. ábra). A denaturálás során a magas hőmérséklet hatására (95°C) a DNS két szála elválik egymástól. Az ezt követő hűtés során oligonukleotid primerek kapcsolódnak (40-60°C) az egyszálú DNS szálakhoz. A ciklus utolsó lépésében dNTP molekulák felhasználásával 72°C-on történik (CANDRIAN et al., 1991). a DNS láncok meghosszabbítása a DNS polimeráz enzim segítségével. Mesterségesen módosított Fast Start vagy Hot Start Taq DNS-polimerázokat is alkalmaznak. Ezek az enzimek azért hasznosak, mert használatukkal rendkívüli mértékben lecsökkenthető az aspecifikus melléktermékek képződése.

Mivel ezek a melléktermékek leginkább a reakcióelegy összemérése, vagyis a PCR reakció elindítása előtt képződnek, ezeket az enzimeket specifikus monoklonális ellenanyagokkal deaktiválják. A PCR ciklusok megkezdésekor ezek az enzimek egy-egyszeri kb. tíz percig tartó 95°C-os hőkezeléssel aktiválhatóak, így elkerülhető, hogy már a PCR megkezdése előtt DNS szintézis történjen.

A ciklusok lezajlását követően a végső lánchozabbítás zárja a reakciót, amely során az összes DNS másolása befejeződik. Egy-egy ciklus során a DNS mennyisége elméletileg megkettőződik, így a 20-40 ciklus során képződött DNS mennyiség már jól detektálható



2. ábra A polimeráz láncreakció működési elve

(Forrás: fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm)

A PCR-termék kimutatása és további elemzése többféleképp történhet. Legegyszerűbb esetben az amplifikált DNS-t agaróz gélben futtatják és etidium-bromiddal megfestve UV fényben vizsgálják (AUSUBEL et. Al 1989.). A futtatás nagyobb érzékenységű agaróz (metafor) vagy poliakrilamid gélen is történhet és az etidium-bromid helyett SYBR Green I festék is alkalmazható a gél festésére. A SYBR Green I 50-100x nagyobb érzékenységgel bír mint az etidium-bromid (SINGER et al. 1994). A termék kimutatása immunológiai reakcióval is összeköthető (PCR-ELISA). A hagyományos gélelektroforézis helyett kapilláris elektroforézist alkalmazva az amplikonok mérete gyorsan és pontosan meghatározható (DOOLEY et al. 2005). A fluoreszcens festékekkel jelölt próbák pedig lehetővé teszik a PCR reakció követését valós időben (pl. TaqMan).

2.2.2.2. GMO kimutatási technikák csoportosítása az azonosítani kívánt célszekvencia szerint

A GMO kimutatás három fő lépése a megfelelő minőségű és mennyiségű DNS izolálása, a kívánt DNS-szakaszok specifikus primerekkel történő sokszorozása, valamint a termékek azonosítása. A módszer segítségével a beépített szabályzó elemek (promóter, terminátor) vagy a „idegen” transzgén DNS-ének kimutatása történhet. A specificitás növelhető, konstrukció-, ill. „esemény (event) specifikus PCR segítségével, mivel ebben az esetben a kimutatás olyan génszakaszok detektálásán alapszik, melyek a természetben „alapállapotban” nem fordulnak elő.

1. Screening – általános szűrés

A leggyakrabban a szűrést a promóter és/vagy a terminátor régió alapján végzik el (35S promóter és a *nos* terminátor). Ez a két elem igen fontos az adott gén kifejeződésében, másrészt jelen van a legtöbb forgalomban lévő GM-növényben.

A mérések során hamis pozitív eredményhez vezethet, ha a vizsgált minta *Cruciferaeae* családból származott, és azt a karfiol mozaikvírus megfertőzte (LIPP et al. 1999b). Több PCR rendszert dolgoztak ki karfiol mozaikvírus kimutatására, abból a célból, hogy kiszűrjék a fals pozitív mintákat a GMO-k mennyiségi meghatározása során (WOLF et al. 2000, CANCAR et al. 2005). A baktérium eredetű *nos* terminátor nem fordult elő nem GM növényben, azonban gyökerek vizsgálata esetén óvatosan kell végezni az extrakciót, mivel a talajszemcsék révén a gyökerekbe is átkerülhet a baktérium.

2. A gazdaságilag jelentős gén kimutatása

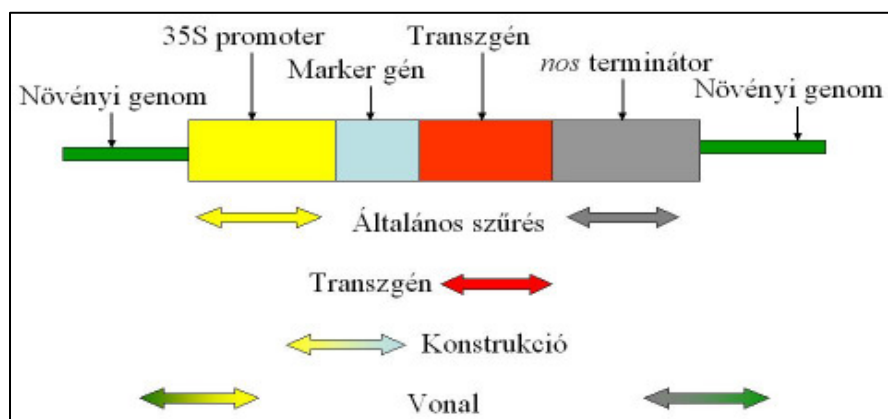
Specifikusabb a kimutatás abban az esetben, ha az adott tulajdonságot hordozó gént mutatják ki, mely leggyakrabban herbicid és/vagy rovarrezisztenciát kódol a növényben.

3. Konstrukció-specifikus PCR

A különböző GM fajták azonosítását, ún. konstrukció-specifikus PCR-reakció alapján végzik. A GM növényekbe juttatott transzformációs vektorban, más néven genetikai konstrukcióban kiválasztható egy olyan rövid szakasz, mely csak az adott GM fajtára jellemző, tehát sem a természetben, sem más GM növényekben nem fordulhat elő. Az azonosítás során, a rövid, sokszorozandó szakasz minden esetben átfed két szomszédos genetikai elemet.

4. „Esemény” (event) specifikus kimutatás

A legspecifikusabb kimutatási technikák alapja a promóter vagy terminátor régió és a hordozó növényi genom kapcsolódási pontjainak átfedése, mely lehetővé teszi az ún. „event”-ek, azaz az egyes GM növényfajták azonosítását. Az említett négyféle kimutatási lehetőséget a 3. ábra mutatja be.



3. ábra GM növények PCR alapú kimutatási lehetőségei az egyes vektor elemek, illetve genom-vektor átfedés alapján

A PCR reakció során kapott eredmények restriktions enzim hasítással vagy a hibridizációs technikán alapuló Southern Blot eljárással erősíthetők meg (MEYER 1999).

2.2.2.3. Kvalitatív GMO analitika

A DNS alapú technikák nagy előnye, hogy a DNS rendkívüli stabilitása miatt a feldolgozott termékekben, illetve összetevőkben előforduló GMO-k detektálására is alkalmas.

1. Egyszerű PCR

Az izolált DNS-ből PCR módszerrel történik a sokszorozás. A reakcióelegy vizsgálata a polimeráz láncreakció után választ ad arra, hogy az adott minta tartalmaz-e transzgénikus növényekre jellemző DNS-szakaszt. Ha a reakcióelegyben eredetileg nem szerepelt transzgénikus DNS, akkor, - a primer-illeszkedés hiányában - a DNS sokszorozódása is elmarad.

A legtöbb szakirodalom referencia anyagokból, szójalisztekből és feldolgozott termékekből történő GMO kimutatással foglalkozik, melyek legnagyobb részét kekszek, tészták, fizikai és kémiai kezeléseknél kitett szójalisztek képezik (OVESNÁ et al. 2002).

Számos körvizsgálatot is elvégeztek annak érdekében, hogy vizsgálják a jogszabály által előírt módszer alkalmazhatóságát. LIPP et al. (1999a) által koordinált körvizsgálat során, 27 laboratórium mutatta ki a különböző RR szójabab tartalmú (0% 0,1% 0,5% és 2%) mintákból a 35S promotert és *nos* terminátort. RR szójabab minták körvizsgálata során kiderült, hogy az átlagos valószínűsége a fals pozitív és negatív eredményeknek csak körülbelül 1-2%.

A fals negatív eredményeket főleg a 0,1%-os RR szóját tartalmazó mintákban kaptak. A vizsgálatok során a specificitás 97,9%-os volt, a szenzitivitás pedig 98,4% (LIPP et al. 1999b).

JANKIEWICZ et al. (1999) az elméleti és gyakorlati kimutatási határ meghatározásán dolgoztak egyszerű PCR technikával, konstrukció-specifikus primerpárok használatával. GMO-t tartalmazó és GMO-t nem tartalmazó DNS oldatokból készítettek modell mintákat. Az elméleti kimutatási határ 0,005% GMO (30 kópia), de a gyakorlati a kimutatási határ értékei 0,01% GMO (60 kópia) volt. A standard referencia anyagból is sikerült a 0,1%-os GMO tartalmat kimutatni.

LIPP et al. (2001) 23 laboratórium munkáját koordinálva körvizsgálatot hajtott végre feldolgozott modell élelmiszerekkel. A modell minták (bébi tápszerek, kekszek, különböző módon kezelt szójaliszt minták) 0%, 2% és 100% (egyes esetekben 10% a 100% helyett) RR szóját tartalmaztak, melyek előállításánál extrém nagy fizikai stresszt alkalmaztak (100°C 45 perc, vagy 180°C 10 perc). Vizsgálataik alapján 97%-ban kaptak megfelelő eredményeket a GMO-t nem tartalmazó minták meghatározásánál (3% volt a fals pozitív eredmény) és 98%-ban sikerült a GMO tartalom kimutatása (2% volt a fals negatív eredmény). A kimutatási határ - a modell minták összetételétől függően - 2% volt.

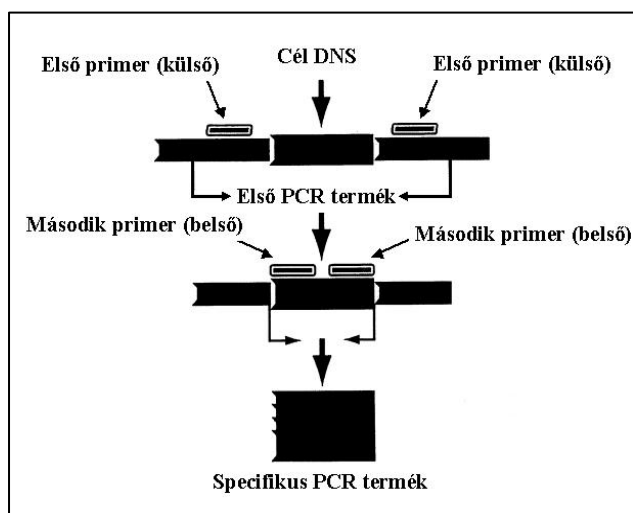
BONFINI et al. (2001) szintén körvizsgálatban vizsgálta a 35S promotert (195 bp) és a *nos* terminátort (180 bp) jelenlétét kvalitatív PCR segítségével. A modell mintákat GM szójaliszttel szennyezték (0%, 2% és 100%), majd hőkezelték azokat. Az érzékenység 89%-os volt, a kimutatási határ pedig 2%.

KAKIHARA et al. (2007) egyszerű PCR módszerrel vizsgálták GM szójabab kimutatását hőkezelt GM szójababból és az úgynevezett „nattó” fantázianevű (speciális szójaból készült étel) mintákból. A mintákat laboratóriumi körülmények között állították elő. 5% RR szóját tartalmazó szójaliszt mintát vízben szuszpendálták és magasnyomású gőzsterilizáló segítségével hőkezelték (121°C, 20 perc). A „nattó” minták 95%-os GM szójaból készültek. Az alkalmazott primerek a CTP és CP4-EPSPS kapcsolódási régiójánál, a CP4-EPSPS és a *nos* terminátor kapcsolódási régiójánál sokszoroztak. A mintákból a DNS-t CTAB módszerrel és lúgos kioldással izolálták. A CTP - CP4-EPSPS kapcsolódási régiójánál sokszorozó primer esetében nem kaptak jelet (100-150 bp) sem a hőkezelt szója, sem a „nattó” esetében.

Ezzel szemben a CP4-EPSPS - nos régió amplifikálása során mindkét típusú mintánál sikerült a GMO jelenlétét bizonyítani. Az eredmények azt mutatják, hogy egyes mintáknál fontos átgondolni, hogy mely célszekvenciát szeretnénk kimutatni, mivel az eredményekből az következik, hogy a DNS szekvenciák a CTP és a CP4-EPSPS régiók között hőkezelés hatására könnyebben fragmentálódnak (100 bp alá).

2. Nested (fészek) PCR

A reakció érzékenysége és specifikussága lényegesen megnövelhető az ún. fészek PCR-el, mely során két specifikus primerpár alkalmazásával 2 egymást követő PCR reakció segítségével dúsítanak fel egy DNS szakaszt. A sokszorozni kívánt szakasz ismeretében az első ún. „külső” primert kevésbé szoros amplifikációs körülmények között alkalmazzák, így a kisebb mennyiségben lévő cél DNS is biztosan amplifikálódik, vagyis ebben az esetben egy hosszabb, általában 300-400 bp hosszú szakaszt sokszoroznak. A második ún. „belső” specifikus primerpárt szoros amplifikációs körülmények között alkalmazzák, amikor az első PCR-termék a cél DNS. Ebben az esetben a hosszú szakaszon belüli régió 100-200 bp-os rövidebb szakaszát amplifikálják (4. ábra) (Meyer et al. 1996).



4. ábra A fészek PCR működési vázlatja

Konstrukció-specifikus nested PCR rendszert dolgoztak ki GMO kimutatásra VAN HOEF et al. (1998). Vizsgálataik során a 35S promóter és a petúnia-CTP régióját átfedő részre terveztek külső és belső primereket, melyeket különböző szójabab, szójaliszt és kereskedelmi forgalomból származó mintáknál teszteltek (tofu, nápolyi, kenyér, italporok). A modell szójabab mintáknál 0,02% volt a kimutatási határ (5000 nem GM szójababból 1 RR szójabab kimutatása).

VAN DUIJN et al. (1999) GMO mentes szójaból és RR szójaból DNS-t izoláltak, majd modell DNS mintákat állítottak elő, mely minták 0% 0,001%, 0,01% és 0,1%-ban tartalmaztak RR szója DNS-t. Vizsgálataik során szintén konstrukció-specifikus nested PCR rendszert alkalmazva 0,01%-os kimutatási határt értek el. BROD et al. (2007) kutatásaik során hasonló eredményeket kaptak.

ZHANG et al. (2007) triplex nested PCR rendszert dolgoztak ki erősen hőkezelt élelmiszerekből történő GMO kimutatásra. A triplex PCR rendszer ebben az esetben szimultán mutatta ki a lektin gént és 2 GM konstrukciót (35S-CTP, EPSPS-*nos*). A vizsgált minták szójalecitin, szója izolátum, csokoládés ital, nyers szójaolaj, finomított szójaolaj és salátákhoz való szójaolajok voltak. A finomított szójaolajból és a saláta olajból nem sikerült DNS-t izolálni. A többi mintában sikerült a nested-PCR rendszerrel a GMO jelenlétét kimutatni (kivéve a nyers szójaolaj, ahol csak a lektin gént detektálták). A kutatások során laboratóriumban előállított különböző RR szója tartalmú szójaliszt minták segítségével vizsgálták a módszer érzékenységét is, mely jelen esetben 0,0005%-nak adódott. Kutatásaik szerint a nested-PCR jelen esetben 1000-szer érzékenyebb, mint a hagyományos egyszerű PCR.

3. Duplex- és multiplex-PCR

A multiplex-PCR lényege hasonló az egyszerű PCR elvéhez, de lehetővé teszi, egyidejűleg egy reakciócsőben, több primerpár felhasználása mellett, több génszekvencia kimutatását. Ebben az esetben polimorf mintázatot kapunk.

SU et al. (2003) multiplex PCR rendszert dolgoztak ki RR szója és Bt kukorica GMO tartalmának kimutatására. Kutatásaik során az RR szójával végzett vizsgálatok esetében 4 primerpárt alkalmaztak egyszerre (CaMV 35S, *nos* terminátor, CP4-EPSPS és 18s rRNS). A detektálás hatékonyságának, pontosságának javítása és a fals pozitív és negatív eredmények csökkentése érdekében a módszert membrán hibridizációs technikával kombinálták. Kutatásaik során többek között 8 szójabab mintát vizsgáltak GMO tartalomra a fent említett hibridizációs technikával egyszerű és multiplex PCR rendszerrel kombinálva (referenciaképpen egyszerű PCR-t és agaróz géles detektálást is alkalmaztak). Mindkét esetben ugyanazokat a szekvenciákat sikerült kimutatni a vizsgált mintákból.

GERMINI et al. (2004) multiplex PCR rendszert fejlesztettek ki transzgén szója és kukorica szimultán kimutatására. A PCR reakcióhoz 7 primerpárt alkalmaztak a MON 810, Bt11, Bt176 GA21 kukorica, RR szója és két endogén szakasz (zein és lektin) egy időben történő azonosítására. A kísérleteket különböző GMO tartalmú referencia anyagokkal végezték.

A módszert körvizsgálatokban validálták, mely során igen jó analitikai paramétereket kaptak (kimutatási határérték (LOD) = 0,25%, ismételhetőség (r) = 1, reprodukálhatóság (R) = 0,9). Méréseik során laboratóriumban előállított modell kekszmintákat (15% RR szója és 15% MON 810 kukorica), egyes takarmány előállítási fázisokból vett mintákat és kereskedelemből származó élelmiszermintákat is vizsgáltak (8 db), melyek helyességét real-time PCR módszerrel ellenőrizték. A kifejlesztett módszerről elmondható, hogy igen specifikus és szenzitív, vagyis csak néhány esetben kaptak fals pozitív és fals negatív eredményeket.

FORTE et al. (2005) multiplex PCR rendszert dolgoztak ki GM kukorica és szója monitorozására. A reakció során szója (lektin) és kukorica (zein) növény specifikus primereket alkalmaztak a növényi DNS kimutatására, valamint 35S promóter és *nos* terminátor sokszorozását végezték a GMO jelenlétének igazolására. Szójaminták esetében a vizsgált minták 0%, 0,1%, 0,5%, 1% és 2%-ban tartalmaztak RR szójababot. A multiplex PCR eredményei alapján megállapították, hogy a lektin gén, a *nos* terminátor és a 35S promóter szimultán kimutatásának határa 0,5%. A módszer igen gyors, jól reprodukálható és költségkímélő, így igen széles körben alkalmazható GMO monitorozásra.

2.2.2.4. Félkvantitatív GMO analízis

1. Kompetitív PCR (QC-PCR)

A módszer egy ún. belső standardot igényel - mely a sokszorozandó DNS-től néhány bázispárral különbözik, annak inszerciójával, vagy deléciójával hozták létre - az ismeretlen mennyiségű cél-DNS tartalom meghatározásához. A módszer elve a belső standard és a cél-DNS együttes amplifikálása. A polimeráz láncreakcióban két eltérő méretű PCR jel képződik, az egyik a standard DNS szakaszból, a másik a minta DNS templátjából. Azon a ponton, ahol a mintában található komponens mennyisége közel azonos, a standard és a mintából kapott jel intenzitása megegyezik. A gél elemzése denzitometriásan történik, a standard és a cél-DNS arányának becslésére pedig regresszióelemzést használnak. Az ekvivalenciapontban a belső standard és a cél-DNS induló koncentrációja egyenlő, vagyis a regressziós egyenes meredeksége 1, a regressziós együttható >0,99. A QC-PCR módszerben a standard és a cél-DNS közötti verseny következtében csökken az érzékenység, ennek ellenére lehetővé teszi 0,1% GMO eredetű DNS kimutatását (STUDER et al. 1998, HÜBNER et al. 1999).

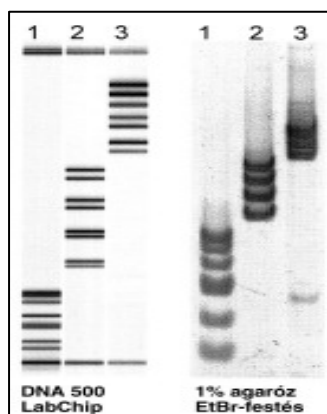
HARDEGGER et al. (1999) a GMO tartalom mennyiségi meghatározását tűzték ki célul a 35S promóterre és *nos* terminátorra tervezett primerek és a belső standard (versengő) segítségével, kvantitatív kompetitív PCR rendszerrel.

A módszer mindkét esetben alkalmasnak bizonyult a mennyiségi meghatározásra 0,1%-os detektálási határral. Vizsgálataim során két ismeretlen élelmiszermintát vizsgáltam QC-PCR rendszerrel, melyek közül az egyik GMO tartalma 0,5-1%, a másiké >2%.

2. Lab-on-a-Chip technika vagy kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis az utóbbi évtizedben terjedt el és igen hatékony, nagyérzékenységű és kiváló felbontású DNS elválasztási módszernek bizonyult. Ennek a módszernek egy széles körben alkalmazott eszköze a „Lab-on-a-chip” Bioanalyzer készülék (Agilent Technologies, Inc., USA). Az általa elvégezhető művelet az agaróz gélelektroforézissel analóg, de annál 2 nagyságrenddel nagyobb érzékenységű. Ezzel a technikával nemcsak a nukleinsavak, hanem fehérjék és sejtek azonos műszeren történő vizsgálata is lehetséges (DOOLEY et al. 2005).

A módszer alkalmas PCR-termékek mennyiségi meghatározására is és egyes vagy multiplex RT-PCR-termékek nagy pontossággal történő mérésére. A jobb érzékenység, széles lineáris dinamikus tartomány és a sávok élessége a kisebb mennyiségben előforduló – agaróz gélen nem látható – termékek kimutatását is lehetővé teszik (5. ábra).

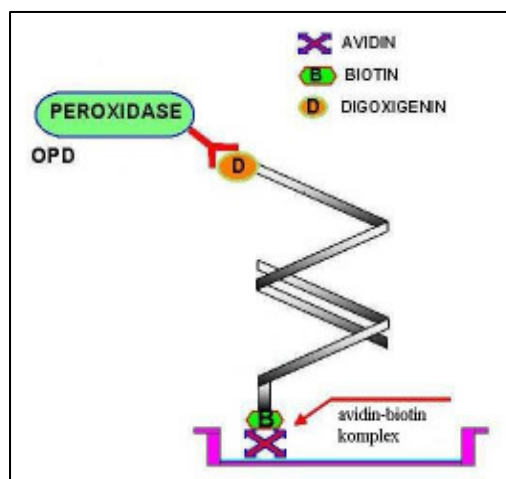


5. ábra PCR-fragmentumok elválasztásának összehasonlítása agaróz gélen és mikropilláris rendszeren

BIRCH et al. (2001) LabChip technológiát használták GMO mennyiségi meghatározására. A DNS izolálás után, a keresett szekvenciákat lektin és 35S promóter specifikus primerekkel PCR készülékben sokszorozták, majd a PCR-termékeket vizsgálták kapilláris és hagyományos gélelektroforézis alkalmazásával. Vizsgálataik során standard referencia anyagokhoz hasonlították a mintákat. Az agaróz gélen megfuttatott PCR-termékeknek mérték az optikai denzitását, majd az eredményeket gél dokumentációs rendszerrel értékelték ki. A szerzők mindkét mérést alkalmasnak találták GMO mennyiségi kimutatására, de a LabChip technológia valamivel pontosabb értékeket adott.

3. Immunreakción alapuló detektálás

A ún. PCR-ELISA technika (6. ábra) is alkalmazható módszer a PCR-termékek, így a GMO mennyiségi meghatározására.



6. ábra A PCR-ELISA működésének sematikus ábrája

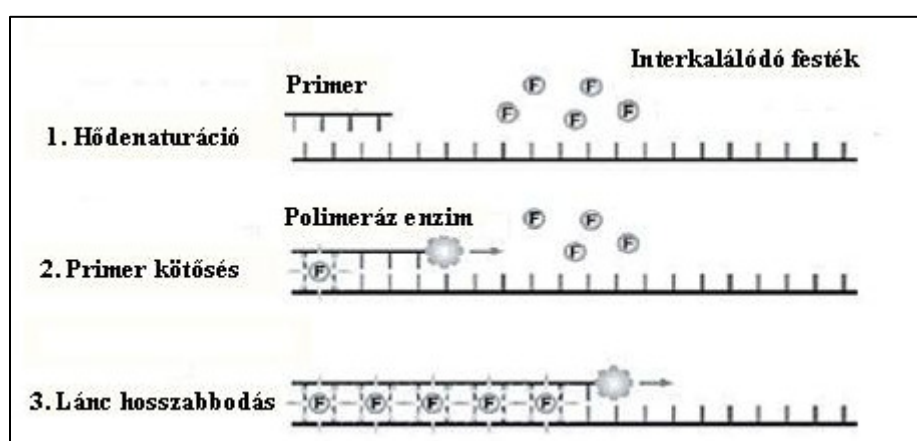
LIU et al. (2004) folyadék fázisú hibridizáción alapuló PCR-ELISA technikát teszteltek GMO kimutatásra, ismert koncentrációjú modell és kereskedelemről származó szójabab mintákból. A kimutatási határ 0,3% volt. A biotinnal jelölt PCR-termékeket hibridizálták digoxigeninnel jelölt próbával, majd a hibridizált termékeket streptavidinnel fedett csövekben rögzítették. Ezek után, a specifikusan kötött biotin és digoxigeninnel jelölt DNS fragmentumokat ELISA technika segítségével (jelölt, anti-digoxigenin ellenanyaggal) mennyiségileg meghatározták. A vizsgálatok alapján a módszer gyors, megbízható, igen érzékeny a GMO mennyiségi meghatározására és nagy mintaszám esetén teljesen automatizálható a rutinmérésekhez. A kereskedelmi minták vizsgálata esetén az eredményeket agaróz gélen is kiértékelték, ahol ugyanazokat a mintákat találták pozitívnak (a vizsgált 7 mintából 4 pozitív), mint a PCR-ELISA technikánál.

2.2.2.5. Kvantitatív GMO analitika

1. Real-time PCR

A GMO-tartalom mennyiségi meghatározása is a PCR módszeren alapul, számottevő különbség azonban, hogy a hőmérséklet-ciklusok során amplifikálódó kópiák mennyiségének növekedését a PCR-folyamat során valós időben, műszeresen lehet követni egy specifikus fluoreszcens próba segítségével. Az analitikai jelet pedig nem a folyamat végpontján, hanem annak lineáris szakasza kezdetén nyerjük. Rendkívül szoros az összefüggés a kiindulási DNS-koncentráció (vagy kópia szám) és a sokszorozódás időbeni lefutása között, így ismert koncentrációjú standardok párhuzamos vizsgálata lehetőséget ad a mintáinkban jelenlévő DNS-szakaszok koncentrációjának (vagy kópia számának) meghatározására. A jelgenerálás többféle technikával is megvalósítható, egyrészt az amplifikációs ciklusok lefolyását interkalálódó festék segítségével (SYBR Green I) lehet láthatóvá tenni, másrészt a Förster-féle rezonancia-energia-transzformáción (FRET) alapuló festés használható különböző próbákkal kombinálva (TaqMan, Molecular Beacon, Scorpions). A Molecular Beacon és a Scorpions próbák, nem lineáris próbák, így még nagyobb a specificitásuk (KOTA 1999).

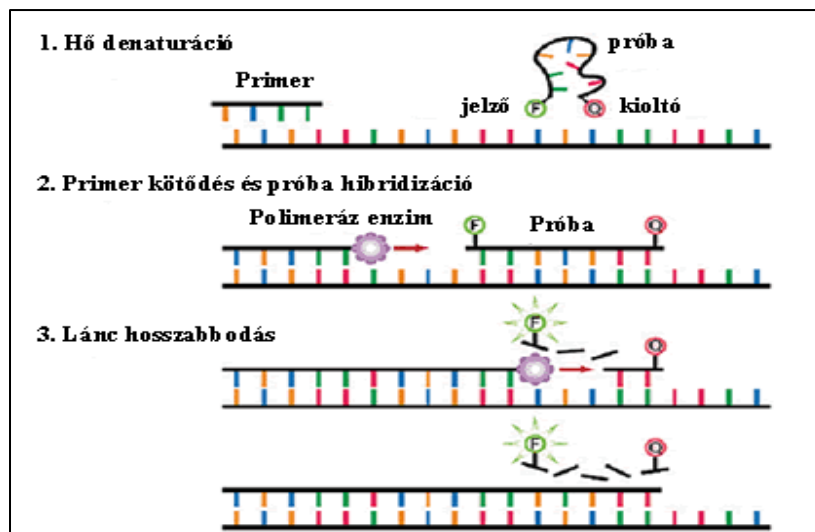
A SYBR Green I festék az etidium bromidhoz hasonlóan interkalálódó molekula, amely a dupla szálú (ds) DNS-hez kötődik az amplifikáló elegyben. Bekötődve, adott monokróm fényrel megvilágítva 530 nm-s hullámhosszú fényt emittál. Az ebből keletkező mérhető fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán szaporodó dsDNS mennyiségével arányosan növekszik (7. ábra).



(Forrás: www.takarabiousa.com/html/PCR_RTPCR_INTRO.html)

7. ábra A SYBR Green I festésre alapozott detektálás működési elve real-time PCR analízis során

A TaqMan próba (8. ábra) – más néven hidrolízis próba – egy rövid, ismert szekvenciájú a sokszorozni kívánt DNS szakaszhoz illeszkedő oligonukleotid, amely külön-külön egy ún. „reporter” és egy „quencher” fluoreszcenciásan gerjeszthető festékmolekulákkal van jelölve az 5’ és a 3’ végein. A festékek közül az egyik gerjesztési frekvenciája jóval kisebb (quencher), mint a másiké (riporter).



F: reporter (jelző); Q: quencher (kioltó)

(Forrás: www.takarabiousa.com/html/PCR_RTPCR_INTRO.html)

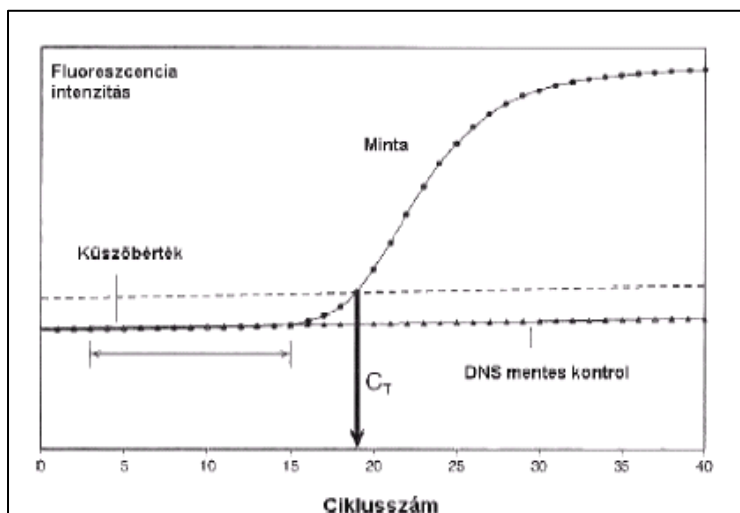
8. ábra Real-time PCR rendszerben jelgenerálásra alkalmazott TaqMan próba működési elve

A Förster-féle energia-átadási törvény szerint a besugárzó fotonokból nyert többlet-energiát az R festék átadja a Q-nak, így csak Q fog gerjesztődni, ugyanakkor R nem ad fluoreszcenciás jelet. Lényeges, hogy a FRET csak akkor valósul meg, ha Q és R festékek távolsága az ún. Förster-féle távolságot (10 Angström=100 nm) nem haladja meg (HOLLAND et al. 1991).

A PCR ciklusok során, amikor a Taq-DNS-polimeráz enzim építeni kezdi a szimpla DNS második szálát, a szintézis előrehaladtával nekiütközik a szimpla DNS-szára hibridizált, festékekkel jelzett „próba” oligo-nukleotidnak és endonukleáz aktivitásának is köszönhetően, az oligonukleotidot eltávolítja a szimpla szálról. Ekkor az egymástól távolodó festékek között már nem érvényesül a Förster-effektus és mindketten - vagy csak az R - más-más hullámhosszon fluoreszkálni kezdenek, amit a mennyiségi meghatározáshoz használt kvantitatív PCR-készülék monokromátora szétválasztva, külön érzékelni képes. Az emittált fluoreszcencia megfelelő hullámhosszon mérhető és arányos a reakcióelegyben lévő specifikus target szekvencia aktuális mennyiségével.

Az R-festék fluoreszcenciás aktivitásának küszöbértéke attól függ, hogy mekkora volt a vizsgálati mintából készült reakcióelegy kezdeti transzgen-koncentrációja, vagyis minél több templát DNS van jelen, annál kevesebb ciklus szükséges a detektálási limitet jelentő ciklusszám eléréséhez (Ct: Threshold Cycle).

A C_t fordítottan arányos a mintában lévő DNS kópiaszámának logaritmusával. A mennyiségi meghatározás lényege, hogy a PCR-ciklusok száma és az amplifikáció során keletkező DNS-szekvenciák kópiaszáma között lineáris összefüggés van. A real-time PCR kvantitatív analízisben történő használata során leggyakrabban relatív mennyiségeket származtatnak, melyet az ismert standardból kapott vonatkoztatási és keresett gén küszöb ciklus értékének (C_t) különbsége alapján az ismeretlen minta C_t érték különbségéből számítanak. Az 9. ábrán egy példa látható a mért fluoreszcens jel időbeni változására a ciklusszám függvényében.



C_t : küszöb ciklus szám

(Forrás: Applied Biosystem)

9. ábra A real-time polimeráz láncreakció során kapott amplifikációs görbe

VAÏTILINGOM et al. (1999) elsők között folytattak kvantitatív GMO kimutatást „Maximizer” transzgénikus kukoricából és „Roundup Ready” szójaból készült referencia anyagokkal. Eredményeikből tisztán kitűnik, hogy méréseik reprodukálhatóak és jól demonstrálják a GMO tartalmat széles határok között (0,01%-100%). A real-time PCR 10-szer érzékenyebbnek bizonyult összehasonlítva a QC-PCR-el. A kifejlesztett módszerekkel kereskedelmi forgalomból származó (pl.: müzli, szója protein, kukoricakeményítő) élelmiszermintákat is vizsgáltak.

TERRY and HARRIS (2001) Roundup Ready szója esemény-specifikus (event-specifikus) relatív kvantifikálását tűzték ki célul TaqMan és Scorpions próba alkalmazásával. Kutatásaik során kiderült, hogy a TaqMan próbát alkalmazó real-time PCR érzékenyebbnek bizonyult és nagyobb pontossággal adta meg a GMO mennyiséget a vizsgált mintákban. Bár fent említett különbségek adódhattak abból is, hogy a TaqMan próbás méréseket ABI PRISM 7700-es géppel, míg a Scorpions próbát alkalmazó méréseket Roche Diagnostic LightCycler berendezéssel végezték.

ALARY et al. (2002) GMO tartalom meghatározására alkalmas szimplex és duplex real-time rendszert hasonlítottak össze. Méréseik során Bt-kukoricát és RR-szóját kvantifikáltak mindkét rendszerrel. A vizsgált minták ismert GMO tartalmú liszt minták voltak (0-5% közötti GMO tartalom). RR szója esetében lektin génre és CaMV 35S promóterre tervezett primereket használtak a mennyiségi analízis során. A szimplex és duplex PCR során kapott kvantitatív eredmények eltérőek voltak. A 0%, 0,1% és 0,5%-os GM tartalmú minták esetében a szimplex PCR, míg az 1%, 2% és 5%-os minták esetében a duplex PCR adott pontosabb eredményt. Az eltérések, azon kívül, hogy a szimplex és duplex PCR reakciók nem feltétlenül működnek egyforma hatékonysággal, származhattak a DNS izoláló módszerek eltéréseiből.

HERNÁNDEZ et al. (2003) olvadási görbe meghatározásán alapuló SYBR Green I real-time duplex-PCR rendszert dolgoztak ki RR szója (CP4-EPSPS) és szója endogén szakasz (lektin), Maximizer 176 és GA 21, valamint triplex-PCR rendszert Maximizer 176, Bt11 és MON 810 kimutatására. A vizsgált minták standard referenciaanyagok voltak. A mérések során a primerek olvadási hőmérsékletének (T_m) optimalizálása volt az elsődleges feladat. Optimalizálás után a módszer érzékenysége 0,1%-nak bizonyult RR szója esetében. A Maximizer 176 és a GA 21 duplex PCR esetében a 4 párhuzamos mérésből kettőnél nem sikerült a 0,1%-ot detektálni, így az érzékenység itt 1%-nak mondható.

YOSHIMURA et al. (2005a) GM kukorica (MON 810) és szója (RR szója) mennyiségi meghatározásának alkalmazhatóságát vizsgálták hőkezelt modell mintákon. A darált magmintákat szuszpendálták és autoklávban 110°C-on különböző ideig hőkezelték. A kísérletek során megállapították, hogy mind a rekombináns és mind a faj specifikus DNS szekvenciák kópia száma csökkent a kezelési idő növelésével. Továbbá kimutatták, hogy a feldolgozott élelmiszerek esetében használt primerek kiválasztásánál igen fontos, hogy azok minél rövidebb szakaszt amplifikáljanak és a sokszorozott DNS szakaszok bp mérete közel azonos legyen. A kiválasztott primerekkel különböző nyers és feldolgozott élelmiszereket (kukoricakeményítő, kukoricaliszt, puffasztott kukorica, burgonyaszírom, tofu, szójatej, főtt szójabab) körvizsgálatban is vizsgáltak, melyek ismert százalékban tartalmaztak GM szóját és GM kukoricát. Az eredmények alapján néhány minta esetében találtak szignifikáns különbségeket a nyers és a hozzá tartozó hőkezelt termékek között (YOSHIMURA et al. 2005b).

CORBISIER et al. (2005) 1% RR szójabab tartalmú, különböző keverési technikákkal előállított mintákat (propeller, Turax, keverés 4-45°C), valamint azok erősen hőkezelt (250°C, 30 perc) változatát vizsgálták.

Munkájuk célja volt, hogy meghatározzák a különböző kezelési formák utáni GMO tartalmat TaqMan real-time PCR-el. A mintákból a DNS-t DNeasy Plant Mini és Maxi kit szilika gyanta alapú módszerrel izolálták. Eredményeikből kiderül, hogy a vizsgált minták GMO tartalma egy mintát kivéve (45°C turaxolt) 0,97-1,38% között volt. A mintákat két laboratórium is analizálta, mely során különböző DNS izolálási módszereket alkalmaztak. A vizsgálatokból kiderült, hogy a szilika gyanta alapú módszerrel izolált minta GMO tartalma szignifikánsan többnek adódott, mint a többi DNS izolálási módszerrel kapott értékek.

ANDERSEN et al. (2006) 4 féle real-time PCR rendszert (molecular beacon, SYBR Green, TaqMan, „Minor Groove Binder” MGB) hasonlítottak össze GM szója mennyiségi meghatározásának vizsgálatára céljából. A kutatások során megállapították, hogy egyik rendszer sem bizonyult szignifikánsan jobbnak a másiknál, de a molecular beacon próba mutatta a legkisebb szenzitivitást és ez a rendszer volt a legérzékenyebb a PCR paramétereinek változására.

ENGEL et al. (2006) kutatásaikkal bizonyították, hogy a különböző szemcseméretű összetevőkből álló élelmiszerek kvantitatív GMO analízise során eltérő, hibás eredményeket kaphatunk. Kísérleteik során 1% GM kukoricát kvantifikáltak, mely során különböző méretű kukoricaőrleményeket keverték össze a következő összetételben: 1% Bt kukorica tartalmú kukorica dara, 1% Bt kukorica tartalmú kukoricaliszt, 1% Bt kukoricaliszt + 99% kukoricadara, 1% Bt kukoricadara + 99% kukoricaliszt. A hasonló méretű kukoricaőrlemények esetében a 0,9% és 1%-os GMO tartalmat mértek. Ez az érték 1% Bt kukoricaliszt + 99% kukoricadara esetében 2,4%-nak, 1% Bt kukoricadara + 99% kukoricaliszt esetében pedig 0,2%-nak adódott. A DNS izolálás Wizard módszerrel történt. A CTAB módszerrel izolált DNS oldatok esetében még nagyobb volt az eltérés az különböző méretű összetevőkből álló modell minták GMO tartalmának mérésekor.

Kutatásai során azt is bizonyították, hogy hőkezelt élelmiszerek esetében annál pontosabb eredményt kapunk a kvantifikálás során, minél közelebb esik a transzgen specifikus és a referencia gén specifikus primerek által sokszorozott DNS fragmentumok mérete. Fontos, hogy a feldolgozott élelmiszerek esetében minél kisebb legyen a primerek által sokszorozott DNS szakasz, a feldolgozás által előidézett DNS töredezés miatt. A DNS degradáció hatással lehet a kimutatási és kvantifikálási határra is.

CHEN et al. (2007) 2,5% RR szóját tartalmazó, laboratóriumi körülmények között előállított szójatej mintákat vizsgáltak. A kutatásaik fő célja, vizsgálni, hogy az egyes technológiai lépések milyen hatással vannak a GMO mennyiségi meghatározására (turmixolás, homogenizálás, sterilizálás). Az egyes kritikus lépések során mintát vettek és mérték a GMO tartalmat TaqMan real-time PCR módszerrel.

A vizsgálatok során arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgált mintákban az endogén szakaszok relatív stabilabbak mint az exogén szakaszok, így ezzel magyarázható, hogy a szójatej előállítás utolsó lépéséből származó sterilizált mintákban, már csak 0,5% körüli RR szója tartalmat mutattak ki.

2.2.2.6. Makro-, mikro-array és egyéb alternatív módszerek a GMO detektálásra

A jövőben a GM növények fajtái és száma egyre inkább növekedni fog a piacon, amelyek előállításához különböző vektor konstrukciókat fognak alkalmazni, ezért szükséges az ún. makro- és mikro-array technikák fejlesztésére és alkalmazására. A mikro-array módszer, egy körülbelül 1cm x 1cm felülettel rendelkező többféle anyagból álló hordozó lehet, amelyre különböző módon jelölt (pl. fluorescens festékkel, biotinnal) PCR-termékeket hibridizálnak. A detektálást sok esetben kolorimetriás reakció teszi lehetővé. GMO tesztek százait tudják így egyszerre, költség-hatékony módon elvégezni (SPIEGELHALTER et al. 2001).

CHEN et al. (2004) cDNS mikro-array rendszert dolgoztak nyers (pl. szójabab) és feldolgozott (pl. tofu) élelmiszermintákból történő GMO-k kimutatására. A kutatások során a chip technológiával az általában használatos genetikai elemek, (35S promóter, *nos* terminátor, vagy 35S termiátor), marker gének (*nptII*, *hph*, *pat*), riporter gének (*gus*, *luc*, *gfp*), gazdaságilag jelentős gének (CryIA(b), *pat*, CP4-EPSPS) és növényi endogén szakaszok (invertáz, legumin, aktin és β -tubulin) kimutatását tűzték ki célul. GM szójabab és a belőlük készült különböző feldolgozottsági fokú tofu esetében a módszer jól reprodukálható és a pontossága 100%. A módszert később továbbfejlesztették GM burgonyából, rizsből és paradicsomból történő GMO detektálásra is. Az endogén szakaszokon kívül a módszerrel ki tudták mutatni a CaMV 35S promótert, a 35S terminátort, a *nos* terminátort és az *npt II*, *pat*, CP4-EPSPS *cry1A(b)* géneket is. A módszer gyors és pontos (100%), a kimutatási határ pedig 0,01-0,002% nyers minták esetében (CHEN et al. 2006).

PEANO et al. (2005a) multiplex PCR rendszert alkalmazott micro-array technológiával kombinálva. Kutatásaik során GM szóját (RR szója) és GM kukoricát (MON 810, Bt 176, Bt11, GA21) sikerült azonosítani. A kimutatási határ 0,4%-nak adódott. XU et al. (2006) szintén multiplex PCR rendszert kombinálták micro-array technológiával, növelve ezzel a teljesítményt, a megbízhatóságot és csökkentve a hamis negatív és pozitív eredmények előfordulását. A módszer segítségével bizonyítani lehetett a GM szója, GM kukorica, GM gyapot és GM repce jelenlétét, mivel a 20 genetikai elem szimultán kimutatására volt alkalmas. A rendszer a karfiol mozaikvírus jelenlétéből származó hamis pozitív eredményeket is kiszűrte.

A kimutatási határ 0,5% volt RR szója esetében és 1% GM kukorica esetében. Napjainkban micro-array alapú technikát is kifejlesztettek nem engedélyezett GMO-k kimutatására (TENGS et al. 2007).

A fent említett technikákon kívül számos alternatív módszer fejlesztésén is dolgoznak GMO kimutatására. Ezek között említhető a közeli infravörös spektroszkópia (NIR) (AHMED 2002), a tömegspektroszkópia (MIRAGLIA et al. 2004), különböző szenzorok és bioszenzorok (MERIC et al. 2004, PASSAMANO and PIGHINI 2006, KALOGIANNI et al. 2006, STOBIECKA et al. 2007), valamint GMO kimutatás szintetikus peptid-nukleinsav próbák alkalmazásával (PEANO et al. 2005b, ROSSI et al. 2007).

2.3. A DNS izolálás és problémaköre

2.3.1. PCR inhibitorok

A PCR élelmiszeranalitikában történő alkalmazása során az érzékenység jelentősen csökkenhet. Ennek okai többnyire a DNS izolálás, vagy az élelmiszer előállítás során keletkező DNS töredezés, a mátrix-hatás és a PCR inhibitorok. Ilyen inhibitorok a DNS izolálás során használt vegyszerek (pl. SDS, etanol, EDTA, guanidin-izotiocianát és a CTAB), a hemfehérjék, a nátrium-klorid, a nátrium-hidroxid, a szacharóz, a glikogén, Ca^{2+} , az ovalbumin és maga a kivont DNS is gátolhatja a PCR reakciót (ROSSEN et al. 1992). Ezeket az állításokat WILSON (1997) kutatásai is alátámasztják, valamint bizonyítják a zsírok, pollenek, laboratóriumi kesztyűkből származó hintőpor, laboratóriumi műanyagárak és a cellulóz gátló hatásait is. Nehezen megoldható feladat az élelmiszer-mátrixban található fehérjék, zsírok, poliszaharidok, polifenolok (tannin) és más egyéb másodlagos komponensek (szekunder metabolitok) eltávolítása (pl. csokoládé esetében), mivel számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal. A poliszaharidokról köztudott, hogy a DNS-polimeráz enzim inhibitora (FANG et al. 1992). A polifenolok antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek és igen sok növényben jelen vannak. A polifenol tartalmú növényekből, termékekből történő DNS izolálás nehézkessé válása azzal magyarázható, hogy a polifenolok kovalens kötéssel kötődnek a fehérjékhez és a nukleinsavakhoz. Éppen ezért igen nehéz feladat a szójalecitin kimutatása csokoládé mintákból, a kakaó massa igen magas polifenol tartalma (500 mg/100g étcsokoládéra vonatkoztatva) és az alacsony lecitin tartalma (0,5%) miatt (GRYSON et al. 2007b).

Az inhibitorok elsődleges kiszűrésére és a kapott DNS-oldat koncentrációjának meghatározására spektrofotométeres mérés alkalmazható, mely során 260 és 280 nm hullámhosszon mért értékek hányadosából képzett R érték ad információt az oldat RNS és fehérje szennyezettségére (MANIATIS et al. 1989). Ha a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia értékek hányadosa 1,7-2,0 közötti, akkor az extrahált DNS oldat megfelelő tisztaságú, ha 1,7-nél kisebb, az extrahált oldatban fehérje is jelen van, ha 2,0-nél nagyobb, az extrahált oldat RNS-t is tartalmaz. Amennyiben a tiszta DNS minta 260 nm hullámhosszon mért abszorbancia értéke 1,0, az megfeleltethető 50 µg/ml koncentrációjú, duplaszálú DNS oldatának (ZIMMERMANN et al. 1998).

A további inhibitor hatás vizsgálatára célszerű egy belső kontroll PCR reakció használata, még a specifikus PCR reakció használata előtt.

2.3.2. Élelmiszerekből történő GMO kimutatásra alkalmas DNS izolálási módszerek

Számos irodalomban olvashatunk növényi szövetekből történő egyszerű DNS izolálási technikákról, de jóval kevesebb tudományos cikk foglalkozik a feldolgozott élelmiszerekből történő DNS izolálással és a felvetődő problémákkal. Jelenleg igen sok kereskedelmi forgalomból beszerezhető DNS izoláló kit áll rendelkezésre, de közülük csak kevés használható feldolgozott élelmiszerekből történő DNS izolálásra (GRYSON et al. 2004a).

A DNS-izolálás két kritikus pontját a kivont DNS mennyisége, és tisztasága jelenti. Feldolgozott élelmiszerek esetében jelentős problémát okoz, hogy az extrahált DNS nagymértékben degradálódik, számos esetben a fragmentumok mérete nem éri el a 400 bp-t sem. Az élelmiszerminta bármiféle fizikai vagy kémiai kezelése - pH, hőmérséklet, nyíró erők, magas nyomás, savas vagy lúgos kezelések - a DNS károsodásához, fragmentum méretének csökkenéséhez vezethet a különböző helyeken bekövetkező hasítások miatt, ezért sok esetben előfordulhat, hogy a kimutatás lehetetlenné válik. Számos kutató támasztotta alá azt, hogy keményítő származékok (pl. glükóz szirup, maltodextrin) tisztított lecitin, finomított növényi olaj, szójaszósz és a magas hőmérsékleten hőkezelt (bizonyos extrudált vagy sterilizett) termékek esetében nincs jelen a mintában detektálható DNS (EBBEHOJ and THOMSEN 1991, MEYER 1999, CHEN et al. 2007).

A GMO kimutatás során leggyakrabban alkalmazott DNS izolálási módszerek, a Wizard, CTAB és a módosított CTAB módszer. A Wizard módszer lényege, hogy a proteináz K enzimes kezelés után a DNS-t egy szilika gyantán megkötjük, tisztítjuk majd eluáljuk.

A CTAB eljárás során pedig egy kloroformos tisztítás és egy alkoholos kicsapás során nyerjük ki a DNS-t. A módosított CTAB módszernél a mintát proteináz-K enzimmal emésztik a tisztítási és a kicsapási lépést megelőzően (ZIMMERMANN et al. 1998).

POREBSKI et al. (1997) módosított CTAB módszert használtak DNS izolálásra poliszacharidot, polifenolt és tannint tartalmazó növények esetében. A módosított izolálás során nagy só koncentrációt használtak a poliszacharidok eltávolítására. A polifenolok a hozzáadott polivinil-pirrolidonnal (PVP) hidrogénkötések által komplexet alkotnak, mely segítségével a polifenolokat távolíthatjuk el a DNS-től.

PAULI et al. (1998) vizsgálataik során azt próbálták kideríteni, hogy vajon a szójaolajat szükséges-e egyáltalán jelölni a GMO tartalom tekintetében. Hidegen és melegen sajtolt olajokat vizsgáltak, a DNS-t pedig a GMO kimutatásnál leggyakrabban alkalmazott Wizard módszerrel próbálták kinyerni a mintákból. A hidegen és melegen sajtolt olajak egyik részét a DNS izolálás előtt centrifugálták a másik részéből centrifugálás nélkül próbálták DNS-t izolálni. A DNS sokszorozhatóságát lektin gén specifikus nested-PCR rendszerrel vizsgálták. A centrifugált minták esetében nem sikerült az alkalmazott primerekkel a keresett szekvenciát kimutatni, szemben a nem centrifugált mintákkal, ahol a nested-PCR-rel értékelhető jeleket kaptak az agaróz gélen. A nagyüzemi körülmények között előállított minták esetében (szűrt nyers olaj, szűrt és centrifugált, szűrt és finomított olaj) szintén nem sikerült a lektin gén jelenlétét bizonyítani. A kutatók a vizsgálatok során arra a következtetésre jutottak, hogy a kezeletlen nyers olaj még tartalmazhat detektálható DNS-t, de a feldolgozás során az olajos fázisból a DNS-t már nem lehet kimutatni.

Ugyanerre a megállapításra jutott GRAYSON et al. (2002), akik laboratóriumi körülmények között modellezték az olajfinomítás lépéseit. Kutatásai során arra a megállapításra jutottak, hogy a DNS a nyers olajból még kimutatható, de a finomítás első lépése, a nyálkátlanítás után már nem detektálható. Kutatásaikat tovább folytatva kiderült, hogy a nyálkátlanítási lépés után a DNS igen nagy része a vizes fázisban marad ugyan, de csak nagymennyiségű (360 g) kiindulási anyag esetén lehetséges a DNS jelenlétét bizonyítani a nyálkátlanított olajfrakcióból is. Ennél az anyagmennyiségnél a lektin PCR során is pozitív jelet kaptak (GRAYSON et al. 2004b).

Szemben számos irodalommal HELLEBRAND et al. (1998) sikeresen izoláltak DNS-t hidegen sajtolt, szűrt és finomított repcemag olajkból, melyekből nested-PCR segítségével kimutatták a repcére jellemző gén jelenlétét. Az így kapott eredmények nem csak a GMO kimutatásban, hanem a különböző növényekből származó olajok azonosításában, hamisításának bizonyításában is segítséget nyújthatnak.

BUSCONI et al. (2003) sikeresen izoláltak DNS-t kereskedelemről származó olívaolajokból többlépcsős módosított CTAB eljárással, mely DNS oldat alkalmas volt további PCR-es vizsgálatokhoz.

ZIMMERMANN et al. (1998) 9 különböző DNS extrakciós eljárást hasonlítottak össze. A vizsgálatokhoz szója mintákat (tofu, szójaliszt, lecitin) használtak és meghatározták a kivont DNS mennyiségét, minőségét. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a DNS-kötő gyantát felhasználó módszerek, mint a Wizard, Dneasy, Nucleon Phytopure esetében, valamint a CTAB módszer alkalmazásakor viszonylag alacsony hozamú, de igen jó minőségű DNS-t kaptak. Ugyanakkor az egyszerűbb, gyorsabb és olcsóbb eljárások, mint a ROSE, Alkali vagy a Chelex100 viszonylag nagyobb hozamú, de gyenge minőségű DNS-t eredményezett.

WURZ et al. (1998) Lecitin vizsgálatára alkalmas, módosított CTAB módszert használtak. Kutatásaik során hexánt és guanidin-tiocianátot tartalmazó puffert adtak a lecitinhez, alaposan összekeverték és centrifugálták. Ezt követően, a vizes fázishoz kloroformot adtak és a mintát ismételtelen centrifugálták. A felső fázishoz glikogént kevertek, majd a DNS-t 2-propanollal kicsapták. A megszáritott pelletet steril desztillált vízben feloldották és gélszűrővel tisztították.

HERMAN et al. (2003) kereskedelmi forgalomból beszerezhető DneasyTM Plant Tissue kit folyékony nitrogénnel történő kombinálásával sikeresen izoláltak DNS-t kakaó masszából, lecitinből, szójababból, nyers mogyoróból, kész mogyorós és mogyoró mentes csokoládéból. Vizsgálataik a csokoládéban nyomokban előforduló mogyoró detektálására irányultak.

VODRET et al. (2007) 45 Olaszországban vásárolt élelmiszermintát vizsgáltak kvalitatív és real-time kvantitatív PCR technikával, mely vizsgálatok során három különböző DNS izolálási módszert hasonlítottak össze. A DNS izoláláshoz CTAB módszert, PrepMan Ultra kereskedelmi kittet és egy AbiPrism 6100-as nukleinsav tisztító berendezést használtak. Az eredményeik arról tanúskodnak, hogy mindhárom izolálási módszer alkalmas DNS izolálásra, de a három izolálási módszer kvantitatív méréseinek eredményeit összehasonlítva eltérések tapasztalhatók olaj, lecitin és feldolgozott termékek esetében (pl. péksütemények).

GRYSON et al. (2004a) 5 különböző DNS extrakciós módszert hasonlítottak össze csokoládé, keksz, nápolyi és csokis keksz mintákból történő szója DNS kimutatására. A vizsgálataik során „DNA Stool Mini Kített”, „Nucleon PhytoPure Kített”, Wizard Magnetic DNA Purification System for Food Kített”, Genespin DNA Isolation Kített” és a CTAB módszert tesztelték. Az eredmények alapján a CTAB módszer bizonyult a legjobbnak, bár ez a módszer jóval időigényesebb, egy teljes napot is igénybe vehet, szemben a kereskedelmi forgalomból vásárolható kettekkel, melyekkel fél nap alatt izolálhatunk DNS-t.

GRYSON et al. (2007) GMO eredetű lecitint (0,6-3%) tartalmazó modell csokoládé mintákat állítottak elő és vizsgálták a lektin gén és a GMO kimutathatóságát, valamint a DNS kivonhatóságát az egyes mintákból. Kutatásaik során 4 DNS izoláló módszerrel próbálták DNS-t izolálni a mintákból. A 4 módszer: a Nucleo™ PhytoPure™ kit növényi szövetekre, CTAB módszer, PVP módszer és a Wizard DNS tisztító rendszer. A legjobban működő módszernek a Nucleo™ PhytoPure™ kit bizonyult, ahol az R értékek < 1,46, melyek még mindig jóval alacsonyabbak, mint az előírt R=1,7-2. A lektin gén jelenlétét szója specifikus primerekkel próbálták kimutatni, a GMO kimutatásra pedig a 35S promóterre, *nos* terminátorra és EPSPS génre tervezett primereket használtak. Vizsgálataik során megállapították, hogy a 15,4%-nál több kakaó masszát tartalmazó mintákból nem sikerült a lektin gént detektálni, vagyis a kakaó massa jelenléte egy bizonyos mennyiség felett akadályozza a szója DNS sokszorozhatóságát, kimutathatóságát. A 35S promóter jelenlétét a csokoládé mintákban szintén a Nucleon™ PhytoPure™ kittel kinyert DNS oldatokból sikerült detektálni. Az RR szója specifikus kimutatás eredménye minden esetben negatív volt. Vizsgálataik során azt is megállapították, hogy ha nagyobb mennyiségű az izoláláshoz bemért mintánk mennyisége, abban nagyobb a PCR inhibitorok és a DNS extrakciós inhibitorok mennyisége is.

CHEN et al. (2005) 8 különböző feldolgozási lépés (darálás, főzés /100°C, 15 perc/, alvasztás /10% CaSO₄/, préselés /16 kg/cm² nyomás alatt, 60°C, 20-30perc/, keverés, homogenizálás, porlasztva szárítás /160°C belépő és 80°C kilépő hőmérséklet/) hatását vizsgálták lektin gén és az EPSPS gén változására. A 2,5% RR szójababot tartalmazó kiindulási anyagból szójatejet, szója fehérje izolátumot és egy ún. „bean curd” fantázianevű szójabából készült desszertet állítottak elő. A vizsgálatok során különböző méretű lektin (1883 bp, 869 bp, 407 bp, 162 bp) és EPSPS (1512, bp, 807 bp, 408 bp, 190 bp) specifikus primereket használtak, melyekkel azt próbálták bizonyítani, hogy a feldolgozási technikák során milyen mértékben fragmentálódik a DNS. Eredményi alapján elmondható, hogy szinte mindegyik feldolgozási technológia hatással volt a DNS töredezettségére, de a hatásfoka eltérő volt. A darált mintákból 800 bp nagyságú lektin gén sikerült amplifikálni, míg az EPSPS gén esetében csak 400 bp volt detektálható. A legjelentősebb degradáció a porlasztva szárításnál adódott, ahol csak a 162 bp (lektin gén) és 190 bp (EPSPS gén) nagyságú fragmentumot sikerült kimutatni.

FERRARI et al. (2007) kutatásaikat során RR szója kvalitatív vizsgálatát tűzték ki különböző kereskedelmi forgalomban kapható szójababból, szója tejporból, zsírtalanított szójalisztból és szója italokból. Vizsgálataik során a CTAB módszer három különböző változatát hasonlították össze. A tisztaság tekintetében a legjobb eredményeket (R= 1,6-1,9) az a módszer adta, ahol a mintákat CTAB pufferrel és proteináz K enzimmel emésztettek.

Az emésztés után első lépésben, fenol/kloroform/izoamil-alkohollal (25:24:1) tisztították a DNS-t, majd a további két lépcsőben kloroform és izoamil-alkoholt (24:1) használtak a tisztításához. A DNS-t nátrium-acetáttal és 100%-os etanollal csapták ki két lépcsőben. Abban az esetben is jó minőségű DNS-t kaptak ($R=1,6-2,2$), amikor a 3 lépéses kloroformos tisztítást 2-propanolos DNS kicsapatás követte. A GMO tartalom nested-PCR-rel történő kimutatása során ez utóbbi módszer bizonyult a legérzékenyebbnek (0,01-0,001% GMO kimutatás nyers szójababból).

DEBODE et al. (2007) négyféle fizikai kezelést alkalmaztak a célból, hogy vizsgálják van-e hatása a kezeléseknak a GMO mennyiségi meghatározására. Kutatásaik során RR szója referencia sorból izolált tiszta DNS extraktumot kezeltek, (a mátrix hatás kiküszöbölése céljából) mikrohullámmal, kundukciós melegítéssel, ultrahangos kezeléssel és autoklavozással. Az eredményeik alapján elmondható, hogy a hipotézis, miszerint az élelmiszerek feldolgozása hasonló arányú degradációt okoz mind a transzgen (konstrukció-, vagy „esemény” specifikus) mind az endogén célszekvencia esetében, igaznak bizonyult. Kutatásaik során megállapították, hogy a fizikai kezelésekre hatására a transzgen és az endogén célszekvencia C_t értéke szignifikánsan és viszonylag egyenlő mértékben nőtt, ami így egy állandó ΔC_t értéket eredményezett. Így elmondható, hogy az alkalmazott fizikai kezeléseknak a relatív GMO tartalomra nem volt hatásuk. A kísérletek tervezésénél fontos szempont volt, hogy a kiválasztott transzgen és endogén szekvenciákra tervezett primerek hozzávetőleg ugyanakkora méretű fragmentumot sokszoroztak.

2.3.3. A háromfázisú megoszlás módszere

Jelenleg 3 DNS-izolálási módszer (Wizard, CTAB, módosított CTAB) az, amely széles körben elfogadott GM szója, kukorica valamint származékaik, pl. lecitin, szójaolaj, illetve a belőlük készült élelmiszerek esetében (VAN DEN EEDE et al. 2000). Egy DNS kivonási módszernél a DNS minősége és hozama mellett nagyon fontos a módszer idő- és költségigénye, ezért mindig törekedni kell minél egyszerűbb, gyorsabb és alacsony költséggel működő DNS izolálási technikák fejlesztésére, továbbfejlesztésére. Egy ilyen ígéretes DNS extrakciós technika a háromfázisú megoszlás módszere (HFM).

A HFM eredeti formájában egy olyan fehérjeizoláló módszer, amely egyesíti az ammónium-szulfát kiszózó hatását és a szerves oldószer tercier butanol kicsapó hatását szobahőmérsékleten.

Az erős kicsapó szerek jelenlétében (20-80% relatív telítésű ammónium-szulfát és 30-50% (v/v) tercier butanol) a vizes fázisból kiváló fehérjék a határfelületre jutnak, ahol egy harmadik fázisnak nevezett réteget képeznek. Így egy fehérjében gazdag középső réteg különül el a két folyadék fázis között. A HFM során az apoláros komponensek (pigmentek, lipidek, bizonyos enziminhibitorok), a felső, míg a poláris komponensek (pl. cukor) az alsó fázisban dúsulnak (KISS et al. 1998). A fehérjekiválás mértékét több faktor befolyásolja, így a só koncentrációja, a fehérje koncentráció, a szerves-vizes fázisok térfogataránya, a vizes fázis pH-ja, a fehérjék összetétele, molekulatömege, hidrofób jellege, izoelektromos pontja, és a hőmérséklet. A HFM nagyon gyors, hatékony és gazdaságos lépés, fő alkalmazási területe a nyers enzimek készítményekből történő enzimtisztítás, amelynek különböző változatait publikálták (ODEGAARD et al. 1984, PIKE and DENNISON 1989, SZAMOS and HOSCHKE 1992, SZAMOS and KISS 1995, DENNISON and LOVRIEN 1997). Újabban egyéb alkalmazásairól is beszámoltak, például szójalisztból történő olaj kinyeréséről (KANSAL et al. 2006).

SZAMOS et al. (1998) foglalkoztak először a háromfázisú megoszlással, mint egy lehetséges DNS kivonási módszerrel, búzaliszt mintákból. A DNS izolálás alapja az a megfigyelés volt, hogy nagy relatív ammónium-szulfát telítésű oldatból a nukleinsav a határfelületre jut. A kinyert DNS oldatok tisztasága (R értéke), 1,4 és 1,7 közé esett. Az így kapott DNS oldatokat tovább tisztították Wizard DNS tisztító rendszerrel és alkalmazták további PCR-es vizsgálatokra.

JÁNOSI and SZAMOS (2001) 5 hústermékből izolált DNS oldatot hasonlítottak össze a DNS tisztaságát és koncentrációját figyelembe véve. A mintákból Wizard és HFM módszerrel történt a DNS kinyerése. A kétlépcsős HFM módszerrel 3 minta esetében kaptak megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t, melyet további PCR-es vizsgálatokhoz jól alkalmaztak. A folyamat részleteit a továbbiakban nem vizsgálták.

2.3.4. DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfia

A kromatográfiai technikákat eredetileg állati szövetekből, mikrobákból és növényekből történő fehérje izolálásra alkalmazták, de napjainkban, a biotechnológiában egyre szélesebb körben használják rekombináns fehérjék, peptidok, szénhidrátok és nukleinsavak kinyerésére. A kromatográfiai technikák közül az ioncserés kromatográfia jól alkalmazható DNS izolálásra. Az egyik leggyakrabban használt anioncserélő a DEAE-cellulóz (Diethyl-Amino-Etil-cellulóz), ahol a szálak felületén elhelyezkedő dietil-amino-etil-csoportok anioncserélő tulajdonságot kölcsönöznek a cellulóznak.

LEVISON et al. (1998) DEAE-Magarose mágnesezett agaróz gyöngyökön alapuló ioncserés kromatográfiát alkalmaztak *Escherichia coli* plazmid és genomiális DNS izolálására. A módszert sikeresen alkalmazták emberi vérből történő DNS izolálására is. Korábbi vizsgálataik során 70 különböző ioncserélőt teszteltek, mely eredménye szerint a kereskedelemről származó fehérje izoláló ioncserélőknek különböző a teljesítménye. Az eredményekből elképzelhetőnek tartották, hogy a nukleinsavak is különböző mértékben kötődnek az anioncserélőkre. Az egyik legjobb töltés sűrűséggel rendelkező anioncserélő a DEAE cellulóz, mellyel a só koncentrációtól függően (0,1 M-1,6 M) fehérjét, RNS-t illetve DNS-t izolálhatunk (BECKER et al. 1996).

2.4. GMO felmérések kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerminták esetében

Az EU jelenleg érvényben lévő 1830/2003-as EK rendelete értelmében minden olyan élelmiszeripari terméket, amely 0,9% vagy annál több GM összetevőt tartalmaz GMO élelmiszernek minősül és jelölésköteles. A fogyasztók érdekeinek védelmében a világon szinte mindenhol fontosnak tartják tesztelni, hogy van-e lehetőségük a fogyasztóknak választani a GMO-t tartalmazó és nem tartalmazó élelmiszerek között. Ezért különböző GMO kimutatásra alkalmas analitikai módszereket kell fejleszteni és adaptálni.

SHIRAI et al. (1998) Japánban vásárolt szójabab mintákat vizsgáltak a GMO tartalom tekintetében. A többnyire észak-Amerikából importált szójabab 1,1%-ában találtak génmódosításra utaló szekvenciákat (35S promóter és/vagy *nos* terminátor).

VOLLENHOFER et al (1999) Ausztriában vásárolt feldolgozott élelmiszereket monitoroztak az általuk kidolgozott PCR módszerrel és a pozitív mintákat kvantitatív PCR-el is vizsgálták. Bár a cikkben nem találtam arra utalást, hogy mennyi volt a vizsgált minták darabszáma, az jól látható, hogy 17 mintában találtak GMO tartalomra utaló szekvenciákat (pl: sonka, szója ital, nugát krém, szójas spagetti, szójaliszt, csirke falatok). A vizsgált mintákból kettő esetében igen magas GMO tartalmat mutattak ki (10% banános diétás instant por és 15% csokoládés diétás instant por).

EL SANHOTY et al. (2002) egyiptomi élelmiszerpiacról származó élelmiszereket vizsgáltak. Kutatásaik során 40 élelmiszermintából 8 (20%) esetében bizonyították a transzgen szója jelenlétét. A vizsgált minták 15%-a tartalmazott Bt176 GM kukoricát és 12,5% volt pozitív a Bt11-es GM kukoricára.

ORABY et al. (2005) szintén Egyiptomból, Kairó területéről származó élelmiszermintákat vizsgáltak, mely eredményeképpen 24 mintából 3 mintánál bizonyították a CaMV 35S promóter jelenlétét, de mindhárom minta negatívnak bizonyult a *nos* terminátor vizsgálata során.

ROTT et al. (2004) 39 élelmiszermintát vizsgáltak, mely minták kanadai élelmiszer-áruházakból származtak. Kutatásaik során kvalitatív és kvantitatív PCR módszerrel kívánták kideríteni, hogy a vizsgált minták tartalmazzak-e GM összetevőt és ha igen, hány százalékban. A vizsgált minták főleg vegetáriánus ételek, kekszek, szójabab és liszt minták, fűszerek, leves porok, bébiételek és italok voltak. A 39 vizsgált mintából 28-ban találtak RR szójatartalomra utaló jeleket kvalitatív PCR-el. A vizsgált minták GMO tartalma 0,03 és 87% közötti tartományban változott.

LAU et al. (2004) kínai élelmiszerpiacról származó élelmiszereket vizsgáltak kvalitatív PCR-el és a vizsgált 31 minta közül (szójabab, szójaliszt, szója tej, levespor, levesbetét, virsli) 20 mintában találtak RR szója tartalomra utaló jeleket.

CARDARELLI et al. (2005) 89 Brazíliában vásárolt élelmiszermintát (pl. szójatejpor minták, kekszek, tésztafélék, virsli minták, szója italok, konzerv levesminták, nyers szójabab és levespor minták) GMO tartalmát vizsgálták. A 89 mintából 66 esetben sikerült kimutatni a szója jelenlétét lektin specifikus primerek segítségével. A szóját tartalmazó 66 mintát tovább vizsgálták 35S promóter és *nos* terminátor jelenlétének bizonyítása érdekében. A mintákból 16 esetben azonosították a fent említett két genetikailag fontos elem együttes jelenlétét. További 6 mintában a 35S promótert azonosították, de a *nos* terminátort nem. A mintákról CaMV specifikus primerek segítségével bizonyították, hogy karfiol mozaikvírussal voltak fertőzöttek. A 16 pozitív mintában az RR szója jelenlétét transzgén specifikus PCR segítségével is bizonyították. Az egyszerű PCR érzékenysége 0,1%-nak adódott a 35S promóter, a *nos* terminátor és az EPSPS gén esetében.

GERMINI et al. (2005) Olaszországban vásárolt termékeket teszteltek az általuk kidolgozott multiplex PCR rendszerrel. A módszer alkalmas az RR szója, MON 810, Bt 176, Bt11 és GA 21 GM kukoricák együttes kimutatására. 40 élelmiszermintát vizsgáltak, melyek főleg keksz minták, szója és kukorica minták, szója italok voltak. A vizsgált termékek 17,8%-ánál bizonyították a transzgén jelenlétét. A kvantitatív mérések szerint egyetlenegy minta GMO tartalma sem haladta meg az EU jogszabály által előírt 0,9%-ot. Érdeemes megemlíteni, hogy két GM pozitív minta csomagolásán „GMO mentes” feliratot találtak.

GREINER et al. (2005) 100-100, szóját tartalmazó élelmiszert vizsgált 2000 és 2001-ben a Brazil élelmiszerpiacon. 2000-ben a vizsgált minták 13%-a, 2001-ben 21%-a tartalmazott RR szóját.

A 2000-es felmérés szerint a pozitív minták közül 2 minta tartalmazott RR szóját 1% alatt, 3 minta volt 1-4% között, 4 minta 4-10% között és 4 minta 10% RR szójatartalom felett. A 2001-es adatok szerint 3 minta 1% alatt tartalmazott RR szóját, 5 minta 1-4% között, 6 minta 4-10% között és a maradék 7 minta több mint 10%-ban tartalmazta a GM szóját.

SIERADZKI et al. (2006) Lengyelországban végeztek felmérést, arra vonatkozóan, hogy a takarmány alap- és segédanyagai tartalmazzak-e GM szóját vagy kukoricát és ha igen, milyen mértékben. 87 mintát vizsgáltak, melyek közül 53 (61%) bizonyult pozitívnak. Az 53 mintából 50 esetben RR szójatartalmat detektáltak és 3 esetben GM kukoricát (MON810 és T25). Az 53 GMO tartalmú mintából 46 minta 0,9% fölött tartalmazott génmódosított összetevőt.

ABDULLAH et al. (2006) 85 Malajziában vásárolt élelmiszert (szójabab, szójaliszt, tofu, „tempe” „fucuk”, melyek tradicionális maláj élelmiszerek) teszteltek és vizsgálták a 35S promóter, *nos* terminátor és az EPSPS gén jelenlétét. A 85 vizsgált mintából 80 tartalmazott szóját (lektin gént) és 18 esetben sikerült kimutatni mindhárom genetikai elem jelenlétét, vagyis a szóját tartalmazó minták 22,5%-a tartalmazott GMO összetevőt.

VODRET et al. (2007) 45 Olaszországban vásárolt szója tartalmú élelmiszermintát (szójatej, lecitin, szójaliszt, jégkrém, nápolyi, keksz) vizsgáltak kvalitatív és real-time kvantitatív PCR technikával. A vizsgált 45 mintából 12 esetben tudták kimutatni kvalitatív PCR technikával a 35S promóter jelenlétét. A 12 pozitív mintát kvantitatív PCR technikával is vizsgálták. A mérések alapján mindegyik minta GMO tartalma 0,9% alatt adódott.

BROD et al. (2007) 37 Brazíliában vásárolt szója tartalmú mintákat vizsgáltak nested-PCR rendszerrel. A 37 vizsgált mintából 19 tartalmazott RR szóját (szója tejpor 25/15, szójaliszt 6/4), vagyis a vizsgált minták 51%-a.

BROD and ARISI (2007b) 62 élelmiszermintát (texturált szójafehérje, szója tejpor) vizsgáltak, mely élelmiszerek Brazíliából származtak. A vizsgált szójatartalmú minták közül 40 minta tartalmazott RR szóját. Összesen 2 minta tartalmazott 1% feletti GMO-t.

ZHOU et al. (2007) RR szója monitorozását tűzték ki célul szójabab mintákból Kínában. A 660 vizsgált szójabab minta közül 60 minta tartalmazta az RR szójára jellemző CP4-EPSPS gént (9%).

A húsiparban jelentős mennyiségben használnak különböző szója készítményeket, szójafehérje koncentrátumot és izolátumot fehérje pótlóként, állományjavítóként, víz és zsírmegkötő képességéért, mégis igen kevés azon vizsgálatok száma, amelyek a hústermékekből történő GMO kimutatással foglalkoznak.

BROD and ARISI (2007a) elsőként határozták meg ekkora mintaszám mellett a kereskedelemről származó húskészítményekből (mortadella minták, hot-dog és hamburger húsminták, főtt sonka minták) és a húsgyártás során alkalmazott, többnyire szóját tartalmazó adalékanyagokból (fűszerek, szója fehérje és szója fehérje izolátum, íz fokozók) történő RR szója jelenlétét. Kutatásaik során 40 Brazíliából származó mintát vizsgáltak nested-PCR rendszerrel a GMO jelenlétének tesztelése céljából. Eredményeik szerint a vizsgált 40 mintából 33 minta tartalmazott szóját, melyből 18 esetben bizonyították az RR szója jelenlétét. A módszer érzékenysége ebben az esetben 0,1%-os volt.

2.5. DNS túlélése a tápcsatornában és onnan más szervekbe való bejutásának kockázata

A genetikailag módosított szervezetek kibocsátása és forgalmazása engedélyhez kötött. Az engedélyezési eljárás során többek között vizsgálni kell az új tulajdonság kialakítását eredményező vektor konstrukciók állati, emberi szervezetbe történő bejutásának kockázatát, valamint az emésztő csatornában lévő transzgén fehérje és DNS stabilitását (KUIPER et al. 2002).

Számos biotechnológus szerint a táplálékban előforduló legtöbb fehérje és DNS a tápcsatornában hamar alkotó elemeire bomlik. PUSZTAI and BARDÓCZ (2004) szerint, ha ez igaz lenne, akkor viszont nem lenne értelme a DNS-en alapuló gyógyszereknek, vakcináknak és a vírusos bélfertőzésektől sem kellene tartanunk

2.5.1. A 35S promóter és esetleges veszélyei

A genetikailag módosított növények esetében a beépített idegen gén működését az ún. promóter régió határozza meg. Segítségével szabályozni lehet, hogy a GM növényben a transzgén a növény élete során mikor, mely szövetben és szervben íródjon át. A fajok közötti átírást lehetővé tevő, első generációs konstitutív promóterek (például karfiol mozaikvírus) hatására a tervezett génexpresszió mindenhol és állandóan megnyilvánulhat. Az újabb GM növények esetében azonban a vektor konstrukció már szerv- és szövetspecifikus promótert is tartalmazhat, valamint a harmadik generációs GM növényeknél a gén időbeli kifejeződése is megvalósítható (BÁNÁTI and GELENCSÉR 2007). Napjainkban az engedélyezett GM növények egyik leggyakrabban használt promótere a karfiol mozaikvírusból származó 35S promóter, melyet az RR szója génkonstrukció is tartalmaz és melynek biztonságossága néhány kutató szerint vitatott.

A *caulimovirusok* a kettős szálú DNS-vírusok egyedüli képviselői, típusjuk a karfiol mozaikvírus (*cauliflower mosaic caulimovirus*). Különlegessége, hogy nukleinsav-újratermelése a reverz transzkriptáz (RNS-től függő DNS-polimeráz) enzim működésén alapul. E replikációs mód az állat- és humánpatogén retrovírusokra jellemző, ezért is használják a *caulimovirusokra* a pararetrovirus elnevezést. A genomja egy 8 kbp méretű kettős szálú cirkuláris DNS, mely három helyen szakad meg. Két fő mRNS szintézis történik (19S és 35S) az egyik szálról, és a genom hat nyitott leolvasási keretet tartalmaz (ORF).

A mozaikvírussal fertőzött kereszteseket (karfiolt, káposztát, brokkolit stb.) évszázadok óta fogyasztja a népesség, de probléma nem adódott még ezzel kapcsolatban. Nem okozott fokozott génműködést, és nem keletkeztek új vírusok sem (HO et al. 2000b). Azonban mikor a vírus ily módon bejut a szervezetünkbe, annak a genetikai anyaga a vírus fehérjetokjába van burkolva, és ez az, ami meghatározza a vírus specifitását. A specifitás az evolúció során alakult ki úgy, hogy a karfiol mozaikvírus tokja csak a káposztaféléket betegíti meg. Így ha karfiol mozaikvírussal fertőzött növényeket eszünk, a vírus változatlanul megy át a szervezetünkön. A kutatók véleménye eltérő abban az álláspontban, hogy mi történik, ha a vírus vírusköpeny nélkül jut be a szervezetünkbe, mint ahogy az, például az RR szójában található expressziós vektorban van (PUSZTAI and BARDÓCZ 2004).

Ez idáig nem találtak tudományos bizonyítékot a vírusköpenyt nem expresszáló vírus promóterek egészségkárosító hatására. Egyes adatok szerint a megvásárolt karfiol és karalábé 10%-a fertőzött karfiol mozaikvírussal. A növény minden egyes sejtjében 100.000 kópiában van jelen a teljes vírus DNS. Ezzel szemben a transzformáns növények sejtjeiben 1-5 példányban található a 343 nukleotidnyi DNS-darab. Mindez azt jelenti, hogy 100.000-szer több vírus- és promóterszekvenciát fogyasztanak az emberek, mint amennyi a transzformáns növényekben megtalálható. (COCKBURN 2002). Érdeemes megemlíteni, hogy a CaMV35S promótert hordozó transzformánsokkal végzett etetési kísérletek nem mutattak káros elváltozást csirkében, halakban, szarvasmarhában és patkányban (HAMMOND et al. 1996).

A promóter rendszerint gén specifikus, de egyes kutatók szerint a promóter a transzgént befogadó sejt genomjában más „alvó” géneket is bekapcsolhat. Ez olyan fehérjék szintéziséhez vezethet, amelyek hatását nem lehet előre kiszámítani. Továbbá a sejt genomjában található nyugvó vírusokat is aktiválhatják, vagy új, rekombináns vírusok kifejlődéséhez vezethetnek. Ha a genetikai módosítás eredményeképpen új növényi vírusok jönnek létre, akkor annak a lehetőségét sem zárhatjuk ki, hogy ezek az érintett növényben járványokat okozzanak (PUSZTAI and BARDÓCZ 2004).

HO et al. (1999) szerint a virális promóterekkel szemben felmerült az a gyanú, hogy egyes gének fokozott működését eredményezik a transzformált növényben, és így közvetve daganatos megbetegedések kialakulásában lehet szerepük. Transzgenikus rizs lókusának vizsgálata során kiderült, hogy a karfiol mozaikvírus promóter a DNS-ben ún. rekombinációs "forró pontokat" hozhat létre, így egyes gének, DNS részek, esetleg az egész kromoszóma instabillá válhat. A DNS fragmentálódhat, egyes gének pozíciója megváltozhat úgy, hogy azok még más kromoszómákra is átkerülhetnek. A CaMV 35S promóter néha még más kromoszómán lévő, azaz más genetikai egységen található géneket is bekapcsolhat. Több kutatás szerint a karfiol mozaikvírus csak növényi sejtekben működik, sokak szerint viszont ez a promóter állati sejtekben (*Xenopus* oocytes – karmos béka petesejt) is aktív (HO et al. 2000a). A promóter aktivitását bizonyították baktériumokban (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Agrobacterium rhizogenes*), gombákban (*Schizosaccharomyces pombe*) és emberi rákos sejtvonalakban (STEINBRECHER 2002).

MYHRE et al. (2006) vizsgálták, hogy vajon aktív-e a 35S promóter emlős sejtekben. Kísérleteik során expressziós vektort készítettek, ahol a 35S promótert illesztették két riporter gént kódoló szakaszok elé (szentjánosbogár luciferáz gén és GFP /green fluorescent protein/ gén) és transzfekeziós kísérleteket végeztek *in vitro* humán Caco-2 sejtvonalakban. Az eredmények azt mutatták, hogy a 35S promóter képes volt a riporter géneket expresszálni, bár a fehérje expressziós szint mérsékeltebb volt, mint a humán cytomegalovírus promóterrel végzett kísérletek során.

HO et al. (2000a) szerint fontos megemlíteni, hogy a karfiol mozaikvírus nagyfokú hasonlóságot mutat az állati hepadnavírusokkal, ahová a hepatitis-B-vírus is sorolható és a HIV-vírussal. Bár a hasonlóság a CaMV és a hepatitis B vírus között még nem elegendő a rekombináció létrejöttéhez, mivel egyes kutatások szerint a rekombinációs ciklusuk jelentősen eltér egymástól és nincs szekvencia hasonlóság a CaMV 35S promóter és a hepatitis B replikációjában szerepet játszó „forró pontjuk” (hotspot) között.

Az emberi DNS-nek csak kb. 1,5 %-át azonosították génként, a többit felesleges, avagy szemét (junk) DNS-nek hívják. A feleslegesnek gondolt DNS darabokról kiderült, hogy nagy részük nyugvó vírus, vagy vírusmaradék. Valószínű, hogy ezeknek a vitális DNS-daraboknak a kémiai szerkezete sérült, és normális körülmények között legtöbbjük elvesztette az újra-aktiválódás képességét. Azonban előfordulhat, hogy némelyikük újra bekapcsolható. Így a genetikailag módosított kukoricában, szójában és a többi növényben ez a promóter elősegítheti, hogy a vírusgén horizontális génátvitellel átkerülhessen egyik fajtából a másikba.

Ha az ember genetikailag módosított növényt tartalmazó élelmiszert fogyaszt, akkor fennállhat annak a veszélye, hogy a táplálékban lévő karfiol mozaikvírus promóter a bélhámsejtekben hozzákapcsolódhat az egyik nyugvó vírus DNS-éhez és azt aktiválhatja (PUSZTAI and BARDÓCZ 2004).

EWEN and PUSZTAI (1999) szerint a bélhámsejtekben a karfiol mozaikvírus promóter nemcsak a vírusokat kódoló, hanem a sejtben jelenlevő más géneket is aktiválhatja. A GM burgonyát tartalmazó tápon tartott patkányok gyomor- és bélfalának szövettani vizsgálatok során kiderült, hogy a CaMV és a genetikai módosításban használt más DNS darabok hatására a hámsejtekben felgyorsul a sejtosztódás. Vizsgálataikból azt a következtetést vonták le, hogy a transzgenek a bélben nem szabályozható növekedést válthatnak ki, ami végül is vastagbélrák kifejlődéséhez vezethet.

2.5.2. Horizontális génátvitel idegen DNS átjutása a bél falon és integrálódása a szervezetbe

Horizontális génátvitelről akkor beszélünk, amikor a gének egyik fajból a másikba kerülnek. Kevés kísérletet végeztek annak vizsgálatára, hogy a kompetens baktériumok felveszik-e a transzgent. Emellett igen fontos a DNS bélszatórnába és más szervekbe valamint izomba történő átkerülésének vizsgálata is, sajnos az erre vonatkozó irodalmak száma sem túl sok. A legtöbb esetben GM kukoricával történő etetési kísérleteket folytattak és igen csekély az RR szójjával végzett vizsgálatok száma. Mindössze néhány többgenerációs, hosszútávú etetési kísérletről olvashatunk az irodalomban, e vizsgálatok számát mindenképpen fontos lenne növelni.

Mikrobákkal végzett kísérletek eredményei: MERCER et al. (1999) az egyik szájban élő baktérium faj egyedeit összekeverték egy rekombináns plazmid 520 bp hosszúságú részletével. Megfigyelésük szerint a baktérium rövid időn belül transzformálódott. PUSZTAI and BARDÓCZ (2004) szerint ez egyben azt is jelentheti, hogy a genetikailag módosított növényekből az antibiotikum rezisztenciát hordozó markergén étkezéskor átkerülhet a szájban és az emésztőszatórnában élő baktériumokba. Ezekből a kísérletekből az következhet, hogy a vírus-promóter és esetleg más hozzácsatolt DNS darabok is átkerülhetnek a GM-növényből a bélhámsejtekbe és a vérbe.

Laborállatok bevonásával végzett kísérletek eredményei: DOERFLER et al. (1995) kísérleteik során egéretetési kísérletben bizonyították, hogy az élelmiszerrel bejutó idegen DNS nem teljesen bomlik le az emésztőrendszeren keresztül, hanem (M13mp 18 ds DNS) átmenetileg túlél az állatok bélrendszerében (kimutatható volt a székletből, bár csak erősen fragmentált formában). Az idegen DNS darabokat 2-8 órával az etetés után a vérből is sikerült kimutatni. Eredményeikből kiderült, hogy a vérben lévő idegen DNS majdnem kizárólag a periférián keringő fehérvérsejtek sejtmag és citoplazma frakciójával kapcsolódik össze. SCHUBBERT et al. (1997) vizsgálataikban próbálták kideríteni, hogy a vér által szállított M13mp18 DNS integrálódhat-e az állatok bármely szervében lévő sejtek kromoszómáival. Az M13mp18 fág DNS fragmentumok jelenlétét igazolták a vékony és a vastag bélben (oszlopos hámsejtekből), a vakbélben, a májban, a lépben és a székletben.

Az eredményeik alapján arra következtettek, hogy az idegen DNS átjutása a bélfalon, valamint a bélrendszer nyálkahártyája alatt található Peyer-plakkokon keresztül történik a periférián keringő fehérvérsejtekbe és a különböző szervekbe. Kísérleteikkel bizonyították, hogy az idegen DNS kovalens kötést kialakítva kapcsolódhat az egér DNS-ével (M13mp18 DNS 70%-os homológiát mutatott az egér IgE receptor génjével). A vizsgálatok legnagyobb részét PCR és FISH (fluoreszcens *in situ* hibridizációs) módszerrel végezték. További kutatásaik is alátámasztották az idegen DNS detektálását több szervben, sőt kísérleteik szerint az idegen DNS a méhlepényen is átjuthat. A kutatások során az idegen DNS részt kimutatták a magzatok különböző szerveiből és az újszülött állatokból is (SCHUBBERT et al. 1998). Kísérletek során az idegen DNS felszívódott a bélből és a vér-agy gáton át bekerült a magzati agyba, bár ennek a megfigyelésnek a jelentősége vitatott (THOMSON 2001).

WILCKS et al. (2004) kísérleteik során többek között plazmid DNS túlélését vizsgálták *in vivo* patkánymodell segítségével. A plazmid DNS-t 5 órával az etetés után is sikerült izolálni a bélből származó mintákból. A mintákból izolált DNS-t transzformálták *Escherichia coli*-ba, ahol a vizsgálatok szerint a plazmid még biológiailag aktív volt. Az eredmények alapján a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a DNS túlélhet a bélrendszerben és így a bélbaktériumok felvehetik azt.

ZHU et al. (2004) kutatásaik során Roundup Ready szóját tartalmazó táppal (30%, 60% és 90%) végeztek etetési kísérletet patkányokkal. A 13 héten át tartó etetési kísérlet során figyelték, hogy a CP4-EPSPS gén DNS fragmentumát (145 bp), illetve a szójabab lektin génjét kódoló fragmentumát (405 bp) sikerül-e detektálni az izomszövetből. A PCR-es vizsgálatok alapján megállapították, hogy a két vizsgált fragmentum egyetlen mintából sem volt kimutatható.

EL-SANHOTY et al. (2006) GM burgonyával végeztek patkányetelési kísérletet, mely során csak a növényi DNS jelenlétét igazolták egyes szervekben (máj, vese, lép) és az izomban. A GM specifikus primerekkel végzett PCR-es vizsgálatok negatívnak bizonyultak.

A növényi DNS jelenléte magyarázható azzal, hogy a növényi (kloroplaszt) genom jelenléte relatív magas (100 kópia/sejt) kópiaszámban van jelen a transzgénhez (1-2 kópia/sejt) képest. A béltraktus különböző szakaszain (gyomor, nyombél, éhbél, csípőbél, vakbél, végbél) a GM DNS jelenlétét ezzel szemben igazolták, még 24 órával a tápelvonás után is.

GMO táppal etetett haszonállatok bevonásával végzett kísérletek eredményei:

KHUMNIRDPECH et al. (2001) GMO szóját tartalmazó táppal végeztek brojler csirkeetelési kísérletet 7 héten keresztül. 1. 3. 5. és 7. héten vettek mintákat a húsból, a bőrből, a májból és a nyombélből és real-time PCR módszerrel vizsgálták, hogy kimutatható-e az idegen DNS szekvencia a szervekből. A vizsgálat során az összes minta negatív volt.

TONY et al. (2003) 35 napon át tartó brojler csirkeetelési kísérletet végeztek Bt 176 kukorica hibridet (NX 6262 – Bt 176) tartalmazó táppal. Mintát vettek a vérből, izomból, májból, veséből, lépből, szívizomból, a csecsemőmirigyből, valamint vizsgálták a béltraktus különböző régióit. Eredményeikből megállapítható, hogy a bélrendszerben nem degradálódik teljes mértékben a DNS és a növényi DNS kis fragmentuma (199 bp) átjut a bélhámsejteken a vérbe, néhány szervbe és a szövetekbe, mely 24 órával a táplálék elvonása után már nem kimutatható. Ugyanakkor a Bt gén nem volt detektálható egyetlen vizsgált szervből, szövetből illetve a vérmintákból sem.

ROSSI et al. (2005) brojler csirkeetelési kísérletet végeztek Bt kukoricával. Vizsgálták többek között a cry1A(b) gén, a zein gén kimutathatóságát a béltartalomból, a begyből, a zúzából, az éhbélből, a vakbélből és a vérből. Eredményeik szerint a takarmányból származó DNS fokozatosan degradálódik a tápcsatornában. A cry1A(b) gén egy 1800 bp méretű fragmentumát néhány esetben a begyből és a zúzából sikerült kimutatni.

AESCHBACHER et al. (2005) 60% Bt 176-os kukoricával kevert táppal etettek brojler csirkéket és tojó tyúkokat 39 napon keresztül. A lényegi egyenértékűségeen kívül vizsgálták, hogy kimutatható-e a béltraktusból (begy, zúzógyomor, vékonybél, vakbél), szervekből (máj, lép), húsból, vérből, vizeletből, tojásból az idegen génrészlet. A PCR-es vizsgálatokhoz, a baromfi és invertáz specifikus primereken kívül Bt gén specifikus primereket használtak. A rekombináns növényi DNS fragmentumát egyedül a begyből sikerült kimutatni néhány esetben, a többi minta negatív volt.

FLACHOWSKY et al. (2005) hosszú távú, 10 (10*12 hét) generációs etetési kísérletet végzett fűrjekkel. A táp Bt kukoricát tartalmazott. Az eredmények szerint a transzgén DNS fragmentuma (211 bp) kimutatható volt a gyomorból és a béltraktusból, míg az izomszövet, a máj, a vese, a lép, a szív és a tojások negatívnak bizonyultak.

DUGGAN et al. (2000) vizsgálták, hogy a kérődzők gyomrában a GM-tápból a transzgén átkerülhet-e a bendőbaktériumokba. Úgy találták, hogy a bendőben a transzgén gyorsan lebomlik. PUSZTAI and BARDÓCZ (2004) szerint ez a rövid idő is elég lehet arra, hogy a bendő-baktériumok felvegyék a transzgént, azaz bekövetkezzen a génátvitel, bár jelen publikációban feltevésüket kísérleti eredményekkel nem támasztották alá.

EINSPANIER et al. (2001) Bt kukoricát tartalmazó táppal etettek szarvasmarhákat és csirkéket, annak érdekében, hogy vizsgálják, kimutatható-e különböző szervekből, szövetekből (izom, máj, lép, vese). Vizsgálataikat PCR technikával végezték, mely során egy esetben sem sikerült a Bt-gén fragmentumát detektálni (189 bp). Rövid kukorica kloroplasztisz gén részletet néhány esetben detektáltak. Ezeket az eredményeket egy USA által koordinált kísérletsorozatban is megerősítették, vagyis a Bt toxint kódoló gént, vagy génrészletet nem sikerült állati szövetekből, tejből és tojásból PCR technika segítségével kimutatni (AUMAITRE et al. 2002). Ezt támasztották alá POMS et al. (2003) eredményei is, mely során bizonyították, hogy bár a kukorica invertáz gén és a szója lektin gén jelenléte igazolható, de a génmódosított összetevőkre a vizsgált tejminták negatívak voltak.

AULRICH et al. (2002) szarvasmarha- és csirkeetetési kísérleteket hajtottak végre Bt kukoricát tartalmazó táppal. Vizsgálataik során bizonyították, hogy transzgén DNS fragmentumok nem mutathatók ki sem a másodlagos állati termékekből (tojás, hús, tej) sem a különböző szövetekből (izom, máj, lép, vese).

PHIPPS et al. (2002) kutatásaik során szarvasmarhákat etettek génmódosított (RR) szóját tartalmazó táppal és vizsgálták, hogy a CP4-EPSPS gén kimutatható-e a tejből. Az etetési kísérlet 12 hétig végezték és a 3. 4. és a 12. héten vettek mintákat a transzgén jelenlétének vagy hiányának vizsgálatára. Az eredmények szerint a vizsgált mintákból egyetlen esetben sem sikerült PCR módszerrel kimutatni a fent említett gén jelenlétét. A táp 26,1% szójalisztet tartalmazott szárazanyagra vonatkoztatva. PHIPPS et al. (2003) etetési kísérleteit folytatva, GM szóját és kukoricát tartalmazó táppal végzett szarvasmarha etetési kísérleteket, mely során vizsgálta többek között a CP4-EPSPS és cry1A(b) gén jelenlétét a bendőben, a nyombélben, a tejben, a vérben és a székletben. Eredményeik szerint a transzgén jelenlétét a bendő szilárd fázisából és a nyombélből lehetett kimutatni. A széklet minden esetben negatív volt, mely azt jelenti, hogy a DNS a bélrendszerben degradálódott. A vizsgált tej és vérminták mindegyike szintén negatív volt.

TRABALZA-MARINUCCI et al. (2008) 3 éves hosszútávú etetési kísérleteket végzett 53 anyajuhhal és utódaikkal. A kísérletben használt táp Bt 176-os kukoricát tartalmazott. Számos vizsgálatot végeztek, melyek között szerepelt a transzgen DNS kimutatásának vizsgálata májból, lépből, hasnyálmirigyből, éhbélből, vérből, bendő folyadékból és a bendő baktériumflórájából (vizsgálva ezzel a horizontális géntranszfer lehetőségét). Az eredmények alapján az összes minta negatívnak bizonyult, vagyis a transzgen jelenléte nem volt kimutatható a vizsgált mintákból.

REUTER and AULRICH (2003) Bt kukoricát tartalmazó táppal végeztek sertésetetési kísérleteket, mely során a végbélből sikerült kimutatni a transzgen DNS fragmentumát, szemben a szervekből, vérből és szövetekből, mely minták negatívak voltak.

CHOWDHURY et al. (2003b) StarLink CBH351 GM kukoricát tartalmazó táppal végeztek sertésetetési kísérleteket és kimutatták a cry9C gént a vakbél és a végbél tartalmából. Ezzel a kísérlettel bizonyították, hogy a DNS nem bomlik le teljesen a béltraktusban. CHOWDHURY et al. (2003a) további etetési kísérletekkel végeztek eredményeik alátámasztására. A 28 napon át tartó sertésetetési kísérlet során 60% Bt 11 GM kukoricát tartalmazó táppal etettek sertéseket, majd mintát vettek az állatok vérből és a bélrendszer különböző szakaszaiból származó béltartalomról. Vizsgálták a DNS degradációját, mely kísérletek során a cry1A(b) gén 110 bp és 437 bp nagyságú fragmentumát mutatták ki a béltraktus különböző szakaszaiból a végbél tartalmát is beleértve. A vérminták a cry1A(b) génre nézve minden esetben negatívak voltak. A béltraktusban és a végbél tartalomban cry1A(b) fehérjét is detektáltak.

JENNINGS et al. (2003b) szintén sertésetetési kísérleteket végzett különböző %-ban RR szóját tartalmazó táppal. A vizsgálat során a növekedés különböző fázisaiból vettek mintákat az izomból (bélszín) és vizsgálták a CP4-EPSPS gént kódoló régió egy 272 bp hosszú fragmentumának és a lektin génnek a jelenlétét (198 bp). A vizsgált minták mindkét fragmentumra negatívak voltak a Southern blot-tal kombinált PCR-es vizsgálatok során. Ugyanebben az évben publikálták csirkeetetési kísérleteiket is, mely 60% GM kukoricát tartalmazó táppal történt (MON810). A vizsgálatok során 42 nap után mintát vettek a csirkék mellizmából és vizsgálták a cry1A(b) gén (213 bp) jelenlétét. A minták mindegyike negatív volt (JENNINGS et al. 2003a).

MAZZA et al. (2005) 35 napos GM (MON810) kukoricát tartalmazó táppal végeztek sertésetetési kísérletet. A cry1A(b) gén rövid fragmentumát mutatták ki vérből, májból, lépből, veséből. Az intakt cry1A(b) gént egyetlen esetben sem detektálták.

TUDISCO et al. (2006) génmódosított szójjával végeztek nyületetési kísérletet, ahol a vizsgálatok során nézték az idegen gén átkerülését a szervekbe (növényi DNS, lektin gén, 35S promóter). A növényi DNS jelenlétét több szervből is kimutatták, viszont a mintákból nem sikerült a lektin gént és a 35S promótert detektálni. Következő évben publikált kísérleteik során kecske anyaállatokat etettek RR szójját tartalmazó táppal. A vizsgálatok lényege azt volt, hogy a borjak szoptatása és nevelése alatt átkerülhet-e az idegen gén a különböző szervekbe. Vizsgálták a növényi DNS, a lektin gén és az idegen gén átjutását (CP4-EPSPS, 35S promóter). A növényi DNS és a lektin gén jelenlétét több mintából sikerült kimutatni. Példaként, a növényi DNS jelenléte a májban a minták 91,6%-ában, a lektin gén jelenléte a minták 36,4%-ában kimutatható volt. A 35S promóter és az CP4-EPSPS gén jelenlétét igazolták a májban (50% és 16,6%), a vesében (80% és 40%), az izomban (40% és 60%), a lépben (25% és 25%), a szívben (25% és 75%) és a vérben (75% és 25%). Az eredmények alapján arra következtettek a szerzők, hogy a szoptatás során, a tejen keresztül is megtörténhet a géntranszfer (TUDISCO et al. 2007).

SANDEN et al. (2004) lazacetetési kísérletet hajtott végre GM szójját tartalmazó táppal, annak érdekében, hogy vizsgálja az idegen DNS túlélését (EPSPS gén /120 bp/, 35S promóter /195 bp/, lektin gén 180 bp /) a béltraktusban. A vizsgálatok során a 120 bp nagyságú fragmentumot sikerült detektálni a gyomorból, és a bélcsatorna különböző szakaszaiból. A kísérlet folytatásaként GM élelmiszerből származó idegen DNS felvételét vizsgálták *in vivo* és *ex vivo* lazacetetési kísérlettel. Kísérleteik során a bélrendszer egyes részleteit vizsgálták *in situ* hibridizációs (ISH) és PCR technikával. Az ISH technikával történt a felvett idegen DNS helyének a meghatározása, az eredményeket pedig PCR technikával igazolták. A vizsgálatok során a 35S promóter és a növényi DNS kapcsolódási részre tervezett primerekkel dolgoztak (211 és 305 bp). Az idegen DNS-t sikerült kimutatni a középbél kötőszöveti rétegéből illetve a sejtek vakuolum rendszeréből is. Kísérleteikből az is kiderült, hogy intenzív stressz hatására a lazac bélrendszerének makromolekula felvevő hatása megváltozhat (SANDEN et al. 2007).

NIELSEN et al. (2005) PCR módszerrel több különböző hosszúságú GM fragmentumot szintetizáltak és hozzákeverték a lisztte őrölt táphoz víz segítségével. Így a tápok mindegyike átlagosan 1×10^{11} kópiát tartalmazott adott GM DNS-ből. A vizsgálatokat lazacetetési kísérletben végezték, mely során a fent említett őrölt GM DNS-t tartalmazó tápból 0,5 ml-t intubáltak (adagoltak fecskendővel) az állatokba 1, 2, 4, 8, 16, 32 és 64 órás időpontokban. A kísérletek során a májból, veséből és a vérből sikerült detektálni a 81 bp, 84 bp és 151 bp hosszúságú szakaszt. A legtöbb esetben a 8. órában mérték a legnagyobb koncentrációban a különböző idegen DNS-ek kópiaszámát. További kutatásaik során intravénásan a vérbe fecskendeztek meghatározott kópiaszámban (1×10^{10}) GM DNS-t tartalmazó oldatot.

Eredményeik szerint 0,5 és 1 órával az intravénás adagolás után a vérben és minden vizsgált szervben detektálták az idegen DNS-t a májból, a veséből, a húsból és az ivarmirigyekből is. Néhány szövetmintánál 24 órával az injektlás után is kaptak pozitív eredményeket. A PCR-es vizsgálatok során RR szója, 35S promóter és cry1 gén specifikus primereket használtak. Eredményeik azt mutatják, hogy a DNS felszívódhat a vérben, mely képes elszállítani azt a különböző szervekbe, izomba (NIELSEN et al. 2006).

***In vitro* sejtvonalon és *in vivo* humán kísérletek eredményei:** MARTIN-ORÚE et al. (2002)

RR szója és Bt kukorica degradációját vizsgálták humán gyomor és vékonybél szimulációval. A megfelelő *in vitro* körülményeket teremtve, kutatásaik során azt találták, hogy a GM élelmiszerből származó transzgén túlélhet mind a gyomorban, mind a vékonybélben körülbelül 4 óra hosszúig. Kutatások szerint a gyomorban nem található DNáz I enzim, így a DNS degradációért az alacsony pH a felelős. A vékonybélben a növényi sejtek lizálnak és a DNS kiszabadul a sejtekből. *Ex vivo* kísérletek szerint a legnagyobb mértékű DNS degradációt a bélrendszer felső szakaszában, a nyombélben és az éhbélben figyeltek meg, ami valószínűleg a magas pankreáz enzim aktivitásnak köszönhető. Így a bélrendszer alsóbb régiójában alacsonyabb mértékű a degradáció (WILCKS et al. 2004).

NETHERWOOD et al. (2004) tanulmányaik során az EPSPS gén túlélését vizsgálták a newcastle-i egyetemen humán kísérletekkel. Vizsgálataik során hét olyan beteggel végeztek kísérletet, akiknek a vastagbélét valamilyen megbetegedés miatt kioperálták. Ezekben az emberekben a vékonybél végét a hasfalon át kivezették, így a táplálék megemésztetlen része (a béltartalom) a bélfalhoz erősített cserélhető tárolóban gyűlt össze. A hét betegnek egyszeri alkalommal genetikailag módosított szójából készült hamburgert és shake-et adtak és nézték, hogy milyen mértékben bomlott le a bélrendszerükben a transzgén DNS. Bár különböző mennyiségben, de minden egyes beteg béltartalmából ki lehetett mutatni a GM-szója transzgén szekvenciáját. A bélflóra tenyésztési vizsgálatai során néhány mintából több generáción keresztül is kimutatható volt a szója transzgénje. A kísérlet másik felében egészséges emberekkel etették ugyanazt a GM-szójából készült ételt, de a székletből már nem tudták a transzgént kimutatni, így valószínűleg a transzgén a vastagbélben elbomlott.

Mivel a fent említett cikkekből kitűnik, hogy az adatok igen ellentmondásosak, így szükség lenne hosszú távú, több generációs etetési kísérletekre, melyek kiterjednek a bélcsatornában történő DNS degradáció vizsgálatára, a szervekbe, izomba történő átkerülés lehetőségének vizsgálatára, az állatok fejlődésének (össz tömeg, szervsúly) illetve szövetek mikroszkópos vizsgálatára.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A különböző gazdaságilag jelentős gént tartalmazó genetikailag módosított növények jelentős fejlődésen mentek keresztül az elmúlt években. Az elsőként kifejlesztett, termesztett és élelmiszeriparban felhasznált FlavrSavr paradicsomot számos GM növény követte. Az első generációs GM-növények közül az RR szója a legjelentősebb, melyet 2004-ben már több mint 40 millió ha-on termesztettek. Felhasználják a legtöbb állat takarmányozására, emellett élelmiszeripari alkalmazása is számottevő. Mivel a GM növények a természetben ilyen formában elő nem forduló vektor konstrukciókat tartalmaznak, ezek emberi-, állati szervezetre gyakorolt hatása teljes mértékben még nem ismert, így a fogyasztók egy része kétségekkel fogadja termesztésüket és élelmiszeripari alkalmazásukat.

A fogyasztói érdekeket figyelembe véve az Európai Unió rendeletekkel szabályozza a genetikailag módosított termények, szervezetek kibocsátását, forgalmazását, nyomon követését és jelölését. A rendelet betartásának érdekében számos deklarált GMO kimutatási módszert fejlesztettek ki, többek között a Joint Research Center (JRC) referencia módszerét (VAN DEN EEDE et al. 2000), amelyre vizsgálataim nagy részét építettem. A módszer kidolgozásához többnyire takarmányokat, gabonaipari nyers- és alapanyagokat (szójabab és liszt), valamint néhány készterméket (keksz, bébitápszer) használtak. Viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a különböző élelmiszer-technológiai eljárásoknak, fizikai, kémiai hatásoknak kitett, összetett élelmiszer-mátrixokból (húsipari és édesipari termékek) történő GMO kimutatásra.

A fentiek mellett nagyon fontos a GMO-k élelmiszerbiztonságra gyakorolt hatásának vizsgálata, mivel az erre vonatkozó szakirodalmak száma is igen csekély.

Ezek alapján dolgozatomban az alábbiak vizsgálatát tűztem ki célul:

- Különböző technológiai fázisokból származó, félüzemi körülmények között előállított GM szóját tartalmazó modell hústermékek vizsgálata egyszerű PCR módszerrel, vizsgálva ezzel az egyes fizikai hatásokra bekövetkező DNS degradációt, valamint azt, hogy a degradáció befolyásolja-e kimutathatóságot,
- A JRC által javasolt DNS izolálási módszerek adaptálása, tesztelése és továbbfejlesztése különböző feldolgozottságú élelmiszer-mátrixokból történő DNS izolálására. Költség hatékony háromfázisú megoszláson alapuló (HFM) DNS kivonási módszer továbbfejlesztése, optimalizálása valamint DNS izolálási technika kidolgozása kereskedelmi forgalomból származó, DNS extrakció szempontjából kritikus kakaó tartalmú (csokoládé, csokoládé tartalmú nápolyi) mintákra,
- az EU által előírt 0,9%-os jelölési kötelezettség betartásának vizsgálata kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerek kvalitatív és kvantitatív GM tesztelésével,
- Roundup Ready szója expressziós vektorjában megtalálható karfiol mozaikvírus 35S promóter tápcsatornából történő kimutathatósága és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata állatetetés kísérletekkel, a JRC által javasolt GMO kimutatási módszer használatával és adaptálásával.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Vizsgálati anyagok, előállításuk és mintavételezés

4.1.1. Roundup Ready szója kimutatásának vizsgálata élelmiszermintákból

4.1.1.1. Félüzemi körülmények között előállított modell húsminták

A vizsgálati mintákat a Hajdú BÉT RT, debreceni és mezőkovácsházi üzemében állították elő. A húsminták pulykahúst tartalmaztak és a termékeket 0,5%; 1%; 1,5%; és 2%-ban Roundup Ready szójaliszttel keverték, melyekből a következő termékeket állították elő (a minták pontos összetétele gyártási titok).

Baromfi párizsi

A nyers, formázott termékeket füstölő-főzőszekrényben hőkezelték, megfelelő paraméterek mellett. Főzés: 80°C-on 70 perc, hőntartás: 72°C-on, 20 perc. A hőkezelt termék hűtése hideg vizes zuhany alatti előhűtés után hűtőalagútban történt 10°C alatti maghőmérsékletre. A GMO vizsgálat során két ponton történt a termékből mintavételezés:

- nyers, formázott párizsi minták,
- hőkezelt párizsi minták.

Baromfi vagdalt

A panírozott termékek elősütése forró napraforgó étolajban 180°C-on 40 másodpercig, az utósütése pedig forró levegős sütőben 185°C-on 5 percig, 82°C maghőmérsékletig történt. A gyorsfagyasztást FRIGOSCANDIA egyedi spirál-fagyasztóban végezték -38°C-on, 70 percig -18°C maghőmérsékletig. A panírozott vagdalthús előállítása során a termékből öt ponton történt mintavételezés:

- nyers, formázott vagdalthús minták,
- panírozott vagdalthús minták,
- olajban elősütött vagdalthús minták,
- gőzzel készre sütött vagdalthús minták,
- fagyaszott vagdalthús minták.

A formázott nyers masszából különböző konyhatechnikai eljárásokkal is készítettek mintákat. Mindhárom esetben a fagyasztott állapotú vagdalt húsból indultak ki.

Az első eljárás során Zanussi légkeveréses sütővel a vagdaltakat 225°C-on sütötték 15 percig 89-90°C maghőmérsékletig. A második kezelés mikrohullámú sütővel történt 500 watt teljesítményen 6 percig, 78-80,5°C maghőmérsékletig. A harmadik esetben De Longhi kontakt grillsütőben a vagdaltakat két oldalon, közepes sütési fokozaton 5 percig hőkezelték 76-82°C maghőmérsékletig.

Pulyka májkonzerv üzemi gyártása

A nyers, májkrémet tartalmazó konzervdobozokat autoklávban 121°C-on 50 percig 115 °C maghőmérsékletig hőkezelték, majd nyomás alatt 25-30°C-os maghőmérsékletig hűtötték. A vizsgálat során két ponton történt a termékből mintavételezés:

- nyers májkrém minták,
- sterilizett májkrém minták.

4.1.1.2. Kereskedelemről származó mintacsoportok

A GMO vizsgálataim során kereskedelemről származó élelmiszermintákat is vizsgáltam, mely az alábbi mintacsoportokba csoportosítható:

- **Húskészítmények:** formában vagy bélben főtt, pácolt húsok; aszpikos termékek; felvágottak; párizsi minták, virsli minták; májasok; húskonzervek; májkrémek; gyorsfagyasztott húskészítmények,
- **Bébiételek:** tejpép porok, bébiétel konzervek,
- **Levesbetétek**
- **Pizzák és makaróni szószok**
- **Édességek:** pudingporok, kekszek, nápolyik, csokoládék,
- **Szójatermékek:** szójaital, szójaszósz, szójakocka, szójagranulátum, szójacsíra, tofu.

A minták kiszereleési egységenkénti teljes mennyiségét háztartási kutterben aprítottam, homogenizáltam (4x0,5 perc) szobahőmérsékleten. Az egyes minták aprítása között a kuttert mosószeres vízzel majd DNS eliminálóval (Qiagene) tisztítottam és desztillált vízzel öblítettem. A homogenizált mintából 10 g-ot steril centrifugacsőbe mértem, majd felhasználásig -18 °C-on tároltam.

4.1.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetelési kísérletben – vizsgálati minták

Előzetesen 5 napig szójamentes (félszintetikus táp tojásfehérjével keverve) diétán nevelt Wistar törzsű hím patkányokat alkalmaztam a kísérletekhez (5 állat/csoport). Az állatokat ezután 10% összfehérje tartalmú táppal etettem, mely fehérjeforrásként szójalisztet tartalmazott. A liszt RR szója tartalmát keveréssel állítottam be 0,9%, 2,5% és 50%-ra. A 14 napos etelési kísérlet után a túlaltatását követően az állatokból eltávolítottam a lépet, májat, hasnyálmirigyet, vesét, belet, gyomrot, mintát vettem az izomból, és fiziológiás sóoldattal mostam a belet és a gyomrot. A mintákat -18°C-on tároltam felhasználásig. A kontroll csoport GMO mentes szójával előállított tápot kapott.

4.1.3. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata csirkeetelési kísérletekben - vizsgálati minták

A Master-M Kft. kisvárdai baromfifeldolgozó üzemében történt az etelési kísérlet 2,5%-ban RR szóját tartalmazó takarmánnyal. A kontroll csoport GM mentes szóját tartalmazó tápot kapott. A neveltetés 42 napon keresztül történt, mely időszak során háromszor történt tápváltás. Mintavétel a baromfi neveltetés során 5 időpontban, a különböző etelési fázisokból véletlenszerűen történt. A mintavételi időpontok a következők voltak:

- betelepített napos csibe
- szuper intenzív előindító takarmány etelési fázisa
- szuper intenzív indító takarmány etelési fázisa
- szuper intenzív nevelő takarmány etelési fázisa
- vágóvonal

Minden mintavételnél az állományból 3 db állatot vizsgáltam, melyekből eltávolítottam az izmos gyomor külső és belső részét, a mirigyos gyomrot, a begyet, a belet, a hasnyálmirigyet, a bélfodri nyirokcsomót és a májat, mintát vettem továbbá a combból és a mellhúsból. A belet (5-10 ml a nevelési fázistól függően) fiziológiás sóoldattal mostam ki. A mintákat steril szikével aprítottam és -18°C-on tároltam felhasználásig.

4.2. Oldatok és reagensek

4.2.1. Oldatok és reagensek a DNS izoláláshoz

Promega Wizard kittel történő DNS izolálás vegyszerei:

- Wizard puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS)
- 5 M guanidin-hidroklorid oldat (Sigma)
- 20 mg/ml proteináz-K enzim oldat (Sigma)
- 80%-os 2-propanol (Merck)
- TE puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0))

CTAB DNS izolálási módszer vegyszerei:

- CTAB puffer (50 mM cetil-trimetil ammónium-bromid; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA)
- Kloroform (Reanal)
- 70%-os etil-alkohol (Merck)
- TE puffer

Háromfázisú megoszláson alapuló DNS izolálási módszer vegyszerei:

- TNE puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS)
- 5 M guanidin-hidroklorid oldat
- 20 mg/ml proteináz-K enzim oldat
- telített ammónium-szulfát (Reanal)
- 100%-os 2-propanol (Merck)
- 70%-os etil-alkohol (Merck)
- TE puffer

Ioncserés kromatográfiával történő DNS izolálás vegyszerei:

- DEAE cellulóz (0,6-0,8 meq/g Reanal)
- Start puffer (50 mM (pH 8,0) Trizma, 250 mM NaCl)
- Eluáló puffer (50 mM (pH 8,0) Trizma, 750 mM NaCl)
- Sephadex G25-ös és G50-es gél (Pharmacia)
- TE puffer

4.2.2. Oldatok és reagensek a polimeráz láncreakcióhoz

Egyszerű polimeráz láncreakció reagensei:

A szója specifikus PCR-es vizsgálatok során a REDTaq PCR ReadyMix-et használtam, a GMO specifikus vizsgálatok során (35S, nos) pedig egy jóval specifikusabb és érzékenyebb JumpStart REDTaq PCR Ready Mix-et.

- REDTaq PCR ReadyMix (Sigma) (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% zselatin, 0,2 mM dNTP, stabilizálók, 0,75 U Taq DNS polimeráz), primerek, PCR tiszta steril víz (Sigma)
- JumpStart REDTaq PCR ReadyMix (Sigma) (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,001% zselatin, 0,2 mM dNTP, festék, stabilizálók, 0,75 U Taq DNS polimeráz, Jump Start Taq antitestek), primerek, PCR tiszta steril víz

Real-time (valós idejű) polimeráz láncreakció reagensei:

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (0,2 mM dATP, dCTP, dGTP és 0,4 mM dUTP, 4 mM MgCl₂, 1,25 U DNS polimeráz és 0,25 U UNG /Uracil-N-glikoziláz/), primerek és próbák (TaqMan), PCR tiszta steril víz

4.2.3. Oldatok és reagensek a termékanalízishez

- Tris-Bórsav-EDTA elektroforézis puffer (TBE puffer), pH 8,0 10x törzsoldat (108 g Tris bázis, 55 g bórsav, 40 ml 0,5 M Na₂EDTA)
- 2%-os agaróz-gél oldat TBE pufferben DNS fragmentum analízishez (1 µg/ml etídium-bromid desztillált vízben)
- 10%-os "mini" gél oldat a PCR termékek analíziséhez 1 mm vastag gél kész gélkazettába (Invitrogen) öntve (1,65 ml akrilamid-biszakrilamid (29:1) oldat, 0,5 ml TBE puffer (10x törzsoldat), 2,85 ml desztillált víz, 4 µl TEMED, 40 µl 10%-os ammónium-perszulfát oldat)
- Gélfestő oldat SYBR Green I (Sigma)
- DNS Bázispár hossz standard (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000 bp - Sigma)
- DNS Bázispár hossz standard (125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp - Fermentas)

4.3. Vizsgálati módszerek

GMO vizsgálataim során a Joint Research Center (Ispra) által javasolt módszert használtam. A vizsgálat első lépése a megfelelő mennyiségű és minőségű DNS izolálása a mintából. A második lépésben egy kontroll PCR reakcióval megállapítható, hogy a minta PCR tiszta-e, vagyis tartalmaz-e láncreakció inhibitorokat. A harmadik lépésben két specifikus reakció segítségével eldönthető, hogy a minta tartalmaz-e a GM előállítás során alkalmazott szabályozó DNS szekvenciákat (35S promotert és/vagy *nos* terminátort). A specifikus reakciók termékének további vizsgálatával dönthető el, hogy a várt terméket kaptuk-e (VAN DEN EEDE et al. 2000).

4.3.1. DNS izolálás

A modell húsminták és a kereskedelmi minták esetében Wizard, Amicon ultraszűrővel kombinált Wizard (50 bp vágási határérték), proteináz-K enzimmel kombinált CTAB, háromfázisú megoszláson alapuló (HFM) és ioncserés kromatográfiás módszert használtam. Mindkét DNS túlélés vizsgálat esetén a DNS izolálás minden esetben Wizard módszerrel történt. A patkányetetési kísérlet során a gyomrot 2 ml, a belet 4 ml, csirkeetetési kísérlet esetében pedig a belet 5-10 ml fiziológiás sóoldattal mostam ki (nevelési fázistól függően). Ezen minták kevés DNS-t tartalmaztak, így az izolálás előtt Amicon ultraszűrő segítségével (proteináz K enzimes emésztés után) koncentráltam.

Wizard módszer:

- 300 mg homogenizált mintát steril csőbe mértem és ezt követően 860 µl extrakciós puffert (TNE), 100 µl 5 M-os guanidin hidrokloridot és 40 µl 20 mg/ml proteináz K enzimet pipettáztam a mintához. Alaposan összekevertem és 3 órán keresztül 60°C-on rázógépből inkubáltam.
- Inkubálás után a mintát 10 percig 12400 rpm-en centrifugáltam (Eppendorf csövekkel kompatibilis AB2.14 típusú szögrotor, Jouan BR4i centrifuga). Az 500 µl felülúszót átpipettáztam 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe, majd 1-1 ml Wizard gyantát adtam hozzá.
- A keveréket átforgattam, majd minioszlopon fecskendő segítségével átnyomtam, így a DNS-t tartalmazó gyanta az oszlopban lévő szűrőn fennmaradt.

- Az oszlopon lévő mintákat 2 ml 80%-os 2-propanollal mostam szintén fecskendő segítségével, majd a maradék 2-propanolt centrifugálással (12400 rpm, 2 perc) távolítottam el.
- A minioszlopról 50 µl, 70°C-os TE puffer segítségével eluáltam a megkötött DNS-t (12400 rpm, 2 perc).
- A DNS-t hígítottam (50 ng/µl) és -18°C-on tároltam felhasználásig (ZIMMERMANN et al. 1998).

Amicon ultraszűrővel kombinált Wizard módszer:

- Kevés DNS-t tartalmazó minták esetében alkalmaztam ezt a módszert (pl.: szójatej, híg bébiételek, bélfolyadék). 4 ml mintát emésztettem (3 óra, 60°C) 2 ml Wizard pufferrel, 500 µl 5 M-os guanidin hidrokloriddal és 100 µl (20 mg/ml) proteináz K enzimmel.
- Inkubálás után a mintát 10 percig centrifugáltam (12400 rpm).
- 4 ml felülúszót Amicon ultraszűrő (Millipore) segítségével (vágási érték 30000 Dalton = 50 bp duplaszálú DNS) a mintákat betöményítettem kétszer-háromszor 10 percig (15 ml-es csövekkel kompatibilis R20 típusú kilendülő rotor, Jouan BR4i centrifuga) történő centrifugálással 500 µl-re, majd 1-1 ml Wizard gyantát adtam és az előzőekben leírt Wizard módszer szerint folytattam tovább a DNS izolálást. ZIMMERMANN et al. (1998) módszerére támaszkodva módosítottam a DNS kivonási technikát.

Proteináz K enzimmel kombinált CTAB módszer:

- 1 g mintát steril 15 ml centrifugacsőben 5 ml CTAB pufferrel, 50 µl proteináz K enzimmel (20 mg/ml) 60°C-on 2 órán át inkubáltam.
- Az oldatot ezután 10 percig, 4000 rpm-en centrifugáltam (15 ml-es csövekkel kompatibilis R20 típusú kilendülő rotor, Jouan BR4i centrifuga), majd a felső fázishoz (3 ml) 60 µl (20 mg/ml) RNáz enzimet adtam és 60°C-on 5 percig inkubáltam.
- A 3 ml felső fázist 1 ml kloroformot tartalmazó csőbe tettem, majd 30 másodpercig kevertettem és ezt követően 10 percig centrifugáltam (12400 rpm). A felső fázis 2 ml-éhez 2 ml 100%-os 2-propanolt adtam és szobahőmérsékleten 30 percig állni hagytam.
- 10 percig centrifugáltam (12400 rpm; Eppendorf csövekkel kompatibilis AB2.14 típusú szögrotor, Jouan BR4i centrifuga), majd a felülúszót eltávolítottam és a pelletet 200 µl TE pufferben oldottam vissza (60°C, 10 perc inkubáció).
- Vortex után a vissza nem oldódott anyagokat centrifugálással távolítottam el (2 perc, 12400 rpm).

- A DNS-t hígítottam (50 ng/μl) és -18°C-on tároltam felhasználásig (ZIMMERMANN et al. 1998).

Háromfázisú megoszláson (HFM) alapuló DNS izolálási módszer:

Első lépésben az irodalom alapján (BAILEY and OLLIS 1987) kiválasztott sókat (MgSO₄, KCl, (NH₄)₂SO₄, natrium-citrát) teszteltem 30%-os relatív telítésen. Szerves oldószerként a tercier butanolt és az izopropanolt választottam. A sók teszteléséhez modell oldatot készítettem, mely tartalmazott szója fehérjét (15,5 mg/ml), tiszta csirke vörösvértest DNS (Reanal) (1 mg/ml) és szója olajat (3 v/v%). Optimalizálás után ammónium-szulfáttal és izopropanollal dolgoztam tovább és 30%, 40%, 50%, 60%-os relatív ammónium-szulfát telítésen vizsgáltam a fehérje, illetve a DNS határfelületre jutását.

Az általam továbbfejlesztett és optimalizált háromfázisú DNS izolálási módszer lépései:

- 600 mg homogenizált mintát steril csőbe mértem és ezt követően 1780 μl extrakciós puffert (TNE), 200 μl 5 M-os guanidin hidrokloridot és 40 μl proteináz K enzimet (20 mg/ml) pipettáztam a mintához. Alaposan összekevertem és 2 órán keresztül 60°C-on inkubáltam.
- Inkubálás után a mintát 10 percig centrifugáltam (12400 rpm; Eppendorf csövekkel kompatibilis AB2.14 típusú szögrotor, Jouan BR4i centrifuga).
- 1-1 ml telített ammónium-szulfátot pipettáztam steril csövekbe, melyekre 1 ml-t adtam a centrifugált minták felülúszójából (50%-os relatív telítés).
- Rövid idejű vortexezés után 860 μl 100%-os 2-propanolt adtam a mintához, összeráztam és 2 percig centrifugáltam (4000 rpm).
- 2,25 ml telített ammónium-szulfát oldatot mértem steril 15 ml-es centrifuga csövekbe, majd a centrifugált minták alsó fázisából 1,5 ml-t adtam hozzá (80%-os relatív telítés).
- Rövid vortexezés után hozzáadtam 1,6 ml 100%-os 2-propanolt, jól összeráztam és 2 percig centrifugáltam (4000 rpm).
- A középső fázist átpipettáztam steril Eppendorf csövekbe, majd újra centrifugáltam 2 percig (12400 rpm), a maradék víz eltávolítása céljából.
- A maradék víz eltávolítása után a pelletet 250 μl 70%-os etil alkohollal mostam, a maradék só és kis molekulájú szerves vegyületek eltávolítása céljából.
- Centrifugálás után (5 perc, 12400 rpm) az etanolt eltávolítottam és a pelletet vákuum alatt szárítottam

- A csapadékot 200 μ l TE pufferben (70°C) oldottam vissza. Az esetlegesen vissza nem oldódott részt centrifugálással távolítottam el (12400 rpm, 1 perc).
- A DNS-t hígítottam (50 ng/ μ l) és -18°C-on tároltam felhasználásig.

DEAE cellulóz ioncserés kromatográfias módszer:

- 1,5 g homogenizált mintát steril 15 ml-es centrifugacsőbe mértem és 4 ml extrakciós puffert (TNE), 500 μ l 5 M-os guanidin hidrokloridot és 100 μ l (20 mg/ml) proteináz K enzimet pipettáztam a mintához. (Egyes mintáknál, melyek nagyon magukba szívták a nedvességet, dupla annyi puffert adagoltam). A mintákat alaposan összekevertem és 3 órán keresztül 60°C-on inkubáltam.
- A mintákat lecentrifugáltam (4000 rpm, 5 perc), majd a felülúszót Sephadex G50 rétegen tükrösre szűrtem (KREMMER 1974).
- A kapott mintákat DEAE-cellulóz oszlopra vittem, majd Start pufferrel mostam (10ml) a nem kötődött komponensektől való elválasztás céljából (detektálás a 260 nm-en mért fényelnyelés alapján).
- A tisztítás után az oszlopon megkötődött DNS-t 3 ml 750 mM-os NaCl tartalmú 50 mM-os (pH 8,0) Trizma pufferrel eluáltam.
- Az oszlopról lejövvő DNS oldatot 3 frakcióba gyűjtöttem (3*1 ml) és a második frakciót Sephadex G25 gélen (KREMMER 1974) áteresztettem sómentesítettem céljából (4 ml gyanta + 1 ml minta).
- A mintát sómentesítés után Amicon ultraszűrő segítségével (vágási érték 30000 Dalton = 50 bp duplaszálú DNS) töményítettem (1000 μ l-t 100 μ l-re).
- A DNS-t hígítottam (50 ng/ μ l) és -18°C-on tároltam felhasználásig.

A módszert BECKER et al. (1996), LEVISON et al. (1998) és KREMMER (1974) publikációi alapján fejlesztettem.

4.3.2. A kivont DNS tisztaságának meghatározása

A DNS oldat koncentrációját és a tisztaságára jellemző R értéket spektrofotometriás analízissel határoztam meg a 260 nm és 280 nm-en mért elnyelés hányadosa alapján. A DNS izolálást a vizsgálatától függően két illetve három párhuzamos mintával végeztem (ZIMMERMANN et al. 1998). A DNS fragmentumok nagyságának változását a modellekben 2%-os agaróz-gélelektroforézissel követtem nyomon.

Az elektroforézist MANIATIS et al. (1989) szerint hajtottam végre 100 V állandó feszültség mellett 45 percig, 12 µl DNS oldat/zseb mintamennyiséggel, 1x TBE pufferben LKB Midget Electrophoresis Unit készülékkel. A géleket etídium-bromid oldattal (1 µg/ml) festettem és az eredményeket KODAK EDAS 290 rendszerrel értékeltem ki.

4.3.3. DNS sokszorozás

Kutatásaim során egyszerű ill. valós idejű real-time PCR rendszert alkalmaztam. A PCR módszerhez szükséges primereket az irodalomban ismertett szekvencia információk alapján szintetizáltam. A primereket kiválasztásánál figyelembe vettem, hogy az élelmiszerek előállításánál alkalmazott hőkezelés és egyéb fizikai változások a DNS töredezését okozhatja.

4.3.3.1 Kontroll PCR

Modell és kereskedelemről származó élelmiszerminták vizsgálata egyszerű PCR módszerrel

A modell húsminták esetében szója specifikus lektin gén sokszorozásával vizsgáltam az izolált DNS inhibitor mentességét. A kereskedelemről származó élelmiszerminták esetében szintén szója specifikus gént használtam a szója jelenlétének bizonyítására. A szójalektin primereivel (GM03/GM04) a lektin gén egy 118 bp hosszúságú fragmentuma sokszorozható (MEYER et al. 1996).

A szóját nem tartalmazó kereskedelmi minták inhibitor mentességét gerinces állatokra specifikus (Scytb1/Scytb2), vagy növény specifikus primerek (B49317/A49855) segítségével ellenőriztem. A gerinces állatokra specifikus primerpár egy, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális gén 175 bp-os szakaszát sokszorozza (BRANCIARI et al. 2000), a növény specifikus primerpár pedig a kloroplasztisz DNS trnL génjének nem kódoló (konzervatív) régióját amplifikálja.

Ebben az esetben növényenként eltérő bp méreteket kaphatunk, mivel ez gén kevésbé variábilis, így önmagában alkalmas akár evolúciós vizsgálatokra is (TABERLET et al. 1991). Csokoládé és kakaó tartalmú minták esetében a PCR tisztaságot ORTOLA-VIDAL et al. (2007) által tervezett primer (rbc104f/rbc104r) segítségével ellenőriztem. Az adott primerpár a kloroplasztisz rbcL gén egy igen konzervatív régióját sokszorozza, melynek mérete 104 bp. A mintából izolált DNS PCR-rel történő sokszorozhatóságának vizsgálatával a hamis-negatív eredmények is eliminálhatók.

35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának állatkísérletes vizsgálata

A vizsgált szervminták PCR tisztaságát mind a csirkeetetési kísérlet, mind a patkányetetési kísérlet során a gerinces állatokra specifikus (Scytb1/Scytb2) primerpár segítségével ellenőriztem (BRANCIARI et al. 2000).

A kontroll PCR reakciók során alkalmazott primerek adatait és a vonatkozó referenciákat a 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat A különböző kontroll PCR reakciók során alkalmazott primerpárok adatai

Primer száma	Primer jele	Primer szekvencia (5'-3')	Referencia	Célgének
1.	A49855	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	TABERLET et al. (1991)	Eltérő bp méretű, növény-specifikus kloroplasztisz DNS szakasz (trnL gén)
	B49317	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG		
2.	Scytb1	TAT TCC TAG CCA TGC ACT ACA CA	BRANCIARI et al. (2000)	175 bp hosszú gerinces állat-specifikus mitokondriális DNS szakasz (citokróm b fehérjét kódoló gén)
	Scytb2	TAT GAT CCG TAA TAT AGG CCT CG		
3.	rbc104f	GGA GTT CCT ATC GTA ATG C	ORTOLA-VIDAL et al. (2007)	104 bp hosszú növény-specifikus kloroplasztisz DNS szakasz (rbcL gén)
	rbc104r	CGG TGG ATG TGA AGA AGT A		
4.	GM03	GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC	MEYER et al. (1996)	118 bp hosszú szója lektin-specifikus sejtmag DNS szakasz
	GM04	GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG		

Minden esetben a sokszorozást 25 µl végtérfogatban, vékonyfalú PCR csövekben végeztem el Perkin Elmer 2400 típusú készülékben. Negatív kontrollként templát DNS-t nem tartalmazó ún. blank-et alkalmaztam, pozitív kontrollként pedig az adott vizsgálatnak megfelelő húsból, szójából izolált DNS oldatot használtam. A különböző kontroll PCR reakciókat az optimalás elvégzése után az 2. táblázatban látható hőmérséklet profilokkal végeztem.

2. táblázat Az alkalmazott kontroll reakciók hőmérséklet profiljának és a templát DNS mennyiségének adatai

Primer száma	Sokszorozandó szakasz	PCR program lefutása	Ciklus-szám	Primer végkonc. (µM/reak.)	Reakcióba vitt DNS konc. (ng)
1.	Eltérő bp méretű, növény-specifikus kloroplasztisz DNS szakasz	94°C, 3 perc – hot start és 94°C, 1 perc; 55°C, 1 perc; 72°C, 2 perc; 72°C, 3 perc	35	0,5	1-5
2.	175 bp hosszú gerinces állat-specifikus mitokondriális DNS szakasz	94°C, 2 perc – hot start és 92°C, 1 perc; 50°C, 1 perc; 72°C, 1 perc 72°C, 2 perc	30	0,25	250
3.	104 bp hosszú növény-specifikus kloroplasztisz DNS szakasz	95°C, 15 perc – hot start és 94°C, 15 mp. 50°C, 30 mp.; 72°C, 30 mp. 72°C, 10 perc	30	0,1	100
4.	118 bp hosszú szója lektin-specifikus DNS szakasz	95°C, 10 perc – hot start és 95°C, 30 mp. 60°C, 30 mp.; 72°C, 60 mp. 72°C, 3 perc	35	0,25	250

4.3.3.2. GMO specifikus reakciók

Egyszerű PCR

A GMO kimutatás esetében a beépített szabályozóelemek detektálásán alapul, vagyis mind a modell és kereskedelmi élelmiszerminták, mind az állatkísérletek esetében a 35S promóter és/vagy *nos* terminátor jelenlétét vizsgáltam. A felhasznált primerpárokkal (35S-cf3/35S-cr4) a 35S promóterről 123 bp méretű, a *nos* terminátorról (HA-nos118f/HA-nos118r) pedig 118 bp méretű fragmentum sokszorozható.

A GMO specifikus egyszerű PCR során alkalmazott primerek adatait és a vonatkozó referenciát a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat A GMO specifikus PCR reakciók során alkalmazott primerpárok adatai

Primer száma	Primer jele	Primer szekvencia (5'-3')	Referencia	Célgének
5.	35S-cf3	CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG	LIPP et al. (2001)	123 bp hosszú 35S promóter- specifikus DNS szakasz
	35S-cr4	TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C		
6.	HA-nos118f	GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG		118 bp hosszú <i>nos</i> terminátor- specifikus DNS szakasz
	HA-nos118r	GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC		

Minden esetben a sokszorozást 25 µl végtérfogatban, vékonyfalú PCR csövekben végeztem el Perkin Elmer 2400 típusú készülékben. Negatív kontrollként templát DNS-t nem tartalmazó ún. blank-et alkalmaztam, pozitív kontrollként pedig az RR szójából izolált DNS oldatot használtam. A különböző GM specifikus PCR reakciókat az optimálás elvégzése után a 4. táblázatban látható hőmérséklet profilokkal végeztem.

A modell húsminták esetében a ciklusszám a különböző feldolgozottsági fokú húsmintáknál eltérő volt, így a baromfi párizsi esetében 28, baromfi vagdalt esetében 30 és a pulyka májkonzerv esetében pedig 33. A kereskedelmi minták esetében a ciklusszám minden esetben 35 volt.

A DNS túlélésének vizsgálata esetében a 35S promóter kimutatása során a lánreakció hőmérséklet profilja megegyezik a 4. táblázatban összefoglaltakkal, de a reakció érzékenységének növelése céljából a ciklusszámot 40-re, a bevitt DNS mennyiséget 250 ng-ról 500 ng-ra növeltem. Ez a DNS mennyiség még nem gátolja a PCR reakciót (ROSSEN et al. 1992).

4. táblázat Az alkalmazott GMO specifikus láncreakciók hőmérséklet profiljának lefutása

Primer száma	Sokszorozandó szakasz	PCR program lefutása	Ciklus-szám	Primer vég-koncentráció (µM/reakció)	DNS konc. (ng/reak)
5.	118 bp hosszú <i>nos</i> terminátor-specifikus DNS szakasz	94°C, 2 perc - és 94°C, 25 mp.; 64°C, 30 mp.; 72°C, 45 mp. 72°C, 7 perc	28-40	0,4	250-500
6.	123 bp hosszú 35S promóter-specifikus DNS szakasz	94°C, 2 perc - és 94°C, 25 mp.; 64°C, 30 mp.; 72°C, 45 mp. 72°C, 7 perc	28-40	0,4	250-500

4.3.4. Termékanalízis

A vizsgálatok során a PCR termékeket 10%-os poliakrilamid gélben (150x80x1 mm mini gél) futtattam. A mintákból 10-10 µl-t vittem fel a gélekre. Az elektroforézis 1 órán át, 200 V állandó feszültség mellett történt, LKB Midget Electrophoresis Unit típusú készülékkel. Futtatás után a gél 15 percig SYBR Green I. festékkel festettem és a kapott sávokat a DNS-hosszúság markerrel, valamint pozitív kontrollként használt mintára kapott sávokkal hasonlítottam össze. Az így kapott géleket UV transzilluminátor alatt vizsgáltam, majd Kodak EDAS 290 rendszerrel (EASTMAN KODAK, USA) dokumentáltam és értékeltem ki (MANIATIS et al. 1989).

4.3.5. Real-time (valós idejű) PCR (Q-PCR)

A kereskedelmi minták vizsgálata során, abban az esetben, ha az adott minta 35S promóterre és/vagy *nos* terminátorra pozitívnak bizonyult, real-time PCR segítségével meghatároztam a GMO tartalmát. A sokszorozást GeneAmp 5700 típusú készülékben (Applied Biosystems), 25 µl végtérfogatban végeztem. A reakció minden esetben 250 ng templát DNS-t, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP és 0,4 mM dUTP-t, 4 mM MgCl₂-ot, 1,25 U DNS polimerázt és 0,25 U UNG-t (Uracil-N-glüloziláz) tartalmazott. Ezen kívül a reakció tartalmazott még lektin specifikus és Roundup Ready event (esemény) specifikus primereket és a próbákat (TaqMan). A primerek és próbák adatait az 5. táblázatban foglaltam össze.

A reakció során negatív kontrollként templat DNS-t nem tartalmazó ún. blank-et alkalmaztam. A mennyiségi meghatározáshoz RR szója standard referencia anyagot (Fluka, ERM-BF410 - 0%, 0,1%; 0,5%; 1%; 2%, 5%) használtam. A PCR reakció hőmérséklet profilja a következő volt: 50°C 2 perc (1 ciklus), 94°C 10 perc (1 ciklus), majd 15 mp. 94°C és 1 perc 60°C (45 ciklus).

5. táblázat A kvantitatív PCR reakciók során alkalmazott primerpárok adatai

Primer/ próba jele	Primer/próba szekvencia (5'-3')	Vég- koncentráció (μM/reakció)	Célgének
GmaxLecF	CTT TCT CGC ACC AAT TGA CA	0,75	102 bp hosszú szója lektin- specifikus sejtmag DNS szakasz
GmaxLecR	TCA AAC TCA ACA GCG ACG AC		
GmaxLecFT (próba FAM- TAMRA jelöléssel)	CCA CAA ACA CAT GCA GGT TAT CTT GG	0,2	
RRS3JF	TAG CAT CTA CAT ATA GCT TC	0,75	85 bp hosszú RR szója esemény (event) specifikus, 3' kapcsolódás) DNS szakasz
RRS3JR	GAC CAG GCC ATT CGC CTC A		
RRS3JFT (próba FAM-TAMRA jelöléssel)	ACA AAA CTA TTT GGG ATC GGA GAA GA	0,2	

Referencia: BERDAL and HOLST-JENSEN (2001)

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

5.1. Félüzemi körülmények között előállított modell húsminták és kereskedelmi forgalomból származó élelmiszer-minták vizsgálatának eredményei

5.1.1. Modell és élelmiszer-minták DNS izolálási eredményei

5.1.1.1. Félüzemi modell húsminták DNS izolálási eredményei

Kutatásaim során, első lépésben modell húsmintákat teszteltem egyszerű PCR módszerrel annak érdekében, hogy vizsgáljam a különböző hőkezelés hatására bekövetkező DNS degradációt és ennek hatását a GMO kimutatásra. A GMO kimutatás első lépése a megfelelő minőségű és mennyiségű DNS izolálása. Az anyagok és módszerek 4.1.1.1. fejezetben részletezett vagdalthús, párizsi és májkrém minták aprítását és homogenizálását követően Wizard módszerrel végeztem el a DNS kinyerését. A különböző technológiai lépésekből vett minták azonos összetételűek voltak és azonos koncentrációban tartalmaztak szójalisztet, melyen belül csak az RR szójaliszt aránya változott (0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%). A fent említett okok miatt, ezeket az adatokat az egyes technológiai lépéseknél összevontam, átlagot és szórást számoltam. Minden minta esetében két párhuzamos DNS izolálást végeztem. A 6. és 7. táblázat ezen mintákból kinyert DNS mennyiségének és tisztaságának (R érték) átlagértékeit tartalmazza.

6. táblázat Vagdalthús, párizsi és májkrém modell mintákból Wizard módszerrel nyert DNS adatok jellemzői

Minták	Wizard tisztítás	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Nyers, formázott vagdalthús minták	6,72 \pm 0,99	1,80 \pm 0,03
Panírozott vagdalthús minták	6,24 \pm 1,44	1,77 \pm 0,02
Olajban elősütött vagdalthús minták	6,74 \pm 1,56	1,77 \pm 0,04
Gőzzel készre sütött vagdalthús minták	5,08 \pm 1,08	1,77 \pm 0,06
Fagyasztott vagdalthús minták	4,98 \pm 0,90	1,75 \pm 0,08
Párizsi minták hőkezelés előtt	6,32 \pm 0,33	1,76 \pm 0,04
Párizsi minták hőkezelés után	6,09 \pm 0,91	1,75 \pm 0,05
Májkrém minták sterilizálás előtt	20,87 \pm 1,60	1,81 \pm 0,02
Májkrém minták sterilizálás után	29,57 \pm 3,30	1,82 \pm 0,02

A táblázatból kitűnik, hogy a májkrémekből jóval nagyobb mennyiségű DNS-t sikerült izolálni. Ennek oka valószínűleg az, hogy a májban jóval nagyobb a DNS koncentráció mint az izomszövetben, a májban végbemenő igen erős anyagcsere folyamatok és eltérő szövetszerkezet miatt. A vagdalthús és párizsi minták hasonló eredményt mutattak a kinyerhető DNS mennyiségét illetően. A vagdalthús minták különböző technológiai lépések során vett mintái sem különböztek egymástól lényegesen. Mindezek oka az is lehet, hogy a Wizard gyanta DNS megkötő képessége is limitált, a kísérletek alapján elsősorban a minta összetétele befolyásolja a megkötődő mennyiséget.

7. táblázat Különböző sütési eljárásokkal elkészített vagdalthús modell mintákból Wizard módszerrel nyert DNS oldatok eredményei

Minták	Wizard tisztítás	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Vagdalthús minták kontakt grillsütővel sütvé	5,13±0,69	1,83±0,06
Vagdalthús minták mikrohullámú sütővel sütvé	6,28±0,52	1,84±0,03
Vagdalthús minták légkeveréses sütővel sütvé	7,81±1,04	1,85±0,04

A DNS izolálás eredményei alapján - megállapítható, hogy mindegyik húsminta esetén az alkalmazott WIZARD módszerrel megfelelő mennyiségű és nagy tisztaságú DNS oldatokat kaptam, melyek alkalmasnak bizonyultak a további PCR-rel történő vizsgálatokhoz.

5.1.1.2. Kereskedelmi forgalomból származó különböző mintacsoportok DNS izolálásának eredményei

Kutatásaim során kereskedelmi mintákat is vizsgáltam annak érdekében, hogy teszteljem, milyen százalékban található a magyar élelmiszerpiacon GMO-t tartalmazó élelmiszeripari termékeket. Mivel az előző fejezetben említett modell húsminták esetében a Wizard módszerrel megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t sikerült izolálnom, így legelső lépésben az élelmiszerminták esetében is ezt a módszert alkalmaztam. A DNS izolálást három párhuzamos mintával végeztem el. Azon minták esetében, ahol a Wizard módszert nem lehetett eredményesen alkalmazni, CTAB, HFM illetve ioncserés kromatográfiás módszert használtam.

A mintákból kinyert összes DNS mennyiségére és tisztaságára vonatkozó adatokat a 8-21. táblázatokban foglaltam össze. 100 mg sonka mintából átlagosan 3,0-11,23 µg DNS-t lehetett kinyerni, melyen belül néhány aszpikos termék esetében alacsonyabb koncentráció és tisztaság értékeket kaptam (8. táblázat). Ennek oka valószínűleg a zselatin volt, mely igen nagy mennyiségű (száraz állapotban 98-99%) fehérjét tartalmaz, melyet az izolálás során nem sikerült teljes egészében eltávolítani, rontva ezzel a DNS oldat tisztaságát. Elképzelhető, hogy a DNS izolálás során használt proteináz-K enzim nem tudta megfelelő mértékben elbontani a zselatint, így nem sikerült megfelelő R értékű DNS-t izolálni.

Párizsi minták esetében a párhuzamos mintákból kinyert összes DNS mennyiségére és minőségére vonatkozó adatokat a 9. táblázatban foglaltam össze. A mintákból kinyert DNS mennyisége ingadozó volt (5,47-19,50 µg/100 mg minta), ami valószínűleg az eltérő termékösszetétel miatt adódott. A tisztaságra vonatkozó adatokat vizsgálva megállapítható, hogy szinte minden termék esetében (egy esettől eltekintve: Párizsi 3) az R érték 1,7 és 2,0 közé esett.

8. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó sonka mintákból Wizard eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<i>Sonka minták</i>	<i>Wizard tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége µg/100 mg	R érték ($A_{260/280}$)
Sonka 1	9,65±0,29	1,76±0,03
Sonka 2 (aszpikos)	3,13±0,06	1,64±0,05
Sonka 3 (aszpikos)	4,85±0,47	1,77±0,09
Sonka 4	11,25±0,67	1,75±0,01
Sonka 5	10,99±0,61	1,77±0,01
Sonka 6	6,19±0,16	1,80±0,01
Sonka 7 (aszpikos)	3,00±0,08	1,66±0,04
Sonka 8	5,43±0,22	1,71±0,04
Sonka 9 (aszpikos)	3,36±0,35	1,69±0,06
Sonka 10	10,57±0,57	1,78±0,04

9. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó vörösárú mintákból Wizard eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<i>Párizsi minták</i>	<i>Wizard tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Párizsi 1	12,21±1,00	1,78±0,01
Párizsi 2	10,69±1,96	1,82±0,04
Párizsi 3	5,47±1,18	1,66±0,01
Párizsi 4	6,17±0,20	1,74±0,00
Párizsi 5	19,50±1,02	1,79±0,00
Párizsi 6	14,75±0,08	1,78±0,00
Párizsi 7	11,44±1,06	1,77±0,03
Párizsi 8	11,14±0,39	1,76±0,01
Párizsi 9	13,17±1,85	1,80±0,03
Párizsi 10	10,40±0,45	1,71±0,01
Virsli 1	12,96±1,47	1,76±0,00
Virsli 2	13,83±1,65	1,76±0,00
Virsli 3	6,75±1,41	1,66±0,06
Virsli 4	9,36±0,35	1,84±0,02
Virsli 5	8,58±0,51	1,71±0,04
Virsli 6	5,26±1,04	1,79±0,02
Virsli 7	8,65±1,45	1,78±0,03
Virsli 8	9,36±1,69	1,76±0,03
Virsli 9	8,17±1,53	1,71±0,05
Virsli 10	14,29±0,65	1,78±0,01

A virsli mintákból izolálható DNS adatait szintén a 9. táblázat tartalmazza. Az eredmények alapján elmondható, hogy ezen mintákból is nagyobb mennyiségű (5,26-14,29 $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ minta) tiszta DNS-t lehetett izolálni.

A májkrém és kenőmájas minták DNS-ének mennyiségi és tisztasági jellemzőit az 10. táblázatban tüntettem fel. A DNS szintén minden esetben megfelelő minőségű és mennyiségű volt. Ez esetben is az egyes minták között jelentős eltérések voltak, melynek oka ez esetben is valószínűleg az összetétel.

10. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó kenőmájás és májkrém mintákból Wizard eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Kenőmájás és májkrém minták</u>	<i>Wizard tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége μg/100 mg	R érték (A _{260/280})
Májkrém 1	22,95±1,28	1,82±0,01
Májkrém 2	10,60±0,60	1,74±0,04
Májás 1	13,79±1,79	1,76±0,02
Májás 2	14,89±1,77	1,68±0,09
Májás 3	14,46±0,93	1,76±0,06
Májás 4	12,10±1,47	1,74±0,06
Májás 5	10,71±0,41	1,69±0,06

A gyorsfagyasztott húskészítményekből is sikeresen izoláltam DNS a Wizard módszer felhasználásával. A DNS oldatok jellemzőit a 11. táblázat tartalmazza. A 13. számú gyorsfagyasztott hústermék esetében nem tudtam megfelelő tisztaságú DNS-t izolálni sem a Wizard sem a CTAB módszerrel. A Wizard módszerrel kapott három párhuzamos átlag R értéke 1,32-nek adódott, mely szerint a minta fehérjével szennyezett. Ezen mintából háromfázisú módszerrel izoláltam tiszta (táblázat nem mutatja) DNS-t (1,71±0,05).

11. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó gyorsfagyasztott mintákból Wizard eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Gyorsfagyasztott hústermékek</u>	<i>Wizard tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége μg/100 mg	R érték (A _{260/280})
Gyorsfagyasztott hústermék 1	11,65±0,37	1,70±0,07
Gyorsfagyasztott hústermék 2	16,58±0,67	1,76±0,02
Gyorsfagyasztott hústermék 3	5,54±0,45	1,67±0,12
Gyorsfagyasztott hústermék 4	9,43±1,08	1,77±0,03
Gyorsfagyasztott hústermék 5	12,25±0,51	1,72±0,01
Gyorsfagyasztott hústermék 6	7,81±1,02	1,76±0,02
Gyorsfagyasztott hústermék 7	13,93±0,81	1,74±0,00
Gyorsfagyasztott hústermék 8	9,54±0,22	1,75±0,01
Gyorsfagyasztott hústermék 9	6,92±0,75	1,76±0,02
Gyorsfagyasztott hústermék 10	10,18±0,45	1,75±0,02
Gyorsfagyasztott hústermék 11	5,10±0,34	1,78±0,04
Gyorsfagyasztott hústermék 12	4,47±0,94	1,67±0,08
Gyorsfagyasztott hústermék 13	4,32±0,73	1,32±0,20

A következő vizsgált mintacsoport a bébiételek csoportja volt. Az egyes mintáknál a DNS kinyerés Wizard és CTAB módszerrel történt. A CTAB módszert a konzerv bébiételeknél alkalmaztam, mivel e minták a DNS tartalmat illetően túl „hígnak” bizonyultak, valószínűsíthetően a zöltség-tartalom miatt. A megfelelő DNS koncentráció elérése érdekében, nagyobb mennyiségű anyagból kellett kiindulnom. Egy minta esetében ez a módszer sem volt alkalmazható, mivel a minta olyan híg volt, hogy így sem sikerült a PCR reakcióhoz szükséges mennyiségű DNS kinyerése (4. minta). A megoldás így a Wizard módszerrel való izolálás előtt egy Amicon Ultraszűrővel történő koncentrálási lépés. Az izolálás adatait a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó tejpép bébiétel és bébiétel konzerv mintákból Wizard ill. CTAB eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Bébiételek</u>	<i>Wizard és CTAB tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Bébiétel 1 (pép) (Wizard)	1,02±0,54	1,68±0,05
Bébiétel 2 (pép) (Wizard)	1,43±0,29	1,82±0,01
Bébiétel 3 (pép) (Wizard)	4,43±0,34	1,68±0,04
Bébiétel 4 (konzerv) (Amicon Ultra+Wizard)	0,11±0,12	1,84±0,05
Bébiétel 5 (konzerv) (CTAB)	2,53±0,76	1,72±0,04
Bébiétel 6 (konzerv) (CTAB)	7,20±0,17	1,84±0,01
Bébiétel 7 (konzerv) (CTAB)	2,55±0,2	1,66±0,02
Bébiétel 8 (konzerv) (CTAB)	6,92±0,07	1,76±0,02

A 13. táblázat a levesbetétekből történő DNS izolálás eredményeit mutatja be. A DNS-t szintén Wizard és CTAB módszerrel nyertem ki. A mintákból 10,05-20,05 $\mu\text{g}/100\text{mg}$ DNS volt izolálható, magas tisztasági (R) értékek mellett. A *-al jelölt levesbetét minták esetében a CTAB utolsó lépését, a 2-propanolos DNS kicsapást még egyszer el kellett végezni a DNS oldat megfelelő tisztasága érdekében.

13. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó levesbetét mintákból Wizard ill. CTAB eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Levesbetét minták</u>	<i>Wizard és CTAB tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
* Grízgaluska (CTAB)	14,92±0,37	1,81±0,01
* Arvit gyorsfagyasztott galuska (CTAB)	13,05±0,08	1,89±0,00
Májgaluska levesbetét (Wizard)	14,39±0,56	1,83±0,02
Májgombóc levesbetét (Wizard)	10,08±1,28	1,78±0,03
Májgaluska (Wizard)	20,05±1,58	1,83±0,02

A 14. táblázat a mirelit pizzákból és a makaróni szószokból, alapporokból izolált DNS minőségi és mennyiségi jellemzőit mutatja. Minden esetben sikerült DNS-t izolálni, de egyes mintáknál csak igen kis koncentrációban.

14. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó pizza és makaróni szósz mintákból Wizard ill. CTAB eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Pizzák, makaróni szósz minták</u>	<i>Wizard és CTAB tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Alappor 1 (Wizard)	5,25±0,25	1,85±0,01
Alappor 2 (Wizard)	8,76±0,42	1,82±0,03
Bolognai mártás 1 (Wizard)	0,74±0,13	1,58±0,12
Bolognai mártás 2 (CTAB)	6,00±0,16	1,65±0,04
Bolognai mártás 3 (Wizard)	0,8±0,20	1,58±0,05
Mirelite Pizza 1 (Wizard)	4,50±0,34	1,74±0,04
Mirelite Pizza 2 (Wizard)	5,56±0,66	1,77±0,07

A 15. táblázat foglalja össze a pudingpor minták DNS izolálásának eredményeit. Ezeknél a mintáknál csak egy esetben tudtunk megfelelő minőségű DNS-t izolálni, mely minta grízt is tartalmazott. A legtöbb vizsgált pudingpor 'csak' kukoricakeményítőt, esetenként kakaóport és egyéb adalékanyagot tartalmazott, melyből igen nehéz DNS-t izolálni a magas szénhidrát tartalom és a magas feldolgozottsági fok miatt. Számos kutató támasztotta alá azt, hogy egyes keményítő származékok esetében nincs jelen a mintában detektálható DNS, valamint a magas szénhidrát és polifenol tartalom is gátolta a megfelelő mennyiségű DNS kinyerését (EBBEHOJ and THOMSEN 1991, MEYER 1999, FANG et al. 1992, POREBSKI et al. 1997, GRAYSON et al. 2007b).

15. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó pudingpor mintákból Wizard ill. CTAB eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Pudingpor minták</u>	<i>Wizard és CTAB tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Pudingpor 1	n	n
Pudingpor 2	n	n
Pudingpor 3 (Wizard)	7,81 \pm 0,08	1,81 \pm 0,03
Pudingpor 4	n	n
Pudingpor 5	n	n

n=nincs izolálható DNS

A 16. táblázat a töltött ostyák és csokoládé minták DNS izolálás eredményeit foglalja össze. Sem Wizard, sem CTAB technikával nem sikerült 5 mintából megfelelő tisztaságú, sokszorozható DNS-t kinyerni. Ezek a minták csokoládé minták voltak, illetve a 3. számú minta egy kakaóval töltött ostya. A sikertelen DNS izolálásért valószínűleg a csokoládében található kakaó massa magas polifenol (tannin) tartalma felelős. A polifenolok számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal, így nehézkes lehet az ezt tartalmazó termékekből történő DNS kivonása. A polifenolok ezen felül PCR inhibitorok is (GRYSON et al. 2007b).

16. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó töltött ostyák, csokoládé és egyéb mintákból Wizard eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Töltött ostyák és csokoládé minták</u>	<i>Wizard tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Töltött ostya 1	2,49 \pm 0,05	1,72 \pm 0,10
Töltött ostya 2	3,98 \pm 0,35	1,72 \pm 0,04
Töltött ostya 3	n	n
Töltött ostya 4	1,57 \pm 0,34	1,64 \pm 0,06
Dióízű örlemény	16,19 \pm 0,09	1,83 \pm 0,00
Csokoládé 1	n	n
Csokoládé 2	n	n
Csokoládé 3	n	n
Csokoládé 4	n	n

n=nincs izolálható DNS

A csokoládé tartalmú mintákra egy DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfia elvén működő technikát fejlesztettem ki, melynek részletes leírása az anyagok és módszerek fejezetben található. A 17. táblázat ezzel a módszerrel izolált DNS minőségi és mennyiségi adatait tartalmazza. Az eredmények alapján elmondható, hogy ezzel a DNS izolálási technikával sikerült jó minőségű DNS-t kinyerni a kakaó tartalmú mintákból. Ez a technika jól működhet csokoládé és kakaó tartalmú mintáknál, nemcsak a GMO kimutatásnál, hanem esetlegesen csokoládéban lévő mogyoró, illetve egyéb növényi DNS jelenlétének (pl. szója) igazolására.

17. táblázat Kereskedelmi forgalomból, eltérő gyártóktól származó töltött ostya és csokoládé minták DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfiával izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Töltött ostya és csokoládé minták</u>	<i>Ioncserés kromatográfias módszer</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Töltött ostya 3	1,31 \pm 0,34	1,90 \pm 0,04
Csokoládé 1	1,22 \pm 0,52	1,77 \pm 0,06
Csokoládé 2	1,99 \pm 0,64	1,87 \pm 0,03
Csokoládé 3	1,37 \pm 0,53	1,89 \pm 0,05
Csokoládé 4	2,81 \pm 0,78	1,96 \pm 0,02

A szójatermékek (18. táblázat) esetében az erősen feldolgozott mintákból (pl. szójaszós) sikertelen volt a DNS izolálás az általam alkalmazott módszerek mindegyikével. Mindkét említett szójaszós, sötét szójaszós volt, melyekben igen magas a szénhidrát- és a karamell tartalom. A magas poliszaharid tartalom gátolhatja a DNS izolálást, mivel számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal. Szójaszószból történő izolálási eredményeim az irodalommal egybeesnek, mivel az irodalom szerint igen nehézkes az ilyen magas feldolgozottsági fokú termékekből a DNS kinyerése (EBBEHOJ and THOMSEN 1991, MEYER 1999).

Az elsődleges termékeknél megfelelő mennyiségű és tisztaságú DNS-t kaptam. A szójaital esetében szükséges volt a Wizard módszerrel való izolálás előtt egy Amicon Ultraszűrővel történő koncentrálnálási lépés is.

18. táblázat Kereskedelmi forgalomból származó, eltérő feldolgozottsági fokú szójatermék mintákból Wizard eljárással izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Szójatermékek</u>	<i>Wizard tisztítás</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Szójababcsíra	1,35 \pm 0,31	1,62 \pm 0,04
Szójakocka	18,89 \pm 0,44	1,86 \pm 0,01
Szójagranulátum	14,60 \pm 1,36	1,84 \pm 0,02
Tofu	11,42 \pm 1,26	1,93 \pm 0,04
Szójaital	0,20 \pm 0,67	1,93 \pm 0,03
Szójaszószt 1	n	n
Szójaszószt 2	n	n

n=nincs izolálható DNS

A kereskedelmi minták DNS izolálás eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a 91 mintából 85 esetben tudtam a láncreakcióhoz megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-t izolálni, Wizard, Amicon Ultraszűrővel módosított Wizard, CTAB, HFM, vagy ioncserés kromatográfiás módszerrel.

5.1.1.3. Háromfázisú megoszláson (HFM) alapuló DNS izolálási módszer továbbfejlesztése élelmiszeranalitikai célokra

A HFM eredetileg egy fehérjeizoláló módszer, mely során erős kicsapó szerek (ammónium-szulfát, és tercier-butanol) jelenlétében a vizes fázisból kiváló fehérjék a határfelületre jutnak, ahol egy harmadik fázist képeznek a két folyadék fázis között. A HFM során az apoláros komponensek (pigmentek, lipidek, bizonyos enziminhibitorok), a felső, míg a poláris komponensek (pl. cukor) az alsó fázisban dúsulnak (KISS et al. 1998). SZAMOS et al. (1998) megfigyelése szerint nagy relatív ammónium-szulfát telítésű oldatból a nukleinsav is a határfelületre jut.

Kísérleteim során első lépésben a Hofmeister féle liotróp sor alapján kiválasztott sókat [MgSO_4 , KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nátrium-citrát] teszteltem 30%-os relatív só telítésen. Szerves oldószerként 30% tercier butanolt és a HFM-ben korábbiakban nem alkalmazott 2-propanolt alkalmaztam. A sók teszteléséhez modell oldatot készítettem, mely tartalmazott szója fehérjét (15,5 mg/ml), tiszta csirke vörösvértest DNS (Reanal) (1 mg/ml) és szója olajat (3 v/v%).

Az így elkülönülő három fázis alsó vizes fázisa tartalmazza a DNS-t, melynek tisztaságát és mennyiségét spektrofotométerrel ellenőriztem.

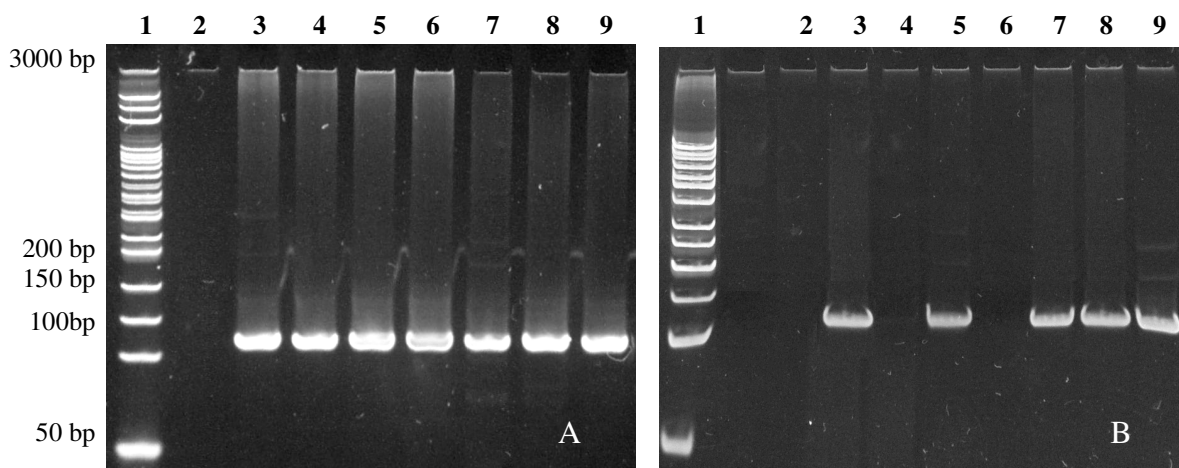
A 19. táblázat a párhuzamos mérések átlagértékeit és szórásait mutatja. Az eredmények azt mutatják, hogy megfelelő tisztaságú DNS-t kaptam az 1, 2, 5, 8 rendszerekkel, de a legjobb hozamot a 2. rendszerrel értem el. A terc-butanollal is megfelelő mennyiségű DNS-t kaptam, mivel a 2-propanol kevésbé költséges és a butanoltól eltérően nem dermed meg 25°C-on, így kísérleteimhez továbbiakban a 2-propanolt alkalmaztam.

19. táblázat Csirkevér DNS minősége és mennyisége különböző sókkal és szerves oldószerekkel végzett háromfázisú megoszlási rendszerekben

Modell minták	Használt alkoholok és sók kombinációja	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	R érték ($A_{260/280}$)
1.	Ammónium-szulfát és tercier butanol	0,78±0,31	1,73±0,03
2.	Ammónium-szulfát és 2-propanol	0,84±0,23	1,77±0,02
3.	Nátrim-citrát és tercier butanol	0,23±0,45	1,37±0,05
4.	Nátrium-citrát és 2-propanol	0,12±0,57	1,54±0,04
5.	Kálium klorid és tercier butanol	0,05±0,68	1,71±0,05
6.	Kálium klorid és 2-propanol	0,04±0,74	1,57±0,04
7.	Magnézium-szulfát és tercier butanol	0,13±0,58	1,39±0,03
8.	Magnézium-szulfát és 2-propanol	0,07±0,52	1,74±0,04

A fenti eredmények szerint kísérleteimet, a legjobb eredményt adó 2-es rendszerrel folytattam, az előző fejezetben már említett modell húsminták tesztelésével. A kísérleteimet a HFM módszerrel két lépcsőben végeztem. Az első lépcsőben 30%, 40%, 50% illetve 60% relatív só telítéssel (külön-külön tesztelve) 30% 2-propanol jelenlétében a fehérjéket, majd második lépésként az alsó vizes fázisból 80%-os relatív só telítéssel és 30% 2-propanol jelenlétében a DNS-t csaptam ki. Az első lépésben, ha növelem a telítést (40%, 50%, 60%) egyre több szennyeződés (pl. fehérje) távozik el a rendszerből és így a 80%-os relatív telítéssel (második lépcső) tisztább DNS állítható elő. Ugyanakkor azonban a só koncentráció növelésével a fehérjével eltávozó DNS mennyisége is növekszik, ezért céltom annak a határtelítésnek a meghatározása volt, amikor a két folyamat eredője megfelelő DNS hozamot és minőséget biztosít. A két lépcsőből álló megosztó rendszereket a továbbiakban relatív só telítés/térfogatszázalék magadásával jelöltem, így például a 40/30 jelölés 40%-os relatív ammónium-szulfát telítésű, 30 térfogat% 2-propanolt tartalmazó rendszert jelöli. A modell húsmintákat első esetben két lépcsőben 30/30 (első lépcső) és 80/30 (második lépcső) rendszerben teszteltem, mely során nem kaptam megfelelő tisztaságú DNS-t (adatok nem közlik), mert az R érték nem haladta meg az 1,5-öt.

Ezt az jelenti, hogy a minták még erősen szennyezettek fehérjével. Így a továbbiakban növeltem a só telítést, hogy minél több fehérje távozzon el a rendszerből, így 40/30, 50/30 és 60/30 rendszert teszteltem, mely során a második lépés minden esetben a 80/30 rendszer volt. A 40/30 rendszerben a DNS tisztaság nem volt minden esetben megfelelő (adatok nem közlik), ezzel szemben az R érték az 50/30 és a 60/30 rendszerben már minden esetben 1,7 és 2 között volt. A DNS izolálás kritériumai az extrakciós hatékonyság, DNS tisztaság és koncentráció mellett a DNS amplifikálhatósága, így az 50/30 és a 60/30 rendszerrel kapott DNS oldatok sokszorozhatóságát is tesztelni kellett. Mivel minden minta tartalmazott szóját is, így a DNS oldatokat szója specifikus primer párral vizsgáltam, amelynek segítségével egy 118 bp hosszúságú fragmentum sokszorozható. Így ha az általam vizsgált mintákból izolált DNS oldatom inhibitor mentes, másrészt tartalmazza a szükséges lektin gént akkor a fent említett amplikon detektálható. Az amplifikáció után kapott géleképeket a 10. ábra szemlélteti. Az ábrákon jól látható, hogy a 60/30 rendszer esetében nem tudtam igazolni a szója jelenlétét a sterilizált mintáknál, aminek oka valószínű az, hogy a töredezett kisebb DNS darabokat a fehérje már ezen a telítésen magával vitte. Az 50/30 rendszerben minden esetben sikerült a várt amplikont detektálni, így a továbbiakban ezzel a rendszerrel dolgoztam tovább. A megfelelő R érték eléréséhez minden esetben 70%-os etanolos mosást is kellett végezni az izolálás utolsó lépéseként. A 70%-os etanol eltávolítja a maradék sókat és a kis szerves molekulákat, amelyek gátolhatják a PCR reakciót.



10. ábra Lektin génre specifikus primerpár alkalmazása az 50/30-as (A) és a 60/30-as (B) relatív telítésen feldolgozott mintákra (118 bp PCR termék)

1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp);
2. DNS mentes kontroll (vak próba)
3. 0,5 %-os májkrém sterilizálás előtt;
4. 0,5 %-os májkrém sterilizálás után;
5. 0,5 %-os nyers, formázott vagdalthús;
6. 0,5 %-os készre sült, fagyasztott vagdalthús
7. 0,5 %-os párizsi hőkezelés előtt;
8. 0,5 %-os párizsi hőkezelés után;
9. Pozitív kontroll (szójaliszt DNS)

A fentiekben említett 50/30 rendszerrel kidolgozott módszer végső leírása szerepel az anyagok és módszerek fejezetben. A kidolgozott rendszerrel a félüzemi körülmények között előállított modell húsmintákból (Anyagok és módszerek 4.1.1.1. fejezet) izolált DNS oldatok eredményeit a 20. táblázat tartalmazza, a GMO kimutatásban elterjedten alkalmazott Wizard módszerrel összehasonlítva. A táblázat a minták három párhuzamos izolálásának átlageredményeit tartalmazza a DNS minőségre és mennyiségre vonatkozóan. A táblázatból jól látható, hogy a HFM módszer minden esetben jobb (átlagosan 2-szer nagyobb) DNS hozamot produkált, mint a Wizard módszer. Az R érték is minden esetben a kívánt 1,7 és 2 érték között volt, vagyis az izolált DNS oldatunk igen tisztának bizonyult a spektrofotometriás mérések alapján.

20. táblázat 0,5% RR szóját tartalmazó modell húsminták DNS izolálás eredményeinek összehasonlítása HFM és Wizard módszerrel

Kiválasztott modell minták	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ (Wizard)	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ (HFM)	R érték ($A_{260/280}$) Wizard	R érték ($A_{260/280}$) HFM
Párizsi minta hőkezelés előtt	6,45±0,01	8,58±0,20	1,75±0,03	1,71±0,03
Párizsi minta hőkezelés után	6,46±0,38	13,59±0,55	1,78±0,01	1,82±0,06
Nyers, formázott vagdalthús minta	7,79±0,30	19,68±0,21	1,79±0,01	1,89±0,01
Készre sütött, fagyasztott vagdalthús minta	5,64±0,03	18,98±0,11	1,79±0,02	1,82±0,02
Májkrém minta sterilizálás előtt	18,79±0,10	42,23±0,44	1,80±0,03	1,80±0,01
Májkrém minta sterilizálás után	34,10±1,62	37,57±1,34	1,84±0,02	1,80±0,01

A korábbiakban már Wizard módszerrel izolált és egyszerű PCR módszerrel GM pozitívnak bizonyuló kereskedelmi forgalomból származó élelmiszermintákon is teszteltem a HFM módszert. A 21. táblázat ezen élelmiszerminták Wizard és HFM módszerrel kapott DNS izolálásának eredményeit foglalja össze.

21. táblázat Kereskedelmi forgalomból származó GMO pozitív mintákból HFM és Wizard módszerrel nyert DNS oldatok jellemzőinek összehasonlítása

Kereskedelemből származó élelmiszerminták	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ (Wizard)	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ (HFM)	R érték ($A_{260/280}$) Wizard	R érték ($A_{260/280}$) HFM
Májkrém minta (1)	22,95±1,28	55,56±1,24	1,82±0,01	1,88±0,02
Májkrém minta (2)	10,60±0,60	26,48±1,01	1,74±0,04	1,67±0,03
Sonka minta (4)	11,25±0,67	13,64±0,57	1,75±0,01	1,71±0,04
Sonka minta (5)	10,99±0,61	30,60±0,61	1,77±0,01	1,88±0,01
Kenőmájas (3)	14,46±0,93	120,40±0,78	1,76±0,06	1,89±0,03
Kenőmájas (4)	12,10±1,47	107,32±0,86	1,74±0,06	1,88±0,02
Párizsi minta (5)	19,50±1,02	34,00±0,44	1,79±0,00	1,83±0,05
Párizsi minta (9)	13,17±1,85	59,48±0,39	1,80±0,03	1,92±0,04
Gyorsfagyasztott húsminta (2)	9,43±1,08	11,48±0,25	1,77±0,03	1,78±0,01
Gyorsfagyasztott húsminta (4)	16,58±0,67	36,68±0,31	1,76±0,02	1,94±0,02
Virslis minta (1)	12,96±1,47	17,64±0,68	1,76±0,00	1,71±0,05
Virslis minta (7)	8,65±1,45	39,64±0,79	1,78±0,03	1,89±0,04

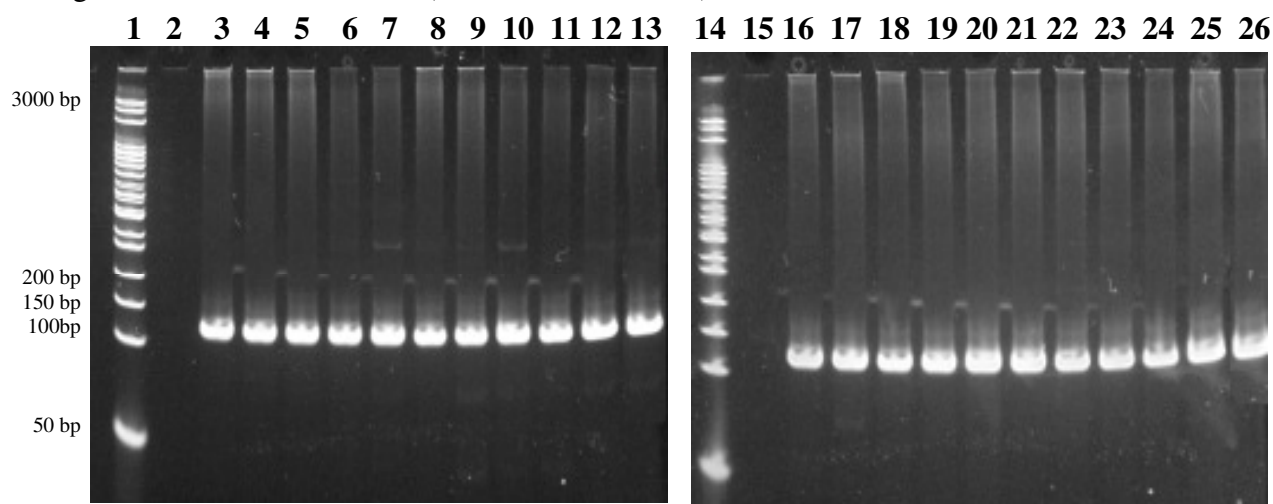
Mind a modell (0,5% RR szója) húsmintákat és mind a GMO pozitív kereskedelmi forgalomból származó húsmintákat teszteltem gerinces állatokra specifikus, lektin gén specifikus és 35S promóter specifikus primerek segítségével, annak bizonyítására, hogy a kifejlesztett háromfázisú módszerrel ugyanolyan jó minőségű és mennyiségű amplifikálható DNS izolálható, mint a Wizard módszerrel. Ennek eredményei az 5.2.5 fejezetben található.

A két módszert összehasonlítva elmondhatjuk, hogy mindkét módszer elvégzése hozzávetőleg 4 órát igényel (kb. 12 minta esetén) a proteináz K emésztési lépést is beleértve. A módszerek költségét illetően, viszont igen nagy különbségek adódnak. Kereskedelmi forgalomból származó Wizard DNS tisztító Kit jelenlegi piaci ára körülbelül 55.000,- Ft/100 minta. Ezzel szemben a DNS-HFM módszer segítségével 100 mintából történő DNS kinyerés hozzávetőleg 3.000,- Ft-ba kerül. Természetesen mindkét módszer költségeit még növeli a proteináz K enzim alkalmazása, mely 100 mintára körülbelül 25.000,- Ft. Így az egy mintára jutó költség a Wizard módszer esetében 750,- Ft, míg a HFM esetében csak 280,- Ft.

5.1.2. Modell és élelmiszer-minták PCR vizsgálatának eredményei

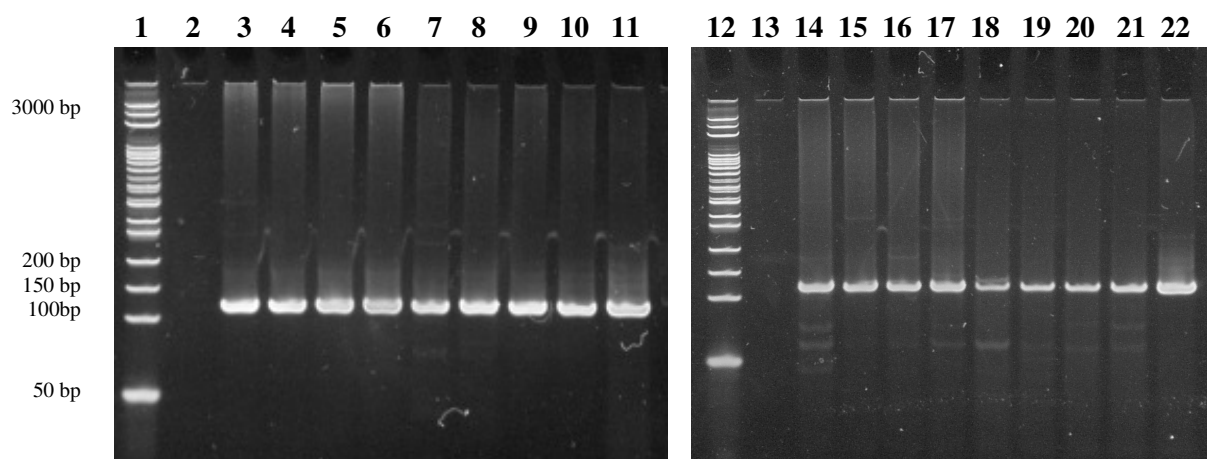
5.1.2.1. Szója tartalmú modell húsminták kontroll lektin PCR-jének és GMO vizsgálatának eredményei

A PCR reakció optimális paramétereinek beállítása után szója specifikus lektin gén sokszorozásával vizsgáltam az izolált DNS-ek inhibitor mentességét, vagyis, hogy a vizsgált húsminták tartalmazzak-e sokszorozható szója eredetű lektin gént (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat). Pozitív kontrollként a húsminták előállításánál felhasznált RR szóját alkalmaztam. Az eredmények alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált összes húsmintából sikerült a lektin gént detektálni. A 11. és 12. ábra példaként szemlélteti a lektin PCR eredményeit az üzemben előállított vagdalthús, párizsi és májkrém minták esetében. A gélfotókról jól látható, hogy a különböző típusú hőkezelési eljárások előtti és utáni mintáknál, a bázispár standarddal illetve a pozitív kontrollal összehasonlítva, minden esetben jelen van a lektin gén fragmentuma. Ugyanezt elmondhatjuk a különböző sütési eljárással készre sültött vagdalthús minták esetében is (ábra nem szemlélteti).



11. ábra 0,5%, 1%, 1,5% és 2% RR szóját tartalmazó vagdalthús minták lektin PCR-jének eredményei (118 bp PCR termék)

- | | |
|---|--|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 14. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 15. DNS mentes kontroll (vak próba) |
| 3. 0,5 %-os nyers, formázott vagdalthús | 16. 1,5 %-os nyers, formázott vagdalthús |
| 4. 0,5 %-os panírozott vagdalthús | 17. 1,5 %-os panírozott vagdalthús |
| 5. 0,5 %-os elősütött vagdalthús | 18. 1,5 %-os elősütött vagdalthús |
| 6. 0,5 %-os készre sültött vagdalthús | 19. 1,5 %-os készre sültött vagdalthús |
| 7. 0,5 %-os fagyasztott vagdalthús | 20. 1,5 %-os fagyasztott vagdalthús |
| 8. 1 %-os nyers, formázott vagdalthús | 21. 2 %-os nyers, formázott vagdalthús |
| 9. 1 %-os panírozott vagdalthús | 22. 2 %-os panírozott vagdalthús |
| 10. 1 %-os elősütött vagdalthús | 23. 2 %-os elősütött vagdalthús |
| 11. 1 %-os készre sültött vagdalthús | 24. 2 %-os készre sültött vagdalthús |
| 12. 1 %-os fagyasztott vagdalthús | 25. 2 %-os fagyasztott vagdalthús |
| 13. Pozitív kontroll (RR szója) | 26. Pozitív kontroll (RR szója) |

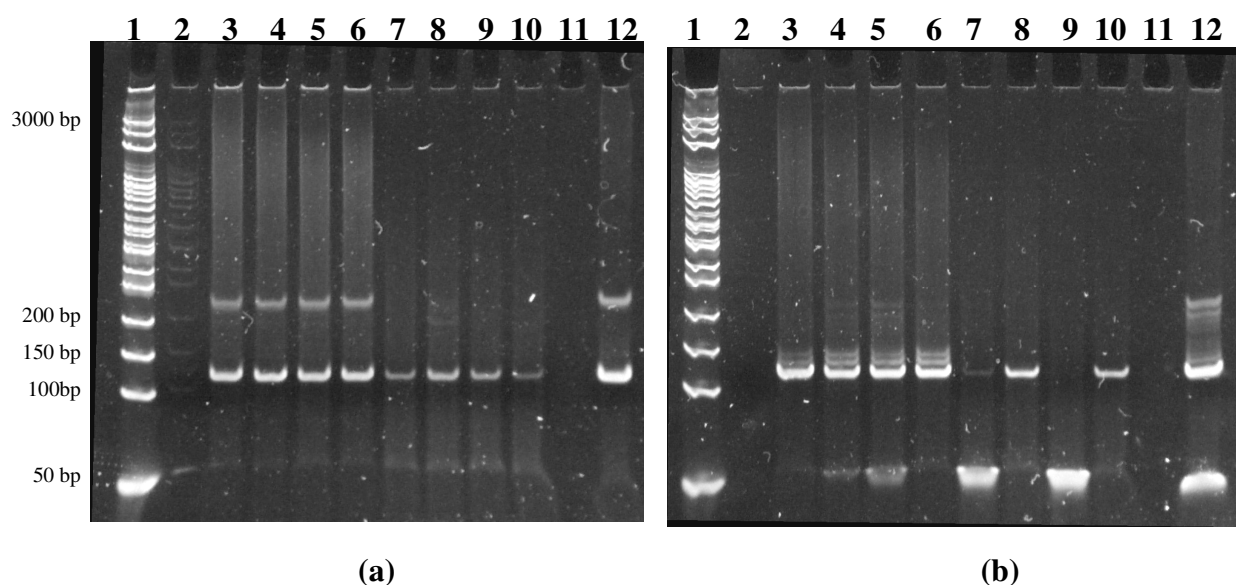


12. ábra 0,5%, 1%, 1,5% és 2% GMO-t tartalmazó párizsi és májkrém minták lektin PCR-jének eredményei (118 bp PCR termék)

- | | |
|---|--|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 12. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 13. DNS mentes kontroll (vak próba) |
| 3. 0,5 %-os párizsi hőkezelés előtt | 14. 0,5 %-os májkrém sterilizálás előtt |
| 4. 1 %-os párizsi hőkezelés előtt | 15. 1 %-os májkrém sterilizálás előtt |
| 5. 1,5 %-os párizsi hőkezelés előtt | 16. 1,5 %-os májkrém sterilizálás előtt |
| 6. 2 %-os párizsi hőkezelés előtt | 17. 2 %-os májkrém sterilizálás előtt |
| 7. 0,5 %-párizsi hőkezelés után | 18. 0,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 8. 1 %-os párizsi hőkezelés után | 19. 1 %-os májkrém sterilizálás után |
| 9. 1,5 %-os párizsi hőkezelés után | 20. 1,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 10. 2 %-os párizsi hőkezelés után | 21. 2 %-os májkrém sterilizálás után |
| 11. Pozitív kontroll (RR szója) | 22. Pozitív kontroll (RR szója) |

A lektin sokszorozhatóságának vizsgálatát követően specifikus reakciókkal, vagyis a genetikailag módosított RR szójára jellemző *nos* terminátor és 35S promóter szabályzó régiók sokszorozásával vizsgáltam a GMO jelenlétét a mintákban (Anyagok és módszerek fejezet, 3. táblázat). Ezzel, a különböző típusú hőkezelések (olajban sütés, sterilizálás stb.) hatását vizsgáltam a kimutathatóságra tehát, hogy a 0,5%-os mesterséges szennyezettségi szint kimutatható-e. Kutatásaim során a JRC által javasolt GMO kimutatási módszert alkalmaztam. Az 1%-os RR szója tartalmú sterilizált májkrémből és készre sült vagdalthúsból történő 35S promóter és *nos* terminátor kimutatása sem minden esetben volt sikeres. Ezért a kimutathatóság érdekében az agaróz gélen történő futtatást a nagyobb elválasztó képességű 10%-os poliakrilamid gélen végeztem, és az etidium-bromiddal történő gélfestést az 50-100x érzékenyebb SYBR Green I-re cseréltem.

A JRC által előírt PCR paramétereket, azonban a termékanalízis során már poliakrilamid gélt és SYBR Green I festéket alkalmazva, jobb eredményeket kaptam (13. ábra). A májkrém vizsgálatánál azt tapasztaltam, hogy míg a nyers termékmasszából vett mintáknál a GMO jelenléte egyértelműen detektálható, a sterilizáció okozta változások miatt a *nos* terminátor kimutathatósága csökken. Ez abból adódhat, hogy a mintában a DNS a magas hőmérséklet hatására töredezetté válik, illetve a mintaszerkezet megváltozik. A gélen erős háttérszennyeződések és primer-dimerek is keletkeztek, így az előírt PCR rendszert optimalizálni kellett a megfelelő eredmények elérésének érdekében. A primer-dimerek és háttérszennyeződések jelei a párizsi, a vagdalthús és az egyéb sütési technológiák alkalmazásával készre sültött vagdalthús minták gélképén is látható volt (ábra nem mutatja).

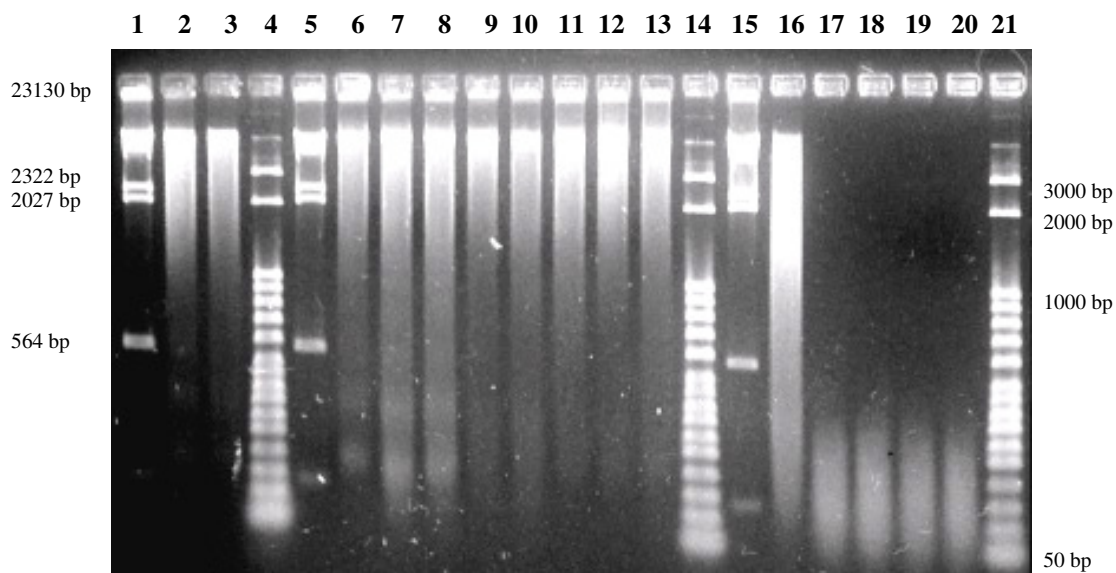


13. ábra GMO-t tartalmazó májkrém minták 35S - 123 bp (a) és *nos* PCR-jének -118 bp (b) eredményei a PCR reakció optimalizálása előtt

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 7. 0,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 8. 1 %-os májkrém sterilizálás után |
| 3. 0,5 %-os májkrém sterilizálás előtt | 9. 1,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 4. 1 %-os májkrém sterilizálás előtt | 10. 2 %-os májkrém sterilizálás után |
| 5. 1,5 %-os májkrém sterilizálás előtt | 11. Üres zseb |
| 6. 2 %-os májkrém sterilizálás előtt | 12. Pozitív kontroll (RR szója) |

A mintákból származó tisztított DNS oldatokban a fragmentáció csökkenését 2%-os agaróz gélen ellenőriztem. A 14. ábrán jól látható, hogy a nyers és hőkezelt párizsi minták DNS mintázata (2-3. zseb) nem különbözik egymástól jelentősen, az átlagos DNS méret 1 és 23 kbp közötti. A vagdalthús minták esetében, a DNS mintázat szintén hasonló egymáshoz (200 bp - 23 kbp), de már az alacsonyabb mérettartományban is találtam DNS-t, mely töredezés valószínűleg a feldolgozási technológiának köszönhető (6-13 zseb).

A nyers májkrém massa esetében a DNS méret szintén az előbb említett 200 bp - 23 kbp közötti mérettartományban található, ezzel szemben a sterilizett májkrém konzerv mintákból izolálható DNS mérete igen alacsony, kisebb mint 350 bp. Ez a méret előző irodalmi adatok alapján is várható volt (EBBEHOJ and THOMSEN, 1991) és részben felelős lehet a kimutatás nehézkességéért.



14. ábra Nyers, hőkezelt valamint sterilizett modell húskészítményekből izolált DNS minták elválasztása 2%-os agaróz gélen

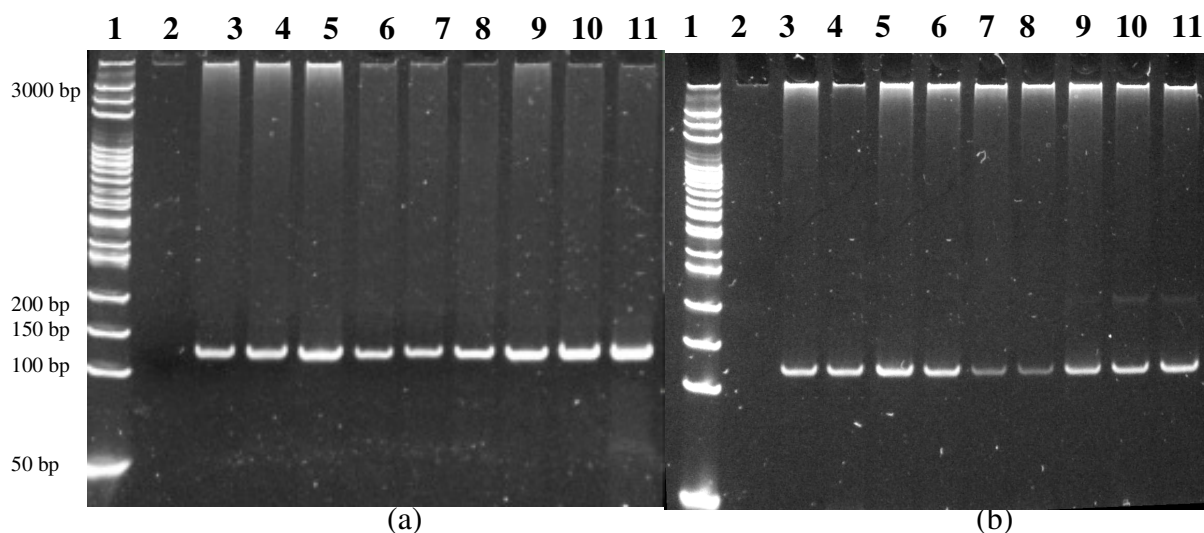
- | | |
|---|---|
| 1. Bázispár hossz standard (125-23130 bp) | 12. 0,5%-os vagdalthús kontakt grillsütővel sütve |
| 2. 0,5 %-os párizsi hőkezelés előtt | 13. 0,5%-os vagdalthús mikrohullámú sütővel sütve |
| 3. 0,5 %-os párizsi hőkezelés után | 14. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) |
| 4. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 15. Bázispár hossz standard (125-23130 bp) |
| 5. Bázispár hossz standard (125-23130 bp) | 16. 0,5 %-os májkrém sterilizálás előtt |
| 6. 0,5 %-os nyers, formázott vagdalthús | 17. 0,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 7. 0,5 %-os panírozott vagdalthús | 18. 1 %-os májkrém sterilizálás után |
| 8. 0,5 %-os elősütött vagdalthús | 19. 1,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 9. 0,5 %-os készre sütött vagdalthús | 20. 2 %-os májkrém sterilizálás után |
| 10. 0,5 %-os fagyasztott vagdalthús | 21. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) |
| 11. 0,5%-os vagdalthús légkeveréses sütővel sütve | |

A fent említett okok miatt a PCR reakció körülményeit optimalizáltam. Az optimalizálás több lépcsőben történt, amely során Jump Start REDTaq PCR mixet használtam az amplifikációhoz, mely mixben a specifikus enzimműködést gátló ellenanyag hő hatására inaktiválódik, a polimeráz már a teljesen szétvált DNS láncon tud működésbe lépni, mely által csökken a nem specifikus termékek képződése. Továbbá, az előírt primer koncentrációt csökkentettem (0,5 μ M/reakcióról 0,4 μ M/reakcióra) a primer-dimerek keletkezésének kiküszöbölésére.

A háttérszennyezések kialakulásának megakadályozására a primer kapcsolódási hőmérsékletet az előírthoz képest 2°C-al emeltem, növelve a primer specificitást, így a 0,5%-ot tartalmazó sterilizált májkrém minták esetében is sikerül kimutatni a GMO jelenlétét, valamint sikerült a primer-dimerek illetve a háttérszennyeződések is megszüntetni.

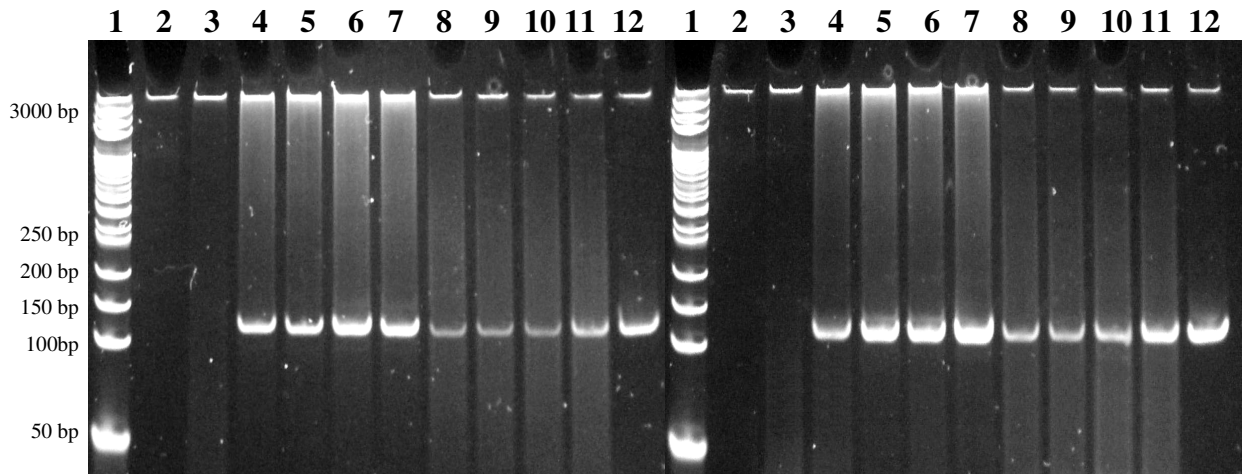
A háttérszennyeződések eltüntetése érdekében a ciklusszámot is csökkenteni kellett, mely eltérőnek adódott a különböző modell termékek esetében a feldolgozottsági foktól függően.

Az optimalizált PCR reakció során kapott eredményeket a 15.-18. ábra példaként mutatja be. Az ábrákról jól látható, hogy az optimalizált módszerrel a párizsi, vagdalthús és májkrém minták vizsgálata esetén, a különböző hőkezelési típusok előtt és után vett mintákból 0,5%-os határérték mellett igazolható volt a GMO jelenléte. Ugyanezt elmondható a különböző sütési eljárással készre sültött vagdalthús minták esetében is (ábra nem szemlélteti).



15. ábra GMO-t tartalmazó párizsi minták 35S - 123 bp (a) és *nos* PCR-jének - 118 bp (b) eredményei a PCR reakció optimalizálása után

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 7. 0,5 %-os párizsi hőkezelés után |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 8. 1 %-os párizsi hőkezelés után |
| 3. 0,5 %-os párizsi hőkezelés előtt | 9. 1,5 %-os párizsi hőkezelés után |
| 4. 1 %-os párizsi hőkezelés előtt | 10. 2 %-os párizsi hőkezelés után |
| 5. 1,5 %-os párizsi hőkezelés előtt | 11. Pozitív kontroll (RR szója) |
| 6. 2 %-os párizsi hőkezelés előtt | |

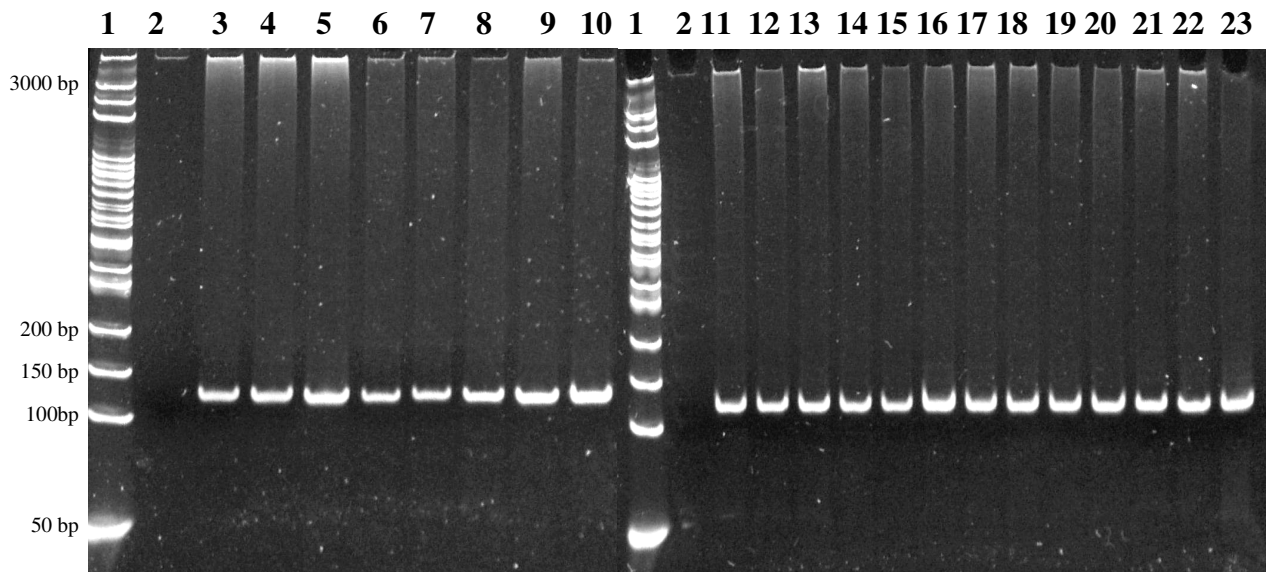


(a)

(b)

16. ábra GMO-t tartalmazó májkrém minták 35S - 123 bp (a) és *nos* PCR-jének - 118 bp (b) eredményei a PCR reakció optimalizálása után

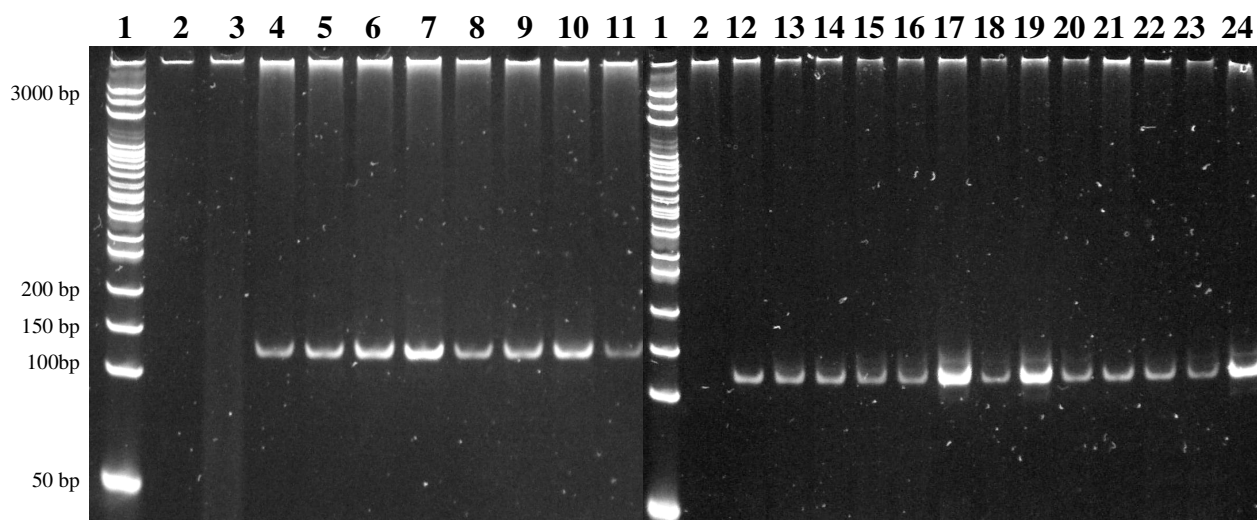
- | | |
|---|--|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 7. 2 %-os májkrém sterilizálás előtt |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 8. 0,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 3. Üres zseb | 9. 1 %-os májkrém sterilizálás után |
| 4. 0,5 %-os májkrém sterilizálás előtt | 10. 1,5 %-os májkrém sterilizálás után |
| 5. 1 %-os májkrém sterilizálás előtt | 11. 2 %-os májkrém sterilizálás után |
| 6. 1,5 %-os májkrém sterilizálás előtt | 12. Pozitív kontroll (RR szója) |



17. ábra GMO-t tartalmazó vágdalthús minták

35S PCR-jének (123 bp) eredményei a PCR reakció optimalizálása után

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1. 0,5 %-os Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 12. 1 %-os elősütött vágdalthús |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 13. 1,5 %-os elősütött vágdalthús |
| 3. nyers, formázott vágdalthús | 14. 2 %-os elősütött vágdalthús |
| 4. 1 %-os nyers, formázott vágdalthús | 15. 0,5 %-os készre sült vágdalthús |
| 5. 1,5 %-os nyers, formázott vágdalthús | 16. 1 %-os készre sült vágdalthús |
| 6. 2 %-os nyers, formázott vágdalthús | 17. 1,5 %-os készre sült vágdalthús |
| 7. 0,5 %-os panírozott vágdalthús | 18. 2 %-os készre sült vágdalthús |
| 8. 1 %-os panírozott vágdalthús | 19. 0,5 %-os fagyasztott vágdalthús |
| 9. 1,5 %-os panírozott vágdalthús | 20. 1 %-os fagyasztott vágdalthús |
| 10. 2 %-os panírozott vágdalthús | 21. 1,5 %-os fagyasztott vágdalthús |
| 11. 0,5 %-os elősütött vágdalthús | 22. 2 %-os fagyasztott vágdalthús |
| | 23. Pozitív kontroll (RR szója) |



18. ábra GMO-t tartalmazó vagdalthús minták *nos* PCR-jének (118 bp) eredményei a PCR reakció optimalizálása után

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 12. 0,5%-os elősütött vagdalthús |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 13. 1 %-os elősütött vagdalthús |
| 3. Üres zseb | 14. 1,5 %-os elősütött vagdalthús |
| 4. 0,5 %-os nyers, formázott vagdalthús | 15. 2 %-os elősütött vagdalthús |
| 5. 1 %-os nyers, formázott vagdalthús | 16. 0,5 %-os készre sült vagdalthús |
| 6. 1,5 %-os nyers, formázott vagdalthús | 17. 1 %-os készre sült vagdalthús |
| 7. 2 %-os nyers, formázott vagdalthús | 18. 1,5 %-os készre sült vagdalthús |
| 8. 0,5 %-os panírozott vagdalthús | 19. 2 %-os készre sült vagdalthús |
| 9. 1 %-os panírozott vagdalthús | 20. 0,5 %-os fagyasztott vagdalthús |
| 10. 1,5 %-os panírozott vagdalthús | 21. 1 %-os fagyasztott vagdalthús |
| 11. 2 %-os panírozott vagdalthús | 22. 1,5 %-os fagyasztott vagdalthús |
| | 23. 2 %-os fagyasztott vagdalthús |
| | 24. Pozitív kontroll (RR szója) |

A legtöbb szakirodalom referencia anyagokból, szójalisztekből és feldolgozott termékekből történő GMO kimutatással foglalkozik, melyek legnagyobb részét kekszek, tészták, fizikai és kémiai kezeléseknél kitett szójalisztek képezik (OVESNÁ et al. 2002, LIPP et al. 1999a, LIPP et al. 1999b, JANKIEWICZ et al. 1999, BONFINI et al. 2001, KAKIHARA et al. 2007). Szinte alig található szakirodalom a különböző feldolgozottsági szintű, eltérő összetételű húsmintákból történő GMO kimutatás vizsgálatára, pedig a szóját mint fehérjepótlót és állományjavítót nagyon gyakran használják a húsiparban, emellett kötelezően jelölendő, allergén listán is szereplő komponens ezért vizsgálatuk igen fontos. BROD and ARISI (2007a) elsők között határozták meg a kereskedelemről származó húskészítményekből (mortadella minták, hot-dog és hamburger húsminták, főtt sonka minták) és a húsgyártás során alkalmazott, többnyire szóját tartalmazó adalékanyagokból (fűszerek, szója fehérje és szója fehérje izolátum, íz fokozók) történő RR szója jelenlétét.

Kutatásaik során nested-PCR rendszert használtak, melynek érzékenysége ebben az esetben 0,1%-os volt, bár ZHANG et al. (2007) kutatásaik szerint a nested-PCR 1000-szer is érzékenyebb lehet, mint a hagyományos egyszerű PCR.

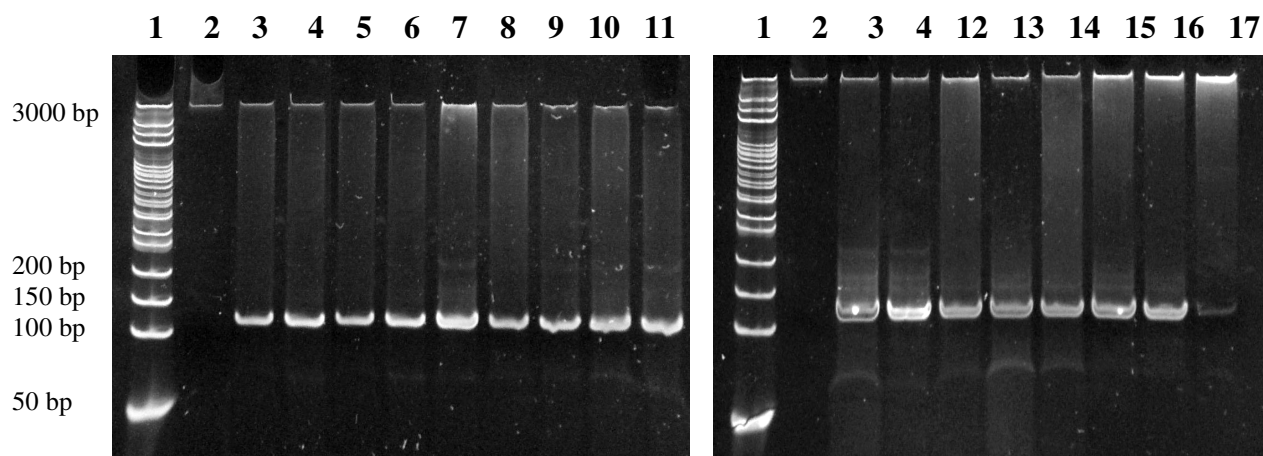
Az eredményeimet összefoglalva elmondható, hogy az adaptált optimalizált egyszerű PCR módszerrel, poliakrilamid gélen történő elválasztással és SYBR Green I festéssel a sterilizett termékek vizsgálatakor is sikerült a 0,5%-os kimutatási határt elérni (a szenzitivitás és a specificitás az optimalizált módszerrel 100% volt). A 0,5%-os detektálási határral teljesíthető volt az EU jogszabály által előírt 0,9%-os jelölési kötelezettség. Ez az érték, az EU-ban nem engedélyezett GM termékeknél 0,5%.

5.1.2.2. Kereskedelemből származó élelmiszerminták kontroll lektin PCR-jének és GMO vizsgálatának eredményei

Szója specifikus lektin gén sokszorozásával vizsgáltam, hogy az élelmiszerminták tartalmaznak-e szója összetevőt, ellenőrizve ezzel a minták csomagolásán olvasható összetétel helyességét is. Ha nem volt feltüntetve a szója összetevő és ennek ellenére a minta pozitívnak bizonyult, a termék jelöléshibás, vagy elképzelhető, hogy a termék a gyártóvonalon szennyeződött. Amely minta csomagolásán az összetevők között fel volt tüntetve a szója tartalom, abban az esetben a lektin gén sokszorozásával az izolált DNS-ek inhibitor mentessége is ellenőrizhető. Annál a mintánál, ahol nem találtam a csomagoláson szójaösszetevőt, terméktől függően növény vagy gerinces állatra specifikus primerpárral ellenőriztem az inhibitor mentességét (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat).

A lektin primerrel történő amplifikáció során, ha a termék tartalmazott szója összetevőt, egy 118 bp méretű fragmentum sokszorozódott (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat).

A 19. ábra példaként mutatja be a gyorsfagyasztott húsminták lektin PCR-jének gélképét. Az eredmények alapján láthatjuk, hogy az összes gyorsfagyasztott húsmintában detektálható volt a lektin gén, tehát tartalmazott szóját. A termék címkén lévő jelölések megegyeztek a vizsgálati eredményekkel, kivételt képez a „gyorsfagyasztott hústermék 6”, ahol a szója tartalom nem volt jelölve a csomagoláson. A minta jelöléshibás, vagy a gyártás során szójával szennyeződhetett, mivel semmi olyan egyéb adalékanyagot nem tartalmazott, amivel magyarázható lett volna a lektin gén jelenléte.



19. ábra Gyorsfagyasztott hústermék minták lektin PCR-jének eredményei (118 bp)

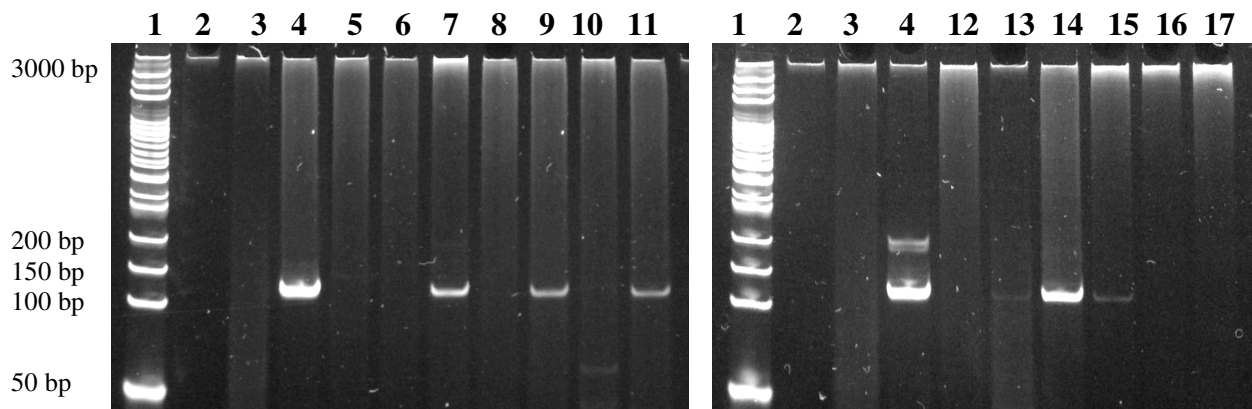
1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp)
2. DNS mentes kontroll (vak próba)
3. Evans szója (GMO mentes)
4. Pozitív kontroll (RR szója)
- 5-17. Gyorsfagyasztott hústermék 1-13.

Összefoglalva a kereskedelemből származó élelmiszerminták lektin PCR-jének az eredményeit (22. táblázat), megállapítható, hogy a szója tartalom vizsgálata során, a 80 jó minőségű DNS mintából 65 termék esetében kaptam lektin génre pozitív jelet. 5 sonka termék szója tartalmáról, nem volt információ, mivel ezen termékek nem előre csomagolt, hanem frissen szeletelt áruk voltak, így ezen mintákat a táblázat nem tartalmazza (ezen 5 mintából is sikerült megfelelő minőségű DNS-t kinyerni, de szóját egyetlenegy esetben sem detektáltam). Az így fennmaradó 65 minta közül 7 esetben mutattam ki a szója jelenlétét, annak ellenére, hogy semmiféle szója összetevőre, vagy szójából származó adalékanyagra a csomagoláson nem találtam utalást, vagyis a termékek 11%-a jelöléshibás volt.

22. táblázat Kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerminták szója tartalmára vonatkozó adatok összefoglalása

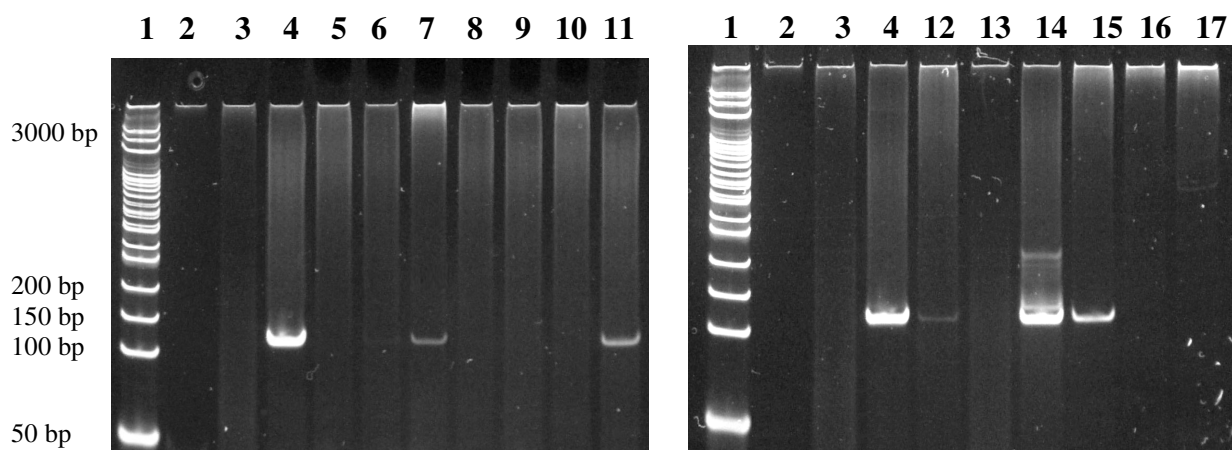
Vizsgált mintacsoportok	Vizsgált minták száma (db)	DNS izolálások száma (db)	Lektin gén (szója) pozitív minták (db)	Jelöléshibás termékek száma (db)
Párizsi minták	10	10	9	1
Virsli minták	10	10	7	0
Sonka minták	5	5	2	2
Kenőmájás és májkrém minták	7	7	7	1
Gyorsfagyasztott hústermékek	13	13	13	1
Levesbetét minták	5	5	2	0
Töltött ostyák és csokoládé és egyéb minták	9	9	7	0
Pizzák, makaróni szósz minták	7	7	3	0
Bébiételek	8	8	6	1
Szójatermékek	7	5	5	0
Pudingpor minták	5	1	1	1
Összesen	86	80	62	7

A szója jelenlétre utaló lektin gén vizsgálatát követően specifikus reakciókkal, vagyis a genetikailag módosított RR szójára jellemző *nos* terminátor és 35S promóter szabályzó régiók sokszorozásával vizsgáltam a GMO jelenlétét a mintákban (Anyagok és módszerek fejezet, 3. táblázat). A szabályzó régiók sokszorozása során kapott eredményeket példaként a 20-21. ábrán mutatom be. Az ábrából látható, hogy a 13 vizsgált gyorsfagyasztott húsminta közül 4 (gyorsfagyasztott húsminta 3, 7, 10, 11) minta esetében volt kimutatható a *nos* terminátor és 35S promóter együttes jelenléte. A gyorsfagyasztott húsminta 5 és 9 esetében csak a 35S promótert sikerült detektálni (20. ábra), a gyorsfagyasztott húsminta 8 mintában pedig csak a *nos* terminátort (21. ábra).



20. ábra Gyorsfagyasztott hústermék minták 35S PCR-jének eredményei (123 bp)

1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp)
2. DNS mentes kontroll (vak próba)
3. Evans szója (GMO mentes)
4. Pozitív kontroll (RR szója)
- 5-17. Gyorsfagyasztott hústermék 1-13.



21. ábra Gyorsfagyasztott hústermék minták *nos* PCR-jének eredményei (118 bp)

1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp)
2. DNS mentes kontroll (vak próba)
3. Evans szója (GMO mentes)
4. Pozitív kontroll (RR szója)
- 5-17. Gyorsfagyasztott hústermék 1-13.

A kereskedelmi élelmiszerminták GMO vizsgálata során kapott eredményeket a 23. táblázat foglalja össze. A GMO jelenlétének kimutatása során megállapítható, hogy a vizsgált 62 lektin gén pozitív termék közül 29 minta esetében sikerült kimutatni a 35S promóter és/vagy *nos* terminátor jelenlétét. GMO jelenlétére utaló jelölést egyik termék csomagolásán sem találtam. Az eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált minták 47%-ánál volt kimutatható a GMO tartalom. Ha a termék tartalmazott *nos* terminátort és/vagy 35S promótert, abban az esetben megmértem, hogy az adott minta, hány százalékban tartalmaz RR szóját. A mennyiségi meghatározást „esemény” (event) specifikus valós idejű (real-time) PCR módszerrel végeztem.

A relatív GMO (RR szója) mennyiségi meghatározása során a normalizálás lektin gén specifikus szekvenciával történt (Anyagok és módszerek fejezet, 5. táblázat). Az ismeretlen minta RR szója tartalma standard referencia anyagok méréséből adódó kalibrációs görbe segítségével történt.

23. táblázat Kereskedelemből származó élelmiszerminták GMO vizsgálatának összesítő táblázata

Vizsgált mintacsoportok	Vizsgált minták száma (db)	Lektin gén (szója) pozitív minták (db)	<i>nos</i> terminátor és/vagy 35S promóter együttes jelenléte (db)
Párizsi minták	10	9	8
Virslis minták	10	7	6
Sonka minták	5	2	2
Kenőmájas és májkrém minták	7	7	3
Gyorsfagyasztott hústermékek	13	13	7
Levesbetét minták	5	2	0
Töltött ostyák és csokoládé és egyéb minták	9	7	1
Pizzák, makaróni szósz minták	7	3	0
Bébiételek	8	6	1
Szójatermékek	5	5	1
Pudingpor minták	1	1	-
Összesen	80	62	29

A kvantitatív vizsgálatok eredményeit a 24. táblázat foglalja össze. Az eredményekből láthatjuk, hogy a 29 GM pozitív mintából 12 minta RR szója tartalma kisebb volt, mint 0,1% (41,4%-a a GM pozitív mintáknak), 12 minta (41,4%) esett a 0,1-0,9%-os intervallumon belül és 5 minta (17,2%) tartalmazott 0,9%-nál magasabb RR szója tartalmat. A 0,9%-nál magasabb RR szója tartalmú mintáknál a csomagoláson egyetlenegy esetben sem találtam utalást a GM összetevő előfordulására.

24. táblázat Kereskedelemből származó élelmiszerminták mennyiségi GMO vizsgálatának összesítő táblázata

RR szója tartalom (%)	Vizsgált minták (zárójelben a darabszáma)	Vizsgált minták száma (db)
< 0,1	párizsi minta (5), kenőmájas minta (2), gyorsfagyasztott húsminta (2), virsli minta (1) töltött ostya minta (1), szójatermék (1)	12
0,1-0,9	sonka minta (1), párizsi minta (2), kenőmájas minta (1), gyorsfagyasztott húsminta (3), virsli minta (4), bébiétel (1)	12
0,9-5	párizsi minta (1), gyorsfagyasztott húsminta (1), virsli minta (1)	3
>5	sonka minta (1), gyorsfagyasztott húsminta (1),	2
	Összesen	29

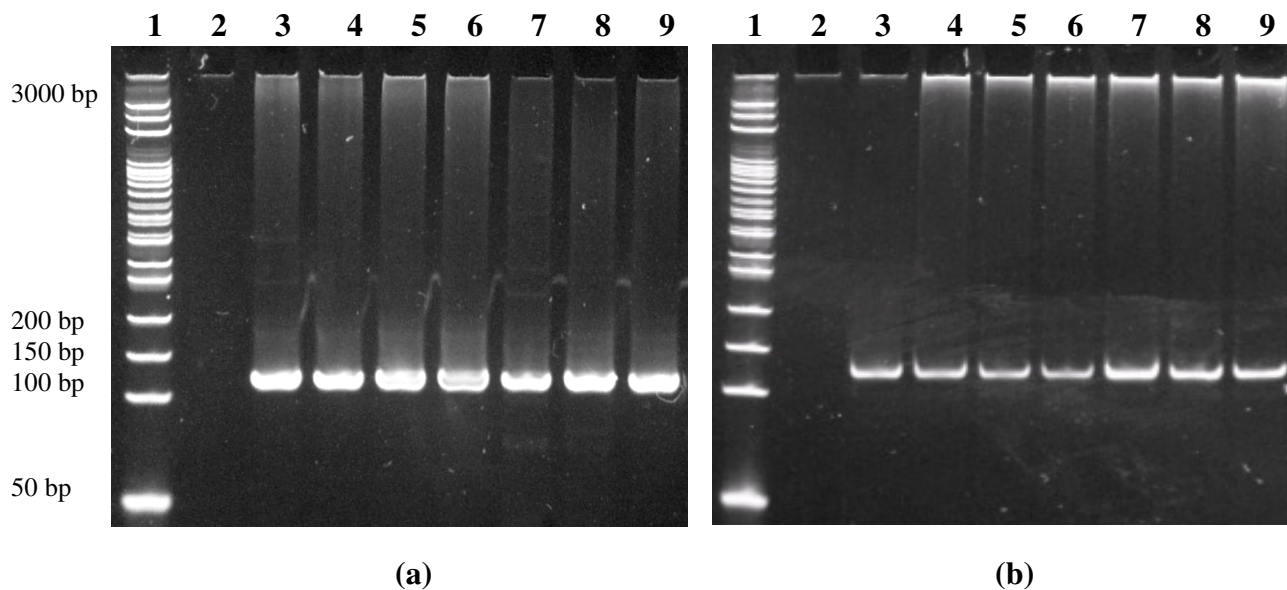
Ha a Magyarországon végzett GMO felmérést összevetjük a világ egyes országaiban végzett felmérésekkel, igen eltérő eredményeket kapunk (SHIRAI et al. 1998, EL SANHOTY et al. 2002, ROTT et al. 2004, LAU et al. 2004, CARDARELLI et al. 2005, GERMINI et al. 2005, GREINER et al. 2005, ABDULLAH et al. 2006, VODRET et al. 2007, BROD and ARISI 2007a, BROD and ARISI 2007b, ZHOU et al. (2007)). A vizsgált termékek száma és milyensége is igen széles skálán mozog, így az eredményeimet igen nehéz összevetni az irodalomban találhatóakkal. Az irodalomban főleg szójatej, levesporok, szójaliszt, szójabab, keksz, tészta, bébiételek, szójatejpor, néhány húsminta tesztelésével találkozhatunk.

Vizsgálataimban igen nagy számban szerepeltek hústermékek, melyek eredményei alapján elmondható (ha csak a vizsgált szóját tartalmazó húsmintákat veszem figyelembe), hogy a minták 60%-ánál volt kimutatható az RR szója jelenléte. BROD et al. (2007) szintén kereskedelemből származó húskészítményekben és a húsgyártás során alkalmazott szóját tartalmazó adalékanyagokban vizsgálták az RR szója jelenlétét. Kutatásaik alapján elmondható, hogy eredményeik hasonló adatokat szolgáltatottak, mivel a szóját tartalmazó minták 55%-ában bizonyították az RR szója jelenlétét.

5.1.2.3. Háromfázisú megoszláson (HFM) alapuló DNS izolálási módszerrel kinyert DNS sokszorozhatóságának vizsgálata

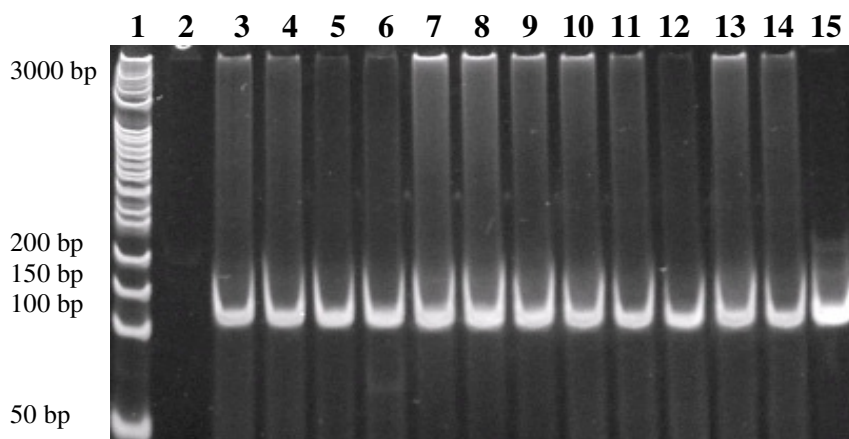
Az 5.1.1.3. fejezet eredményei alapján látható, hogy a különböző modell húsminiókból és kereskedelemből származó élelmiszerminiókból kiváló minőségű és mennyiségű DNS-t sikerült izolálni a HFM módszer segítségével. A DNS minőségén és mennyiségén kívül, a DNS oldat inhibitor mentességét is ellenőrizni kell. Az izolált DNS sokszorozhatóságát szója specifikus primerekkel bizonyítottam (Anyagok és módszerek fejezet 1. táblázat), mivel minden vizsgált minta tartalmazott szóját, ebben az esetben, ha a vizsgált DNS oldatunk inhibitor mentes, akkor egy 118 bp méretű fragmentum sokszorozódik. A 22/a. ábra a modell húsminiók lektin PCR-jének eredményeit mutatja be. Az ábráról jól látható, hogy minden esetben sikerült a szója jelenlétét bizonyítani, ugyanúgy mint a Wizard módszerrel izolált DNS esetében. Mivel a modell miniók mindegyike tartalmazott RR szóját, így a módszer alkalmazhatóságát a 35S promóterre specifikus primer párral is ellenőriztem (Anyagok és módszerek fejezet, 3. táblázat). Minden esetben sikerült kimutatni a 35S promóter jelenlétét (22/b. ábra).

A kereskedelmi forgalomból származó - már előzetesen PCR-el RR szója pozitívnak bizonyuló - élelmiszerminiókat szintén lektin és 35S specifikus primerpárokkal vizsgáltam, annak bizonyítására, hogy hasonlóan jó eredményeket kapok-e, mint a Wizard módszerrel izolált DNS-ek esetében. A 23. és 24. ábra a kereskedelmi miniók lektin és 35S promóter specifikus primerpárral történő amplifikáció eredményeit mutatja be. A gélképeken egyértelműen látható, hogy minden esetben megjelent a várt 118 bp (lektin gén) és 123 bp (35S promóter) méretű fragmentum. Így elmondható, hogy a DNS izolálásra továbbfejlesztett HFM módszer ugyanolyan hatékonysággal működik, mint a Wizard módszer, de alacsonyabb költséggel és nagyobb DNS hozammal. A módszer hatékonyságát a továbbiakban real-time PCR módszerrel is szükséges lenne ellenőrizni, hogy lássuk a mennyiségi GMO vizsgálat során hasonló GMO tartalmat kapam-e a HFM és a Wizard módszerrel izolált DNS-ek esetében.



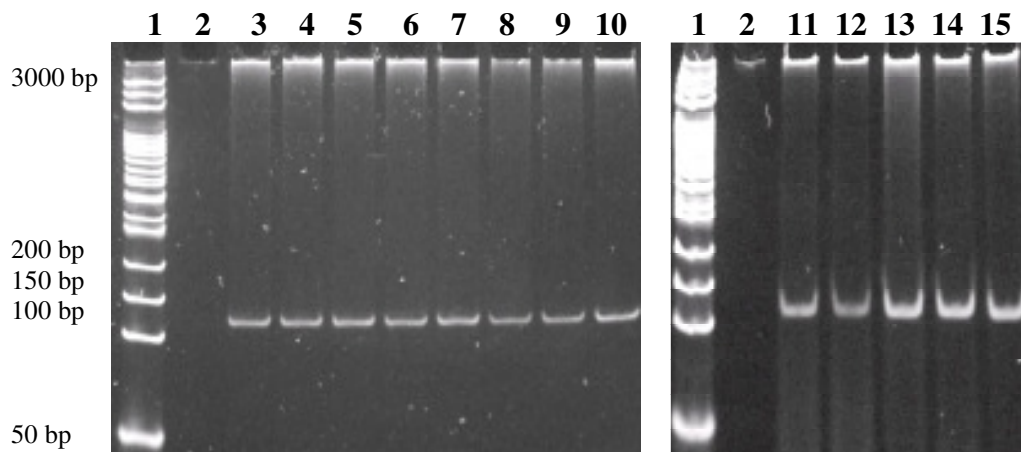
22. ábra Félüzemi körülmények között előállított modell húsminták lektin - 118 bp (a) és 35S PCR-jének eredményei – 123 bp (b) (háromfáziú megoszláson alapuló DNS izolálási módszer felhasználásával)

- | | |
|---|---|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 6. 0,5 %-os készre sütött, fagyasztott vagdalthús |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 7. 0,5 %-os párizsi hőkezelés előtt |
| 3. 0,5 %-os májkrém sterilizálás előtt | 8. 0,5 %-os párizsi hőkezelés után |
| 4. 0,5 %-os májkrém sterilizálás után | 9. Pozitív kontroll (RR szója) |
| 5. 0,5 %-os nyers, formázott vagdalthús | |



23. ábra Kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerminták lektin PCR-jének (118 bp) eredményei (HFM eljárással nyert DNS oldatok felhasználásával)

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 9. Párizsi minta 1 |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 10. Párizsi minta 2 |
| 3. Májkrém minta 1 | 11. Gyorsfagyasztott húsminta 1 |
| 4. Májkrém minta 2 | 12. Gyorsfagyasztott húsminta 2 |
| 5. Sonka minta 1 | 13. Virsli minta 1 |
| 6. Sonka minta 2 | 14. Virsli minta 2 |
| 7. Kenőmájas 1 | 15. Pozitív kontroll |
| 8. Kenőmájas 2 | (Evans GMO mentes szója) |

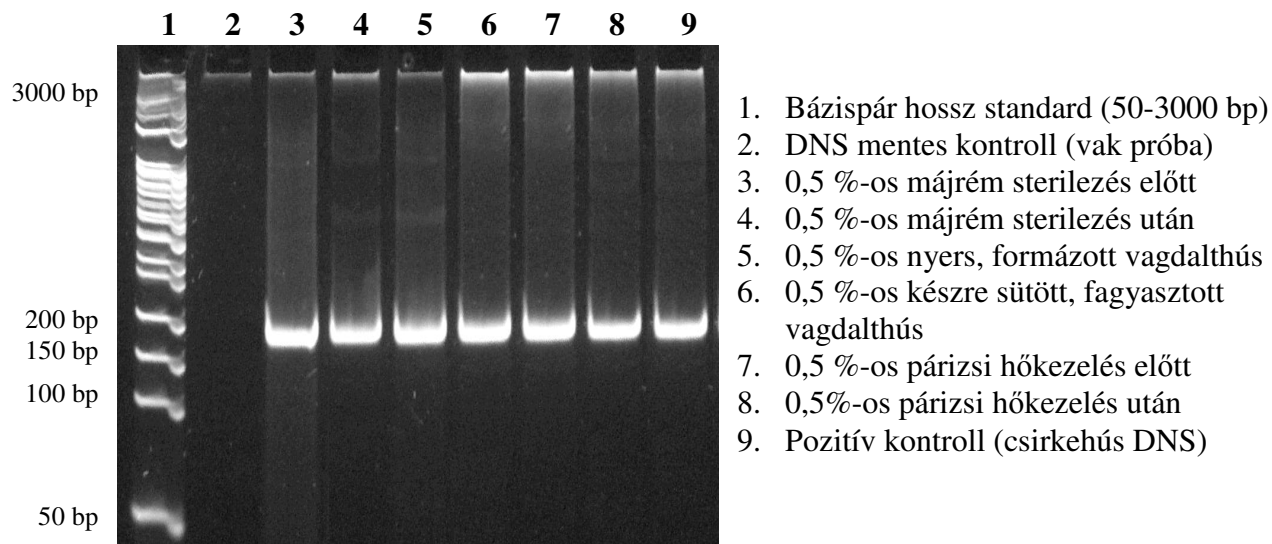


24. ábra Kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerminták 35S PCR-jének (123 bp) eredményei (HFM eljárással nyert DNS oldatok felhasználásával)

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 8. Kenőmájás 2 |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 9. Párizsi minta 1 |
| 3. Májkrém minta 1 | 10. Párizsi minta 2 |
| 4. Májkrém minta 2 | 11. Gyorsfagyasztott húsminta 1 |
| 5. Sonka minta 1 | 12. Gyorsfagyasztott húsminta 2 |
| 6. Sonka minta 2 | 13. Virsli minta 1 |
| 7. Kenőmájás 1 | 14. Virsli minta 2 |
| | 15. Pozitív kontroll (RR szója) |

A modell húsmintákból és a kereskedelmi forgalomból származó húsmintákból HFM módszerrel izolált DNS-t teszteltem gerinces állatra specifikus primerpár segítségével is, annak érdekében, hogy lássam a módszerrel sikerült-e sokszorozható állati-eredetű DNS-t kinyerni. Az izolált DNS inhibitor mentességét Scytb1/Scytb2 gerinces állatra specifikus primer pár segítségével ellenőriztem, mellyel egy 175 bp hosszúságú mitokondriális eredetű fragmentum sokszorozható (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat).

A 25. ábra a modell húsminták gerinces állatra specifikus primerpár PCR-jének gélképeit mutatja be. Az ábráról jól látható, hogy minden esetben sikerült a 175 bp hosszúságú szakaszt kimutatni, vagyis az izolált DNS-ek esetében sikerült igazolni, hogy tartalmaznak állati-eredetű DNS-t is. Az PCR eredményei alapján elmondható, hogy a HFM módszerrel izolált DNS oldatok ugyanolyan jól alkalmazhatónak bizonyultak a különböző PCR reakciókhoz, mint a Wizard módszer segítségével kinyert DNS oldatok.

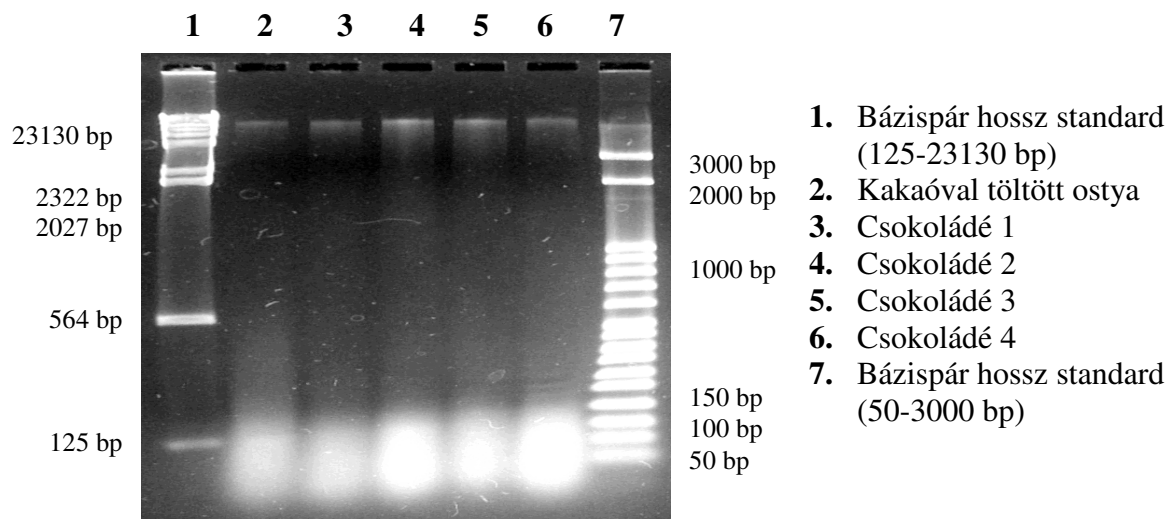


25. ábra Félüzemi körülmények között előállított modell húsminták gerinces állatra specifikus kontroll PCR-jének (175 bp) eredményei

A vizsgált kereskedelemből származó élelmiszermintáknál is minden esetben sikerült a 175 bp hosszú fragmentum sokszorozása és detektálása a gélben (ábra nem mutatja).

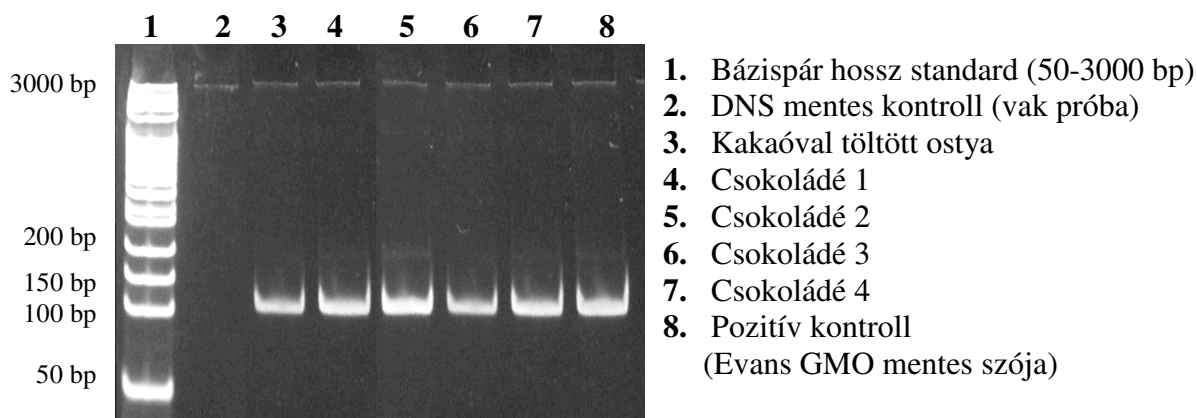
5.1.2.4. Kakaó tartalmú minták ioncserés kromatográfiával kinyert DNS sokszorozhatóságának vizsgálata

A kereskedelemből származó élelmiszerminták GMO vizsgálata során a csokoládé mintákból és a kakaóval töltött ostyából nem sikerült DNS-t izolálni az általunk alkalmazott Wizard, CTAB, HFM módszerrel sem. Ennek oka a kakaóban található polifenolok és egyéb másodlagos komponensek, melyek az irodalom szerint számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal. Ezért a DNS izolálására egyszerűen kivitelezhető anioncserélő kromatográfiás módszert fejlesztettem ki DEAE-cellulóz és Trisz-puffer alkalmazásával (ld: Anyagok és Módszerek). A kifejlesztett módszerrel jó minőségű DNS-t kaptam, amint azt a spektrofotometriás mérések, valamint az agaróz gélen történő DNS ellenőrzése is bizonyítja. A 26. ábra szemlélteti a csokoládé tartalmú ostya és csokoládé mintákból kinyert DNS fragmentum eloszlását 2%-os agaróz gélen. A DNS mintázatok jelentősen nem térnek el egymástól. Minden mintánál a 10-23 kbp tartományban sikerült DNS-t detektálni, valamint 150 bp alatt is kimutattam DNS töredékeket, melyért valószínűleg a termékek előállítása során alkalmazott magas hőmérséklet, illetve egyéb technológiai kezelések felelősek.



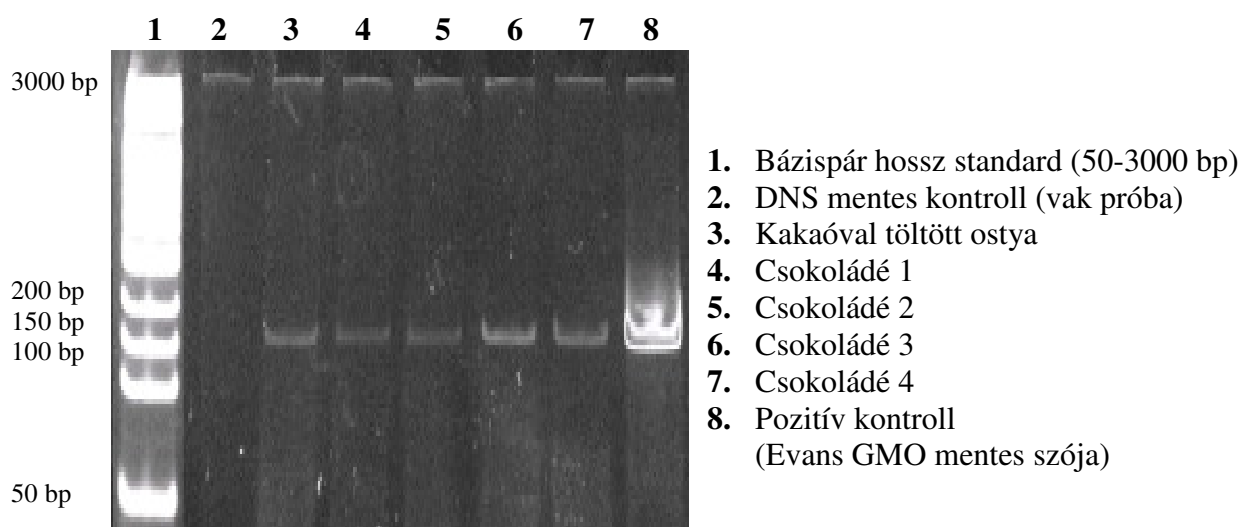
26. ábra Kereskedelmi forgalomból származó kakaóval töltött ostyából és csokoládéból DEAE cellulóz alapú ioncserés kromatográfiával tisztított DNS oldatok mintázata

A DNS inhibitor mentességét és sokszorozhatóságát növény specifikus primerpár segítségével ellenőriztem, mellyel egy 104 bp hosszúságú kloroplasztisz DNS szakasz sokszorozható (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat). A PCR reakció paramétereinek optimalizálása után kapott eredményeket a 27. ábra szemlélteti. Az ábráról jól látszik, hogy minden minta tartalmaz sokszorozható növényi DNS-t. A következő lépésben szója specifikus primerpárral vizsgáltam, hogy a mintákból kimutatható-e a szója összetevő. Mindegyik minta esetében pozitív jelet vártunk, mivel a csomagoláson a szója tartalom (kakaóval töltött nápolyi), vagy a lecitin (csokoládé), mint adalékanyag fel volt tüntetve.



27. ábra Kereskedelmi forgalomból származó, kakaóval töltött ostyából és csokoládéból származó DNS minták (DEAE eljárással tisztított) növény specifikus PCR-jének (104 bp) eredményei

A 28. ábra a lektin PCR eredményeit mutatja. Jól látható, hogy a csokoládé mintákból, csak igen gyenge jelet sikerült detektálni, mely valószínűleg egyrészt annak köszönhető, hogy a mintában a lecitin koncentrációja jóval kisebb, mint a jelenlevő növényi DNS koncentrációja, valamint az erősen feldolgozott lecitinben, a DNS már töredezett állapotban van jelen, így emiatt is nehezkessé válhat a kimutatása.



28. ábra Kereskedelmi forgalomból származó, kakaóval töltött ostyából és csokoládéból származó DNS minták (DEAE eljárással tisztított) lektin specifikus PCR-jének (118 bp) eredményei

A továbbiakban vizsgáltam a mintákban a GMO jelenlétet, de mindegyik minta negatívnak bizonyult mind a 35S promóter, mind a *nos* terminátor tekintetében (ábra nem mutatja).

5.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetés kísérletekben

5.2.1. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetés kísérletekben - DNS izolálás eredményei

A kísérletek során 4 csoportot különítettem el, mely csoportokban az állatokat 0%, 0,9%, 2,5% és 50% Roundup Ready szóját tartalmazó táppal etettem 14 napon keresztül. Egy csoporton belül 5 állattal dolgoztam. A kísérletek során az egyes állatok szerveiből és az izomból Wizard módszerrel DNS-t izoláltam, melynek eredményeit a 25. táblázat foglalja össze. A táblázatban az összes csoport adata egyesítve látható, az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy az összes szervből és izomszövetből minden esetben megfelelő mennyiségű és tisztaságú DNS-t extraháltam a további PCR analitikai vizsgálatokhoz. Egyes esetekben a bél és a gyomor vizsgálata során igen nagyak adódott az említett szervekből kinyert DNS mennyiségének szórása, mely az állatok egyedi eltéréséből adódhat.

25. táblázat 0%, 0,9%, 2,5% és 50% %-os RR szóját tartalmazó táppal etetett patkányok szerveiből és izomszövetéből izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzőinek összefoglaló táblázata

<i>Szervminták</i>	<i>Wizard módszer</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$	R érték ($A_{260/280}$)
Lép	23,26-26,89	1,78-1,81
Máj	20,16-22,63	1,78-1,82
Hasnyálmirigy	30,39-34,63	1,82-1,88
Vese	27,42-32,84	1,79-1,84
Bél	46,34-59,23	1,83-1,85
Gyomor	23,97-41,21	1,80-1,82
Izom	10,51-14,39	1,78-1,81
Bélfodri nyirokcsomó	8,29-17,7	1,78-1,80

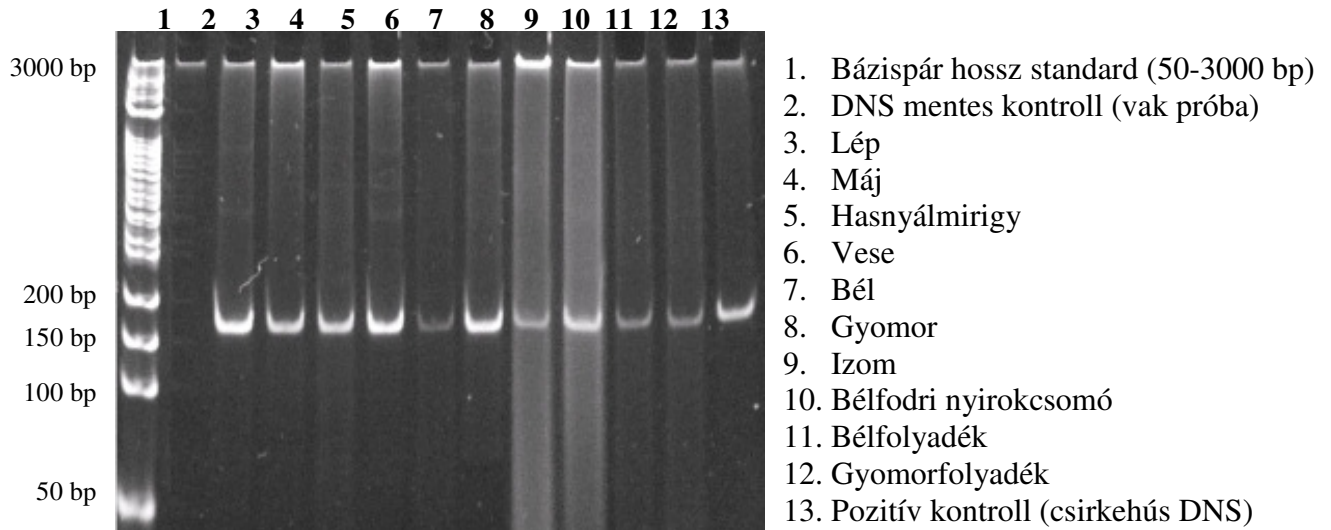
A 26. táblázat a 0%, 0,9%, 2,5% és 50%-os RR szóját tartalmazó táppal etetett állatok bél és gyomortartalmából izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzőit mutatja. A gyomrokat 2 ml, a belet 4 ml fiziológiás sóoldattal mostam ki. Ezen mintákat a proteináz K-val történő enzimés emésztést követően Amicon Ultraszűrő segítségével koncentráltam (2 ml-t töményítettem 500 µl-re), a megfelelő minőség és mennyiség elérése céljából. Az így töményített mintákból a továbbiakban sikeresen vontam ki DNS-t.

26. táblázat 0%, 0,9%, 2,5% és 50%-os RR szóját tartalmazó táppal etetett patkányok bél- és gyomortartalmából izolált DNS oldatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<u>Szervminták</u>	<i>Wizard módszer</i>	
	A mintából kinyert DNS mennyisége µg/2000 µl	R érték (A _{260/280})
Bélfolyadék (0%)	1,92±1,15	1,75±0,06
Bélfolyadék (0,9%)	2,11±1,97	1,78±0,05
Bélfolyadék (2,5%)	1,84±2,10	1,73±0,16
Bélfolyadék (50%)	0,73±0,70	1,66±0,19
Gyomorfoladék (0%)	1,67±1,23	1,84±0,09
Gyomorfoladék (0,9%)	2,02±1,16	1,83±0,07
Gyomorfoladék (2,5%)	1,17±1,09	1,86±0,08
Gyomorfoladék (50%)	1,94±1,23	1,82±0,02

5.2.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata patkányetetési kísérletekben – PCR vizsgálatok eredményei

Az etetési kísérlet során 0%, 0,9%, 2,5% és 50%-os RR szóját tartalmazó táppal etettem az állatokat 14 napon keresztül. A DNS izolálás fejezetből látható, hogy minden szervből és izomszövetből megfelelő R értékű DNS-t izoláltam, megfelelő koncentrációban. Az izolált DNS inhibitor mentességét SCytb1/SCytb2 gerinces állatra specifikus primer pár segítségével ellenőriztem, mellyel egy 175 bp hosszúságú fragmentum sokszorozható (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat). A kontroll PCR eredményei alapján az általam vizsgált összes minta megfelelő tisztaságúnak bizonyult, így minden DNS minta alkalmas volt a további PCR-el történő vizsgálatokhoz. A 29. ábra példaként mutatja be a gerinces állatra specifikus primerpárral történő sokszorozás eredményét.

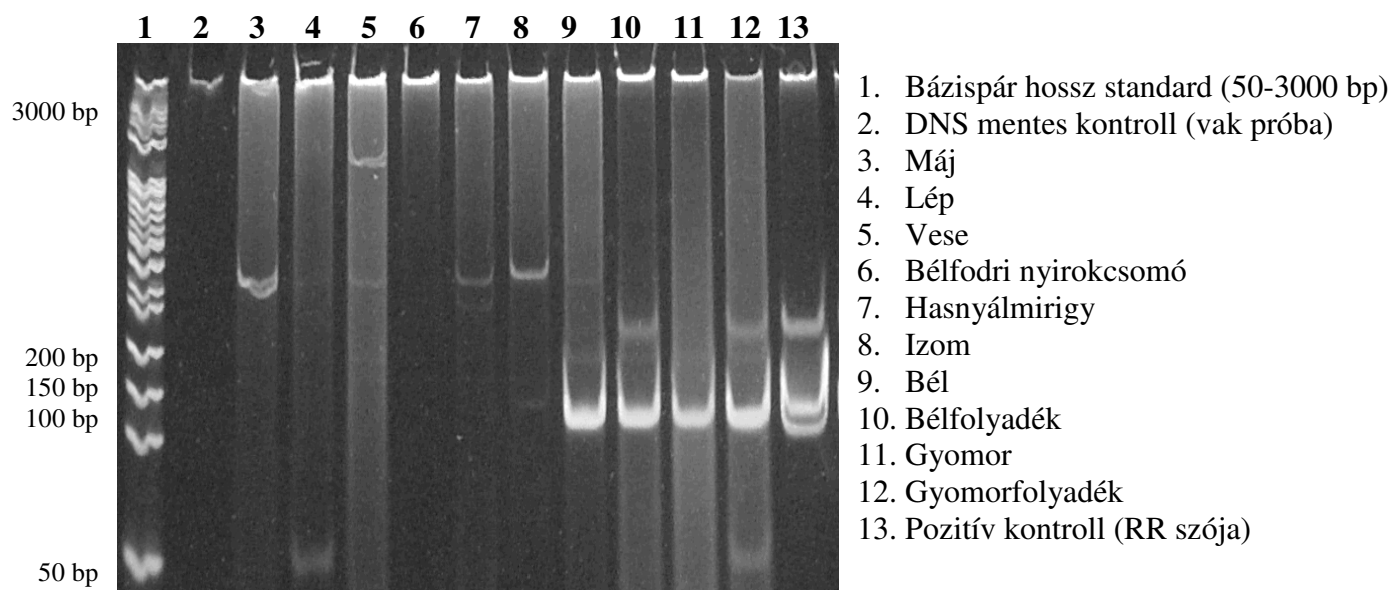


29. ábra Patkányszerv és izomszövet minták gerinces állatra specifikus PCR-jének (175 bp) eredményei

Mivel az összes izolált DNS minta inhibitor mentesnek bizonyult, így a következő lépésben vizsgáltam, hogy kimutatható-e a 35S promóter valamely szervből, vagy az izomszövetből. A GM összetevő jelenlétét az élelmiszermintáknál is alkalmazott 35S promóterre tervezett GM specifikus primerek segítségével vizsgáltam, mellyel egy 123 bp hosszúságú fragmentum sokszorozható (Anyagok és módszerek fejezet, 3. táblázat).

A 30. ábra példaként mutatja az egyik 50% RR szóját tartalmazó táppal etetett patkány (2. számú állat) béltraktusából, egyéb szerveiből és húsából izolált DNS 35S promóter specifikus PCR-jének eredményeit. A 35S promóter a bélben, a bélfolyadékban, a gyomorban és a gyomorfolyadékban volt kimutatható

A többi 4 állat esetében, melyeket szintén 50% RR szóját tartalmazó táppal etettem, több esetben kaptam pozitív jelet a 35S promóterre, azoknál a szerveknél, melyek közvetlenül érintkeznek a táppal (gyomor, bél), ennek megfelelően a gyomorfolyadékban és a bélfolyadékban is.



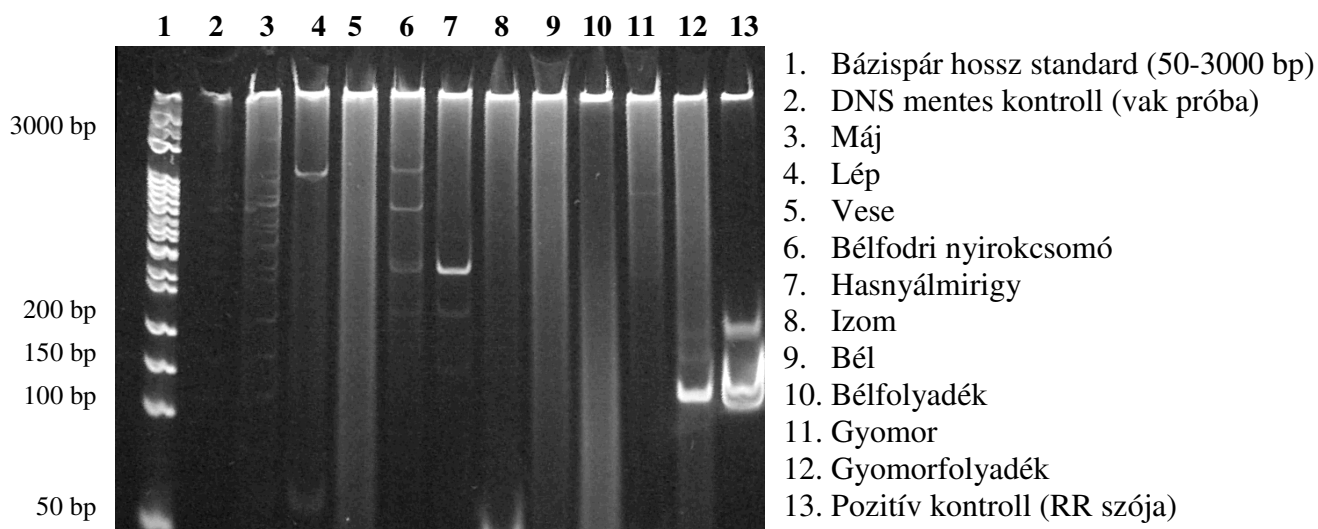
30. ábra 50% RR szóját tartalmazó táppal etetett (2. számú) patkány béltraktusából, egyéb szerveiből és izmából származó minták 35S promóter specifikus PCR-jének (123 bp) eredményei

Az 50% RR szóját tartalmazó táppal etetett állatok vizsgálata során kapott eredményeket a 27. számú táblázat foglalja össze. Az 1. számú állat esetében egyetlenegy esetben sem kaptam a 123 bp fragmentum méretnél jelet, ami azt jelenti, hogy egyetlenegy mintában sem sikerült kimutatni a 35S promóter jelenlétét. A 3. számú állat esetében a gyomorban és a gyomorfolyadékban volt kimutatható a 35S promóter. A 4. számú állat esetében a belfolyadékban és a gyomorfolyadékban tudtam detektálni a 35S promótert detektálni. Míg az 5. számú állat esetében szintén a belfolyadékban és a gyomorfolyadékban kaptam pozitív jelet a 35S promóter specifikus PCR során. A táblázatban található szerveken kívül az összes vizsgált szerv és izom minta negatívnak bizonyult.

27. táblázat 50% RR szóját tartalmazó táppal etetett patkányok esetében a 35S promóter tápcsatornából történő kimutatásának összefoglaló táblázata

Minták		Állat száma				
		1.	2.	3.	4.	5.
50% RR szója tartalmú táp	Gyomor	-	+	+	-	-
	Gyomorfolyadék	-	+	+	+	+
	Bél	-	+	-	-	-
	Belfolyadék	-	+	-	+	+

A 31. ábra a 2,5% RR szóját tartalmazó táppal etetett állatok béltraktusából, egyéb szerveiből, és izmából izolált DNS 35S promóter specifikus PCR-jének eredményeit mutatja az 5. számú patkány esetében. A 35S primerpárral történő sokszorozás során az 5. számú állat esetében kaptam pozitív jelet a gyomorfolyadékban (31. ábra). A többi 4 állat esetében minden minta negatívnak bizonyult.



31. ábra 2,5% RR szójjal etetett 5. számú patkány béltraktusából, egyéb szerveiből és izmából származó minták 35S promóter specifikus PCR-jének (123 bp) eredményei

A 0,9% RR szóját tartalmazó táppal etetett állatok béltraktusából, egyéb szerveiből, és izmából izolált DNS 35S promóterrel történő sokszorozása során egyetlen állat esetében sem kaptam pozitív jelet. Ez természetesen a kontroll (0% RR szóját tartalmazó táppal etetett) állatokból származó mintákra is elmondható.

Vizsgálataimat összefoglalva elmondható, hogy az 50% RR szóját tartalmazó táppal történő etetés során egyes esetekben a gyomorból, bélből, gyomor- és belfolyadékból detektáltam a 35S promótert. Bár az állatok altatása előtt, egy éjszakán át tartó tápelvonás történt, ez idő valószínűleg nem volt elegendő arra, hogy a táplálék teljes mértékben kiürüljön a szervezetből, ez adhat magyarázatot a pozitív eredményekre. A többi szervminta és az izomszövet minden esetben negatív volt, mely azt jelenti, hogy a 35S promóter, vagy annak kisebb fragmentuma nem jutott át a bélfalon, így nem került bele a véráramba. Hasonló eredményeket kaptam, mint EL-SANHOTY et al. (2006), akik GM burgonyával végeztek patkányetetés kísérletet. A vizsgálatok során a GM specifikus primerekkel végzett PCR-es vizsgálatok negatívnak bizonyultak a májból, veséből, lépből és izomból vett minták esetében. Ezzel szemben a béltraktus különböző szakaszain (gyomor, nyombél, éhbél, csípőbél, vakbél, végbél) a GM DNS jelenlétét igazolták, még 24 órával a tápelvonás után is.

ZHU et al. (2004) kutatásaiktól, Roundup Ready szóját tartalmazó táppal (30%, 60% és 90%) végeztek etetési kísérletet patkányokkal. A 13 héten át tartó etetési kísérlet során figyelték, hogy a CP4-EPSPS gén DNS fragmentumát (145 bp), illetve a szójabab lektin génjét kódoló fragmentumát (405 bp) sikerül-e detektálni az izomszövetből. Kísérleteik során egyéb szerveket nem vizsgáltak. A PCR eredményei alapján megállapították, hogy a két vizsgált fragmentum egyetlenegy mintából sem volt kimutatható.

5.3. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata - csirkeetetési kísérletekben

5.3.1. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata csirkeetetési kísérletekben - DNS izolálás eredményei

A Master-M kisvárdai baromfifeldolgozó üzemében történt az etetési kísérlet 2,5%-ban RR szóját tartalmazó takarmánnyal. Mintavétel a baromfi neveltetés során 5 időpontban, különböző etetési fázisokból véletlenszerűen történt. Minden mintavételnél az állományból 3 db állatot vizsgáltam, melyekből szervmintákat vettem, a belet (5-10 ml – nevelési fázistól függően) fiziológias sóoldattal mostam ki és a mintákból DNS-t izoláltam. Kontrollként garantáltan GMO szója mentes táppal etetett csirkeszervekből is izoláltam DNS-t (adatok nem mutatják). A bélfolyadékokból is izoláltam DNS-t, de ezeket a mintákat, a szintén proteínáz K enzimes emésztést követően Amicon Ultraszűrő segítségével koncentrálni kellett a megfelelő minőség és mennyiség elérése céljából.

Az így koncentrált mintákból a továbbiakban sikeresen vontam ki DNS-t (4 ml-t töményítettem 500 µl-re, 33. táblázat). Az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy az összes szervből és izomszövetből minden esetben megfelelő mennyiségű és tisztaságú DNS-t extraháltam. Az azonos etetési fázisokból vett minták esetében a DNS izolálási eredményekből átlagot és szórást számoltam. A 2,5%-os RR szóját tartalmazó táppal végzett különböző etetési fázisokból származó DNS oldatok mennyiségi és minőségi paramétereinek átlagértékeit és szórásait a 28-31 táblázat tartalmazza. A neveltetés kezdeti fázisaiban, a szervek kis mérete miatt nem sikerült az állatokból egyes szerveket elkülöníteni (bélfodri nyirokcsomó, hasnyálmirigy), így ezen adatok hiányoznak a táblázatból (28. táblázat).

A neveltetés késői fázisaiban a béltraktust a könnyebb kezelhetőség érdekében két részletben vizsgáltam. A kinyerhető DNS mennyisége a különböző nevelési fázisokban az állatok fejlődése miatt eltérő lehet, ezért az adatokat külön táblázatokban részleteztem.

28. táblázat Betelepített napos csibék szerveiből és izomszövetből izolált DNS minőségi és mennyiségi paraméterei

<i>Szerv neve</i>	A kinyert DNS mennyisége (µg/100 mg)	R érték (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Izmos gyomor külső rész	45,31±6,02	1,87±0,03
Izmos gyomor belső rész	41,02±5,11	1,88±0,06
Mirigyes gyomor	98,82±22,78	1,89±0,03
Begy	91,90±8,55	1,90±0,00
Izom (comb)	32,80±2,78	1,86±0,05
Bél	40,49±37,74	1,80±0,09
Máj	55,72±7,03	1,87±0,02

29. táblázat Szuper intenzív előindító takarmány etetési fázisából származó csirkeszervekből és izomszövetből izolált DNS minőségi és mennyiségi paraméterei

<i>Szerv neve</i>	A kinyert DNS mennyisége (µg/100 mg)	R érték (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Izmos gyomor külső rész	50,38±6,97	1,85±0,00
Izmos gyomor belső rész	46,85±12,41	1,72±0,00
Mirigyes gyomor	36,55±1,55	1,71±0,00
Begy	52,04±2,85	1,72±0,05
Izom (comb)	37,29±0,17	1,83±0,00
Izom (mell)	42,27±2,48	1,71±0,04
Bél	36,69±2,93	1,85±0,01
Hasnyálmirigy	25,79±5,15	1,76±0,01
Máj	64,19±0,44	1,85±0,01

30. táblázat Szuper intenzív indító takarmány etetési fázisából származó csirkeszervekből és izomszövetből izolált DNS minőségi és mennyiségi paraméterei

<i>Szerv neve</i>	A kinyert DNS mennyisége (µg/100 mg)	R érték (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Izmos gyomor külső rész	25,51±0,04	1,88±0,01
Izmos gyomor belső rész	32,61±9,48	1,88±0,01
Mirigyes gyomor	26,45±7,04	1,89±0,00
Begy	33,72±0,89	1,87±0,01
Izom (comb)	13,90±3,12	1,91±0,01
Izom (mell)	10,48±1,31	1,94±0,01
Bél eleje	51,73±16,48	1,83±0,04
Bél vége	43,08±27,05	1,84±0,02
Hasnyálmirigy	3,89±0,62	1,71±0,07
Bélfodri nyirokcsomó	30,06±0,52	1,79±0,00
Máj	52,82±3,52	1,84±0,00

31. táblázat Szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisából származó csirkeszervekből és izomszövetből izolált DNS minőségi és mennyiségi paraméterei

<i>Szerv neve</i>	A kinyert DNS mennyisége (µg/100 mg)	R érték (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Izmos gyomor külső rész	21,56±0,59	1,82±0,03
Izmos gyomor belső rész	30,08±2,51	1,90±0,00
Mirigyes gyomor	29,49±2,00	1,88±0,00
Begy	24,41±4,04	1,87±0,00
Izom (comb)	12,87±0,25	1,90±0,00
Izom (mell)	14,75±0,99	1,88±0,01
Bél eleje	43,71±8,92	1,88±0,01
Bél vége	55,42±4,66	1,84±0,03
Hasnyálmirigy	20,71±7,31	1,82±0,03
Bélfodri nyirokcsomó	49,05±10,44	1,82±0,01
Máj	56,14±0,81	1,84±0,00

32. táblázat Vágóvonalról származó csirkeszervekből és izomszövetből izolált DNS minőségi és mennyiségi paraméterei

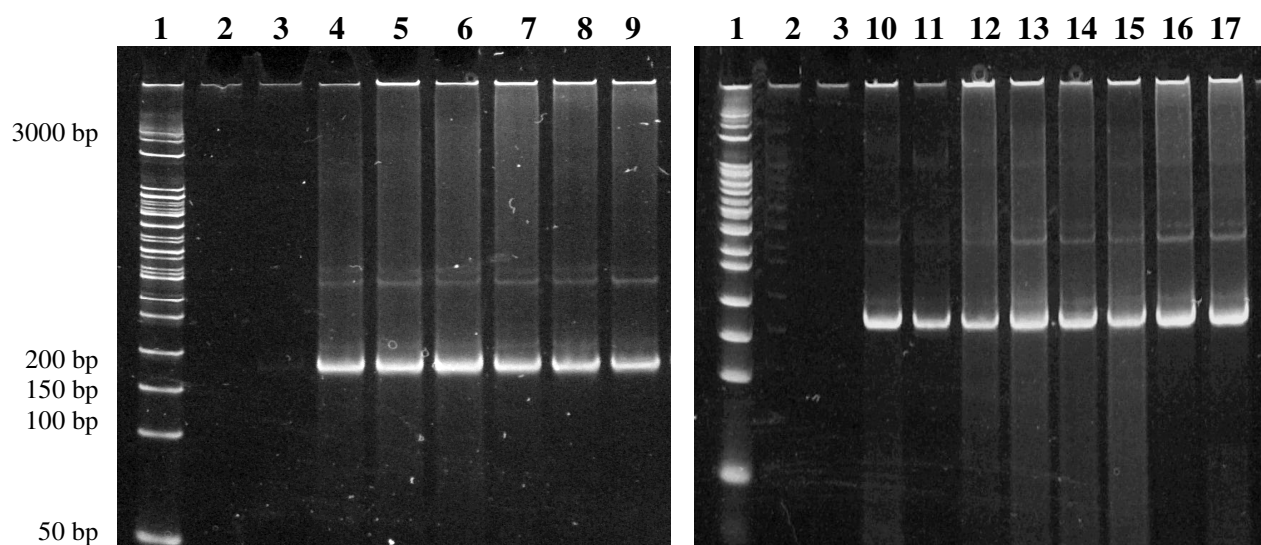
<i>Szerv neve</i>	A kinyert DNS mennyisége (µg/100 mg)	R érték (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Izmos gyomor külső rész	39,61±0,59	1,85±0,00
Izmos gyomor belső rész	22,54±2,81	1,88±0,00
Mirigyes gyomor	52,52±2,16	1,87±0,00
Begy	16,35±3,35	1,86±0,01
Izom (comb)	11,52±1,65	1,83±0,02
Izom (mell)	14,24±0,47	1,90±0,01
Bél eleje	3,01±0,62	1,63±0,21
Bél vége	60,87±10,62	1,79±0,09
Hasnyálmirigy	3,24±0,13	1,74±0,02
Bélfodri nyirokcsomó	5,08±1,03	1,84±0,06
Máj	58,97±0,74	1,85±0,02

33. táblázat 2,5% RR szóját tartalmazó táppal etetett csirkék béltartalmából izolált DNS adatok mennyiségi és tisztasági jellemzői

<i>Szerv neve</i>	A kinyert DNS mennyisége ($\mu\text{g}/4000 \mu\text{l}$)	R érték (A_{260}/A_{280})
Bélfolyadék (betelepített napos csibe)	0,55±0,22	1,88±0,02
Bélfolyadék (szuper intenzív előindító takarmány etetési fázisa)	1,69±2,96	1,86±0,04
Bélfolyadék eleje (szuper intenzív indító takarmány etetési fázisa)	2,81±4,15	1,80±0,03
Bélfolyadék vége (szuper intenzív indító takarmány etetési fázisa)	0,85±3,47	1,83±0,04
Bélfolyadék eleje (szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisa)	1,92±2,39	1,82±0,05
Bélfolyadék vége (szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisa)	3,70±1,07	1,86±0,00
Bélfolyadék eleje (vágóvonalról származó csirkeszervek)	0,54±3,45	1,85±0,04
Bélfolyadék vége (vágóvonalról származó csirkeszervek)	6,45±2,75	1,74±0,07

5.3.2. 35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata csirkeetetési kísérletekben – PCR reakciók eredményei

Mivel, - mint az a DNS izolálás fejezetben is jól látható - minden szervből és izomszövetből megfelelő R értékű DNS-t izoláltam, megfelelő koncentrációban, így a következő lépésben az inhibitor mentességet és a sokszorozható DNS jelenlétét ellenőriztem kontroll PCR reakcióval. A kontroll PCR reakció során az SCytb1/SCytb2 gerinces állatra specifikus primer pár segítségével dolgoztam, mellyel egy 175 bp hosszúságú fragmentum sokszorozható (Anyagok és módszerek fejezet, 1. táblázat).



32. ábra Szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisából származó szerv és izom minták gerinces állatra specifikus PCR-jének eredményei

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1. Bázispár hossz standard (50-3000 bp) | 10. Bélfolyadék eleje |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 11. Bélfolyadék vége |
| 3. Üres zseb | 12. Hasnyálmirigy |
| 4. Izmos gyomor belső rész | 13. Bélfodri nyirokcsomó |
| 5. Mirigyes gyomor | 14. Máj |
| 6. Begy | 15. Béleleje |
| 7. Izom (comb) | 16. Bélvége |
| 8. Izom (mell) | 17. Izmos gyomor külső rész |
| 9. Pozitív kontroll (csirkehús DNS) | |

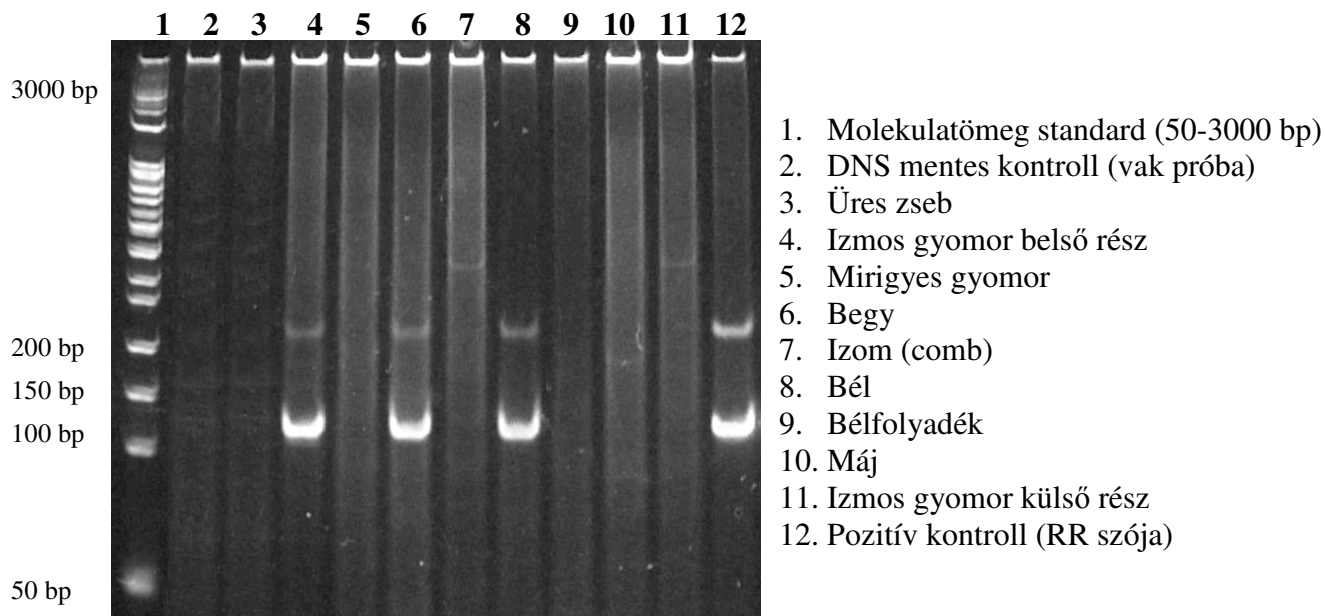
A 32. ábra példaként mutatja be a szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisából származó csirkeszerv és izom minták gerinces állatra specifikus primerpárral történő sokszorozásának eredményét. A többi vizsgált mintánál is minden esetben sikerült a 175 bp hosszúságú DNS szakaszt sokszorozni, ami azt jelenti, hogy a DNS oldataink nem tartalmaznak PCR inhibitorokat.

Mivel az összes DNS minta alkalmas volt a további vizsgálatokhoz, így a 35S promóter szervekbe, izomba történő átkerülésének a lehetőségét 35S promóterre tervezett GM specifikus primerek segítségével vizsgáltam. A primer segítségével pedig egy 123 bp hosszúságú fragmentum sokszorozható (Anyagok és módszerek fejezet, 3. táblázat).

Vizsgálataim során a 35S promóter jelenlétét mutattam ki néhány esetben az izmos gyomorból, begyből, bélből, a gyomorfoltyadékból és a bélfolyadékból.

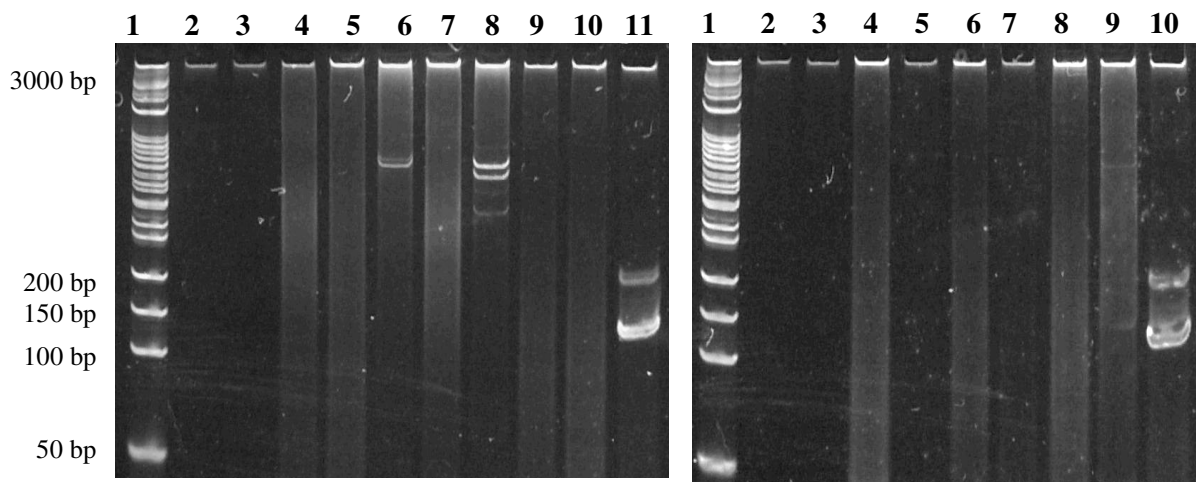
Az első mintavétel a betelepített naposcsibék közül történt (3 állat/mintavétel). A 33. ábrán látható, hogy a vizsgálat során a 35S promótert az izmos gyomor belső részéből, a begyből és a bélből lehetett kimutatni.

A másik két vizsgált állat esetében egyik állatnál a 35S promóter a begyből és a bélből volt detektálható, míg a másik állatból származó minták minden esetben negatívak voltak (ábra nem mutatja).



33. ábra Betelepített naposcsibék szerveiből és izomzatából származó minták 35S PCR-jének (123 bp) eredményei

A szuper intenzív előindító takarmány etetési fázisából származó állatok esetében a 35S promóter az izmos gyomor belső részéből volt kimutatható mindhárom állat esetében. A szuper intenzív indító takarmány etetési fázisából származó állatok esetében a 35S promótert mindhárom vizsgált állat esetében az izmos gyomor belső részéből sikerült kimutatni, illetve egy esetben a begyből vett mintánál is gyenge pozitív jelet kaptam. A szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisából vett minták esetében a 35S promóter az izmos gyomor belső részéből volt kimutatható mindhárom állat esetében. A GMO specifikus PCR eredményei szerint a 35S promóter kimutatásánál a vágóvonalról vett minták egyikénél sem kaptam pozitív jelet (34. ábra)



34. ábra Vágás során, a technológiai vonalról származó csirkék szerveiből és izomzatából vett minták 35S PCR-jének (123 bp) eredményei

- | | |
|--|--|
| 1. Molekulatömeg standard (50-3000 bp) | 1. Molekulatömeg standard (50-3000 bp) |
| 2. DNS mentes kontroll (vak próba) | 2. DNS mentes kontroll (vak próba) |
| 3. Üres zseb | 3. Üres zseb |
| 4. Izmos gyomor belső rész | 4. Bélfolyadék eleje |
| 5. Mirigyes gyomor | 5. Bélfolyadék vége |
| 6. Begy | 6. Hasnyálmirigy |
| 7. Comb | 7. Bélfodri nyirokcsomó |
| 8. Mell | 8. Máj |
| 9. Béleleje | 9. Izmos gyomos külső rész |
| 10. Bélvége | 10. Pozitív kontroll |
| 11. Pozitív kontroll (RR szója) | |

Az 34. táblázat foglalja össze a 2,5% RR szóját tartalmazó táppal etetett csirkék vizsgálata során kapott eredményeket. A táblázatban található szerveken kívül az összes vizsgált szerv és izom minta negatívnak bizonyult.

34. táblázat 2,5% RR szóját tartalmazó táppal etetett csirkék esetében a 35S promóter tápcsatornából történő kimutatásának összefoglaló táblázata

Minták	Napos csibék			Szuper intenzív előindító etetési fázis			Szuper intenzív indító etetési fázis			Szuper intenzív nevelő etetési fázis			Vágóvonal		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Izmos gyomor belső rész	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Begy	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bél	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A vizsgálatok során, a géleképeken nem specifikus termékek is keletkeztek, melynek magyarázata, hogy az érzékenység növelése céljából a JRC módszer által GMO kimutatásra javasolt ciklusszámot (35) 40-re növeltem. Az érzékenység növelése céljából a DNS koncentrációt is 500ng-ra növeltem, mely során nagyobb a valószínűsége, hogy a primer nem specifikus helyekre is bekötődik illetve az alkalmazott primerpár hasonló bázisösszetételű szekvenciát talált a DNS oldatban, mint a keresett szekvencia.

A GMO specifikus PCR eredményeit összefoglalva elmondhatjuk, hogy az egyes etetési fázisokból származó minták esetében a 35S promóter egyes szervekből kimutatható, bár e szervek közvetlenül érintkeznek a takarmánnyal, így ez magyarázatot adhat a pozitivitásra. A leggyakrabban fogyasztott belsőségből, a májból valamint az izomzatból egy alkalommal sem volt kimutatható a 35S promóter. A vágóvonalról vett csirke mintáknál egy esetben sem kaptam pozitív jelet, amit azzal magyarázhatunk, hogy a vágás előtt a csirkék egy éjszakás „éheztetésen” estek át a vágás megkönnyítése és a fertőzés elkerülése céljából, így az állat ez idő alatt a takarmányt teljes egészében megemésztette és a gyomorból, bélből ki is ürülhetett.

Az irodalom több csirkeetetési kísérletet ismertet, melyek során az volt a cél, hogy vizsgálják kimutatható-e a különböző szervekből, izomszövetből a transzgén DNS fragmentumát. Az etetési kísérletek legtöbbször Bt kukoricával történt. A kísérletek eredményei nagyrészt egyeznek a kutatásaim során kapott eredményeimmel. TONY et al. (2003) 35 napon át tartó brojler csirkeetetési kísérlet végzett, mely során a Bt gén nem volt detektálható sem az izomszövetből, sem a vizsgált szervekből (máj, vese, lép, szívizom, a csecsemőmirigy). ROSSI et al. (2005) eredményeimmel egyezően néhány esetben a begyből és a zúzából mutattak ki GM növényre jellemző fragmentumot (cry1A(b) gén 1800 bp méretű fragmentuma). AESCHBACHER et al. (2005) a rekombináns növényi DNS fragmentumát egyedül a begyből detektálták néhány esetben. AULRICH et al. (2002) bizonyították, hogy transzgén DNS fragmentumok nem mutathatók ki sem a másodlagos állati termékekből (tojás, hús, tej) sem a különböző szövetekből (izom, máj, lép, vese). KHUMNIRDPETCH et al. (2001) GMO szóját tartalmazó táppal végeztek brojler csirkeetetési kísérletet. Real-time PCR módszerrel vizsgálták hogy kimutatható-e az idegen DNS szekvencia a húsból, a bőrből, a májból és a nyombélből. A vizsgálat során az összes minta negatív volt.

5.4. Új tudományos eredmények

1. Az EU JRC (Ispra) által GMO kimutatásra javasolt DNS alapú PCR módszert adaptáltam és teszteltem különböző feldolgozottsági fokú, RR szóját tartalmazó modell hústermékeken, illetve kereskedelmi forgalomból származó élelmiszer-mátrixokon. Igazoltam, hogy a termékekben hőkezelés hatására csökken a *nos* terminátor kimutathatósága. Az adaptált és optimalizált egyszerű PCR módszerrel a sterilizett termékek vizsgálatakor is sikerült a 0,5%-os kimutatási határt elérni.
2. Az EU JRC (Ispra) által javasolt DNS izolálási módszert kombináltam Amicon Ultraszűrővel, mely továbbfejlesztett módszer alkalmas volt híg, alacsony DNS tartalmú mintákból történő DNS izolálásra. Új, háromfázisú megoszláson alapuló (HFM) módszert fejlesztettem ki, mely technika nem csak GMO kimutatásra, hanem egyéb PCR-es vizsgálatokban is alkalmazható. A kakaó tartalom miatt kritikus mintákra DEAE cellulóz alapú ioncserés kromatográfiás DNS kivonási módszert dolgoztam ki, melyeknél a gyakorlatban elterjedten használt módszerek nem alkalmazhatók hatékonyan.
3. Magyarországon elsők között végeztem az élelmiszertermék palettát átfogó RR szója kimutatást. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a kereskedelmi forgalomból származó szója pozitív élelmiszerek 47%-a tartalmazott GMO-t, valamint a GM pozitív termékek 17%-a haladta meg a 0,9%-os törvény által előírt jelölési kötelezettséget. A 0,9%-nál magasabb GMO tartalmú minták esetében, egyetlenegy esetben sem találtam a csomagoláson erre utaló jelölést.
4. Elsőként foglalkoztam a Roundup Ready szója expressziós vektorjában található karfiol mozaikvírus 35S promóter tápcsatornából történő kimutatásával és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálatával patkánytetési, illetve csirkeetési kísérlet segítségével. A vizsgálatokra az EU JRC (Ispra) által javasolt DNS izolálási és GMO kimutatási módszer adaptáltam. Az állatetési kísérletek során megállapítható, hogy a 35S promóter nem volt kimutatható a vizsgált szerv és izomszövet mintákból, vagyis a promóter nem jutott át a bélfalon, nem került bele a véráramba.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Egyes kereskedelemről származó, DNS izolálás szempontjából kritikus élelmiszerminták esetében (folyadék állagú, alacsony DNS koncentrációjú-, kakaó tartalmú-, egyes erősen feldolgozott élelmiszerek) a JRC által GMO kimutatásra javasolt DNS izolálási módszer nem adott megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t. Ezeknek a mintáknak az eredményes vizsgálatára szükség van a DNS izolálási technikák fejlesztésére. E területen, a dolgozatban ismertetett eredmények alapján az *alacsony DNS koncentrációjú élelmiszerminták* (szójaital, bébiételek) esetében, az JRC által ajánlott DNS izolálási módszert továbbfejlesztve, Amicon Ultraszűrővel kombinálva, a módszer alkalmas lehet megfelelő tisztaságú és koncentrációjú DNS kinyerésére. A *kakaó tartalmú* (csokoládé, csokoládé tartalmú nápolyi) *élelmiszermintákból* DEAE-cellulóz ioncserés kromatográfián alapuló DNS izolálási módszer kifejlesztésével sikerült jó minőségű, sokszorozható DNS-t izolálni. Az új, alacsony költségű háromfázisú megoszláson alapuló (HFM) DNS kivonási módszerrel, egy nemcsak GMO kimutatásra, hanem egyéb PCR-es vizsgálatokra (húseredet, növényeredet) is alkalmas DNS izolálási módszert fejlesztettem ki. A kereskedelmi forgalomból származó Wizard DNS tisztító Kit és a HFM módszer végrehajtása hozzávetőleg ugyanannyi időt igényel, de a költségeket összehasonlítva a HFM módszer harmada a Wizard módszernek. Ezen felül a HFM módszer átlagosan 2-szer nagyobb DNS hozamot produkált, mint a Wizard módszer, mivel korlátozott a gyanta DNS kötő kapacitása.

A HFM módszert a jövőben érdemesnek tartom real-time PCR módszerrel is tesztelni, összehasonlítva - a GMO kimutatásnál leggyakrabban alkalmazott - a Wizard módszerrel izolált DNS oldatok real-time PCR eredményeivel.

Az irodalomban igen kevés a hústermékekből történő GMO kimutatási kísérlet, így fontos megemlíteni, hogy a JRC által GMO kimutatásra javasolt egyszerű PCR módszer adaptálásával és optimalizálásával, sikerült még az erősen hőkezelt, sterilizált hústermékekből is kimutatni az RR szója tartalmat 0,5%-os kimutatási határral. Fontos, hogy ez az érték, a 0,9% törvény által előírt jelölési kötelezettség alatt van. Későbbiekben javasolnám – a kevés rendelkezésre álló irodalmi adat miatt is – az ismert RR szója tartalmú hústermékek, élelmiszerek real-time PCR-es vizsgálatát nyers és a hozzá tartozó feldolgozott élelmiszermintákból.

A vizsgálat célja, hogy teszteljük, a különböző mértékű hőkezelés (vagy esetleg egyéb fizikai illetve kémiai kezelés) hogyan hat a GMO tartalom mennyiségi meghatározására, mérhető-e ugyanaz a GMO tartalom például egy nyers májkrém massa és a belőle készült májkrém konzerv esetében.

A kereskedelmi minták kvantitatív PCR-el történő GM vizsgálata során, az eredményekből kitűnt, hogy a GM pozitív termékek 17%-a haladta meg a 0,9%-os törvény által előírt jelölési kötelezettséget. Mivel a 0,9%-nál magasabb GMO tartalmú mintáknál, egyetlenegy esetben sem találtam a csomagoláson a GMO tartalomra utaló jelölést, így a jövőben javasolnám a fogyasztók érdekeinek védelmében a hatóságok éves vizsgálati mintaszámának növelését.

A JRC által javasolt DNS izolálási és GMO kimutatási módszer adaptálásával vizsgáltam a 35S promóter tápcsatornából történő kimutatását és a szervezetbe történő bejutását állatetetési kísérletekkel (patkány- és csirkeetetési kísérlet).

A *rövid-távú patkány-etetési kísérletek* alapján elmondható, hogy a 35S promóter kis (123 bp) fragmentuma nem jutott át a bélfalon, nem került bele a véráramba, mivel nem volt kimutatható a vizsgált szervminták egyikéből sem. Az 50% RR szóját tartalmazó táppal etetett patkányok esetében több esetben kaptam pozitív jelet a 35S promóterre, azoknál a szerveknél, melyek közvetlenül érintkeznek a táppal (gyomor, bél), ennek megfelelően a gyomorfoliadékban és a bélfolyadékban is. Az állatok altatása előtt egy éjszakán át tartó tápelvonás történt, de ez idő valószínűleg nem volt elegendő arra, hogy a táplálék teljes mértékben kiürüljön a szervezetből, mely magyarázatot adhat a pozitivitásra. Ennek részletesebb vizsgálata szükségeltetik nagyobb állatszámmal, több ismétlésben annak igazolására, hogy a fogyasztás jelenthet-e kockázatot.

A *csirkeetetési kísérlet* eredményei szerint az egyes etetési fázisokból származó minták esetében a takarmánnyal közvetlenül érintkező szervekből (begy, izmos gyomor belső része, bél) néhány esetben kimutatható volt 35S promóter. A leggyakrabban fogyasztott belsőségek, a máj, valamint az izomszövet minden alkalommal negatívnak bizonyult. A vágóvonalról vett csirke mintáknál egy esetben sem kaptam pozitív jelet. Ez az elsődleges eredmény a GM takarmányt fogyasztó haszonállatok feldolgozásának szempontjából pozitív, ennek megerősítésére is további vizsgálatokat javaslok.

A jövőben további tervezett vizsgálatok végrehajtását javasolnám hosszú távú, többgenerációs állatetetési kísérletekkel, mellyel igazolható hogy a GM növények fogyasztásának van-e rövid illetőleg hosszabb távon esetleges kockázata, kiemelten a direkt módon az élelmiszerbe kerülő GM növények illetve termékeik esetében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A géntechnológiailag módosított organizmusok (Genetically Modified Organisms, GMO) olyan élő szervezetek, amelyekben az örökítő anyagot, a DNS-t, a természetben elő nem forduló módon változtatták meg. A különböző gazdaságilag jelentős gént tartalmazó genetikailag módosított növények jelentős fejlődésen mentek keresztül az elmúlt években. Az első generációs GM növények közé a biotikus és abiotikus stressz rezisztens növények tartoznak, melyek közül a legelterjedtebb a rovarkártevőkkel szemben ellenálló, valamint a gyomirtó szerekkel szemben toleráns GM növények. Közülük leggyakrabban a szója, kukorica, repce és gyapot módosításával találkozhatunk. Élelmiszeripari szempontból a szója felhasználása a legjelentősebb, különösen a húsiparban, ahol nagyobb mennyiségben használják a különböző szója készítményeket fehérje pótlóként, illetve állományjavítóként. A GM növények társadalmi megítélése nem egységes, ezért biztosítani kell a termesztőknek és fogyasztóknak a szabad választás lehetőségét, hogy dönthessenek a GM növények termesztése, fogyasztása ellen illetve mellette. Mindezeket figyelembe véve az Európai Unió rendeletekkel szabályozza a genetikailag módosított termények, szervezetek kibocsátását, forgalmazását, nyomon követését és jelölését. A mai álláspont szerint az 1830/2003-as Európai Közösségi (EK) rendelet értelmében a 0,9%-nál nagyobb részarányban genetikailag módosított alkotót tartalmazó termékek jelölése az EU tagállamaiban kötelező. A törvény által előírt határértékek, valamint a GMO mentesség ellenőrzésére Uniós szinten különböző analitikai módszerek állnak rendelkezésre, mely módszerek azonban leginkább növényi minták (vetőmagok, takarmányok, élelmiszeripari nyers- és alapanyagok) vizsgálatára alkalmasak. A feldolgozott élelmiszerekből történő DNS izolálás és GMO kimutatás azonban számos nehézségbe ütközhet, egyes élelmiszeripari termékeknél az élelmiszer-mátrixban található fehérjék, zsírok, poliszaccharidok, polifenolok és egyéb másodlagos komponensek számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal, másrészt a különböző élelmiszer előállítási folyamatok során fellépő fizikai, kémiai hatások is degradálhatják a bennük található DNS-t. A fent említett okok miatt fontos a már meglévő módszerek folyamatos tesztelése, adaptálása és továbbfejlesztése mind a DNS izolálás, mind a GMO kimutatás területén.

Így dolgozatom célja volt a Joint Research Center (JRC) által GMO kimutatásra javasolt DNS izolálási módszerek adaptálása, tesztelése és továbbfejlesztése különböző feldolgozottsági fokú élelmiszer-mátrixok esetében, költség hatékony háromfázisú megoszláson alapuló (HFM) DNS kivonási módszer továbbfejlesztése, optimalizálása, valamint DNS izolálási technika kidolgozása kakaó tartalmú élelmiszermintákra. További céloom volt különböző technológiai fázisokból származó, félüzemi körülmények között előállított GM szóját tartalmazó modell hústermékek vizsgálata egyszerű PCR módszerrel, vizsgálva ezzel egyes fizikai hatásokra bekövetkező DNS degradációt, valamint azt, hogy a degradáció befolyásolja-e a kimutathatóságot. Munkám során kereskedelmi forgalomból származó élelmiszereket is teszteltem kvalitatív és kvantitatív PCR rendszerrel, annak érdekében, hogy felmérhető legyen, a magyar fogyasztó GM élelmiszerek fogyasztásának mértéke.

Kutatási területem másik fő irányvonala a Roundup Ready szója expressziós vektorjában található karfiol mozaikvírus 35S promóter tápcsatornából történő kimutathatóságával és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálatával foglalkozik állatetetés kísérletek segítségével, a JRC által javasolt GMO kimutatási módszer használatával és adaptálásával. Mivel a GM növények a természetben ilyen formában elő nem forduló vektor konstrukciókat tartalmaznak, ezek emberi-, állati szervezetre gyakorolt hatása teljes mértékben még nem ismert, így a fogyasztók egy része kétségekkel fogadja termesztésüket és élelmiszeripari alkalmazásukat.

Élelmiszerminták tesztelése GMO kimutatás céljából

Az általam vizsgált különböző feldolgozottságú termékek között a baromfi párizsi (nyers és hőkezelt formátum), baromfi vagdalt (nyers, panírozott, elő és készre sütött, valamint fagyasztott formátum) és pulyka májkrém (nyers és sterilizált formátum) szerepelt, melyeket a Hajdú BÉT RT, debreceni és mezőkovácsházi üzemében állították elő 0,5%; 1%; 1,5%; és 2%-ban RR szójaliszt tartalommal. A GM teszteléshez vásárolt közel 100 kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerminták nagy részét húskészítmények (felvágottak, májkrém és májas minták, húskonzervek, virsli minták, gyorsfagyasztott húskészítmények), valamint bébiételek, levesbetétek, pizza és makaróni szószok, édességek, illetve szójatermékek képezték.

A modell húsminták DNS izolálási eredményei szerint, mindegyik húsminta az alkalmazott Wizard módszerrel megfelelő mennyiségű és nagy tisztaságú DNS oldatot eredményezett, melyek alkalmasnak bizonyultak a további PCR-rel történő vizsgálatokhoz. A kereskedelmi forgalomból származó minták esetében a DNS izolálást Wizard, Amicon Ultraszűrővel módosított Wizard és CTAB módszerrel végeztem.

Költséghatékony háromfázisú megoszláson alapuló DNS kivonási technikát fejlesztettem tovább a különböző feldolgozottsági szintű modell és kereskedelmi forgalomból származó hústermékekre, valamint ioncserés kromatográfiás módszert dolgoztam ki DNS kivonásra kakaó tartalmú mintákból. A kereskedelmi minták DNS izolálás eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a 91 mintából 85 esetben tudtam a polimeráz láncreakcióhoz megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-t izolálni (5 sonka termék szója tartalmáról, nem volt információ, mivel ezen termékek nem előre csomagolt, hanem frissen szeletelt áruk voltak, így ezen mintákat a továbbiakban nem vontam bele a kiértékelésbe). Problémák a magas feldolgozottsági fokú és szénhidrát tartalmú pudingporokkal és a magas feldolgozottságú szójaszósszal adódtak.

A fent említett vizsgált minták esetében a DNS inhibitor mentességét szója specifikus lektin gén sokszorozásával, vagy növény specifikus vagy gerinces állatokra specifikus primerek segítségével vizsgáltam. A GMO kimutatáshoz 35S promóter és *nos* terminátor specifikus primereket használtam.

A mennyiségi meghatározást „esemény” (event) specifikus valós idejű (real-time) PCR módszerrel végeztem, TaqMan próba alkalmazásával. A relatív GMO (RR szója) mennyiségi meghatározása során a normalizálás lektin gén specifikus szekvenciával történt. Az ismeretlen minta RR szója tartalma standard referencia anyagok méréséből adódó kalibrációs görbe segítségével történt. A vizsgálatokhoz szója specifikus és RR szója event specifikus primert és próbát alkalmaztam.

A modell húsminták mindegyikéből sikerült kimutatni a lektin gént, mely azt jelenti, hogy az izolált DNS oldatok inhibitor mentesek. A kereskedelemről származó élelmiszerminták lektin PCR-jének az eredményeit összefoglalva pedig megállapítható, hogy a szója tartalom vizsgálata során, a 80 jó minőségű DNS mintát vizsgálva 62 termék esetében kaptam lektin génre pozitív jelet. A termékek 11%-ánál pozitív jelet kaptam lektin génre, annak ellenére, hogy a csomagoláson erre nem találtam utalást, így ezek a termékek jelöléshibásak voltak.

A modell húsmintákkal végzett GMO specifikus PCR eredményeimet összefoglalva elmondható, hogy az adaptált optimalizált egyszerű PCR módszerrel, poliakrilamid gélen történő elválasztással és SYBR Green I festéssel az erősen hőkezelt, sterilizett termékek vizsgálatakor is sikerült a 0,5%-os kimutatási határt elérni (a szenzitivitás és a specificitás az optimalizált módszerrel 100% volt). A 0,5%-os detektálási határral teljesíthető volt az EU jogszabály által előírt 0,9%-os jelölési kötelezettség.

A GMO jelenlétének kimutatása során megállapítható, hogy a vizsgált 62 lektin gén pozitív termék közül 29 minta esetében sikerült kimutatni a 35S promóter és/vagy *nos* terminátor jelenlétét. GMO jelenlétére utaló jelölést egyik termék csomagolásán sem találtam. Az eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált minták 47%-ánál volt kimutatható a GMO tartalom.

A kvantitatív vizsgálatok eredményei szerint a 29 GM pozitív mintából 12 minta RR szója tartalma kisebb volt, mint 0,1% (a minták 41,4%-a), 12 minta (41,4%) esett a 0,1-0,9%-os intervallumon belül és 5 minta (17,2%) tartalmazott 0,9%-nál magasabb RR szója tartalmat. A 0,9%-nál magasabb RR szója tartalmú mintáknál a csomagoláson egyetlenegy esetben sem találtam utalást a GM összetevő előfordulására.

35S promóter tápcsatornából történő kimutatása és a szervezetbe történő bejutásának vizsgálata állatetelési kísérletekkel

A kísérletek egyik részében a humán szervezet modellezésére Wistar törzsű hím patkányokat alkalmaztam (5 állat/csoport), mely során az állatokat különböző (0% /kontrol/, 0,9%, 2,5% és 50%) RR szójaliszt tartalmú táppal ettem 14 napon keresztül. Az állatok túlaltatását követően, eltávolítottam és vizsgáltam a lépét, májat, hasnyálmirigyet, vesét, belet, gyomrot, izomszövetet, béltraktust és a gyomrot, valamint a bél- és gyomorfoliadékot.

Kísérleteim második részében a Master-M Kft. kisvárdai baromfifeldolgozó üzemében 0% (kontrol) és 2,5%-ban RR szójalisztet tartalmazó takarmánnyal történt csirkeetetés 42 napon keresztül. Az említett időszak során háromszor történt tápváltás, így a mintavétel a baromfi neveltetés során 5 időpontban, véletlenszerűen történt (betelepített napos csibe, szuper intenzív előindító-, szuper intenzív indító-, szuper intenzív nevelő takarmány etetési fázisa és a vágóvonal). Minden mintavételnél az állományból 3 db állatot vizsgáltam, melyekből eltávolítottam az izmos gyomor külső és belső részét, a mirigyes gyomrot, a begyet, a belet, a hasnyálmirigyet, a bélfodri nyirokcsomót és a májat, mintát vettem továbbá az izomszövetből (comb és mellhús) és vizsgáltam a bélfolyadékot is.

Mindkét DNS túlélés vizsgálat során Wizard illetve Amicon ultraszűrővel kombinált Wizard (bélfolyadékok esetében) módszerrel történt a DNS izolálás. A vizsgált szervmintákból izolált DNS inhibitor mentességét, gerinces állatokra specifikus primerpár segítségével ellenőriztem.

A 35S promóter jelenlétének vizsgálatát pedig a 35S promóter specifikus primerpárral vizsgáltam.

A patkányetelési kísérlet eredményeit összefoglalva, elmondható, hogy az 50% RR szóját tartalmazó táppal történő etetés során egyes esetekben a gyomorból, bélből, gyomor- és bélfolyadékából detektáltam a 35S promótert. Mivel az állatok altatása előtt egy éjszakán át tartó tápelvonás történt, ez idő valószínűleg nem volt elegendő arra, hogy a táplálék teljes mértékben kiürüljön a szervezetből, ez adhat magyarázatot a pozitivitásra. A vizsgált szervminták és az izomszövet minden esetben negatív volt, mely azt jelenti, hogy a 35S promóter, vagy annak kisebb fragmentuma nem jutott át a bélfalon, így nem került be a véráramba. A 2,5% RR szóját tartalmazó táppal történő etetés során egy esetben kaptam pozitív jelet a gyomorfolyadékban. A többi állat esetében, - beleértve a 0,9%-os RR szóját tartalmazó táppal etetett állatokat - minden minta negatívnak bizonyult.

A csirkeetelési kísérlet eredményei szerint az egyes etelési fázisokból származó minták esetében a takarmánnyal közvetlenül érintkező szervekből (begy, izmos gyomor belső része, bél) néhány esetben kimutatható volt 35S promóter. A leggyakrabban fogyasztott belsőségek, a máj, valamint az izomszövet minden alkalommal negatívnak bizonyult. A vágóvonalról vett csirke mintáknál egy esetben sem kaptam pozitív jelet, amit azzal magyarázhatunk, hogy a vágás előtt a csirkék egy éjszakás „éheztetésen” estek át a vágás megkönnyítése és a fertőzés elkerülése céljából, így az állat ez idő alatt a takarmányt teljes egészében megemésztette és a gyomorból, bélből is kiürülhetett.

8. SUMMARY

The Genetically Modified Organisms are such living organisms, in which the inheritance material, the DNA, has been modified in which way that cannot be found in nature. The different genetically modified plants, which have economically significant genes, have evolved greatly in the recent past. The first generation of GM plants are the biotic and abiotic stress resistant plants, of which the most widely known are the ones that can resist insects and certain pesticides. The most commonly modified plants are soybean, maize, rapeseed and cotton. From the food industry's point of view the most significant is the soybean, especially meat processing plants as they are using large amount of soybean products as protein substitute and substance conditioner. The social acceptance towards GM plants is far from being unified, hence we must grant the freedom of choice for the consumers for growing and consuming GM plants. Taken all this into consideration the European Union controls by the means of regulations the producing, selling, tracking and marking of such crops and products. According to the 1830/2003 EU regulation, any product containing more than 0.9% of GM component has to be labelled in all EU member states. The legal limit of GMO component or the total absence of such can be tested by certain analytical routines, most of which are suitable to test plant samples (seeds, livestock feed, and the raw and base materials of the food industry). To isolate DNA and to detect GMO from processed foods is usually very problematic, as certain food products' food-matrix contains such proteins, fats, polysaccharides, polyphenols and other secondary components usually create an irreversible bond with the nucleic acids, furthermore the physical and chemical influence along the processing can also degrade the DNA. Because of the reasons mentioned above it is very important to further test adapt and improve the routines that we have for isolating DNA and to detect GMO.

The goal of my thesis is to adapt, test and improve the Joint Research Center's (JRC) DNA isolating routine for detecting GMO in regard of different processing-level of food matrixes, to improve and optimize a cost effective three-phase partitioning DNA extraction method, and to work out a DNA isolation technique for cocoa containing food samples. My further goal is to examine GM soybean containing meat products coming from different technological phases using the PCR method, monitoring the DNA degradation resulting from the physical stresses, and also to determine whether the degradation influences the traceability or not. Along my work I have tested commercially available products using both quantitative and qualitative PCR systems, to map the Hungarian market's GM food consuming volume.

The other main stream of my research is to test the cauliflower mosaic virus 35S promoter which can be found in the expression vector of the Roundup Ready soybean from the nutritional track and also with its penetration to the body by the means of animal experiment using and adapting the GMO testing method recommended by JRC. Since the GM plants contain certain vector constructions that cannot be found in nature, the effect of these to animals or humans is not completely know, hence a number of consumers have serious doubts about growing and using these.

Testing food samples for detecting GMO

The food samples that I have tested include poultry bologna (raw and heat treated), ready-to-eat hamburgers (raw, crumbed, preheated, fried and deep frozen) and turkey liver canes (raw and sterilized). All of them were produced by Hajdu BET RT in either Debrecen or Mezőkovácsháza, and they had 0,5%, 1%, 1.5% and 2% of Roundup Ready soybean flour content. The nearly 100 commercial samples were mostly meat products (cold-meat, liverwurst, canned liver, canned meat products, frankfurter and ready-to-eat meat products) along with baby food, pizza and pizza sauces, sweets and soybean products.

The model meat products, according to the DNA isolation results, gave sufficient amount and purity of DNA solution, thanks to the Wizard method, and these solutions have been proven to be suitable for the further PCR analysis. In case of the commercial samples I isolated the DNA using the Wizard method, Wizard method modified with Amicon ultra filter, and CTAB method. I have developed a cost effective three-phase partitioning DNA isolation technique for the mid production and for commercial meat products, and I also worked out an ion exchange chromatography method for extracting the DNA from cocoa containing samples. Summarizing the commercial samples DNS isolation results the conclusion is the following. In case of 85 out of the 91 samples I was able to isolate sufficient quantity and quality of DNA for the polymerase chain reaction (I have had no information on 5 ham product's soy content because these were not packed but freshly sliced products, so I excluded these from the summary). The problems encountered in case of the highly processed and carbohydrate containing pudding powders and highly processed soy sauce.

In case of the above mentioned samples, I examined the lack of the DNA inhibitor by amplifying the soy specific lectin or vertebrate specific mitochondrial gene sequences. To detect the GMO I have used 35S promoter and NOS terminator specific primers.

Along the commercial sample tests, if the samples tested positive for the S35 promoter and/or the nos terminator, I have determined the GMO content by real-time PCR. For the quantification I have used Roundup Ready event specific primers, and probes (TaqMan). For quantifying the relative GMO (RR soy) content the normalization were carried out with lectin gene specific sequence. To determine the quantity I have used the standard RR soy reference material. The lectin gene has been detected in every model meat sample, which means that the isolated DNA solutions are inhibitor free. By summarizing the commercial samples' PCR results we can conclude that examining the soy content in case of the 80 good quality DNA samples 62 gave a lectin positive result. 11% of the product samples gave positive result for the lectin gene despite the fact that the wrapping and the product label contained no such information meaning that the labelling was defect in these cases.

Summarizing the GMO specific PCR results done on the model meat samples we can conclude that it was possible to reach the 0,5% detection limit with the adapted and optimized simple PCR routine as well as by using the polyacrylamid gel separation, and also on sterilized products using the SYBR Green I stain. The sensitivity and the specificity both were resulting 100% with the optimized method. With the 0,5% detection limit we can meet the 0,9% labelling obligation set in the EU directives.

Along the process of testing for GMO it is clear that out of the 62 lectin gene positive products 29 was also positive for 35S promoter and/or nos terminator. None of the labels mentioned GMO content. The final conclusion is that 47% of the samples were tested positive for GMO content. The quantitative results show that of the 29 GM positive sample, 12 had lower than 0,1% of RR soy content (41,4%), 12 samples fell into the 0,1-0,9% interval and 5 samples (17,2%) had higher than 0,9% RR soy content, but none of these products' labels had shown any sign of GM component.

Testing for the presence of the 35S promoter in the nutrition pathway, and examining its organism penetration ability by means of animal feeding tests.

In one part of the experiment I have used Wistar strain male rats to model the human body, 5 specimens per group. I had 4 groups, and I have fed them with 0% (control group), 0,9%, 2,5% and 50% RR soy flour containing feed for 14 days. After over anesthetizing the rats, I have removed and examined the spleen, liver, pancreas, kidneys, intestines, stomach, and muscle tissue, and also intestinal and stomach fluids.

In the second part of the experiment, I fed chickens for 42 days in the poultry processing facility of Master-M Ltd. in Kisvarda. Two kinds of feeds were used, 0% of RR soy content

and 2,5% RR soy content feed. During the 42 days, we changed the feed 3 times, and we took samples randomly 5 times from the 1 day old state to the slaughter processing line. During every sampling I examined 3 specimens of which I have removed the gizzard, the crop, intestines, pancreas, and the liver, and also took muscle tissue samples, thigh and breast as well as intestinal liquid.

For both DNA survival tests I have used the Wizard, and the Wizard combined with Amicon ultra filter method to isolate the DNA. I have checked the isolated DNA for being inhibitor free using a vertebrate specific primer pair. The presence of the 35S promoter has been tested using a 35S promoter specific primer pair. The rat experiment's results show that in case of the samples coming from the group that has been fed with the 50% RR soy content feed some samples from stomach, intestines and fluids tested positive for the 35S promoter. The explanation is that there was only one night of food absence before the anaesthesia, and this time is probably not long enough for the food to completely clear from the body. The examined organs and muscle tissue was negative every time meaning that neither the 35S promoter nor its smallest fragment was able to get through the intestinal wall hence not getting into the bloodstream. In case of the 2,5% RR soy content feed I only found 1 positive test from a stomach fluid sample. The rest of the specimens, including the group with the 0,9% RR soy content feed were completely negative for everything I have tested.

The chicken feeding experiment shows that the specimens taken from certain growth phases occasionally show positive results for the samples that came in direct contact with the feed (crop, inside of the gizzard and intestines) but the most commonly eaten giblets like the liver, or the muscle tissue samples always gave negative PCR results. The samples taken from the processing line every single sample gave a negative result, which can be explained by the fact that before the processing the chicken undergo a 8-12 hour starving, which makes the processing easier, and helps avoid infections. During this time the specimen can digest the feed and it can clear from the body completely.

9. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

ABDULLAH T., RADU S., HASSAN Z., HASHIM J. K. (2006). Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. *Food Chemistry*, 98 (3) 575-579. p.

AESCHBACHER K., MESSIKOMMER R., MEILE L., WENK C. (2005): Bt176 Corn in Poultry Nutrition: Physiological Characteristics and Fate of recombinant Plant DNA in Chickens. *Poultry Science*, 84 385-394. p.

AHMED, F. E. (2002): Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20 (5) 215-223. p.

ALARY R., SERIN A., MAURY D., JOUIRE B. H., SIRVEN J-P., GAUTIER M-F., JOUDRIER P. (2002): Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. *Food Control*, 13 235-244. p.

ANDERSEN C., HOLST-JENSEN A., BERDAL K.G., THORSTENSEN T., TENGS T. (2006): Equal Performance of TaqMan, MGB, Molecular Beacon, and SYBR Green-Based Detection Assay in Detection and Quantification of Roundup Ready Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 9658-9663. p.

ANDRÁSFALVY M. (2004): Új megoldás DNS, RNS és fehérje kapillárelektroforetikus vizsgálatára. *A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója*, 18 (1) 20-21. p.
<http://195.228.254.34/biokemia/tartalom/b200403.pdf>

AULRICH K., BÖHME H., DAENICKE R., HALLE I., FLACHOWSKY G. (2002): Novel feeds – a review of experiments at our Institute. *Food Research International*, 35 285-293. p.

AUMAITRE A., AULRICH K., CHESSON A., FLACHOWSKY G., PIVA G. (2002): New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. *Livestock Production Science*, 74 223-238. p.

- AUSUBEL FM et al .(1989): Short protocols in molecular biology Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York City.
- BAILEY J. E., OLLIS D. F. (1987): Product recovery operation. 726-798. p. In: BAILEY J. E., OLLIS D. F. (Szerk.): *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill International Editions, 984 p.
- BÁNÁTI D., GELENCSÉR É. (2007): A genetikailag módosított növények és élelmiszerek engedélyezését megelőző kockázatértékelés alapja. *Magyar Tudomány*, 4 445. p.
- BERDAL K.G., HOLST-JENSEN A. (2001): Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Research and Technology*, 213 432-438. p.
- BECKER J. M., CALDWELL G. A., ZACHGO E. A. (1996): Large-scale isolation of plasmid DNA by column chromatography. 49-54. p. In: BECKER J. M., CALDWELL G. A., ZACHGO E. A. *Biotechnology, a laboratory course (Second edition)*. San Diego, California: Academic Press, 261 p.
- BIRCH L., ARCHARD C. L., PARKES H. C., MCDOWELL D. G. (2001): Evaluation of LabChip technology for GMO analysis in food. *Food Control*, 12 535-540. p.
- BONFINI L., et al. (2001): Review of GMO detection and quantification techniques. Ispra: Publication of the European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. 67. p.
- BRANCIARI R., AVELLINI P., SUKASI-SANGAMAYYA R., DI ANTONIO E. (2000): Analisi PCR-RFLP per la determinazione de specie in prodotti carnei trattati termivamente. (PCR-RFLP /Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism/ analysis for species determination in heat-treated meat products). *Industrie Alimentari XXXIX*, marz 313-318. p.
- BROD F. C. A., ARISI A. C. M. (2007a): Recombinant DNA in meat additives: Specific detection of Roundup Ready soybean by nested-PCR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 1980-1984. p.

BROD F. C. A., ARISI A. C. M. (2007b): Quantification of Roundup Ready soybean in Brazilian soy-derived foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, (article in pressed) doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01556.x

BROD F. C. A., FERRARI A DOS S., VALENTE L. L. ARISI A., C., M. (2007): Nested PCR detection of genetically modified soybean flour, infant formula and soymilk. *LWT*, 40 748-751. p.

BUSCONI M., FORONI C., CORRADI M., BONGIORNI C., CATTAPAN F., FOGHER C. (2003): DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry*, 83 127-134. p.

CANCAR K., RAVNIKAR M., ŽEL J., GRUDEN K., TOPLAK N. (2005): Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of *Cauliflower mosaic virus* to Complement the 35S Screening Assay for Genetically Modified Organisms. *Journal of AOAC International*, 88 (3) 814-822. p.

CANDRIAN U., LÜTHY J. (1991): Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. *Chimia*, 45 49-52. p.

CARDARELLI P., BRANQUINHO M. R., FERREIRA R. T. B., DA CRUZ F. P., GEMAL A. G. (2005): Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food control*, 16, 589-866. p.

CHEN T-L., PRASAD V., LEE C-H., LIN K-H., CHIUEH L-H., CHAN M-T. (2004): Extending the cDNA Microarray Detection System to Evaluate Genetically Modified Soybean and Tradicional Soy Foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12 (3) 259-264. p.

CHEN T-L., SANJAVA, PRASAD V., LEE C-H., LIN K-H., CHIUEH L-C., CHAN M-T. (2006): Validation of cDNA microarray as a prototype for throughput detection of GMOs. *Botanical Studies*, 47 1-11. p.

CHEN Y., GE Y., WANG Y. (2007): Effect of critical processing procedures on transgenic components in quality and quantity level during soymilk processing of Roundup Ready Soybean. *European Food Research and Technology*, 225 119-126. p.

CHEN Y., WANG Y., GE Y., XU B. (2005) Degradation of Endogenous and Exogenous Genes of Roundup Ready Soybean during Food Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 10239-10243. p.

CHOWDHURY E. H., KURIBARA H., HINO A., SULTANA P., MIKAMI O., SHIMADA N., GURUGE K. S., SAITO M., NAKAJIMA Y. (2003a): Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *Journal of Animal Science*, 81 2546-2551. p.

CHOWDHURY E. H., MIKAMI O., NAKAJIMA Y., HINO A., KURIBARA H., SUGA K., HANAZUMI M., YOMEMOCHI C. (2003b): Detection of genetically modified maize DNA fragments in the intestinal contents of pigs fed StarLink CBH351. *Veterinary and human toxicology*, 45 (2) 95-96. p.

COCKBURN A. (2002): Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. *Journal of Biotechnology*, 98 79-106. p.

CORBISIER P., TRAPMANN S., GANCSBERG D., HANNES L., VAN IWAARDEN P., BERBEN G., SCHIMMEL H., EMONS H. (2005): Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 282-290. p.

DEBODE F., JANSSEN E., BERBEN G. (2007): Physical degradation of genomic DNA of soybean flours does not impair relative quantification of its transgenic content. *European Food Research and Technology*, 226 273-280. p.

DENNISON C., LOVRIEN R. (1997): Three phase partitioning: Concentration and purification of proteins. *Protein Expression and Purification*, 11 149-161. p.

DOERFLER W., OREND G., SCHUBBERT R., FECHTELER K., HELLER H., WILGENBUS P., SCHRÖER J. (1995): On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes: mechanism and consequences. *Gene*, 157 241-245. p.

DOOLEY J. J., SAGE H. D., BROWN H. M., GARRETT S. D. (2005): Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Control*, 16 601–607. p.

DUGGAN P. S., CHAMBERS P. A., HERITAGE J., FORBES J. M. (2000): Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiology Letters*, 191 71-77. p.

EBBEHOJ K. F., THOMSEN P. D. (1991): Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. *Meat Science*, 30 221-234. p.

EINSPANIER R., KLOTZ A., KRAFT J., AULRICH K., POSER R., SCHWAGELE F., JAHREIS G., FLACHOWSKY G. (2001): The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *European Food Research and Technology*, 212 (2) 129-134. p.

EL SANHOTY R., BROLL H., GROHMANN L. LINKE B., SPIEGELBERG A., BOGL K. W., ZAGON J. (2002): Genetically modified maize and soybean on the Egyptian food market. *Nahrung-food*, 46 (5) 360-363. p.

EL-SANHOTY R. M. S. S., EL-MAGED A. D. A., RAMADAN M. F. (2006): Safety assessment of genetically modified potato spunta: degradation of DNA in gastrointestinal tract and carryover to rat organs. *Journal of Food Biochemistry*, 30 556-578. p.

ENGEL K.H., MOREANO F., EHLERT A., BUSCH U. (2006): Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17 490-497. p.

EWEN S. W. B., PUSZTAI A. (1999): Effects of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *Lancet*, 354 1353-1354. p.

FANG G., HAMMAR S., GRUMET R. (1992): A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biofeedback*, 13 (1) 52-54. p.

FERRARI C. S., VALENTE L. L., BROD F. C. V., TAGLIARI C., SANT'ANNA E. S., ARISI A. C. M. (2007): Evaluation of polymerase chain reaction and DNA isolation protocols for detection of genetically modified soybean. *International Journal of Food Science and technology*, 42 1249-1255. p.

FLACHOWSKY G., HALLE I ., AULRICH K. (2005): Long term feeding of Bt-corn – 10 generation study with quails. *Archives of Animal Nutrition*, 59 (6) 449-451. p.

FORTE V.T., DI PINTO A., MARTINO C., TANTILLO G.M., GRASSO G., SCHENA F. P. (2005): A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. *Food control*, 16 535-539. p.

GELENCSÉR É., BÁNÁTI D. (2007): A GM növényekre alapozott élelmiszerek biztonsági értékelése. 53-68. p. In: BÁNÁTI D., GELENCSÉR É., (Szerk.): *Élelmiszer-biztonsági kötetek IV. Genetikailag módosított növények az élelmiszerláncban*. Budapest: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet. 189 p.

GELENCSÉR É., JÁNOSI A. (2006): GM kontamináció ellenőrzése DNS-re alapozott molekuláris biológiai és ellenanyagra alapozott immunkémiai módszerekkel. 94-102. p. In DEÁK T., MARÁZ A. (Szerk.): *Az élelmiszerbiztonság mikrobiológiai vizsgáló módszerei*. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 115 p.

GERMINI A., SALATI C., QUARTAROLI G., MARCHELLI R. (2005): Determination of transgenic material on the Italian food market using a new multiplex PCR method. *Italian Journal of Food Science*, 17 (4) 371-380. p.

GERMINI A., ZANETTI A., SALATI C., ROSSI S., FORRÉ C., SCHMID S., MARCHELLI R. (2004): Development of Seven-Target Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Transgenic Soybean and Maize in Feeds and Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 3275-3280. p.

GREINER R, KONIETZNY U., VILLAVICENCIO A. L. C. H. (2005): Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16 (8) 753-759. p.

GRYSON N., DEWETTINCK K., MESSEN K. (2007a): Detection of Genetically Modified soy in Doughs and Cookies. *Cereal Chemistry*, 84 (2) 109-115. p.

GRYSON N., DEWETTINCK K., MESSENS K. (2007b): Influence of cocoa components on the PCR detection of soy lecithin DNA. *European Food Research Technology*, 226 247-254. p.

GRYSON N., MESSENS K., DEWETTINCK K. (2004a): Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 1357-1363. p.

GRYSON N., MESSENS K., DEWETTINCK K. (2004b): Influence of Different Oil-Refining Parameters and Sampling Size on the Detection of Genetically Modified DNA in Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81 (3) 231-234. p.

GRYSON., RONSSSE F., MESSENS K., DE LOOSE M., VERLEYEN T., DEWETTICK K. (2002): Detection of DNA During the Refining of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (2) 171-174. p.

HAMMOND B. G., VICINI J. L., HARTNELL G. F., NAYLOR M. W., KNIGHT C. D., ROBINSON E. H., FUCHS R. L., PADGETTE S. R. (1996): The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosphate tolerance. *American Institute of Nutrition*, 717-727. p.

HARDEGGER M., BRODMAN P., HERRMANN A. (1999): Quantitative detection of the 35S promoter and NOS terminator using quantitative competitive PCR. *European Food Research and Technology*, 209 83-87. p.

HELLEBRAND M., NAGY M., MÖRSEL J. T. (1998): Determination of DNA traces in rapeseed oil. *European Food Research and Technology*, 206 237-242. p.

HERMAN L., DE BLOCK J., VIANE R. (2003): Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 38 633-640. p.

HERNÁNDEZ M., RODRÍGUEZ-LÁZARO D., ESTEVE T., PRAT S., PLA M. (2003): Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organisms detection. *Analytical Biochemistry*, 323 164-170. p.

HESZKY L., KISS E. (2005): Növényi biotechnológia és molekuláris növénynevelés. 107-221. p. In: HESZKY L., FÉSÜS L., HORNOK L. (Szerk.): *Mezőgazdasági biotechnológia*. Budapest: Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., 354 p.

HO M-W., RYAN A., CUMMINS, J. (1999): Cauliflower mosaic viral promoter - A recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11 194-197. p.

HO M-W., RYAN A., CUMMINS, J. (2000a): CaMV 35S Promoter Fragmentation Hotspot Confirmed, and it is Active in Animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12 189. p.

HO M-W., RYAN A., CUMMINS, J. (2000b): Hazards of transgenic plants containing the cauliflower mosaic viral promoter, *Authors' reply to critiques of "The Cauliflower Mosaic Viral Promoter – a Recipe for Disaster?"*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12 6-11. p.

HOLLAND P. M., ABRAMSON R. D., WATSON R., GELFAND D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Termus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88 7276-7280. p.

HÜBNER P., STUDER E., LÜTHY J. (1999): Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 10 353-358. p.

JANKIEWICZ A., BROLL H., ZAGON J. (1999): The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG § 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer). *European Food Research and Technology*, 209 77-82. p.

JÁNOSI A., SZAMOS J. (2001): Comparison of two methods in purification of meat-DNA for PCR. *Acta Alimentaria*, 30, 113-118. p.

JENNINGS J. C., ALBEE L. D., KOLWYCK D. C., SURBER J. B., TAYLOR M. L., HARTNELL G. F., LIRETTE R. P., GLENN K. C. (2003a): Attempts to Detect Transgenic and Endogenous Plant DNA and Transgenic Protein in Muscle from Broilers Fed YieldGard Corn Borer Corn. *Poultry Science*, 82 371-380. p.

JENNINGS J. C., KOLWYCK D. C., KAYS S. B., WHETSELL A. J., SURBER J. B., CROMWELL G. L., LIRETTE R. P., GLENN K. C. (2003b): Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal. *Journal of Animal Science*, 81 1447-1455. p.

KAKIHARA Y., MATSUFUJI H., CHINO M., YAMAGATA K. (2007): Detection of recombinant DNA of genetically modified (GM) soybeans in heat-treated GM soybeans and commercial natto. *Food Control*, 18 (10) 1289-1294. p.

KALOGIANNI D. P., KORAKI T., CHRISTOPOULOS T. K., IOANNOU P. C. (2006): Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 1069-1076. p.

KANSAL S., SHARMA A., GUPTA M. N. (2006): An integrated process for obtaining oil, protease inhibitors and lectin from soybean flour. *Food Research International*, 39 499-502. p.

KHUMNIRDPETCH V., INTARACHOTE U., TREEMANEE S., TRAGOONROONG S., THUMMABOOD S. (2001): Detection of GMOs in the broilers that utilized genetically modified soybean meals as a feed ingredient. Plant and Animal Genome IX Conference Poster P08., San Diego, January 13-17. http://www.intl-pag.org/pag/9/abstracts/P08_38.html

KISS É., TAMÁS B., BORBÁS R., SZAMOS J. (1998): Fehérjék határfelületi viselkedése a háromfázisú megoszlás során víz – tercier-butanol – só háromkomponensű rendszerben. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 104 (10) 422-429. p.

KOTA R., HOLTON, T.A. HENRY R. J. (1999): Detection of Transgenes in Crop Plants Using Molecular Beacon Assays. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17 363-370. p.

KREMMER T. (1974): Módszertan II. 95-163. p. In: KREMMER T., BOROSS L. (Szerk.) *Gélkromatográfia*. Budapest: Műszaki könyvkiadó. 263. p.

KUIPER H. A., NOTEBORN H. P. J. M., KOK E. J., KLETER G. A. (2002): Safety aspects of novel foods. *Food Research International*, 35 567-271. p.

LAU L-T., COLLINS R. A., YIU S-H., XING J., YU A. C. H. (2004): Detection and characterization of recombinant DNA in Roundup Ready soybean insert. *Food Control*, 15 471-478. p.

LIPP M., ANKLAM E., BRODMAN P., PIETSCH K., PAUWELS J. (1999a): Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control*, 10 379-383. p.

LEVISON P. R., BADGER S. E., HATHI P., DAVIES M. J., BRUCE I. J., GRIMM V. (1998): New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 827 337-344. p.

LIPP M., BLUTH A., EYQUEM F., KRUSE L., SCHIMMEL H., VAN DEN EEDE G., ANKLAM E. (2001): Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 212 497-504. p.

LIPP M., BRODMANN P., PIETSCH K., PAUWELS J., ANKLAM E. (1999b): IUPAC Collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82 (4) 923-928. p.

LIU G., SU W., XU Q., LONG M., ZHOU J., SONG S. (2004): Liquid-phase hibridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 15 303-306. p.

LIU G-M., CAI H-N., CAO M-J., SU W-J. (2007): Fluorophore doubled stranded probe-multiplex quantitative PCR method for detecting transgenic component of promoter derived from Cauliflower Mosaic Virus and nos terminator derived from *Agrobacterium tumefaciens* simultaneously. *Food Control*, 18 615-622. p.

MANIATIS, T., FRIRSCH, E. F., SAMBROOK, J. (1989): Molecular cloning, New York: Cold Spring Harbor. 586 p.

MARÁZ A. (2006): Molekuláris módszerek alkalmazása patogén és indikátor mikroorganizmusok kimutatására és azonosítására. 74-93. p. In DEÁK T., MARÁZ A. (Szerk.): *Az élelmiszerbiztonság mikrobiológiai vizsgáló módszerei*. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 115 p.

MARTIN-ORÚE S. M., O'DONNELL A. G., ARIÑO J., NETHERWOOD T., GILBERT H. J., MATHERS J. C. (2002): Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations. *British Journal of Nutrition*, 87 533-542. p.

MAZZA R., SOAVE M., MORLACCHINI M., PIVA G., MAROCCO A. (2005): Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Research*, 14 775-784. p.

MERCER D. K., SCOTT K. P., BRUCE-JOHNSON W. A., GLOVER L. A., FLINT H. J. (1999): Fate of free DNA and transformation of oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 6-10. p.

MERIC B., KERMAN K., MARRAZZA G., PALCHETTI I., MASCINI M., OZSOZ M. (2004): Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS-terminator, a genetic element present in GMOs. *Food Control*, 15 (8) 621-626. p.

MEYER, R., CHARDONNENS, F., HUBNER, P., & LUTHY, J. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food. Detection of soya in processed meat products *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203, 339-344. pp.

MEYER R. (1999): Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMO in food. *Food Control*, 10 391-399. p.

MEYER R. (1999): Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMO in food. *Food Control*, 10 391-399. p.

MEYER R., CHARDONNENS F., HÜBNER P., LÜTHY J. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A*, 203 339-344. p.

MIRAGLIA M., BERDAL K. G., BRERA C., CORBISIER P., HOLST-JENSEN A., KOK E. J., MARVIN H. J. P., SCHIMMEL H., RENTSCH J., VAN RIE J. P. P. F., ZAGON J. (2004): Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42 1157-1180. p.

MYHRE M. R., FENTON K.A., EGGERT J., NIELSEN K. M., TRAAVIK T. (2006): The 35S CaMV plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells. *European Food Research and Technology*, 222 185–193. p.

NETHERWOOD T., MARTIN-ORÚE S. M., O'DONNELL A. G., GOCKLING S., GRAHAM J., MATHERS J. C., GILBERT H. J. (2004): Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, 22 (2) 204-209. p.

NIELSEN C. R., BERDAL K. G., BAKKE-MCKELLEP A. M., HOLST-JENSEN A. (2005): Dietary DNA in blood and organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *European Food Research and Technology*, 221 1-8. p.

NIELSEN C. R., HOLST-JENSEN A., LØVSETH A., BERDAL K. G. (2006): Persistence and distribution of intravenously injected DNA in blood and organs of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L.). *European Food Research and Technology*, 222 258-265. p.

ODEGAARD B. H., ANDERSON P. C., LOVRIEN R. E. (1984): Resolution of the multienzyme cellulase complex of *Trichoderma reesei* QM9414. *Journal of Applied Biochemistry*, 6 156-183. p.

ORABY H .A. S., HASSAN A. A., MOSSALLAM A. A. A. (2005): Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52 (12) 1974-1980. p.

ORTOLA-VIDAL A., SCHNERR H., ROJMYR M., LYSHOLM F., KNIGHT A. (2007): Quantitative identification of plant genera in food products using and Pyrosequencing technology. *Food Control*, 18 921-927. p.

OVESNÁ J., DĚDIČOVÁ L., HORÁČEK J., SADILOVÁ E., KUČERA L., MĚSKOVÁ, L. (2002): Comparison of Different PCR-based Protocols for Detection of Roundup Ready Soybean. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 38 (1) 55-63. p.

PASSAMANO M., PIGHINI M. (2006): QCM DNA-sensor for GMO detection. *Sensors and Actuators B*, 118 177-181. p.

PAULI U., LINIGER M., ZIMMERMANN A. (1998): Detection of DNA in soybean oil. *European Food Research and Technology*, 207 264-267. p.

PEANO C., BORDONI R., GULLI M., MEZZELANI A., SAMSON M. C., DE BELLIS G., MARMIROLI N. (2005a): Multiplex polymerase chain reaction and ligation detection reaction/universal array technology for the traceability of genetically modified organisms in foods. *Analytical Biochemistry*, 346 90-100. p.

PEANO C., LESIGNOLI F., GULLI M., CORRADINI R., SANSON M. C., MARCHELLI R., MARMIROLI N. (2005b): Development of peptide nucleic acid polymerase chain reaction clamping. *Analytical Biochemistry*, 344 174-182. p.

PHIPPS R. H., BEEVER D.E., HUMPHRIES D. J. (2002): Detection of transgenic DNA in milk from cows receiving herbicide tolerant (CP4EPSPS) soyabean meal. *Livestock Production Science*, 74 269-273. p.

PHIPPS R.H., DEAVILLE E. R., MADDISON B. C. (2003): Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA in Rumen Fluid Duodenal Digesta, Milk, Blood, and Feces of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86 4070-4078. p.

PIKE R. N., DENNISON C. (1989): Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, 33 221-228. p.

POMS R. E., HOCHSTEINER W., LUGER K., GLOSSL J., FOISSY H. (2003): Model studies on the detectability of genetically modified feeds in milk. *Journal of Food Protection*, 66 (2) 304-310. p.

POREBSKI S., BAILEY G. L., BAUM R. B. (1997): Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15 (1) 8-15. p.

PUSZTAI Á., BARDÓCZ ZS. (2004): A genetikailag módosított élelmiszerek biztonsága. Kölcsey Füzetek VII. <http://mek.oszk.hu/03200/03216/03216.pdf>

REUTER T., AULRICH K. (2003): Investigation on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fate of feed ingested foreign DNA in pig bodies. *European Food Research and Technology*, 216 185-192. p.

ROSSEN L., NORSKOV P., HOLMSTROM K., RASMUSSEN O. F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17 37-45. p.

ROSSI F., MORLACCHINI M., FUSCONI G., PIETRI A., MAZZA R., PIVA G. (2005): Effect of Bt Corn on Broiler Growth Performance and Fate of Feed-Derived DNA in the Digestive Track. *Poultry Science*, 84 1022-1030. p.

ROSSI S., LESIGNOLI F., GERMINI A., FACCINI A., SFORZA S., CORRADINI R., MARCHELLI R. (2007): Identification of PCR-Amplified Genetically Modified Organisms (GMOs) DNA by Peptide Nucleic Acid (PNA) Probes in Anion-Exchange Chromatographic Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (7) 2509-2516. p.

ROTT M. E., LAWRENCE T. S., WALL E. M., GREEN M. J. (2004): Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 5223-5232. p.

SANDEN M., BERNTSSEN H. G., HEMRE G-I. (2007): Intracellular localisation of dietary and naked DNA in intestinal tissue of Atlantic salmon, *Salmo salar L.* using in situ hybridisation. *European Food Research and Technology*, 225 (3-4) 533-543. p.

SANDEN M., BRUCE I. J., RAHMAN M. A., HEMRE G-I. (2004): The fate of transgenic sequences present in genetically modified plant products in fish feed, investigating the survival of GM soybean DNA fragments during feeding trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 237 391-405. p.

SCHUBBERT R., HOHLWEG U., RENZ D., DOERFLER W. (1998): On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission in the fetus. *Molecular and General Genetics*, 259 569-576. p.

SCHUBBERT R., RENZ D., SCHMITZ B., DOERFLER W. (1997): Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leucocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Medical Science*, 94 961-966. p.

SHIRAI N., MOMMA K., OZAWA S., HASHIMITO W., KITO M., UTSUMI S., MURATA K. (1998): Safety Assessment of Genetically Engineered Food: Detection and Monitoring of Glyphosate-Tolerant Soybeans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62 (7) 1461-1464. p.

SIERADZKI Z., WALCZAK M., KWIATEK K. (2006): Occurrence of genetically modified maize and soybean in animal feedingstuffs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51 567-570. p.

SINGER V. L., JIN X., JONES J. L., YUE S., HAUGLAND R. P. (1994): Sensitive fluorescent stains for detecting nucleic acids in gels and solutions. *BioProbes*, 20 12. p.

SPIEGELHALTER F., LAUTER F-R., RUSSEL J .M. (2001): Detection of Genetically Modified Food Products in a Commercial Laboratory. *Journal of Food Science*, 66 (5) 634-640. p.

STEINBRECHER R. A. (2002): The CaMV 35S Promoter, Government and Corporate Scientific Incompetence: Failure to assess the safety of GM crops. *EcoNexus Briefings*, (<http://www.econexus.info/publications.html>)

- STOBIECKA M., CIEŚLA J. M., JANOWSKA B., TUDEK B., RADECKA H. (2007): Piezoelectric Sensor for Determination of Genetically Modified Soybean Roundup Ready in Samples not Amplified by PCR. *Sensors* 7, 1462-1479. p.
- STUDER E., RHYNER C., LÜTHY J., HÜBNER J. (1998): Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *European Food Research and Technology*, 207 207-213. p.
- SU W., SONG S., LONG M., LIU G. (2003): Multiplex polymerase chain reaction/membrane hybridization assay for detection of genetically modified organisms. *Journal of Biotechnology*, 105 227-233. p.
- SZAMOS J., AUBRECHT E., GELENCSÉR É. (1998): Detection of wheat by adapted polymerase chain reaction (PCR) methodology. *Acta Alimentaria*, 27 87-95. p.
- SZAMOS J., HOSCHKE Á. (1992): Purification of horseradish peroxidase by three-phase partitioning (TPP). *Acta Alimentaria*, 21 253-260. p.
- SZAMOS J., KISS É. (1995): Three-phase partitioning of crude protein extracts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170 290-292. p.
- SZIGETI T. (2001): Élelmiszerek, takarmányok és alapanyagaik GMO-vizsgálatának analitikai lehetőségei. *Konzervújság*, 1 7-10. p.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G., BOUVET J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17 1105-1109. p.
- TENGS T., KRISTOFFERSEN A. B., BERDAL K. G., THORSTENSEN T., BUTENKO M. A., NESVOLD H., HOLST-JENSEN A. (2007): Microarray-based methods for detection of unknown genetic modification. *BMC Biotechnology*, 7 (91) 1-8. p.
- TERRY F. C., HARRIS N. (2001): Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistry. *European Food Research and Technology*, 213 (6) 425-431. p.

THOMSON J. A. (2001): Horizontal Transfer of DNA From GM Crops to Bacteria and to Mammalian Cells. *Journal of Food Science*, 66 (2) 188-193. p.

TONY M. A., BUTCHKE A., BROLL H., GROHMANN L., ZAGON J., HALLE I., DÄNICKE S., SCHAUZU M., HAFEZ H. M., FLACHOWSKY G. (2003): Safety assessment of Bt 176 maize in broiler nutrition: degradation of maize-DNA and its metabolic fate. *Archives of Animal Nutrition*, 57 (4) 235-252. p.

TRABALZA-MARINUCCI M., BRANDI G., RONDINI C., AVELLINI L., GIAMMARINI C., COSTARELLI S., ACUTI G., ORLANDI C., FILIPPINI G., CHIARADIA E., MALATESTA M., CROTTI S., ANTONINI C., AMAGLIANI G., MANUALI E., MASTROGIACOMO A. R., MOSCATI L., HAOUET M. N., GAITI A., MAGNANI M. (2008): A three-year longitudinal study on the effects of a diet containing genetically modified Bt176 maize on the health status and performance of sheep. *Livestock Science*, 113 178-190. p.

TUDISCO R., CUTRIGNELLI M. I., CALABRÒ S., GUGLIEMELLI A., INFASCELLI F. (2007): Investigation on genetically modified soybean (RoundUp Ready) in goat nutrition: DNA detection in suckling kids. *The Italian Journal of Animal Science*, 6 (1) 380-382. p.

TUDISCO R., LOMBARDI P., BOVERA F., D'ANGELO D., CUTRIGNELLI M. I., MASTELLONE V., TERZI V., AVALLONE L., INFASCELLI F. (2006): Genetically modified soya bean in rabbit feeding: detection of DNA fragments and evaluation of metabolic effects by enzymatic analysis. *Animal Science*, 82 1-8. p.

VAN DEN EEDE G., LIPP M., EYQUEM F., ANKLAM E. (2000): Validation of an analytical method for the detection of GMO-derived in processed foodstuffs EUR 19677 EN. *Report of a study commissioned by the Directorate General Health and Consumer Protection of the European Commission*, 4-58. p.

VAN DUIJN G., VAN BIERT R., BLEEKER-MARCELIS H., PEPELMAN H., HESSING M. (1999): Detection methods for genetically modified crops. *Food Control*, 10 375-378. p.

- VAN HOEF A. M. A., KOK E. J. BOUW E., KUIPER H. A., KEJIER J. (1998): Development and application of selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food additives and Contaminants*, 15 (7) 767-774. p.
- VAÏTILINGOM M., PIJNENBURG H., GENDRE F., BRIGNON P. (1999): Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in Some Representative Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 5261-5266. p.
- VODRET B., MILIA M., ORANI M. G., SERRATRICE G., MANCUSO M. R. (2007): Detection of Genetically Modified Organisms in Food: Comparison Among Three Different DNA Extraction Methods. *Veterinary Research Communications*, 31 (1) 385-388. p.
- VOLLENHOFER, S., BURG, K., SCHMIDT, J. & KROATH, H. (1999): Genetically modified organisms in food – screening and specific detection by polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5038-5043. p.
- WILCKS A., VAN HOEK A. H. A. M., JOOSTEN R. G., JACOBSEN B. B. L., AARTS H. J. M. (2004): Persistence of DNA studied in different ex vivo and in vivo rat models simulating the human gut situation. *Food and Chemical Toxicology*, 42 493-502. p.
- WILSON I.G. (1997): Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (10) 3741-3751. p.
- WOLF C., SCHERZINGER M., WURZ A., PAULI U., HÜBNER P., LÜTHY J. (2000): Detection of cauliflower mosaic virus by polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *European Food Research and Technology*, 210 367-372. p.
- WURZ A., RÜGGERBERG H., BRODMANN P., WAIBLINGER H. U., PIETSCH K. (1998): DNA-Extraktions-methode für den Nachweis gentechnisch veränderter soja in sojalecithin. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 94 159-161. p.

XU J., MIAO H., WU H., HUANG W., TANG R., QIU M., WEN J., ZHU S., LI Y. (2006): Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 71-77. p.

YOSHIMURA T., KURIBARA H., KODAMA T., YAMATA S., FUTO S., WATANABE S., AOKI N., IIZUKA T., AKIYAMA H., MAITANI T., NAITO S., HINO A. (2005b): Comparative Studies of the Quantification of Genetically Modified Organisms in Food Processed from Maize and Soy Using Triplex Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 2060-2069. p.

YOSHIMURA T., KURIBARA H., MATSUOKA T., KODAMA T., IIDA M., WATANABE T., AKIYAMA H., MAITANI T., FURUI S., HINO A. (2005a): Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 2052-2059. p.

ZHANG M., GAO X., YU Y., AO J., QIN J., YAO Y., LI Q. (2007): Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR. *Food Control*, 18 1277-1281. p.

ZHOU X., LIU W., LIAN J., ZHANG W-Q. (2007): Monitoring of Roundup Ready soybean in Guangdong province in china. *Food Control*, 18 1219-1222. p.

ZHU Y., LI D., WANG F., YIN J., JIN H. (2004): Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans using rats. *Archives of Animal Nutrition*, 58 (4) 295-310. p.

ZIMMERMANN A., LÜTHY J., PAULI U. (1998): Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food Samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A*, 207 81-90. p.

Jogszabályok, rendeletek, előírások

90/220/EGK irányelv a genetikailag módosított szervezetek környezetbe való szándékos kihelyezéséről. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 117*, 15. p.

258/97/EK rendelet (1997. január 27.) Az Európai Parlament és a Tanács az új élelmiszerekről és az új élelmiszer-összetevőkről. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 43*, 13 (18) 244 – 249. p.

1139/98/EK rendelet (1998. június 3.) A géntechnológiával módosított szervezetekből előállított egyes élelmiszerek címkézésén a 79/112/EGK irányelvben előírt adatokon kívüli adatok kötelező feltüntetéséről. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 159*, 13 (20) 4-7. p.

49/2000/EK rendelet (2000. január 10.) A géntechnológiával módosított szervezetekből előállított egyes élelmiszerek címkézésén a 79/112/EGK irányelvben előírt adatokon kívüli adatok kötelező feltüntetéséről szóló 1139/98/EK tanácsi rendelet módosításáról. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 6*, 13 (24) 226. p.

2001/18/EK irányelv (2001. március 12.) A géntechnológiával módosított szervezetek környezetbe történő szándékos kibocsátásáról és a 90/220/EGK tanácsi irányelv hatályon kívül helyezéséről. *Európai Unió Hivatalos Lapja L 106*, 15 (6) 77-114. p.

1946/2003/EK rendelet (2003. július 15.) Az Európai Parlament és a Tanács a géntechnológiával módosított szervezetek országhatárokon történő átviteléről EGT vonatkozású szöveg. *Hivatalos Lap L 287*, 15 (7) 650. p.

148/2003 (IX.22.) Kormány rendelet a géntechnológiai bírság megállapításáról. *Magyar Közlöny*, 109 8060. p.

1830/2003/EK rendelet (2003. szeptember 22.) A géntechnológiával módosított szervezetek nyomkövethetőségéről és címkézéséről, és a géntechnológiával módosított szervezetekből előállított élelmiszer- és takarmánytermékek nyomkövethetőségéről, valamint a 2001/18/EK irányelv módosításáról. *Európai Unió Hiv. Lapja L 268*, 13 (32) 455-459. p.

641/2004/EK rendelet (2004. április 6.) Az 1829/2003/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletnek az új, géntechnológiával módosított élelmiszerek és takarmányok engedélyezése iránti kérelem, a létező termékek bejelentése és a kockázatértékelés során kedvező eredményt mutató, géntechnológiával módosított anyagok véletlen vagy technikailag elkerülhetetlen jelenléte tekintetében történő végrehajtására vonatkozó részletes szabályokról EGT vonatkozású szöveg. *Európai Unió Hivatalos Lapja* L 102, 13 (34) 36. p.

2004/787/EK ajánlás (2004. október 4.) Az 1830/2003/EK rendelettel összefüggésben a géntechnológiával módosított szervezetek és a géntechnológiával módosított szervezetekből előállított anyagok vagy ezen termékekből történő mintavételre és kimutatásra vonatkozó technikai iránymutatásról. *Európai Unió Hivatalos Lapja* L 348, 24 (11) 18-26. p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőm Dr. Gelencsér Éva főosztályvezető munkám során nyújtott szakmai támogatását és javaslatait a dolgozat összeállításában.

Köszönöm Dr. Bánáti Diána főigazgatónak, hogy lehetővé tette számomra az Intézetben a kísérletek elvégzését és köszönöm támogatását a PhD fokozat megszerzésében. Köszönöm Dr. Halász Anna dolgozatjavításához adott tanácsait és egyben köszönöm a PhD tanulmányaim alatti személyes támogatását.

Köszönöm Dr. Jánosi Annának a PCR technika elsajátításában nyújtott gyakorlati szakmai tanácsait és köszönöm kitartó ösztönzését a PhD fokozat megszerzésében.

Köszönettel tartozom Dr. Szamos Jenőnek a DNS izolálási módszerek fejlesztésében nyújtott szakmai támogatásáért, Molnár Mihályné laboratóriumi asszisztensnek és a Biológia Osztály Munkatársainak a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Vajda Boldizsárnak a kvantitatív real-time mérésekben nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom az Campden & Chorleywood Magyarország Kht. és az egykori Hajdú BÉT Rt. munkatársainak a félüzemi minták elkészítésében nyújtott segítségéért és köszönöm a Master-M Kft. a csirkeetetés kísérlet megvalósításáért.

Végül szeretném megköszönni Szüleimnek és Családom többi tagjának ösztönzését és kitartó türelmét.