

Articol original

## Prezența OMG-urilor în Probe de Soia și Produse din Soia, Identificate în Județul Sălaj

ȘTEȚCA Gh.<sup>a\*</sup>, N. MOCUȚA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj – Napoca, Facultatea de Agricultură, Str. Mănăstur nr. 3 – 5, 400372 Cluj – Napoca, România

<sup>b</sup>Direcția Sanitar Veterinară – Laboratorul DSVSA Sălaj, România

Primit în data de 3 iunie 2009; primit în forma finală după recenzie în 11 august 2009; acceptat în 1 octombrie 2009  
Disponibil online din 25 decembrie 2009

### Rezumat

Realizarea, comercializarea și cultivarea organismelor modificate genetic (OMG) constituie aspecte foarte controversate cu implicații în mai multe domenii. Detectarea OMG-urilor va deveni o necesitate, în viitor, ca urmare a cererilor legislative care sunt destul de severe atunci când este vorba de comercializarea acestor produse. În acest context, se impune să se pună la punct mai multe metodologii pentru diagnostic de laborator în scopul de a detecta OMG în alimente, furaje, semințe etc. În cadrul laboratorului DSVSA Sălaj, a fost inițiată activitatea de detectare a OMG-urilor, cu ajutorul metodei PCR - calitative și în anul 2009 s-au examinat 54 probe de soia și produse derivate din soia. Deși, din punct de vedere statistic, aceste rezultate nu sunt semnificative trebuie remarcat faptul că există organisme modificate genetic a căror prezență trebuie să fie detectată în laboratoare specifice.

*Cuvinte cheie:* Organisme Modificate Genetic (OMG), alimente, detecție, PCR

### 1.Introducere

Realizarea și comercializarea Organismelor Modificate Genetic (OMG) a provocat de mai multe ori controverse, dezbateri și discuții. OMG sunt organisme cu ADN modificat în mod artificial.

Modificările genetice au fost făcute cu scopul de a schimba câteva caracteristici cu cele care sunt mai avantajoase ca rezistență la erbicide, crescând capacitatea de producție, îmbunătățirea conținutului nutritiv, rezistență la factorii de mediu nefavorabili, îmbunătățirea calității produselor alimentare etc.

Preocupările și protestele exprimate de oameni, în ceea ce privește riscurile pentru sănătatea umană și animală, și nu în ultimul rând cu privire la mediul înconjurător, au determinat autoritățile din

multe țări să eticheteze produsele alimentare și alte produse din OMG-uri într-un mod diferit.

Ca urmare, s-au promovat cadre legislative severe, în ceea ce privește aprobarea cultivării și comercializării OMG-urilor și denumirii lor. Acest fapt a impus necesitatea de a dezvolta mai multe metode de diagnostic de laborator în scopul de a sublinia prezența OMG în diverse produse: alimente, furaje, semințe etc.

Modificarea genetică a plantelor implică trei factori: gena recent introdusă în organism, promotorul care are rolul de a favoriza reacția de transformare și un stopper care asigură sfârșitul procesului de transfer la finalul reacției. În general, pentru promotor se utilizează virusul mozaicului al conopidei (CaMV 35S) și ca stopper un derivat din gena desinteză NOS, de la *Agrobacterium tumefaciens*.

Aceste două elemente sunt prezente în peste 95% din culturile modificate genetic aprobate pentru

\* Autorul căruia i se va adresa corespondența.  
Tel.: 0040 264 596384/371; Fax: 0040 264 593792  
e-mail: stetcagheorghe@yahoo.com

a fi comercializate în EU. Capacitatea de a identifica aceste elemente (promotorul/stopper-ul permite detectarea majorității plantelor modificate genetic (MG). Cea mai folosită metodă este tehnica PCR, care impune un protocol de izolare a ADN-ului din proba de analizat, amplificarea secvenței specifice pentru cele două elemente menționate și apoi obținerea produsului PCR.

## 2. Material și metodă

Echipamente, consumabile, utilizate pentru metoda PCR: termocycler, transiluminator, echipamente pentru electroforeză, aparat de fotografiat, pipete, consumabile (tampon de re pentru încărcare, markeri greutate moleculară, support pentru pipete, etc).

**Kit-ul pentru extracția și purificarea ADN-ului alimentar și din furaje** provine de la Promega Company.

**Modul de utilizare** este în conformitate cu recomandările din broșura tehnică, se măsoară 200 mg din proba analizat fin măcinată, se introduc într-un tub de 2 ml și se agaugă în continuu soluția tampon. Soluția de precipitare se adăugă și se centrifuează la 13000 x G timp de 10 minute și supernatantul este transferat în alt tub de 2 ml.

S-au adăugat 50 μl MagneSil PMPs și apoi izopropanol, 0,8 /1 ml de supernatant, a fost incubat 5 minute la temperatura camerei și tubul a fost pentru separarea magnetică. ADN-ul a fost fixat cu ajutorul antigene reacție- anticorpi.

Faza lichidă a fost îndepărtată și s-a adăugat 250 μl tampon de liza B și după amestecare din tub a fost îndepărtată faza lichidă și s-a adăugat 1 ml de etanol 70%.

Faza lichidă a fost din nou aruncată, repetând de două ori spălarea cu etanol.

Probele s-au uscat la 65 °C timp de zece minute, s-au adăugat 100 μl nuclează, s-a vortexat și incubat la 65 °C, timp de cinci minute. Tuburile au fost introduse în platoul magnetic și faza lichidă a fost recoltată (ADN-ul), într-un tub de reacție pentru PCR. S-a completat 100 μl cu nuclează.

Tuburile au fost menținute la frigider pentru o perioadă scurtă de timp sau congelate (-24 ° C) pentru o perioadă mai lungă de timp. ADN-ul extras și purificat este folosit pentru PCR în scopul de a detecta OMG-urile.

50 μl MagneSil PMPs a fost adăugat la probă, 5 micrograme ADN-ului în 100 de apă μl, respectiv, 50 ng/1 μl apă.

Detectarea OMG din eșantion cu ajutorul metodei PCR, s-a realizat folosind un kit produs de BIOTOOLS. Kitul conține Master mix (PCR-

tampon, dNTP) și clorură de magneziu, ADN polimeraza.

În setul de amplificare sunt prezente cinci tipuri de Master-mix:

- 5S Master-mix pentru a identifica promotorul 35S
- Master NOS-Mix, pentru a identifica stopper-ul,
- Master Soia-Mix, pentru a identifica soia, cu ajutorul genei pentru prezența lectinei.
- Porumb-Master-mix pentru a identifica porumbul cu Plant-Master-mix pentru a identifica prezența genei RBCL a cloroplastului.
- Pe langa Master-mix, magneziu - clorură de vinil și polimerază, setul conține varianta de control pozitiv de reacție pentru a amplifica, respectiv de produs pentru a amplifica ADN-ul și pentru a controla: soia, porumb, plantelor și OMG-ulri.

La amplificarea în termocycler a produselor de control al ADN-ului, cu Master-mix-ul corespunzător pentru fiecare produs și se amestecă, în prezență de clorură de magneziu și polimerază.

Pregătirea de reactanților pentru PCR a fost făcută în camera de PCR sub hotă cu de flux laminar și respectând cantitățile de reactivi necesare și specificate de firma lor producătoare:

Reactiv	P 35S	NOS	Porumb	Soia	Plante
MgCl <sub>2</sub>	2,5μl	2,5μl	2,0μl	2,0μl	2,0μl
Master Mix	15μl	15μl	15μl	15μl	15μl
Polimerază	1,4μl	1,4μl	1,2μl	1,0μl	1,0μl
Apă	21,1 μl	21,1 μl	21,8 μl	22 μl	22 μl
TOTAL	40 μl	40 μl	40 μl	40 μl	40 μl

Tuburile pregătite pentru PCR, au fost transferate în camera de extracție a ADN-ului (pre-amplificare), și sub hota cu de flux laminar acolo a fost adăugat 1 - 2μl ADN extras din probele analizate și 10 μl de ADN de control (varianta de control pozitiv) și 10 μl PCR nuclează, de control negativ (gol), în cele două tuburi cu varianta de control.

La volumul total de 50μl PCR și s-a fost plasat o picătură de ulei mineral, în fiecare tub PCR, după care tuburile au fost puse în termocycler în scopul de a fi amplificate.

Timpii de amplificare pentru thermocycler au fost stabilit în funcție de indicațiile de pe Kit instrucțiuni de utilizare:

<b>Denaturare inițială</b>	Plante,35S NOS 94°C X 3 min.	Porumb 94°C X 10 min.	Soia 94°C X 10 min.
<b>Ciclu de amplificare</b>	94°C X 30 sec. 55°C X 40 sec. 72° C X 1 min.	94°C X 30 sec. 70°C X 30 sec. 72° C X 30 sec.	94°C X 30 sec. 60°C X 30 sec. 72° C X 1 min.
<b>Numărul de cicluri</b>	45	40	40
<b>Elongare inițială</b>	72°C X 3 min.	72°C X 10 min.	72°C X 3 min.

După amplificarea PCR evaluarea s-a făcut cu ajutorul electroforezei. Au fost pregătite geluri de 2,5% agaroză (agaroză LE-AG), în tampon TAE și vizualizarea s-a realizat cu bromură de etidiu în gel, 5μl 10 m/ml soluție de bromură pentru 100 ml de

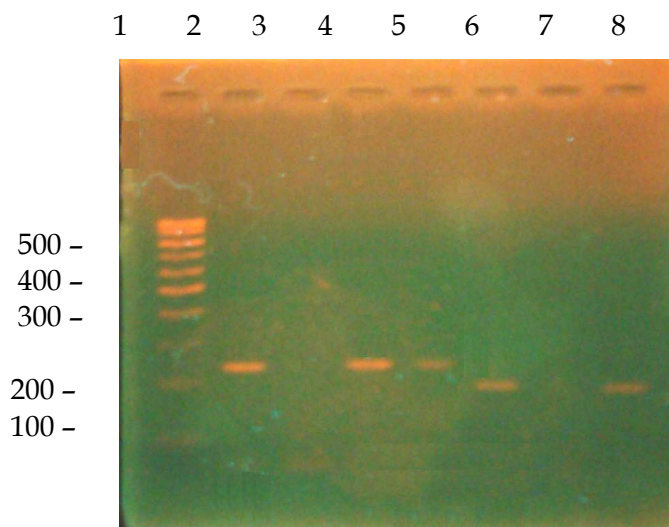
gel. Migrația a fost făcută în tampon TAE 1X la 100 V. Rezultatul s-a interpretat în funcție de distanța de migrare și de poziția față de markerul de greutate de 100 pb cum se poate vedea în imaginea de mai jos.

Toate probele cu un răspuns pozitiv, respectiv cu prezența de P-35S și/sau NOS au fost trimise pentru a fi confirmate și cuantificate cu ajutorul Real-Time PCR, la Departamentul de Biologie Moleculară în cadrul IDSA Bucuresti.

### 3. Results and discussions

The results of the electrophoresis made at PCR for two samples.

Rezultatele obținute la analiza probelor sunt prezentate în tabelul 1.



#### GEL II – P-35S, NOS

1. Marker de greutate moleculară 100 bp
2. P-35S Martor pentru amplificare
3. Blank
4. Proba nr. 25
5. Proba nr. 30
6. NOS Martor pentru amplificare
7. NOS Blank
8. NOS Proba nr. 25

- Plant Master Mix – 190 bp
- 35S Master Mix – 226 bp
- NOS Master Mix – 180 bp
- Maize Master Mix – 225 bp
- Soya Master Mix – 118 bp

Tabelul 1. Rezultatele examenului pentru detectarea OMG în probele de soia și de produse derivate din soia examinate în laborator.

Nr. crt.	Proba	Total probe examinate	Din care pozitive	
			Total	Procent
1	Din soia granulată	11	1	9%
2	Din bucăți de soia	5	0	0
3	Din felii de soia	5	0	0
4	Din făină de soia	7	1	14.2%
5	Din pudră concentrată de soia	8	1	12.5%
6	Izolată proteică din pudră concentrată de soia	8	1	12.5%
7	Făină proteică din soia	1	0	0
8	Sos de soia	1	0	0
9	Făină de soia	6	6	100%
10	Grăunțe de soia	2	1	50%
<b>Total probe</b>		<b>54</b>	<b>11</b>	<b>21.3%</b>

#### 4. Concluzii

Au fost examinate un număr de 54 de probe de soia și produsele derivate din soia, pentru a detecta prezența OMG-urilor.

Pentru detecție a fost folosită o metodă calitativă, fiind stabilite numai de prezența sau absența OMG în probe .

Limită minimă pentru kit-ul de detecție folosit este de 0,1% (față de 0,9%, care reprezintă maxima admisă).

Din totalul de 54 probe examinate, un număr de 11 probe s-au dovedit a fi pozitive, respectiv 21,3%.

Pentru mai multe categorii de probe de numărul lor redus nu permite o concluzie semnificativă statistic.

Trebuie subliniat procentul ridicat de probe soia, modificate genetic

Pentru că problema OMG-urilor este extrem de contestată credem că se impun dezbateri ale aspectelor multiple care implică utilizarea și cultivarea OMG.

#### Bibliografie

[1] Bonfini Laura, Heinze Petra, Kay Simon, G. Van den Eed, 2005, Review of gmo detection and quantification techniques, European Commission, Joint Research

Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit, I-21020 Ispra, Italy

[2] Mocuta N., L. Herman, 1998, The prevalence of *Listeria* spp in food examined by the classical method and by the PCR method, 4-th World Congress of Foodborne Infections and Intoxications

[3] Mocuta N., 2003, Metode de detecție a OMG (Organisme Modificate Genetic) in alimente. Congresul National de Medicina Veterinara , Iasi

[4] Mocuta N., 2003, Marea sfidare a secolului XXI – Hranirea a 10 miliarde de oameni, „Agricultura Romaniei” Nr 30 (655)

[5] Biogenics Kits, Kits for detection of gmos in food and food materials, [http://www.biotoools.net/eng/frameset \\_productos.htm](http://www.biotoools.net/eng/frameset_productos.htm)

[6] Holger Nickel, Agro-Biotechnology at the University of Cologne

[7] Identigen-Company, Background Learning, What are GMO's? <http://www.identigen.com/>

[8] Promega Corporation, DNA & RNA Purification Food & GMO Testing, <http://www.promega.com/>

[9] Tepnel Biosystems, *biokits* DNA GMO Detection Kits, for Food & Feed, <http://www.tepnel.com/>