

## **Dôkaz geneticky modifikovanej sóje 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 sóje Roundup Ready v potravinách. Metóda pozostáva z izolácie DNA použitím súpravy Wizard, overenia kvality izolovanej DNA amplifikáciou lektínového génu, z PCR orientovanej na génovú konštrukciu charakteristickú pre sóju Roundup Ready a z potvrdenia pozitívnych výsledkov použitím „nested PCR“. Pri overovaní metódy analýzou referenčných materiálov bolo metódou možné reprodukovateľne detegovať 0,1 % geneticky modifikovanej sóje. Optimalizovaná metóda sa použila na analýzu potravín na trhu v SR, pričom bola geneticky modifikovaná sója dokázaná v odtučnenej sójovej múke, extrudovaných sójových plátkoch, sójovej nátierke, sójovej omáčke a sójových rožkoch.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** geneticky modifikované organizmy; sója; polymerázová reťazová reakcia

Rastúca produkcia geneticky modifikovaných organizmov (GMO) a ich prienik na európske trhy vyvoláva záujem odbornej i laickej verejnosti. Pre túto oblasť vypracovala Európska únia niekoľko legislatívnych predpisov. Jednou zo základných smerníc týkajúcich sa používania GMO v potravinárstve je smernica 97/258/EEC [1] o nových potravinách a na ňu nadväzujúce predpisy. Vyplyva z nich povinnosť označovať tie potraviny, ktoré sú geneticky modifikované, alebo obsahujú GMO v akejkoľvek podobe. S tým súvisí potreba vývoja analytických metód, ktoré by boli schopné spoľahlivo a s dostatočnou citlivosťou identifikovať prítomnosť GMO v potravinách.

GMO sa od pôvodných organizmov odlišujú proteínom - nositeľom novej vlastnosti - a inzertom - vloženým úsekom DNA, ktorý kóduje uvedený proteín, a obsahuje ďalšie potrebné sekvencie. Tieto štruktúry sú cieľom analytických metód na identifikáciu GMO a je možné využiť dva spôsoby analýzy: imunochemické metódy na princípe ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) na dôkaz proteínu alebo molekulárno-biologické metódy na princípe

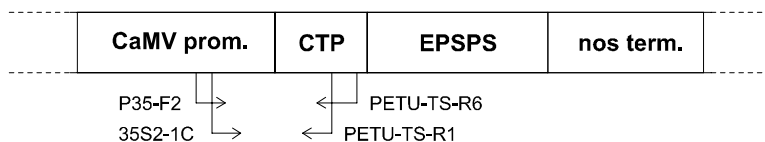
---

Ing. Alena ŠTEFANOVIČOVÁ, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., RNDr. Peter SIEKEL, CSc.,  
Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

PCR (polymerase chain reaction) na dôkaz DNA inzertu. Vzhľadom na nižšiu termostabilitu proteínov sú metódy na princípe ELISA spravidla vhodné iba na analýzu surovín a potravín, ktoré nie sú v priebehu technologického opracovania vystavené vyšším teplotám. Za univerzálnejšie sa považujú metódy na princípe PCR, ktoré majú navyše v zvláštnej úprave väčší potenciál kvantitatívneho stanovenia GMO [2,3].

PCR je metóda amplifikácie cieľového úseku DNA pomocou oligonukleotidových primerov, termostabilnej polymerázy a nukleotidov. Reakcia je cyklická a v priebehu jedného cyklu sa pri definovaných teplotných podmienkach denaturuje cieľová DNA (denaturácia), naviažu sa primery na cieľový úsek DNA (annealing) a účinkom polymerázy sa nasyntetizuje tento úsek DNA (polymerizácia). Opakovaním cyklov sa z minimálneho množstva DNA (teoreticky stačí jedna molekula) získa také množstvo produktu, ktoré je možné identifikovať. Na identifikáciu amplifikovaného úseku DNA sa najčastejšie používa elektroforéza v agarózovom géli, pomocou ktorej sa zistí jeho veľkosť (molekulová hmotnosť) [4].

V súčasnosti je jednou z najviac využívaných geneticky modifikovaných rastlín sója Roundup Ready, ktorá je rezistentná voči glyfosátovému herbicídu Round Up. Jej produkcia rýchlo vzrastá najmä v Severnej Amerike. Genóm sóje Roundup Ready obsahuje inzert, ktorého časťou je gén kódujúci enzým 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntetázu (EPSPS). Uvedený enzým je zodpovedný za rezistenciu rastliny voči glyfosátu. Použitý gén sa derivoval z pôdnej baktérie *Agrobacterium* sp. CP-4. Súčasťou génovej konštrukcie sú ďalšie sekvencie, ktoré sú nevyhnutné pre prenos a expresiu génu v rastline (obr. 1) [5].



OBR. 1. Génová konštrukcia integrovaná do genómu sóje Roundup Ready a poloha primerov použitých na jeho identifikáciu.

CaMV prom. - 35S promótor vírusu karfiolovej mozaiky, CTP - petúniový peptid zodpovedný za prenos proteínu v bunke, EPSPS - gén kódujúci 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntetázu, nos term. - nopalínsyntetázový terminátor.

FIG. 1. Gene construct integrated in the genome of Roundup Ready soya and the positions of primers used for its identification.

CaMV prom. - Cauliflower Mosaic Virus 35S promotor, CTP - Petunia cell transit peptide, EPSPS - 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene, nos term. - nopaline synthase terminator.

Dôkaz geneticky modifikovanej sóje v potravinách použitím PCR pozostáva z izolácie DNA, z amplifikácie DNA pomocou PCR a z identifikácie získaných produktov.

Izolácia DNA je veľmi dôležitou časťou metódy. Spôsob izolácie DNA by mal rešpektovať skutočnosť, že potravina je komplikovaný súbor chemických látok, ktoré môžu ovplyvňovať priebeh PCR. Je preto nevyhnutné zvoliť taký postup, ktorý eliminuje inhibičné látky (proteíny, polysacharidy, polyfenolické látky) a je zároveň šetrný k DNA. Výsledkom izolácie musí byť dostatočné množstvo amplifikovateľnej DNA. Všeobecne sa na izoláciu DNA používajú postupy kombinujúce selektívnu precipitáciu a extrakciu v kvapalnej (fenolová extrakcia, izolácia s použitím CTAB - cetyltrimetylamóniumbromidu) alebo na tuhej fáze (komerčne dostupné kolónky na báze silikagélu). Kvalitu a množstvo izolovanej DNA ovplyvňuje nielen voľba vhodného izolačného postupu, ale aj kvalita a množstvo DNA prítomnej v potravine. Kvalitu prítomnej DNA ovplyvňuje stupeň technologického opracovania potravin - účinkom vysokých teplôt, tlakov alebo extrémneho pH dochádza k fragmentácii DNA. Množstvo DNA je v niektorých potravinách veľmi nízke z dôvodu vysokého stupňa prečistenia (napr. rafinovaný olej, cukor, škrob a pod.) [2,6].

Predtým, ako sa analyzuje prítomnosť modifikovanej - rekombinantnej DNA, je potrebné overiť, či je izolovaná DNA v kvalite a množstve potrebných pre amplifikáciu. Na tento účel sa používa PCR orientovaná na gén *Le1* kódujúci lektín, ktorý je vždy v sóji prítomný [3]. Overenie kvality izolovanej DNA je v niektorých prípadoch možné uskutočniť súčasne s dôkazom rekombinantnej DNA použitím PCR v usporiadaní duplex s dvoma párami primerov v jednej reakcii [7].

Na dôkaz rekombinantnej DNA pomocou PCR sa používajú primery orientované na úseky DNA, ktoré sú charakteristické pre umelo vytvorenú konštrukciu a ktoré sa v danej kombinácii prirodzene nevyskytujú. Takými sú napr. spojenie promótoru z vírusu karfiolovej mozaiky (CaMV) a génu kódujúceho tranzitný peptid z petúnie (CTP) (obr. 1). Vzhľadom na predpokladanú fragmentáciu templátovej DNA je nevyhnutné voliť primery tak, aby veľkosť amplifikovaného produktu bola menšia ako 400 bp [6].

Potvrdenie identity amplifikovaného úseku sa vykonáva restriktčnou analýzou, hybridizáciou s DNA sondou, pomocou „nested PCR“ alebo sekvenovaním [3,7]. Potvrdenie sa vyžaduje na vylúčenie falošne pozitívnych výsledkov. Za falošne pozitívne výsledky sa považuje amplifikácia fragmentov, ktoré majú približne rovnakú veľkosť ako charakteristický fragment (pomocou elektroforézy ťažko rozlíšiteľnú), ale ktoré nevznikli amplifikáciou cieľovej časti génovej konštrukcie. Za určitých podmienok by mohli

vzniknúť prirodzenou kontamináciou rastliny vírusom karfiolovej mozaiky. Z metodického hľadiska je najjednoduchšie použitie „nested PCR“, ale je nevyhnutné dodržiavať prísne protikontaminačné opatrenia.

Vzhľadom na značnú komplikovanosť uvedených postupov a vzhľadom na závislosť ich citlivosti od variability matríc je potrebná validácia celej metódy. V predkladanej práci sa zaoberáme zavedením metódy na dôkaz geneticky modifikovanej sóje, jej overením s použitím referenčných materiálov a jej aplikáciou pri analýze potravín na trhu v SR.

### **Materiál a metódy**

Analyzovali sa sójové bôby a rôzne sójové potravinárske výrobky zakúpené v obchodnej sieti v SR. Ako referenčný materiál sa použil certifikovaný referenčný materiál SB-Set (Fluka, Buchs, Švajčiarsko) s obsahom 0 %, 0,1 %, 0,5 % a 2 % geneticky modifikovanej sóje Roundup Ready.

Použili sa dva postupy izolácie DNA, metóda s CTAB (cetyltrimetylamóniumbromid) [8] a metóda s použitím súpravy Wizard.

V prípade metódy s CTAB sa 100 mg až 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 vysušila a rozpustila v 50 µl až 100 µl vody, v závislosti od množstva izolovanej DNA.

V prípade metódy Wizard sa použila súprava Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Náväžok 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 guanidínium hydrochloridu. 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 vakuu 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 °C - 70 °C 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, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM každého dNTP (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko), 0,5 µM primerov (tab. 1) a 2,5 U DNA polymerázy (Ampli $Taq$  Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA alebo Platinum  $Taq$ , Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Na PCR sa použil termálny cyklér Biometra Personal Cyclér (Whatman-Biometra, Göttingen, Nemecko), použité teplotné programy sú uvedené v tabuľke 2. V prípade „nested PCR“ sa ako templát použili 4 µl 25-krát zriedeného produktu PCR s vonkajšími primermi (PETU-TS-R6 a P35S-F2), koncentrácia vnútorných primerov (PETU-TS-R1 a 35S2-1C) bola 1 µM.

Produkty PCR sa separovali elektroforeticky v 1 % agarózovom géli. Súčasne so vzorkami sa separoval 100 bp štandard molekulových hmotností (Advanced Biotechnologies, Leatherhead, Veľká Británia). Po farbení etídiumbromidom sa fragmenty DNA vizualizovali pri transiluminácii UV-svetlom a fotografovali [9].

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 % sóje Roundup Ready.

TABUĽKA 1. Použité primery.

TABLE 1. Primers used.

Označenie <sup>1</sup>	Cieľový gén <sup>2</sup>	Sekvencia <sup>3</sup>	Produkt <sup>4</sup>	Literat. <sup>5</sup>
GM03	lektínový gén	5' -gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C- 3'	118 bp	10
GM04	lektínový gén	5' -gCC CAT CTg CAA gCC TTT TTg Tg- 3'		
PETU-TS-R6	CTP	5' -TgT gCT gTA gCC ACT gAT gC- 3'	352 bp	11
P35S-F2	CaMV promótor	5' -TgA TgT gAT ATC TCC ACT gAC g- 3'		
PETU-TS-R1	CTP	5' -ACA ACA Tgg CTC Agg ggA TAC A- 3'	156 bp	11
35S2-1C	CaMV promótor	5' -CTg ACg TAA ggg ATg ACg CA- 3'		

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

TABUĽKA 2. Teplotné programy PCR pri použití polymerázy Platinum  $Taq$ .TABLE 2. Temperature programs used for PCR with Platinum  $Taq$  polymerase.

Primery <sup>1</sup>	Úvodná denaturácia <sup>2</sup>	Počet cyklov <sup>3</sup>	Denaturácia <sup>4</sup>	Annealing	Polyme-rizácia <sup>5</sup>	Záverečná polymerizácia <sup>6</sup>
GM03, GM04	94 °C, 2 min	35	97 °C, 30 s	65 °C, 50 s	72 °C, 80 s	72 °C, 8 min
PETU-TS-R6, P35S-F2	94 °C, 2 min	35	95 °C, 30 s	61 °C, 50 s	72 °C, 80 s	72 °C, 8 min
PETU-TS-R1, 35S2-1C	94 °C, 2 min	20	95 °C, 30 s	58 °C, 45 s	72 °C, 30 s	72 °C, 8 min

1 - primers, 2 - initial denaturation, 3 - number of cycles, 4 - denaturation, 5 - polymerisation, 6 - final polymerisation.

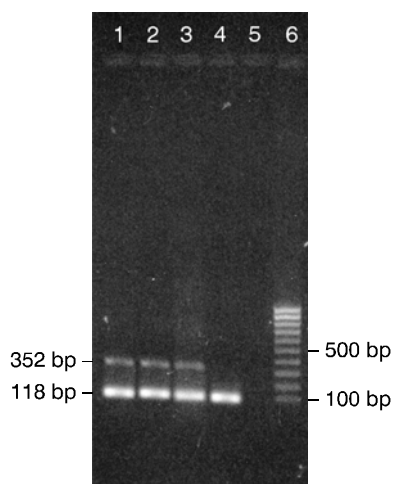
## Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo zaviesť metódu na dôkaz geneticky modifikovanej sóje, overiť ju s použitím referenčných materiálov a aplikovať ju pri analýze rôznych druhov potravín z obchodnej siete v SR.

Pri zavedení metódy sa použila DNA izolovaná z referenčných materiálov metódou s CTAB a izolovaná s použitím súpravy Wizard. DNA izolovaná obidvoma metódami mala porovnateľnú kvalitu, čo sa potvrdilo amplifikáciou fragmentu lektínového génu veľkosti 118 bp. S použitím primerov PETU-TS-R6 a P35S-F2 sa amplifikoval fragment veľkosti 352 bp špecifický pre GMO. V záujme zvýšenia reprodukovateľnosti sa reakčné podmienky PCR optimalizovali z hľadiska použitej termostabilnej DNA polymerázy, zloženia reakčnej zmesi a pre jednotlivé páry primerov aj z hľadiska teplotného programu. Porovnálo sa päť druhov termostabilných DNA polymeráz, z ktorých sa najšpecifickejšie a najreprodukovateľnejšie výsledky dosiahli použitím enzýmu *Ampli<sup>Taq</sup> Gold*. Dobré výsledky sa dosiahli tiež použitím lacnejšieho enzýmu *Platinum Taq*, ktorý však mal o niečo nižšiu efektívnosť amplifikácie. V ďalšej práci sme používali enzým *Platinum Taq*.

Pri použití optimalizovanej metódy na analýzu referenčných materiálov bolo možné reprodukovateľne detegovať 0,1 % geneticky modifikovanej sóje.

V záujme zjednodušenia a urýchlenia analýzy sa overovala možnosť použitia oboch párov primerov v jednej reakcii (duplex PCR) pri teplote



OBR. 2. Výsledky analýzy referenčných materiálov pomocou duplex PCR.

1 - 2 % geneticky modifikovanej sóje, 2 - 0,5 % geneticky modifikovanej sóje, 3 - 0,1 % geneticky modifikovanej sóje, 4 - 0 % geneticky modifikovanej sóje, 5 - negatívna kontrola, 6 - štandard molekulových hmotností n.100 bp.

FIG. 2. Results of the analysis of reference materials using duplex PCR.

1 - 2 % of genetically modified soya, 2 - 0.5 % of genetically modified soya, 3 - 0.1 % of genetically modified soya, 4 - 0 % of genetically modified soya, 5 - negative control, 6 - molecular weight standard n.100 bp.

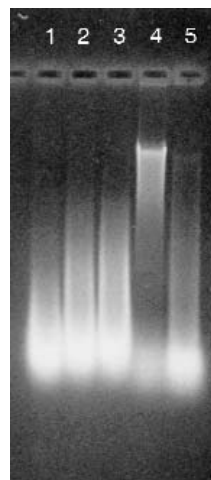
annealingu 61 °C. V tomto usporiadaní bolo tiež možné detegovať 0,1 % GMO, avšak preferenčne prebiehala amplifikácia fragmentu lektínového génu (obr. 2). Príčinou bol pravdepodobne nadbytok geneticky nemodifikovaného templátu. Keďže takýto výsledok PCR by mohol negatívne ovplyvniť interpretáciu výsledkov v prípade DNA izolovanej z potravín (t. j. DNA nižšej kvality), v ďalšej práci sme od duplex PCR ustúpili.

Optimalizovaná metóda sa použila na analýzu potravín obsahujúcich sóju. Analyzovali sa potraviny s rôznou konzistenciou, s rôznym podielom sóje a do rôzneho stupňa technologicky opracované. Odoberalo a homogenizovalo sa 25 g potraviny, z ktorých sa na vlastnú analýzu použilo 350 mg. Dôsledná homogenizácia analyzovaných vzoriek je jedným z dôležitých momentov analýzy. V prípade vzoriek s vysokým podielom sušiny (extrudované výrobky, rožky a pod.) sa k homogenizovanej vzorke pridalo dvojnásobné množstvo sterilnej vody. Čokoláda, majonéza a lecitín sa pred homogenizáciou zahriali na 55 °C - 60 °C. Tekuté výrobky sa analyzovali priamo po premiešaní.

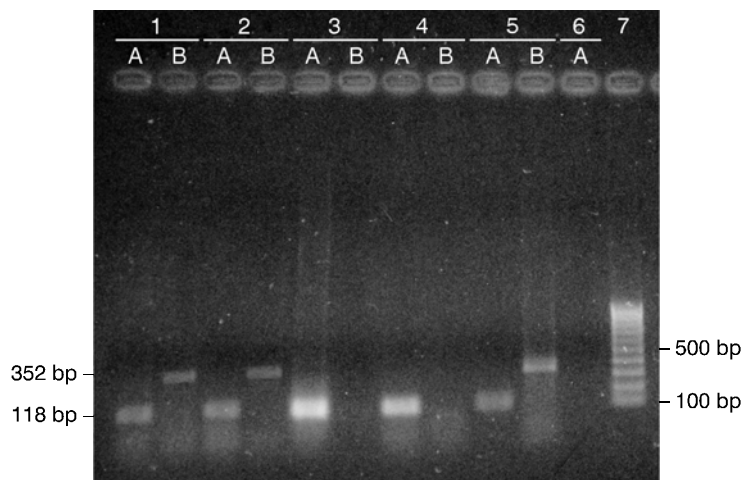
Po homogenizácii sa zo vzorky izolovala DNA. Vzhľadom na menšiu prácnosť, menšiu časovú náročnosť a lepšiu reprodukovateľnosť sa používala na izoláciu DNA súprava Wizard. Kvalita DNA izolovanej z technologicky rôzne opracovaných potravín bola odlišná, DNA mala rôzny stupeň fragmentácie (obr. 3). Amplifikovateľnosť DNA sa potvrdila vo všetkých prípadoch a sóju Roundup Ready sme dokázali v nasledujúcich sójových výrobkoch: odtučnenej múke, extrudovaných plátkoch, nátierke, omáčke

OB. 3. Fragmentácia DNA izolovanej z rôznych vzoriek potravín.  
1 - sójový granulát, 2 - sójové extrudované plátky, 3 - sójová odtučnená múka, 4 - sójové bôby, 5 - sójová majonéza.

FIG. 3. Fragmentation of DNA isolated from various food samples.  
1 - soya granulate, 2 - soya extruded slices, 3 - defatted soya flour, 4 - soya beans, 5 - soya mayonnaise.







OBR. 4. Výsledky analýzy rôznych vzoriek potravín na prítomnosť sóje Roundup Ready.

A - PCR orientovaná na lektínový gén, B - PCR orientovaná na génovú konštrukciu charakteristickú pre sóju Roundup Ready.

1 - sójová odtučnená múka, 2 - sójové extrudované plátky, 3 - sójový granulát, 4 - sójové kocky, 5 - pozitívna kontrola, 6 - negatívna kontrola, 7 - štandard molekulových hmotností n.100 bp.

FIG. 4. Results of the analysis of various food samples for the presence of Roundup Ready soya.

A - PCR oriented to the lectin gene, B - PCR oriented to the gene construct characteristic for Roundup Ready soya.

1 - defatted soya flour, 2 - extruded soya slices, 3 - soya granulate, 4 - soya cubes, 5 -positive control, 6 - negative control, 7 - molecular weight standard n.100 bp.

a rožkoch (pre ilustráciu uvádzame obr. 4). Na potvrdenie pozitívnych výsledkov sa použila „nested PCR“ s primermi PETU-TS-R1 a 35S2-1C. Potvrdenie (amplifikáciu fragmentu veľkosti 156 bp) sme dosiahli vo všetkých prípadoch pozitívnych výsledkov (tab. 3).

Uvedenou metódou je možné spoľahlivo identifikovať prítomnosť sóje Roundup Ready v surových a šetrne opracovaných potravinách, v ktorých sa DNA nachádza v relatívne vysokom množstve. V prípade potravín, ktoré prešli náročnejšou technologickou úpravou alebo obsahujú malé množstvo DNA, môže byť reprodukovateľnosť výsledkov nižšia a vtedy je vhodné modifikovať podmienky izolácie DNA.



Tabuľka 3. Výsledky analýzy potravín na prítomnosť sóje Roundup Ready.  
TABLE 3. Results of the food analysis for the presence of Roundup Ready soya.

Potravina <sup>1</sup>	Výsledok PCR <sup>2</sup>		
	lektínový gén <sup>3</sup>	CaMV/CTP	nested PCR
Sójové bôby	+	+	+
Sójová múka odtučnená	+	+	+
Sójový granulát	+	-	N
Sójové plátky	+	+	+
Sójová pochúťka	+	-	N
Pražené sójové oriešky	+	-	N
Sójové kocky	+	-	N
Lecitín tekutý	+	-	N
Lecitín práškový	+	-	N
Sójová čokoláda	+	-	N
Sójová paštéta	+	-	N
Sójová majonéza	+	-	N
Sójová nátierka	+	+	+
Sójová omáčka	+	+	+
Sójová tatárska omáčka	+	-	N
Syr tofu	+	-	N
Syr tofu špeciál	+	-	N
Syr tofu údený	+	-	N
Sójové mlieko	+	-	N
Sójový rožok	+	+	+

N - neanalyzované.

N - not determined.

1 - food product, 2 - PCR result, 3 - lectin gene.

#### Podakovanie

Autori vyjadrujú poďakovanie Dr. J. Kraicovi, PhD. z Výskumného ústavu rastlinnej výroby, Piešťany, za konzultácie o izolácii DNA z geneticky modifikovaných rastlín.

## 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. 1-6.
2. MEYER, R.: Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control, 10, 1999, s. 391-399.
3. 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.

4. SAIKI, R. K. - GELFAND, D. H. - STOFFEL, S. - SCHARE, S. J. - HIGUCHI, R. - HORN, G. T. - MULLIS, K. B. - ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 1988, s. 487-491.
5. Monsanto Company, St. Louis Missouri, USA: Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Majitelia: BARRY, G. F. - KISHORE, G. M. - PADGETTE, S. R. European Patent Office. Patent, EP 0 546 090 B1, 19.6.1996
6. STRAUB, J. A. - HERTEL, C. - HAMMES, W. P.: Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 208, 1999, s. 77-82.
7. 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.
8. 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.
9. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
10. MEYER, R. - CHARDONNENS, F. - HÜBNER, P. - LÜTHY, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 203, 1996, s. 339-344.
11. VAN HOFF, A. M. A. - KOK, E. J. - BOUW, E. - KUIPER, H. A. - KEIJER, J.: Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Additives and Contaminants*, 15, 1998, s. 767-774.

Do redakcie došlo 13.7.2000.

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

ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - KUČHTA, T. - SIEKEL, P.: *Bull. potrav. Výsk.*, 39, 2000, p. 255-264.

**SUMMARY.** The article deals with a method based upon the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of genetically modified Roundup Ready soya in food. The method involves the isolation of DNA using a Wizard kit, determination of the quality of the isolated DNA by the amplification of the lectin gene, PCR oriented to the gene construct characteristic for Roundup Ready soya, and confirmation of positive results using nested PCR. When the method was validated with reference materials, 0.1 % of genetically modified soya could be reproducibly detected. When the optimized method was used for the analysis of food products on the market in Slovak Republic, genetically modified soya was detected in defatted soya flour, extruded soya slices, soya spread, soya sauce and soya buns.

**KEYWORDS:** genetically modified organisms; soya; polymerase chain reaction