



УНИВЕРЗИТЕТ „КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ  
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА – СКОПЈЕ



**Арита Агим Сабриу-Хацијаха**

**ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА REAL-TIME  
PCR МЕТОД ЗА АНАЛИЗА НА ГЕНЕТСКИ  
МОДИФИЦИРАНА ХРАНА**

Докторски труд

Скопје, 2021



УНИВЕРЗИТЕТ „КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ  
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА - СКОПЈЕ



Арита Агим Сабриу-Хацијаха

**ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА REAL-TIME  
PCR МЕТОД ЗА АНАЛИЗА НА ГЕНЕТСКИ  
МОДИФИЦИРАНА ХРАНА**

Докторски труд

Скопје, 2021

Докторанд:

АРИТА АГИМ САБРИУ-ХАЏИЈАХА

Тема:

ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА REAL-TIME PCR МЕТОД ЗА  
АНАЛИЗА НА ГЕНЕТСКИ МОДИФИЦИРАНА ХРАНА

Ментор:

проф. д-р ВЕЛИМИР СТОЈКОВСКИ,  
Факултет за ветеринарна медицина Скопје

Комисија за одбрана:

проф. д-р ПАВЛЕ СЕКУЛОВСКИ (претседател)  
Факултет за ветеринарна медицина Скопје

проф. д-р ВЕЛИМИР СТОЈКОВСКИ,  
Факултет за ветеринарна медицина Скопје

проф. д-р ЗЕХРА ХАЈРУЛАИ-МУСЛИУ,  
Факултет за ветеринарна медицина Скопје

проф.д-р ЈОВАНКА ТУТЕСКА  
Факултет за биотехнички науки, Битола

проф. д-р ДЕАН ЈАНКУЛОСКИ,  
Факултет за ветеринарна медицина Скопје

Научна област:

БЕЗБЕДНОСТ НА ХРАНА

Датум на одбрана:

23.12.2021

**Арита Агим Сабриу-Хаџијаха**

## **ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА REAL-TIME PCR МЕТОД ЗА АНАЛИЗА НА ГЕНЕТСКИ МОДИФИЦИРАНА ХРАНА**

### **Апстракт**

Примената на генетскиот инженеринг води до промени на генетскиот материјал на организми со вметнување на ген кој носи информација за одредено својство кое природно не е присутно во тој организам. На овој начин се дизајнираат генетски модифицирани организми (ГМО) со посакувани карактеристики. И покрај значителната комерцијална вредност, сепак кај потрошувачите постои скептицизам во однос на безбедноста на здравјето и ризиците по животната средина.

Во последните децении, бројот на генетски модифицирани култури брзо се зголемува, затоа нивната прецизна детекција е значајно за задолжително означување и проценка на ризик. Според Регулативите 1830/2003 и 1829/2003 на Европската Унија означувањето на храна и добиточна храна е задолжително доколку содржи генетска модификација во концентрација поголема од 0.9%. Моментално, real-time PCR методот е „златен стандард“ за анализа на генетски модифицирана храна.

Екстракцијата на високо квалитетна DNA е критичен чекор за точна и ефикасна DNA амплификација. Во овој докторски труд е опишана модификација со употребата на ензим RNаза А, на веќе оптимизиран натрум додецилсулфат (SDS) протокол за екстракција на високо квалитетна DNA. Оваа DNA е погодна за скрининг на генетска модификација. Целта на оваа дисертација е и развој, оптимизација и валидација на метод за скрининг на 35S промоторот и Tnos терминаторот во сирова и процесирани храна. Оптимизирани се концентрацијата и соодносот на прајмерите и TaqMan пробата, на универзалниот мастер микс и на DNA матрицата. Најниската концентрација на DNA при која се детектираат и двата генетски елементи е 0.1 ng/ $\mu$ L. Лимитот на детекција (LOD) изнесува 0.01% ГМО. Методот е акредитиран и е во опсегот на официјални методи на Институт за храна при Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, кој се користи за рутинска анализа.

**Клучни зборови:** деоксирибонуклеинска киселина (DNA), генетски модифицирани организми (ГМО), DNA екстракција, оптимизација, валидација, real-time PCR

**Arita Agim Sabriu-Haxhijaha**

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF REAL-TIME PCR METHOD FOR ANALYSIS OF GENETICALLY MODIFIED FOOD**

**ABSTRACT**

The application of genetic engineering leads to changes in the genetic material of organisms by inserting a gene that carries information about a certain trait that is not naturally present in that organism. In this way, genetically modified organisms (GMOs) are designed with the desired characteristics. Despite the significant commercial value, consumers are still skeptical about the risks to the environment and health safety.

In recent decades the number of genetically modified crops has increased rapidly, so their accurate detection is important for mandatory labelling and risk assessment. According to Regulations 1830/2003 and 1829/2003 of the European Union, the labelling of food and feed is mandatory if it contains a genetic modification in a concentration greater than 0.9%. Currently, the real-time PCR method is the „gold standard" for the analysis of genetically modified foods.

Extraction of high quality DNA is a critical step for accurate and efficient DNA amplification. This doctoral dissertation describes a modification using the RNase A enzyme to an already optimized sodium dodecyl sulphate (SDS) protocol for the extraction of high quality DNA. This DNA is suitable for screening of genetic modification. The purpose of this dissertation was to develop, optimize and validate a screening method for the 35S promoter and Tnos terminator in raw and processed foods. During the research were optimized the concentration and ratio of primers and TaqMan probe, the concentration of DNA template and of universal master mix. The lowest DNA concentration at which both genetic elements are detected is 0.1 ng/ $\mu$ L. The limit of detection (LOD) is 0.01% GMO. The method is accredited and is in the range of official methods of the Food Institute at Faculty of veterinary medicine – Skopje, used for routine analysis.

**Key words:** deoxyribonucleic acid (DNA), genetically modified organisms (GMOs), DNA extraction, optimization, validation, real-time PCR

## БЛАГОДАРНОСТ

Голема благодарност на раководството на Факултетот за ветеринарна медицина – Скопје и Институтот за храна, кои ми овозможиле да ја изработам докторската дисертација во Лабораторијата за молекуларни анализи на храна и генетски модификувани организми. Благодарност до сите професори и соработници за подршката и стручните совети при изработка на ова истражување.

Најискрена благодарност на моите родители и моето семејство за неизмерната љубов и поддршка во тек на целокупното мое професионално усовршување. Голема благодарност на родителите на мојот сопруг кои се грижеа за мојот син во мое отсуство.

Најголема благодарност на мојот сопруг и мојот син Ррон за трпението, љубовта и подршката за реализација на целта.

Изјавувам дека докторскиот труд е оригинален труд што го имам изработено самостојно.

Арита Сабриу Хацијаха

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

Арита Сабриу Хацијаха, с.р

## СОДРЖИНА

Листа на кратенки .....	9
1.     ВОВЕД .....	10
2.     ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА .....	12
2.1. Што е ГМ храна?.....	12
2.2. Историјат - Прва произведена ГМ храна.....	13
2.3. Предности од употребата на ГМ храна.....	15
2.3.1. Подобравање на нутритивните вредности.....	15
2.3.2. Намалување на антинутриентите .....	16
2.3.3. Редукција на алергените протеини .....	18
2.3.4. Толерантност кон абиотички стрес фактори .....	19
2.3.5. Резистентност на инсекти .....	22
2.3.6. Резистентност кон фунгални патогени.....	24
2.3.7. Толерантност кон хербициди .....	25
2.4. Потенцијални опасности / ризик од употреба на ГМО .....	26
2.4.1. Антибиотска резистентност.....	26
2.4.2. Хоризонтален трансфер на гени.....	27
2.4.3. Алергеност .....	28
2.5. Јавно мислење за безбедноста на ГМ храна.....	29
2.6. Законска регулатива за користење и ставање на промет на ГМО; Европска и национална рамка .....	32
2.7. Скрининг детекција на генетска модификација.....	34
2.7.1. Екстракција на DNA.....	34
2.7.2. Инхибитори на PCR реакција.....	36
2.7.3. Принципи на real-time PCR за скрининг на ГМ.....	38
2.7.4. Принципи на real-time PCR методот со TaqMan проби .....	39
2.8. Оптимизација и валидација на методи за скрининг детекција на генетски модификации .....	46
3.     ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА .....	50
4.     МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ .....	51
4.1. Материјал.....	51
4.1.1. Карактеристики на референтниот материјал.....	51



4.2. Методи .....	54
4.2.1. Екстракција на DNA .....	54
4.2.2. Одредување на концентрацијата, принос, чистота и структурна интактност на екстрахираната DNA .....	55
4.3. Оптимизација на метод за екстракција на DNA .....	56
4.4. Валидација на методот за екстракција на DNA .....	62
4.5. Скрининг на генетските модификации со real – time PCR .....	65
4.6. Оптимизација на параметри на real – time PCR .....	67
4.7. Валидација на аналитичкиот метод за скрининг на ГМО.....	72
4.8. Релативна квантификација .....	75
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	76
5.1. Оптимизација на екстракцијата на DNA .....	76
5.2. Валидација на С4 протокол за екстракција на DNA од пченка и соја со real- time PCR.....	94
5.2.1. Скрининг за присуство на <i>zein</i> и <i>lectin</i> ген.....	94
5.2.2. Амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот во DNA од пченка и соја екстрахирани со протокол С4 .....	97
5.3. Оптимизација на real-time PCR методот .....	107
5.3.1. Оптимизација на амплификација на 35S во singleplex и duplex реакција 109	
5.3.2. Амплификација на 35S промоторот во duplex PCR реакција.....	110
5.3.3. Оптимизација на амплификацијата на Tnos терминаторот .....	112
5.4. Валидација на real-time PCR методот .....	117
5.4.1. Применливост .....	117
5.4.2. Практичност .....	118
5.4.3. Специфичност .....	119
5.4.4. Специфичност на методот за 35S промоторот и Tnos терминаторот.....	120
5.4.5. Сензитивност .....	121
5.4.6. Релативна квантификација.....	127
6. ЗАКЛУЧОЦИ .....	129
7. ЛИТЕРАТУРА.....	131

## Листа на кратенки

Кратенка	Значење на кратенка / превод
ГМО	Генетски модифицирани организми
ГМ	Генетска модификација
DNA	Деоксирибонуклеинска киселина
Real-time PCR	Полимеразно верижна реакција во реално време
CaMV 35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S promotor / 35S промотор на Мозаичниот вирус на карфиолот
Tnos	Терминаторот на нопалин синтаза генот од <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CRM	Certified reference material/ Сертифициран референтен материјал
LOD	Лимит на детекција
LOQ	Лимит на квантификација
FAO	Food and agriculture organization/ Организацијата за храна и земјоделство
FDA	Food and drug administration / Управа за храна и лекови
qPCR	Квантитативна полимеразно верижна реакција (синомим за real-time PCR реакција)
UN	Обединети нации
WHO	Светска здравствена организација
EFSA	European Food Safety Authority / Европска агенција за безбедност на храна
EURL GMFF	Референтна лабораторија на Европската Унија за генетски модифицирана храна и храна за животни
ENGL	Европска мрежа на лаборатории за генетски модифицирани организми
SDS	Натриум додецил сулфат
СТАВ	Цетилтриметиламониум бромид
NaOAc	Натриум ацетат
EDTA	Етилендиаминотетраоцетна киселина
Tris HCl	Трис-(хидроксиметил)-аминометан <i>хидрохлорид</i>
ТЕ пуфер	Tris/ EDTA пуфер
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
RNAi	RNA интерференција
сгу протеини	Протеински кристални формации
ISAAA	International service for acquisition of agro-biotech applications
JRC	Joint Research Center
IRMM	Институт за референтни материјали и мерења, Белгија
NTC	No template control / негативна контрола
6FAM	6- карбоксифлуоресцеин
VIC	2'-хлоро-7' фенил-1,4-дихлоро-6-карбоксифлуоресцеин
QSY	Нефлуоресцентен квенчер
IPC	Internal positive control / Внатрешна позитивна контрола
ср	Број на копии на хаплоиден геном
SOP	Standard operating procedure / Стандардна процедура за работа

## 1. ВОВЕД

Во последниве децении современото општество се соочува со големи предизвици од аспект на обезбедување на доволна количина храна, како и на безбедна храна. Зголемената урбанизација, доведува до намалување на површините достапни за одгледување на земјоделски култури, кои секојдневно се користат во исхраната на човекот и животните. Истовремено, климатските промени и глобалното затоплување, во значителна мера го отежнуваат одгледувањето на земјоделските култури. Од друга страна, интензивниот пораст на светската популација, не оди во прилог на горенаведеното, што резултира со сè поголем број на гладни и недоволно ухранети. Од тие причини, една од целите на одржлив развој дадени од земјите членки на Обединети нации (UN) во 2015, беше постигнување на нула глад до 2030 година (FAO, 2020). Пред Covid-19 пандемијата, човештвото не беше на добар пат за постигнување на крај на гладот и неухранетоста во светот, така да пандемијата сега го направи тоа уште потешко. Според Извештајот на FAO од 2020 година, преваленцата на неухранетост за само една година се зголемила за 1.5%, достигнувајќи пораст од 9.9%, односно меѓу 720 и 811 милиони жители. Иако сè уште не може да се измери влијанието на пандемијата во 2020 година, новите проекции потврдуваат дека гладот нема да биде искоренет до 2030 година, доколку не се превземат сериозни мерки за забрзување на напредокот, особено за решавање на нееднаквоста во пристапот до храна.

Сето ова ја наметнува потребата од одгледување на култури на мала површина, со поголем принос и подобар нутритивен состав, како и култури кои ќе можат да опстанат и во неповолни надворешни услови. Секоја година пак сме соочени со драстично зголемени климатските промени кои резултираат со поплави, суши и ширење на болести кај растенијата, што претставува сè поголема закана за одгледувањето на голем број од тие култури. Значи дека во децениите што следат ќе биде сè потешко да се прехрани светската популација, што претставува голем предизвик за генетски модифицираните (ГМ) култури.

Со цел да се засее култура која ќе даде поголем принос, со поголема хранлива вредност, со истовремено намалена употреба на пестициди, особено на

инсектициди, како и да се ограничи дејство на токсичните хербициди, произведени се култури кои содржат генетски модификации. Со производството на ГМ култури отпорни на органофосфорниот хербицид глифосат, се овозможува зголемен принос на пченка, соја, памук, маслодајна и шеќерна репа и покрај употребата на глифосатот. За разлика од природните земјоделски култури, генетски модифицираните култури отпорни на инсектици, ја намалуваат употребата за истите, со што индиректно влијаат врз заштитата на животната средина. Покрај тоа, произведени се генетски модифицирани култури кои се отпорни кон различни болести, потолерантни на стрес фактори од различна природа, што им овозможува да опстојат во екстремни временски услови и да имаат продолжено време на складирање.

И покрај големата предност на генетски модифицираните култури, сепак кај потрошувачите е присутна загриженост од ризикот и несаканите последици од нивната употреба. Европската Унија (ЕУ) има воспоставено сеопфатна и строга правна рамка за да се осигури дека развојот на модерната биотехнологија се одвива во безбедни околности. Целите на таа правна рамка се заштита на здравјето на луѓето, животните и животната средина со проценка на безбедноста на ГМ храна преку највисоки можни стандарди, пред да се стави на пазар било кој продукт кој е генетски модифициран. Со Директивата 2001/18/ ЕС на Европската Комисија се регулира намерното ослободување на ГМО во животната средина, додека со Регулативите 1829/2003 и 1830/2003 се воведува задолжително обележување и следливост на храна и храна за животни кои содржат повеќе од 0,9% на одобрени ГМО.

Што се однесува до неодобрените ГМО, постои 0% толеранција. За таа цел, неопходен е прецизен и сензитивен метод за детекција и на мал процент на присутна генетска модификација во испитуваниот примерок. Постојат повеќе методи, но најефикасен е методот на полимеразно верижна рекација во реално време (real time PCR - Polymerase Chain Reaction). Овој молекуларен метод се заснова на скрининг детекција на таргетната (целната) DNA секвенца. За успешна амплификација на таргетната DNA секвенца, неопходна е екстракција на висококвалитетна DNA.

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

### 2.1. Што е ГМ храна?

Генетски модифицирани организми (растенија, животни или микроорганизми) се организми чиј генетски материјал (DNA) е променет на начин кој во природата не настанува спонтано со помош на природните методи на вкрстување (WHO, 2014). Оваа технологија, означена како генетски инженеринг, овозможува добивање на организам со посакувани карактеристики. Генетскиот инженеринг се заснова на инсертирање на ген од еден организам кој носи информација за посакувано својство, во друг организам. Доколку трансферот на гени настане помеѓу два организма од ист вид или се во блиска сродност и можат природно да се вкрстат, добиениот организам, односно организмот во кој е инсертиран ген се нарекува цисген. Тие содржат совршено целосна копија на природни гени со сите нивни регулаторни елементи. За разлика од цисгените, трансферот исто така може да биде меѓу организми од ист вид, но нивните гени може да се хибридизирани, односно да имаат генетски елементи од различни гени или локуси. Овие организми се означени како интрагени, и истите може да ја менуваат експресијата на одреден ген преку промена на промоторот или терминаторот (Basso и сор., 2019). Трансферот може да се случи и помеѓу организми кои не се во блиско сродство – трансгени. Пример за последниве е вметнување на ген од риба која живее во северните мориња, во спанаќ, компир и јагоди со што истите стануваат отпорни на мрзнење.

Најраната варијација на генетска трансформација ја вклучува употребата на бактеријата *Agrobacterium tumefaciens* што природно се наоѓа во почвата и претставува природен генетски инженеринг. Бактеријата *Agrobacterium tumefaciens* е одговорна за инфекции на рани кај некои растенија и формира туморален изросток. Туморалните формации се резултат на интеграција на DNA фрагмент од нејзиниот Ti (Tumor inducing) плазмид во јадрото на инфицираната растителна клетка (Halford и Shewry, 2000). Но, *Agrobacterium tumefaciens* природно ги инфицира само дикотилните растенија, така што житарките и другите економски значајни монокотилни растенија се недостапни за генетска манипулација. За таа цел, развиени се други директни методи на трансформација како, хемиски метод со полиетиленгликол, метод со протопласти, биолистичка

технологија (Vicini, 2017) итн. Во последната декада, е особено многу дискутирано за т.н. „технологии на уредување на геномот“ (Yin и соp., 2017). Сите методи предизвикуваат различни видови на промени, од точкасти мутации па сè до вметнување или бришење на поголеми фрагменти. Некои од овие технологии вклучуваат ZFN (zing-finger nuclease) технологија, ODM (oligonucleotide-directed mutagenesis), цисгеназа и интрагеназа, агроинфилтрација, RNA-зависна DNA метилација, обратно размножување и калемење на корен на ГМО. Пример, принципот на методот на RNA-зависна DNA метилација, вклучува супресија на некој ген (gene silencing) со метилација на DNA и/или хистон што значи дека DNA секвенцата останува непроменета. Со моменталните лабораториски методи не може да се определи дали метилацијата е природно настаната или е резултат на модификација со новите техники на размножување. Како резултат на тоа, производот на овие техники во моментот не може рутински да се детектира или да се идентификува (Lusser со соp., 2012).

Во тек се истражувањата за користење на понова технологија на модификација означена со акронимот CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) која претставува значајна можност за подобрување на производството на култури со редуција на дејството на биотските и абиотските фактори, како и потенцијално зголемување на приносот. Со оваа технологија настануваат промени на DNA во самиот вид на културата, додека со традиционалната генетска модификација има вметнување на DNA од различен вид или од друг сој на истиот вид. CRISPR технологијата до сега се покажала како успешна кај култури на ориз (*Oryza sativa*) и пченица (*Triticum aestivum*) кои се главна храна на најголем дел од популацијата на светот (Shan и соp., 2014).

## **2.2. Историјат - Прва произведена ГМ храна**

Прва генетски модифицирана храна, дозволена за хумана употреба е домотот означен како “Flavr Savr”. Тој е одобрен од страна на FDA (Управата за храна и лекови) за маркетинг во САД во 1994 година, а во 1996 се појавил за прв пат на пазарот во САД, а потоа е увезен и во други земји во Европа. Доматите биле користени за продукција на пире од домати, намалувајќи го отпадот и трошоците за производство. Овој домот има предност над немодифицираната

конкуренција во однос на подебелата конзистенција и пониската цена на продуктот. Покасно и други генетски модифицирани култури добиле дозвола за маркетинг како маслодајната репка со модифицирана содржина на масло, пченката модифицирана со *Bt* ген од бактеријата *Bacillus thuringiensis*, *Bt* модифициран памук, *Bt* модифициран компир, соја резистентна на хербицидот глифосат и други ГМ култури (Kamthan и сор., 2016). Глифосат-толерантните култури им овозможуваат на земјоделците користење на хербицид кој брзо се разградува, за разлика од токсичните и перзистентни хербициди. Со тоа се редуцира количеството на користени хербициди, почвата останува нетретирани во тек на зимскиот период, видно се редуцира ерозијата на почвата и губитокот на подземни води, како и обезбедување животен простор за инсектите и птиците. *Bt* генот од бактеријата *Bacillus thuringiensis*, во пченката е одговорен за синтеза на протеин ендотоксин, кој во дигестивниот систем на инсектите предизвикува перфорација на сидот на цревата. Перфорацијата доведува до излевање на цревната содржина во абдоменот, предизвикувајќи сепса и последователно на тоа смрт на инсектот. Со генетски инженеринг се овозможува подобрување на земјоделските култури со побрзо темпо, што доведува до брз развој на сорти со поголем принос, побогати нутритивни карактеристики, подобрена толеранција на биотските и абиотските фактори, односно поприлагодливи кон надворешните негативни влијанија.

И покрај значителната комерцијална вредност, сепак се јавуваат ограничувања поради скептицизмот на потрошувачите во однос на ризиците по јавното здравје, животната средина и безбедноста на трансгените култури. Како последица на стравот кај потрошувачите од вметнувањето на туѓа DNA во растителните култури, се развиле два алтернативни концепти на трансформација—цисгенезата и интрагенезата. Според двата концепти, растенијата мора да се трансформираат со генетски материјал кој потекнува од самите видови или блиски видови со кои е возможно и природно полово размножување, како и добивање на фертилно потомство.

## 2.3. Предности од употребата на ГМ храна

### 2.3.1. Подобрување на нутритивните вредности

Генетскиот инженеринг бил користен за подобрување на нутритивните вредности на растителните култури на неколку начини: со збогатување на културите со нови хранливи материи, со зголемување на количината на претходно присутни хранливи материи или со намалување, односно отстранување на антинутритивните токсини. Пример на збогатување со нови хранливи материи е продукцијата на т.н. „златен ориз“ во кој бил вметнат ген одговорен за синтеза на  $\beta$ - каротен како прекурсор на витаминот А (Ye и сор., 2000). Недостатокот на витамин А во оризот, како една од најчесто користените култури во светот, особено во Азија, е главна причина за појава на ноќно слепило (West, 2002). Од тоа причини, истражувањата за биофортификацијата се развиле во правец на создавање на супер банани со зголемена количина на  $\beta$ - каротен, чија предност во однос на оризот се состои во стерилноста на бананите, со што се спречува ризикот за трансфер на трансгените (Mlalazi и сор., 2012). Што се однесува до есенцијалните аминокиселини присутни во протеините од сојата, се смета дека по квалитет се еквиваленти на казеинот и белката од јајцето, освен недостатокот на аминокиселини кои содржат сулфур, како што е метионинот. Значителен напредок во зголемувањето на содржината на аминокиселини со сулфур е постигнат со експресија на генот за новосинтетизируваниот протеин MB-1 (Milk Bundle) и подобрената варијанта MB-16 со поголема термостабилност и протеазна резистентност. Овој ген е инсертиран во геномот на сојата со помош на промоторот CaMV 35S (Zhang и сор., 2014). Подобрувањето на квалитетот на компирот преку поголем раст и зголемена содржина на вкупни протеини, особено на есенцијални аминокиселини е постигнато со вметнување на генот одговорен за синтеза на албуминот AmA1 од *Amaranthus hypochondriacus*, кој по природа не е алерген и е богат со есенцијални аминокиселини (Chakraborty и сор., 2000).

Полинезаситените масни киселини како еикосапентаноична киселина (EPA) (20:5,  $\omega$ -3) и докосахексаноична киселина (DHA) (22:6,  $\omega$ -3) се основни компоненти на клеточните мембрани и важни фактори на човечкото здравје. Тие имаат важна улога во регулацијата на инфламаторните имуни реакции, а со тоа се значајни за здравјето на кардиоваскуларниот систем, за фетален развој на мозокот



и развојот на когнитивните функции во раниот постнатален период од животот (Hashimoto и сop., 2017). Алфалиноленската киселина (ALA) (18:3,  $\omega$ -3) е прекурсор за синтеза на EPA и DHA. Истражувањата на Petrie и сop., 2020, биле насочени во создавање на маслодајна репка со количина на DHA од 9-11%, слично на количината на оваа полинезаситена масна киселина во рибино масло.

Преваленцата на неухранетост останува голем проблем за јавното здравје во неразвиените и земјите во развој. Несоодветното внесување на клучни микроелементи означено како „скриен глад“, е глобален проблем кој влијае на околу 2 милијарди луѓе, а 30-40% од тоа е предизвикано од недостаток на железо (Ludwig и Slamet-Loedin, 2019). Биофортификацијата на храната со микронутриенти е најпрактичен начин на спречување на недостаток на нутриенти, но тоа не е изводливо за секоја хранлива материја, особено за железото, ниту е одржливо заради трошоците неопходни за истражувања. Истражувањата за зголемување на количината на железо во ендоспермот на семето се развиле во насока на експресија на лактоферин и феритин, железоврзувачки протеини во оризот (Nandi и сop., 2002; Aluru и сop., 2011). Истражувањата на Masuda и сop. (2013), покажале четирикратно зголемување на концентрацијата на железо преку вметнување на соин - феритин ген водено од два ендосперм-специфични промотори, заедно со генот за никотинамид синтаза од јачмен, два никотинамин аминотрансфераза гени и ген за синтеза на мугинска киселина (фитосидерофор и железо хелатор).

### **2.3.2. Намалување на антинуутриентите**

Растенијата како одговор на надворешни неповолни влијанија создаваат секундарни метаболити како одбранбен механизам за преживување. Тие соединенија уште се означени и како антинуутриенти или природни токсини кои можат да бидат штетни доколку се користат од животните или луѓето. Пример е фитинската киселина која е широко распространета во житарици, мешунки и маслодајни семиња која дејствува како главен хелатор на микроелементите. Со генетски инженеринг може да се постигне целосно губење на функцијата (knockout) или намалена експресија на гени за продукција, акумулација и активација на антинуутриентите во растенија. Апсорпцијата на железото од

пченица и пченка може да се зголеми преку експресија на термостабилен рекомбинантен ензим фитаза од габата *Aspergillus fumigatus* (Brinch-Pedersen и сор., 2006; Chen и сор., 2008). Друг пристап на намалување на фитинска киселина со експресија на фитаза, а од друга страна и зголемување на апсорпцијата на железо, е со супресија („silencing“) на гени за биосинтезата на миоинозитол посредувано преку iRNA (Aluru и сор., 2011). Како резултат на синтезата на феритин како показател на биорасположливото железо, трансгената пченка од Ipa1-1 линија покажала сигнификантно зголемување на железото во споредба со немодифицираната контрола. Иако бројни студии покажуваат негативна корелација меѓу количината на фитати и биорасположливоста на железо, сепак тешко е да се протолкува користа од експресијата на фитаза, бидејќи главните култури подлежат на термичка обработка па забележано било сигнификантно губење на активноста после 20 минути варење на ориз и пченица (Lussa и сор., 2002; Brinch-Pedersen и сор., 2006).

Друг антинутриент кој е особено присутен во лиснат зеленчук, житарки, овошја и мешунки, е и оксалната киселина. Иако кај бактериите, габите и растенијата постои метаболички пат за разградување на оксалната киселина, кај хуманата популација тој недостасува. Откако ќе се внесе во организмот преку храната, оксалната киселина мора да се елиминира преку бубрезите. Долготрајната употреба на храна со голема количина на оксална киселина, предизвикува примарна или секундарна хипероксалурија резултирајќи со нарушувања на бубрежната функција, и на метаболизмот на глицин, намалена можност за коагулација на крвта (Chakraborty и сор., 2013). Дополнително, оваа киселина се таложува како калциум оксалат во форма на бубрежни камчиња и хипокалцемија (Williams and Wandzilak, 1989) кои влијаат врз намалување на апсорпцијата на калциумовите јони во тенкото црево. Затоа, истражувањата на Chakraborty и сор. (2013) биле насочени кон продукција на домат (*Solanum lycopersicum*) со намалена количина на оксална киселина, преку експресија на оксалат декарбоксилаза, ензим кој оксалната киселина ја раградува до мравска киселина и јаглерод диоксид (Reinhardt et al., 2003), а потекнува од габата *Flammulina velutipes*. Трансформација на *FvOXDC* генот била посредувана од *Agrobacterium tumefaciens* во селективен медиум со канамицин и под контрола на овошно-специфичен E8 промотор. Оваа трансформација резултирала со редукција

до 90 % на оксална киселина во трансформираните плодови. Во друго истражување спроведено од Kumar и сор. (2016), авторите го модифицирале семето од соја (*Glycine max*), во правец на редукција на оксална киселина до 73%, заедно со зголемена количина на микроелементите калциум, железо и цинк во семето. Истовремено оваа соја поседувала и зголемена толеранција кон патогената габа *Sclerotinia sclerotiorum* за која е неопходна оксална киселина при колонизација.

### 2.3.3. Редукција на алергените протеини

Една од главните причини за загриженост на критичарите на генетскиот инженеринг била и алергениот ефект на новосинтетизираните протеини во ГМ култури. Но спротивно на ова, било докажано дека токму преку методите на генетскиот инженеринг можат да се отстранат природно присутните алергени во некои култури (Herman и сор., 2003). Пример за тоа е редукција на два високо молекуларни глобуларни протеини од 52 kDa и 63kDa од групата на гликозидази, кои се високо експресирани во семе од ориз и се смета дека тие се главните причинители на алергија од ориз (Satoh и сор., 2011). Оризот со RNAi (RNA интерференција) супресија на гени за тие протеини, бил вкрген со трансгеничен ориз со намалена количина на главните алергени и при анализа на серумот од алергични пациенти било забележано ниско ниво на врзување на IgE антителата. Тоа претставува доказ дека овие трансгени соеви на ориз се безбедни за користење од страна на пациентите кои имаат алергија и тоа не само од главните алергени на оризот (Ogo и сор., 2014).

Пченицата од освен што од една страна е главна житарка во поголем дел од Светот е главен извор на растителни протеини, од друга страна е предизвикувач на сериозен здравствен проблем како целијакија. Тоа е автоимуно заболување кон епитопите на пченица, јачмен и 'рж и секоја експозиција кон протеинот глутен води до болно хронично оштетување на микровилите на тенкото црево и трајна интолеранција кон проламините во храна. Продукцијата на пченица без глутен за таа категорија на луѓе, бил предизвик за Wen и сор. (2012) кои вршеле супресија на транскрипцискиот активатор DEMETER (DME) преку RNA интерференција. DME го катализира ослободувањето на 5-метилцитозин од

DNA со механизам на гликозилација, со што предизвикува деметилација на промоторите на глијадин и глутенин со мала молекуларна маса во ендоспермот на пченицата. Со тоа се супресира транскрипцијата на овие два протеини кои се главен извор на имуногени епитопи. Резултатите на овие истражувања покажуваат и до 76,4% намалување на количината на имуногените проламини со што се дава надеж на развивање на сорти од пченица соодветни за пациенти со целијакија.

Една од најсериозните алергии од храна е алергијата кон кикирики. Преку генетски инженеринг Dodo и сор., (2008) успешно вршеле елиминација на имунодоминантниот Ara h 2 протеин од кикирики со помош на RNAi интерференција. Алергеноста на трансгените кикирики тестирана со Western имуноблотинг, покажала недостаток на Ara h 2 протеинот во суров екстракт на неколку трансгени семиња од регенерирани T<sub>0</sub> растенија. Намален капацитет на врзување на IgE антителата кај селектираните трансгени семиња во споредба со дивиот сој на кикирики е забележан кај пациенти со алергија кон кикирики. Тоа е доказ дека со супресијата на гени со RNAi може да се ублажи алергеноста на кикириците.

Биотехнологијата во иднина ќе овозможи решение за проблеми со алергијата преку развој на хипоалергични или култури без алергени. Овие генетски модифицирани култури ако бидат комерцијализирани ќе ги решат проблемите со алергијата и ќе ја намалат неухранетоста во земјите во развој.

#### **2.3.4. Толерантност кон абиотички стрес фактори**

Влијанието на високите температури и сушата како главни абиотички стрес фактори се очекува да се зголеми со оглед на трендот на промена на климатските услови. Во извештајот на Меѓувладиниот панел на Климатски Промени даден во 2019 година, наведено е дека температурата на воздухот и површината на океаните е зголемен за 1.5 °C во споредба со прединдустриското ниво а зголемена е и концентрацијата на гасови на „стаклена градина“ (IPCC, 2019). Според извештајот даден од Светската Метеоролошка Организација, целосното затворање поради пандемијата со COVID-19 предизвикало намалување на антропогената емисијата на гасови на „стаклена градина“ особено во урбани

средини, но сепак тоа нема да има видлив ефект во глобалното ниво на CO<sub>2</sub> во атмосферата, бидејќи тоа намалување е помало или приближно исто со природната варијабилност на CO<sub>2</sub> од година во година (WMO, 2020). Климатските промени доведуваат до намалено производство на растителни култури и ја намалуваат безбедноста на храна на глобално ниво. Според податоците на Daryanto и сор., 2016, намален принос од 40% кај пченката и 21% кај пченицата било забележано при намалување на достапност на вода до 40%. Последиците од недостаток на доволна количина на вода се зголемен оксидативен стрес со продукција на слободни радикали на кислород (ROS) во растението (Sohag и сор., 2020) редуција на фотосинтетските карактеристики (Guo и сор., 2018) со прекин на транспорт на енергија од фотосинтетскиот систем PSII во фотосинтетскиот систем PSI (Siddique и сор., 2016) и намалена флуоресенција на хлорофил поради намалување на сунѓерестото ткиво на листовите (Wang и сор., 2018). Растенијата кои се развиваат при повисоки температури обично имаат потенки листови и поголема површина (Poorter и сор., 2009). Додека листовите кои се развиваат при недостаток на вода имаат помали клетки и погусто наредени стоми (Shahinnia и сор., 2016). За избегнување на дехидратацијата, растенијата опстојуваат со помош на различни физиолошки и морфолошки механизми, како намалување на транспирацијата со затварање на стомите под дејство на абсцисинска киселина, со таложеење на кутикуларни восоци или забавување на животниот циклус на растението и сл. (Martignago и сор., 2020).

Толеранцијата кон суша е комплексна карактеристика која е под контрола на голем број на гени, затоа е тешко да се откријат молекуларните и физиолошките механизми (Khan и сор., 2020). Првата биотехнолошки произведена култура која се појавила на пазарот со подобрена резистентност кон суша како резултат на намалена сензитивност кон етилен и одложено стареење, била означена како HB4<sup>®</sup> Drought Tolerance Соја (Bergau, 2019). HB4 е модифицирана верзија на транскрипцискиот фактор HaHB4 од сончогледот (*Helianthus annuus*), кој е под контрола на нативниот соја HaHB4 промотор индуциран при стрес. Интересен е фактот дека HB4 конструктот кој се експресира кај сојата овозможува зголемен принос и при услови на ограничена достапност и со доволна количина на вода. Успехот на HB4 конструктот зависи од пронаоѓање

на промотори кои повеќе се чувствителни на суша отколку пронаоѓање на конститутивни силни промотори (Martignago и сop., 2020).

Преку различен пристап за биотехнолошко производство на култури резистентни на суша, Monsanto пронашле начин на експресија на бактериски ладен шок протеин B (CSPB-Cold Shock Protein B) во пченка под контрола на конститутивен промотор на ориз ACTIN1. Трансгените покажале зголемување на приносот за 6% и намалување на површината на листовите кое води до поефикасно искористување на водата во услови на суша (Castiglioni и сop., 2008). На овој принцип била создадена првата биотехнолошки подобрена култура - пченка толерантна на суша означена како Genuity™ DoughtGart™ од страна на Monsanto (MON-87460-4) (ISAAA, 2019a). Друга стратегија на постигнување на производство на култури отпорни на суша биле експериментите во кои се менувал бројот, големината и регулацијата на стомите кај *Arabidopsis thaliana* преку сигнален пат на абсцисинска киселина кои резултати би можеле да се применат и во други култури (Bertolino и сop., 2019). Во истражувањата на Nelson и сop. (2007) на *Arabidopsis thaliana* било забележано подобрена стапка на преживување на трансгените растенија со експресија на нуклерниот фактор Y - AtNF-YB1. Од друга страна, хомологот на AtNF-YB1 во пченката означен како ZmNF-YB2, покажал подобрување на стапката на преживување на трансгените пченки но само при експериментални услови во стаклена градина и при теренски испитувања. Иако покажувале ветувачки резултати за зголемување на приносот дури за 50 % во услови на суша но сепак не се комерцијализирале бидејќи нивниот принос бил негативно засегнат во услови на снабдување со доволна количина на вода.

Друга стратегија за добивање на култури резистентни на суша биле експериментите со карактеристиките на коренот, како главен орган за абсорпција на вода каде се забележуват првите знаци на дехидратација на растението. Правилниот раст и развој на коренот е регулиран од класа на растителни хормони – брасиностероиди (Lamaoui и сop., 2018). Затоа експериментите на метаболизмот и сигнализацијата на брасиностероидите била цел на истражувања на одговорот на коренот при услови на суша (Singh и Savaldi-Goldstein, 2015; Planas-Riverola и сop., 2019). Единствениот мутант кој е широко користен во земјоделството е *uzzi* мутантот на јачмен, кој има супституција на една аминокиселина во BR

рецепторот HvBRI1, хомолог на BR брасиностероид несензитивен-1 рецепторот на *Arabidopsis* (BRI1) кој се манифестира со цуцест фенотип. Но според сознанијата на Chen и сор. (2017) тројниот мутант на *wrky46*, *wrky54* и *wrky70* на позитивниот регулатор, WRKY транскрипцискиот фактор на *Arabidopsis* покажува резистентност кон суша. Биосинтетските цуцести или полуцуцести мутанти се покажале како толерантни на суша (Beste и сор., 2011). Постојат литературни податоци за обиди на истражувања кај ориз и трансгени *Arabidopsis* растенија со индуциран раст на коренот преку зголемена експресија на транскрипциски фактори кои ја контролираат градбата на коренот (Redillas и сор., 2012; He и сор., 2016) со PEG третман на поделен коренски систем кај сојата (Iqbal и сор., 2019) или транскрипциски фактори кои стимулираат таложење на кутикуларен восок и суберин (Legau и сор., 2016), со цел добивање на култури кои ќе ги надминат престојните проблеми предизвикани од климатските промени.

### 2.3.5. Резистентност на инсекти

Освен неповолните абиотички фактори, негативно влијание врз приносот на културите имаат и патогените организми кои предизвикуваат губиток на глобалниот принос за 10 до 16% (Chakraborty и сор., 2011). Потенцијалните гени со кои што може да се експериментира за да се добие резистентност кон широк спектар на бактерии и фунги се поделени во две групи. Во првата група се растителни или патогени гени кои можат да индуцираат имун одговор на растението и обично ги кодираат рецепторите на имуниот одговор. Во втората група, се вклучени растителни или егзогени гени кои поседуваат антимикуробна или антивирусна активност. Предноста на втората група на гени е дека тие делуваат директно против патогените без активирање на имуниот одговор на растението со што се избегнува дополнителното енергетско оптоварување на растението (Salomon и Sessa, 2012). Бројни гени за природни и синтетички сгу протеини, протеаза инхибитори, трипсин инхибитори и гени за цистатин се користат за вметнување на отпорност на инсекти и нематоди кај трансгените растенија (Parmar и сор., 2017).

*Bacillus thuringiensis* се грам позитивни бактерии кои за време на спорулација продуцираат протеински кристални (Cry) формации. Тие исто така

продуцираат и цитотоксини кои делуваат заедно со Cry токсините. Cry протеините се токсични за инсектите (особено за Lepidoptera), но се нетоксични за човекот и животните (BANR, 2000). Откако ќе бидат внесени во организмот на инсектите, тие се раствораат и се разложуваат од протеазите во дигестивниот систем. Некои од формираните протоксични полипептиди се поврзуваат со рецепторите на цревните епителијални клетки формирајќи пори на апикалните мембрани со што предизвикуваат оштетување на цревното ткиво, доведувајќи до бактериска септикемија и угинување на ларвите (Gahan и сор., 2010; Raymond и сор., 2010; Gomez и сор., 2014). Токму поврзувањето на cry токсините со рецепторите ја одредува нивната специфичност (Bravo и сор., 2007). Тие се високо селективни и имаат тесен спектар на активност (Naranjo, 2011).

Придобивките од користење на *Bt* растенијата во земјоделство се: поефикасна контрола на инсекти-штетници, намалување на употребата на инсектициди како и биолошка контрола на системот за интегрирано управување со штетници кое овозможува и поодржливи земјоделски практики (Martin-Salles и сор., 2017).

Постојат литературни податоци дека некои *Bt* пченки се трансформирани со *cry1Ab*, *cry1Ac* и *cry9C* гени за заштита од *Ostrinia nubilalis* и *Sesamia nonagroides*, со *cry1F* ген за заштита од *Spodoptera frugiperda* или со *cry3Bb*, *cry34Ab* и *cry35Ab* гени за заштита од коренски црви од родот *Diabrotica* (Tohidfar и Khosravi, 2015). Исто така и *Bt* компирот заштитен од *Leptinotarsa decemlineata* кој го содржи *cry3Aa* генот и комерцијално е засаден во Северна Америка и Европа (Coombs и сор., 2002). Друга култура за контрола за заштита од *Leucinodes orbonalis* е *Bt* модриот патлиџан кој прв пат е комерцијализиран во Бангладеш во 2014 година (ISAAA, 2018). Може да го споменеме и *Bt* оризот кој како *Bt* култура може да даде 60% поголем принос (Wang и сор., 2010) и користење на 80% помалку пестициди во споредба со конвенционалните сорти (Jin и сор., 2019). И покрај тоа што *Bt* оризот ги поминал сите детални испитувања за термичката стабилност, токсичноста, дигестибилноста, алергеноста на cry протеините и нутритивната содржина (Li и сор., 2014), сепак неговата комерцијализација во Кина била одложена поради отпорноста и неприфаќањето од широката јавност на ГМ храна (Chen и сор., 2014). Од тие причини Кина станува најголемиот увозник на ориз во светот (NBSC, 2018). Успешни



модификации на сојата имало при неколку истражувања со вметнување на *cryIAb Bt* ген (Parrot и сор., 1994) со синтетички *Bt cryIAc* (tic 107) ген (Stewart и сор., 1996) со експресија на синтетички *cryIAc* ген каде се покажало дека експресијата на овој конструкт во сојата дава соодветно ниво на резистентност кон одредени лепидоптери (Walker и сор., 2000). *Bt* сојата била развиена со комбинација на генетските модификации MON877011 (со експресија на *CryIAc* протеинот) и MON 89788 (со толерантност кон глифосат) (Cui и сор., 2015).

Друга стратегија на постигнување резистентност кон инсектите било преку растителните инхибитори на протеази кои интерферираат со протеолитичката активност во дигестивниот систем на инсектите. Серин и цистеин протеазните инхибитори се најчесто распространети во растителните семиња и ткивата за складирање кои придонесуваат за природна заштита од инсектите (Reeck и сор., 1997). Специфичен цистеин – протеазен инхибитор од оризот, *orzyacystatin 1* (OC1) бил успешно вметнат во различни култури како ориз, пченица, маслодајна репка и модар патлиџан, со што им овозможил заштита од напад на колеоптери и лисни вошки (Tohidfar и Khosravi, 2015). Според податоците на Oksman-Kaldentey и Barz. (2002) одреден вид *Bt* пченка со резистентност на инсекти означена како *Bt-Xtra* била создадена со комбинација на три гени, вклучувајќи *cryIAc* ген од *B. thuringiensis*, *bar* ген од *Streptomyces higroscopicus* и протеаза инхибитор од компир (*pinII*). Од друга страна, во тек на вегетативниот раст некои видови на *Bacillus* како и *Bacillus thuringiensis*, создаваат друг тип на токсини означени како VipA3. Во споредба со *Cry* токсините, тие се врзуваат за различни рецептори и не мора да бидат растворени пред делување во дигестивниот систем на инсектите (Lee и сор., 2006).

### 2.3.6. Резистентност кон фунгални патогени

Растот на патогените фунги може успешно да се инхибира под дејство на ензимите хитиназа и  $\beta$ -1,3-глюконаза кои би ги хидролизирале хитинот и глуканите како главни градбени единици на клеточниот ѕид на патогените фунги како што е *Rhizoctonia solani* (Neuhaus, 1999). Можноста за трансфер на ген за хитиназа резултирало со зголемена резистентност кон фунгалните инфекции кај различни растенија како кај лозата (Yamamoto и сор., 2000), кикириците (Rohini и

сop., 2000) и памукот (Tohidfar и сop., 2012), додека со комбинирани експресија на хитиназа и глуканаза, Melchers и сop. (2000) успеале да добијат трансгени моркови, домати и тутун со заштита од развојот на фунгални инфекции.

Друг пристап на постигнување на резистентност кон фитопатогените организми бил трансферот на ген за хуман лактоферин (hLf) во геномот на домати со посредство на *Agrobacterium*. Лактоферинот е железо-врзувачки протеин кој е дел од хуманиот вроден неспецифичен имунолошки систем кој покажува антиинфламаторна, антиканцерогена, антивирусна, бактерицидна и фунгистатична активност. Имено, трансгените домати (*L. esculentum*) кои биле создадени во тек на истражувањето на Buziashvili и сop. (2020) покажале резистентност на бактериски фитопатогени како *R. solanacearum* како и на фунгалниот патоген *P. infestans*. Затоа интеграција на овој ген во геномот на комерцијално значајни култури може да ја зголеми резистентноста кон фитопатогените како бактериите, вирусите и фунгите (Yemets и сop., 2014; Buziashvili и сop., 2020), додека резистентноста кон вируси најчесто е постигнато со вметнување на секвенци на генот од патогените вируси во геномот на културата со супресија на гени преку antisense RNA и RNAi техники (Ramesh и сop., 2007).

### 2.3.7. Толерантност кон хербициди

Во земјоделството, присуството на плевел е голем проблем, бидејќи тој агресивно се натпреварува со културите за хранливи материи, вода, простор, светлина и други важни ресурси за раст и развој. Тоа се генерално издржливи видови со брз раст, со длабок коренски систем кои имаат негативно влијание врз растот и приносот на земјоделските култури. Затоа со глобалниот пораст на побарувачка за храна се јавува потреба од користење на хербициди чија што технологијата во последните декади дава голем придонес. Но, прекумерната употреба на еден хербицид повеќе пати во сезоната на растење го зголемува потенцијалниот ризик за еволуција на резистентен плевел, што претставува и главен проблем во земјоделството ширум светот. Од друга страна, високите дози на аплицирани хербициди се голема закана за контаминација на животната средина. За избегнување на овие проблеми, приоритет на земјоделските програми

е создавањето на трансгени култури отпорни на два или повеќе хербициди. Агробиотехнолошките компании како Monsanto, Pioneer, Dow, Bayer и Syngenta предложиле да се воведат повеќе карактеристики за толеранција на хербициди кај земјоделските култури покрај толерантноста кон глифосат (Bonny, 2016). Создавањето на првата соја со карактеристика на резистентност кон глифосат во 1996 година, отвори нов начин на управување со плевел кај земјоделските култури. Иако брзо биле прифатени од страна на земјоделците, сепак продолжуваат да бидат предмет на контроверзии. Особено важна тема за дебата беше нивното влијание врз употребата на пестициди. Некои автори трдат дека овие култури предизвикуват намалување на употребата на хербициди додека други го потврдуваат спротивното. Во првите години од нивното појавување на пазарот, културите толерантни на хербициди доведоа до одредено намалување на употребата на хербициди. Но, садењето на исти глифосат-толерантни култури и користење само на глифосат на исти земјоделски површини, довело до појава на глифосат-резистентен плевел. Тоа доведува до пораст на употребата на глифосат и други хербициди (Bonny, 2016; Fartyal и сор., 2018).

## **2.4. Потенцијални опасности / ризик од употреба на ГМО**

### **2.4.1. Антибиотска резистентност**

Кај генетски модифицираните култури од прва генерација, гените кои кодираат резистентност кон специфичен антибиотик, широко се употребуваат за селекција и брза идентификација на трансформираните клетки. Маркер гените на антибиотска резистентност, под контрола на регулаторните секвенци на растението, се трансферираат и се експресираат во растението заедно со генот од интерес. Маркер генот им овозможува на трансформираните клетки да преживеат во медиум кој го содржи соодветниот антибиотик, додека нетрансформираните клетки не можат да се регенерираат, односно умираат. Откако ќе бидат селектирани генетски модифицираните клетки и ќе се создаде генетски модифицирана култура, маркер гените остануваат во растението иако повеќе не служат за таа цел. Најчесто користени маркер гени се два гени на *Escherichia coli*: *nptII* кој го кодира ензимот неомицин фосфотрансфераза кој дава отпорност кон аминокликозидните антибиотици неомицин и канамицин и *hpt* кој го кодира

ензимот хигромицин фосфотрансфераза кој дава отпорност кон хигромицин (Breuer и сор., 2014). Аминогликозидните антибиотици од родот *Streptomyces*, ги уништуваат нетрансформираниите клетки со блокирање на синтезата на протеини преку врзување за 30S рибозомите на бактеријата и хлоропластите или митохондриите, додека хигромицинот В ги уништува нетрансформираниите клетки преку спречување на поврзувањето на tRNA со рибозомите на прокариотите и на еукариотите (Ahmad и Mukhtar, 2017).

Сепак, содржината на DNA што кодира ген за резистентност која би била внесена со храна е екстремно многу мал дел (0.00005%) од 0.1 до 1g DNA која се консумира преку нормална исхрана во текот на денот. И секако, таа ќе биде подложена на разградување во дигестивниот тракт како и останатата DNA од храната (Oliver, 2014). Ризикот од внесување на селективните гени за антибиотик се согледува во принцип на вметнување или во DNA на самиот организам кој што ги конзумираше или од микрофлората во дигестивниот тракт што кај нив би довело до појава на антибиотска резистентност. Но и при процесирање на храната, како и при дигестија на истата во дигестивен тракт, DNA се разградува до многу мали фрагменти, така што веројатноста цели гени да останат интактни е многу мала. Нема податоци дека DNA апсорбирана преку тенкото црево би можела да биде интегрирана во микрофлората на човекот или животните.

#### **2.4.2. Хоризонтален трансфер на гени**

Хоризонталниот трансфер на гени е стабилен трансфер на генетски материјал од еден организам во друг, без репродукција или интервенција од човечки фактор. Трансферот се случува со пренос на генетскиот материјал од донорот, кој ги поминува клеточните бариери и потоа се инкорпорира во геномот на организмот примател. Најчесто хоризонталниот трансфер вклучува трансмисија на гени во вируси или мобилни генетски елементи. Хоризонталниот трансфер за прв пат стана прашање од јавен интерес во 1970 год. со истражувањата на природниот трансфер на гените за антибиотска резистентност помеѓу патогените бактерии или покасно со комерцијална продукција на ГМ култури. Но сепак, фреквенцијата на трансфер на гени од растенијата кон другите прокариоти или еукариоти е екстремно ниска. Почести се случаи на хоризонтален

трансфер во вируси, но и тоа се случува под строги притисоци за селекција. Хоризонталниот трансфер од ГМ култури представува незначителен ризик за здравјето на луѓето и животната средина. Но сепак постојат и контрадикторни согледувања во однос на ризикот од хоризонтален трансфер на гени од ГМ култури, прикажани во отвореното писмо на Mae-Wan Ho (2014) упатено до Kaare Nielsen како член на панелот за ГМО во склоп на Европската агенција за безбедност на храна (EFSA), дека проблемот со хорионталниот трансфер на гени од ГМ култури наликува на „слон во соба“ и регулаторните агенции не треба да замижат пред оваа потенцијална закана.

### 2.4.3. Алергеност

Главните причини за загриженост на потрошувачите за негативните ефекти на ГМ храната врз нивното здравје се трансферот на антибиотска резистентност, токсичноста и алергеноста на новосинтетизираните протеини. За проблемот со алергеноста постојат две гледни точки. Прво, може да се трансфер на познат алерген во култура која не предизвикува алергиска реакција. Таков бил случајот со вметнување на генот за 2S албумин од бразилски орев во соја со цел зголемување на концентрацијата на аминокиселините со сулфур но не биле комерцијално развиени поради алергеноста на 2S албуминот (Nordle и сор., 1996). Нешто слична била и судбината на трансгената соја со зголемена количина на цистеин и метионин за 30% и 19%, соодветно, со вметнување на 7-kDa гама-зеин, но поради алегерноста на протеинот и овој трансген не бил комерцијализиран (Krishnan и сор., 2010). Втората гледна точка е воведувањето на нов протеин во синцирот на исхрана што може да експресира нов алерген и да доведе до нова алергиска сензибилизација кај луѓето, доколку постои структурна хомологија со познати алергени. Но, не е доволно јасно и тешко може да се предвиди, зошто на некои протеини се јавува алергиска сензибилизација, а на некои не се јавува. Од аспект на физичко-хемиските карактеристики на алергените, најголем дел од нив се гликопротеини со молекулска маса поголема од 10.000 Da. Во споредба со растителните протеини, алергените протеини се постабилни во однос на дигестијата, протеолизата, хидролизата, промената на рН и температурата. Основен пристап за предвидување на алергеноста е преку анализа на храната во оглед на изворот од кој е добиен новиот ген, *in silico* споредување на

аминокиселинската секвенцата на новиот протеин со секвенцата на познати алергени, *in vitro* тестови за мерење на капацитетот на врзување на новиот протеин со IgE антитела од серум на алергични индивидуи како и мерење на отпорноста на разложување со протеолитичкиот ензим пепсин.

## 2.5. Јавно мислење за безбедноста на ГМ храна

Резултатите од анкетањето во САД, Канада, Белгија, Франција и Австралија спроведено од Shew и сор. (2018) укажуваат на присутен скептицизам кај јавноста кон конвенционалниот начин со употреба на комерцијално достапни хербициди, во однос на употребата на храна добиена со генетска модификација со CRISPR технологија и модерна земјоделска биотехнологија. Овој податок дава надеж во намалување на отпорот кај јавноста, во врска со употребата на земјоделската биотехнологија и комерцијализација на CRISPR продуктите (Shaw и сор., 2018).

Од друга страна, Pew Research Center спровел истражување како дел од студија за разбирањето и ставот на јавното мислење за употребата на генетски модифицираната храна во хуманата исхрана (слика 1). Истражувањето било спроведено во 20 земји од Европа, Русија, Америка и дел од Азија, во период од октомври 2019 до март 2020. Според резултатите на анкетата, кај скоро половина од сите 20 земји, 48% од популацијата смета дека генетски модифицираната храна е небезбедна за користење, додека само 13% од населението имаат позитивен став. Мнозинството во земјите како Русија (70%), Италија (62%), Индија (58%) и Јужна Кореа (57%) мислат дека ГМ храната генерално е небезбедна за консумација. Испитувањата на јавното мислење покажуваат дека доминира негативниот став дури и на места каде процентот на луѓето кои велат дека не знаат доволно за ГМ храна е голем. Еден таков пример е Шпанија каде 47% мислат дека ГМ е небезбедна, само 13 % мислат дека е безбедна додека 39% мислат дека немаат доволно познавање за да дадат мислење во врска со безбедноста на ГМ храна. Најголеми скептици во овој поглед биле Јапонците, каде 51% од испитуваното население се изјасниле дека немаат доволно информации за да можат да завземат став во однос на тоа прашање (Kennedy и Thigpen, 2020).



Слика 1. Резултати од анкета спроведена од Pew Research Center за безбедноста на генетски модифицирана храна во период 2019-2020. International Science Survey 2019-2020. Q20. “Science and scientists held in esteem across global publics”.

Иако новите технологии тврдат дека се побезбедни од другите техники на генетска модификација, сепак секоја техника на уредување на гени носи во себе и ризици, и неизвесности. Според извештајот даден од Janet Cotter и сор., (2020) активист на Logos Environmental UK организација, тврди дека „научните докази покажуваат дека уредувањето на гени, особено кај животните е далеку од прецизно“. Наместо тоа, може да предизвика несакани промени во генетскиот материјал и да ги наруши генетските процеси. Ваквите ефекти може да имаат сериозни последици по безбедноста на храната така што нивата апликација ќе бара строга проценка на ризикот дококу се користат во земјоделството (Cotter и сор., 2020 ). Таков бил случајот со компанијата Okanagan Specialty Fruits (OSF) од Канада кои произведуваат генетски модифицирани јаболка од сортата Златен делишес и Green Smith означени само како „Arctic Apple“ а не и како ГМ храна. Процесот на трансформација вклучува супресија на активноста на ген кој кодира синтеза на ензимот полифенол оксидаза, па како резултат на тоа, јаболкото има

подолг век на траење и не потемнува при оксидација. Но, одгледувањето на таквите јаболка се врши само во САД, а не и во Канада. Сеуште се дискутира за користење на новите техники на уредување на геномот, односно дали да важат за нив постоечките закони за ГМО или ќе требаат дополнителни измени.

Последните години постојано се зголемува бројот на генетски модификации кои се комерцијализираат на светско ниво (James и сор., 2012, ISAAA., 2019b). Површината на земја посеана со генетски модифицирани култури е зголемена за 112 пати (од 1,7 милиони хектари во 1996 година кога се комерцијализираа ГМ култури, до 190,4 милиони хектари во 2019, одгледувани во 29 земји). Петте земји кои сејат 91% од таа површина се САД, Бразил, Аргентина, Канада и Индија. Мал пад од 0,7% е забележан во период меѓу 2018 и 2019 година, до кога е ажуриран извештајот даден од ISAAA (International service for acquisition of agro-biotech applications). До денес, се наброени вкупно 538 генетски модификации (event-и) во 32 видови култури кои добиле одобрение за комерцијализација, садење или употреба за храна и храна за животни (ISAAA, 2021a). Од тие генетски модификации најголем број се кај пченката (244 модификации во 35 земји), следуваат памукот (67 ГМ во 27 земји), компирот (51 ГМ во 13 земји, сојата (43 ГМ во 31 земји) и маслодајната репка (43 ГМ во 15 земји).

Во Европската Унија до денес, се одобрени вкупно 109 генетски модификации од кои што најголем број се модификации на пченката (вкупно 52), сојата има 20 модификации и памукот 14 генетски модификации, одобрени според Регулативата ЕС 1829/2003 (ISAAA, 2021b). Од 2016 година само Шпанија и Португалија имаат посеано модифицирана *Vt* пченка. Во 2019 година во двете земји заедно било посеано 111.883 хектари со ГМ пченка што е за 7,5% помалку, споредено со 2018 година. Побарувачката на пазарот за немодифицирани суровини, довела до намалена мотивација за засадување на ГМ култури. Најголем дел од храната за животни увезена од Аргентина, Бразил и САД е генетски модифицирана, особено сојата, пченката и репката. Ваквата ситуација се очекува да продолжи сè додека не се променат регулативите на Европската Унија. На повидок нема одобрение за одгледување, а од друга страна и кампањата против генетски модифицирани култури е сè уште актуелна. Секако дека се очекува зголемување на бројот на случаи кога една ГМ култура е одобрена во една земја,



а не е одобрена во друга, па затоа поединечната идентификација на секоја ГМ по принципот на event-специфичен метод станува нереален. Затоа најголем број на лаборатории за анализа на храна воспоставуваат систем на скрининг кој ќе им заштеди време и трошоци за потврдување на присуство на што поголем број на ГМ со користење на минимален број на скрининг real-time PCR методи.

## **2.6. Законска регулатива за користење и ставање на промет на ГМО; Европска и национална рамка**

Европската Унија (ЕУ) има воспоставено сеопфатна и строга правна рамка за да се обезбеди сигурен развој на модерната биотехнологија. Целите на таа правна рамка се заштита на здравјето на луѓето, животните и животната средина со проценка на безбедноста на ГМ храна преку највисоки можни стандарди, пред да се пушти во промет било кој продукт кој е генетски модифициран. Со правните директиви и регулативи се воспоставуваат усогласени процедури за проценка на ризикот и одобрување на ГМО кои се ефикасни, временски ограничени и транспарентни. Законодавството и политиката на ЕУ за ГМО се заснова врз принципот на претпазливост и обезбедува јасно обележување на производите кои содржат ГМО, за информирање на потрошувачите и операторите со храна, како и можност за следливост на ГМО на пазарот.

Со Директивата 2001/18/ЕС на Европската Комисија, се регулира дозволената употреба на ГМО во животната средина. Според Директивата, проценката на ризикот врз животната средина се врши за секој случај поодделно пред да се пушти во промет. Исто така треба да се земе предвид и кумулативниот долгогодишен ефект поврзан со интеракцијата со другите генетски модифицирани организми и со животната средина. Мониторингот на потенцијалните кумулативни ефекти треба да се смета како задолжителен дел на планот за контрола и следење. При проценка на ризикот особено внимание треба да се обрне на ГМО кои содржат гени за резистентност кон антибиотици кои се користат за медицински или ветеринарен третман, со цел идентификација на маркерите на антибиотска резистентност кои можат да имаат негативен ефект врз здравјето на луѓето и животната средина.

Според Регулативата 1829/2003, храната и храната за животни, која содржи, се состои или е произведена од генетски модифицирани организми треба да подлежи на безбедносна проценка пред да се стави во промент, со цел заштита на здравјето на луѓето и животните, додека со Регулативата 1830/2003 се воведува задолжително обележување и следливост на храната и храна за животни кои содржат повеќе од 0.9% на ГМО.

Протоколот од Картагена за биосигурност, како составен дел на Конвенцијата за биолошка разновидност, е меѓународен договор со кој се уредуваат прекуграничните движењата на живите модифицирани организми. Во таа конвенција се разгледува концептот на биосигурност како потреба за заштита на човечкото здравје и животната средина од можните несакани ефекти од продуктите на современата биотехнологија и се обезбедува развој на соодветни процедури за зајакнување на безбедноста во контекст на намалување на сите потенцијални закани за биолошката разновидност. Од друга страна, Протоколот овозможува пристап до трансфер на технологија каде биотехнологијата е релевантна во зачувување и одржливо користење на биолошката разновидност. Позитивните ефекти на современата биотехнологија се разгледуваат како потенцијал за обезбедување на човековата благосостојба во задоволување на потребата на храна со соодветна нутритивна вредност, обезбедување на земјоделски култури кои опстануваат во услови на глобално затоплување како и здравствена заштита. Протоколот воспоставува постапка за спогодба по претходно информирање, за да им се овозможи на земјите да донесат правилни решенија пред да се договорот за увоз на живи модифицирани организми на нивната територија. Протоколот од Картагена беше усвоен во 2000 година како дополнителен договор на Конвенцијата за биолошка разновидност и влезе во сила во септември 2003 година.

Во Република Северна Македонија прв пат беше донесен закон за генетски модифицирани организми и генетски модифицирани микроорганизми во 2008 година („Службен весник на РМ“ бр. 35/08). Со овој закон се уредува управувањето со генетски модифицирани организми, мерките за спречување и намалување на можните негативни влијанија врз здравјето на луѓето и животната средина како последица на ограниченото користење на ГМО, санкциите во случај на намерно ослободување на ГМО во животната средина или пуштање во промет

на производи кои содржат ГМО, и можноста за прекугранично движење на ГМО и на производи кои содржат ГМО и/или се состојат или потекнуваат од комбинација на ГМО и ГМО како производ. Во 2010 година е донесен Законот за безбедност на храна („Службен весник на РМ“ бр. 157/10) во кој се дефинира што е ГМО храна и кои се обврските на операторите во однос на ГМО храната. Од Агенцијата за храна и ветеринарство (АХВ) во 2011 и 2013 година се донесени подзаконски акти, како Правилник за начинот и постапката за издавање на одобрение за ставање во промет на ГМО храна („Службен весник на РМ“ 137/11) и Правилник за посебни барања за безбедност на ГМО храна („Службен весник на РМ“ бр 119/13), за да се изврши целосна хармонизација на националната легислатива за ГМО со Европската легислатива (Регулативите 1829/2003 и 1830/2003), но, имплементацијата на овие правилници во пракса не е спроведена. Според член 55 од Законот за изменување и дополнување на законот за безбедност на храна („Службен весник на РМ“ 187/13), се забранува производство, ставање во промет и увоз во Република Македонија на храна и производи од храна кои содржат ГМО или се составени од ГМО. Според член 151 на Законот за безбедност на храна („Службен весник на РМ“ бр 123/2015), забраната ќе се применува до пристапувањето на Република Северна Македонија во Европската Унија. Во тој случај, Република Северна Македонија ќе ја хармонизира легислативата за ГМО со Европската легислатива и како праг на прифатливост за случајно или технички неизбежно присуство на одобрени ГМО ќе изнесува 0.9%. Во годишната мониторинг програма на АХВ за безбедност на храна во Република Северна Македонија за 2021 биле планирани за анализа на ГМО храна вкупно 30 мостри од соја, ориз, пченка, житни мусли, виршли и паштети.

## **2.7. Скрининг детекција на генетска модификација**

### **2.7.1. Екстракција на DNA**

Екстракцијата и прочистувањето на DNA е првиот чекор при анализа на генетски модифицираната храна. Чистите екстракти на DNA од различни матрикси се користат за детекција и квантификација на специфични генетски

секвенци со PCR или real – time PCR метод. Пристапот на методите за екстракција на DNA е сменет од стратегијата „ист метод за сите матрикси“ во „матрикс-зависен“ метод. При рутинска анализа на матрикси, во ретки случаи се добива информација за целосна содржина на примерокот. Во тој случај изборот на метод за екстракција на DNA, се заснова на претходно искуство со слични матрикси. Затоа, при анализа на секој примерок треба да се вклучат негативни и позитивни контроли за да се добие веродостојност на резултатите.

За екстракција на нуклеинските киселини од биолошки материјал потребно е лизирање на клетките, инактивација на клеточните нуклеази и денатурација на нуклеопротеините, отстранување на контаминентите и таложување и прочистување на DNA.

**Лизирање на клеточната мембрана:** Првиот чекор на DNA екстракција е оштетување на клеточниот ѕид, плазмалемата и јадрената мембрана. За таа цел, примерокот првично се хомогенизира, потоа се третира со пуфер за лизирање кој содржи Tris/HCl, EDTA и детергент. Најчесто користени детергенти се SDS, Triton-X, CTAB (Ahmad и сор., 2017). Заради сличната структура на липидите со детергентот, SDS детергентот има функција да ги врзе липидите на клеточната мембрана овозможувајќи ослободување на геномската DNA. При одредени концентрации на соли (NaCl), детергентот формира нерастворлив комплекс со нуклеинските киселини. Друга компонента на пуферот за лизирање е EDTA, која ги врзува магнезиумовите јони ( $Mg^{2+}$ ) како кофактори на нуклеазните ензимите и на тој начин ја инхибира нивната активност. Tris/HCl овозможува стабилизирање на рН на пуферот бидејќи ниската или високата рН ја оштетува DNA молекулата. Со оглед на тоа што нуклеинските киселини во оваа фаза на прочистување можат лесно да се оштетат, времето на хомогенизација на примерокот и додавањето на детергент во пуферот за лизирање треба да биде што е можно пократко. Недостаток на детергент-базирани пуфери за лизирање на клетките е ризикот од контаминација на DNA примерокот и инхибицијата на следните чекори на манипулација. Друг пристап кон успешно лизирање на клетките, е примена на висока температура. По оваа постапка следува процес на прочистување на DNA.

**Методи на прочистување на DNA:** Методите за прочистување на нуклеинските киселини од клеточната суспензија обично се комбинација на две или повеќе техники како на пример екстракција/таложување, центрифугирање,

хроматографија или афинитетно одвојување. Екстракцијата со растворувачи се користи за отстранување на контаминентите на нуклеинските киселини. Во овој чекор, полисахаридите, фенолните соединенија, протеините и другите клеточни остатоци растворени во воден раствор се отстрануваат од комплексот формиран од нуклеинските киселини. Отстранувањето на полисахаридите и фенолните соединенија е особено значајно бидејќи тие делуваат како инхибитори на многу ензимски реакции. При ниски концентрации на соли ( $< 0.5 \text{ M NaCl}$ ) не се таложат контаминентите на комплексот на нуклеински киселини, така што тие лесно можат да се отстранат од водениот раствор со помош на органски растворувачи. Најчесто користен органски растворувач при DNA екстракцији од различни матрикси е хлороформот, кој ги денатурира протеините и го олеснува развојувањето на водената и органската фаза. Обично, водената фаза е во горниот слој па полесно е и пипетирањето на водениот слој во кој што се наоѓа и DNA. Секако, доколку водената фаза е со поголема густина заради концентрацијата на соли ( $> 0.5 \text{ M}$ ), таа ќе се формира во долниот слој. Доколку е потребно, екстракцијата со хлороформ може да се изведе два или три пати, со цел целосно отстранување на нечистотиите од водениот слој. Откако ќе се прочисти комплексот на нуклеински киселини, тогаш може да се оди кон следниот чекор на таложеење на DNA.

**Таложеење:** Во оваа завршна фаза, нуклеинските киселини се таложат заедно со солите. DNA се таложат со висока концентрација на соли како NaCl или NaOAc, или пак со алкохол, етанол или изопропанол. Целта на таложеење на DNA е отстранување на детергентот и другите хемикалии кои се користат при процесот на екстракција како и концентрирање на DNA. Потоа, талогот се измива со 70% етанол за отстранување на вишокот соли од DNA. На крај талогот на DNA се раствора во разреден Tris/ EDTA (TE) пуфер или во стерилна вода.

### 2.7.2. Инхибитори на PCR реакција

Инхибиторите се серија на органски или неоргански соединенија кои можат да бидат директно присутни во примерокот, како ненамерно додадени при процесирање на храната или како остатоци при екстракција на DNA. Растенијата

се главно богати со феноли и полисахариди, кои делуваат инхибиторно особено на TaqMan пробите при real-time PCR реакција, за разлика од конвенционалниот PCR, кој е помалку подложен на инхибиторно дејство. Различните соли (NaCl или KCl), детергенти или органски содиненија (EDTA, сакрозил, етанол, изопропанол или фенол) кои се користат при екстракција на нуклеинските киселини, претставуваат можни инхибитори на real-time PCR реакцијата (Demeke и Jenkins, 2010). Тие се неопходни за ефикасно клеточно лизирање или прочистување на нуклеинските киселини, но при одредени концентрации можат да делуваат инхибиторно на PCR реакцијата. Јонските детергенти (натриум деоксихолат, саркозил или SDS) се силни инхибитори на PCR реакцијата, додека нејонските детергенти (Tween 20, Triton X-100, N-октил гликозид) делуваат инхибиторно само при високи концентрации.

Инхибиторите интерферираат во различни чекори на PCR анализата преку реакција со нуклеинските киселини или блокирање на активноста на DNA-полимеразата. Тие делуваат директно на DNA-полимеразата со нејзина деградација или блокирање на активниот центар или индиректно со компетитивно поврзување со кофакторите на DNA-полимераза (Opel и sor., 2010). Присуството на инхибитори може да доведе до лажно негативни резултати при PCR анализа. За да се минимизира тој ефект треба да се внимава при изборот на методот за екстракција на DNA. Во тој случај се избира најсоодветен метод на екстракција зависно од матриксот кој треба да се анализира. За детекција на присуство на PCR инхибитори во примерокот, се препорачува да се изведе контролен експеримент за тестирање на PCR инхибицијата. За таа цел, може да се изведе таксон-специфична PCR анализа или реакција специфична за растенија (еукариоти или хлоропласт) за анализа на присуство на инхибитори. Корисна техника за намалување на дејството на инхибитори е разредување на примерокот, но тоа ќе доведе до дополнително разредување и на таргет матрицата. Други третмани на примерокот, како испирање со NaOH, прочистување со силика спин колони или агароза, доведуваат до губење на DNA матрицата (Opel и sor., 2010).

### 2.7.3. Прицип на real-time PCR за скрининг на ГМ

Аналитичките методи базирани на техниката на полимеразно верижна реакција (PCR – Polymerase Chain Reaction), денес повеќе се користат во лабораториите за анализа на ГМ храна, во споредба со користењето на методи базирани на протеини. PCR овозможува селективна амплификација на специфични сегменти на DNA кои се јавуваат во многу мал број на копии во комплексни матрикси заедно со други DNA секвенци. PCR се заснова на механизмот на *in vivo* репликацијата на DNA. Оваа техника се состои од повторувани циклуси на денатурација, анилирање (хибридизација) и екстензија. Денатурацијата на DNA се одвива на висока температура за конверзија на двојноверижната DNA во едноверижна DNA молекула. Потоа, мали комплементарни DNA секвенци означени како прајмери кои се користат во пар, се хибридираат со таргетната DNA секвенца, во процесот означен како анилација. Следува екстензија на DNA веригата, при што ензимот DNA-полимераза во присуство на магнезиумови јони ( $Mg^{2+}$ ), учествува во додавањето нуклеотиди на местата на поврзување на прајмерите. По завршување на секој циклус, новосинтетизираните DNA сегменти служат како нова матрица за следниот циклус. Преку серија на повторувања на овие три термални циклуси, DNA-полимеразата овозможува експоненцијална амплификација на таргетната DNA секвенца која се наоѓа помеѓу парот на прајмери. При PCR реакциите се користат hot-start полимеразни ензими кои се активираат единствено на високи температури (обично на 95 °C за 10 минути), при што настанува денатурација на цела DNA молекула пред да започне процесот на амплификација. Оваа карактеристика, освен што ја зголемува сензитивноста на методот, овозможува и избегнување на амплификацијата на неспецифични продукти, особено кога се анализираат високо процесирани и комплексни примероци.

Во споредба со протеин базирани методи, PCR методот има предности дека е високо сензитивен и специфичен и може да детектира една или неколку копии на генот или таргет секвенцата од интерес, времето за синтеза на прајмери е пократко отколку продукцијата на антитела за одреден протеин и се применува на високо процесирани примероци. Од друга страна, недостаток на PCR методот е

дека се работи со лабораториска техника која бара обучен персонал и специјализирана опрема, како и високи материјални трошоци.

Принципот на PCR првично бил објаснет од Saiki и соp. (1985) и од Mullis и соp. (1987) за што научникот Kary Banks Mullis добил и Нобелова награда за хемија во 1993 година. Во 1992 година, Higuchi и соработниците, докажале дека специфични секвенци на DNA можат да се детектираат без отворање на реакционата епрувета (епендорф). Тие всушност го објаснуваат почетокот на развивање на real-time PCR техниката, за која цел користеле етидиум бромид, чија флуоресценција се зголемувала при амплификација на двојноверижна DNA молекула. Со поставување на резултатите од емисијата на флуоресцентната светлина наспроти бројот на циклуси, системот дава покомплетна слика на PCR процесот, отколку анализата на акумулиран продукт после фиксен број на циклуси како во случај на конценционален PCR. Клучен чекор при поставување на real-time PCR анализата е селекцијата на хемизмот на реакцијата која ќе се користи за следење на таргет секвенцата. За таа цел се користат различни флуоресцентни методи како: DNA – врзувачки бои (SYBR GREEN I) и флуоресцентно-обележани специфични олигонуклетиди на прајмери или пробии (TaqMan пробии). Хемизмот кој се избира за real-time PCR анализа зависи од примената, дали реакцијата ќе се изведува како singleplex или multiplex реакција, како и од економските трошоци на лабораторијата. Обично за singleplex реакции кои се изведуваат во лаборатории со помало оптеретување на работа се користат методи со DNA – врзувачки бои, поради фактот што методите полесно се поставуваат и се иницијално порентабилни. Додека, при поголем обем на работа и во случај на изведување multiplex (но може и при singleplex) реакциите, се користат методи со флуоресцентно-обележани прајмери или пробии.

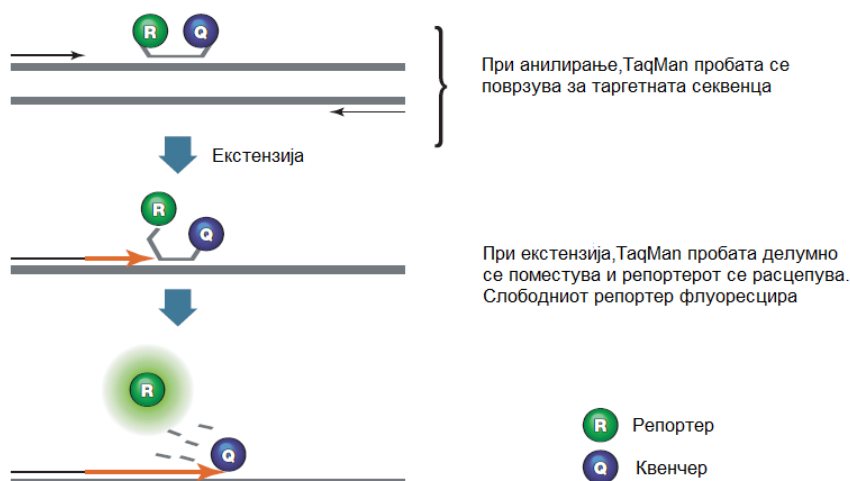
#### **2.7.4. Принцип на real-time PCR методот со TaqMan пробии**

Real-time PCR методот со TaqMan пробии се базира на 5'-3' егзонуклеазната активност на Taq DNA полимераза, која ја хидролизира флуоресцентната проба во тек на PCR реакцијата. TaqMan пробата е обично олигонуклеотид со големина од 20-30 базни пара, со температура на топење околу 10 °C повисока отколку температурата на топење на прајмерите и содржи флуоресцентна боја на 5' крајот



reporter (репортер) и quencher (квенчер) на 3' крајот. Бидејќи 3' крајот е блокиран, пробата не може да се продолжи како прајмер. Во тек на PCR реакцијата, во присуство на таргет генот, пробата специфично се анилира меѓу forward (преден) и reverse (реверзен) прајмер. Кога пробата е интактна, блискоста на репортерот со квенчерот резултира со супресија на флуоресценцијата првично со Foster тип на трансфер на енергија (Livak и сор., 1995). Во тек на реакцијата, 5'-3' егзонуклеазната активност на Taq DNA полимераза ја деградира пробата меѓу репортерот и квенчерот само доколку пробата се хибридизира со таргет генот. Тоа резултира со зголемување на флуоресценцијата како што се одвива процесот на амплификација. Акумулацијата на PCR продукти се детектира со следење на зголемувањето на флуоресценцијата на репортерот. Овој процес се одвива во тек на секој циклус и не интерферира со експоненцијалната акумулација на продуктите. TaqMan пробите функционираат со универзални параметри на термосајклери и PCR услови.

Постојат два типа на TaqMan проби означени како MGB (Minor Groove Binding) и non-MGB. Првично развиените TaqMan проби се означени како non-MGB кои користат TAMRA™ боја како квенчер. Кај тие TaqMan проби е неопходно повисока температура на анилирање, сигнификантно повисока од PCR прајмерите, за да овозможи хидролиза на пробата. Но, при анализа кога се бара висока специфичност како експресија на еукариотските гени и полиморфизам на единечни нуклеотиди (SNPs), воведени се TaqMan MGB проби, кои содржат MGB молекула на нивниот 3' крај кој е нефлуоресцентен квенчер за абсорпција на флуоресценцијата од репортерот. Затоа TaqMan MGB пробите се препорачуваат за покомплексни генетски анализи. Нефлуоресцентниот квенчер комбинирано со пократката низа на MGB пробата, резултира со понизок сигнал во позадина, со што се зголемува сензитивноста и прецизноста на резултатите.



Слика 2. Механизам на дејство на TaqMan пробите (Real-time PCR, Applications guide , BIO RAD)

Специфичноста на PCR методот зависи од точниот избор на парот на прајмери кои се користат при PCR реакцијата. Затоа, според специфичноста на таргет секвенцата, методите за детекција на ГМО се групирани во следните групи:

1. Елемент-специфични методи каде што таргет DNA секвенците се ограничени единствено на одредени генетски елементи на ГМО, на пример детекција на присуство на промоторот 35S на Мозаичниот вирус на карфиолот (CaMV) и терминаторот на нопалин синтаза генот од *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos)
2. Конструкт-специфични методи кои се специфични за трансгениот конструкт, чија цел се вештачки споените секвенци како секвенцата за кодирање и контролните региони во негова непосредна близина
3. Event (настан)-специфични методи кои имаат највисоко ниво на специфичност бидејќи нивна цел се DNA секвенците кои се единствени за секоја генетска модификација
4. Таксон-специфични методи чија цел се DNA секвенци кои се специфични за одредени таксони или видови. Тие обично се користат за дефинирање на релативната содржина на генетски модифицирана храна изразено во проценти (% ГМО).

Во последните декади се зголемува бројот на ГМО во различни матрикси, а со тоа се зголемува и потребата за скрининг методи кои ќе детектираат

присуство на ГМ. Скринингот за присуство на ГМ може да се постави на начин при што ќе се оптимизираат времето и ресурсите и ќе се редуцира обемот на работа. Тестирањето на примерок за сите генетски модификации кои се одобрени на пазарот на ЕУ одзема многу време и економски е неисплатливо. Затоа, во лабораториите за ГМО анализа првично се врши иницијален скрининг тест. Во случај на позитивен сигнал на овие скрининг тестови, дополнително се користат event-специфични методи за идентификација на генетската модификација која ги содржи претходно детектираните генетски елементи (Petrillo и сop., 2015).

Првиот скрининг метод развиен од германски и швајцарски научници предводени од Pietsch и соработници во 1997 година, бил всушност првиот PCR-базиран скрининг метод со кој можеле да се детектираат најголем број на ГМО комерцијализирани во тоа време. Методот се засновал на детекција на контролните секвенци меѓу кои е вметнат новиот ген, означени како 35S промотор и NOS терминатор. Валидацијата била координирана од Joint Research Center (JRC) во соработка со Институтот за референтни материјали и мерења (IRMM) одговорен за производство на сертифицирани референтни материјали (CRMs). Нивните цели биле широко поставени, па затоа нивниот скрининг покрива 95% од генетските модификации кои се комерцијализирани во ЕУ (Forte и сop., 2005; Debode и сop., 2013). И покрај тоа што методот е погоден за скрининг на ГМО, тој не е селективен за идентификација на ГМО, бидејќи во бројни ГМО се вметнати истите генетски елементи. Секако, во меѓувреме се одобрени и други генетски модификации кои содржат нехетерологни и ткивно-специфични генетски регулаторни елементи, со што и бројот на скрининг методи се зголемува.

Лажно позитивен резултат може да се добие поради фактот дека 35S промоторот кој потекнува од Cauliflower Mosaic Virus може да ги инфицира растенијата од фамилијата *Brassicaceae*. Затоа, позитивен резултат на растенија од фамилијата *Brassicaceae* би требало внимателно да се анализира. Сепак, ризикот за инфекција на други фамилии на растенија со овој вирус е доста мал. Од друга страна Tnos терминаторот се јавува само кај некои видови на бактеријата *Agrobacterium tumefaciens* кои се патогени на одредени растителни култури. Во овој случај, треба да се обрне внимание кога се анализираат корења, бидејќи DNA на *Agrobacterium tumefaciens* може да потекнува од остатоци на почва во

корењата (Lipp и сор., 1999). Но, најчесто *A. tumefaciens* не е вирулентен т.е. не пренесува Ti-плазмид со T-DNA и онкогени па затоа тој не е присутен во природно настанати култури (Anklam и сор., 2002). Различни тестови за детекција на р35S и Tnos биле развиени за класичен PCR (Mendoza и сор., 2006), за real-time PCR (Holden и сор., 2010; Pansiot и сор., 2011), за изотермален PCR (Fukuta и сор., 2004), микрочипови (Leimanis и сор., 2006), имунострипови (Kolm и сор., 2015) и биосензори (Minnuni и сор., 2001). И покрај другите промотори и терминатори, на почетокот голем број на генетски модифицирани растенија биле трансформирани со конструкти кои содржат 35S промотор и/или Tnos терминатор. Денес постојат трансгени конструкти каде овие генетски елементи воопшто не се присутни. Затоа е потребно постојано да се развиваат алтернативни скрининг системи за детекција на генетски модификации кои секојдневно се развиваат. Според податоците од истражувањето на Wu и сор., (2014), постојат барем 24 методи чиј што таргет се различни региони на секвенцата на 35S промоторот но сите тие скрининг системи имаат недостатоци кои можат да даваат лажно негативни резултати и/или се потценува количината на ГМО при нивна детекција. Затоа тие идентификувале еден конзервиран дел во зајакнувачкиот регион на 35S промоторот и бил воспоставен општ PCR метод насочен кон овој регион. Нивна препорака е во иднина од сите развивачи на трансгени да се бара вметнување на единечна вештачка секвенца која би можело многу полесно да се детектира само со еден метод кај сите генетски модификации. Но сепак, спороведувањето на оваа идеја треба да се прифати и одобри од страна на развивачите на трансгени и од соодветните регулаторни тела.

Во Европската Регултивата 625/2017 е наведено дека Референтната лабораторија на Европската Унија (EURLs) за храна и храна за животни, покрај другите обврски, треба да ги насочи националните референтни лаборатории во методите на лабораториски анализи, тестирања и дијагностика, вклучувајќи ги и референтни методи. За таа цел, Референтната лабораторија на Европската унија за генетски модифицирана храна и храна за животни (EURL GMFF) има развиено база на податоци на референтните методи на ЕУ за ГМО анализи, позната како „GMOMETHODS“ (JRC, 2021a). Сите методи, се DNA-базирани методи за детекција на ГМО кои биле валидирани во заеднички координирано испитување според принципите и барањата на ISO 5725 и протоколот на Меѓународниот сојуз

за чиста и применета хемија (IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry) или биле верифицирани од EURL GMFF за правни цели на ЕУ.

До 25 февруари 2021, базата на податоци „GMOMETHODS” содржи информации за 197 различни PCR методи кои овозможуваат идентификација на 92 поединечни генетски модификации. Овие методи ги покриваат сите генетски модификации кои се одобрени во ЕУ, тие што треба да се одобрат и тие чие одобрение е истечено. Базата содржи аналитички тестови за 25 таксон-специфични гени и 35 елемент-специфични скрининг тестови. Дополнителни 22 конструктор-специфични методи можат да се користат за скрининг. Во табела 1. се прикажани методите кои ги содржи базата на податоци GMOMETHODS според Bonfini, (2021) до 25 февруари 2021.

Табела 1. Методи за ГМО и таксон-специфични методи кои се содржат во базата на податоци GMOMETHODS според специфичноста и целта на анализа.

Таргет	Специфичност	Цел на анализа		Вкупно методи
		Квалитативни	Квантитативни	
ГМО	Event-специфичен	12	77	89
	Конструктор-специфичен	14	8	22
	Елемент-специфичен	31	4	35
Таксон	Специфичен за вид	16	34	50
	Растително-специфичен	1	0	1
Вкупно методи		74	123	197

Скрининг тестовите овозможуваат детекција на 19 поединечни или комбинирани генетски елементи кои се користат при развој на голем број на генетски модификации кои се одобрени ширум светот. Во табела 2 се прикажани скрининг методите според нивниот различен таргет.

Табела 2. Целни секвенци кои се детектираат со референтните методи во ЕУ за скрининг на ГМО.

Бр	Цел на скринингот	Кратенка
1	Промотор на Cauliflower Mosaic Virus	CaMV P-35S
2	Терминатор на Cauliflower Mosaic Virus	CaMV T-35S
3	Терминатор на Cauliflower Mosaic Virus од pCAMBIA вектор	T-35SpCAMBIA
4	<i>CP4 epsps</i> ген од <i>Agrobacterium tumefaciens</i> тип I и II	CP4-epsps
5	<i>Cry1Ab/Ac</i> модифицирани гени од <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>cry1Ab/Ac</i>
6	<i>Cry1A(b)</i> синтетичен ген од <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>cry1A(b)</i>
7	<i>Cry1Ac</i> синтетичен ген од <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>cry1Ac</i>
8	E9 терминатор од <i>Pisum sativum</i>	T-E9
9	Промотор од Figward Mosaic Virus 35S	P-FMV
10	Поврзувачки регион меѓу Cauliflower Mosaic Virus промотор и генот за фосфинотрицин N-ацетилтрансфераза од <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>CaMV P-35S_Pat</i>
11	Поврзувачки регион меѓу секвенцата на хлоропластен транзитен пептид 2 од <i>Arabidopsis thaliana epsps</i> ген и <i>CP4 epsps</i> генот од <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>CTP2_ CP4 epsps</i>
12	Поврзувачки регион меѓу <i>cry1Ab/Ac</i> модифициран ген со DNA spacer секвенци	<i>cry1Ab/Ac_DNA spacer</i>
13	Поврзувачки регион меѓу промоторот на пченкарен убиквитин и <i>cry1Ab/Ac</i> модифицирани гени	<i>P-ubi_ cry1Ab/Ac</i>
14	Поврзувачки регион меѓу нопалин синтаза промоторот од <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и генот за неомицин фосфоттрансфераза II ( <i>nptII</i> )	<i>T-nos_nptII</i>
15	Генот за неомицин фосфоттрансфераза II ( <i>nptII</i> )	<i>nptII</i>
16	Промотор за нопалин синтаза од <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>P-nos</i>
17	Терминатор за нопалин синтаза од <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>T-nos</i>
18	Ген за фосфинотрицин N-ацетилтрансфераза од бактеријата <i>Streptomyces hygroscopius</i>	<i>bar</i>
19	Ген за фосфинотрицин N-ацетилтрансфераза од <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>pat</i>

Според *in silico* анализа, со овие скрининг методи можат да се детектираат 94% (63 од 67) поединечни генетски модификации кои се моментално одобрени или процедурата за одобрување е во чекање или истечена. Само четири генетски модификации не можат да се детектираат со референтните скрининг методите кои се наоѓаат на базата на податоци (пченка DAS-40278-9; маслодајна репа

DP073496-4 и две генетски модификации на соја DP-305423-1 и BPS-CV127-9), па затоа нивната детекција треба да се изврши со методи кои се специфични за тие генетски модификации (event-специфични методи) (Bonfini, 2021).

Ако се земе предвид големиот број на одобрени генетски модификации или чие што одобрување е во исчекување или е истечено, тогаш треба да се примени оптимизирана стратегија за скрининг на храна и храна за животни во пазарот на ЕУ. При рутински лабораториски анализи, голем број на скрининг пристапи можат да се користат базирани на критериумот за максимално покривање, најдобри перформанси и минимална цена и време на анализата. Дополнителните методи можат да се користат за подобра дистинкција меѓу откриените генетски модификации. Со биоинформатички анализи можат да се добијат информации за методите кои можат да се користат за детекција на максимален број на одобрени генетски модификации кај секој вид домаќин. Тоа може да се провери на веб апликацијата GMO-Matrix (JRC,2021b).

## **2.8. Оптимизација и валидација на методи за скрининг детекција на генетски модификации**

Како „златен стандард“ за скрининг детекција на генетски модификации е прифатен real-time PCR методот. На пазарот постојат голем број на комерцијални китови како за екстракција на високо квалитетна DNA, така и за амплификација на таргетната секвенца со real-time PCR методот. Но, и покрај тоа, голем број лаборатории, развиваат сопствени „in-house“ методи за екстракција и амплификација. Развојот на овие методи се состои во оптимизација на реагенси и поедини чекори во протоколите, како и нивна валидација.

Според документот даден од Европската мрежа на лаборатории за ГМО (European Network of GMO Laboratories ENGL) за минималните побарувања на методите за изведување на анализа на ГМО (ENGL, 2015) засновано на Регулацијата 1829/2003, при валидација на методот треба да се запазат одредени аналитички параметри. Препораките кои се даваат во овој документ се во согласност со барањата на Codex Alimentarius. Валидацијата на методот е значајна компонента на мерењата извршени во лаборатории акредитирани според ISO

17025 стандарди, што претставува доказ дека добиените резултати се точни и веродостојни. Аналитичките параметрите кои треба да се оценат се поделени во две групи: параметри на прифаќање на методот (кои треба да се тестираат при развој и „in-house“ валидација на методот) и параметри на перформанси на методот (кои се тестираат при интерлабораториски и колаборативни испитувања) (Broeders и соp., 2014).

Параметрите за прифаќање на одреден метод при негова валидација се: применливост, практичност, специфичност и сензитивност. Според упатствата дадени од ENGL, при определување на применливоста на методот за анализа на ГМО треба да се има целосна информација за опсегот на методот т.е. која е целта, на кој матрикс може да се примени и на која количина на DNA е експериментирано. Методот може да се тестира на различни матрикси, како на пример сиров или процесирани материјал, храна или храна за животни, геномска или плазмидна DNA итн. Од друга страна, може да се тестираат и различни количини на DNA овозможувајќи откривање на можни PCR инхибитори. Се очекува да се добијат слични резултати за што е можно повеќе матрикси. Во случај да се појават отстапувања поради интерференција со аналити или неприменливост на методот на одредени матрикси или одредени услови, тогаш тоа треба да се назначи при изјавата на применливост на развиениот метод.

За одредување на практичноста на еден метод, според препораките дадени во трудот на Broeders и соp. (2014) може да се анализираат слепи примероци при рутинска работа во лабораторија. Новоразвиениот метод може да се комбинира со други методи кои веќе се користат во лабораторијата за рутинска анализа на ГМ храна. Со тоа може да се одреди дали методите можат да се комбинираат и дали може да се работат под исти услови. Од друга страна, треба да се проценат и економските трошоци како и потребата за обука на персоналот кој треба да ги изврши анализите. Практичноста на методот исто така може да се процени и со изведување на експериментот во друга лабораторија под исти репродуктивни услови. За еден метод може да се смета дека е практичен доколку има мали дополнителни трошоци споредено со рутински поставените методи за анализа, доколку обуката на персоналот е ограничена, доколку може да се користи рутинска опрема и работните манипулации се лесни за извршување.



За одредување на специфичноста на олигонуклеотидите (прајмерите и пробите) при развивање на метод, треба да се проверат дали реагираат само со секвенцата што ни е од интерес. Избраните олигонуклеотиди треба да се проценат со нивно тестирање на различен растителен материјал, при што пожелно е тоа да биде сертифициран референтен материјал (CRM). За таксон-специфични скрининг PCR методи, треба да се анализираат материјали од видови кои се тесно поврзани, како и од други видови на растителни култури кои често се наоѓаат во храната и храната за животни. Секој материјал треба да се тестира најмалку двојно за да се добие веродостоен резултат за специфичност на олигонуклеотидите за таксон – специфичниот метод.

Сензитивноста на PCR методот е значаен параметар особено при анализа на ГМ примероци кои се во исчекување на одобрување според регулативата на EU 619/2011 или за детекција на неодобрени генетски модификации кои можат да бидат присутни во многу ниски концентрации. Сензитивноста на квалитативен PCR метод, може да се изрази како лимит на детекција (LOD) и два типа на LOD параметри. LOD е всушност најниската концентрација на аналит каде стапката на лажно негативни примероци е  $\leq 5\%$  со релативна стандардна девијација на репродуцибилноста од 33% или пониска.

Освен параметрите за прифаќање на метод, при развивање и валидација на квалитативен multiplex PCR метод, неопходно е да се тестираат и дополнителни параметри на перформансот на методот. Еден таков параметар по кој се водење при оптимизација на методот, е PCR ефикасноста на амплификацијата, која ја одредивме со следната формула (Nolan и сор., 2006):

$$E = [10^{(-1/\text{наклон})} - 1] \times 100$$

Ефикасноста на PCR амплификацијата се дефинира како однос на бројот на таргет гените на крајот на PCR циклусот поделен со бројот на таргет гените на почеток на истиот PCR циклус, што може да се изрази како сооднос или во процент. Тоа претставува мерка за брзината со која полимеразата ги конвертира реагенсите (dNTPs, олигонуклеотидите и DNA матрицата) во ампликони. Максималното зголемување на ампликон за еден циклус е двојно, што претставува PCR реакција која е 100% ефикасна. Тоа е теоретска ефикасност која не секогаш може да се примени во практиката. Затоа, при соодветно дизајниран

протокол и во отсуство на интерферирачки супстанции во матриксот, амплификацијата на таргетната DNA треба да биде со ефикасност во интервал од 90% до 110%. Врз PCR ефикасноста на амплификација влијаат многу фактори како од: секвенцата и структурата на прајмерите и DNA матрицата, каде секундарната структура ја намалува ефикасноста на PCR реакцијата поради формирање на несакани интрамолекуларни интеракции; инхибитори кои може да бидат присутни во матриксот или се пренесуваат во тек на процесот на екстракција; употребените реагенси и нивните концентрации, каде било кој од реагенсите може да ги ограничува брзината и перформансите на PCR реакцијата; и компетитивните реакции (Svec и сор., 2015).

### 3. ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА

Целите на докторската дисертација се:

- Развој и оптимизација на соодветен аналитички метод за екстракција на DNA од сертифициран референтен материјал и други матрикси со цел добивање на екстракт кој ќе има добар принос на DNA, без остатоци на контаминентни и интактна нефрагментирана DNA молекула;
- Примена на методот на екстракција на DNA на сирови и процесирани прехранбени производи, компарација на принос, чистота на DNA екстрактот изразена преку соодносот A260/A280 и A260/230 и интактноста во агарозна гел електрофореза;
- Оптимизација на елемент-специфичен метод за скрининг на 35S промоторот и Tnos терминаторот во генетски модифицирана храна за duplex real-time PCR анализа, и
- Валидација на оптимизираниот метод за скрининг и семиквантитативно одредување на генетска модификација преку анализа на 35S промоторот и Tnos терминаторот .

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

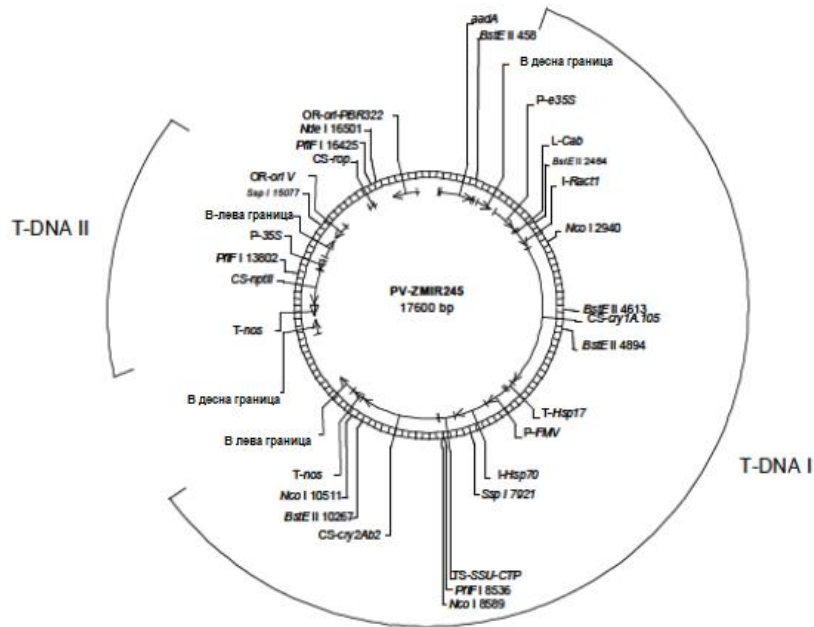
### 4.1. Материјал

Во нашите истражувања користевме сертифициран референтен материјал (CRM) и тоа: 100% генетски мофицирана пченка со модификација означена како MON89034 (AOCS – American Oil Chemists Society, САД) и 1% соја со модификација GTS-40-3-2 од Институт на референтни материјали и мерења (IRMM-Institute of reference Materials and Measurements, Белгија). Покрај тоа, користевме и сирова пченка со негативен резултат за присуство на 35S и Tnos генетските елементи. За анализа на присуство на генетски елементи беше користен комерцијален кит (Eurofins, GMOScreen RT IPC (LR) 35S/NOS/FMV, Германија). Оваа пченка беше користена за подготовка на мешавини со одреден процент на генетска модификација. Сите примероци за DNA екстракција беа фино сомелени со лабораториска мелница (Retsch Grindomix GM200), работени во по две екстракции за секој примерок, додека референтните материјали добиени во прашкаста форма беа директно користени за екстракција на DNA. Дополнително, користевме и прехранбени производи за одредување на специфичноста на методот на екстракција и амплификација, како пченкарно брашно, палента, пченкарен леб, корнфлекс, пуќанки, пченкарен гриз, сирова пченка, печена соја, соин изолат, говедско месо, рибино брашно, мусли, житни барови и ориз.

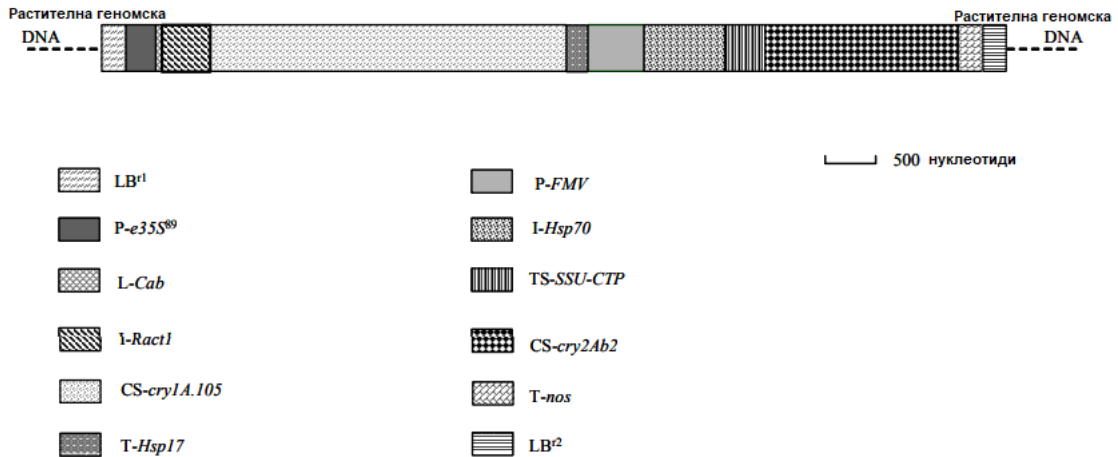
#### 4.1.1. Карактеристики на референтниот материјал

Генетски модифицираната пченка MON89034 е развиена за да обезбеди заштита од одредени штетни организми од редот Lepidoptera вклучително европски пченкин молец (*Ostrinia nubilalis*) и медитерански пченкин молец (*Sesamia nonagrioides*) (Слика 4.). Заштитата се постигнува преку експресија на два инсектицидни Cry протеини, Cry1A.105 и Cry2Ab2 со потекло од *Bacillus thuringiensis*, вообичаена почвена бактерија. Cry1A.105 протеинот кодиран од *cry1A.105* генот, е химерен протеин составен од различни функционални домени од три диви форми на Cry протеини кои потекнуваат од *B. thuringiensis subsp. kurstaki* и *aizawai*. Додека Cry2Ab2 протеинот се кодира *cry2Ab2* генот од *B. thuringiensis subsp. kurstaki*. (Слика 3.). Cry протеините го постигнуваат својот

ефект по врзување со специјалните рецептори во епителијаните клетки на цревата на инсектот домаќин предизвикувајќи лизирање на епителијалните клетки што доведува до парализа на цревата, прекин на хранењето и евентуална смрт на инсектот.



Слика 3. Шематски приказ на плазмидот PV-ZMIR245 користен при развој на MON89034 пченка (Сликата е превземена од VKM Report 2016:17, Final health and environmental risk assessment of genetically modified maize MON 89034 x NK 603).

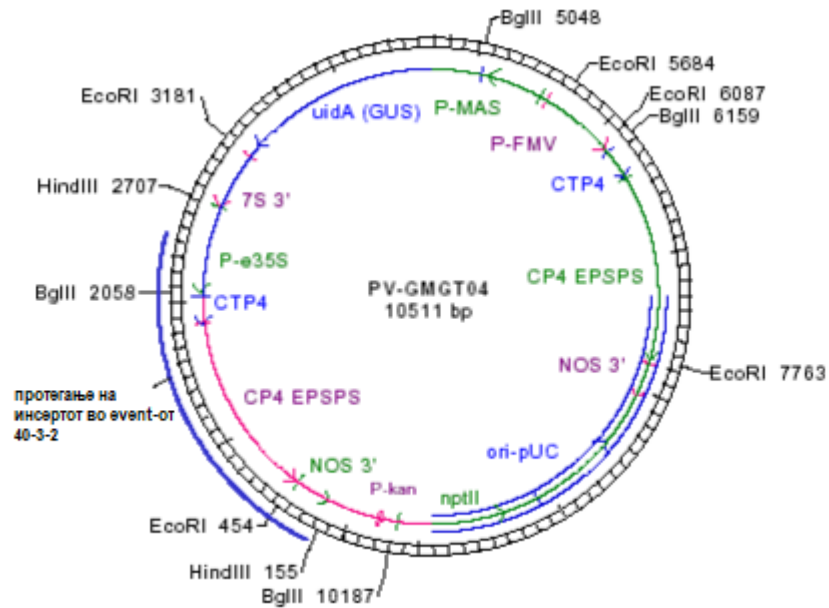


Слика 4. Шематски приказ на инсертиот на MON89034 (Сликата е превземена од Monsanto, Application for authorization of MON 89034 maize in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed).

Генетски модифицираната соја GTS 40-3-2 позната како Roundup ready соја, за прв пат била произведена од компанијата Monsanto Canada Inc. Таа се

карактеризира со толеранција кон хербицидот глифосат, кој се користи за уништување на плевелот при одгледување на соини култури. Со рекомбинантна DNA технологија, е вметнат генот за синтеза на ензимот 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (EPSPS) изолиран од *Agrobacterium tumefaciens* CP4 видот, во комерцијален вариетет на соја „A5403” (Asgrow Seed Company). Преносот бил реализиран со бомбардирање со златни честички обложени со векторот PV-GMGT04 земен од *Escherichia coli* (Слика 5.) Плазмидот PV-GMGT04 го содржи генот *CP4 EPSPS* кој кодира толерантност кон глифосатот, *gus* генот за продукција на  $\beta$ -глукуронидаза и како селективен маркер е *nptII* генот за резистентност кон антибиотикот канамицин. Рекомбинантниот ген го намалува афинитетот за врзување на глифосатот кој делува како компетитивен инхибитор на ензимот EPSPS, еден многу значаен ензим на шикиматскиот биохемиски пат за синтеза на ароматичните аминокиселини фенилаланин, тирозин и триптофан. Инхибицијата на овој ензим резултира со супресија на растот и угинување на растението. Линијата GTS 40-3-2 се состои од еден единствен функционален генетски конструкт кој содржи еден силен конститутивен промотор од *Cauliflower Mosaic Virus* (P-CaMV E35S), еден хлоропластен транзитен пептид (СТР4 од *Petunia hybrida*), CP4 EPSPS кодирачка секвенца и терминаторот од нопалин синтаза (Т-nos) земен од *Agrobacterium tumefaciens* (Padgett и соp., 1995). EPSPS синтазата широко е распространет во природата и не се очекува да биде токсичен или алерген. Компаративни студии врз база на секвенци на алергени полипептиди или токсини, не покажале хомологија на аминокиселинската секвенца на овој ензим со некој познат токсин или алерген. DNA анализата низ шест генерации покажала дека вметнувањето на новиот ген во линијата GTS 40-3-2 е стабилна (Monsanto, 2000; Windels и соp., 2001).

Roundup ready сојата била прва линија на соја која била дозволена за увоз на пазарот во Еврсопската Унија, по Одлуката на Комисијата на ЕУ 96/281/ЕС. Според оваа одлука, во ЕУ се дозволува само увоз на семе за индустриска обработка на храна за животни, храна и други продукти каде се користат фракции на сојата додека одгледувањето на оваа линија на соја е строго забрането.



Слика 5. Шематски приказ на плазмидот PV-GMGT04 користен при трансформација на Roundup ready соја и генскиот конструкт (M. Querci, M. M. Characteristics of Roundup Ready® Soybean, MON810 Maize, and Bt-176 Maize (Session 7); Joint Research Centre (European Commission): 2006.)

## 4.2. Методи

### 4.2.1. Екстракција на DNA

Оптимизиран процес на екстракција на DNA е од големо значење за добивање на висококвалитетна молекула на DNA која ќе може да се амплифицира со PCR техника. Тоа е особено значајно кога станува збор за процесирани прехранбени продукти. Познато е дека при технолошко процесирање на храната на висока температура, висок притисок и ниска рН, настанува деградација на DNA молекулата зависно од температурата и времето на експозиција (Ballari и Martin., 2013; Godalova и соp., 2013; Bitskinashvili и соp., 2019). Иако DNA може да биде деградирана, сепак доволно долгите фрагменти на DNA можат да содржат интактни секвенци на генот од интерес. При истражувања во ова поле, забележано е дека должината на таргет секвенцата е клучен параметар при точна квантификација на DNA од генетски модифицирана храна која била термички третирана, заради непропорционална деградација на рекомбинантниот и референтниот ген (Moreano и соp., 2005)

Од друга страна предизвик при екстракција на DNA се и инхибиторите кои се присутни во примерокот или реагенси кои се користат при самиот протокол на екстракција, а може да делуваат инхибиторно на Taq полимеразата ензимот кој се користи при анализа со полимеразно верижна реакција во реално време (real-time PCR). Идеалниот протокол за екстракција на DNA треба да го оптимизира приносот на DNA, да предизвикува што е можно помала фрагментација на DNA и да биде ефикасен во смисла на цена, време, работна сила и потребни материјали за работа.

Во тек на нашето истражување почетен предизвик беше развојот и оптимизацијата на метод за екстракција на DNA која ќе даде доволен принос на високо квалитетна DNA, споредено со DNA екстрахирана од истиот примерок со комерцијално достапен кит за екстракција. Споредбата се заснова на анализа на параметри за принос и концентрација на екстрахирана DNA, чистота, структурна интактност и соодветноста за понатамошна анализа со real-time PCR.

#### **4.2.2. Одредување на концентрацијата, принос, чистота и структурна интактност на екстрахираната DNA**

Концентрацијата на екстрахираната DNA беше измерена со NanoDrop™ 2000 спектрофотометар (Thermo Scientific™, Germany). Вредностите за апсорпција на 260 nm (максимално апсорбираат нуклеинските киселини), на 280 nm (максимално апсорбираат протеините) и 230 nm (солите, фенолот или други контаминенти апсорбираат на оваа бранова должина) се користат за пресметување на соодносот A260/A280 и A260/A230. Овие два односа се важни параметри за одредување на чистотата на DNA екстрактот. Приносот на добиената DNA се пресметува со формулата:

$$DNA \text{ принос } (\mu g) = \text{концентрација на DNA } (ng/\mu L) \times \text{вкупен волумен } (mL)$$

Интактноста на DNA се оценува според гел електрофорезата на 1.5% агарозен гел. TBE пуферот (1x) беше подготвен од комерцијално достапен 10x TBE пуфер (Bio Rad) со чиста автоклавирана дестилирана вода. Овој пуфер се користи за полнење на кадата за електрофореза и за подготовка на 1.5% агарозен гел. Агарозата се загрева на микробранова печка до комплетно растворање, потоа



се лади до 60 °C и се доаваат 10 µL етидиум бромид (10 mg/mL) на 100 mL агарозен гел. Електрофорезата се изведува на 120V, 400 mA за време од 60 минути. Гелот се визуелизира под UV светлина на Gel dox XR+ imager трансилуминатор (Bio Rad, USA).

Целокупниот квалитетот за екстрахирана DNA ќе се потврдува со real-time PCR анализа преку амплификација на генот од интерес.

### 4.3. Оптимизација на метод за екстракција на DNA

За целите на нашето истражување покрај референтните материјали користевме и примероци од сирово семе од пченка и печено семе од соја, кои беа генетски позитивни при претходен скрининг со комерцијален кит. Тие ни служеа како примери за непроцесирана и процесирани храна. За елиминација на влијанието на матриксот врз резултатите, истите примероци се користени при целиот процес на оптимизација на екстракција на DNA. Целта беше прилагодување на метод за екстракција на DNA кој ќе даде добар принос и квалитет. Затоа почетните фази на истражувањата се засноваа на Edwards-овиот протокол (Edwards и сор., 1991) кој беше едноставен за работа и даваше солидни резултати за квалитет на DNA екстрактот споредено со комерцијалниот кит GeneSpin (Eurofins, Германија). За секој примерок и при сите модификации на протоколот беа направени по две екстракции на DNA.

**Edwards-овиот** протокол за екстракција на DNA претставува едноставен и брз метод за екстракција на мали количини на геномска DNA кој може да се примени во различни растителни видови без употреба на опасни органски растворувачи (Edwards и сор., 1991). Според овој протокол, примерокот од растителен материјал откако ќе се мацерира, се лизира со 400 µL Edwards-ов пуфер кој во оригиналната рецептура содржи 200 mM Tris HCl со pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA и 0.5% SDS. Содржината се меша на вортекс 5 секунди и се центрифугира 1 мин / 13.000 rpm. Од добиениот супернатант 300 µL се префрлуваат во друга епендорф епрувета и се додава ист волумен на изопропанол. Содржината треба да отстои 2 мин на собна температура, се центрифугира 5 мин / 13.000 rpm и добиениот талог се ресуспендира во 100 µL TE

пуфер. Вака екстрахираната DNA е стабилна во температура од 4 °C подолг временски период.

Нашата првична оптимизација на процесот на екстракција на DNA базиран на Edwards-овиот протокол беше промена на содржината на детергентот во пуферот за лизирање. За таа цел користевме 2% SDS и 2% N-лаурил саркозин. И двата претставуваат анијонски детергенти, со структура слична на фосфолипидните молекули на клеточната мембрана кои можат да ја имитираат таа средина и да ги отстранат липидите кои влегуваат во изградба на клеточната мембрана. Друг предизвик при нарушување на клеточните мембрани се и протеините, кои се природно вградени во мозаичниот липиден двослој, кој и кај најпростите организми претставува една комплексна, хетерогена и динамична средина.

По додавањето на пуферот за лизирање, примерокот се меша на вортекс и се центрифугира на 13.000 грм за време од 5 минути. Добиениот супернатант се префрла во чиста епендорф епрувета и се додава ист волумен на изопропанол. Примерокот се меша на вортекс, се остава во собна температура околу 2 минути а потоа следи центрифугирање на 13.000 грм време од 10 минути. Се отстранува супернатантот, додека талогот кој всушност претставува DNA молекула, се прочистува трикратно со 70% (v/v) етанол. По центрифугирање, талогот се суши на собна температура до испарување на вишокот на етанол. Талогот на DNA се раствора во соодветен волумен на TE пуфер (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Дополнително, беше воведен чекор на инкубација со лизирачки пуфер за време од 30 мин на 65 °C со константно мешање на 350 грм, како и дополнителни чекори на прочистување на талогот на DNA со еднократно испирање со 96% етанол проследено со трикратно испирање со 70 % етанол. Следна оптимизација опфати додавање на чекор на прочистување на протеините и липидите со органски растворувачи и тоа со n-хексан, хлороформ и мешавина хлороформ:изооктан (3 : 2). Талогот го ресуспендиравме во претходно загреан TE пуфер со инкубација од 3 минути на 65 °C за подобро растворање на талогот на DNA.

Екстракцијата со комерцијалниот кит GeneSpin (Eurofins, Germany) се спроведе според протоколот даден од производителот. За анализа беа користени 200 mg хомогенизиран примерок, кои се мешаат со лизирачкиот пуфер и ензимот

протеиназа K, по што следеше инкубација за време од 30 минути на 65 °C. Следен чекор е регулирање на оптималните услови за таложење на DNA, нејзино врзување за силика гел мембраната во Spin колоната, трикратно почистување на DNA молекулата врзана на Spin колоната со етанол, како и елуирање на DNA со пуфер.

Според резултатите од квантификацијата и определената интактност на екстрахираната DNA се соочивме со појава на размачкување на гел електрофореза кое може да се должи на присуство на RNA кое се ослободува заедно со DNA молекулата при лизирање на клетките. Најчесто користен метод за отстранување на RNA од DNA е третирање на екстрактот со ензим RNаза A (Tan и Yip, 2009). За подобрување на квалитетот на екстрахираната DNA, во процесот на оптимизација беше вклучен ензимот RNаза A за отстранување на RNA контаминацијата (Demeke и Jenkins, 2010). Присуството на RNA и други нуклеотиди, може да доведе до преценување на количината на DNA при квантификација со спектрофотометриски методи, поради фактот дека и двете нуклеински киселини апсорбираат на иста бранова должина од  $\lambda=260$  nm.

Третманот со ензимот RNаза A, при процесот на екстракција на геномска DNA обично се одвива откако DNA молекулата ќе се исталожи и раствори во стабилизирачки пуфер (како TE пуферот). Но во тој случај се потребни дополнителни чекори на отстранување на ензимот со повторно таложење и прочистување на DNA со што би се продолжило времето на екстракција на DNA. Во истражувања на Healey и сор. (2014) чекорот на прочистување со ензимот RNаза A кој е вметнат меѓу два чекори на екстракции со хлороформ и изоамил алкохол. Додавањето на RNаза A проследено со инкубација за време од 15 минути на температура од 37 °C, ефикасно ја разложи RNA молекулата, додека вториот чекор на екстракција со органски растворувач ќе го отстрани ензимот и нема потреба од дополнително повторно таложење и прочистување на DNA молекулата. Додека Abdel-Latif и Osman (2017) во своите истражувања за екстракција на геномска DNA од семе од пченка, третманот со ензимот RNаза A бил извршен веднаш по процесот на лизирање на температура од 65 °C за време од 10 минути.

Водејќи се според литературните податоци од претходни истражувања, прочистувањето на DNA молекулата со ензим RNаза А опфати промени во начинот на апликација на ензимот RNаза А (заедно со пуферот за лизирање, по процесот на лизирање или измеѓу два чекори на прочистување со органски растворувачи). Затоа, оптимизацијата на протоколот за екстракција на DNA е прикажан преку три различни протоколи обележани како А, В и С. Анализата на добиените резултати ќе го даде конечниот протокол на екстракција за добивање на високо квалитетна DNA за понатамошна анализа со real-time PCR.

**Протокол А** вклучува: лизирање на примерокот со претходно загреан модифициран Edwards-ов пуфер кој содржи 200 mM Tris HCl со pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA и 2% SDS (Sabriu-Naxhijaha и сор., 2020), за време од 30 минути на температура од 65 °C со константно мешање на 320 rpm вртежи. По завршување на инкубациониот период се додаваат 10 µL на RNаза А ензим (10 mg/mL) и додатно содржината се инкубира уште 15 минути на температура од 37°C. Потоа следи процес на екстракција со единечна апликација на органски растворувач (хексан/хлороформ). DNA се таложи со изопропанол а потоа следи еднократен чекор на прочистување на талогот на DNA со 700 µL етанол 96%, 5-минутна инкубација на -20°C и трикратно прочистување со 500 µL етанол 70%. Талогот се елуира во 100 µL TE пуфер претходно загреан на 65 °C, се инкубира 3 мин на 65 °C за растворање на DNA талогот.

**Протокол В** вклучува: лизирање на примерокот со претходно загреан модифициран Edwards-ов пуфер, за време од 30 минути на температура од 65 °C со константно мешање на 320 rpm. Следува чекор на отстранување на протеините и липидите со органски растворувач а на добиениот супернатант се додаваат 10µL на ензимот RNаза А (10 mg/mL) со инкубација за време од 15 минути на температура од 37 °C. Понатамошната постапка на таложење на DNA со изопропанол, прочистување со етанол, елуирање со TE пуфер и последна инкубација на 65 °C, е иста со другите два протоколи.

**Протокол С** вклучува: додавање на 10 µL на ензим RNаза А (10 mg/mL) во самиот лизирачки пуфер (модифициран Edwards-ов) потоа целата содржина се инкубира на температура од 65 °C за време од 30 минути со константно мешање на 320 rpm. Потоа следуваат два чекори на екстракција со хлороформ.

Понатамошната постапка на таложење на DNA со изопропанол, прочистување со етанол, елуирање со TE пуфер и инкубација на 65 °C е иста со другите два протоколи. Овие три главни модификации при самиот процес на оптимизација претрпеа и други промени во однос на количината на додаден ензим (5 или 10  $\mu\text{L}$ ), времето на инкубација (15 минути, 30 минути или 60 минути), температурата на инкубација (37 °C или 65 °C) сè до добивање на најчист DNA екстракт како и добар принос на геномска DNA. Според прелиминарните резултати најдобри вредности за принос и чистота добивме со протоколот C, затоа следеше оптимизација на количината и времето на инкубација со ензимот RNаза А, комбинации означени како протокол C1 до C4, прикажани во табела 3.

Табела 3. Комбинации на различен волумен и време на инкубација со RNаза А ензим

Протокол на екстракција	Услови
Протокол C1	5 $\mu\text{L}$ / 60 минути/65 °C
Протокол C2	5 $\mu\text{L}$ /30 минути /65 °C
Протокол C3	10 $\mu\text{L}$ / 60 минути /65 °C
Протокол C4	10 $\mu\text{L}$ / 30 минути /65 °C

Според добиените резултати како најоптимален протокол за екстракција на DNA од пченка и соја во сирова или процесирана форма беше протоколот C4 со следните чекори:

1. 200 mg примерок;
2. 750  $\mu\text{L}$  <sup>1</sup>модифициран Edwards-ов пуфер за лизирање (200 mM Tris HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA и 2% SDS), претходно загреан на 65°C, се меша на вортекс 30 секунди;
3. Се додава 10  $\mu\text{L}$  ензим RNаза А (10 mg/mL), се меша на вортекс 2-3 секунди;

<sup>1</sup> Забелешка: Во случај примерокот да е хигроскопен тогаш се додава поголема количина на пуфер за лизирање и соодветно поголема количина на ензим RNаза А.

4. Инкубација 30 минути / 65 °C / мешање на 320 грм;
5. Центрифугирање 5 мин / 13.000 грм;
6. Супернатантот се префрла во посебен епендорф епрувета. Се додава 1mL хлороформ;
7. Содржината се меша со превртување на епруветата, на собна температура за време од 5 минути;
8. Центрифугирање 5 мин / 13.000 грм;
9. Супернатантот се префрла во посебен епендорф епрувета. Се додава 1mL хлороформ;
10. Содржината се меша со превртување на епруветата, на собна температура за време од 5 минути;
11. Центрифугирање 5 мин/13.000 грм;
12. Супернатантот се префрла во посебен епендорф епрувета. Се додава ист волумен на изопропанол, се меша и се остава на собна температура 2 минути;
13. Центрифугирање 5 мин/10.000 грм;
14. Супернатантот се декантира;
15. Талогот се испира со 700  $\mu$ L 96% етанол;
16. Инкубација 5 мин / -20 °C;
17. Центрифугирање 5 мин / 10.000 грм;
18. Талогот се испира со 500  $\mu$ L 70% етанол;
19. Центрифугирање 1 мин / 10.000 грм;
20. Супернатантот се декантира;
21. Чекорите 18, 19 и 20 се повторуваат уште два пати;
22. Талогот се суши во воздух;
23. Талогот се ресуспендира во 100  $\mu$ L TE пуфер претходно загреан на 65 °C;
24. Инкубација 3 мин / 65 °C.

Вака екстрахираната DNA веднаш се квантифицира на NanoDrop спектрофотометар и се чува на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  за понатамошни анализи. Ефикасноста на методот на DNA екстракција ќе се процени според спектрофотометриските анализи, агарозната електрофореза и PCR ефикасноста на амплификација на *zein* генот кај пченката, *lectin* генот кај сојата и детекција на генетските елементи 35S промотор и Tnos терминатор кај двата вида на примероци.

#### 4.4. Валидација на методот за екстракција на DNA

Според спектрофотометриските анализи на добиените DNA екстракти и проценката на интактноста со агарозна гел електрофореза, како најсоодветен за добивање на висококвалитетна DNA се покажа протоколот C4. Затоа валидацијата на методот на екстракција беше изведена на DNA екстракти добиени со C4 протоколот.

Првичниот чекор на валидација на екстракција беше одредување на амплификација на таксон-специфичен ген од анализираните примероци. Во примероци од пченка беше следена амплификацијата на *zein* генот додека во примероци од соја беше одредена присуството на *lectin* ген со real-time PCR метод. За амплификација на овие таксон-специфични гени беа користени соодветни forward (предни) и reverse (реверзни) прајмери со секвенци, според Cottenet и сор., (2013) произведени од Invitrogen (Thermo Fischer Scientific) додека TaqMan пробите беа произведени од Applied Biosystems (Life Technologies) (Табела 4.)

Амплификацијата на секвенците на таксон-специфичните гени беше анализирана со real – time PCR метод на Rotor-Gene Q термосајклер (Qiagen, Германија). PCR реакционата смеса во вкупен волумен од  $25\text{ }\mu\text{l}$  се состои од  $12.5\text{ }\mu\text{l}$  на TaqMan Универзален PCR мастер микс (Thermo Fischer, Applied Biosystems, nr.4304449), соодветна количина на прајмери за добивање на конечна концентрација од  $0.9\text{ }\mu\text{M}$ , TaqMan проба со конечна концентрација од  $0.28\text{ }\mu\text{M}$  како и  $5\text{ }\mu\text{l}$  DNA матрица (Табела 5.).

Табела 4. Секвенци на forward (F) прајмери, reverse (R) прајмери и TaqMan проби за амплификација на *zein* ген и *lectin* ген

Таргетна секвенца	Олигонуклеотид	Секвенца (5' – 3')	Ампликон (bp)
	<i>Zein</i> -F	5'-GGGCTTGCCAGCTTGATG-3'	
<i>Zein</i> ген	<i>Zein</i> -R	5'-CGGTAAGGCCAACAGTTGCT-3'	60 bp
GenBank X07535	<i>Zein</i> – проба	TaqMan 5'-VIC-CGTGTCCGTCCCTG-MGBNFQ-3'	
	<i>Lectin</i> -F	5'-AACCGGTAGCGTTGCCAG-3'	81 bp
<i>Lectin</i> ген	<i>Lectin</i> -R	5'-AGCCCATCTGCAAGCCTTT-3'	
GenBank K00821	<i>Lectin</i> - проба	TaqMan 5'-6-FAM-CTTCCTTCAACTTCACC-MGBNFQ-3'	

Табела 5. Поставање на real-time PCR реакцијата за амплификација на *zein* и *lectin* ген

Реагенси	Конечна	
	концентрација во 25 µL	Волумен за една реакција (µL)
TaqMan Universal Master mix (2x)	1x	12.5
<i>Zein</i> -F / <i>Lectin</i> -F прајмер (10 µM)	0.9 µmol/L	2.25
<i>Zein</i> -R / <i>Lectin</i> -R прајмер (10 µM)	0.9 µmol/L	2.25
<i>Zein</i> / <i>Lectin</i> TaqMan проба (10 µM)	0.28 µmol/L	0.7
Вода без нуклеази	#	2.3
DNA матрица	#	5
Вкупен волумен	#	25



Real-time PCR профилот на Rotor-Gene Q термосајклерот по кој се работеше е прикажан во табела 6.

Табела 6. Услови на real-time PCR амплификацијата

Чекор	Температура	Време	Бр. на циклуси
Активација на hot-start Taq полимераза/ иницијална денатурација	95 °C	600 секунди	1 циклус
Денатурација	95 °C	15 секунди	
Анилирање и екстензија	60 °C	60 секунди	
Денатурација, анилирање и екстензија			45 циклуси

За валидација на C4 протоколот за успешна екстракција на DNA од пченка користевме прехранбени производи кои содржат пченка како пченкарно брашно, палента, пченкарен леб, корнфлекс, пуќанки и пченкарен гриз. Real-time PCR амплификацијата на *zein* генот се работеше во три повторувања за секој примерок. Истовремено се работеше и негативна контрола (NTC) и позитивна контрола која во овој случај беше DNA од референтна пченка MON89034. Амплификацијата на *lectin* генот ја одредивме во мешавина на печена соја со друг матрикс (пченка) со 10%, 1% и 0.1% процент (w/w%) на соја. Во овој случај сите примероци на соја беа работени во по шест повторувања, додека негативна контрола (NTC) и позитивна контрола која беше DNA од референтна соја GTS 40-3-2, беа работени во по две повторувања.

Дополнителна верификација на успешноста на методот на екстракција беше амплификацијата на TaqMan внатрешна позитивна контрола (IPC). Китот на претходно оптимизираните реагенси се користи за разликување на типови на негативни PCR резултати. Имено, доколку се јави негативен сигнал на амплификација на таргетната секвенца, а има позитивен сигнал на IPC контролата, тоа покажува дека во DNA примерокот нема присуство на инхибитори и дека резултатот е негативен за присуство на таргетната секвенца. Во случај кога има негативен сигнал за амплификација на таргетната секвенца и исто така негативен сигнал за IPC контролата, значи дека PCR реакцијата е инхибирана, односно тоа е лажно негативен резултат. Во нашиот случај IPC

контролата ја додадовме во количини од 2.5  $\mu$ L на 10x Eho IPC Mix и 0.5  $\mu$ L на 50x Eho IPC DNA обележана со VIC флуоресцентна боја, заедно со прајмерите и TaqMan пробата за 35S промоторот прикажано на табела 7.

#### 4.5. Скрининг на генетските модификации со real – time PCR

Покрај верификацијата за успешна екстракција на DNA од пченка и соја со C4 методот, следна цел беше детекција на генетска модификација преку скрининг на генетските елементи 35S промоторот и Tnos терминаторот. Амплификацијата на овие генетски елементи беше анализирана со real-time PCR метод, со соодветни специфични прајмери и TaqMan проби со секвенци прикажани во табела 7.

Табела 7. Секвенци на прајмери и проби за 35S промотор и Tnos терминатор земени од Waiblinger и сор. (2008)

Генетски елемент	Прајмери/ TaqMan проби	Секвенца 5'-3'	Ампликон [bp]
35S	CaMVP35S-F	5'- GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'	82 bp
	CaMVP35S-R	5' – AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT -3'	
	CaMVP35S-FAM	6FAM- CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G - QSY	
Tnos	Tnos-F	5'- CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G-3'	84 bp
	Tnos-R	5'- TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T-3'	
	Tnos-VIC	VIC- ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A- QSY	

Скринингот на генетските елементи 35S промотор и Tnos терминатор, беше изведен со duplex real-time PCR реакција во конечни концентрации прикажани на табела 8. При поставување на реакцијата користевме готов, комерцијално достапен универзален мастер микс за real-time PCR реакција кој ги содржи неопходните елементи во оптимални концентрации за успешна амплификација. Со тоа се овозможува побрзо поставување на PCR реакцијата со помалку чекори на пипетирање, редукција на контаминација, помала варијабилност на волумен меѓу реакционите тубички и порепродуцибилни

резултати. TaqMan пробата за 35S промоторот беше обележана со 6-FAM флуоресцентна боја додека на Tnos терминаторот со VIC флуоресцентна боја, што овозможува анализа на амплификацијата на двете таргет секвенци во иста епендорф епрувета.

Табела 8. Поставување на real-time PCR реакцијата за амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот во duplex real-time PCR реакција

Реагенси	Конечна концентрација во 25 $\mu$ L	Волумен за една реакција ( $\mu$ L)
TaqMan Universal Master mix (2x)	1x	12.5
Прајмер 35S-F (10 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ mol/L	0.25
Прајмер 35S-R (10 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ mol/L	0.25
35S TaqMan проба (10 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ mol/L	0.25
Прајмер Tnos -F (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ mol/L	2.5
Прајмер Tnos -R (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ mol/L	2.5
Tnos проба (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ mol/L	0.5
Вода без нуклеази	#	1.25
DNA матрица	#	5
Вкупен волумен	#	25

Временско-температурниот PCR профил по кој се работеше, опфаќа активација на ензимот Taq полимераза за време од 10 минути на температура од 95°C, потоа следуваа 45 циклуси на денатурација за 15 секунди на 95 °C, анилирање на прајмерите и екстензија на низата за време од 60 секунди на 60 °C, со читање на абсорбцијата на зелен (FAM) и жолт (VIC) канал, зависно од флуоресцентните бои со кои се обележани пробите.

Важен предуслов за успешна амплификација на специфичен таргетен ген е додавање на соодветна концентрација на DNA матрица, бидејќи и поголема концентрација на DNA матрица делува инхибиторно врз целата реакција поради недостаток на доволна количина на прајмери и проба за нормален тек на

реакцијата. Од друга страна, при ниска концентрација на DNA матрицата, бројот на таргет гени е мал, што може да резултира со добивање на лажно негативни резултати, зависно од сензитивноста на методот. За таа цел, DNA екстрактот од CRM пченка (100% ГМО) добиен со C4 методот, го разредивме со TE пуфер до концентрации од 100, 50, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.0027 ng/μl DNA, за да содржи приближно 37000, 18500, 3700, 370, 37 и 1 копии на хаплоидниот геном на пченка. Разредувањата беа анализирани со специфични прајмери и проби за *zein*, 35S и Tnos гените. Концентрациите од 100 ng/μL и 50 ng/μL беа работени во дупликат додека останатите концентрации се работеа во по шест повторувања на секое ниво на разредување.

#### 4.6. Оптимизација на параметри на real – time PCR

За елиминација на PCR инхибиторите кај повеќето методи се користи принципот на разредување на DNA екстрактот. Но, тоа не би било возможно доколку имаме примерок со мал број на копии на генот од интерес. Секако, високоинхибирани DNA примероци не можат да се разликуваат од примероци без DNA матрица или од комбинација на примерок со мал број на копии на генот од интерес и средноинхибиран примерок каде всушност нема амплификација на посакуваниот ген (King и сор., 2009). Од друга страна, разредувањето на примерокот може драстично да ја намали сензитивноста на методот за детекција на ГМ. Затоа, ефикасноста на PCR реакцијата се користи како критериум за оценување на методот за ефикасна екстракција на DNA без присуство на инхибитори (Matthes и сор., 2020). Механизмот на делување на PCR инхибиторите може да биде различен; можат да ја менуваат кинетиката на PCR амплификацијата со врзување на Mg<sup>2+</sup> јони, со врзување на таргетната DNA молекула или на DNA полимеразата. Извор на PCR инхибиторите може да биде самиот примерок на растителен материјал или реагенсите кои се користат за DNA екстракција (Demeke и Jenkins, 2010).

При процесот на оптимизација на условите за real-time PCR ги испитавме следните параметри: оптимизација на количината на TaqMan универзален мастер микс, финална концентрација на прајмери и проби по PCR реакција, менување на соодносот меѓу прајмери и проба, менување на концентрацијата на прајмери и

проба за Tnos, при што нивниот сооднос останува ист, амплификација на 35S и Tnos во singleplex или duplex real-time PCR реакции, како и менување на количината на DNA матрицата. Целта за превземање на овие чекори е добивање на ефикасност на PCR амплификацијата во рамки на оптималниот интервал од 90 до 110% (ENGL, 2015).

При оптимизација на количината на универзалниот TaqMan мастер микс пробавме три комбинации означени како мастер микс 1, 2 и 3, прикажани во табела 9. Во тек на овој процес на оптимизација, конечната концентрација на прајмерите и TaqMan пробите за 35S и Tnos остана иста како што се прикажани во табела 8. Комерцијалниот универзален TaqMan мастер микс беше 2x концентриран, па затоа во вкупен волумен од 25  $\mu\text{L}$  на PCR реакцијата би требало да се додадат 12.5  $\mu\text{L}$ . Во нашиот случај пробавме со поголема количина - 13.75  $\mu\text{L}$  (мастер микс 1) на универзален мастер микс или помала количина - 10.75  $\mu\text{L}$  (мастер микс 2). Во мастер микс 3, количината на универзален TaqMan мастер микс остана иста (12.5  $\mu\text{L}$ ), а ја намаливме количината на DNA матрица од 5  $\mu\text{L}$  на 3.25  $\mu\text{L}$ . Сите комбинации се работеа во дупликат и се следеше со „endpoint” анализа на софтверот на Rotor-Gene Q термосајклер.

Табела 9. Оптимизација на концентрација на универзален TaqMan мастер микс.

Реагенс	Мастер микс 1 ( $\mu\text{L}$ )	Мастер микс 2 ( $\mu\text{L}$ )	Мастер микс 3 ( $\mu\text{L}$ )
Универзален TaqMan мастер микс (2x)	<b>13.75</b>	<b>10.75</b>	<b>12.5</b>
35S- Forward прајмер (10 $\mu\text{M}$ )	0.25	0.25	0.25
35S- Reverse прајмер (10 $\mu\text{M}$ )	0.25	0.25	0.25
35S- проба (10 $\mu\text{M}$ )	0.25	0.25	0.25
Tnos- Forward прајмер (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	2.5	2.5
Tnos- Reverse прајмер (10 $\mu\text{M}$ )	2.5	2.5	2.5
Tnos- проба (10 $\mu\text{M}$ )	0.5	0.5	0.5
DNA матрица	5	5	<b>3.25</b>
Вода без DNA	/	3	3
<b>Вкупен волумен</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

Следен чекор на оптимизација на real-time PCR беше амплификација на секвенцата на 35S промоторот во singleplex PCR реакција со конечни концентрации во 25  $\mu\text{L}$  прикажани во табела 10.

Табела 10. Real-time PCR реакциона смеса за 35S промоторот во singleplex.

Реагенси	Конечна концентрација во 25 $\mu\text{L}$	Волумен за една реакција ( $\mu\text{L}$ )
ТaqMan универзален мастер микс (2x)	1x	12.5
Прајмер 35S-F (10 $\mu\text{M}$ )	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.25
Прајмер 35S-R (10 $\mu\text{M}$ )	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.25
35S ТаqMan проба (10 $\mu\text{M}$ )	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.25
IPC микс	#	2.5
IPC DNA	#	0.5
Вода без нуклеази	#	3.75
DNA матрица	#	5
Вкупен волумен		25

Во овој случај користевме неразреден DNA екстракт од CRM пченка MON 89034 кој при спектрофотометрирање покажа концентрација од 501.7  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , потоа истиот го разредивме до 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  и 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  со ТЕ пуфер. Конечните концентрации на прајмерите и пробата беа исти како во табела 8, додека во PCR реакционата смеса додадовме и 3  $\mu\text{L}$  внатрешна позитивна контрола (IPC) за детекција на евентуална инхибиција на PCR реакцијата. По анализа на PCR ефикасноста за singleplex PCR реакција поминавме во анализа на амплификацијата на 35S промоторот во duplex PCR реакција заедно со Tnos терминаторот во конечни концентрации како што се прикажани во табела 8.

Во multiplex PCR методите постои можност на интерференција помеѓу ампликоните кога истовремено се амплифицираат различни таргет гени. Но сепак, предизвикот за оптимизација на multiplex PCR методите е поголем во споредба со singleplex методите, пред сè заради намалување на трошоците, намалување на количина на DNA матрица за анализа, како и пократкото време за истовремена анализа на повеќе таргет гени.

При оптимизација на конечната концентрација на прајмерите и TaqMan пробата за амплификација на секвенца на Tnos терминаторот беа направени девет комбинации на поединечни услови означени како MM1 до MM9 (Табела 11). Првично амплификацијата на Tnos се постави за singleplex PCR реакција, при што конечната концентрација на прајмерите остана иста, а беше менувана коцентрацијата на TaqMan пробата. Во овие модификации означени како MM1 соодносот на прајмери и проба беше 4:1, во модификацијата MM2 соодносот беше 3:1 додека во MM3 соодносот на прајмери и проба беше 2.5:1. По анализа на Ct вредностите како и ефикасноста на PCR реакцијата беа избрани најдобрите комбинации, при што во следните чекори на оптимизација соодносот на прајмерите и пробите остана иста, но беа намалени количините на универзалниот TaqMan мастер микс, прајмерите и пробата. Во модификацијата означена како MM4 количината на универзален TaqMan мастер микс беше намален на 10.75  $\mu\text{L}$ , конечната концентрација на прајмери беше намалена на 0.48  $\mu\text{M}$ , додека на TaqMan пробата на 0.3  $\mu\text{M}$ . Во следна модификација, MM5, конечните концентрации останаа исти како MM4, само што во овој случај истовремено беше намалена и количината на DNA матрица на 3  $\mu\text{L}$ .

Во следните чекори на оптимизација, амплификацијата на Tnos секвенцата се одвиваше во duplex PCR реакција. Конечната концентрација на прајмерите и пробата за 35S промоторот останаа исти како што беа прикажани во табела 8. При модификација MM6, количината на универзалниот TaqMan мастер микс беше 12.5  $\mu\text{L}$ , беше зголемен соодносот на прајмери и проба во 5:1 додека количината на DNA матрица беше намалена на 2.35  $\mu\text{L}$ . Во следните две модификации беше додадено помала количина на универзален TaqMan мастер микс (10.75  $\mu\text{L}$ ), со ист сооднос на прајмери и проба (5:1), но со различна конечна концентрација, и тоа кај MM7 модификацијата беа 0.8  $\mu\text{M}$  и 0.16  $\mu\text{M}$ , додека кај MM8 модификацијата беа 1  $\mu\text{M}$  и 0.2  $\mu\text{M}$ , соодветно. И на крајот, при последната модификација MM9, количината на универзален TaqMan мастер микс беше 12.5  $\mu\text{L}$  за добивање 1x концентрација во вкупен волумен од 25  $\mu\text{L}$ , конечната концентрација на прајмерите беше 1.0  $\mu\text{M}$  додека концентрацијата на TaqMan пробата беше 0.2  $\mu\text{M}$ . Оптимизацијата на амплификацијата на Tnos беше изведена со 1% CRM пченка MON89034 со концентрации на DNA матрицата од 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$  и 10 ng/ $\mu\text{L}$ , работени во по три повторувања на секое разредување.

Табела 11. Оптимизација на концентрација на мастер микс, концентрација на прајмери и проба за Tnos и количината на DNA матрица.

Реагенс	MM1	MM2	MM3	MM4	MM5	MM6	MM7	MM8	MM9
Универзален TaqMan мастер микс (2x)	12.5	12.5	12.5	10.75	10.75	12.5	10.75	10.75	12.5
35S-Forward прајмер (10 µM)	/	/	/	/	/	0.25	0.25	0.25	0.25
35S-Reverse прајмер (10 µM)	/	/	/	/	/	0.25	0.25	0.25	0.25
35S-проба (10 µM)	/	/	/	/	/	0.25	0.25	0.25	0.25
Tnos-Forward прајмер (10 µM)	2.5	2.5	2.5	1.2	1.2	2.0	2.0	2.5	2.5
Tnos-Reverse прајмер (10 µM)	2.5	2.5	2.5	1.2	1.2	2.0	2.0	2.5	2.5
Tnos –проба (10 µM)	0.6	0.8	1.0	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5
DNA матрица	5	5	5	5	3	2.35	5	5	5
Сооднос Прајмер:Проба	4:1	3:1	2.5:1	4:1	4:1	5:1	5:1	5:1	5:1

Брзиот развој на нови модификации не може да биде проследен истовремено и со развој на готови китови на реагенси за секоја генетска мутација. Од друга страна тоа имплицира и големи материјални трошоци и за лабораториите кои се занимаваат со анализа на ГМ храна. Затоа, неопходен е „in-house“ развој на тестови за анализа на ГМ храна кои претходно треба адекватно да се оптимизираат и валидираат пред нивно користење за рутинска анализа. Последните години се користи пристапот на multiplex real-time PCR за анализа на генетски модифицирани организми. Еден од најголемите предизвици на multiplex real-time PCR методот е да осигура сензитивност и репродукцибилност. За да се избегнат лажно негативни резултати при скрининг на генетска модификација, високата сензитивност на методот е многу значаен параметар. Затоа развојот и оптимизацијата на multiplex PCR методот е покомплексен одколку singleplex PCR методот.

Нашето истражување беше фокусирано на оптимизацијата и валидацијата на duplex real-time PCR методот за истовремена детекција на секвенците на 35S промоторот и Tnos терминаторот и семиквантитативна проценка на генетска модификација во референтни материјали од пченка и соја. Откако го оптимизиравме методот со добивање на оптимални вредности за ефикасноста на



PCR реакцијата и факторот на корелација, истиот duplex PCR метод го валидиравме според насоките дадени од Европската мрежа на лаборатории за ГМО во соработка со Референтната лабораторија на Европската Унија за генетски модифицирана храна и храна за животни (EURL GMFF) (ENGL, 2015).

#### 4.7. Валидација на аналитичкиот метод за скрининг на ГМО

При „in-house“ валидација на метод за скрининг на генетските елементи се одредуваат параметрите на прифаќање на методот, додека параметрите на перформанс на методот се одредуваат при интерлабораториска валидација.

Параметрите за прифаќање на методот кои треба да се оценат за singleplex и multiplex квалитативни PCR методи при развој и „in-house“ валидација на методот се:

- Применливост,
- Практичност,
- Специфичност,
- Сензитивност,
- Робустност

За докажување на применливоста на методот користевме геномска DNA екстрахирана од сиров и процесирани матрикс која ги содржеше генетските елементи 35S промоторот и Tnos терминаторот. Истовремено вршевме екстракција и анализа на геномска DNA од сертифициран референтен материјал од MON89034 пченка и GTS-40-3-2 соја. Применливоста на методот го докажавме со екстракција и скрининг на DNA од различни матрикси како сирова пченка, печена соја, соин изолат, корнфлекс, говедско месо, рибино брашно, мусли, житни барови, ориз и DNA од *Salmonella spp.* При real-time PCR скрининг на генетските елементи, како позитивна контрола користевме плазмидна DNA која ги содржеше секвенците на гените од интерес. Со тоа сакавме да ја докажеме целта на методот за скрининг на генетските елементи, применливоста на методот за анализа на сирова и процесирани храна како и на геномска и плазмидна DNA.

За проценка на практичноста на методот го споредивме нашиот развиен метод со комерцијален кит за скрининг на генетските елементи, во однос на условите на работа, економските трошоци, потребата за обука на персоналот, користената опрема, како и примената за рутинска анализа на примероци.

За евалуација на специфичноста на олигонуклеотидите при одредување на присуство на *zein* ген во таксон-специфичната PCR метода, користевме DNA од различни матрикси како корнфлекс, говедско месо, рибино брашно, пченица, овесни снегулки и ориз, работени во по две повторувања. Додека за евалуација на специфичноста на прајмерите за скрининг на генетските елементи, 35S и Tnos, користевме DNA екстрахирана од рибино брашно, *Salmonella spp.* и свинско месо, кои не се очекува да содржат примеси на ГМ растителен материјал.

Евалуацијата на сензитивноста на методот беше една од главните предизвици при оптимизација и валидација на методот. Целта беше да се добие што посензитивен метод кој би можел да детектира и најмала концентрација на генетска модификација. Ова е особено значајно доколку се присутни неodobрени генетски модификации за кои не постои толеранција за нивно присуство во храна и храна за животни. При оптимизација на методот, целта беше да се добие успешна амплификација на мал број на копии (cp) на најниски Ct вредности со највисоко ниво на флуоресценција. Според литературните податоци, за успешна амплификација на таргет генот кај повеќето методи за анализа на ГМО, лимитот на детекција е 20 копии на таргет генот (ISO 21569 и ISO 21570). Со цел одредување на сензитивноста на методот за скрининг на генетските елементи, пристапивме на два начина. Првиот начин беше спајкување на ниво на примерок, на генетски немодифицирана пченка која не покажа амплификација на ниеден од генетските елементи 35S, Tnos и FMV, со точно одредена количина на сертифициран референтен материјал MON89034 (100% ГМО) со следните соодноси:

C<sub>0</sub> = 100 % ГМО

C<sub>1</sub> = 5 % ГМО 150 mg од C<sub>0</sub> (100% ГМО) + 2850 mg (немодифицирана пченка)

C<sub>2</sub> = 1 % ГМО 30 mg од C<sub>1</sub> (100% ГМО) + 2970 mg (немодифицирана пченка)

C<sub>3</sub> = 0,1 % ГМО 300 mg од C<sub>2</sub> (1% ГМО) + 2700 mg (немодифицирана пченка)

$C_4 = 0,01\% \text{ ГМО } 300 \text{ mg од } C_3 (0,1\% \text{ ГМО}) + 2700 \text{ mg (немодифицирана пченка)}$

Откако беа енергично мешани на вортекс неколку минути, тогаш од секоја мешавина на аналитичка вага прецизно беа измерени 200 mg примерок за DNA екстракција по протоколот на „in-house“ развиениот  $C_4$  метод. Сите DNA екстракти беа разредени до 100 ng/ $\mu\text{L}$  со TE пуфер. Скринингот на 35S и Tnos беше изведен во duplex PCR реакција, во по пет повторувања од секој процент на ГМ. Истоврмено беше одредено и присуството на *zein* ген во истите разредувања.

Вториот начин на евалуација на сензитивноста на методот беше спајкување на ниво на DNA. За да се избегне дилемата за присуството на инхибитори, во овој случај екстракцијата на DNA ја вршевме со комерцијално достапен кит на реагенси за екстракција на DNA (GeneSpin, Eurofins, Германија). Беше изведена екстракција на DNA од генетски немодифицирана пченка и од сертифициран референтен материјал - MON89034 (100% ГМО) пченка. Тие DNA екстракти беа измешани во следниот сооднос, со цел добивање на 1% ГМО и 0.1% ГМО:

$C_1 = 100\% \text{ ГМО DNA од CRM (MON89034)}$

$C_2 = 1\% \text{ ГМО } 1 \mu\text{L од } C_1 + 99 \mu\text{L од DNA (немодифицирана пченка)}$

$C_3 = 0.1\% \text{ ГМО } 10 \mu\text{L од } C_2 + 90 \mu\text{L од DNA (немодифицирана пченка)}$

Според насоките на Broeders и соp., (2014),  $\text{LOD}_6$  се одредува експериментално за секој PCR метод со подготовка на серија на разредувања на позитивен сертифициран референтен материјал и анализирање на секоја точка на разредувања во шест повторувања. За  $\text{LOD}_6$  на методот се смета најмалиот број на копии кога сите шест PCR поворувања се позитивни. За одредување на  $\text{LOD}_6$ , користевме DNA од 0.1% ГМО CRM добиен со спајкување на ниво на DNA, кој го разредивме со TE пуфер со цел добивање на мал број на копии на таргетниот ген 20, 10, 4, 2 и 1 копии во микролитар (cp/ $\mu\text{L}$ ). Сите нивоа на разредувања се работеа во шест повторувања и за  $\text{LOD}_6$  се зема точката со најмал број на копии каде сите шест поворувања даваат позитивен сигнал на амплификација на таргетниот ген. Истата постапка се повтори и со DNA од 1% ГМО CRM, разреден со TE пуфер за добивање 500, 100, 50, 20, 10, 5, 2 и 0,37 cp/ $\mu\text{L}$  на таргетниот ген

во позадина на 50000, 10000, 5000, 2000, 1000, 500, 200 и 37 cp/ $\mu$ L на *zein* генот. И во овој случај сите нивоа на разредување се работеа во шест повторувања.

#### **4.8. Релативна квантификација**

Принципот на релативна квантификација е одредување според соодносот (изразен во проценти) на две DNA секвенци; при што едната го претставува генот од интерес на генетски модифицираниот организам и другата е таксон-специфичната DNA секвенца (ендоген ген).

Резултатите од квантитативната анализа треба да бидат изразени како сооднос на број на таргет DNA секвенци спрема број на таксон специфична DNA пресметани во однос на хаплоиден геном (Според регулативата 1830/2003 на ЕУ што претставува клучен документ за усогласување на детекција и квантификација на ГМО).

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 5.1. Оптимизација на екстракцијата на DNA

Тргувајќи од протоколот по Edwards и *сop.* (1991) кој не може да се примени за сите видови на анализирани матрикси, приносот и чистотата на DNA екстрактот беа постепено подобрувани со измена на оригиналниот протокол со пермутации со една променлива. Добивајќи најдобри резултати со одреден протокол, следеа дополнителни прилагодувања со додавање на чекори, со цел добивање на метод кој ќе остане лесен за манипулација, ќе биде економски исплатлив, но сепак ќе даде DNA со добар квалитет. По оптимизацијата на процесот на екстракција на DNA, следеше процес на оптимизација на real-time PCR методот за скрининг на генетските елементи – 35S промоторот и Tpos терминаторот, како и валидација на истиот.

Методите на екстракција на DNA се состојат од три клучни чекори: лизирање на клетките, прочистување и обновување на DNA. Целта на овие чекори е ефикасно лизирање на клетките, денатурирање на протеинските комплекси, отстранување на биолошките и хемиските контаминации, и на крајот обновување на DNA. Наједноставните методи се базираат само на чекорот на лизирање и DNA екстрактот без прочистување, директно се аплицира во понаматошните чекори на анализа. Имено, лизата на клетки е најкритичниот чекор за да се обезбеди соодветно и успешно обновување на DNA. Тој е есенцијален чекор на сите методи на екстракција на DNA. Најголемата разлика помеѓу методите за екстракција на DNA, е чекорот на прочистување бидејќи се користат различни стратегии за денатурација на протеините и прочистување на DNA од можните соединенија кои се присутни во примерокот (Barbosa и *сop.*, 2016). За добивање на подобар квалитет на DNA, како основен пуфер за лизирање беше користен Edwards-овиот, на кој беа направени неколку модификации со употреба на различен тип на детергент и со различна концентрација. Истите модификации беа применети и кај двата матрикса. Според добиените резултати, се покажа дека типот и концентрацијата на детергент кај сива пченка немаше поголемо влијание врз приносот на екстрахирана DNA. Вредноста за принос на DNA со 0.5% SDS детергент беше 24.5 µg, со концентрација од 2% SDS даде принос од 28.1 µg, додека со 2% N-лаурил саркозин се доби принос од 25.1 µg. Но, затоа кај

печена соја, видно најголем принос на DNA екстракт добивме со пуферот за лизирање кој содржи 2% SDS и тоа 275.8  $\mu\text{g}$ , потоа следуваше 2% N-лаурил саркозин со 184.6  $\mu\text{g}$  и со 0.5% SDS детергент добивме 171.9  $\mu\text{g}$  (график 1). Овие резултати се во согласност со резултатите на Xia и сoр., (2019), кои користеле четири различни протоколи за екстракција на DNA и потврдиле дека SDS пуферот за лизирање е најефикасен за екстракција на DNA од соја, додека составот на пуферот зависи од степенот на процесирање на сојата. Сличен заклучок дале и Wang и сoр. (2012) кои најголем принос од сирова пченка и соја добиле со лизирачки пуфер со 1.4% SDS детергент, но тие користеле поразлична содржина на пуферот за лизирање (100 mM NaOAc, pH 4.8; 50 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH 8.0; 500 mM NaCl; 2% PVP; 1.4% SDS, pH 5.5) во споредба со нашиот лизирачки пуфер. Тие заклучиле дека SDS методот може да се користи за сите високо процесирани матрикси, додека СТАВ методот може да се користи само кај непроцесирани примероци како зрна од соја и пченка. До сличен заклучок дошле и Tung Nguyen и сoр. (2009) кои со модификација на Wizard метод кој содржи 1% SDS детергент, најголем принос добиле од процесирани прозиви од соја, додека СТАВ методот го препорачуваат за екстракција од сирова пченка, сирова соја и храна за животни. Спротивно на оваа констатација, Ashtrafi- Dehkordi и сoр. (2021) реферираат за најдобар принос од соин протеин, како пример на процесирани прозиви од соја, со СТАВ детергент. Според Turkes и сoр., (2016), негативно наелектризираниот SDS присутен во Edwards-овиот пуфер е поефикасен во одвојување на геномската DNA од другите компоненти на соја отколку позитивно наелектризираниот СТАВ. Тие заклучиле дека Edwards-овиот протокол е поефикасен за екстракција на високо процесирани матрикси на соја (соја сос, соино млеко) во споредба со 2% (w/v) СТАВ.

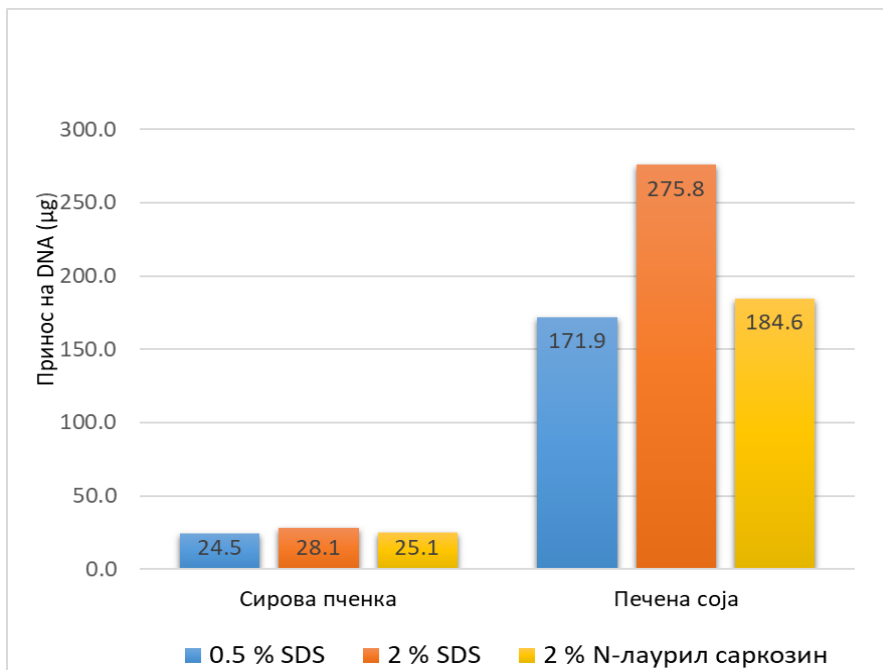


График 1. Споредба на принос на DNA од сирова пченка и печена соја со пуфер за лизирање со различна содржина на детергент

Во однос на чистотата на DNA екстрактот, во нашето истражување типот на детергент немаше значително влијание. Кај пченката, вредноста за A260/280 се движеше во интервал од  $2.03 \pm 0.11$  до  $2.07 \pm 0.02$ , додека кај сојата вредностите беа меѓу  $1.95 \pm 0.01$  и  $1.97 \pm 0.02$  (табела 12). Според резултатите на Wang и сор. (2012), најдобри вредности за A260/280 кај сирова пченка се добиени со SDS детергент во интервал од 2.0-2.1 што е во согласност со нашите резултати, додека кај сирова соја интервалот на A260/280 се движел меѓу 1.8-2.0. Други истражувачи (Tung Nguyen и сор., 2009) со пуфер кој содржи 1% SDS детергент и ензим протеиназа K, за сирова пченка добиле вредности на A260/280 од 1.8, за сирова соја 1.9, за тофу 1.9 и за соино млеко 1.7. Нашите резултати кои сè уште отстапуваат од оптималната 1.8, се индикатор дека протоколот за екстракција треба дополнително да се оптимизира.

Од друга страна, во литературата постојат податоци за погодноста на саркозилот како ефикасен детергент за лизирање на клетки, што е во согласност и со нашите резултати кога станува збор за чистота и кај двата матрикса. Чистотата на DNA со употреба на 2% N-лаурил саркозин, за односот A260/280 кај пченката изнесуваше  $2.03 \pm 0.11$ , додека кај сојата  $1.97 \pm 0.02$ . Според резултатите на истражувања на Zain Hasan и сор. (2008) при екстракција на DNA од пелин

(*Artemisia capillaris*), најчисти екстракти без остатоци од протеини и полисахариди добиле со N-лаурил саркозин, за разлика од SDS методот каде била присутна контаминација со RNA, која се забележува како размачкување на гел електрофореза. Во нашиот случај, резултатите за чистота на DNA екстрахирана од пченка и со двата пуфера укажуваат на присутна контаминација со RNA, што може да се види од односот A260/280 прикажан во Табела 12. Во слично истражување, Гресо и сор. (2014) најдобри резултати за отстранување на протеини, полифеноли и полисахариди добиле со 1% саркозил и 150 mM NaCl во пуфер за лизирање на DNA од кафеави алги. Singh и сор. (2003) предлагаат како најдобар пуфер за лизирање на матрикси богати со полисахариди како на пример кај пченица, да се користи 1% саркозил како детергент.

Табела.12. Вредности од соодносите A260/280 и A260/230 на DNA екстрахирана од сива пченка и печена соја со различни пуфери за лизирање.

Пуфер за лизирање	Сива пченка		Печена соја	
	A260/280	A260/230	A260/280	A260/230
0.5% SDS	2.06±0.05	1.55±0.24	1.96±0.02	1.61±0.13
2% SDS	2.07±0.02	1.64±0.12	1.95±0.01	1.38±0.14
2% N-lauryl sarcosine	2.03±0.11	1.37±0.31	1.97±0.02	1.47±0.01

Оригиналниот Edwards-ов протокол иако брз, без инкубација на примерокот на висока температура, сепак има ограничена употреба, само за екстракција на мали количини на DNA од растителни ткива (Edwards и сор., 1991). Следен параметар на оптимизирање на протоколот за екстракција беше додавање на чекор на инкубација заедно со пуферот за лизирање, со цел што подобро оштетување на клеточните мембрани и ослободување на нуклеинските киселини. Водејќи се од приносот на екстрахираната DNA, во понатамошните чекори на протоколот се користеше лизирачкиот пуфер со 2% SDS, претходно загреан на 65 °C, со цел да се избегне температурната разлика при почетокот на реакцијата. Потоа, следувахе инкубација на 65 °C во времетраење од 30 минути со константно мешање на 320 грм. На график 2 може да се забележи дека приносот на DNA кај сивата пченка со чекор инкубација е за 121% зголемен во



однос на екстракцијата без инкубација (од  $15.1 \pm 2.5 \mu\text{g}$  на  $33.5 \pm 1.0 \mu\text{g}$ ). Тоа е во согласност со резултатите на Abdel-Latif и Osman (2017) кои исто така најголем принос на DNA од пченка добиле при лизирање на клетките на температура од  $65^\circ\text{C}$  за време од 30 минути со мешање на 1000 rpm. Од друга страна, кај печената соја таа разлика изнесуваше само 6% (од  $168.6 \pm 9.3 \mu\text{g}$  на  $179.6 \pm 1.3 \mu\text{g}$ ). Обично при термичка обработка на сојата се користат температури од  $115^\circ\text{C}$ ,  $130^\circ\text{C}$  и  $145^\circ\text{C}$ , додека температурата на инкубација е многу пониска ( $65^\circ\text{C}$ ), па пробите остануваат нечувствителни кон дејството на таа температура. Што се однесува до чистотата на DNA, со примена на чекорот на инкубација не беа забележани поголеми разлики во однос на екстракцијата без инкубација, со средни вредности за соодносот A260/280 за пченка од  $2.04 \pm 0.03$  и за печена соја од  $1.96 \pm 0.02$ . Температурата на инкубација е значаен критериум за добивање на вискоквалитетна DNA. Од друга страна во истражувањата на Akaneme и сор. (2014), најдобри вредности на параметрите за чистота на DNA кај примероци богати со протеини и масти, добиле при клеточно лизирање со SDS пуфер на температура на инкубација од  $60^\circ\text{C}$ , независно од концентрацијата на етанолот користен за прочистување на DNA. Додека, според резултатите на истражувањата на Ramos-Gómez и сор. (2014) за времето на лизирање, подолгиот период на инкубација доведува до пониски вредности на параметрите за чистота на DNA, но има позитивно влијание врз концентрација на DNA која може да се амплифицира.

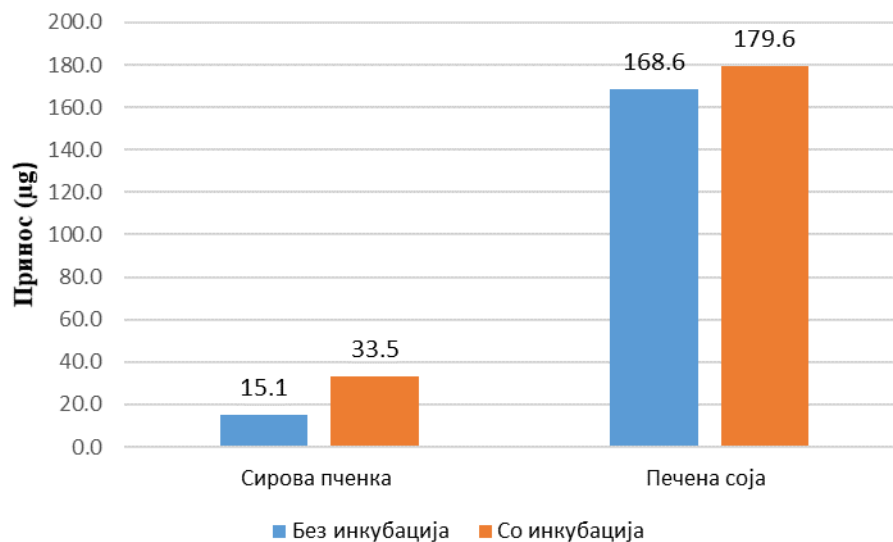


График 2. Споредба на принос на DNA со и без инкубација при клеточно лизирање

Следен чекор по лизирање на клетките, е таложење на DNA и прочистување на DNA талогот од остатоци на соединенија кои потекнуваат од самиот примерок или се користат при процесот на екстракција. За успешна PCR амплификација, чистотата на екстрахирана DNA е позначајна отколку приносот на DNA (Särkinen и сop., 2012).

Механизмот на таложење се заснова на електростатската интеракција меѓу катионите на солите и фосфатите на DNA. Всушност, DNA е двојна спирала со две негативно наелектризираните фосфатно-шеќерни оски на кои се врзуваат азотните бази, така што позитивно наелектризираните јони на калциум или натриум ќе бидат привлечени кон нивните оски. Јоните на солите и DNA добро се раствораат во вода, но послабо во етанол или изопропанол, бидејќи им е неопходен поларен растворувач за нивна дисоцијација. Затоа, додавањето на етанол или изопропанол во солен раствор, предизвикува таложење на DNA (He и сop., 2021). Користењето на изопропанол и етанол при таложење на DNA влијае врз квалитетот на добиената DNA (Hedman и Rådström, 2013) и тие можат да пречат или целосно да ја инхибираат активноста на DNA полимеразата при PCR реакција. Според протоколот даден од Green и Sambrook (2017a), таложењето на DNA подобро се изведува со изопропанол поради помалата растворливост на DNA во споредба со етанол. Особено е важно таложењето со изопропанол да се изведе на собна температура заради намалување на ризикот за копреципитација на сахароза или NaCl заедно со DNA, доколку тоа се изведува на пониска температура. Според Li и сop. (2020), изопропанолот е погоден за екстракција на DNA од примероци кои содржат протеини и полисахариди. Но, од друга страна, недостатокот на таложење со изопропанол е формирање на талог кој не се лепи за сидовите на микроцентрифугалните епрувети, па може да се губиток на DNA при отстранување на изопропанолот или плакнење на талогот со етанол. Во истражувањата на Xia и сop. (2019) при екстракција на DNA од соја, заклучено е дека изопропанолот е попогоден за таложење на DNA. Затоа, во нашиот случај за таложење на DNA користевме изопропанол.

Од литературните податоци познато е дека 96% етанол помага во агрегација на DNA и формирање на талог, додека 70% етанол овозможува отстранување на вишокот соли, а растворливоста на DNA е минимална. Според истражувањата на Oda и сop. (2016) забележано е дека во отсуство на NaCl,

талогот на DNA се создава при концентрација на етанол од 60% (v/v), додека целосно се раствора при концентрација на етанол од 80% (v/v). Со додавање на 200 mM NaCl, таложеење на DNA може да се забележи при двете концентрации на етанол. Исто така, со зголемување на концентрацијата на етанол се забележува промена на секундарната конформација на DNA од B форма во C, а потоа и во A форма.

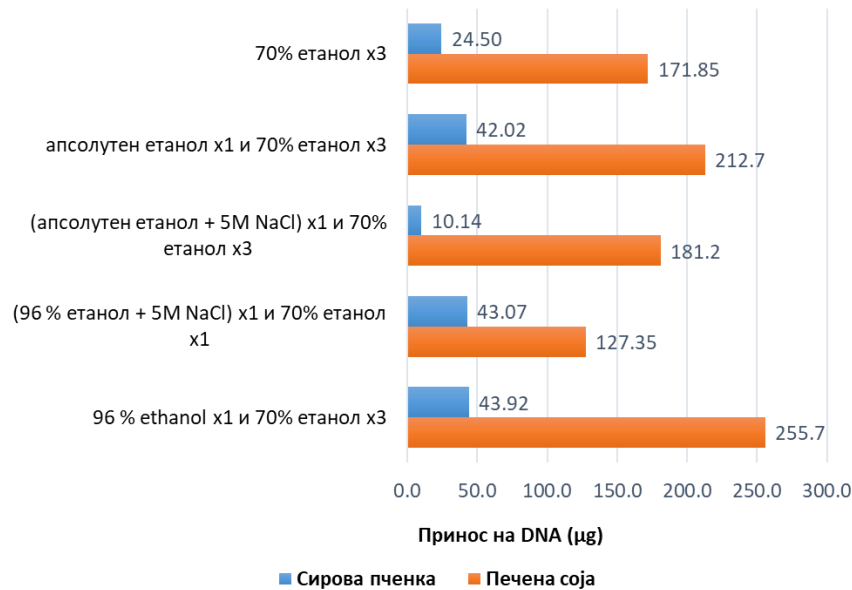


График 3. Принос на DNA по различни начини на прочистување

На график 3 се прикажани неколку начини на прочистување на добиениот DNA талог. На почетокот се обидовме само со трикратно испирање на DNA талогот со 70% етанол, а потоа следна модификација беше користење на апсолутен етанол, проследено со инкубација на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  за времетраење од 5 минути и дополнително трикратно испирање со 70% етанол. Во овој случај беше забележано подобрување на приносот на DNA од сирова пченка за околу 71% со средни вредности од 24.5 µg на 42.02 µg, додека кај сојата добивме зголемување од 24% со средни вредности на принос на DNA од 171.85 µg на 212.7 µg. Значително намалување на DNA приносот кај пченка забележавме при комбинација на апсолутен етанол со 5M NaCl (средна вредност од 10.14 µg), додека додавањето на NaCl во 96% етанол даде позитивен ефект врз приносот на DNA (средна вредност од 43.07 µg). Слични се и резултатите и во истражувањето на Abdel-Latif и Osman (2017), каде што додавањето на 2.56 M NaCl во пуферот

за екстракција, немало влијание во екстракцијата на DNA од пченка. Во нашето истражување, сличен негативен ефект врз приносот на DNA од печена соја имаше додавањето на 5M NaCl независно од користениот алкохол. Според истражувањето на Li и сор. (2020a), при оптимизација на условите за ефикасно таложеење на долга двојно-верижна DNA (пример плазмид од 10000 bp), се покажало дека најсоодветно е таложеење со изопропанол, во сооднос 1:1 со растворот на нуклеински киселини, без период на инкубација, со испирање на DNA талогот со етанол во сооднос 3:1 во однос на растворот на нуклеински киселини, и центрифугирање на 7500 xg за време од 10 минути. Но, сепак условите зависат од должината и видот на нуклеински киселини кои се екстрахираат. Интересен е фактот, дека кај плазмидната DNA продолжениот период на инкубација на ниска температура (-20 °C и 4 °C) не се покажал како корисен во однос на приносот на DNA. Додека, во однос на времето на центрифугирање, немало статистички голема разлика во приносот на DNA при центрифугирање за време од 10 минути или 1 час. Затоа, за намалување на времето за целосна екстракција, центрифугирањето по таложеење со етанол може да се скрати и на помалку од 5 минути или 2 минути. Што се однесува до брзината од 7.500 x g, Li и соработниците докажале дека таа брзина на центрифугирање е доволна за екстракција на нуклеински киселини со должина >150 bp, во споредба со анализираната 21.000 x g. Во нашето истражување, најголем принос на DNA кај сива пченка и кај печена соја добивме со еднократно прочистување со 96% етанол и трикратно прочистување со 70% етанол, додека времето на центрифугирање и брзината останаа исти - 1 минута на 10.000 rpm. Затоа, оптимизираниот процес на прочистување остана ист, додека се менуваа другите чекори на целокупниот протокол на екстракција.

Во однос на чистотата на DNA екстрактите, кај сива пченка најдобри вредности 1.97 за A260/280 и 2.09 за A260/230 добивме при еднократно прочистување со 96% етанол и трикратно прочистување со 70% етанол. Тоа кореспондира и со најголемиот принос за пченката кој го добивме со истата комбинација на алкохоли. Обратно пропорционална корелација на приносот со чистота кај пченката забележавме во комбинацијата на апсолутен етанол со 5M NaCl. Од друга страна кај печената соја, комбинацијата на апсолутен алкохол со 5M NaCl даде највисоко отстапување на соодносот A260/280 од 1.8, додека

најблиска вредност до оптималната добивме со еднократно прочистување со 96% етанол и трикратно прочистување со 70% етанол. Со оваа комбинација на алокохоли, не забележавме подобрување на соодносот A260/230 кај печена соја. Таложењето со изопропанол во некои истражувања имало позитивен ефект врз приносот на DNA од соја, но сепак негативно влијаело врз соодносот A260/230 (Xia и сор., 2019). Отстапувањето на овие индикатори на чистота од оптималните вредности сè уште е високо, што представува индикација за дополнителна оптимизација на протоколот за екстракција (Табела 13).

Табела 13. Сооднос A260/280 и A260/230 на DNA екстракти прочистени на различни начини.

	Сирова пченка		Печена соја	
	A260/280	A260/230	A260/280	A260/230
70% етанол x3	2.06	1.55	1.96	1.61
Апсолутен етанол x1 и 70% етанол x3	2.05	1.85	1.95	1.55
Апсолутен етанол + 5M NaCl x1 и 70% етанол x3	1.98	1.52	2.03	1.80
96 % етанол + 5M NaCl x1 и 70% етанол x1	2.08	1.92	1.96	1.66
96 % етанол x1 и 70% етанол x3	1.97	2.09	1.94	1.51

Со цел подобрување на чистотата на DNA екстрактот, следен чекор на оптимизација на протоколот беше додавање на чекор на отстранување на протеините и липидите со органски растворувачи. Во нашиот случај направивме проба со n-хексан, хлороформ и мешавина хлороформ : изооктан (3 : 2), кај печена соја како високопротеински матрикс кој содржи околу 40% протеини и 20% масти. Обично n-хексанот се користи како прв чекор во СТАВ методот за екстракција на DNA од матрикси кои се проблематични поради високата содржина на масти како лецитин или чоколадо (Žel и сор., 2015). За истата цел, во истражувањата на Consolandi и сор. (2008) и Piarulli и сор (2019), при екстракција на DNA од маслиново масло користеле n-хексан пред лизирање на клетките со цел обновување (recovery) на DNA од маслениот слој наместо од водениот слој како во повеќето протоколи за екстракција на DNA. Во литературата се препорачува користење на n-хексан за одвојување на водениот слој и талогот од

липидната фаза. Во истражувањата на Ramos-Gómez и сор. (2014), со некои модификации на протоколот за екстракција на DNA од растителни масла, при користење на n-хексан во пуферот за лизирање, не добиле подобрување на приносот на DNA, а се намалила и амплификацијата на екстрахирана DNA. Во литература може да се најдат податоци за користење на мешавина на изооктан со 1-октанол за екстракција на DNA во органска фаза во присуство на катјонски липофилен сурфактант, како и реверзна екстракција на DNA повторно во водена фаза при pH>9 на собна температура (Itoh и сор., 2009). Но, нема податоци дека комбинацијата на хлороформ : изооктан е користена во претходни истражувања за екстракција на DNA. На графикот 4 може да се забележи дека најголем принос кај печена соја добивме при екстракција со n-хексан (146.4 µg) во споредба со прочистувањето со хлороформ (122.7 µg) и комбинацијата на хлороформ и изооктан (126.83 µg). Во повеќето протоколи за екстракција на DNA се користи комбинација на фенол со хлороформ или фенол со хлороформ и изоамил алкохол, при што се добиваат големи концентрации на DNA (Sahu и сор., 2012; Green и Sambrook., 2017b; Gargouri и Kasem, 2018; Barbier и сор., 2019, Xia и сор., 2019). И покрај нивната токсичност и долгото време на изведување на протоколот, хлороформот и фенолот имаат предност за екстракција на DNA, особено од високо процесирани матрикси (Matthes и сор., 2020).

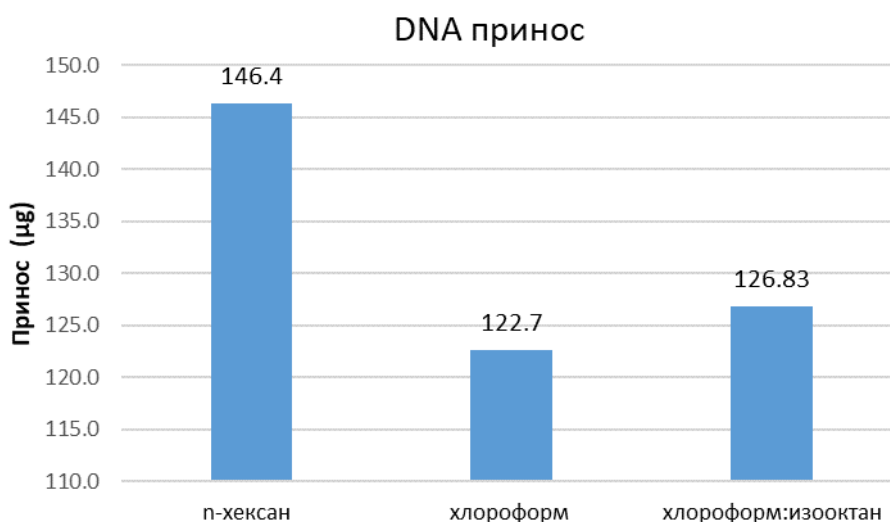


График 4. Принос на DNA кај печена соја прочистена со органски растворувачи

При анализа на чистотата на DNA екстрактите на печена соја може да се забележи дека видот на органски растворувач нема влијание врз соодносот

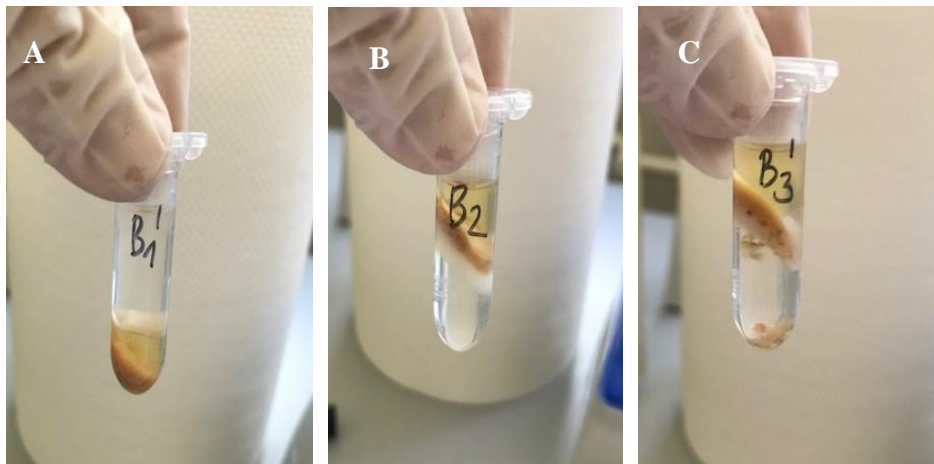
A260/280 (Табела 14). Во овој случај добиваме високи вредности (1.90 за n-хексан, 2.00 за хлороформ и 1.98 за мешавината хлороформ и изооктан). Тоа значи дека количината на нуклеински киселини кои апсорбираат на 260 nm бранова должина е поголема од количината на протеини кои имаат максимална апсорпција на 280 nm. Тоа се должи на ефикасното отстранување на протеините со сите органски растворувачи. Освен соодносот A260/280, како втор показател на чистотата на DNA се користи соодносот A260/230. Очекуваните вредности на овој параметар за „чист“ DNA екстракт се од 2.0 до 2.2. Доколку вредноста е пониска од очекуваните вредности, тоа подразбира присуство на нечистотии кои апсорбираат на 230 nm, како EDTA, гванидин HCL, јаглехидрати, липиди, соли и фенол. Но сепак, вредностите на овој сооднос како индикатор за квалитет на DNA, се дискутабилни во случај кога за елуирање на DNA се користи пуфер кој поради присуството на соли во него апсорбира на 230 nm (Lucena-Agiular и сор., 2016). Во нашето истражување најдобри вредности за соодносот A260/230 кај печена соја добивме при прочистување на DNA со хлороформ ( $1.77 \pm 0.02$ ). Тоа е во согласност и со истражувањата на Xin и Chen (2012), кои постигнале подобар квалитет на екстрахирана DNA по додавање на чекор со хлороформ, кој ги отстранува полисахаридите, липидите и другите неполарни супстанции од водениот слој, со што резултира со почист DNA екстракт.

Табела 14. Вредности за A260/280 и A260/230 на DNA екстракт од печена соја.

Органски растворувач	A260/280	A260/230
n-хексан	$1.90 \pm 0.03$	$1.31 \pm 0.12$
хлороформ	$2.00 \pm 0.01$	$1.77 \pm 0.02$
хлороформ : изооктан	$1.98 \pm 0.01$	$1.61 \pm 0.04$

При споредување на густината на n-хексан ( $655 \text{ kg/m}^3$ ) и хлороформ ( $1490 \text{ kg/m}^3$ ) со густината на вода ( $997 \text{ kg/m}^3$ ), може да се забележи дека кај n-хексанот органскиот слој поради помалата густина ќе остане на површината, во интермедиерниот слој останува цврст остаток од примерокот, додека водениот слој во кој што се раствора и DNA молекулата ќе биде во долниот дел од епендорф епруветата (Слика 6A). За пипетирање на водениот слој ќе треба со

наставак од микропипета да се пробијат двата слоја со што се зголемува веројатноста за контаминација на DNA со остатоци од органски растворувач и примерок. Од друга страна, при екстракција со хлороформ, после центрифугирањето, поради поголемата густина во споредба со водата, органскиот слој ќе биде во долниот дел од епендорф епрувета, па горниот воден слој може да се пипетира без големи грешки и со помала веројатност за контаминација (Слика 6B). Исто поставување на слоевите се јавува и при користење на мешавина на хлороформ и изооктан. Полесната манипулација во лабораторија како и помалата концентрација на соли и нечистотии кои абсорбираат на 230 nm, беа предности за користење на хлороформ во следните чекори на оптимизација на протоколот за DNA екстракција, како единечен чекор на прочистување или двојна екстракција на липидите и протеините.

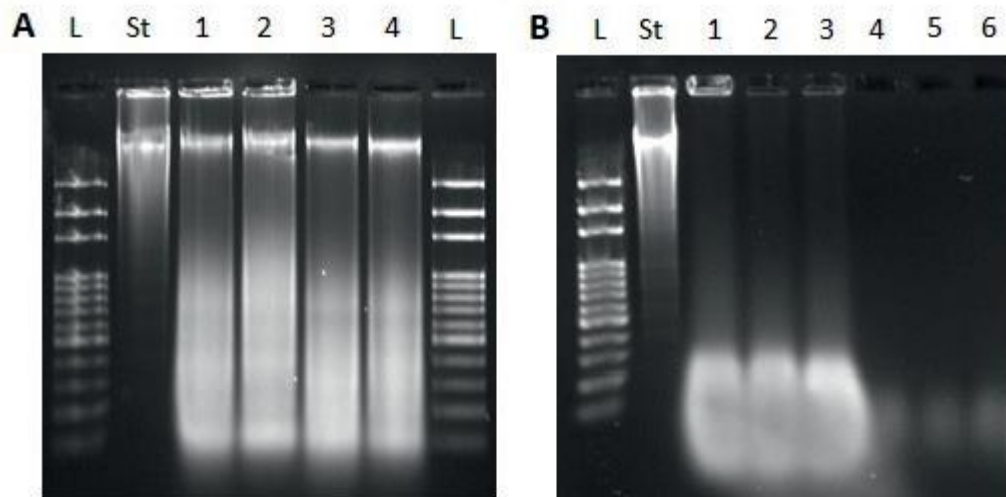


Слика 6. Прочистување на DNA екстрактот со органски растворувач. А. n-хексан; В. хлороформ; С. хлороформ: изооктан (3:2)

При одредување на интактноста на геномската DNA со агарозна електрофореза, беа забележани јасно дефинирани ленти на DNA со високомолекуларна маса кај пченката (Слика 7A), додека кај сојата се јавува размачкување на лентите (Слика 7B). Тоа може да се должи и на типот на примерок од кој се екстрахира DNA. Во нашиот случај пченката беше сирова, затоа DNA е сочувана во нејзината нативна форма, додека печената сојата е средно процесирана храна, па затоа и при самата термичка обработка може да настане фрагментација на геномската DNA. Тоа е во согласност со резултатите на



Tung Nguyen и сор. (2009) за DNA екстракција од соино млеко, како пример на високо процесирани прозивод од соја, каде со примена на 1% SDS и СТАВ – базирани пуфери за лизирање, се добил низок принос и со најдеградирана DNA молекула на агарозна гел електрофореза. Кај пченката и покрај тоа што сите протоколи на екстракција дадоа јасно дефинирани ленти на DNA со високомолекуларна маса, сепак се јавува размачкување во долниот дел на гелот што според литературни податоци може да се јави поради присуство на RNA како нечистотија. За надминување на истиот проблем кој се јавува и кај печена соја, пробавме со прочистување на DNA екстрактот со силика гел колони, но во овој случај приносот на DNA драстично се намали. Затоа предизвикот за оптимизација на екстракција на висококвалитетна DNA продолжи со додавање на ензим RNаза А во различни чекори на протоколот.



Слика 7. Проценка на интактноста на DNA со агарозна гел електрофореза. **А.** Сирова пченка. Линија L-скала, St-DNA стандард, 1-2 DNA од пченка без чекор на инкубација, 3-4 DNA од пченка со инкубација; **В.** Печена соја, L-скала, St-DNA стандард, 1- екстракција со п-хексан, 2- екстракција со хлороформ, 3-екстракција со мешавина хлороформ : изооктан (3:2); 4,5,6 –примероци 1,2,3 прочистени со колона.

Ензимот RNаза А ќе ја разложи RNA молекулата доколку таа се добие при екстракција на геномска DNA. Но, предизвикот беше во кој чекор од протоколот да се додаде. Затоа експериментиравме на неколку начини, со развивање на три протоколи (А, В и С). Според протоколот А, ензимот RNаза А беше додаден веднаш после лизирање на клетките; според протоколот В, ензимот RNаза А беше додаден помеѓу двата чекори на прочистување со органски растворувач и при

протоколот С, ензимот RNаза А беше додаден во самиот лизирачки пуфер, по што заедно се инкубираа на 65 °C за време од 30 минути.

На табела 14 се прикажани резултатите за принос на DNA и соодносот A260/280 со протоколи на екстракција без и со додавање на ензимот RNаза А. При споредба на протоколот без и со RNаза А прочистување, кај сојата се забележа видно намалување на приносот на DNA при екстракција со протоколот А (од 116.57±8.15µg на 76.6±2.15 µg), со протоколот В речиси двојно се зголеми приносот (185.58±7.23µg), додека со протоколот С забележавме четирикратно зголемување на DNA приносот (469.6±3.38).

Во однос на чистота на DNA екстрактите, соодносот A260/280 кај протоколите со и без RNаза А забележавме намалување на вредностите кај двата испитувани примероци независно од чекорот на додавање на ензимот. Тоа значи, дека при спектрофотометриско одредување на концентрацијата на DNA кај екстрактите без RNаза А прочистување, на 260 nm заедно со DNA молекулата апсорбирала и RNA молекулата. Кај пченката додавањето на ензимот RNаза А незначително го зголеми приносот на DNA (од 28.02 µg на 31.43 µg), додека вредноста на A260/280 се намали (од 1.94 на 1.63), додека кај сојата најблиска вредност до оптималната се доби со протоколот С (1.78) (Табела 15).

Табела 15. Споредба на принос на DNA и соодносот A260/280 добиени со различни протоколи со RNаза А прочистување.

Протокол на екстракција	Пченка		Соја	
	Принос (µg)	A260/A280	Принос (µg)	A260/A280
Без RNаза	28.02±1.24	1.94±0.03	116.57±8.15	2.04±0.03
Протокол А	n.a	n.a	76.6±2.15	1.70±0.03
Протокол В	n.a	n.a	185.58±7.23	1.71±0.02
Протокол С	31.43±2.01	1.63±0.04	469.6±3.38	1.78±0.01

\* n.a – не се анализирани

Во истражувањата на Xia и сор. (2019) при екстракција на DNA од сирова соја, со SDS пуфер за лизирање, ензимот RNаза А е додаден откако DNA ќе се

раствори во ТЕ пуфер, проследено со инкубација на 37 °C за време од 30 минути, по што следува уште еден чекор на прочистување со органски растворувач (хлороформ и изоамил алкохол) за отстранување на ензимот и повторно таложење на DNA со етанол. Температурата на инкубација е слична како во протоколите А и В (37 °C), додека времето на инкубација е двојно подолга (30 минути) во споредба со нашите истражувања. За разлика од нас, Salgotra и Chauhan (2020) во своите истражувања за отстранување на RNA користеле дури 300 µL ензим RNаза (10mg/mL) со инкубација од 1 час на 37 °C. Во истражувањата на Abdel-Latif и Osman (2017), при екстракција на DNA од пченка, како продолжеток на процесот на лизирање на клетките за време од 1.5 час на температура од 65 °C, тие додавале 20 µL ензим RNаза А (10 mg/mL) со инкубација на иста температура (65 °C) за време од 10 минути. За споредба, ние во нашиот протокол С заедно со пуферот за лизирање додававме двојно помала количина на ензим RNаза А (10 µL). Во истражувањето на Trifa и Zhang (2004), протоколот за екстракција вклучувал лизирање со СТАВ детергент со 10 µL RNаза А (20 mg/mL) за време од 30 минути на 65 °C (услови слични на нашиот протокол С заедно со различен детергент). Односот на DNA од одредено ткиво во споредба со вкупна DNA може да биде неточен доколку пуферот за лизирање поефикасно ја екстрахира DNA од едно ткиво во споредба со другите. Слични соодноси за принос добиле и со 0.5% SDS детергент на истите ткива и со тоа се елиминира можноста пуферот поефикасно да ја екстрахира DNA од различни ткива. Тоа индицира дека, при екстракција на DNA од целите зрна на пченка, околу 50% на DNA потекнува од ендоспермот, додека другите 50% се од ембрионот (Trifa и Zhang, 2004). Различната природа на овие два дела, но и поголемата содржина на скроб во ендоспермот, доведуваат до ниски приноси на екстрахирана DNA при користење на цели зрна. Ендоспермот содржи два хаплоидни геноми од мајката и еден хаплоиден геном од таткото, додека ембрионот содржи еден хаплоиден геном од мајката и еден хаплоиден геном од таткото. Во достапната литература може да се најде и истражувањето на Sanjuan-Badillo и сор. (2014), во кое со мануелна дисекција на ембрионот, приносот на DNA бил зголемен за 20 пати. Ембрионот бил користен како идеален експериментален примерок, но не се предлага како ткиво за рутинска анализа на пченка, туку може да биде користен за посебни индивидуални анализи на растенијата.

Поради полиплоидноста на растенијата при екстракција на DNA од растителни ткива може да се добие солиден принос. Главниот проблем при екстракција на DNA од растителни ткива е присуството на јаглехидрати, фенолни соединенија или други биоактивни компоненти кои делуваат инхибиторно на Taq полимеразата при понатамошна анализа со real-time PCR метод. Од друга страна и големата количина на DNA делува инхибиторно на полимеразата поради ограничената концентрација на прајмери што се додаваат во самата реакција. Затоа чистотата на DNA екстрактот ни беше главна цел на оптимизација при развивање на овој протокол на екстракција. Според резултатите прикажани на табела 15, протоколот C даде најдобри резултати за принос и чистота на DNA, и за пченката, и за сојата. Затоа, следен чекор беше оптимизација на количината и времето на инкубација со ензимот RNаза A, при што комбинациите се означени како протокол C1 до C4. За таа цел се користеше ензим RNаза A во количина од 5 и 10  $\mu\text{L}$ , и времетраење на инкубација од 30 и 60 минути. Температурата на инкубација остана иста и изнесуваше 65 °C. Од добиените резултати прикажани на табела 16, може да се забележи дека волуменот на ензимот и времето на инкубација не влијаат врз приносот и чистотата на DNA од пченка, односно нема поголеми разлики. Вредностите за чистота се движеа помеѓу 1.65 и 1.61. Sanjuan-Badillo и сор. (2014) во своите истражувањата го анализирале влијанието на ткивото од пченка врз чистотата на DNA екстракт. Тие користеле две модификации на протоколи кои се слични со нашиот протокол C, само со различен режим на време и температура: метод 2. со инкубација од 10 минути на 65 °C и метод 5. со инкубација од 30 минути на 37 °C. Од сите наши протоколи се разликува методот 4., каде што третманот со ензимот RNаза се изведувал после растворање на DNA во TE пуфер. Имено, кај методот 2. ткивото имало големо влијание врз чистотата на DNA екстрактот, бидејќи за DNA од цело зрно за A260/280 соодносот добиена е вредност од  $4.0 \pm 0.72$  додека за DNA од ембрион  $1.7 \pm 0.02$ . Според метод 5. со инкубација на 37 °C, од двете ткива добиени се солидни вредности за соодносот A260/280 ( $1.77 \pm 0.03$  за цели зрна и  $1.8 \pm 0.03$  за ембрион). Тоа значи дека во протокол сличен на нашиот протокол C, времето и температурата на инкубација не влијаат врз чистотата на DNA доколку се користи ембрион од пченка, но не и цели зрна пченка. Сепак, ние добивме слични вредности за соодносот A260/280 кај цели зрна пченка, со протокол C2 со

инкубација 65 °C, но за време од 30 минути (Табела 5.). Слично на нашите резултати, Sanjuan-Badillo и соработниците при прочистување со RNаза после растворање на DNA во TE пуфер добиле вредности за A260/280 блиски до оптималните (1.7±0.01 за цели зрна и 1.9±0.3 за ембрион од пченка).

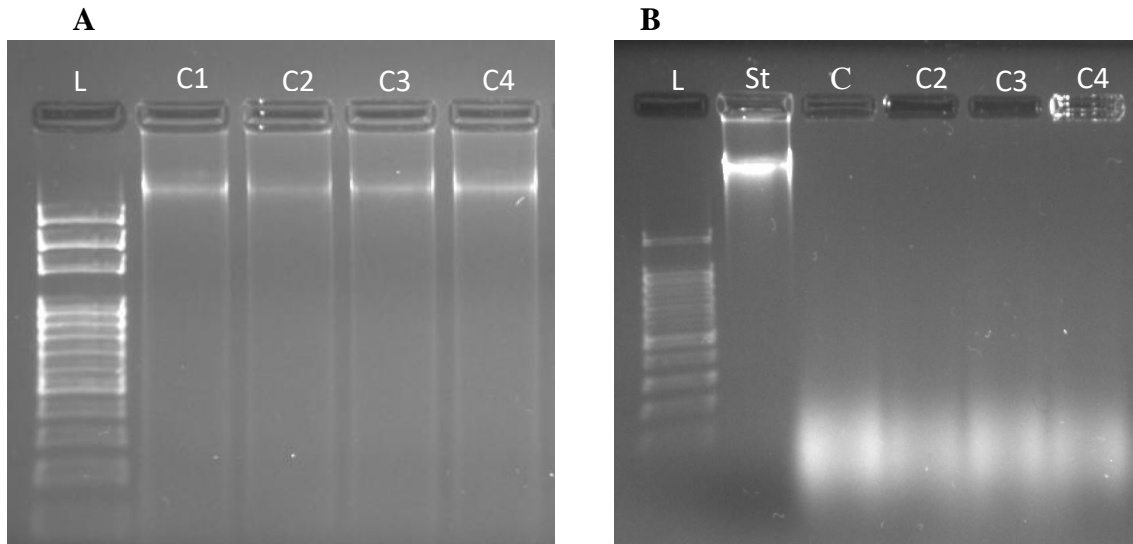
Табела 16. Принос и сооднос A260/280 кај фини оптимизации на протоколот C споредено со комерцијален кит.

Протокол на DNA екстракција	Пченка		Соја	
	Принос (µg)	A260/A280	Принос (µg)	A260/A280
Протокол C1	31.4±1.60	1.61±0.03	301.7±0.71	1.72±0.01
Протокол C2	25.4±0.24	1.65±0.01	396.4±0.48	1.74±0.01
Протокол C3	26.97±0.32	1.63±0.01	444.1±1.23	1.71±0.01
Протокол C4	26.05±0.04	1.61±0.01	469.5±3.39	1.78±0.01
Gene Spin комерцијален кит	45.2±0.08	2.08±0.01	269.1±0.64	2.01±0.01

Во нашите резултати, кај сојата најголем принос и чистота добивме со C4 протоколот кој вклучува волумен од 10 µL ензим RNаза А додаден на самиот пуфер за лизирање, со инкубација во времетраење од 30 минути на температура од 65 °C. При споредба на чистотата на DNA екстрактот со C4 методот со комерцијален кит за екстракција на DNA (Gene Spin, Eurofins, Германија), може да забележиме дека во нашиот случај вредноста на A260/280 е најблиска до оптималната вредност од 1.8, за разлика од Gene Spin китот на реагенси, каде вредноста за A260/280 изнесуваше 2.01±0.01. Покрај поголемите економски трошоци, комерцијалните китови за екстракција на DNA се ограничени и во однос на количината на почетен материјал за анализа (20-200 mg). Во случај кога приносот на DNA е многу низок тогаш се препорачува зголемување на количината на почетниот материјал, па во тој случај „in-house“ развиените методи се посоодветни при повеќе материјал за анализа (Demeke и Jenkins, 2010).

Интактноста на DNA екстрактите се анализираше и по третирање на примероците со ензимот RNаза А. На слика 7, прикажани се резултатите од агарозната гел електрофореза. Кај сива пченка можат да се забележат убаво

одвоени ленти на високомолекуларна геномска DNA (слика 8A) додека кај печена соја како процесирана храна се забележува размачкување на лентата на DNA (Слика 8B). Тоа може да се должи на самиот процес на термичка обработка на сојата што довело до фрагментација на геномската DNA, па затоа не можеме при овие услови на електрофореза да добиеме јасно дефинирани фрагменти на DNA.



Слика 8. Интактност на DNA екстрахирана со оптимизациите на протокол С. **А.** сирова пченка, **В.** печена соја, L- скала, St –DNA стандард, C1 – C4 протоколи.

Доколку ги анализираме сликите од гел електрофореза пред (слика 7) и после третман со ензимот RNаза (слика 8), може да забележиме дека кај пченката веќе го нема размачкувањето кое беше присутно во долниот дел од гелот кај фрагментите со помала молекуларна маса, а лентите на геномската DNA се појасно видливи. Тоа е во согласност и со резултатите на Sanjuan-Badillo и сор. (2014) кои добиле посебни ленти со високомолекуларна маса при екстракција на DNA од суви зрна на пченка третирани со ензимот RNаза после растварање на DNA во TE пуфер или заедно со пуферот за лизирање како во нашиот протокол С. Тоа значи дека независно од чекорот на додавање на ензимот RNаза, се добива интактна DNA молекула од пченка, но зависи од кое ткиво се изведува екстракцијата на DNA (суви листови, свежи листови, суви зрна, цело зрно или ембрион од зрно). Кај примерокот од печена соја, видно е подобрена сликата на агарозната гел електрофореза, по отстранување на RNA молекулата. Иако пробите се прочистени со ензим, сепак не се јавуваат точно дефинирани ленти на DNA при овие услови на агарозна електрофореза. Во високопроцесирани примероци,

размачкувањето кај фрагментите со помала молекулска маса е доказ за зголемена деградација на DNA (Turkes и сор., 2016). Тоа е во согласност со истражувањето на Nikolić и сор. (2017), каде механичката манипулација и термичкиот третман имале поголем ефект во деградација на DNA при производство на тофу, отколку вриењето и додавањето на концентриран раствор на соли. Во овој случај попогоден бил трансгенот на Roudup ready соја, отколку самиот *lectin* ген. Од друга страна и користењето на кисели или базни реагенси при преработка на соја, како и последователните чекори на екстракција со етанол, можат да доведат до фрагментација на DNA и намалена видливост при агарозна гел електрофореза. Во истражувањето на Du и сор. (2020) било констатирано дека помалите таргети во *lectin* и *cp4 epsps* гените се постабилни отколку подолгите таргети при процесирање на храна. Дистрибуцијата на DNA фрагментите според должината се разликува зависно од степенот на процесирање дури и кога се користи иста суровина.

## **5.2. Валидација на C4 протокол за екстракција на DNA од пченка и соја со real-time PCR**

### **5.2.1. Скрининг за присуство на *zein* и *lectin* ген**

При анализа на екстрахирана DNA, освен приносот и чистотата, важно е таа да биде погодна за понатамошна анализа со real-time PCR за детекција на специфични гени. PCR реакцијата е доста разновидна и може да толерира мали контаминации на DNA независно од методот за екстракција. Сепак, квалитетот на DNA е поважен фактор отколку квантитетот при одредување на оптимален метод за екстракција (Tung Nguyen и сор. 2009). Затоа за верификација на успешна екстракција на DNA од пченка и соја беше изведена real-time PCR анализа на присуство на *zein* генот од пченката и *lectin* генот од сојата, со екстракција на DNA од различни матрикси. Нашите резултати прикажани во табела 17, покажуваат специфична амплификација на *zein* генот во екстрахирана DNA со метод C4 во прехранбени продукти кои содржат пченка како пченкарно брашно, палента, пченкарен леб, корнфлекс, пуканки и пченкарен гриз работени во по три репликати. Истовремено работевме и негативна контрола (NTC) и позитивна контрола која представува DNA од сертифициран референтен материјал од

пченка. Во нашиот случај *zein* генот го одредивме како singleplex real-time PCR реакција со проба обележана со VIC флуоресцентна боја. За разлика од нас Branquinho и sor. (2013), *zein* генот го одредиле во duplex заедно со 35S промоторот во пченкарно брашно и начо чипс земени по случаен избор на пазарот во Бразил и во сертифициран референтни материјал MON 810. Ефикасноста на екстракција на DNA од овие продукти била докажана преку успешна амплификација на *zein* генот (*Ze 1*) со специфични прајмери ZE01/ZE02.

Табела 17. Амплификација на *zein* ген во продукти од пченка работени во по три повторувања.

No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A. Yellow
28	Grey	NTC zein	Negative Control		No Reaction
29	Grey	NTC zein	Negative Control		No Reaction
30	Light Grey	PC zein	Positive Control		Reaction
31	Dark Grey	PC zein	Positive Control		Reaction
32	Black	proba 1	Unknown		Reaction
33	Red	proba 1	Unknown		Reaction
34	Yellow	proba 1	Unknown		Reaction
35	Blue	proba 2	Unknown		Reaction
36	Purple	proba 2	Unknown		Reaction
37	Pink	proba 2	Unknown		Reaction
38	Light Blue	proba 3	Unknown		Reaction
39	Teal	proba 3	Unknown		Reaction
40	Light Red	proba 3	Unknown		Reaction
41	Green	proba 4	Unknown		Reaction
42	Magenta	proba 4	Unknown		Reaction
43	Black	proba 4	Unknown		Reaction

(Continued on next page)...

No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A. Yellow
44	Cyan	proba 6	Unknown		Reaction
45	Gold	proba 6	Unknown		Reaction
46	Light Green	proba 6	Unknown		Reaction

За одредување на *lectin* генот беше користена печена соја во мешавина со друг матрикс (пченка) за добивање на различен процент (w/w%) на соја во прехранбени продукти. DNA од мешавините подготвени со 10%, 1% и 0,1% соја, беше екстрахирана по C4 протокол. На график 5 е прикажана амплификацијата на *lectin* генот во сите мешавини на соја. Поради сензитивноста на методот и грешката при пиетирање, примерокот број 45 на график 5 не покажува



амплификација на генот од интерес. Но, тоа не ја намалува сензитивноста на методот, бидејќи и пониски количини на соја во мешан матрикс како што е во нашиот случај (0.1%), можат со сигурност да се детектираат. Тоа е во согласност со резултатите на Tung Nguyen и сор. (2009), кои добиле успешна амплификација на *zein* и *lectin* гените во матрикси од пченка и соја, независно од методот на екстракција на DNA. Други автори (Branquinho и сор., 2012) за одредување на амплификацијата на *lectin* ген користеле прехранбени продукти од соја добиени со различен процес на процесирање како текстуриран соја протеин, храна за доенчиња, соино млеко во прав како и CRM Roundup ready соја (5%). И во овој случај *lectin* генот бил одреден со duplex real-time PCR заедно со 35S промоторот, со TaqMan китот за детекција на ГМО. Отсуството на инхбитори било демонстрирано со успешна амплификација на *lectin* генот (*Le 1*) во DNA екстрахирана од 0% CRM и три немодифицирани соја продукти. Успешната амплификација на DNA фрагментот од 118 bp од *lectin* генот во сите анализирани примероци од соини прозиви, како соино брашно, соја крем, соино млеко и тофу, било доказ за успешна екстракција на DNA (Mandaci и сор., 2014). И кај нив скринингот на ГМО се засновал на детекција на секвенца на 35S промоторот и Tnos терминаторот.

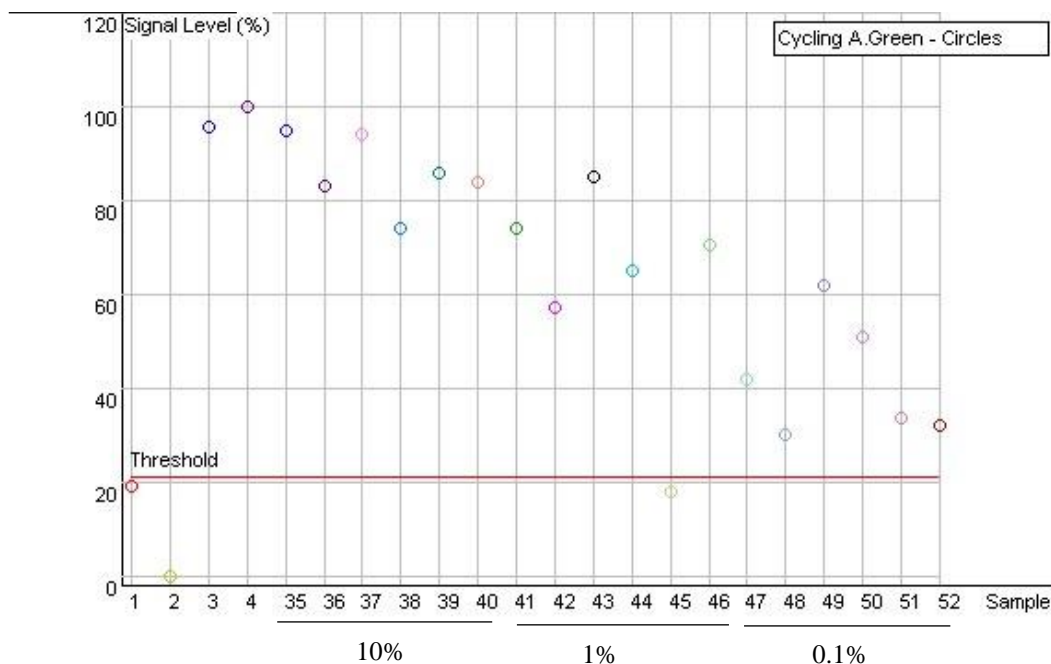


График 5. Амплификација на *lectin* ген во мешан матрикс со различен процент на соја (10%,1% и 0.1%) работени во по шест репликати (1,2 – Негативна контрола; 3,4 – позитивна контрола; 35-40 -10% ГМ соја; 41-46 – 1% ГМ соја; 47-52 - 0.1% ГМ соја).

### 5.2.2. Амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот во DNA од пченка и соја екстрахирани со протокол C4

Покрај верификацијата за успешна екстракција на DNA од пченка и соја со C4 методот, следна цел беше детекција на генетска модификација преку скрининг на генетските елементи 35S промотор и Tnos терминатор. Првично, DNA екстрактот беше анализиран во концентрации од 100 ng/ $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L и 10 ng/ $\mu$ L, работени во по две повторувања. Притоа, добивме позитивен сигнал за амплификација на 35S промоторот и на Tnos терминаторот во сите анализирани концентрации на DNA од пченка, како што е прикажано на график 6 .

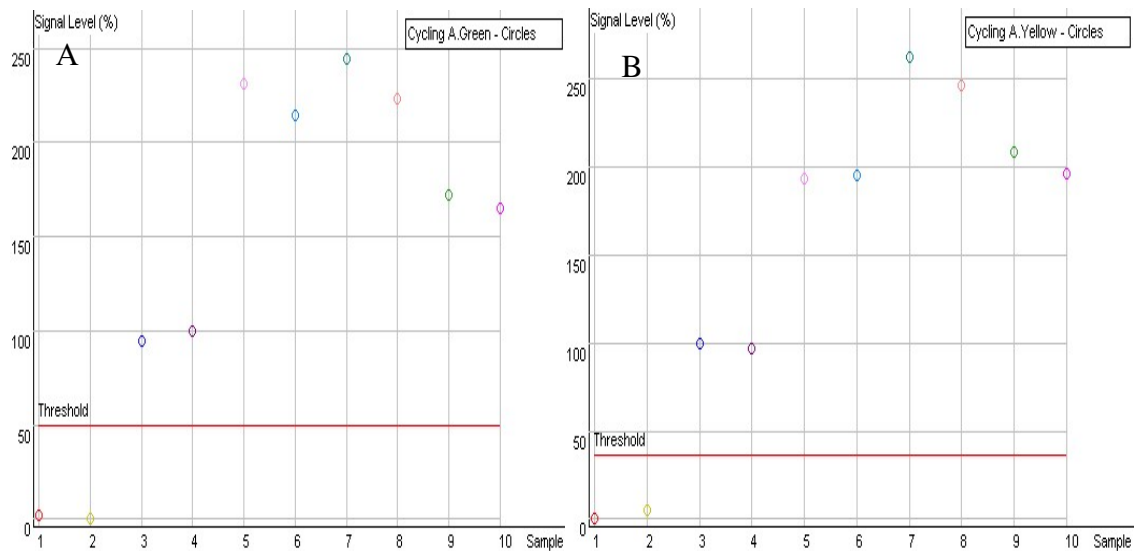


График 6. Амплификација на генетските елементи во DNA од пченка екстрахирана со C4 метод. **A.** 35S промоторот; **B.** Tnos терминатор. (1,2 –негативна контрола; 3,4-позитивна контрола; 5,6 - 100 ng/ $\mu$ L; 7,8- 50 ng/ $\mu$ L; 9,10-10 ng/ $\mu$ L).

Како што е прикажано на графикот 6B при амплификација на Tnos терминаторот при концентрација на DNA од 100 ng/ $\mu$ L, нивото на флуоресцентниот сигнал е понизок во споредба со другите две концентрации на DNA. Тоа може да се должи на присуство на инхибитори кои ја намалуваат ефикасноста на ензимот Taq полимераза, додека во случај кога беа користени 50 ng/ $\mu$ L и 10 ng/ $\mu$ L, со самото разредување на примерокот се намалува и количината на инхибитори во примерокот.

На график 7 се прикажани резултатите од анализа на примерокот од соја, при што може да се забележи дека кај сите анализирани концентрации на DNA екстрахирана со C4 метод е евидентна амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот.

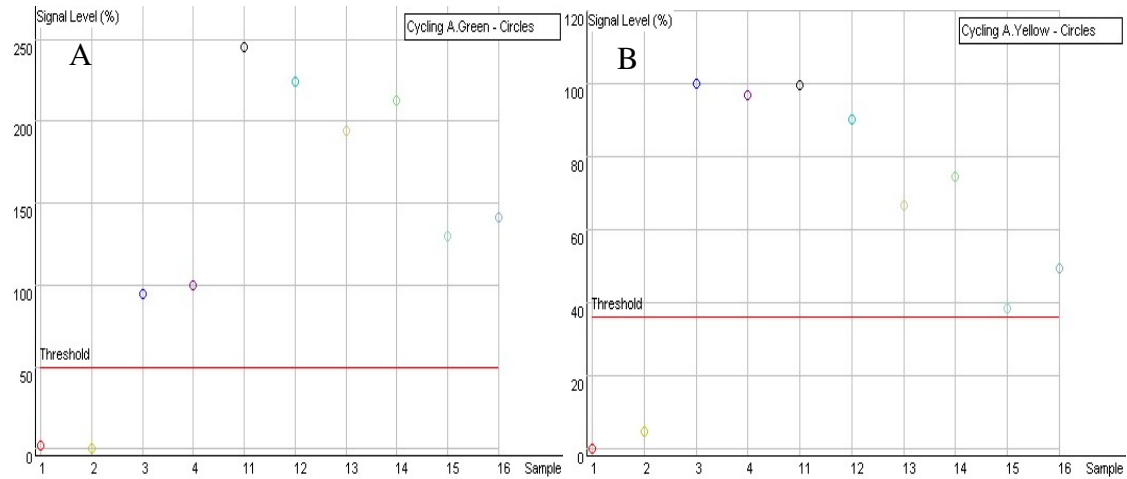


График 7. Амплификација на генетските елементи во DNA од соја екстрахирана со C4 метод. **А.** 35S промоторот; **Б.** Tnos терминатор (1,2-негативна контрола; 3,4-позитивна контрола; 5,6 - 100 ng/ $\mu$ L; 7,8- 50 ng/ $\mu$ L; 9,10-10 ng/ $\mu$ L).

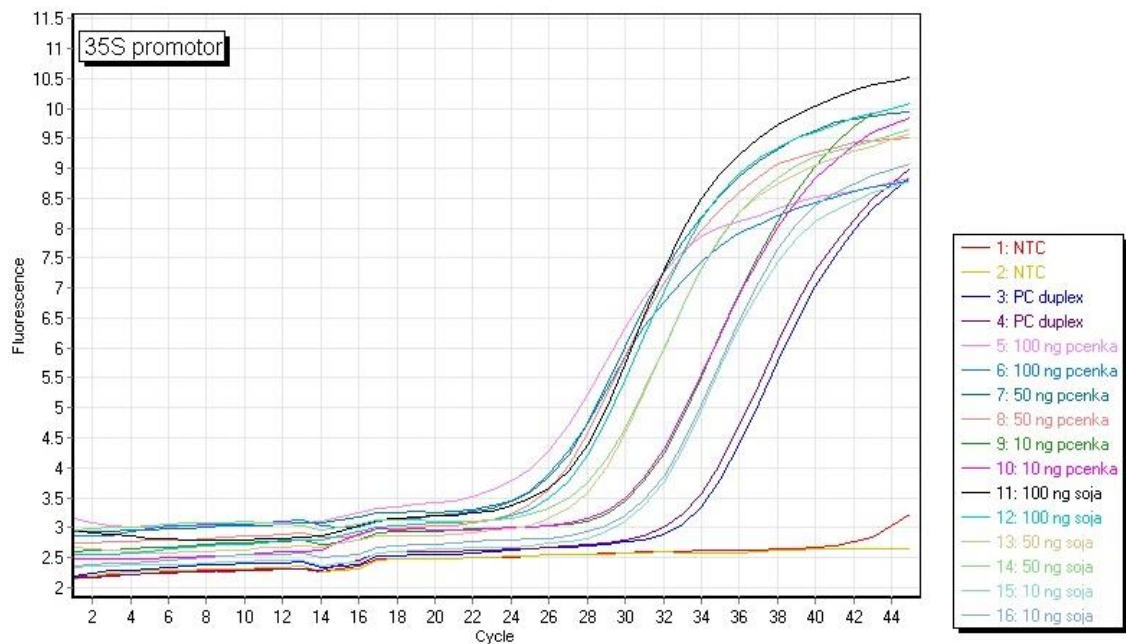


График 8. Амплификација на 35S во DNA од пченка и соја екстрахирана со C4 метод во концентрации од 100,50 и 10 ng/ $\mu$ L.

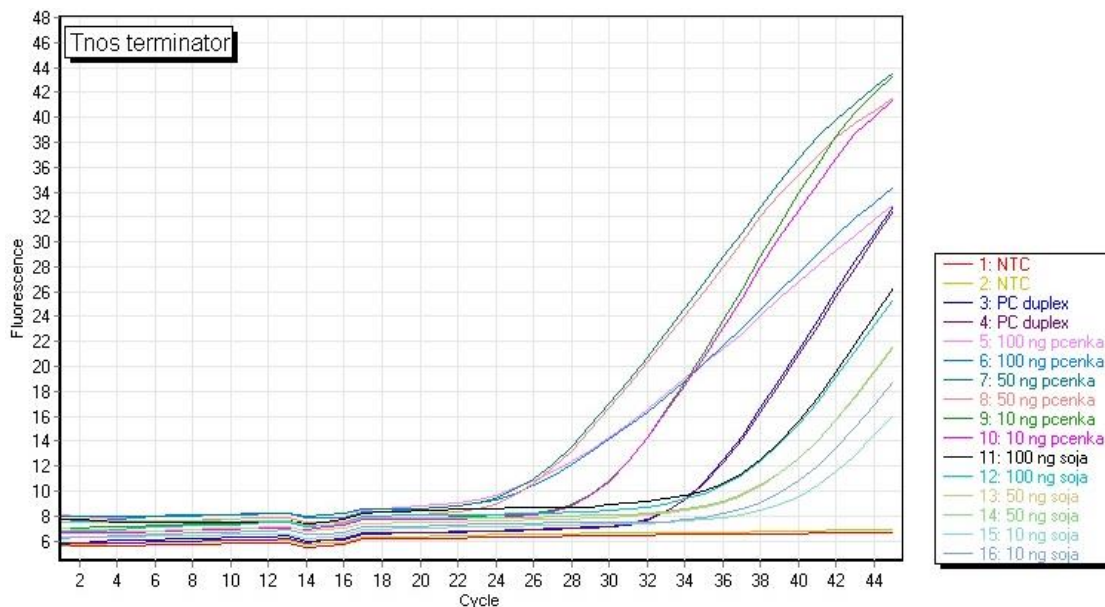


График 9. График на амплификација на Tnos во DNA од пченка и соја екстрахирана со C4 метод во концентрации од 100,50 и 10 ng/μL.

Бидејќи во анализираниите концентрации на DNA од 100 ng/μL до 10 ng/μL, кај сите повторувања имавме позитивен сигнал на амплификација на секвенците на 35S промоторот и Tnos терминаторот (график 8,9) се одлучивме да ја намалиме концентрацијата на DNA за да ја одредиме најмалата концентрација при која што може да се детектира присуство на овие генетски елементи. Исто така, овие резултати би можеле да се користат во анализи на мешани матрикси кога не се знае составот и процентот на генетски модифицирани суровини. Затоа, следен чекор на анализа ни беше разредување на првичниот примерок на DNA од 10 ng/μL до 0.0027 ng/μL, но поради зголемената веројатност за грешка овие концентрации се работеа во шест повторувања (репликати). За најниска концентрација ја сметавме таа при која што сите шест репликати имаат позитивен сигнал на флуоресценција за дадениот таргет ген.

Табела 18. Амплификација на 35S промоторот во DNA од пченка со концентрации од 10 ng/ $\mu$ L до 0.0027 ng/ $\mu$ L.

No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A.Green	No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A.Green
1	Red	nc	Negative Control		No Reaction	17	Blue	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
2	Yellow	nc	Negative Control		No Reaction	18	Purple	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
3	Blue	pc	Positive Control		Reaction	19	Pink	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
4	Purple	pc	Positive Control		Reaction	20	Red	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
5	Pink	10 ng pченка	Unknown		Reaction	21	Brown	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
6	Blue	10 ng pченка	Unknown		Reaction	22	Green	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
7	Teal	10 ng pченка	Unknown		Reaction	23	Cyan	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
8	Red	10 ng pченка	Unknown		Reaction	24	Blue	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
9	Green	10 ng pченка	Unknown		Reaction	25	Blue	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
10	Pink	10 ng pченка	Unknown		Reaction	26	Purple	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
11	Black	1 ng pченка	Unknown		Reaction	27	Pink	0.01 ng pченка	Unknown		No Reaction
12	Cyan	1 ng pченка	Unknown		Reaction	28	Grey	0.01 ng pченка	Unknown		No Reaction
13	Brown	1 ng pченка	Unknown		Reaction	29	Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
14	Green	1 ng pченка	Unknown		Reaction	30	Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		No Reaction
15	Teal	1 ng pченка	Unknown		Reaction	31	Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		No Reaction
16	Blue	1 ng pченка	Unknown		Reaction	32	Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
						33	Red	0.0027 ng pченка	Unknown		No Reaction
						34	Yellow	0.0027 ng pченка	Unknown		No Reaction

На табела 18 се прикажани резултатите од амплификацијата на 35S промоторот во DNA од пченка со концентрации од 10 ng/ $\mu$ L до 0.0027 ng/ $\mu$ L, при што може да се забележи дека до 0.1 ng/ $\mu$ L сите шест репликати имаат позитивен сигнал. Тоа значи дека до таа концентрација на DNA со сигурност може да се квантифицира присуството на ГМ во анализираниот примерок, односно тоа представува лимит на квантификација (LOQ). Во анализираните концентрации од 0.01 ng/ $\mu$ L, четири од шест репликати имаат позитивен сигнал, додека во концентрација на DNA од 0.0027 ng/ $\mu$ L два од шест репликати имаат позитивен сигнал. Тоа значи дека со нашиот метод може да се детектираат и концентрации пониски од 0.1 ng/ $\mu$ L, доколку анализираниот примерок е 100% ГМО, но не може со сигурност да се квантифицира колку е присутен во анализираниот примерок. Оваа вредност преставува лимит на детекција (LOD). Доколку тие концентрации ги конвертираме во број на копии на хаплоиден геном (cp) на пченка, земајќи предвид дека 1C вредноста на пченка е 2.72 pg (Кау и Van den Eede, 2001), тогаш концентрациите од 10 ng/ $\mu$ L до 0.0027 ng/ $\mu$ L содржат 3700, 370, 37, 3.7 и 1 (cp) копии на *zein* генот. Бидејќи се работи со CRM кој е 100% ГМО, тогаш сите копии ќе содржат 35S промотор. Според нашите резултати, концентрациите од 0.01 ng/ $\mu$ L со 3.7 cp и 0.0027 ng/ $\mu$ L со само една копија на хаплоиден геном на

пченка односно секвенца на 35S промоторот, може да се детектираат со нашиот метод, но со сигурност не можеме да ги квантифицираме. Со тоа се потвдува дека методот е доволно сензитивен за да детектира присуство на само една копија на секвенцата на 35S промоторот во анализираниот примерок доколку е 100% генетски модифициран (график 10).

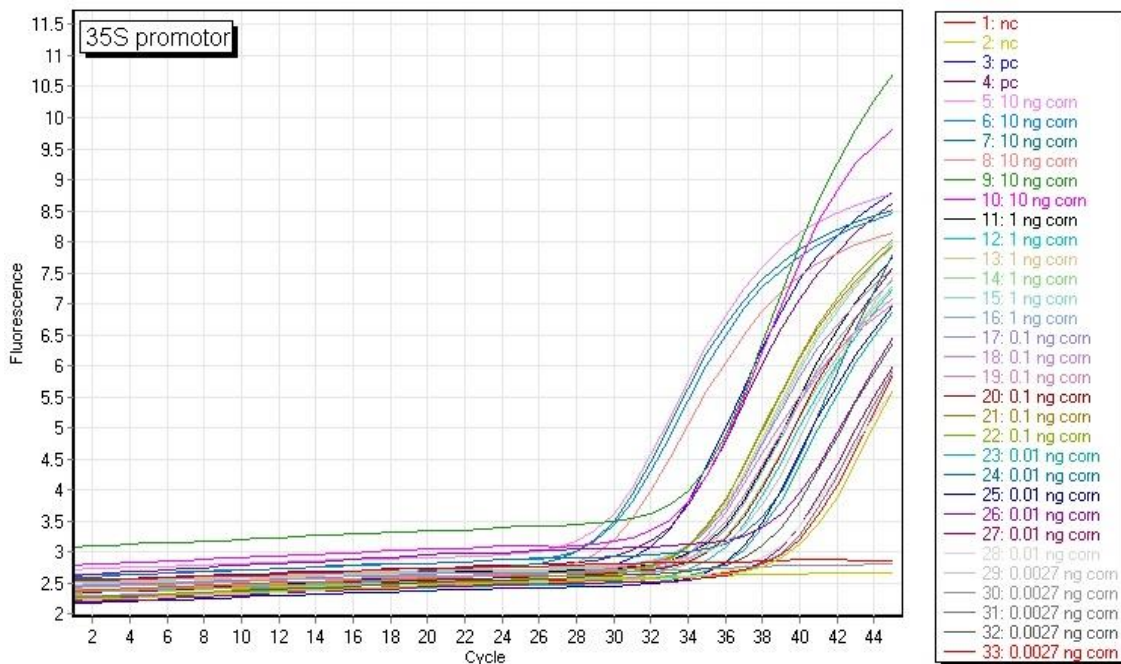


График 10. Амплификација на 35S промоторот во DNA од пченка во интервал на концентрација од 10 ng/ $\mu$ L до 0,0027 ng/ $\mu$ L.

Според резултатите од „endpoint“ анализата прикажани на табела 19 на примерок од пченка за амплификација на Tnos терминаторот, може да се забележи дека позитивен сигнал на сите шест репликати се добива во концентрација на DNA од 0.01 ng/ $\mu$ L додека при концентрација на DNA од 0.0027 ng/ $\mu$ L, пет од шест репликати имаат амплификација. Тоа сепак претставува добар резултат за сензитивноста на методот, бидејќи може да се детектира до една копија на Tnos терминаторот, иако не може со сигурност да се квантифицира.



Табела 19. Амплификација на Tnos терминатор во DNA од пченка во интервал на концентрација од 10 ng/ $\mu$ L до 0,0027 ng/ $\mu$ L.

No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A.Yellow
1	Red	nc	Negative Control		No Reaction
2	Yellow	nc	Negative Control		No Reaction
3	Blue	pc	Positive Control		Reaction
4	Purple	pc	Positive Control		Reaction
5	Pink	10 ng pченка	Unknown		Reaction
6	Light Blue	10 ng pченка	Unknown		Reaction
7	Teal	10 ng pченка	Unknown		Reaction
8	Light Red	10 ng pченка	Unknown		Reaction
9	Light Green	10 ng pченка	Unknown		Reaction
10	Magenta	10 ng pченка	Unknown		Reaction
11	Black	1 ng pченка	Unknown		Reaction
12	Cyan	1 ng pченка	Unknown		Reaction
13	Light Yellow	1 ng pченка	Unknown		Reaction
14	Light Green	1 ng pченка	Unknown		Reaction
15	Light Blue	1 ng pченка	Unknown		Reaction
16	Blue	1 ng pченка	Unknown		Reaction
17	Light Purple	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
18	Purple	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
19	Pink	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
20	Red	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
21	Yellow	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
22	Light Green	0.1 ng pченка	Unknown		Reaction
23	Teal	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
24	Light Blue	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
25	Blue	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
26	Purple	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
27	Magenta	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
28	Grey	0.01 ng pченка	Unknown		Reaction
29	Light Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
30	Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
31	Dark Grey	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
32	Black	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
33	Red	0.0027 ng pченка	Unknown		Reaction
34	Yellow	0.0027 ng pченка	Unknown		No Reaction

При анализа на примерокот соја за амплификација на 35S промоторот, концентрациите на DNA при кои сите шест репликати имаат позитивен сигнал се од 10 ng/ $\mu$ L до 0.1 ng/ $\mu$ L. Притоа, кај концентрациите на DNA од 0.01 ng/ $\mu$ L кај четири од шест репликати имавме позитивен сигнал, додека кај концентрацијата од 0.0027 ng/ $\mu$ L кај три од шест репликати детектиравме позитивен сигнал на флуоресценција (табела 20). Земајќи ја предвид големината на хаплоидниот геном на сојата (1C = 1.115 pg) (Shultz и сор., 2006; Swaminathan и сор., 2007), концентрациите на DNA од 10 ng/ $\mu$ L до 0.0027 ng/ $\mu$ L би имале 8696, 869, 87, 9, 2 (ср) копии на *lectin* генот односно 87, 9, 0.87, 0.09, 0.02 ср копии на 35S промоторот, со оглед на тоа што работевме со CRM кој е 1% ГМО. Според нашите резултати, концентрациите до 0.1 ng/ $\mu$ L со <1 копија на 35S промоторот (0.87 ср) може со сигурност да се детектираат и да се квантифицираат, бидејќи сите шест повторувања имаат позитивен сигнал за квантификација на 35S промоторот

Табела 20. Амплификација на 35S промоторот во DNA од соја со концентрации од 10 ng/ $\mu$ L до 0,0027 ng/ $\mu$ L.

No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A.Green
1	Red	nc	Negative Control		No Reaction
2	Yellow	nc	Negative Control		No Reaction
3	Blue	pc	Positive Control		Reaction
4	Purple	pc	Positive Control		Reaction
35	Blue	10 ng soja	Unknown		Reaction
36	Purple	10 ng soja	Unknown		Reaction
37	Pink	10 ng soja	Unknown		Reaction
38	Blue	10 ng soja	Unknown		Reaction
39	Teal	10 ng soja	Unknown		Reaction
40	Red	10 ng soja	Unknown		Reaction
41	Green	1 ng soja	Unknown		Reaction
42	Pink	1 ng soja	Unknown		Reaction
43	Black	1 ng soja	Unknown		Reaction
44	Cyan	1 ng soja	Unknown		Reaction
46	Light Green	1 ng soja	Unknown		Reaction
47	Light Blue	0.1 ng soja	Unknown		Reaction
48	Light Blue	0.1 ng soja	Unknown		Reaction
49	Purple	0.1 ng soja	Unknown		Reaction
50	Pink	0.1 ng soja	Unknown		Reaction
51	Pink	0.1 ng soja	Unknown		Reaction
52	Red	0.1 ng soja	Unknown		Reaction
53	Yellow	0.01 ng soja	Unknown		Reaction
54	Light Green	0.01 ng soja	Unknown		Reaction
55	Teal	0.01 ng soja	Unknown		No Reaction
56	Blue	0.01 ng soja	Unknown		No Reaction
57	Blue	0.01 ng soja	Unknown		Reaction
58	Purple	0.01 ng soja	Unknown		Reaction
59	Pink	0.0027 ng soja	Unknown		No Reaction
60	Grey	0.0027 ng soja	Unknown		Reaction
61	Grey	0.0027 ng soja	Unknown		Reaction
62	Grey	0.0027 ng soja	Unknown		No Reaction
63	Grey	0.0027 ng soja	Unknown		Reaction
64	Dark Grey	0.0027 ng soja	Unknown		No Reaction

Ако нашите резултати ги споредиме со резултатите од истражувањата на Branquinho и сор. (2012) кои вршеле евалуација на екстракција со разредување на 5% CRM за добивање на 132800, 33200, 8300, 2075, 1037, 520 и 260 копии на *lectin* генот кои содржат 6640, 1660, 415, 100, 50 и 25 копии на 35S промоторот, може да заклучиме дека лимитот на детекција на нашиот метод е многу понизок. Слични резултати со нашите добиле и Mandaci и сор. (2014) кои калибрационата крива ја конструирале со CRM Roundup ready соја со концентрации од 0.1%, 0.5% и 1%. За разлика од нив, во истражувањето на Debode и сор. (2013), тенденцијата за постигнување на највисокиот прифатлив апсолутен LOD од 20 копии била постигната во сите анализирани сертифицирани референтни материјали како и во клонираните таргети, дури за некои специфични модификации од сертифицирани референтни материјали, каде што бил постигнат LOD од една копија (график 11).



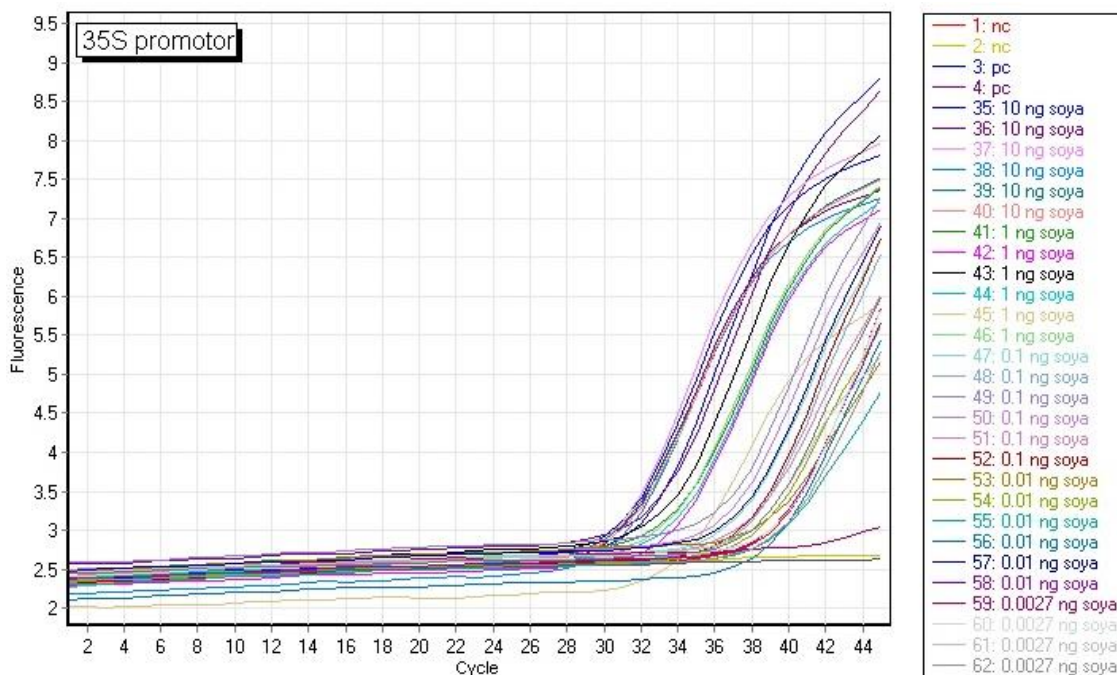


График 11. Амплификација на 35S промоторот во DNA од соја со концентрации од 10 ng/μL до 0.0027 ng/μL

За разлика од примерокот пченка каде за детекција на Tnos терминаторот најниска концентрација на DNA беше 0.01 ng/μL, кај сојата со 1% присуство на генетска модификација потребна е десет пати поголема концентрација на DNA од 0.1 ng/μL, за да се добие амплификација кај сите репликати (табела 21). За детекција на генетски елементи кога се работи со понизок процент на присуство на генетски модифицирани суровини, потребна е поголема концентрација на DNA, додека при работа со 100% генетски модифицирани суровини теоретски доволно е присуство на една копија од генот за да може да се детектира. Тоа и практично го докажавме со пченката, каде 0.0027 ng/μL DNA содржат 1 копија на *zein* ген додека во 0.0027 ng/μL DNA се содржат >2 (2.38) копии на *lectin* ген.

Табела 21. Амплификација на Tnos терминаторот во DNA од соја со концентрации од 10 ng/μL до 0.0027 ng/μL.

No.	Colour	Name	Type	Genotype	Cycling A.Yellow
1	Red	nc	Negative Control		No Reaction
2	Yellow	nc	Negative Control		Reaction
3	Blue	pc	Positive Control		Reaction
4	Purple	pc	Positive Control		Reaction
35	Blue	10 ng soya	Unknown		Reaction
36	Purple	10 ng soya	Unknown		Reaction
37	Pink	10 ng soya	Unknown		Reaction
38	Blue	10 ng soya	Unknown		Reaction
39	Teal	10 ng soya	Unknown		Reaction
40	Red	10 ng soya	Unknown		Reaction
41	Green	1 ng soya	Unknown		Reaction
43	Black	1 ng soya	Unknown		Reaction
44	Cyan	1 ng soya	Unknown		Reaction
46	Light Green	1 ng soya	Unknown		Reaction
47	Light Blue	0.1 ng soya	Unknown		Reaction
48	Blue	0.1 ng soya	Unknown		Reaction
49	Purple	0.1 ng soya	Unknown		Reaction
50	Pink	0.1 ng soya	Unknown		Reaction
51	Pink	0.1 ng soya	Unknown		Reaction
52	Red	0.1 ng soya	Unknown		Reaction
53	Brown	0.01 ng soya	Unknown		Reaction
54	Light Green	0.01 ng soya	Unknown		Reaction
55	Teal	0.01 ng soya	Unknown		Reaction
56	Blue	0.01 ng soya	Unknown		No Reaction
57	Blue	0.01 ng soya	Unknown		Reaction
58	Purple	0.01 ng soya	Unknown		No Reaction
59	Pink	0.0027 ng soya	Unknown		No Reaction
60	Grey	0.0027 ng soya	Unknown		No Reaction
61	Grey	0.0027 ng soya	Unknown		No Reaction
62	Grey	0.0027 ng soya	Unknown		No Reaction
63	Grey	0.0027 ng soya	Unknown		No Reaction
64	Grey	0.0027 ng soya	Unknown		No Reaction

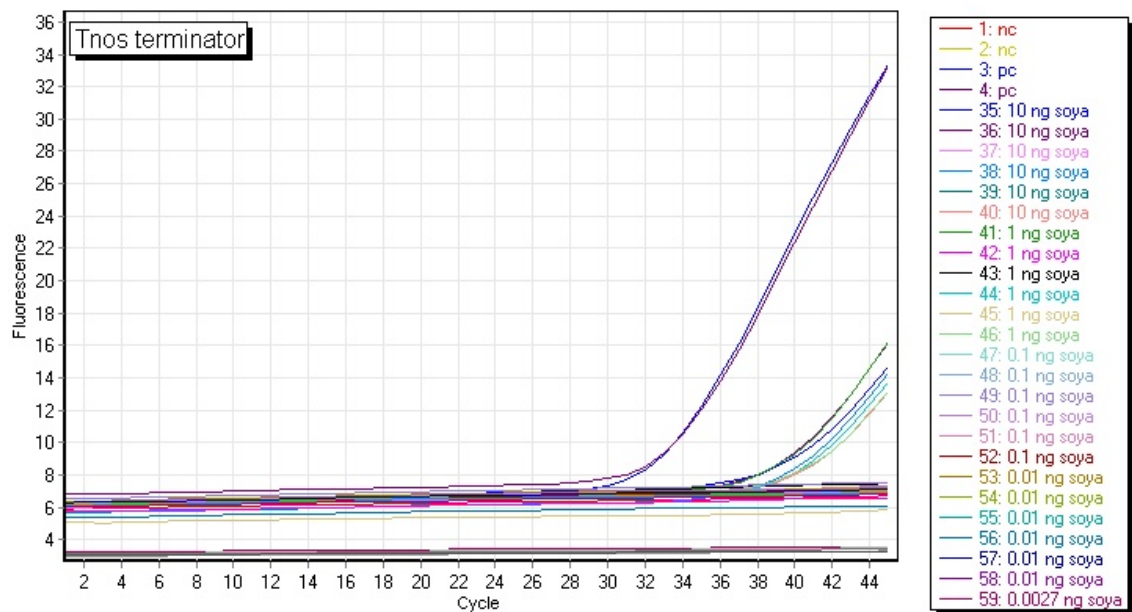


График 12. Амплификација на Tnos терминаторот во DNA од соја со концентрации од 10 ng/μL до 0.0027 ng/μL.

При стандардни PCR анализи, негативен резултат или непредвидлив низок принос на ампликон може да биде индикација на инхибиција. Во тој случај, позната количина на неендогена DNA може да се додаде на примерокот и да се амплифицира како внатрешна позитивна контрола (IPC). Од друга страна и според аналитичките барањата за квалитет на методот за анализа на ГМО опишани во стандардот ISO 24276:2006, се препорачува детекција на потенцијални PCR инхибитори преку амплификација на внатрешна позитивна контрола (Cottenet и сор., 2013).

Дополнителна верфикација дека DNA примерокот екстрахиран со „in-house“ развиениот метод С4 нема присуство на инхибитори беше амплификацијата на секвенцата на IPC (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Applied Biosystems) обележана со VIC флуоресцентна боја, која покажа позитивен сигнал на амплификација кај сите примероци, како и кај негативните и позитивните контроли. Во овој случај користевме неразредена DNA од пченка, разредувања од 100 ng/μl и 10 ng/μl. Во NTC (no template controls) немаше амплификација со што потврдивме дека нема контаминација на мастрер миксот (график 13). Во нашиот случај и пробата за Tnos терминаторот беше обележана со иста флуоресцентна боја, затоа амплификацијата на IPC се следеше во посебна реакциона епрувета со иста количина на DNA матрица како и во другите примероци. Иако DNA екстрактот од пченка беше анализиран при различни концентрации, IPC покажува константни Ct вредности кои ја потврдуваат ефикасноста на методот на екстракција. Во истражувањата на Cottenet и сор. (2013), од 30 PCR run-ови, Ct вредностите за IPC никогаш не варираше повеќе од 2.5%. Затоа таа вредност се смета за максимална толерантна варијација при анализа на инхибицијата.

Во литература постојат податоци од истражувања кои и при екстракција на DNA со комерцијални китови на реагенси вршеле контрола на инхибиција преку амплификација на IPC. Таков е случајот со Peng и сор. (2016), кои 18SRNA ја користеле како внатрешна позитивна контрола за евалуација на присуство/отсуство на PCR инхибитори, иако екстракцијата на DNA од референтните пченка MON89034 и соја GTS 40-3-2, и од другите референтни материјали ја вршеле со комерцијален кит (Takara, Japan). Слично и Erkan и Dastan, (2017), вршеле контрола на присуство на инхибитори со користење на

комерцијален кит 35S/NOS/FMV/IPC (SureFood<sup>®</sup>, R-Biopharm) кој содржи внатрешна инхибиторна контрола при рутинска анализа на различни прехранбени производи (чоколадо, храна за доенчиња, житарици, инстант супи, ориз, пченка во конзерва, прехранбени адитиви, пченка и др.).

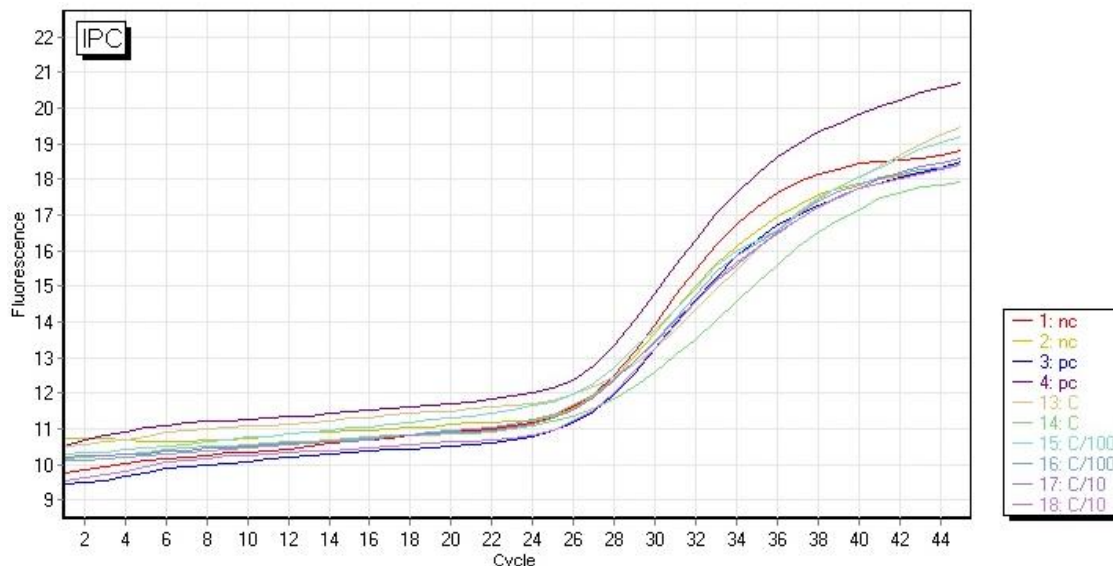


График 13. Амплификација на Внатрешна Позитивна Контрола (IPC) во DNA од пченка екстрахирана со C4 метод.

### 5.3. Оптимизација на real-time PCR методот

Релативната квантификација на експресија на еден ген овозможува мерење на релативни промени во генската експресија без да се знае апсолутната количина на референтните или ендогените гени. Точноста на real-time PCR анализата ависи од: специфичноста на прајмерите за анализираната таргетна секвенца; оптимизацијата на условите на real-time PCR амплификација, и точната нормализација на транскриптот користејќи стабилно експресирани референтни гени (Zhao и сор., 2021).

Бројот на мастер миксови со веќе оптимизирани реагенси секојдневно се зголемува и комерцијално се нуди широка палета на готови мастер миксови за мултиплекс real-time PCR. Затоа нашата цел не беше фокусирана на оптимизација на тие реагенси. За real-time PCR профилот се водевме според упатството на производителот поради специфичноста на самиот полимеразен ензим кој се наоѓа во универзалниот мастер микс. Бидејќи мастер миксот комерцијално е достапен како 2x концентриран, во вкупен волумен од 25  $\mu$ L

реакциона смеса, се додаваат 12.5  $\mu\text{L}$  мастер микс. Наши модификации при оптимизација на услови на real-time PCR реакција беше менување на количината на мастер микс, односно работевме со 10.75  $\mu\text{L}$  и 13.75  $\mu\text{L}$  (табела 9).

Со „endpoint” анализа на резултатите прикажани на график 14А и В, за амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот кај сертифициран референтен материјал од пченка 100% ГМО, се покажа дека сите три модификации на концентрацијата на мастер микс овозможуваат успешна амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот, независно од количината на мастер микс или количината на DNA матрица.

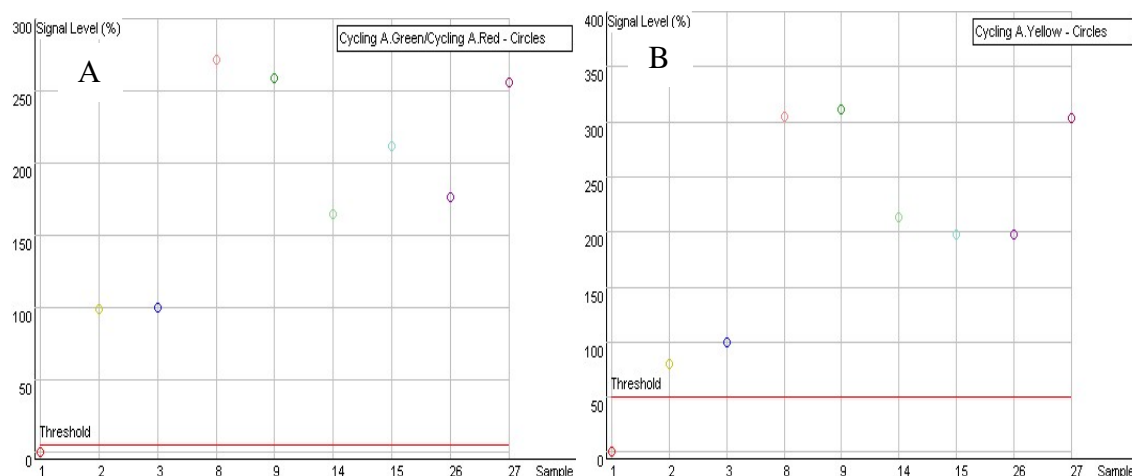


График 14. Амплификација на генетски елементи кај пченка со различни мастер микса, А.35S промотор, В.Tnos терминатор (1-негативна контрола; 2,3-позитивни контроли; 8,9-мастер микс 1; 14,15-мастер микс 2; 26,27-мастер микс 3).

При амплификација на генетските елементи во сертифицирана референтна соја која беше 1% ГМО, промената на мастер миксот имаше влијание врз успешноста на амплификација. Имено, при анализа на резултатите за амплификација на 35S промоторот, може да се забележи на график 15А дека со користење на мастер микс 2 и мастер микс 3, позитивен сигнал на амплификација добивме во една од двете повторувања. Тоа значи дека помала концентрација на мастер микс и помала количина на DNA матрица, не се соодветни услови за амплификација на 35S промоторот кога се работи за матрикс со ниска содржина на генетска модификација. Од друга страна, при детекцијата на Tnos потребно е оптимизација на повеќе фактори бидејќи комбинациите на мастер микс не дадоа и

двете репликати за секој мастер микс да имаат амплификација на тој генетски елемент (график 15B).

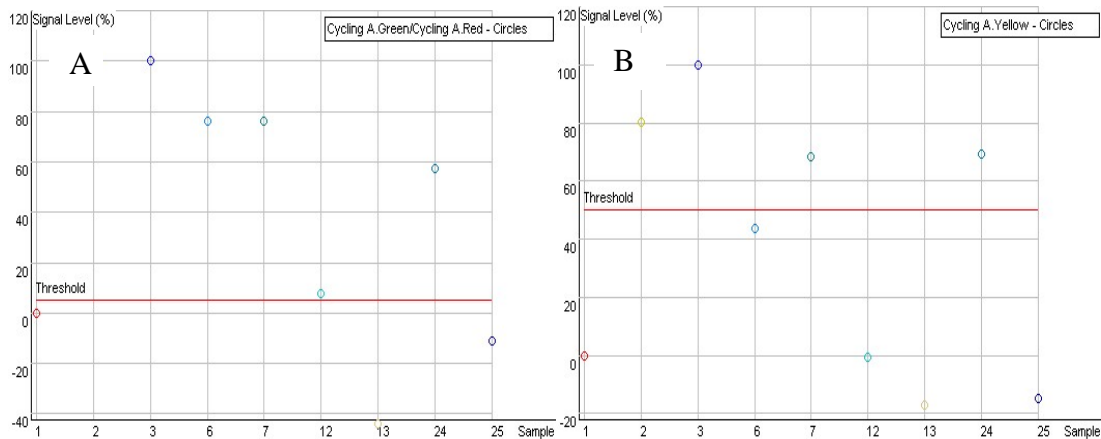


График 15. Амплификација на генетски елементи кај соја со различни мастер микса, **A.** 35S промотор, **B.** Tnos терминатор (1-негативна контрола; 2,3-позитивни контроли; 6,7-мастер микс 1; 12,13-мастер микс 2; 24,25-мастер микс 3).

### 5.3.1. Оптимизација на амплификација на 35S во singleplex и duplex реакција

При оптимизација на PCR условите за амплификација на 35S промоторот првично работевме во singleplex реакција, за да тие резултати ни бидат референтна вредност при изведување на duplex PCR реакција. Според протоколот на Waiblinger и сор. (2008), концентрацијата на прајмери и проба за 35S беше 0.1  $\mu\text{M}$ . Реакционата смеса содржеше 12.5  $\mu\text{L}$  универзален TaqMan мастер микс, 5  $\mu\text{L}$  DNA матрица, додадовме и 3.0  $\mu\text{L}$  IPC а остатокот до 25  $\mu\text{L}$  го дополнивме со ултрачиста вода без DNA. Концентрацијата на неразредениот примерок беше 501.7  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , потоа истиот го разредивме до 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  и 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Сите примероци се работеа во два репликати. На график 16 може да се види амплификација кај сите испитувани примероци. Додека PCR ефикасноста со овие PCR услови беше 92%, линеарноста  $R^2 = 0.99$  и наклонот на калибрационата крива беше -3.534, со што се задоволени сите минимални барања за изведување на аналитичкиот метод пропишани од ENGL (ENGL, 2015).

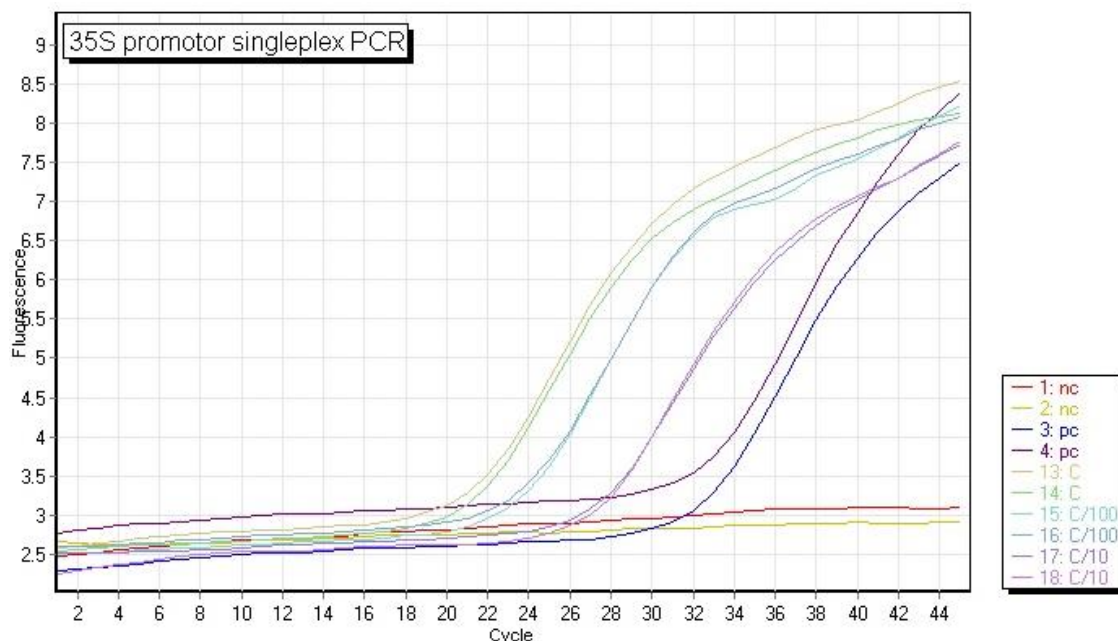


График 16. Амплификација на 35S промоторот во singleplex real-time PCR реакција на неразреден DNA примерок, разредување од 100 ng/μL и 10 ng/μL

### 5.3.2. Амплификација на 35S промоторот во duplex PCR реакција

Предностите на duplex или multiplex real-time PCR реакцијата се брзината на добивање на резултатот, информации за повеќе гени одеднаш и економската исплатливост, што е особено погодно за скрининг на храна, храна за животни или семиња за присуство на генетска модификација. Освен овие предности, со duplex реакцијата се применуваат помал број на пипетирања и се користи помала количина на DNA, а исто така е намалена потрошувачка на реагенси и потрошен материјал од пластика, со што се придонесува за заштита на животната средина. Од друга страна, duplex или multiplex real-time PCR реакцијата има и неколку недостатоци, кои вклучуваат подолго време за развојот и поставувањето на методот, можна некомпатибилност меѓу прајмерите и пробите како и конкуренција на модулите на амплификација. Тргувајќи од овие сознанија, се одлучивме скринингот на 35S и Tnos да го изведеме како duplex real-time PCR реакција.

При амплификација на 35S промоторот како singleplex реакција добивме солидни резултати, затоа не ја променивме концентрацијата на прајмери и проба и при работа како duplex PCR реакција. Внатрешната позитивна контрола ја



заменивме со прајмери и проба за Tnos бидејќи со нејзина амплификација во сите примероци се покажа дека DNA екстрактот не содржи инхибитори на PCR реакцијата. И во овој случај параметарот по кој се водевме при оптимизација на методот, односно PCR ефикасноста, беше 95%, а линеарноста во овој случај беше 0.94 при што грешките при пипетирање имаат големо влијание, додека наклонот на калибрационата крива е -3.459 (график 17). И во истажувањето на Sankar и сор. (2006) примарен параметар по кој се воделе при евалуација на екстракцијата и ефектот на матриксот при квантификација на ГМ била PCR ефикасноста. До сличен заклучок дошле и Svec и сор., (2015) дефинирајќи ја PCR ефикасноста како еден од најважните индикатори за перформансите на real-time PCR методот. Според Broeders и сор. (2014), кај квалитативните методи за детекција на ГМО, како прифатливи вредности за PCR амплификацијата се земаат 80% -120%, додека наклонот на калибрационата крива кога се користи декаден логаритам на хаплоиден геномски еквивалент може да биде меѓу -3.9 и -2.9.

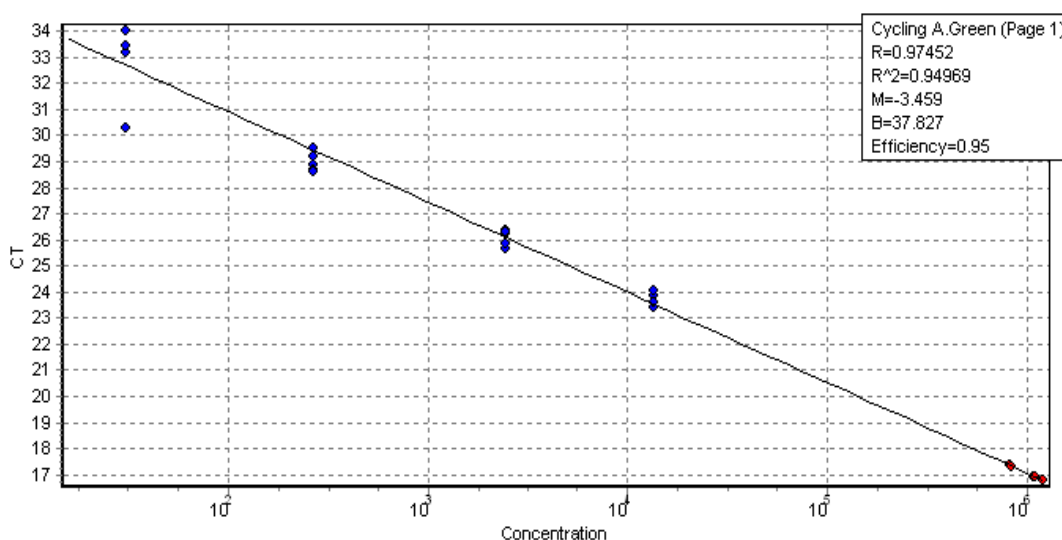


График 17. Ефикасноста на амплификација на 35S промоторот во duplex real-time PCR реакција.

При споредба на резултатите за амплификација на 35S промоторот во singleplex и duplex PCR реакција, се покажа дека ефикасноста и прецизноста на duplex системот е сличен со оние на singleplex методот. И во двата случаи вредностите се во рамките на референтните вредности пропишани од ENGL. Бидејќи концентрацијата на флуоресцентна проба на 35S немаше големо влијание врз системот кога се работи во duplex, се одлучивме при понатамошните анализи



да се користи ниска концентрација на пробата за да се намали ефектот на конкуренцијата со другите компоненти на PCR реакцијата. Затоа, во понатамошните експерименти концентрацијата на прајмери и флуоресцентна проба остана фиксна на 0.1  $\mu\text{M}$ . Од друга страна ефикасноста на амплификацијата на Tnos имаше поголеми отстапувања од референтните вредности па работевме повеќе комбинации на концентрацијата на прајмери и проба. Прајмерите кај Tnos варираа во концентрации од 0.48  $\mu\text{M}$  до 1  $\mu\text{M}$  додека концентрацијата на флуоресцентна проба варираше од 0.12  $\mu\text{M}$  до 0.4  $\mu\text{M}$ . Најдобрите комбинации на соодноси на прајмери и проба за Tnos беа избрани за понатамошните испитувања при валидација на методот.

### 5.3.3. Оптимизација на амплификацијата на Tnos терминаторот

При оптимизација на условите за успешна амплификација на Tnos терминаторот користевме 1% сертифициран референтен материјал MON89034. По квантификација на Nanodrop, DNA екстрактите беа разредени за добивање на 500  $\text{cp}/\mu\text{L}$ , 100  $\text{cp}/\mu\text{L}$  и 50  $\text{cp}/\mu\text{L}$ . Важен параметар по кој се водевме за подобрување на методот за детекција беше ефикасноста на real-time PCR методот. Оптимизацијата на duplex real-time PCR методот беше изведена со варијација на концентрацијата на прајмери и проби како кај singleplex реакцијата. Ефикасноста при singleplex реакција ја споредувавме со duplex PCR реакцијата, кој треба да биде во рамките на референтни вредности од 90-110% според ENGL (ENGL,2015). Критериум при одредување на најоптималните услови беше најмала  $C_t$  вредност кога само еден параметар е променет, додека сите други услови остануваат исти. Слично на нас, на овој начин PCR условите ги оптимизирале и Li и сор. (2020b) при што ефикасноста на амплификација се оценува од  $C_t$  вредностите. Главниот пристап беше во намалување на конкурзивниот ефект со ограничување на концентрацијата на проба за да добиеме подобра PCR ефикасност како и оптимизација на соодносот на прајмери и проба. Со зголемување на концентрацијата на проба се добива посилна флуоресценција, а со тоа се добива подобра чувствителност на методот особено кога се работи со ниска концентрација на генот од интерес (Waiblinger и сор., 2008). Затоа, првичната оптимизација на амплификацијата на Tnos беше

зголемување на концентрацијата на проба, додека концентрацијата на прајмери остана ист. Во тој случај беа пробани соодноси на прајмери и проби 1 $\mu$ M:0.24 $\mu$ M во MM1, 1 $\mu$ M:0.32 $\mu$ M во MM2 и 1 $\mu$ M:0.4 $\mu$ M во MM3. Според резултатите дадени во табела 22, може да се види дека позитивната контрола работена со мастер миксовите MM1 и MM2 имаат слични Ct вредности (30.58 $\pm$ 0.43 и 30.59 $\pm$ 0.12, соодветно) кои се јавуваат порано во споредба со мастер миксот 3 (32.81 $\pm$ 0.13) и имаат посилна флуоресценција (прикажана на график 18). И при анализа на Ct вредностите кога се користи 1% CRM во различни концентрации прикажани како 50 cp/ $\mu$ L, Ct вредностите беа 31.17 $\pm$ 0.04 за MM1, 31.27 $\pm$ 0.16 за MM2 и 33.03 $\pm$ 1.12 за MM3. Во случај кога апсолутната концентрацијата на DNA беше 100 cp/ $\mu$ L Ct вредностите се зголемуваа по истиот редослед (30.08 $\pm$ 0.27, 30.64 $\pm$ 0.23 и 31.02 $\pm$ 0.34, за MM1, MM2 и MM3 соодветно). Ист тренд на зголемување на Ct вредностите се јавува и при концентрација на DNA од 500 cp/ $\mu$ L (28.04 $\pm$ 0.4, 28.58 $\pm$ 0.21 и 28.89 $\pm$ 0.04 за MM1, MM2 и MM3, соодветно). Од овие резултати може да се види дека во сите случаи најниски Ct вредности се јавуваат со MM1, потоа следуваат MM2 и на крајот MM3 (MM1<MM2<MM3). За разлика од Waiblinger и сор. (2008), во нашите истражувања при singleplex PCR реакција, ефикасноста на PCR реакцијата се намалува со зголемување на концентрацијата на проба за Tnos, во случај кога концентрацијата на прајмери останува иста.

Табела 22. Средна вредност на Ct и стандардна девијација при амплификација на Tnos со три различни мастер микса.

	MM1 (Ct $\pm$ SD)	MM2 (Ct $\pm$ SD)	MM3 (Ct $\pm$ SD)
Позитивна контрола	30.58 $\pm$ 0.43	30.59 $\pm$ 0.12	32.81 $\pm$ 0.13
1% CRM, 50 cp/ $\mu$ L	31.17 $\pm$ 0.04	31.27 $\pm$ 0.16	33.03 $\pm$ 1.12
1% CRM, 100 cp/ $\mu$ L	30.08 $\pm$ 0.27	30.64 $\pm$ 0.23	31.02 $\pm$ 0.34
1% CRM, 500 cp/ $\mu$ L	28.04 $\pm$ 0.4	28.58 $\pm$ 0.21	28.89 $\pm$ 0.04

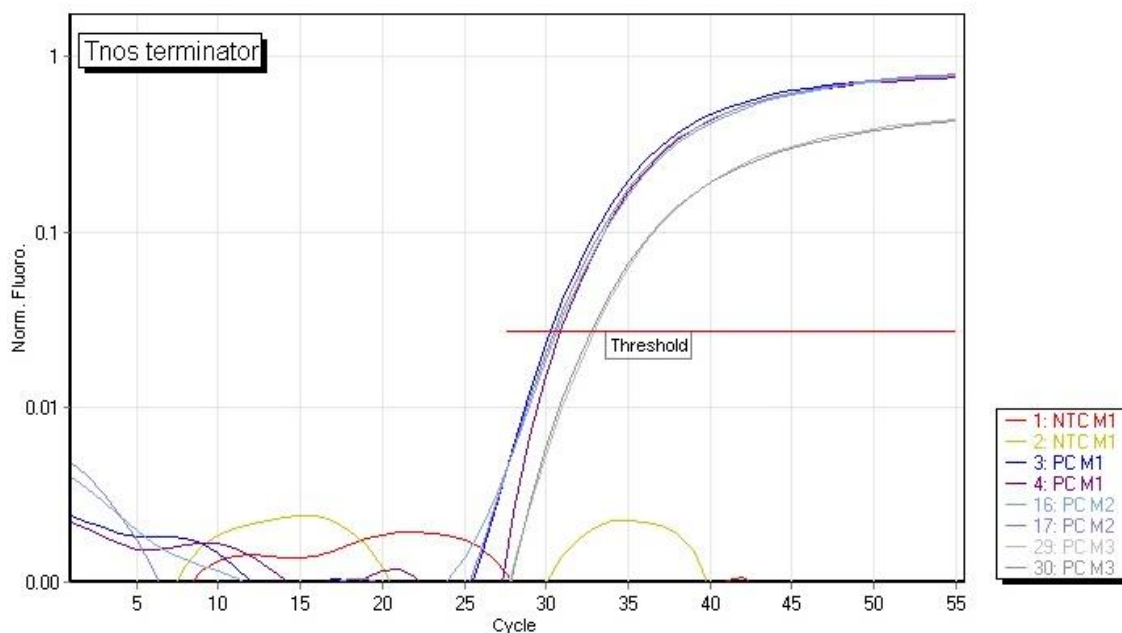


График 18. Амплификација на Tnos терминатор во singleplex кај плазмидна DNA со различни мастер микса MM1, MM2 и MM3.

Најдобри вредности за ефикасност на PCR реакцијата добивме со мастер микс 1 каде соодносот на прајмери и проба беа 4:1, па следна оптимизација беше намалување на концентрацијата на прајмери и проби, при што соодносот да остане ист. Кај MM4 универзалниот мастер микс додадовме 10.75  $\mu\text{L}$ , концентрацијата на прајмери ја намаливме на 0.48  $\mu\text{M}$ , а концентрацијата на флуоресцентна проба ја намаливме на 0.3  $\mu\text{M}$ . Следната модификација означена како MM5, беше иста комбинација на реагенси само количината на DNA матрица беше намалена на 3  $\mu\text{L}$ . При споредба на резултатите за ефикасноста на PCR реакцијата на MM4 и MM5, кои беа 73% и 146%, соодветно, може да се забележи дека со намалена количина на мастер микс, намалени концентрации на прајмери и проби, не се добива соодветна ефикасност на PCR реакцијата за задоволување на критериумите пропишани од ENGL. Според Sves и sor. (2015), инхибицијата на PCR реакцијата предизвикува нереална проценка на ефикасноста со вредности повисоки од 100%, особено изразена во најконцентрирани примероци, што доведува до отстапување од линеарноста.

Следен предизвик беше скринингот на 35S промоторот и Tnos терминаторот во duplex real-time PCR реакција. За да се избегне интерференцијата меѓу пробите и прајмерите од двата таргет гена во duplex-от, првично

применивме намалување на концентрацијата на прајмери за Tnos на 0.8 $\mu$ M и на флуоресцентната проба на 0.16  $\mu$ M, при што соодносот меѓу прајмерите и пробата во овој случај беше 5:1. Истовремено ја намаливме и концентрацијата на TaqMan универзален мастер микс, додека количината на DNA матрица беше 5 $\mu$ L (MM7 протокол). Исти комбинации на прајмери и проба за Tnos со соодветна конц. и сооднос направивме и при MM6 протоколот, само што во овој случај користевме соодветна количина на TaqMan универзалниот мастер микс (1x), а ја намаливме количината на DNA матрица на 2.35  $\mu$ L. И во двата случаи критериумите за успешна PCR реакција не беа задоволителни бидејќи се добија вредности за PCR ефикасност од 79% и 56%, соодветно. Според овие податоци можеме да заклучиме дека при duplex PCR реакција, намалената концентрација на мастер миксот и на DNA матрицата, не се оптимални услови за ефикасна амплификација на таргет гените. До слични резултати дошле и Svec и сор. (2015) со намалување на волуменот на DNA матрицата. Тие феномонот го објаснуваат со тоа дека ако има многу мал број на таргет копии во примерокот, тогаш со намалување на волуменот, многу брзо се зголемува грешката при земање на примероци, па затоа проценката на ефикасноста е помалку веродостојна. Инаку, при поголем број на копии на генот од интерес или кај широко распространет ендеген ген, неговата концентрација никогаш е под 30-35 копии во аплицираниот волумен, каде што грешката при земање примероци станува значајна. Пример, при анализа на *Hprt* mRNA генот, при апликација на 2  $\mu$ L од најразредениот примерок, 31.25% од репликатите не можеле да бидат детектирани. Така, со 5  $\mu$ L фреквенцијата на недостаток на информации на најниската концентрација на примерокот била 25%, додека при апликација на 10  $\mu$ L сите репликати покажале позитивен сигнал на амплификација. Исто така, Svec и соработниците констатирале дека при експериментирање со уште поредок ген (*H2afz*), фреквенцијата на недостаток на позитивниот сигнал бил 68.7%, 50% и 0% при аплицирани волумени од 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L и 10  $\mu$ L соодветно. Некогаш операторот ги занемарува податоците кои недостасуваат, што е погрешен пристап, бидејќи на тој начин се намалува проценетата стандардна девијација, што се рефлектира со проблеми во репродукцибилноста на методот. Тоа значи дека динамичкиот опсег на тој метод не е доволно широк за да ги покрие и најразредените примероци. Врз основа на

стандардната девијација на репликатите се одредува лимитот на квантификација врз што се заснова и динамичкиот опсег на методот.

Следна оптимизација, означена како протокол ММ8, беше зголемување на концентрацијата на прајмери на 1  $\mu\text{M}$  и на флуоресцентна проба на 0.2  $\mu\text{M}$  (нивниот сооднос остана ист - 5:1), количината на DNA матрица беше 5  $\mu\text{L}$  додека концентрацијата на TaqMan универзалниот мастер микс беше намалена < 1x (10.75  $\mu\text{L}$ ). Вредноста за PCR ефикасност при овие услови која што ја добивме беше 66%. Со ММ1 протоколот кога Tnos се работи како singleplex добивме добра PCR ефикасност, во услови на 1x концентрација на TaqMan универзален мастер микс, концентрација на прајмери од 0.1  $\mu\text{M}$  и количина на DNA матрица од 5 $\mu\text{L}$ . Затоа одлучивме овие параметри да не ги менуваме и при анализа на Tnos во duplex PCR реакцијата. Од тука произлезе и последната модификација на протоколот за мастер микс 9 (ММ9), кога во вкупен волумен на реакциона смеса од 25  $\mu\text{L}$ , додадовме 12.5  $\mu\text{L}$  TaqMan универзален мастер микс 1x, концентрација на Tnos прајмери од 1.0  $\mu\text{M}$  и концентрација на флуоресцентна проба за Tnos од 0.2  $\mu\text{M}$ . Со овие услови на PCR реакцијата добивме вредности за PCR ефикасност 96%, линеарност  $R^2 = 0.93$  (вредност која зависи и од грешки при пипетирање) и наклон на калибрационата крива -3.43. Освен вредноста за линеарност која ја занемаруваме затоа што зависи и од други фактори, другите параметри ги исполнуваат критериумите пропишани од ENGL за успешна амплификација на таргет генот (табела 23).

Табела 23. PCR ефикасност,  $R^2$  и наклон на кривите за амплификација на Tnos со различни содржини на мастер микс.

	ММ1	ММ2	ММ3	ММ4	ММ5	ММ6	ММ7	ММ8	ММ9
Ефикасност	106%	133%	83%	73%	146%	56%	79%	67%	<b>96%</b>
$R^2$	0.98	0.98	0.90	0.98	0.95	0.83	0.97	0.79	0.93
Наклон	-3.20	-2.72	-3.80	-4.22	-2.55	-5.15	-3.97	-4.51	<b>-3.43</b>

На табела 24 може да се види дека ефикасност на PCR реакцијата во интервал на референтните вредности од 90% до 110%, добивме за двата генетски елементи - 35S промоторот и Tnos терминаторот, било како singleplex и duplex

PCR систем. Со тоа се потврдува успешна оптимизација на PCR условите. Тоа е во согласност со истражувањата на Вак и Emerson, (2019) при развој на multiplex real-time PCR метод за детекција на голем број на генетски модифицирани растенија и идентификација на лажно позитивни ГМ растенија инфицирани со CaMV(Мозаичен вирус на карфиолот) каде ефикасноста на TaqMan quadriplex реакцијата за сите анализирани таргети (*actin* – ген како позитивна контрола универзален за растенијата, 35S промотор, Tnos терминатор и *P3* ген специфичен за CaMV вирусна инфекција, нема сигнификантна разлика во сензитивноста и ефикасноста на PCR реакцијата кога се работи како singleplex или multiplex. Имено, Ct вредностите за секој таргет ген во multiplex PCR реакција биле многу слични со оние добиени од singleplex реакција (<1 разлика во однос на Ct вредностите).

Табела 24. Споредба на 35S/Tnos singleplex и duplex PCR системот.

	35S (singleplex)	35S (duplex)	Tnos (singleplex)	Tnos (duplex)
Ефикасност	92%	95%	106%	96%
R <sup>2</sup>	0.99	0.94	0.98	0.93
Наклон	-3.534	-3.459	-3.20	-3.431

## 5.4. Валидација на real-time PCR методот

### 5.4.1. Применливост

Real-time PCR методот е „златен стандард“ за анализа на генетски модифицирана храна. Базата на податоци на Референтната лабораторија на Европската Унија за генетски модифицирана храна и храна за животни (EURL GMFF) содржи информации за протоколи на real-time PCR методи за квалитативна и квантитативна анализа на генетски модифицирана храна. Овој оптимизиран duplex real-time PCR метод може да се примени за анализа на сирова и процесирана храна, како што е прикажано во претходите резултати. Целта на развивање на овој метод беше замена на комерцијалните китови за скрининг на ГМО поради рентабилноста. Со duplex системот истовремено го детектираме присуството на двата генетски елемента (промотор и терминатор), со што се

намалува количината на потребни реагенси и манипулацијата при пипетрирање, а со тоа се намалува и веројатноста за грешка. Во нашите истражувања е експериментирано со голем опсег на концентрации; од неразредени DNA примероци, до разредувања кои содржат само една копија на хаплоидниот геномски еквивалент. Користена е геномска DNA од сирови, но и процесирани матрикси, како: сирова пченка, печена соја, соин изолат, корнфлекс, говедско месо, рибино брашно, мусли, житни барови, ориз и DNA од *Salmonella spp.* Методот функционира со сите овие тестирани матрикси, што е докажано со присуство на промоторот 35S и терминаторот Tpos доколку испитуваниот материјал е ГМО позитивен, како и таксон-специфичните гени *zein* и *lectin*. При real-time PCR анализа, како позитивна контрола користевме плазмидна DNA и со претходните резултати покажавме дека се регистрира амплификација и на двата генетски елемента. Единствено, DNA од пченка екстрахирана со нашиот развиен метод, што беше анализирана како неразреден екстракт, не покажа амплификација. Проблемот се надмина со прочистување на истиот екстракт низ колона со силика гел или со разредување на DNA екстрактот.

#### 5.4.2. Практичност

Новоразвиениот и валидиран метод може да се спореди со комерцијално достапни китови на реагенси при што дава исто така одлични вредности за ефикасност и со ист лимит на детекција. Најголемиот предизвик кај овие методи е процесот на оптимизација на прајмери и проби, како и опсегот на концентрација на DNA примерокот кој е предмет на анализи. Од економски аспект, вака развиениот метод има поголема рентабилност во споредба со комерцијалните китови. Апаратурата и обуката на персоналот се исти како и при рутинска анализа со комерцијални китови. За разлика од методите базирани на детекција на протеини при анализа на ГМО, DNA-базираните методи се поскапи, но се посензитивни и поточни поради својствата на DNA да биде зачувана при различни надворешни влијанија. Овие методи особено имаат предност при анализа на високопроцесирани матрикси или матрикси од кои тешко може да се екстрахира DNA, како од масла или соја сос. Притоа, работните манипулации за примена на методот и за рутинска анализа на ГМ храна не се комплицирани.

### 5.4.3. Специфичност

Специфичноста на методот за детекција на пченка во испитуваниот примерок беше одредена преку амплификација на *zein* генот во DNA од различни матрикси како: корнфлекс, говедско месо, рибино брашно, пченица, овесни снегулки и ориз, сите работени во по две повторувања. Истовремено работевме негативна и позитивна контрола која во овој случај беше DNA од сертифицирана референтна пченка MON89034. Од резултатите прикажани на график 19 може да се види специфична амплификација на *zein* генот во екстрахирана DNA со метод С4 само во корнфлекс, кој со сигурност знаеме дека содржи пченка, додека во останатите примероци нема амплификација на овој таксон специфичен ген.

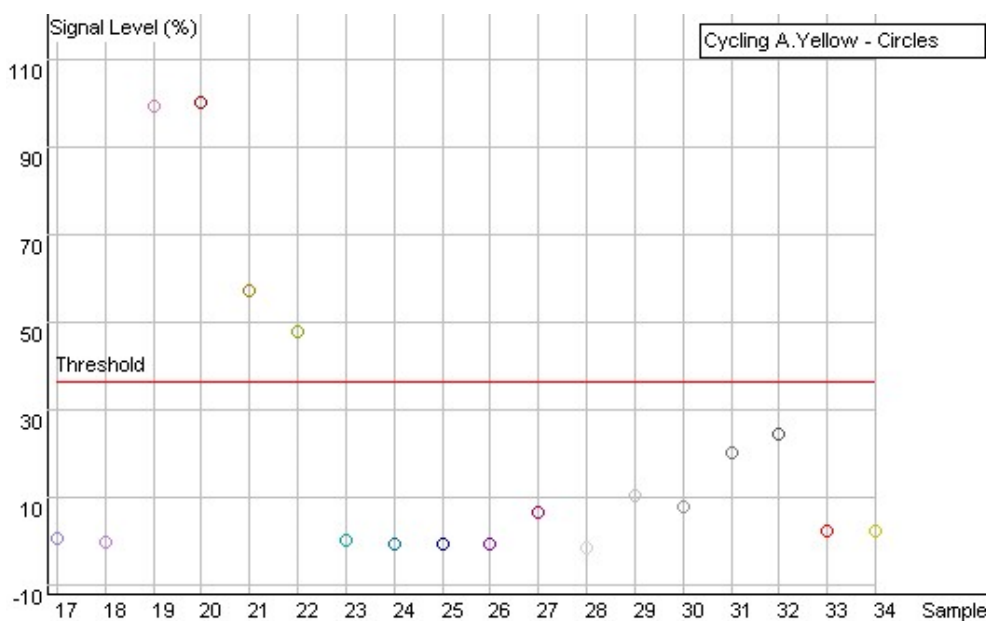


График 19. Амплификација на *zein* генот во екстрахирана DNA со метод С4 (17,18- негативна контрола, 19,20 – позитивна контрола, 21,22-корнфлекс, 23,24-соја, 25,26-говедско месо, 27,28-рибино брашно, 29,30-пченица, 31,32- овесни снегулки, 33,34-ориз).

Слично на нашето истражување, Peng и сор. (2016) ја одредувале специфичноста на методот со користење на DNA од растителен материјал кој бил генетски модифициран со концентрација >1% или немодифициран. За процена на веродостојноста на real-time PCR методот, паралелно биле работени и негативна и позитивна контрола во по две повторувања при секој run. Како критериум за



специфичност на методот била успешната амплификација на позитивната контрола и недостаток на амплификација на негативната (NTC) контрола. Анализите на таксон-специфичните методи овозможиле успешна амплификација само на ендегениот ген за кој се специфични независно дали се работи за генетски модифициран или немодифициран примерок. Притоа, ниеден од нив не покажал позитивен сигнал за амплификација при користење на животинска DNA (говедска, свинска, риба и кокошка).

Откако со верификацијата, се потврди дека со модифицираниот метод може да се амплифицира *zein* генот, целта беше да се утврди најмалата концентрација на DNA од пченка која може да даде амплификација. Според резултатите прикажани на график 20. може да се забележи дека имаше амплификација на *zein* генот кај сите повторувања на сите разредувања од 1 ng/ $\mu$ L до 0.01 ng/ $\mu$ L.

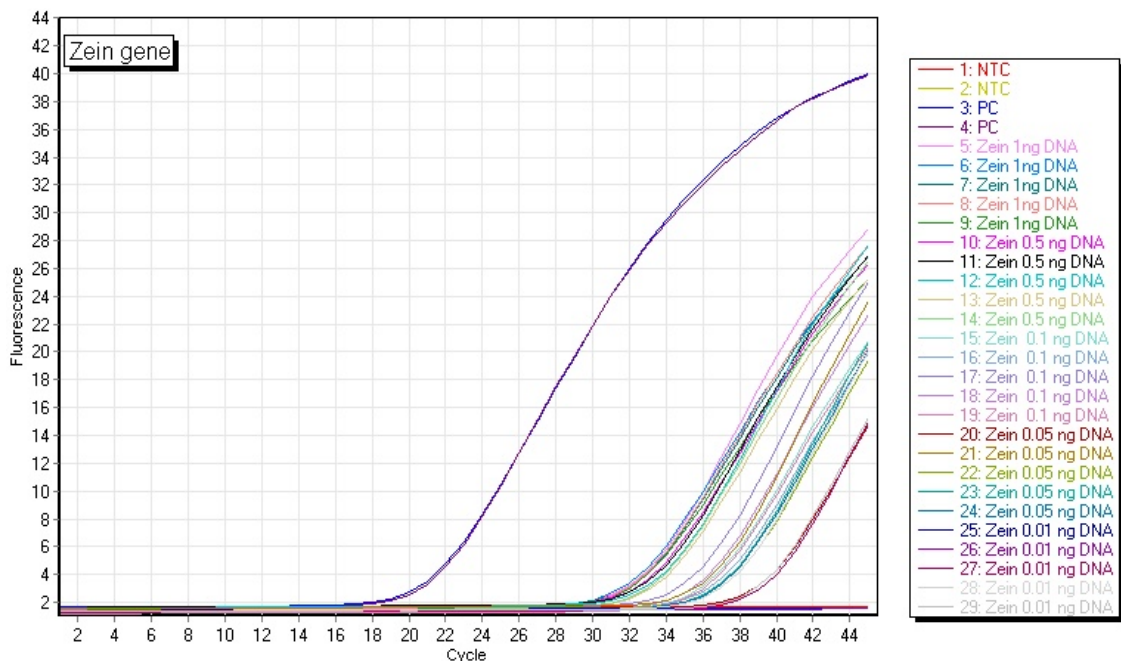


График 20. Амплификација на *zein* ген во различни концентрации од 1 ng/ $\mu$ L до 0.01 ng/ $\mu$ L.

#### 5.4.4. Специфичност на методот за 35S промоторот и Tnos терминаторот

Главен показател за специфичноста на методот е позитивниот сигнал за амплификација на позитивната контрола која во нашиот случај беше плазмидна

DNA која во себе ги содржи и двата генски маркери 35S промоторот и Tnos терминаторот, секој од нив има соодветен експоненцијален раст и експресија. За одредување на специфичноста на методот за овие генетски регулаторни елементи користевме DNA екстрахирана од рибино брашно, *Salmonella* и свинско месо. Сите примероци се работевеа во по две повторувања (график 21).

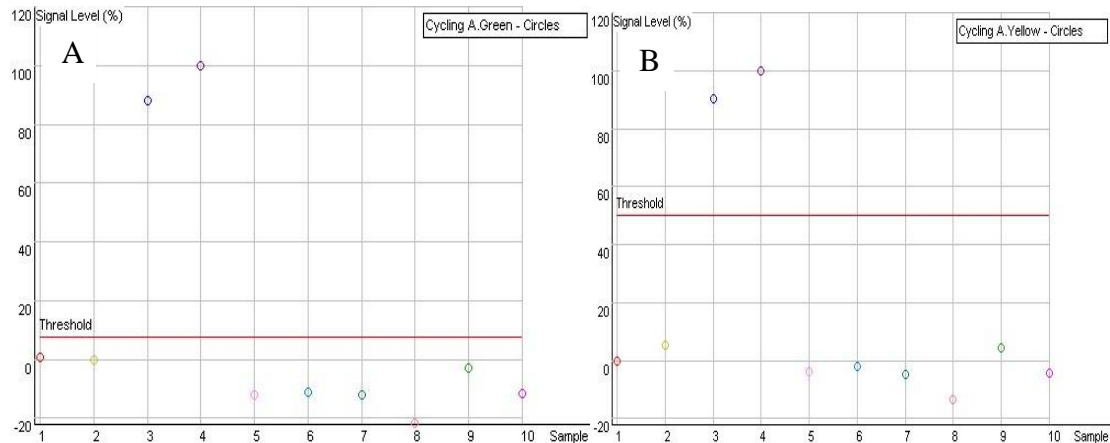


График 21. Амплификација на **А.** 35S промоторот и **В.** Tnos терминаторот за одредување на специфичност на методот (1,2 – негативна контрола, 3,4-позитивна контрола, 5,6-рибино брашно, 7,8-*Salmonella* spp., 9,10- свинско месо).

#### 5.4.5. Сензитивност

Параметар по кои се водевме при оптимизација на сензитивноста беше успешната амплификација на мал број на копии на најниски можни Ct вредности со најголемо зголемување на флуоресценцијата. Од претходните резултати можеме да забележиме дека со нашиот оптимизиран метод за присуство на *zein* ген можеме со сигурност да детектираме помалку од 3.7 копии на хаплоиден геном на пченка. Но, се поставува прашањето, колкава е можноста со нашиот оптимизиран метод да се детектира генетска модификација доколку таа е присутна во многу ниски концентрации. Тоа беше предизвик, за да продолжиме со методот на спајкување со точно одредена количина на аналит.

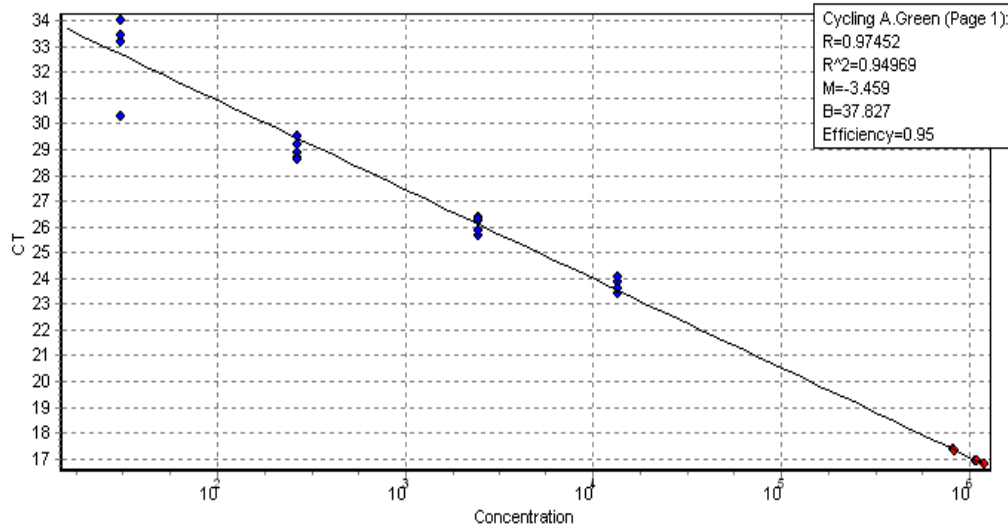


График 22. Калибрациона крива конструирана при амплификација на 35S промоторот со CRM со различен процент на ГМ пченка.

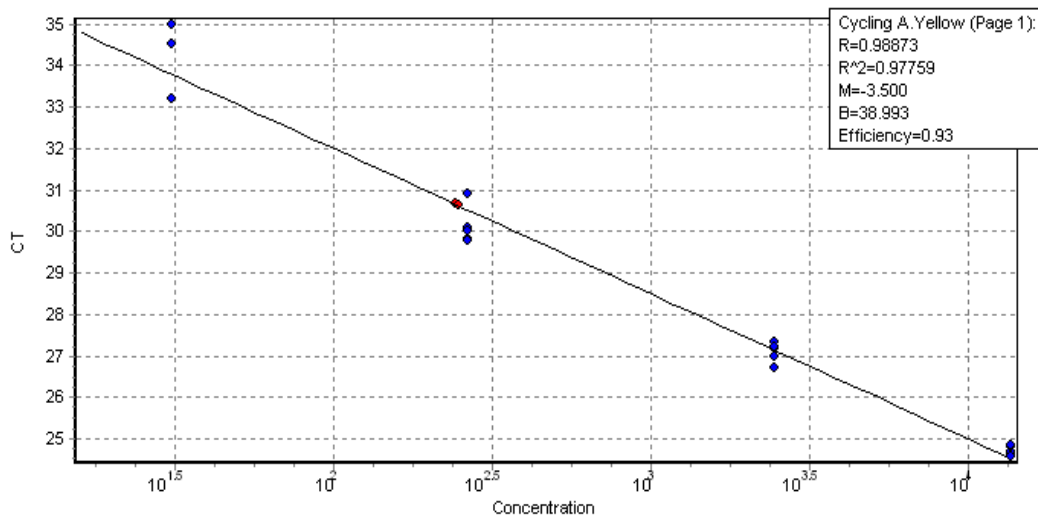


График 23. Калибрациона крива конструирана при амплификација на Tnos терминаторот со CRM со различен процент на ГМ пченка.

Лимитот на детекција на duplex PCR методот го одредивме преку спајкување на немодифицирана пченка со 100% генетски модифициран сертифициран референтен материјал MON89034 во соодветни масени соодноси за да добиеме пченка со 5% (w/w) содржина на генетска модификација, 1% (w/w), 0.1% (w/w) и 0.01% (w/w). По екстракција на DNA и квантификација со Nanodrop спектрофотометар, сите DNA примероци беа разредени до 100 ng/ $\mu$ L. Од резултатите за амплификација на 35S промоторот забележуваме дека до концентрација на генетска модификација од 0.1% сите пет репликати даваат

позитивен флуоресцентен сигнал додека при концентрација од 0.01% на генетска модификација во 80% случаи се добива амплификација на овој ген (Табела 23.). При конструкција на калибрациона крива се добива вредност за PCR ефикасност од 95%, линеарноста  $R^2=0.95$  и наклон на калибрационата крива  $-3.459$ , што ги задоволува критериумите пропишани од ENGL. Од друга страна при амплификација на Tnos терминаторот во 100% од случаи се јавува при содржина на генетска модификација од 0.1%, додека при 0.01% ГМ, позитивен сигнал добивме во 60% од случаи. Ефикасноста на PCR реакцијата во овој случај беше 93%, линеарноста  $R^2=0.98$ , додека наклонот на калибрационата крива беше  $-3.500$ . Од овие резултати може да заклучиме дека, доколку содржината на генетски модифицирана компонента на некој мешан матрикс е 0.01%, можеме со овој развиен, оптимизиран и валидиран метод, да ја детектираме со сигурност од 100%. Овој лимит на детекција е далеку понизок од граничната вредност од 0.9% која според Европските регулативи 1829/2003 и 1830/2003 треба да биде означена на етикетите на продуктите. Во истражувањата на Peng и сор. (2016), за одредување на лимит на детекција, секоја таргетна секвенца била анализирана во по три повторувања со разредувања кои одговараат на број на копии од 1000 до 1 копии/реакција, повторени во пет независни PCR run-ови. Кај испитуваните генетски елементи 35S промоторот и Tnos терминаторот, лимитот на детекција достигнува вредност од 0.01% ГМ или во број на копии тоа се 5.53 копии на ГМ ориз (KMD event). Притоа, одредување на лимитот на детекција за *zein* генот во генетски немодифицирана пченка бил 4.2 ср додека за *lectin* генот во MON89788 соја бил 10.39 ср на *lectin* генот. Во слично истражување (Bak и Emerson, 2019) лимитот на детекција на 35S промоторот бил 0.001% додека за Tnos терминаторот 0.01%.

Табела 25. Лимит на детекција (LOD) на 35S и Tnos терминаторот при спајкување на пченка со CRM MON89034 во концентрации од 5%, 1%, 0.1% и 0.01%.

	5%	1%	0.1%	0.01%
35S	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	4/5 (80%)
Tnos	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	3/5 (60%)

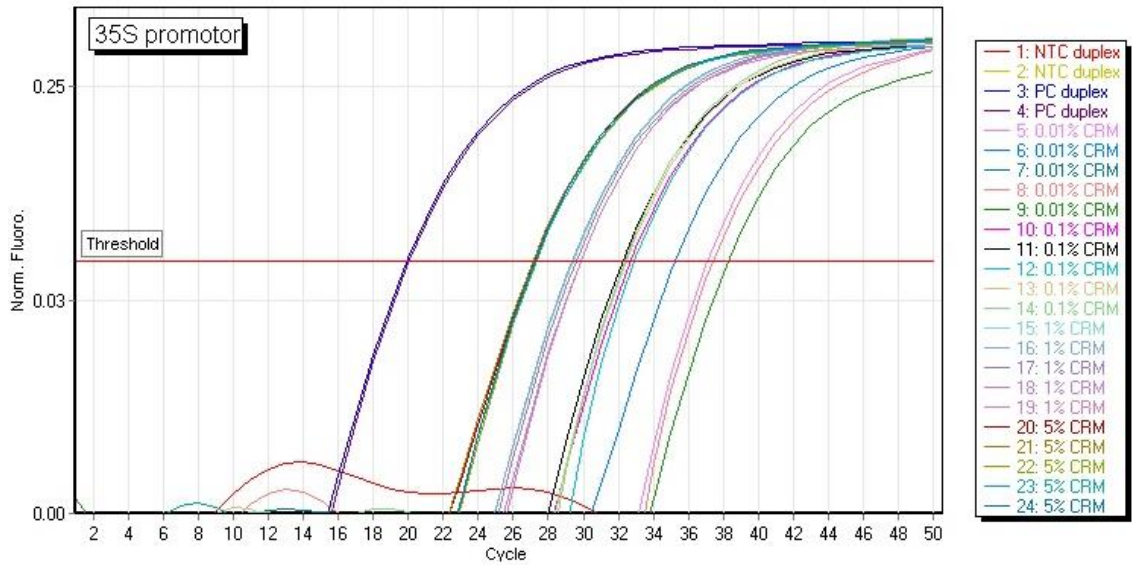


График 24. Амплификација на 35S при спајкување на ниво на примерок со CRM.

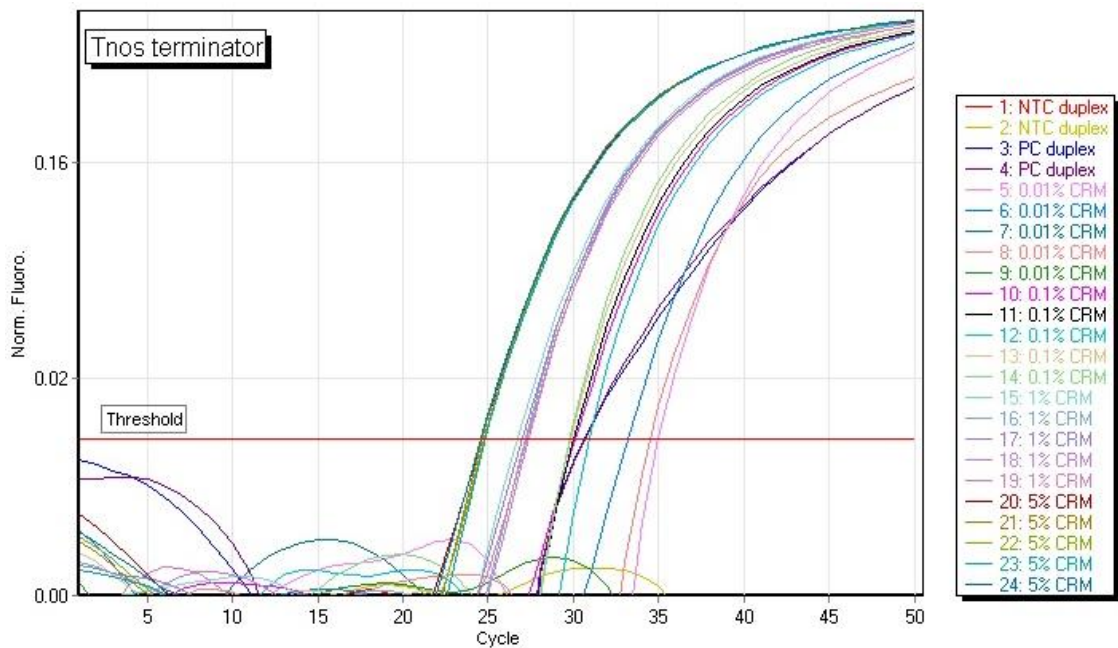


График 25. Амплификација на Tnos при спајкување на ниво на примерок со CRM.

Друг пристап за зголемување на сензитивноста на методот, е тој на Мапо и сор. (2018), кои што ја зголемиле количината на DNA која се аплицира при real-time PCR анализа. Имено тие со десеткратно зголемување на количината на DNA, добиле 10 пати понизок лимит на детекција за ГМ пченка во вредност од 0.005%. Истражувања со зголемувањето на бројот на повторувања вршеле и Sves и сор. (2015). Тие со зголемување на бројот на повторувања ја зголемиле прецизноста на

PCR реакцијата за 41% со користење на две повторувања наместо само едно мерење при секоја анализирана концентрација, додека пак со три повторувања, прецизноста се зголемила за 68%.

Друг метод за одредување на лимитот на детекција на нашиот метод беше на ниво на DNA. Имено, DNA екстракт од сертифициран референтен материјал MON89034 пченка која е 100% генетски модифицирана, се меша во волуменски соодноси со DNA екстракт од генетски немодифицирана пченка за да се добие 1% (v/v) и 0.1% (v/v) содржина на генетска модификација. Од 0.1% генетската модификација беа направени разредувања за добивање на 1, 2, 4, 10 и 20 копии на хаплоиден геном на пченка во еден микролитар. Од резултатите дадени во табела 26, може да се види дека најмал број на копии кога сите повторувања даваат позитивен сигнал за амплификација на 35S промоторот и Tnos терминаторот е 4 cp/μL. Значи лимит на детекција на овој метод доколку се користи матрикс со 0.1% генетска модификација се 20 копии на хаплоиден геном по реакција.

Табела 26. Одредување на лимит на детекција со 0.1% генетска модификација со мал број на копии на хаплоиден геном на пченка при спајкување на ниво на DNA.

Број на копии/ μL	35S	Tnos
1 cp/μL	5/9 (55%)	4/9 (44%)
2 cp/μL	5/9 (55%)	7/9 (77%)
4 cp/μL	9/9 (100%)	9/9 (100%)
10 cp/μL	6/6 (100%)	6/6 (100%)
20 cp/μL	6/6 (100%)	6/6 (100%)

Во овој случај при квантитативна анализа на добиените  $C_t$  вредности со бројот на хаплоидни копии, добиените вредности за PCR ефикасност, линеарност и наклон на калибрационата крива, имаа големи отстапувања од референтните вредности пропишани од ENGL. За 35S добивме вредности за PCR ефикасот од 134% до 154% и линеарност  $R^2$  од 0.41 до 0.70, додека за Tnos, PCR ефикасот се движи од -32% до 220 % со вредности за линеарност  $R^2$  од 0.53-0.56.

Според Европските регулативи 1829/2003 и 1830/2003 прагот за задолжително обележување на примероци кои содржат генетски модифицирани

состојки е 0.9%. Затоа следен чекор беше анализа на спајкување на ниво на DNA, но овој пат со 1% генетска модификација. Со резултатите добиени при работа со овој процент на генетска модификација би биле задоволени критериумите на Европската Унија за задолжително обележување на генетски модифицирана храна.

Табела 27. Одредување на лимит на детекција со 1% генетска модификација со мал број на копии на хаплоиден геном на пченка при спајкување на ниво на DNA.

	35S		Tnos	
	Сооднос позитивни/ репликати	Ct вредности	Сооднос позитивни/ репликати	Ct вредности
Позитивна контрола	2/2 (100%)	35.05±0.73	2/2 (100%)	28.62±0.21
0.37 ср/μL	0/6 (0%)	/	0/6 (0%)	/
2 ср/μL	6/12 (50%)	41.45±0.73	5/12 (42%)	33.75±1.33
5 ср/μL	6/6 (100%)	39.34±0.64	6/6 (100%)	32.6±0.70
10 ср/μL	12/12 (100%)	39.02±0.84	12/12 (100%)	32.97±1.39
20 ср/μL	6/6 (100%)	36.74±1.09	6/6 (100%)	30.91±0.69
50 ср/μL	11/11 (100%)	36.61±0.24	11/11 (100%)	29.05±0.24
100 ср/μL	11/11 (100%)	35.48±0.24	11/11 (100%)	28.45±0.10
500 ср/μL	9/9 (100%)	32.95±0.07	9/9 (100%)	26.57±0.07

За 35S: E=0,91, R<sup>2</sup>=0,97, M= -3,553 За Tnos: E=1,01, R<sup>2</sup>=0,87, M= -3,306

Резултатите дадени во табела 27, добиени при спајкување на ниво на DNA со 1% генетска модификација, ги задоволуваат критериумите пропишани од ENGL за PCR ефикасноста на амплификација на 35S промоторот, која се движи од 90 до 91%, линеарноста R<sup>2</sup> од 0.91 до 0.97, наклон на калибрационата крива M од -3.553 до -3.592. Солидни резултати добивме и за PCR ефикасноста на амплификација на Tnos терминаторот, со вредности од 101 до 113%, линеарност R<sup>2</sup> од 0.87 до 0.94 и наклон на калибрациона крива од -3.046 до -3.306. Според овие резултати можеме да заклучиме дека и спајкувањето на ниво на DNA при

одредување на лимит на детекција, може да даде задоволителни резултати според критериумите пропишани од ENGL, но само доколку се користи минимум 1% генетски модифициран примерок. Доколку ги споредиме резултатите од спајкување на ниво на примерок и спајкување на ниво на DNA со 1% генетски модифициран резултат, може да се забележи дека се добиваат скоро исти вредности за PCR ефикасност и линеарност на методот.

При „in-house“ валидација на квалитативни методи за анализа на ГМО, параметри кои се одредуваат се применливоста, практичноста, специфичноста, соодносот на лажно негативни и лажно позитивни резултати, сензитивноста и робушноста за singleplex и duplex real-time PCR метод. Дополнително ги одредивме и PCR ефикасноста и линеарноста.

#### 5.4.6. Релативна квантификација

Нашиот развиен метод е елемент-специфичен метод кој освен за скрининг детекција на генетска модификација може да се користи и за семиквантитативно одредување на ГМО. При одредени генетски модификации може да има повеќе копии на еден ист елемент, па во тој случај квантификацијата со елемент-специфичен метод би довело до поголема вредност на генетската модификација. Со одредување на соодносот меѓу бројот на копии на 35S промоторот или Tnos терминаторот и бројот на копии на *zein* генот како референтен ген на пченката, ја претставуваме релативната квантификација на ГМО изразена во проценти.

Во табела 28 прикажани се средните вредности на бројот на копии на 35S промоторот, на Tnos терминаторот и на референтниот *zein* ген во DNA од спајкувана пченка со CRM MON89034. Сите DNA екстракти од секој процент на ГМ (5%, 1%, 0.1% и 0.01%) беа разредени до 100 ng/ $\mu$ L. Релативната квантификација на генетската модификација беше пресметана со соодносот на средната вредност на бројот на копии на 35S промоторот или Tnos терминаторот со средната вредност на бројот на копии на референтниот ген, помножено со 100 за да се изрази во процент. Според резултатите може да се види дека при релативна квантификација со овој валидиран метод можеме со сигурност да детектираме 0.01% концентрација на генетска модификација.



Релативната стандардна девијација од реалните вредности за процентот на генетската модификација има позитивни вредности за пониски проценти на ГМ, како на пример 0.1% до 1%, а негативна вредност за повисок процент на ГМ како во случајот со 5% ГМ. Тоа значи, дека при пониски проценти на ГМ нивната вредност е преценета, додека при проценти блиски до горната граница на динамичниот опсег, нивните вредности се потценети. Овие сознанија се во согласност и со валидацискиот извештај на Savini и сор. (2008), според кој позитивна релативна стандардна девијација е добиена за вредности од 0.09% до 0.4% на ГМ, и негативни вредности за релативна стандардна девијација за ниво на ГМ од 3% до 8%

Табела 28. Средни вредности на % на ГМ од спајкување на ниво на примерок со CRM MON89034.

	% ГМО	С. вредност на Ct	С. вредност на cp/ $\mu$ L	Релативна квантификација [%]	Стандардна девијација
35S	5%	23.71	12204	4.75	-0.25
	1%	26.09	2518	1.04	0.04
	0.1%	28.97	373.2	0.13	0.03
	0.01%	32.98	16.75	0.01	0.00
Tnos	5%	24.70	12121.6	4.72	-0.28
	1%	27.08	2567.6	1.06	0.06
	0.1%	30.12	354.6	0.12	0.02
	0.01%	34.23	26	0.01	0.00
Zein	5%	18.44	256951	/	
	1%	18.37	241706	/	
	0.1%	18.37	293656	/	
	0.01%	18.34	314218	/	

## 6. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати може да се донесат следните заклучоци:

- Со оптимизација на метод за екстракција на DNA (концентрација и тип на детергент во пуферот за лизирање, прочистување со органски растворувачи, третман со ензимот RNаза А) добивме висококвалитетна DNA со доволен принос, чистота и интегритет, погодна за скрининг детекција на генетска модификација;
- Оптимизираниот протокол за екстракција на DNA ги содржи следните чекори: лизирање на клетките со пуфер кој содржи 2% SDS детергент и 10  $\mu$ L ензим Rназа А, инкубирани заедно на 65 °C во времетраење од 30 минути, отстранување на загадувачите со хлороформ, таложење на DNA со изопропанол и прочистување на талогот на DNA со 96% и 70% етанол;
- При валидација на методот за екстракција, докажавме дека со овој метод може се екстрахира DNA од сирова пченка и процесирана соја, преку амплификација на таксон-специфични гени, *zein* од пченка и *lectin* од соја. Чистотата на DNA освен преку соодносот A260/280 ја докажавме и со амплификација на внатрешна позитивна контрола;
- Со оптимизација на условите на real-time PCR реакција (концентрација на мастер микс, концентрација и сооднос на прајмери и проба, количина на DNA матрица, singleplex и duplex реакција) развивме протокол за успешен скрининг на 35S промоторот и Tnos терминаторот во генетски модифицирана храна;
- Лимитот на детекција (LOD) на овој метод за скрининг на генетска модификација е 0.01%, што е многу понизок од прагот за задолжително обележување на ГМО храна (0.9%) одреден според Европската регулатива 1830/2003 и Директивата 2001/18/EC на Европската Унија;
- При валидација на методот се добија задоволителни вредности за PCR ефикасноста, факторот на корелација и наклонот на калибрационата крива, согласно минималните барања на методите според упатството на Codex Alimentarius CAC/GL 74-2010 и техничкиот извештај од JRC (ENGL, 2015);

- Валидираниот метод за детекција на растителна DNA од пченка и соја со SOP 860, како и скрининг методот за детекција на 35S промоторот и Tnos терминаторот со SOP 859, се акредитирани методи и се во опсегот на аналитички методи на Институтот за храна при Факултетот за ветеринарна медицина, кои се користат при рутински анализи на генетски модифицирана храна.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Latif, A., Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 13:1.
- Ahmad, N., Mukhtar, Z. (2017). Genetic manipulations in crops: Challenges and opportunities. *Genomics*.109 (5-6): 494-505.
- Akaneme, FI., Odo, IC., Okafor, LA. (2014). DNA extraction protocols for *Citrullus lanatus* and *Capsicum frutescens*: Effects of incubation temperatures and ethanol concentrations on DNA purity and quantity. *African Journal of Biotechnology*. 13(5): 634-639.
- Aluru, MR., Rodermeel, SR., Reddy, MB. (2011). Genetic modification of low phytic acid 1-1 maize to enhance iron content and bioavailability. *J.Agric. Food Chem* 59: 12954-12962.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, Pijnenburg, H., Van Den Eede, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*. 214:3-26.
- Ashrafi-Dekhordi, E., Mazloomi, SM., Hemmati, F. (2021). A comparison of DNA extraction methods and PCR-based detection of GMO in textured soy protein. *J Consum Prot Food Saf*. 16: 51-57.
- Bak, A., Emerson, JB. (2019). Multiplex quantitative PCR for single- reaction genetically modified (GM) plant detection and identification of false positive GM plants linked to Cauliflower mosaic virus (CaMV) infection. *BMC Biotechnology*. 19:73.
- Ballari, RV., Martin, A. (2013). Assessment of DNA degradation induced by thermal and UV radiation processing: implications for quantitation of genetically modified organisms. *Food chemistry*. 141:2130-2136.
- BANR (Board on Agriculture and Natural Resources), 2000. Genetically modified pest protected plant: science and regulation. Washington: National Academy Press.
- Barbier, F., Chabikwa, TG., Ahsan, MU., Cook, SE., Powell, R., Tanurdzic, M., Beveridge, CA. (2019). A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene extrassion and sequencing. *Plant Methods*. 15:62.
- Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M., Chaves, S. (2016). DNA extraction: finding the most suitable method in Molecular microbial diagnostic methods: pathways to implementation for the food and water industries. *Elevier*.
- Basso, M.F., Ferreira, P.C.G., Kobayashi, A.K., Harmon, F.G., Nepomuceno, A.L., Molinari, H.B.C. and Grossi-de-Sa, M.F. (2019), MicroRNAs and new biotechnological tools for its modulation and improving stress tolerance in plants. *Plant Biotechnol J*, 17: 1482-1500.
- Bergau, J. (2019). Verdeca introduces HB4® Drought Tolerant Soybean at Gowers at Argentina's Expoagro. [online].<https://www.businesswire.com/news/home/20190326005300/en/Verdeca-introduces-HB4%C2%AE-Drought-Tolerant-Soybeans-Growers> (accessed 18/08/2021).
- Bertolino, LT., Caine, RS., and Gray, JE. (2019). Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Front. Plant Sci*. 10:225.

- Beste, L., Nahar, N., Dalman, K., Fujioka, S., Jonsson, L., Dutta, P. C. (2011). Synthesis of hydroxylated sterols in transgenic *Arabidopsis* plants alters growth and steroid metabolism. *Plant Physiol.* 157 (1), 426–440. doi:10.1104/pp.110.171199.
- Bitkinashvili, K., Gabriadze, I., Kutateladze, T., Vishnepolsky, B., Mikeladze, D., Datukishvili, N. (2019). Influence of heat processing on DNA degradation and PCR-based detection of wild-type and transgenic maize. *Journal of food quality*. Article ID 5657640, p. 11.
- Bonfini, L. (2021). In silico proposal of screening strategies for detecting EU authorized GMOs, European Commission, Ispra, JRC123103.
- Bonny, S. (2016). Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. *Environ. Manage.* 57, 31–48.
- Branquinho, MR., Ferreira, RTB., Cardarelli-Leite, P. (2012). Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction method from food. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 32(1): 112-118.
- Branquinho, MR., Gomes, DMV., Ferreira, RTB., Lawson-Ferreira, R., Cardarelli-Leite, P. (2013). Detection of genetically modified maize events in Brazilian maize-derived food products. *Food Sci Technol* 33(3): 399-403.
- Bravo, A., Gill, SS., Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423–435.
- Breyer, D., Kopertekh, L., Reheuls, D. (2014). Alternatives to antibiotic resistance marker genes for In-vitro selection of genetically modified plants -Scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Critical review in Plant sciences.* 33(4): 286-330.
- Brinch-Pedersen, H., Hatzak, F., Stoger, E., Arcalis, E., Pontopidan, K., Holm, P. (2006). Heat-stabile phytases in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.): Deposition pattern, thermostability and phytate hydrolysis. *J.Agric. Food Chem.* 54: 4624-4632.
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N., Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of quantitative real-time PCR methods. *Trends in food science and technology.* 37:115-126.
- Buziashvili, A., Cherednichenko, L., Kropyvko, S., Yemets, A. (2020). Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 25:101602.
- Cankar, K., Štebih, D., Dreo, T., Žel, J., Gruden, K. (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology.* 6:37.
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R. J., Anstrom, D. C., Harrison, J., Stoecker, M., et al. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol.* 147 (2), 446–455.
- Chakraborty, N., Ghosh, R., Ghosh, S., Narula, K., Tayal, R., Datta, A., Chakraborty, S. (2013). Reduction of oxalate levels in tomato fruit and consequent metabolic remodeling following overexpression of a fungal oxalate decarboxylase. *Plant Physiology.* 162: 346-378.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N., Datta, A. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *PNAS.* 97(7):3724-3729.

- Chakraborty, S., Newton, AC. (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathol.* **60** (1), 1-14.
- Chaouachi, M., Berard, A., Said, K. (2013). Relative quantification in seed ГМО analysis: state of art and bottlenecks. *Transgenic res.* 22:461-476.
- Chen, J., Nolan, TM., Ye, H., Zhang, M., Tong, H., Xin, P., Chu J., Chu, C., Li, Z., Yina, Y. (2017). Arabidopsis WRKY46, WRKY54 and WRKY70 transcription factors involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. *The plant cell.* 29:1425-1439.
- Chen, R., Xue, G., Chen, P., Yao, B., Yang, W., Ma, Q., Fan, Y., Zhao, Z., Tarczynski, MC., Shi, J. (2008). Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. *Transgenic Res.* 17:633-643.
- Chen, X., Yang, C., Jia, H. (2014). Issues confronting GMO crops in China. *J. Huazhong Agric. Univ.* 33, 115–117.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Severgnini, M., Maestri, E., Marmioli, N., Agrimonti, C., Baldoni, L., Donini, P., De Bellis, G., Castiglioni, B. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *Eur Food Res Technol.* 227:1429-1438.
- Coombs, JJ., Douches, DS., Li, W., Grafius, EJ., Pett, WL. (2002). Combining engineered (Bt-cry3A) and natural resistance mechanisms in potato for control of Colorado potato beetle. *J Amer Soc Hort Sci.* 127(1):62-68.
- Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V., Chuah, PF. (2013). Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem* 405: 6831-6844.
- Cotter, J., Kawall, K., Then, C. (2020). New genetic engineering technologies. Report of the results from the RAGES project 2016-2019.
- Cui XY, Chen ZY, Wu L, Liu XQ, Dong YY, Wang FW, et al. 2015. *rbcS* SRS4 promoter from *Glycine max* and its expression activity in transgenic tobacco. *Genetics and Molecular Research*, 14: 7395–7405.
- Daryanto S, Wang L, Jacinthe P-A (2016) Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production. *PLoS ONE* 11(5): e0156362.
- Daştan, K., Erkan, I. (2017). Real-time PCR detection of genetically modified organisms in several food products and their environmental effects in Turkey. *Fresenius Environmental bulletin.* 26(4): 2589-2595.
- Debode, F., Janssen, E., Berben, G. (2013). Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRICE actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7). *Eur Food Res Technol* 236:659-669.
- Demeke, T., Jenkins, GR. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem.* 396:1977-1990.
- Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC- Commission Declaration. *Official Journal of the European Union.* 106:1-39.

- Dodo, HW., Konan, KN., Chen, FC., Egnin, M., Viquez, OM. (2008). Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h2 leads to its significant reduction and decrease in peanut allergenicity. *Plant Biotechnology Journal*. 6: 135-145.
- Du, Y., Chen, F., Bu, G., Zhang, L. (2021). Distribution and degradation of DNA from non-genetically and genetically modified soybean (Roundup Ready): Impact of soybean protein concentrate and soybean protein isolate preparation. *Food Chemistry* 335:127582.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*. 19 (6)1349.
- European Commission Regulation (EC) No 1829/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 of genetically modified food and feed. *Off J Eur Union* L268, 1-23.
- European Commission Regulation (EC) No 1830/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off J Eur Union*. L268/24.
- European network of GMO laboratories (ENGL) (2015). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. European Commission, Ispra, JRC95544.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2020. In Brief to The State of Food Security and Nutrition in the World 2020. Transforming food systems for affordable healthy diets. Rome, FAO .
- Fartyal, D., Agarwal, A., James, D., Borphukan, B., Ram, B., Sheri, V., Agrawal, PK., Achary, VMM., Reddy, MK. (2018). Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management. *Sci Rep* 8:11598.
- Forte, V., Di Pinto, A., Martino, C., Tantillo, G., Grasso, G., Schena, F. (2005). A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. *Food control* 16 (6):535-539.
- Fukuta, S., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Hasegawa, M., Hayashi, I., Hashimoto, M., Kanbe, M. (2004). Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms. *European Food Research and Technology*. 218: 496-500.
- Gahan, LJ., Pauchet, Y., Vogel, H., Hecke, DG. (2010) An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet.*, 6(12), 1-11.
- Gargouri, H., Kacem, HH. (2018). Evaluation of alternative DNA extraction protocols for the species determination in turkey salami authentication tests. *International Journal of Food Properties*. 21(1): 733-745.
- Godalova, Z., Bergerova, E., Siekel, P. (2013). Effect of high temperature and pressure on quantification of MON 810 maize. *Czech J. Food Sci.* 31(4): 376-381.
- Gomez, I., Sanchez, J., Munoz-Garay, C., matus, V., Gill, SS., Soberon, M., Bravo, A. (2014). *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochem J.* 459:383-396.

- Greco, M., Saez, CA., Brown, MT., Bitonti, MB. (2014). A simple and effective method for high quality co-extraction of genomic DNA and total RNA from low biomass *Extocarpus siliculosus*, the model brown alga. PloS ONE. 9(5): e96470.
- Green, MR., Sambrook, J. (2017b). Isolation of high-molecular –weight DNA using organic solvents. Cold Spring Harb Protoc. 356-359
- Green, MR., Sambrook, J.(2017a). Precipitation of DNA with isopropanol. In Cold Spring Harbor Protocols:673-674. doi: 10.1101/pdb.prot093385.
- Guo, Y., Tian, S., Liu, S., Wang, W., and Sui, N. (2018). Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. Photosynthetica 56, 1–12.
- Halford, N.G., Shewry, P.R. (2000). Genetically modified crops: methodology, benefits, regulation and public concerns. Br Med Bull. 56(1): 62-73 .
- Hashimoto, M., Hossain, Sh., Al-Mamun, A., Matsuzaki, K., Arai, H. (2017). Docosaehaenoic acid: one molecule diverse functions. Critical Reviews in Biotechnology. 37(5): 579-597.
- He, G. H., Xu, Y. J., Wang, X. Y., Liu, M. J., Li, S. P., Chen, M. (2016). Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in Arabidopsis. BMC Plant Biol. 16:116.
- He, S., Cao, B., Yi, Y., Huang, S., Chen, X., Luo, S., Mou, X., Guo, T., Wang, Y., Wang, Y., Yang, G. (2021). DNA precipitation revisited: a quantitative analysis. Nano Select. 1:1-10.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, RJ. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods 10:21.
- Hedman, J., Rådström, P. (2013). Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. In “PCR detection of microbial pathogens” Second edition, Methods in Molecular biology. Springer.Humana Press, Totowa,NJ. vol 943.17-48.
- Herman, EM. (2003). Genetically modified soybeans and food allergies. Journal of Experimental Botany. 54 (386): 1317-1319.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, PS., Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology.10:413-417.
- Ho, MW. (2014). Horizontal transfer of GM DNA why is almost no one looking? Open letter to Kaare Nielsen in his capacity as a member of the European Food Safety Authority GMO panel. Microbial ecology in health and disease. 25:25919.
- Holden, MJ., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, RJ., Jenkins, GR. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. Anal Bioanal Chem 396:2175-2187.
- IPCC (2018) “Framing and context. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development and efforts to eradicate poverty “ Allen, MR., Dube, OP., Solecki, W., Aragon-Durand, F.,Cramer,W., Humphreys, S., Kainuma, M., Kala, J., Mahowald,N., Mulugetta, Y., Perez, R., Wairiu, M., Zickfeld, K. [Massin-Delmotte, V., Zhai, HO., Portner, D., Roberts, J., Skea, PR.,



- Shukla, A., Pirani, W., Moufouma-Okia, C., Pean, R., Pidcock, S., Connors, JBR., Matthews, Y., Chen, X., Zhou, MI., Gomis, E., Lonnoy, T., Tignor, M., Waterfield, T.J.
- Iqbal, N., Hussainm S., Raza, MA., Yang, CQ., Safdar, ME., Brestic, M., Aziz, A., Hayat, MS., Asghar, MA., Wang, XC., Zhang, J., Yang, W., Liu, J. (2019). Drought tolerance of soybean (*Glycine max* L. Merr) by improved photosynthetic characteristics and an efficient antioxidant enzyme activities under a split-root system. *Front.Physiol.*10:786..
- ISAAA (2019a). GM Events with drought stress tolerance [Online]. <https://www.isaaa.org/GMapprovaldatabase/GMtrait/default.asp?TraitID=18&GMTrait=Drought%20stress%20tolerance> (accessed 31/07/2021).
- ISAAA,(2021a).<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/eventslist/default.asp> (accessed 01/12/2021).
- ISAAA,(2021b).<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=6&Crop=Maize> (accessed 01/12/2021).
- ISAAA. (2018). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018. Brief No.54.ISAAA: Ithaca, NY.
- ISAAA. (2019b). Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019: Biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the New Frontier. Brief No.55. Ithaca, NY. ISBN: 978-1-892456-69-9.
- Itoh, Y., Takahashi, K., Uemura, Y. (2009). Solvent extraction of DNA with hydrolysable double -chain surfactant. *Separation science and technology.* 44(2): 466-4754.
- James, C. (2012). Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief No, 44. Ithaca, NY. ISBN: 978-1-892456-53-2.
- Jin, Y., Drabik, D., Heerink, N., Wessler, J. (2019). The cost of postponement of Bt rice commercialization in China. *Front. Plant Sci.*10:1226.
- JRC. (2021a). <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmo-methods/>.
- JRC.(2021b).<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full> (accessed 21/07/2021).
- Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M, Datta, A. (2016). Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement. *Theor Appl Genet.* 129:1639-1655.
- Kay, S., Van den Eede, G., (2001). The limits of GMO detection. *Nature biotechnology.* 19:405.
- Kennedy, B., Thigpen, CL. (2020). Many publics around world doubt safety of genetically modified foods. Pew Research Center. November 11, 2020.
- Khan, MIR., Palakolanu, SR., Chopra, P., Rajurkar, AB., Gupta, R., Iqbal, N., Maheshwari, C. (2020). Improving drought tolerance in rice: Ensuring food security through multi-dimensional approaches. *Physiologia Plantarum.* 172:645-668.
- Kolm, C., Mach, RL., Krskac, R., Brunner, K. (2015). A rapid DNA lateral flow test for the detection of transgenic maize by isothermal amplification of the 35S promotor.
- Krishnan, HB., Jang, S., Kim, WS., Kerley, MS., Oliver, MJ., Trick, HN. (2010). Biofortification of soybean meal: Immunological properties of the 27 kDa  $\gamma$ -zein. *J. Agric. Food Chem.* 59:1223-1228.
- Kumar, V., Chattopadhyay, A., Ghosh, S., Irfan, M., Chakraborty, N., Chakraborty, S., Datta, A. (2016). Improving nutritional quality and fungal tolerance in soya bean and grass

- pea by expressing an oxalate decarboxylase. *Plant Biotechnology Journal*. 14: 1394-1405.
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., Bekkaoui, F. (2018) Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Front. Chem.* 6:26.
- Lee M.K., Miles P. & Chen J.S., 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis Vip3A* toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339:1043-1047.
- Legay, S., Guerriero, G., André, C., Guignard, C., Cocco, E., Charton, S., (2016). MdMyb93 is a regulator of suberin deposition in russeted apple fruit skins. *New Phytol.* 212, 977–991.
- Leimanis, S., Hernandes, M., Fernandes, S., Boyer, F., Burns, M., Bruderer, S., Glouden, T., Harris, N., Kaeppli, O. Philipp, P., Pla, M., Puigdomenech, P., Vaitilingom, M., Bertheau, Y., Remacle, J. (2006). A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant molecular biology*. 61:123-139.
- Li, G., Wang, Y., Liu, B., Zhang, G. (2014). Transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) rice is safer to aquatic ecosystems than its non-transgenic counterpart. *PLoS One* 9 (8), 1–8.
- Li, Y., Chen, S., Liu, N., Wang, T., Veedu, RN., Li, T., Zhang, F., Zhou, H., Cheng, X. (2020a). A systematic investigation of key factors of nucleic acid precipitation towards optimized DNA/RNA isolation. *BioTechniques*. 68:191-199.
- Li, Y., Xiao, F., Liu, B., Gao, H., Wu, Y., Li, J., Li, J., Wu, G. (2020b). Rapid screening of genetically modified ingredients in soybean and cotton processing by-product and waste using direct qPCR. *Oil Crop Science* 5: 142-148.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*. 82(4):923-928.
- Livak, KJ., Flood, SJ., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res*. 4:357-362.
- Lucca, P., Hurrell, R., Potrykus, I. (2002). Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Am Coll Nutr*. 21(3): 1845-1905.
- Lucena-Aguilar, G., Sanchez-Lopez, AM., Barberan-Aceituno, C., Carrilo-Avila, JA., Lopez-Guerrero, JA., Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and biobanking*. 14(4): 264-270.
- Ludwig, Y., Slamet-Loedin, IH. (2019). Genetic biofortification to enrich rice and wheat grain iron: from genes to product. *Front. Plant Sci.* 10:833 .
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodrigues-Cerezo, E. (2012). Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature biotechnology*. 30 (3): 231-239.
- Mandaci, M., Cakiri, O., Turgut-Kara, N., Meric, S., Ari, S. (2014). Detection of genetically modified organisms in soy products sold in Turkish market. *Food Sci Technol*. 34(4): 717-722.
- Mano, J., Hatano, S., Nagatomi, Y., Futo, S., Takabatake, R., Kitta, K. (2018). Highly sensitive GMO detection using real-time PCR with a large amount of DNA template: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*. 101(2): 507-514.

- Martignago D, Rico-Medina A, Blasco-Escámez D, Fontanet-Manzaneque JB and Caño-Delgado AI (2020) Drought Resistance by Engineering Plant Tissue-Specific Responses. *Front. Plant Sci.* 10:1676.
- Martin-Salles, S., Machado, V., Massochin-Pinto, L., Fiuza, LM. (2017). Genetically modified soybean expressing insecticidal protein (Cry1Ac): management risk and perspectives. *FACETS.* 2:496-512.
- Masuda, H., Kobayashi, T., Ishimaru, Y., Takahashi, M., Aung, MS., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, NK. (2013). Iron-biofortification rice by the introduction of three barley genes participated in mugineic acid biosynthesis with soybean ferritin gene. *Front. Plant Sci.* 4:132.
- Matthes, N., Westphal, K., Haldemann, C., Egert M., Jokisch, C., Speck, B. (2020). Validation of a modified CTAB method for DNA extraction from protein-rich maize feedstuffs. *Journal of consumer protection and food safety.* Springer.
- Melchers, LS, Stuiver, MH. (2000). Novel genes for disease resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 147-152.
- Mendoza, A., Fernandez, S., Cruz, MA., Rodrigues-Perez, MA, Resendez-Perez, D., Barrera-Saldana, HA. (2006). Detection of genetically modified maize food products by the polymerase chain reaction. *Cienc. Tecnol.Aliment.* 5(3):175-181.
- Minnuni, M., Tombeli, S., Pratesi, S., Mascini, M., Piatti, P., Bogani, P., Buiatti, M., Mascini, M. (2001). A piezoelectric affinity biosensor for genetically modified organism (GMOs) detection. *Analytical letters.* 34(6):825-840.
- Mlalazi, B., Welsch, R., Namanya, P., Khanna, H., Geijskes, RJ., Harrison, MD., Harding, R., Dale, JL, Bateson, M. (2012). Isolation and functional characterization of banana phytoene synthase genes as potential cisgenes. *Planta.* 236: 1585-1598.
- Monsanto (2000). Glyphosate tolerant soybean 40-3-2. Novel food information-Food biotechnology.
- Moreano, F., Busch, U., Engel, KH. (2005). Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: influence of particle size composition and heat-induced DNA degradation. *J. Agric. Food Chem.* 53:9971-9979.
- Mullis, KB., Faloona, FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology.* 155:335-350.
- Nandi, S., Suzuki, YA., Huang, J., Yalda, D., Pham, Ph., Wu, L., Bartley, G., Huang, N., Lönnerdal, B. (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science.* 163(4):713-722.
- Naranjo, SE. (2011) Impact of *Bt* transgenic cotton on integrated pest management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5842–5851.
- NBSC (National Bureau of Statistics of China). (2018). *China statistical yearbook 2018*. Beijing: China Statistics Press. <http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj/2018/indexeh.htm>.
- Nelson, D. E., Repetti, P. P., Adams, T. R., Creelman, R. A., Wu, J., Warner, D. C., et al. (2007). Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16450–16455.

- Neuhaus JM., (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). *In: Datta S.K. & Muthukrishnan S., eds. Pathogenesis-related proteins in plants.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 77-105.
- Nikolič, Z., Petrovič, G., Pankovič, D., Ignjatov, M., Marinkovič, D., Stojanovič, M., Đorđević, V. (2017). Threshold level and traceability of Roundup Ready ® Soybean in tofu production. *Food Technol. Biotechnol.* 55(4): 439-444.
- Nolan, T., Handrs, RE., Bustin, SA. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols.* 1(3):1559-1582.
- Nordlee, JA., Taylor, SL., Townsend, JA., Thomas, LA., Bush, RK. (1996). Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *The New England Journal of Medicine.* 334(11):688-692.
- Oda, Y., Sadakane, K., Yoshikawa, Y., Imanaka, T., Takiguchi, K., Hayashi, M., Kenmotsu, T., Yoshikawa, K. (2016). Highly concentrated ethanol solutions: good solvents for DNA as revealed by single-molecule observation. *ChemPhysChem.* 17: 471-473.
- Ogo, Y., Wakasa, Y., Hirano, K., Uris, A., Marsuda, T., Takaiwa, F. (2014). Generation of transgenic rice with reduced content of major and novel high molecular weight allergens. *Rice.* 7:19.
- Oksman-Kaldentey K.M. & Barz W.H., 2002. *Plant biotechnology and transgenic plants.* New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Oliver, MJ. (2014). Why we need GMO crops in agriculture. *Mo Med.* 111(6): 492-507.
- Opel, KL., Chung, D., McCord, BR. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real-time PCR. *J Forensic Sci.* 55(1): 25-33.
- Padgette, SR., Kolacz, KH., Delannay, X., Re, DB., LaVallee, BJ., Tinius, CN., Rhodes, WK., Otero, YI., Barry, GF., Eichholtz, DA., Peschke, VM., Nida, DL., Taylor, NB., Kishore, GM. (1995). Development, identification and characterization of glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci* 35:1451-1461.
- Pansiot, J., Chaouachi, M., Cavellini, L., Romaniuk, M., Ayadi, M., Bertheau, Y., Laval, V. (2011). Development of two screening duplex PCR assays for genetically modified organism quantification using multiplex real-time PCR master mixes. *Eur Food Res Technol.* 232:327-334.
- Parmar, N., Singh, KH., Sharma, D., Singh, L., Kumar, P., Nanjundan, J., Khan, YJ., Chauhan, DK., Thakur, AK. (2017). Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. *Biotech.* 7:2394.
- Parrot, WA., All, JN., Adang, MJ., Bailey, MA., Boerma, HR., Stewart, CN. (1994). Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In vitro Cell Dev Biol.* 30P:144-149.
- Peng, Ch., Wang, P., Xu, X., Wang, X., Wei, W., Chen, X., Xu, J. (2016). Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *Springer Plus.* 5:889.
- Petrie, JR., Zhou, XR., Leonforte, A., McAllister, J., Shrestha, P., Kennedy, Y., Belide, S., Buzza, G., Gororo, N., Gao, W., Lester, G., Mansour, MP., Mulder, RJ., Liu, Q., Tian, L., Silva, C., Cogan, NOI., Nichols, PD., Green, AG., de Freyter, R., Devine, MD., Singh, SP. (2020). Development of Brassica napus (Canola) crop containing fish oil-like levels of DHA in the seed oil. *Front.Plant Sci.* 11:727.

- Petrillo, M., Angres-Loustau, A., Henriksson, P., Bonfini, L., Patak, A., Kreysa, J. (2015). JRC GMO-amplicons: a collection of nucleic acid sequences related to genetically modified organisms. Database. Article ID bav101.
- Piarulli, L., Savoia, MA., Tarano, F., D'Agostino, N., Sardaro, R., Girone, S., Gadaleta, S., Fucili, V., De Giovanni, C., Montemurro, C., Pasqualone, A. (2019). A robust DNA isolation protocol from filtered commercial olive oil for PCR-based fingerprinting. *Foods*. 8,462.
- Pietsch, K., Waiblinger, HU., Brodmann, P., Wurz, A. (1997). Screening methods for identification of “genetically modified” food of plant origin. *German Food Review (Germany)*. 93(2):35-38 (German language).
- Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M., and Caño-Delgado, A. I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development* 54. 146 (5), dev151894.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J., & Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist*, 182, 565–588.
- Ramesh, SV., Mishra, AK., Praveen, S. (2007). Hairpin RNA-mediated strategies for silencing of tomato leaf curl virus AC1 and AC4 genes for effective resistance in plants. *Oligonucleotides*, 17:251-257.
- Ramos-Gomez, S., Busto, MD., Perez-Mateos, M., Ortega, N. (2014). Development of a method to recovery and amplification DNA by real-time PCR from commercial vegetable oils. *Food chemistry*. 158: 374-383.
- Raymond, B., Johnston, PR., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.*18:189–194.
- Redillas, M. C., Jeong, J. S., Kim, Y. S., Jung, H., Bang, S. W., Choi, Y. D. (2012). The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 10, 792–805.
- Reeck G.R. et al., 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. *In*: Carozzi N. & Koziel M., eds. *Advance in insect control: the role of transgenic plants*. London: Taylor and Francis Press, 157-183.
- Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC.
- Reinhardt, LA., Svedruzic, D., Chang, CH., Cleland, WW., Richards, NGJ. (2003) Heavy atom isotope effects on the reaction catalyzed by the oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*. 125:1244-1252.

- Reymaekers, M., Smets, R., Maes, B., Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of clinical laboratory analysis*. 23:145-151.
- Rohini, V., Sankara, K., Rao, K. (2000). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci.*, 160, 889-898.
- Sabriu-Haxhijaha, A., Ilievska, G., Stojkovski, V., Blagoevska, K. (2020). A modified SDS-based method applied for extraction of high-quality DNA from raw corn and roasted soybean. *Mac Rev Vet* 43(1):61-67.
- Sahu, SK., Thangaraj, M., Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Network*. Article ID 205049, 6 pg.
- Saiki, RK., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, KB, Horn, GT., Erlich, HA., Arnheim, N.(1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science*. 230 (4732): 1350-1354.
- Salgotra, R., Chauhan, BS. (2020). Comparison of genomic DNA extraction method to obtain high DNA quality from barnyard grass (*Echinochloa colona*). *Trends in Res*. 3:1-5.
- Salomon, D., Sessa, G. (2012). Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. Chapter 21 in book: *Plant Biotechnology and Agriculture*. 329-342.
- Sanjuan-Badillo, A., Galvez, A., Plasencia, J., Quirasco, M. (2014). Assessment of DNA extraction methods from various maize (*Zea mays* L.) tissues for environmental GMO monitoring in Mexico. Part I: detection by end-point PCR. *Agrociencia*. 48:17-33.
- Särkinen, T., Staats, M., Richardson, JE., Cowan, RS., Bakker, FT. (2012). How to open the treasure chest? Optimizing DNA extraction from herbarium specimens. *PloS ONE*. 7(8): e43808.
- Satoh, R., Nakamura, R., Komatsu, A., Oshima, M., Teshima, R. (2011). Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 59(3):437-444.
- Savini, C., Bogni, A., Grazioli, E., Munaro, B., Mazzara, M., Van den Eede, G. (2008). Event-specific method for the quantitation of maize line MON 89034 using real-time PCR. *CRL-GMFF Validation report maize MON89034*. JRC48921.
- Shahinnia, F., Le Roy, J., Laborde, B., Sznajder, B., Kalambettu, P., mahjourimajd, S., Tilbrook, J., Fleury, D. (2016). Genetic association of stomatal traits and yield in wheat grown in low rainfall environments. *BMC Plant Biology* 16:150.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*. 9 (10). 2395-2410.
- Shew, AM., Nalley, LL., Snella, HA., Naygra, RM., Dixon, BL. (2018). CRISPR versus GMOs: Public acceptance and valuation. *Global Food Security*. 19:71-80.
- Shultz, JL., Kurunam, D., Shopinski, K., Iqbal, MJ., Kazi, S., Zobrist, K., Bashir, R., Yaegashi, S., lavu, N., Afzal, AJ., Yesudas, CR., Kassem, MA., Wu, C., Zhang, HB., Town, C., Maksem, K., Lightfoot, DA. (2006). The soybean genome database (SoyGD): a browser for display of duplicated, polyploidy, regions and sequences tagged sites on the integrated physical and genetic maps of *Glycine max*. *Nucleic Acids Research*. Database issue. D758-D765.

- Siddique, Z., Jan, S., Imadi, SR., Gul, A., Ahmad, P. (2016). "Drought stress and photosynthesis in plants" in book Water stress and crop plants: A sustainable approach. 2<sup>nd</sup> edition. P. Ahmad, 1-11.
- Singh, AP., Savaldi-Goldstein, S. (2015). Growth control: brassinosteroid activity gets context. *J. Exp. Bot.* 66 (4), 1123–1132.
- Singh, G., Kumar, S., Singh, P. (2003). A quick method to isolate RNA from wheat and other carbohydrate-rich seeds. *Plant molecular biology reporter.* 21:93a-93f.
- Sohag, AAM., Tahjib-UI-Arif, M., Brestic, M., Afrin, S., Sakil MA., Hossain, MT., Hossain, MA, Hossain, MA. (2020). Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant Soil Environ.* 66:7-13
- Stewart, CN., Adang, MJ., All, JN., Raymer, PL., Ramachandran, S., Parrot, WA. (1996). Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Plant. Physiol.* 112:115-120.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, MW., Kubistra, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantitation.* 3:9-16.
- Swaminathan, K., Varala, K., Hudson, ME. (2007). Global repeat discovery and estimation of genomic copy number in large, complex genome using a high-throughput 454 sequence survey. *BMC Genomics.* 8:132.
- Tan, SC., Yiap, BC. (2009). DNA, RNA and protein extraction: the past and the present. *Journal of biomedicine and biotechnology.* Article ID 574398, p. 10.
- Tohidfar, M., Hossaini, R., Shokhandan, Bashir N, Tabatabaei M. (2012). Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Phaseolus vulgaris*. *Czech J. Genet. Plant Breeding,* 4, 345-355.
- Tohidfar, M., Khosravi, S. (2015). Transgenic crops with an improved resistance to biotic stresses. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.* 19, 62-70.
- Trifa, Y., Zhang, D. (2004). DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification. *J.Agric. Food Chem.* 52: 1044-1048.
- Tung Nguyen, CT., Son, R., Raha, AR., Lai, OM., Clemente Michail, WVL. (2009). Comparision of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *International food research journal.* 16:21-30.
- Turkec, A., Lucas, SJ., Karlik, E. (2016). Monitoring the prevalence of genetically modified (GM) soybean in Turkish food and feed products. *Food Control.* 59:766-772.
- Vicini J.L. (2017). GMO crops in animal nutrition. *Animal Frontiers.* 7(2): 9-14.
- Waiblinger, HU., Ernst, B., Anderson, A., Pietsch, K. (2008). Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. *Eur Foor Res Technol.* 226:1221-1228.
- Walker, DR., All, JN., McPherson, RM., Boerma, HR., Parrott, WA. (2000). Field Evaluation of Soybean Engineered with a Synthetic *cryIAc* Transgene for Resistance to Corn Earworm, Soybean Looper, Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera: Pyralidae), *Journal of Economic Entomology,* 93(3): 613-622.

- Wang, W., Wang, C., Pan, D., Zhang, Y., Luo, B., and Ji, J. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence images of soybean (*Glycine max*) seedlings. *Int. J. Agric. & Biol. Eng* 11, 196–201.
- Wang, X., Teng, D., Tian, F., Guan, Q., Wang, J. (2012). Comparison of three DNA extraction methods for feed products and four amplification methods for the 5'-junction fragment of Roundup Ready soybean. *J. Agric. Food chem.* 60: 4586-4595.
- Wang, Y., Zhang, G., Du, J., Liu, B., Wang, M. (2010). Influence of transgenic hybrid rice expressing a fused gene derived from cry1Ab and cry1Ac on primary insect pests and rice yield. *Crop Protect.* 29, 128–133.
- Wen, Sh., Wen, N., Pang, J., Langen, G., Brew-Appiah, RAT., Mejias, JH., Osorio, C., Yang, M., Gemini, R., Moehs, CP., Zemetra, RS., Kogel, KH., Liu, B., Wang, X., Wettstein, D., Rustgi, S. (2012). Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential application for human health. *PNAS.* 109 (50):20543-20548.
- West, CE. (2000). Meeting requirements for vitamin A. *Nutr Rev* 58 (11): 341-345.
- WHO, 2014. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/food-genetically-modified>.
- Williams, HE., Wandzilak, TR. (1989). Oxalate synthesis, transport and the hyperoxaluric syndromes. *The Journal of urology.* 141:742-747.
- Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Van Bockstaele, E., De Loose, M. (2001). Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *European food research and technology.* 213:107-112 .
- WMO. The state of greenhouse gases in the atmosphere based on Global Observations through 2019. (2020). WMO greenhouse gas bulletin. 16. 23 November 2020.
- Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Li, W., Zhang, L., Yunjing, L., Li, X., Zhu, L., Wu, G. (2014). Development of a general methods for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods. *Scientific reports.* 4:7356
- Xia, Y., Chen, F., Du, Y., Liu, C., Bu, G., Xin, Y., Liu, B. (2019). A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience reports.* 39. BSR20182271.
- Xin, Z., Chen, J. (2012). A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods* 8:26.
- Yamamoto T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T., Matsuta, N. (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* 19:639-646.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klott, A., Zhan J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science.* 287 (5451):303-305.
- Yemets, AI., Tanasienko, IV., Krasnylenko, YA., Blume, YB. (2014). Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* 38: 989-1002.
- Yin, K., Gao, C., Qiu, J-L. (2017). Progress and prospects in plant genome editing. *Nature plants.* 3 (17107).
- Zain Hasan, SM., Shafie, M., Shafie, B. Shah, RM. (2008). Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*). *African journal of Biotechnology.* 7(18):3211-3216.



- Žel, J., Demšar, T., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K. (2015). Extraction of DNA from different sample types—a practical approach for ГМО testing. *Acta biologica Slovenica*. 58(2): 61-75.
- Zhang, Y., Scherthner, J., Labbe, N., Heffor, MA., Zhao, J., Simmonds, DH. (2014). Improved protein quality in transgenic soybean expressing a de novo synthetic protein, MB-16. *Transgenic Res.* 23(3):455-467.
- Zhao, F., Maren, N., Kosentka, PZ., Liao, YY., Lu, H., Duduit, JR., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, AI., Ranney, TG., Liu, W. (2021). An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. *Horticulture Research*. 8:179.
- Закон за изменување и дополнување на законот за безбедност на храна, Службен весник на Република Македонија, број 187, 2013 , стр. 6-7.