

# Mecanismes de detecció d'organismes genèticament modificats

**RESUM:** *El contingut d'organismes genèticament modificats (OGM) a l'alimentació humana i animal està regulat per la norma europea, que n'estableix l'etiquetatge obligatori quan el contingut en OGM és superior al 0,9 %.*

*El Comitè Europeu per a l'Estandardització ha desenvolupat mètodes de detecció, d'identificació i de quantificació dels OGM per tal de dur a terme aquesta norma europea.*

*Els laboratoris que treballen en OGM poden aplicar aquests mètodes específics, sensibles i precisos i poden repetir-los i reproduir-los amb resultats segurs.*

**SUMMARY:** *Food and feed GMO's content is regulated by the European standards, which establish that the labeling is mandatory when the GMO content is higher than 0.9 %.*

*The European Committee for Standardization has developed the detection, the identification and the quantification methods of GMOs to carry out this European standard.*

*The laboratories that work in GMO can apply these specific, sensitive and precise methods and can repeat and reproduce them with safety results.*

**PARAULES CLAU:** mètodes, detecció, OGM.

## 1. INTRODUCCIÓ

### Conceptes

Un organisme genèticament modificat, en endavant OGM, és un organisme, a excepció dels éssers vius, el material genètic del qual ha estat modificat d'una manera que no es produeix naturalment en l'aparellament ni en la recombinació natural. Quan la modificació s'ha produït mitjançant la incorporació al seu genoma d'un fragment d'ADN que procedeix d'una altra espècie, es diu que l'OGM és un organisme transgènic.

En general, un OGM té una combinació nova de material genètic que li confereix noves propietats: resistència a plagues, resistència a herbicides, producció de substàncies d'interès nutritiu, organolèptic o farmacològic (figura 1). Això implica que s'ha modificat el material genètic de l'animal o la planta del qual prové l'aliment o algun dels ingredients que conté, o bé que s'ha modificat el material genètic d'algun dels microorganismes implicats en el procés d'elaboració de l'aliment.

En aquest sentit, aliments i pinsos genèticament modificats (GM)

# La normativa europea estableix com a obligatori l'etiquetatge dels aliments i pinsos quan el contingut d'OGM sigui igual o superior al 0,9 %

són aquells que contenen OGM, hi estan compostos o han estat produïts a partir d'aquests.

## Reglament (CE) núm. 1829/2003

El Reglament (CE) núm. 1829/2003 del Parlament europeu i del Consell,

de 22 de setembre, sobre aliments i pinsos modificats genèticament, aplicable des de l'abril de 2004, va establir els procediments comunitaris per a l'autorització i la supervisió dels aliments i pinsos GM i les disposicions relatives a l'etiquetatge dels aliments i pinsos GM. Això va

incidir en les metodologies de detecció d'OGM.

El reglament estableix que l'etiquetatge serà obligatori quan el contingut d'OGM sigui igual o superior al 0,9 % de cada ingredient considerat individualment (figura 2). Per exemple, en un producte processat que contingui blat de moro i soja, el percentatge d'OGM permès no és el 0,9 % del producte final, sinó el 0,9 % de blat de moro i el 0,9 % de soja (figura 3).

També s'accepta el 0,5 % de la presència accidental o tècnicament inevitable de material GM, si l'OGM encara no ha estat aprovat per la Unió Europea (UE), però està en procés d'avaluació favorable.

La normativa europea estableix com a obligatori l'etiquetatge dels aliments i pinsos quan el contingut d'OGM sigui igual o superior al 0,9 %.

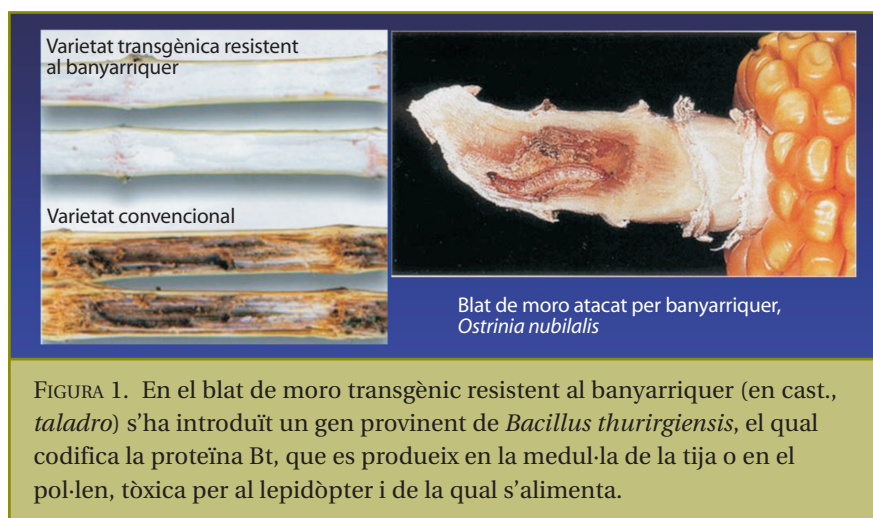


FIGURA 1. En el blat de moro transgènic resistent al banyarriquer (en cast., *taladro*) s'ha introduït un gen provinent de *Bacillus thuringiensis*, el qual codifica la proteïna Bt, que es produeix en la medul·la de la tija o en el pol·len, tòxica per al lepidòpter i de la qual s'alimenta.

## Detecció d'OGM

Per facilitar el compliment dels reglaments europeus, l'anàlisi de material transgènic en aliments ha de ser aplicable tant a matèries primeres com a aliments processats i ha de permetre detectar i quantificar la presència o l'absència de material transgènic. Detectar si som davant d'un OGM no és una feina senzilla. El mètode més fiable per saber si un aliment és transgènic és analitzar-ne el material genètic o ADN o analitzar-ne la composició per identificar la presència de proteïnes derivades de l'activitat de l'ADN transgènic. Malgrat tot, els mètodes moleculars fiables i sensibles funcionen molt bé amb material vegetal fresc o poc processat, però tenen menys sensibilitat quan aquest material ha estat sotmès als processos industrials d'elaboració d'aliments preparats o de purificació dels seus components.

Diferents processos químics, físics o enzimàtics poden contribuir a la degradació de l'ADN. Fins i tot en aliments que pel processament han sofert una gran degradació del seu ADN o de les seves proteïnes no es poden fer aquestes anàlisis perquè no s'hi troben restes d'aquests, o quasi no queden traces en forma

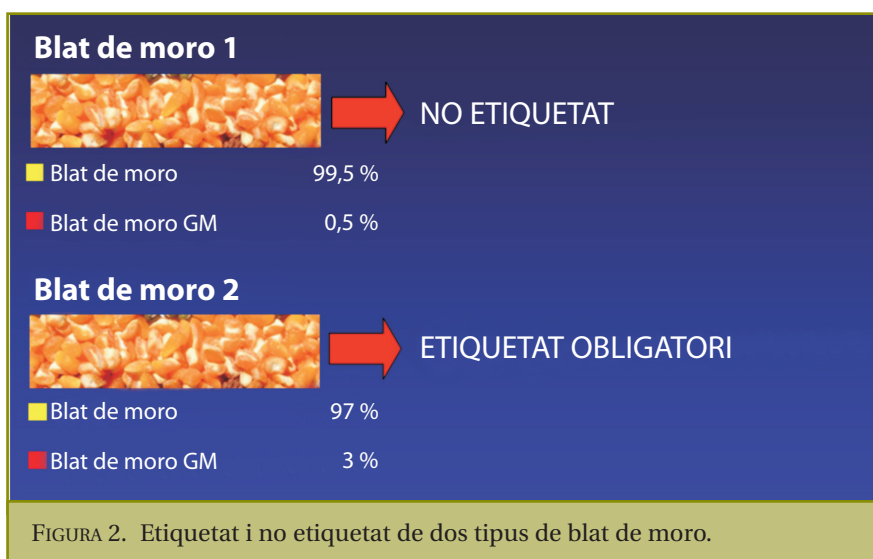


FIGURA 2. Etiquetat i no etiquetat de dos tipus de blat de moro.

de fragments curts dels productes de degradació.

El procés de detecció d'OGM engloba tres etapes (figura 4):

- Detectar la presència o l'absència d'OGM.
- Identificar si són OGM autoritzats a la UE.
- Quantificar si els OGM identificats no superen el 0,9 % permès a la UE.

El mètode més fiable per saber si un aliment és transgènic és analitzar-ne el material genètic o ADN o analitzar la presència de proteïnes derivades de l'activitat de l'ADN transgènic.

## 2. MÈTODES DE DETECCIÓ

L'obligatorietat d'etiquetar els aliments transgènics planteja la posada a punt d'uns mètodes d'anàlisi:

- Adaptats a cada producte brut o derivat i a cada OGM buscat.
- Fiables i sensibles per respondre a la legislació establerta i a una informació de qualitat exigida pels consumidors.
- Homogenis per a tots els laboratoris europeus per garantir els resultats.

Perquè els mètodes de detecció d'OGM compleixin tots aquests requisits, han de ser:

- **Específics**, és a dir, han de ser capaços de detectar i d'identificar l'OGM buscat.
- **Sensibles**, és a dir, han de ser capaços de detectar un percentatge d'OGM igual o inferior al límit marcat per la normativa europea.
- **Precisos**, és a dir, a partir de l'ús de materials de referència, hem de demostrar que són mètodes estadísticament representatius.
- **Repetibles**, és a dir, el resultat d'una anàlisi ha de ser el mateix quan es repeteix amb el mateix mètode, amb idèntiques característiques del test, en el mateix laboratori, pel mateix analista i utilitzant el mateix equip dins d'un interval curt de temps.
- **Reproduïbles**, és a dir, el resultat d'una anàlisi ha de ser el mateix

# El mètode més fiable per saber si un aliment és transgènic és analitzar-ne el material genètic o ADN o analitzar la presència de proteïnes derivades de l'activitat de l'ADN transgènic

quan es repeteix amb el mateix mètode, amb idèntiques característiques del test, en diferents laboratoris, per diferents analistes i utilitzant diferents equips.

A partir de la capacitat de detecció dels mètodes, els podem classificar en dos grans grups:

- Detectar l'expressió del gen, és a dir, **proteïnes**: mètode d'ELISA.

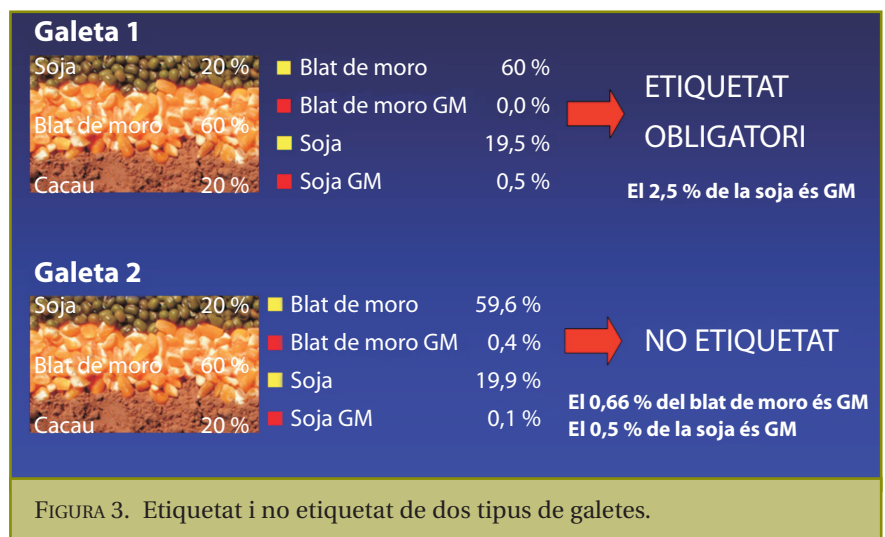


FIGURA 3. Etiquetat i no etiquetat de dos tipus de galetes.



FIGURA 4. Procés de detecció de transgènics.

Tècniques d'ELISA	Tècniques de PCR
Detecta proteïnes a partir de la interacció específica amb els anticossos	Detecta seqüències d'ADN a partir de la seva exclusivitat
No detecta sense la presència d'ADN de proteïnes	No detecta sense la presència d'ADN
Menys sensible	Molt sensible
Requereixen personal experimentat tant per a la posada a punt com per a la interpretació de resultats	
Requereixen l'anàlisi de material de referència	
Requereixen l'estandardització del mostreig i de l'extracció de material	
Requereixen un coneixement detallat de l'estructura molecular i de les propietats fisicoquímiques de la proteïna	Requereixen un coneixement detallat de l'estructura molecular de les seqüències introduïdes
Obtenció d'una resposta qualitativa i quantitativa de menor precisió	Obtenció d'una resposta qualitativa i quantitativa de gran precisió

- Detectar el gen responsable, és a dir, **ADN**: mètode de PCR.

Els mètodes d'anàlisi que detecten l'ADN transgènic són els més utilitzats perquè proporcionen més especificitat i sensibilitat; no obstant això, en determinades ocasions, pot interessar la detecció de proteïnes. Vegeu a dalt la comparació de les característiques entre les dues tècniques.

### Mètode d'enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA

L'assaig immunoenzimàtic ELISA es basa en la detecció d'antígens o anticossos en una mostra.

En el cas de la detecció d'antígens, els anticossos específics per a l'antigen s'adhereixen a la superfície de plàstic de la placa immunoabsorbent que ens fa de suport. Des-

prés s'afegeix la mostra que actua d'antigen en el cas de ser positiva. A continuació s'afegeix l'anticòs adherit a un enzim específic per a l'antigen. Finalment, s'afegeix un substrate específic que quan actua l'enzim produirà color observable a primera vista o quantificable a l'espectrofotòmetre (figura 5).

En el cas de la detecció d'anticossos, els antígens s'adhereixen a la superfície de plàstic de la placa. Després s'afegeix la mostra que actua d'anticòs en el cas de ser positiva. A continuació s'afegeix l'anticòs adherit a un enzim específic per a l'anticòs. Finalment, s'afegeix un substrate específic que quan actua l'enzim produeix un color observable a primera vista o quantificable a l'espectrofotòmetre (figura 6).

### Reacció en cadena per la polimerasa: PCR

L'objectiu de la PCR és l'obtenció de gran quantitat d'ADN. A partir d'una mostra que contingui una quantitat mínima de material genètic difícil de manipular o de detectar es pot obtenir una gran quantitat d'ADN idèntic al de partida.

L'ADN és una molècula termolàbil i és present en totes les cèl·lules d'un organisme. Aquestes característiques el converteixen en la diana perfecta per detectar la presència d'OGM en matèries primeres i aliments. La PCR és capaç de detectar la presència d'ADN, tot i que es trobi en quantitats molt petites.

La PCR permet copiar moltes vegades un fragment específic d'ADN, és a dir, mitjançant una amplificació d'un tros d'ADN, obtenim milions de còpies. L'ADN té dues cadenes complementàries que porten la mateixa informació i per copiar-la és necessari separar físicament les dues cadenes i utilitzar-ne cada una com un motllo, és a dir, com una plantilla que serveix de model en forma de mirall, per sintetitzar-ne l'altre. Aquesta feina la fa un enzim anomenat *ADN polimerasa*, que en aquest cas és termoresistent per suportar les elevades temperatures que s'utilitzen en l'e-

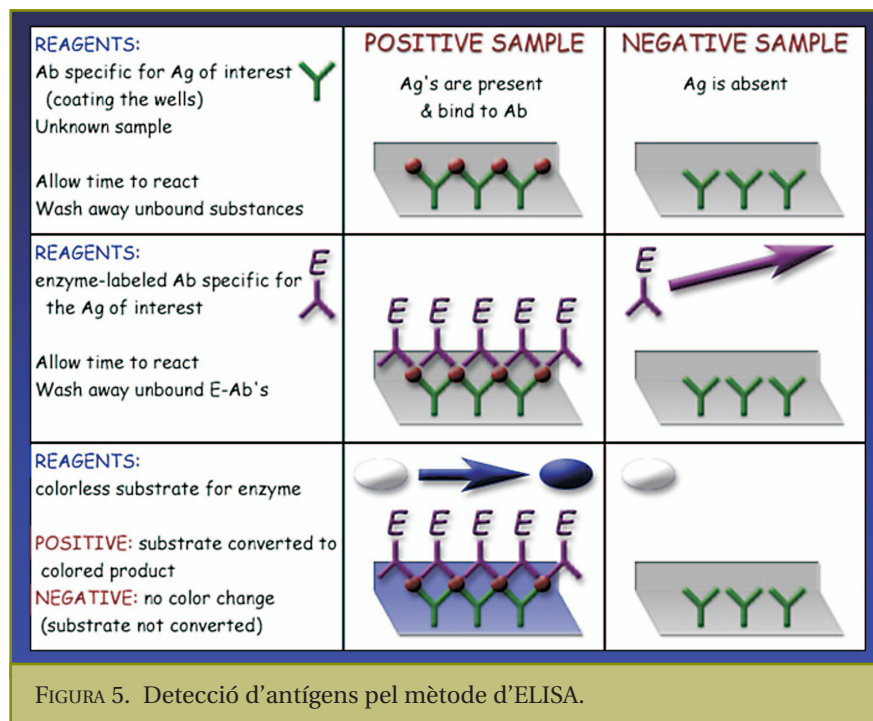


FIGURA 5. Detecció d'antígens pel mètode d'ELISA.

tapa de separació de les dues cadenes d'ADN en cada cicle de copiat. Perquè l'ADN polimerasa iniciï la còpia de les cadenes d'ADN, cal dos encebadors, que són petits fragments d'ADN complementaris als extrems d'ambdues cadenes i que en enganxar-se a l'ADN actuen com una primera anella de la cadena perquè se n'iniciï la còpia. Aquests encebadors donen especificitat al procés d'ampliació i per això el disseny dels encebadors requereix conèixer la seqüència de l'ADN específic que s'amplificarà (figura 7).

La PCR permet obtenir gran quantitat d'ADN idèntic al de partida.

El procés d'amplificació o copiat té lloc en un aparell anomenat *termociclador*, que permet programar automàticament cicles successius d'escalfament i de refredament de les mostres que contenen el material genètic.

La reacció es realitza mitjançant la repetició (20-40 cicles) del procés de còpia, així l'amplificació es produeix de manera exponencial, i al final del procés s'obtenen  $2n$  còpies del fragment d'ADN;  $n$  és el nombre de cicles que es realitza en el termociclador (figura 8).

### 3. DETECCIÓ D'OGM A TRAVÉS DE LA PCR

El procés de detecció de transgènics engloba una sèrie d'etapes successives tal com esquematitza la figura 9.

#### Extracció de l'ADN

L'objectiu de l'extracció de l'ADN és obtenir-ne la quantitat suficient i que sigui de bona qualitat, és a dir, com menys degradat i més lliure de contaminants millor. La degradació de l'ADN i les contaminacions redueixen l'eficiència de la PCR i pot portar-nos a resultats erronis.

S'han descrit molts mètodes per extreure ADN de matèries primeres i productes finals, alguns més indicats per a un tipus de matriu determinada i d'altres d'aplicació més àmplia.

## La PCR permet obtenir gran quantitat d'ADN idèntic al de partida

**Control de qualitat de l'ADN extret**  
La qualitat de l'ADN extret es controla de manera consecutiva i complementària mitjançant:

- La quantificació de l'ADN a l'espectrofotòmetre.
- Un gel de qualitat.
- Gens específics.

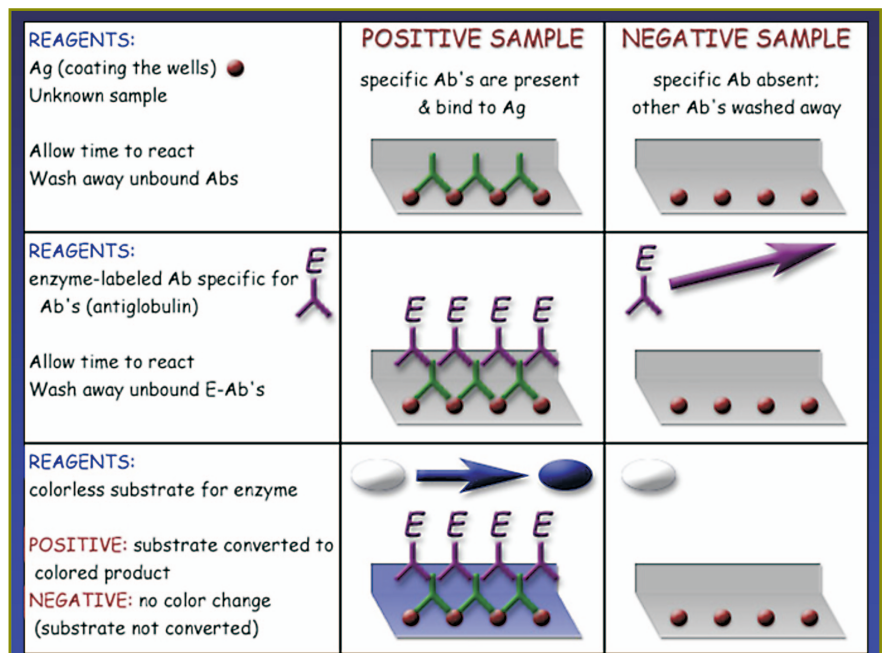


FIGURA 6. Detecció d'anticossos pel mètode d'ELISA.

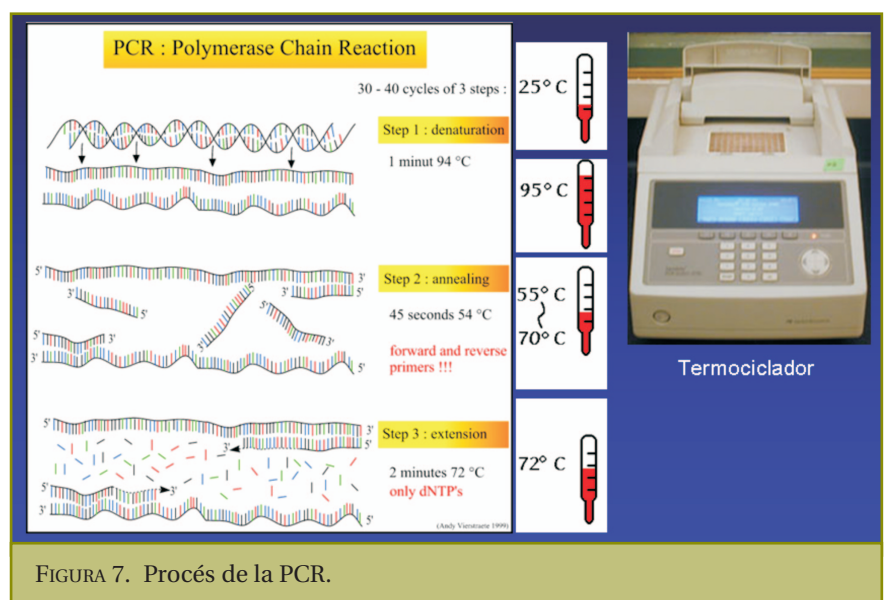


FIGURA 7. Procés de la PCR.

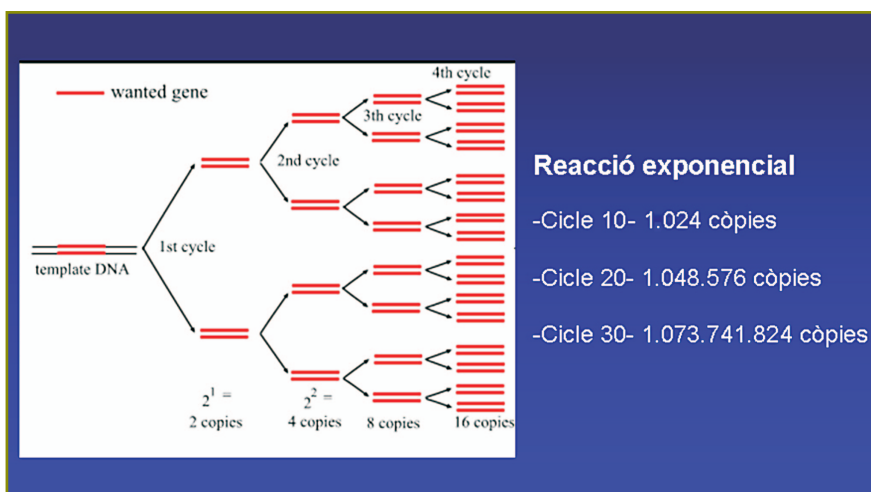


FIGURA 8. Amplificació exponencial de l'ADN en la PCR.

L'amplificació mitjançant PCR de gens específics d'organismes eucariotes o gens d'endògens de les espècies amb què es treballa, permet d'identificar la presència d'ADN d'una espècie determinada i a la vegada veure si hi ha inhibidors de la PCR. Per exemple, per a mostres de blat de moro s'utilitza el gen de la *Zeina*, que es troba tant en varietats transgèniques com en varietats no transgèniques de blat de moro. Per a mostres de soja s'utilitza el gen de la *Lectina*, que es troba tant en varietats transgèniques com en varietats no transgèniques de soja. La imatge superior esquerra de la figura 10 mostra la resposta de senyal del gen de la *Lectina* en mostres de soja (S) i mostres barreja de blat de moro i soja (BS). La imatge superior dreta de la mateixa figura mostra la resposta de senyal del gen de la *Zeina* en mostres de blat de moro (B) i mostres barreja de blat de moro i soja (BS).

Un senyal intens en l'amplificació de la PCR indica un ADN de qualitat. Si no s'obté un bon senyal, la qualitat de l'ADN es qüestiona i es torna a purificar o se'n fa una altra extracció.

### Cribratge mitjançant seqüències reguladores

Després de comprovar que la mostra té un ADN de qualitat, el pas següent és veure si conté o no conté OGM. La detecció del transgèn o ADN transgènic es realitza mitjançant l'amplificació específica d'un dels fragments utilitzant la tècnica de la PCR.

Les seqüències reguladores són interruptors que controlen l'expressió del gen. Molts dels vegetals transgènics són portadors de seqüències d'ADN característiques, el promotor CaMV35S i el terminador T-Nos.

Si l'aliment conté aquests transgens, s'obtindrà un senyal positiu en la reacció de la PCR, tal com veiem en la imatge inferior de la figura 10, on les mostres transgèniques de blat de moro (B), soja (S) i barreja de blat de moro i soja (BS) donen senyal per a aquestes seqüències.

Els gens específics permeten controlar la qualitat de l'ADN extret. La

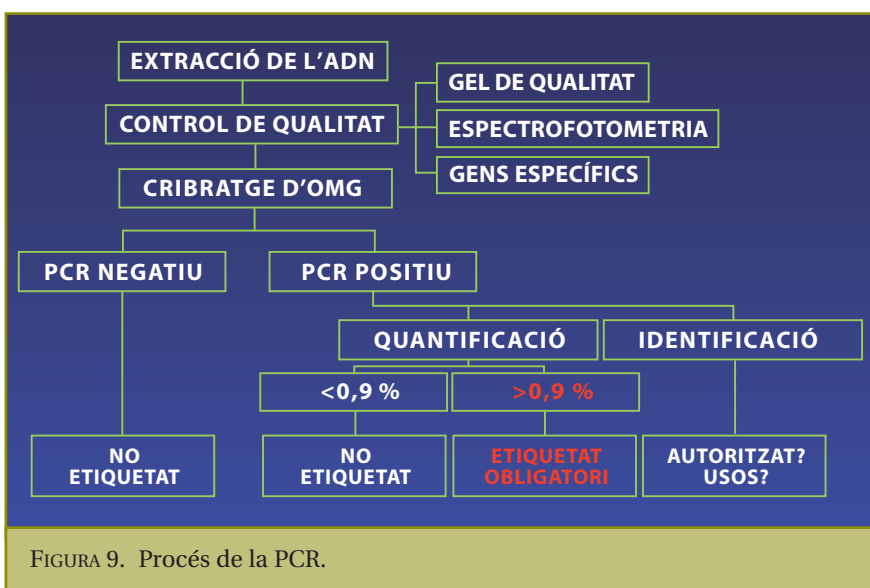


FIGURA 9. Procés de la PCR.

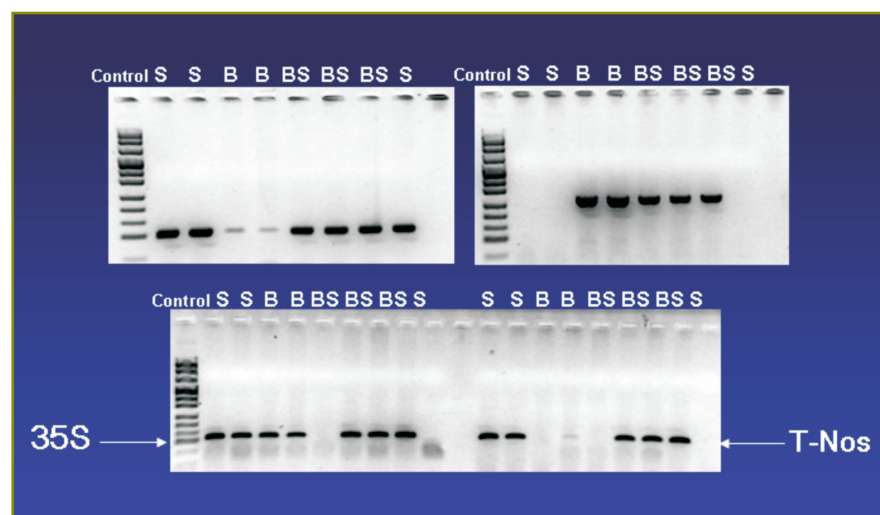


FIGURA 10. Detecció del gen de la *Lectina* (a dalt, esquerra), del gen de la *Zeina* (a dalt, dreta) i detecció del promotor 35S i del terminador T-Nos (a baix) en mostres que contenen blat de moro i soja.

detecció de seqüències reguladores ens indica que som davant d'un organisme genèticament modificat.

### Identificació

Després de detectar que som davant d'un OGM, identificarem de quin OGM es tracta mitjançant l'amplificació per PCR de seqüències específiques.

L'objectiu és la identificació de l'OGM per saber si està autoritzat o no i, en el cas que ho estigui, per a quins usos està permès.

Un exemple conegut és el gen *Cry 1A(b)* que codifica per la toxina Bt del blat de moro Bt 176 i el gen *EPSPS* de la tolerància a l'herbicida glifosat de la soja *Roundup Ready* (figura 11).

### Quantificació

La quantificació d'OGM ha esdevingut molt important en els darrers anys, arran de la normativa europea (v. l'apartat Reglament (CE) núm. 1829/2003).

El llinar obligatori d'etiquetatge del 0,9 % d'OGM establert per la UE fa que cada vegada siguin més necessàries les anàlisis quantitatives, que indiquen la proporció d'OGM a la mostra, en lloc de les qualitatives, que només ens indiquen la presència o l'absència d'OGM.

Les característiques de la PCR quantitativa fan que aquest sigui un procés idoni com a mecanisme de detecció d'OGM:

- Mètode que respon a les necessitats creades per la normativa europea.
- Es basa en una quantificació exacta del percentatge de producte transgènic present a la mostra.
- Mesura la quantitat del producte amplificat després de cada cicle de la PCR mentre aquesta és en marxa.
- El resultat final és l'emissió de fluorescència, la qual és proporcional a la quantitat de producte amplificat.
- La fluorescència emesa es converteix en quantitat d'OGM gràcies al tractament informàtic de les dades i permet expressar els resultats en percentatge d'OGM en la mostra.

## Els gens específics permeten controlar la qualitat de l'ADN extret. La detecció de seqüències reguladores ens indica que som davant d'un organisme genèticament modificat

La detecció de seqüències específiques permet identificar el tipus d'OGM i saber si som davant d'un OGM autoritzat o no.

La PCR quantitativa permet determinar si estem dins el llindar d'OGM establert per la normativa.

### Mètodes basats en la quantificació

**SYBR Green.** Es basa en la mesura de fluorescència emesa quan s'intercalen les molècules de colorant fluorescent SG entre els ponts d'hidrogen de les molècules de doble hèlice d'ADN (figura 12).

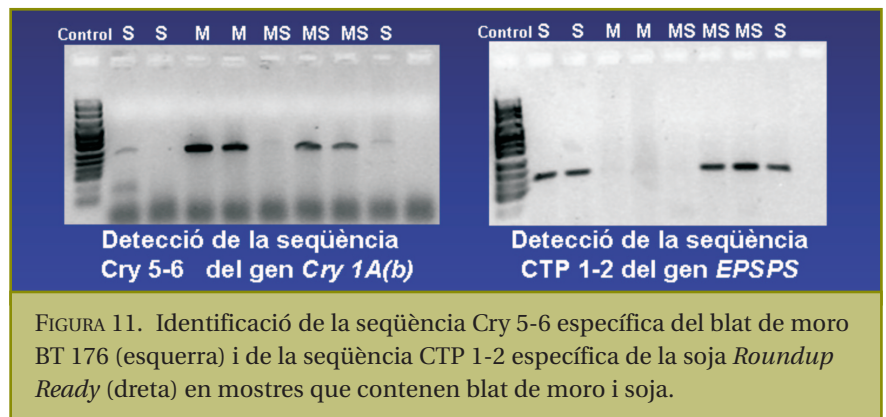


FIGURA 11. Identificació de la seqüència Cry 5-6 específica del blat de moro BT 176 (esquerra) i de la seqüència CTP 1-2 específica de la soja *Roundup Ready* (dreta) en mostres que contenen blat de moro i soja.

## La detecció de seqüències específiques permet identificar el tipus d'OGM i saber si som davant d'un OGM autoritzat o no. La PCR quantitativa permet determinar si estem dins el llindar d'OGM establert per la normativa

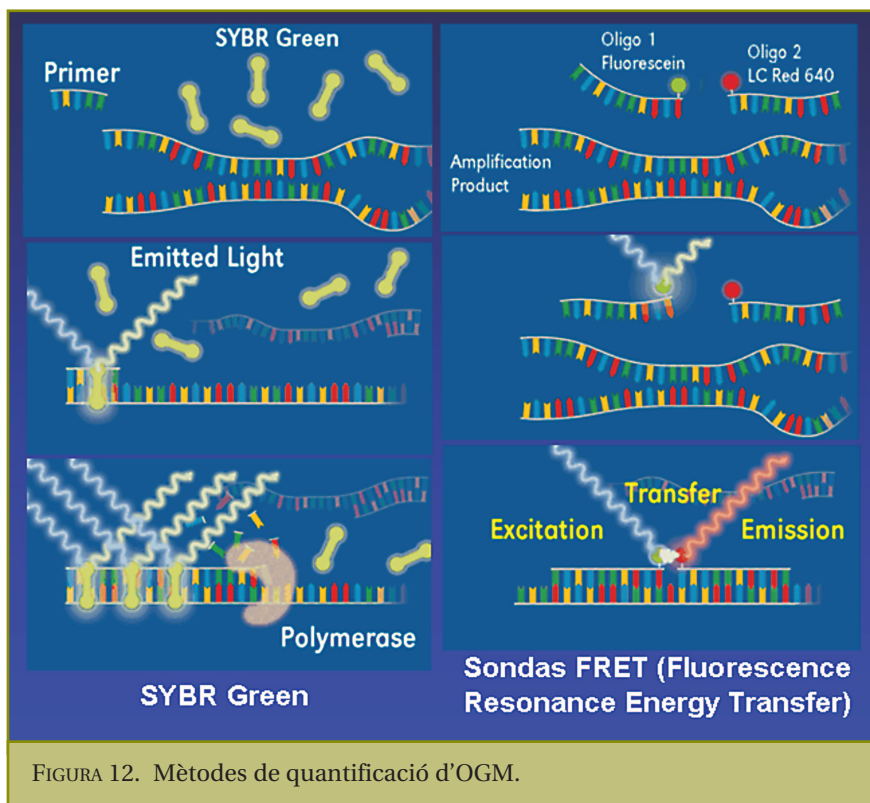


FIGURA 12. Mètodes de quantificació d'OGM.

**Sondes FRET.** Es basa en la medició de fluorescència emesa per sondes d'hibridació específiques del transgèn marcadet amb un fluorocrom (figura 12).

#### 4. PER SABER-NE MÉS

ERLICH, H. A. (1989). *PCR technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press.

ISO 21569:2005. *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods*. CEN/TC 275/WG 11.

ISO 21570:2005. *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods*. CEN/TC 275/WG 11.

ISO 21571:2005. *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction*. CEN/TC 275/WG 11.

ISO 21572:2004. *Foodstuffs – Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods*. CEN/TC 275/WG 11.

ISO 24276:2005. *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions*. CEN/TC 275/WG 11.

TAMAMES, R. (2003). *Los transgénicos, conócalos a fondo*. Ariel.

#### Procés de quantificació per SYBR Green

1. A l'inici de l'amplificació, la barreja de la reacció conté l'ADN desnaturalitzat, els encebadors i el colorant.

Les infinites molècules de colorant dèbilment fluorescents produeixen un senyal fluorescent de fons que és sostret durant l'anàlisi.

2. Després de l'anellament dels encebadors, unes quantes molècules de colorant s'intercalen en la doble hèlice.

La unió de l'ADN acaba amb un gran increment de molècules SYBR Green que emet llum a partir de l'excitació.

3. Durant l'elongació, més molècules de colorant s'intercalen al nou ADN sintetitzat.

Si la reacció continua, es visualitza un increment de la fluorescència, el qual és proporcional a la quantitat d'ADN amplificat.

#### Procés de quantificació per sondes FRET

1. Components essencials: dues sondes marcades amb dues molècules fluorescents diferents, una sonda donant FL i una sonda receptora LC.

Aquestes dues sondes hibriden parts seqüencials de la monocadena d'ADN de la mostra.

2. El desenvolupament de senyal en el sistema depèn de la formació de la doble cadena d'ADN.

El procés té lloc quan les dues sondes es troben molt pròximes i quan l'espectre d'emissió donant se solapa amb l'espectre d'absorció del receptor.

3. Quan té lloc la hibridació, les dues sondes se situen una al costat de l'altra i, llavors, l'encebador donant FL s'excita i emet la fluorescència F1, que transfereix la seva energia a la sonda receptora LC, la qual al seu torn emet fluorescència F2.

Aquesta emissió de radiació es correlaciona amb la quantitat de molècules d'ADN que tenim.

