

## **Dôkaz geneticky modifikovanej kukurice v potravinách polymerázovou reťazovou reakciou**

ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ - TOMÁŠ KUČHTA - PETER SIEKEL

**SÚHRN.** V článku sa opisuje metóda na princípe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na dôkaz geneticky modifikovanej kukurice Bt 176 v potravinách. Metóda pozostáva z izolácie DNA použitím metódy s CTAB (cetyltrimetylamóniumbromid), overenia kvality izolovanej DNA amplifikáciou génu kódujúceho invertázu ( $\beta$ -fruktofuranozidáza; EC 3.2.1.26) a z PCR orientovanej na génovú konštrukciu charakteristickú pre kukuricu Bt 176. Pri overovaní metódy analýzou referenčných materiálov bolo metódou možné reprodukovateľne detegovať 0,1 % kukurice Bt 176. Optimalizovaná metóda sa použila na analýzu potravín, potravinárskych surovín a polotovarov, pričom sa geneticky modifikovaná kukurica dokázala v instantnej kukuričnej kaši, kukuričných lupienkoch, mäsli a v pečive. Metódu bolo možné urýchliť použitím oboch párov primerov súčasne v duplex PCR.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** geneticky modifikované organizmy; kukurica; polymerázová reťazová reakcia; cetyltrimetylamóniumbromid

Produkty génového inžinierstva sa v priebehu posledných dvadsiatich rokov dostali zo základného výskumu do komerčných aplikácií. Na svetových trhoch sa objavili geneticky modifikované plodiny, ktoré majú zvýšenú odolnosť voči herbicídum a škodcom, čím poskytujú výhody pre pestovateľov. V krátkom čase sa očakáva schválenie geneticky modifikovaných plodín, ktoré budú mať upravený obsah nutrične, farmaceuticky alebo priemyselne významných zložiek, čím poskytnú výhody priamo pre konzumentov alebo pre niektoré priemyselné odvetvia.

V súčasnosti sa z geneticky modifikovaných plodín pri výrobe potravín najčastejšie používajú geneticky modifikovaná sója a kukurica. V EÚ ich použitie upravuje niekoľko smerníc, z ktorých najdôležitejšie sú smernice 258/97 a 49/2000. Tieto ukladajú povinnosť označovať potraviny vyrobené

---

Ing. Alena ŠTEFANOVIČOVÁ, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., RNDr. Peter SIEKEL, CSc.,  
Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.  
Korešpondujúci autor: RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., e-mail: kuchta@vup.sk

z geneticky modifikovaných plodín resp. ich zložiek. V prípade sóje a kukurice je povinnosť označovať potraviny tiež vtedy, ak ide o náhodný výskyt a sú prítomné v množstve väčšom ako 1 % [1,2]. Prítomnosť, resp. obsah geneticky modifikovaných organizmov (GMO) sa zisťuje buď analýzou DNA metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) alebo analýzou proteínov imunochemickými metódami. Vzhľadom na nižšiu stabilitu proteínov, ktoré sa pri výrobe potravín môžu denaturovať, je analýza proteínov vhodná najmä na dôkaz GMO v surovinách a potravinách s nízkym stupňom technologického spracovania. Univerzálnejšou metódou je PCR, ktorá umožňuje špecifickú, citlivú a spoľahlivú analýzu transgénnej DNA v komplexných vzorkách [3].

V tejto práci sa rieši aplikácia PCR metódy na dôkaz geneticky modifikovanej kukurice Bt 176 v potravinách. Ide o najrozšírenejšiu odrodu z geneticky modifikovaných odrôd tzv. Bt kukurice, ktorej pestovanie resp. použitie na výrobu potravín bolo schválené aj v krajinách EÚ (tab. 1). Pri vývoji kukurice Bt 176 bola do genómu rastliny vložená genetická konštrukcia obsahujúca gén *cryIA(b)* izolovaný z *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurtzaki*. Expresiou génu *cryIA(b)* sa tvorí v rastline  $\delta$ -endotoxín. Je to kryštalický

TAB. 1. Odrody geneticky modifikovanej kukurice schválené EÚ.  
TAB. 1. Hybrids of genetically modified maize approved by EU.

Odroda kukurice <sup>1</sup>	Vlastnosť <sup>2</sup>	Spoločnosť <sup>3</sup>	Použitie <sup>4</sup>	Rok schválenia <sup>5</sup>
Bt 176	tolerancia voči herbicídom (glufosinát) a rezistencia voči hmyzu	Ciba Geigy (teraz Novartis)	pestovanie bez obmedzenia	1997
T25	tolerancia voči herbicídom (glufosinát)	AgrEvo	pestovanie bez obmedzenia	1998
MON810	rezistencia voči hmyzu	Monsanto	pestovanie bez obmedzenia	1998
MON809	rezistencia voči hmyzu	Monsanto	nesmie sa v EÚ pestovať, ale je povolený dovoz produktov z nej vyrobených	1999
Bt 11	rezistencia voči herbicídom a voči hmyzu	Novartis	pestovanie za účelom produkcie	1998

1 - maize hybrid, 2 - property, 3 - company, 4 - application, 5 - approval year.

<b>CDPK</b> promótor	<b><i>cryIA(b)</i></b> gén	<b>PEPC</b> intrón #9	<b>CaMV 35S</b> terminátor
-------------------------	-------------------------------	--------------------------	-------------------------------

OBR. 1a. Časť génovej konštrukcie kukurice Bt 176 zodpovedná za tvorbu Bt-toxínu. CDPK - proteínkináza závislá na vápniku, *cryIA(b)* - upravený gén, kódujúci tvorbu Bt-toxínu, PEPC - fosfoenolpyruvátcarboxyláza, CaMV 35S - terminátor z vírusu karfiolovej mozaiky.

FIG. 1a. The part of the gene construct of Bt 176 maize responsible for Bt-toxin production. CDPK - calcium-dependent protein kinase, *cryIA(b)* - truncated gene encoding Bt-toxin, PEPC - phosphoenolpyruvate carboxylase, CaMV 35S - cauliflower mosaic virus terminator.

<b>CaMV 35S</b> promótor	<b><i>bar</i></b> gén	<b>CaMV 35S</b> terminátor
-----------------------------	--------------------------	-------------------------------

OBR. 1b. Časť génovej konštrukcie kukurice Bt 176 zodpovedná za toleranciu voči glufosinátu.

CaMV 35S - promótor z vírusu karfiolovej mozaiky, *bar* - gén kódujúci syntézu fosfinotricínacetyltransferázy, CaMV 35S - terminátor z vírusu karfiolovej mozaiky.

FIG. 1b. The part of the gene construct of Bt 176 maize responsible for glufosinate tolerance.

CaMV 35S - cauliflower mosaic virus promoter, *bar* - gene encoding the synthesis of phosphinotricine acetyltransferase, CaMV 35S - cauliflower mosaic virus terminator.

proteín toxický pre larvy niektorých druhov hmyzu rodu *Lepidoptera*, v tomto prípade najmä voči vijačke kukuričnej (*Ostrinia nubilalis*) spôsobujúcej škody pri pestovaní kukurice. S cieľom zvýšiť expresiu tohoto bakteriálneho génu v kukurici bola pôvodná sekvencia génu *cryIA(b)* modifikovaná a výsledkom je upravený gén, ktorý má na nukleotidovej úrovni 65% homológiu s pôvodným génom. Okrem takto upraveného génu tvoria genetickú konštrukciu aj regulačné sekvencie (promótory, terminátory) a gény umožňujúce selekciu transformantov. Zároveň bola do kukurice Bt 176 vložená aj genetická konštrukcia obsahujúca gén *bar*, expresiou ktorého nadobúda rastlina rezistenciu voči herbicídu glufosinátu (obr. 1).

Pre použitie PCR na analýzu prítomnosti transgénnej DNA v potravinách je potrebné izolovať DNA tak, aby neobsahovala inhibičné látky, aby jej bolo dostatočné množstvo a aby nebola dodatočne degradovaná. Preto sa musia voliť izolačné postupy, ktoré sú šetrné k DNA a zároveň spoľahlivo odstránia zložky potravy inhibujúce PCR. Vhodnou metódou je postup s použitím detergentu CTAB (cetyltrimetylamóniumbromid) a chloroformu [4] alebo extrakčné postupy na tuhej fáze [3].

Kvalita izolovanej DNA sa hodnotí pomocou PCR orientovanej na niektoré gény špecifické pre kukuricu, najčastejšie gén *ivr* kódujúci syntézu invertázy ( $\beta$ -fruktofuranozidáza; EC 3.2.1.26) [5] alebo gén *zein* kódujúci syntézu azaínu [6]. V prípade pozitívneho výsledku sa izolovaná DNA môže použiť na dôkaz transgénnej DNA, pričom sú primery v PCR orientované na upravený gén *cryIA(b)* [5,6]. Pri výbere primerov je vhodné uprednostniť tie, pri použití ktorých sa amplifikuje fragment DNA kratší ako 300 bp. Dôvodom je fragmentácia DNA, ku ktorej dochádza pri technologických procesoch výroby potravín. Všeobecne je možné povedať, že čím náročnejšími technologickými procesmi bola potravinu vyrobená, tým menšia je dĺžka fragmentov DNA v nej obsiahnutých. Fyzikálne a chemické vplyvy spôsobujú fragmentáciu reťazcov DNA na úroveň 1100 bp až 300 bp [7]. Hodnotenie kvality izolovanej DNA je možné vykonať súčasne s dôkazom transgénnej DNA pomocou PCR v usporiadaní duplex [8].

Aby sa pri analýze GMO v potravinách predišlo chybnnej interpretácii, používajú sa rôzne metódy na potvrdenie identity amplifikovaného fragmentu [9]. Keďže sa však pri konštrukcii kukurice Bt 176 použil upravený gén *cryIA(b)*, ktorý sa v prírode nevyskytuje, pri použití vhodne zvolených špecifických primerov nie je potvrdzovanie výsledkov nevyhnutné.

Zavedenie kvalitatívnej metódy do laboratórnej praxe je vzhľadom na súčasnú situáciu s výskytom GMO na trhu a pripravovanú legislatívu veľmi aktuálne.

## **Materiál a metódy**

Pri vývoji metódy sa použili certifikované referenčné materiály MZ-0, MZ-0.1, MZ-1 a MZ-2, obsahujúce 0 %; 0,1 %; 1 % resp. 2 % kukurice Bt 176 (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgicko). Analyzovali sa rôzne potravinárske výrobky zakúpené v obchodnej sieti v SR. Suroviny a polotovary boli získané od rôznych firiem v SR.

Na izoláciu DNA sa použila metóda s CTAB (cetyltrimetylamóniumbromid) [4] a metóda s použitím súpravy Wizard [3]. V prípade metódy s CTAB sa 100–350 mg (v závislosti od obsahu vody) homogenizovanej vzorky inkubovalo pri 65 °C počas 30 min v 0,5 ml extrakčného roztoku obsahujúceho 50 mM CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA a 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. Po centrifugácii (14000 g počas 10 min pri 4 °C) sa supernatant extrahoval 0,2 ml chloroformu. Ďalšou centrifugáciou (14000 g počas 10 min pri 4 °C) sa oddelila vodná fáza, z ktorej sa DNA precipitovala rovnakým objemom izopropanolu. Precipitát sa trikrát premyl 0,5 ml 70% etanolu, DNA sa vysu-

šila a rozpustila v 50 µl až 100 µl vody, v závislosti od množstva izolovanej DNA. V prípade, že takto izolovaná DNA nebola amplifikovateľná, pripravár sa prečistil opakovanou precipitáciou.

V prípade metódy Wizard sa použila súprava Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Návažok 350 mg homogenizovanej vzorky sa inkuboval 3 h pri 55 °C v 860 µl roztoku (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % dodecylsulfát sodný, pH 8,0), ku ktorému sa pridalo 40 µl proteínázy K (20 mg.ml<sup>-1</sup>) a 100 µl 5 M guanidíniūhydrochloridu. Po centrifugácii (14000 g počas 10 min pri 4 °C) sa 500 µl supernatantu pridalo k 1 ml suspenzie Wizard Resin. Po premiešaní sa celý objem pomocou vaku naniesol na minikolónu. Minikolóna sa premyla 2 ml 80% izopropanolu a centrifugáciou pri 10000 g počas 2 min sa odstránili zvyšky izopropanolu. DNA sa eluovala z minikolóny 50 µl redestilovanej H<sub>2</sub>O alebo tlmivým roztokom (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) s teplotou 65–70 °C s následnou centrifugáciou pri 14000 g počas 20 s.

Reakčná zmes pre PCR (celkový objem 25 µl) obsahovala 0,5 µl izolovanej DNA, 50 mM Tris-HCl, pH 9, 0,15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM každého dNTP (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 0,5 µM primerov (tab. 2) a 2,5 U DNA polymerázy (Platinum *Taq*; Life Technologies). Na PCR sa použil termálny cyklér Biometra T-Personal (Whatman-Biometra, Göttingen, Nemecko). Použil sa teplotný program pozostávajúci z úvodnej denaturácie pri 94 °C počas 2 min, 37 cyklov (denaturácia pri 95 °C počas 30 s, annealing pri 60 °C počas 30 s, polymerizácia pri 72 °C počas 50 s) a zo záverečnej polymerizácie pri 72 °C počas 8 min. V prípade duplex PCR sa použila teplota polymerizácie 65 °C a program sa predĺžil na 40 cyklov.

Produkty PCR sa separovali elektroforeticky v 2% agarózovom géli v Tris-borátovom tlmivom roztoku TBE. Súčasne so vzorkami sa separoval

TAB. 2. Použité primery.  
TAB. 2. Primers used.

Označ. <sup>1</sup>	Cieľový gén <sup>2</sup>	Sekvencia <sup>3</sup>	Produkt <sup>4</sup>	Lit. <sup>5</sup>
Ivr1A	invertáza	5' -CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C- 3'	226 bp	10
Ivr1B	invertáza	5' -ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C- 3'		
CryIAb	δ-endotoxín	5' -ACC ATC AAC AgC CgC TAC AAC gAC C- 3'	184 bp	8
CryIAs	δ-endotoxín	5' -Tgg ggA ACA ggC TCA CgA TgT CCA g- 3'		

1 - designation, 2 - target gene, 3 - sequence, 4 - product, 5 - reference.

štandard molekulových hmotností n.50 bp (Life Biotechnologies). Po farbení etídiumbromidom sa fragmenty DNA vizualizovali pri transiluminácii UV-svetlom a fotografovali [11].

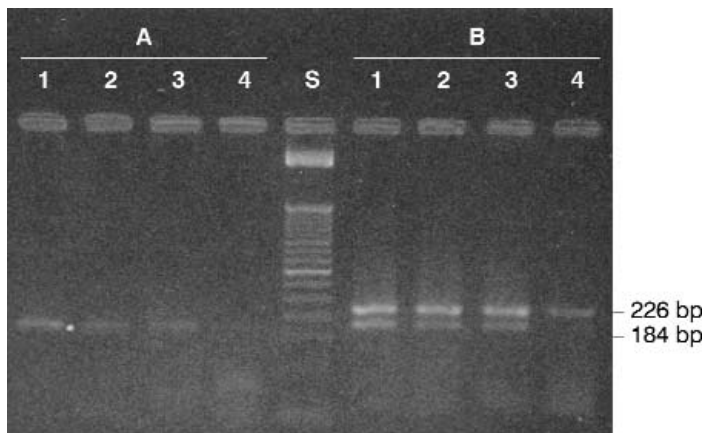
Súčasťou každej analýzy bolo zaradenie kontrolných vzoriek: negatívnej kontroly neobsahujúcej DNA a pozitívnej kontroly, ktorá obsahovala DNA izolovanú z referenčného materiálu s obsahom 0,1 % kukurice Bt 176.

## Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo zaviesť metódu na dôkaz geneticky modifikovanej kukurice Bt 176, overiť ju s použitím referenčných materiálov a aplikovať ju pri analýze rôznych druhov potravín a polotovarov získaných z obchodnej siete a od výrobcov v období október 2000 až august 2001.

V prvom kroku sa metódou s CTAB izolovala DNA z referenčných materiálov s 0%; 0,1%; 1% a 2% podielom kukurice Bt 176. Prítomnosť DNA sa zisťovala elektroforeticky v agarózovom géli. Na kontrolu amplifikovateľnosti izolovanej DNA sa použili primery orientované na gén *ivr* (veľkosť produktu 226 bp), na dôkaz transgénnej DNA sa použili primery orientované na upravený gén *cryIA(b)* (veľkosť produktu 184 bp). Optimalizovali sa aj reakčné podmienky pre duplex PCR, kedy sa použili oba páry primerov v jednej reakcii súčasne. V definovaných podmienkach bol detekčný limit štandardnej aj duplex PCR analýzy rovnaký, reprodukovateľne sa stanovil obsah 0,1 % kukurice Bt 176 v referenčnom materiáli (obr. 2).

V ďalšej etape sa porovnávali izolačné postupy s CTAB a pomocou súpravy Wizard na vzorkách surovín (kukuričných zŕn), polotovarov (kukuričné mláto, glutén, sirup, škrob) a potravín obsahujúcich rôzny podiel kukurice. Nakoľko kvalita a množstvo izolovanej DNA závisia od spôsobu výroby potraviny, boli vybrané také, ktoré reprezentujú rôzne úrovne technologického spracovania a ktoré sú u nás najbežnejšie. Kvalita a amplifikovateľnosť DNA izolovanej z jednotlivých vzoriek potravín sa zisťovala pomocou PCR orientovanej na gén *ivr*. Oboma izolačnými postupmi sa získala DNA vhodná pre PCR, čo je v súlade s našimi predchádzajúcimi výsledkami v prípade geneticky modifikovanej sóje [12]. Z niektorých polotovarov (kukuričný škrob, sirup) však nebolo možné uvedeným spôsobom izolovať DNA. Tieto výsledky sú v súlade s publikovanými údajmi iných autorov, ktorí za pravdepodobnú príčinu považujú nízky obsah DNA v týchto vzorkách a navrhujú odlišný spôsob izolácie DNA z poriadkovo väčšieho množstva vzorky [3,9]. Vzhľadom na vysokú cenu súpravy Wizard sme v ďalšej práci používali na izoláciu DNA metódu s CTAB.



OBR. 2. Výsledky analýzy referenčných materiálov pomocou jednoduchaj PCR (A) a duplex PCR (B). Obsah kukurice Bt 176: 2 % (1), 1 % (2), 0,1 % (3), 0 % (4). S - štandard molekulových hmotností n.50 bp.

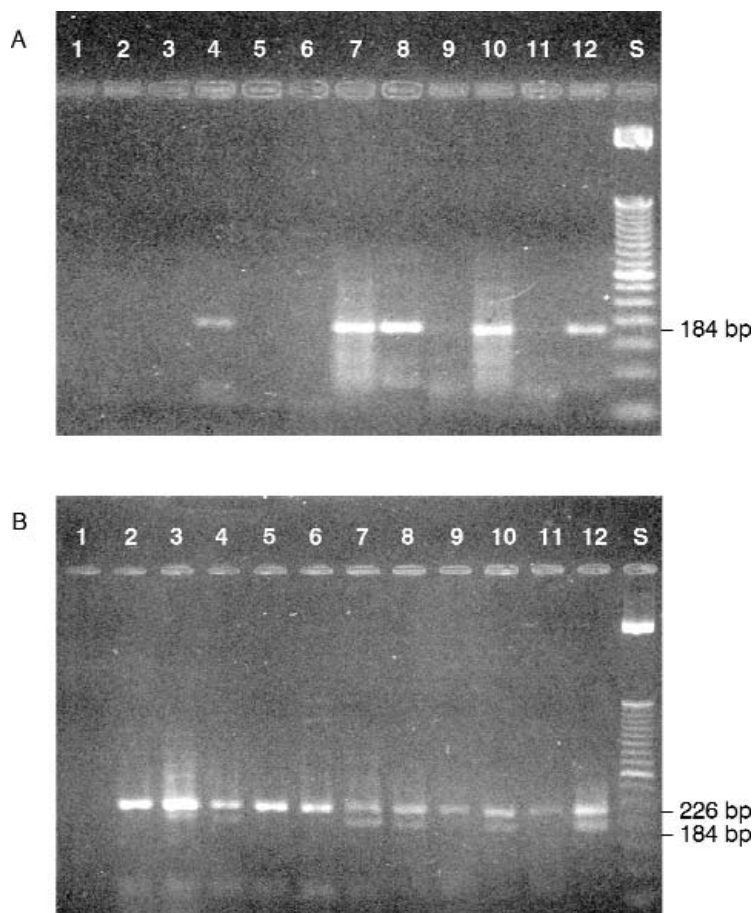
FIG. 2. Results of the analysis of reference materials using simplex PCR (A) and duplex PCR (B). Contents of Bt 176 maize: 2 % (1), 1 % (2), 0.1 % (3), 0 % (4). S - 50 bp ladder.

Ak bola DNA izolovaná z jednotlivých vzoriek potravín amplifikovateľná, použila sa následne v PCR orientovanej na gén *cryIA(b)*. Prítomnosť transgénnej DNA z kukurice Bt 176 sa zistila v instantnej kukuričnej kaši, kukuričných lupienkoch (corn flakes, chips), müsli a v pečive obsahujúcom podiel kukurice (obr. 3a, tab. 3).

DNA izolovaná z potravín sa analyzovala tiež pomocou duplex PCR, keď sa súčasne zisťovala amplifikovateľnosť DNA aj prítomnosť Bt 176. Získali sa výsledky rovnaké ako v prípade štandardnej PCR (obr. 3b). Kým však pri použití jednoduchaj PCR boli výsledky analýz jednoznačné a reprodukovateľné, pri použití duplex PCR vznikali v niektorých prípadoch nešpecifické produkty a výsledky neboli plne reprodukovateľné. Na základe našich skúseností považujeme za vhodnejšie používať pre rutinné analýzy dve samostatné PCR.

Vypracovanou metódou je možné spoľahlivo identifikovať prítomnosť geneticky modifikovanej kukurice Bt 176 v potravinárskych surovinách, polotovarochoch a výrobkoch, ktoré obsahujú dostatočné množstvo DNA, napríklad v kukuričnej múke, instantných kukuričných kašiach, kukuričných lupienkoch, pečive, kukuričnom mláte, kukuričnom gluténe. Metóda nie je vhodná na analýzu kukuričného škrobu, kukuričného sirupu a fruktózových prípravkov.





OBR. 3. Vybrané výsledky analýzy rôznych vzoriek potravín na prítomnosť kukurice Bt 176 použitím jednoduchéj PCR (A) a duplex PCR (B).

1 - kukuričný škrob, 2 - kukuričný glutén, 3 - sterilizovaná kukurica, 4 - kukuričné lupienky (corn flakes), 5 - kukuričná múka, 6 - kukuričná krupica, 7 - kukuričné lupienky (chips), 8 - müsli, 9 - pukance, 10 - instantná kukuričná kaša, 11 - negatívna kontrola (referenčný materiál s obsahom 0 % Bt 176), 12 - pozitívna kontrola (referenčný materiál s obsahom 0,1 % Bt 176), S - štandard molekulových hmotností n.50 bp.

FIG. 3. Selected results of the analysis of various food samples for the presence of Bt 176 maize using simplex PCR (A) and duplex PCR (B).

1 - maize starch, 2 - maize gluten, 3 - sterilized maize, 4 - corn flakes, 5 - maize flour, 6 - maize semolina, 7 - maize chips, 8 - müsli, 9 - pop corn, 10 - instant maize pap, 11 - negative control (reference material containing 0 % Bt 176), 12 - positive control (reference material containing 0.1 % Bt 176), S - 50 bp ladder.



Tab. 3. Výsledky analýzy potravín na prítomnosť kukurice Bt 176.  
Tab. 3. Results of the food analysis for the presence of Bt 176 maize.

Vzorka <sup>1</sup>	Počet vzoriek <sup>2</sup>	Počet pozitívnych vzoriek <sup>3</sup>	
		Ivr1a/b	CryIAb/s
kukuričné zrno	3	3	0
sterilizovaná kukurica	3	3	0
pukance	1	1	0
kukuričná múka	1	1	0
kukuričná krupica	1	1	0
instantná kukuričná kaša	1	1	1
kukuričné lupienky (corn flakes)	2	2	1
kukuričné lupienky (chips)	1	1	1
pudingový prášok	1	0	0
müsli	3	3	1
kukuričná žemľa	1	1	1
kukuričný škrob	5	0	0
kukuričný sirup	1	0	0
fruktóza 55 %	1	0	0
kukuričné mláto	1	1	0
kukuričný glutén	1	1	0

1 - sample, 2 - number of samples, 3 - number of positive samples.

#### Podakovanie

Autori ďakujú RNDr. Hane Drahovskej, Katedra molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, za užitočné odborné konzultácie.

#### Literatúra

1. Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Communities, L 043, 14.2.1997, s. 1-7.
2. Commission Regulation (EC) No. 49/2000 of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No. 1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. Official Journal of the European Communities, L 6, 11.1.2000, s. 13-14.
3. MEYER, R.: Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control, 10, 1999, s. 391-399.

4. ZAGON, J. - SCHAUZU, M. - BROLL, H. - BÖGL, K. W. - WINKLER, D.: Methods for the detection of genetic modifications in transgenic organisms. Berlin : Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1998. 56 s.
5. EHLERS, B. - STRAUCH, E. - GOLTZ, M. - KUBSCH, D. - WAGNER, H. - MAIDHOF, H - BENDIEK, B. - APPEL, B - BUHK, H.-J.: Identification of genetically modified maize by PCR. Bundesgesundheitsblatt, 40, 1997, s. 118-121.
6. STUDER, E. - DAHINDEN, I. - LÜTHY, J. - HÜBNER, P.: Nachweis des gentechnisch veränderten „Maximizer“ - mais mittel der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 88, 1997, s. 515-524.
7. HUPFER, CH. - HOTZEL, H. - SACHSE, K. - ENGEL, K.-H.: Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A, 206, 1998, s. 203-207.
8. HURST, C. D. - KNIGHT, A. - BRUCE, I. J.: PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. Molecular Breeding, 5, 1999, s. 579-586.
9. GACHET, E. - MARTIN, G. G. - VIGNEAU, F. - MEYER, G.: Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. Trends in Food Science and Technology, 9, 1999, s. 380-388.
10. TENDEL, C. - SCHÜSSLER, P. - SPRENGER-HAUSSELS, M. - SETZKE, E. - BALLER, J.: Verbesserte Nachweis gentechnisch veränderter Soja- und Maisbestandteile in Kakao-haltigen Lebensmitteln sowie in Lebensmittelzusatzstoffen. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96, 2000, s. 129-135.
11. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
12. ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - KUČHTA, T. - SIEKEL, P.: Dôkaz geneticky modifikovanej sóje v potravinách polymerázovou reťazovou reakciou. Bulletin potravinárskeho výskumu, 39, 2000, s. 255-264.

Do redakcie došlo 29.10.2001.

#### **Detection of genetically modified maize in food using polymerase chain reaction**

ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - KUČHTA, T. - SIEKEL, P.: Bull. potrav. Výsk., 41, 2002, p. 31-40.

**SUMMARY.** The article deals with a method based upon the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Bt 176 maize in food. The method involves the isolation of DNA using CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), determination of the quality of the isolated DNA by the amplification of the gene encoding invertase ( $\beta$ -fructofuranosidase; EC 3.2.1.26), and PCR oriented to the gene construct characteristic for Bt 176 maize. When the method was validated with reference materials, 0.1 % of Bt 176 maize was reproducibly detected. When the optimized method was used for the analysis of food products, Bt 176 maize was detected in instant maize pap, corn flakes, müsli and in bakery products. It was possible to reduce the time of analysis by using the two primer pairs together in a duplex PCR.

**KEYWORDS:** genetically modified organisms; maize; polymerase chain reaction; cetyltrimethylammonium bromide