

Sledovanie degradácie DNA v strukovinách využitím PCR metódy

GABRIEL KOLLÁROVIČ - MIROSLAVA KRETOVÁ - PETER SIEKEL

SÚHRN. Sledovala sa degradácia DNA semien strukovín v závislosti od teploty a času tepelného spracovania. Na analýzu úrovne degradácie DNA sa využila metóda PCR. Na určenie stupňa degradácie sa navrhli priméry pre lektínový a fazeolínový gén tak, aby sa získali PCR produkty rôznej veľkosti. Menšie fragmenty DNA sa amplifikovali vo všetkých vzorkách. Väčšie fragmenty sa amplifikovali, len ak tepelné spracovanie trvalo 60 min pri 100 °C a 30 min pri 200 °C. Pri tepelnom spracovaní pri 80 °C sa všetky fragmenty rôznych dĺžok amplifikovali do 360 min.

Kľúčové slová: degradácia DNA; strukoviny; tepelné spracovanie; PCR

Posúdenie rizika u potravín, ktoré sa získali z geneticky modifikovaných rastlín, si vyžaduje holistický prístup, ktorý zahrnuje množstvo činiteľov pôsobiacich na zdravie konzumenta [1]. Na vykonanie takéhoto posudku je potrebné verejne oznámiť údaje, ktoré sa týkajú takých aspektov, ako identifikácia rizika s jeho charakterizáciou a určenie miery rizika [2]. Identifikácia rizika sa týka biologických, chemických alebo fyzikálnych agens, prítomných v určitých častiach potravín alebo skupiny potravín, ktoré môžu mať za následok nepriaznivý vplyv na zdravie. Charakterizácia miery rizika predstavuje kvalitatívne a kvantitatívne zhodnotenie podstaty nepriaznivého zdravotného efektu [3].

DNA sama osebe nepredstavuje zdravotné riziko, ale môže prenášať dedičnú informáciu na iné organizmy, najmä na baktérie [4]. Niektorí autori uvažujú o prenose rekombinantnej DNA do baktérií, ktoré sú prítomné v potravinách a gastrointestinálnom trakte. Pravdepodobnosť prenosu DNA z potravín na baktérie súvisí s perzistenciou natívnej DNA. Bolo dokázané,

Mgr. Gabriel KOLLÁROVIČ, RNDr. Miroslava KRETOVÁ, RNDr. Peter SIEKEL, CSc.,
Výskumný ústav potravinársky, P. O. box 25, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava 26.
Korešpondujúci autor: RNDr. Peter SIEKEL, CSc., e-mail: peter.siekel@vup.sk

že niektoré baktérie asociované s potravinami sú transformovateľné voľnou DNA, ktorá je prítomná v potravinovej matrici [5-7]. O voľnej DNA, ktorá by bola prítomná a stabilná počas spracovania a uskladňovania potravín je len málo údajov. Známe sú základné procesy, ktoré sa zúčastňujú na degradácii DNA v potravinách a krmivách. Na prenos funkčných génov z transgénnych rastlín do baktérií je potrebná minimálna dĺžka DNA fragmentov 250 bp. Veľkosť štrukturálnych génov je medzi 150 bp až 6000 bp a regulačných sekvencií medzi 100 bp až 150 bp [8], ale na ich identifikáciu sa využívajú len krátke úseky DNA (cca 100 bp) [9, 10]. Pre posudzovanie rizika prenosu transgénov je potrebné zistiť nielen prítomnosť rekombinantnej DNA v potravině, ale aj určiť distribúciu dĺžok fragmentov rekombinantnej DNA [3].

Napriek množstvu údajov, ktoré dokazujú prítomnosť DNA v potravinách počas ich spracovania [11-13] a jej stabilitu v jednotlivých častiach tráviacej sústavy [14, 15] nie je presne známa kinetika degradácie DNA počas výrobného procesu potravín. Počas výroby chleba bola zistená degradácia rastlinnej DNA, pri ktorej hlavnú úlohu zohrávali faktory ako teplota a pH prostredia [16, 17]. Degradácia DNA je závislá od podmienok, ktoré vznikajú počas výrobného procesu a od potravinovej matrice, ktorej je súčasťou [3].

Strukoviny sú významným zdrojom proteínov na výživu ľudí a zvierat. Používajú sa ako súčasť krmív pre hospodárske zvieratá, pričom sa najčastejšie využíva sója. Na Slovensku sa pestujú najmä hrach a fazuľa, ktoré sú vhodným alternatívnym zdrojom proteínov, kým sója sa dováža. Cieľom práce bolo štúdium degradácie DNA v semenách hrachu a fazule.

Materiál a metódy

Sledovanie degradácie DNA v semenách hrachu a fazule

Semená hrachu (Gloriosa) a fazule (Bobovica biela maslová) sa varili v destilovanej vode (pH 7,0) pri 80 °C, 100 °C a 200 °C. Vzorky sa odoberali pri 80 °C a 100 °C v časových intervaloch od 0 do 360 min, v prípade tepelného opracovania pri 200 °C vo vzorkách hrachu od 0 do 120 min, a pri 200 °C vo vzorkách fazule od 0 do 75 min (tab. 1).

Izolácia DNA zo semien hrachu a fazule a overenie degradácie DNA

Pred izoláciou DNA zo semien hrachu a fazule sa tepelne opracované semená homogenizovali v trecích miskách, v prípade hrachu navyše tiež s využitím mixéra AY47R1 Moulinex (Barcelona, Španielsko). Po homoge-

TAB. 1. Teplota a čas opracovania vzoriek.
TAB. 1. Temperature and duration of sample processing.

Teplota - Čas ¹ [min]	0	7	15	30	45	60	75	90	120	150	225	360
hrach ² , fazuľa ³ - 80 °C, 100 °C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
hrach - 200 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
fazuľa - 200 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Vysvetlivky: + izolovaná DNA, – neuskutočnená izolácia.

Key: + isolated DNA, – not isolated. 1 - temperature - time, 2 - pea, 3 - beans.

nizácii sa DNA izolovala pomocou súpravy GeneSpin (GeneScan, Teltow, Nemecko), podľa priloženého návodu. Výsledný elučný objem bol 100 µl.

Kvalita DNA sa stanovila elektroforeticky, s použitím 1% agarózového gélu [18].

Identifikácia hrachového a fazuľového lektínového, fazeolíнового génu pomocou PCR reakcie

PCR sa robila v objeme 25 ml reakčnej zmesi, ktorá mala zloženie: 10 mmol.l⁻¹ Tris HCl, pH 8,8; 50 mmol.l⁻¹ KCl; 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂; 0,05 % Tween 20; 200 mmol.l⁻¹ dNTP (Invitrogen, Carlsbad, California, USA); 50 pmol primérov, ktoré sú uvedené v tab. 2 a tab. 3, 1 U HotStarTaq polymerázy (2 U HotStarTaq polymerázy pre väčšie fragmenty), od firmy Qiagen (Hilden, Nemecko), a 1 ml vzorky DNA. Priméry sa navrhli na základe sekvencií prístupných v databáze GeneBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA): hrachový lektínový gén

TAB. 2. Priméry pre hrachový lektínový gén.
TAB. 2. Pea lectin gene primers.

Názov priméru ¹	Sekvencia ² (5'→3')	Veľkosť produktu PCR ³
HRACH F3	ttgtcataaatgcacccaacagttacaacg	122 bp
HRACH R1	catactctgcgctattgaaaactccgag	
HRACH F2	atggcttctcttcaaaccctaatgatctcg	417 bp
HRACH R1	catactctgcgctattgaaaactccgag	
HRACH F2	atggcttctcttcaaaccctaatgatctcg	748 bp
HRACH R2	gcataattctgctcctgtggtagctgag	
HRACH F3	ttgtcataaatgcacccaacagttacaacg	874 bp
HRACH R3	ccaaaatggtgagaggtgcacatgaacc	

1 - primer, 2 - sequence, 3 - length of PCR products.

TAB. 3. Priméry pre fazuľový lektínový a fazeolínový gén.

TAB. 3. Bean lectin and phaseolin gene primers.

Názov priméru ¹	Sekvencia ² (5'→3')	Veľkosť produktu PCR ³
FAZ F2	cagtagacctgaagagcggttcttcc	116 bp
FAZ R2	cggagagccttgaagcaaaagacc	
FAZ F1	cctcttccttggtgcttctcacc	469 bp
FAZ R1	tgatggagttcacgtcgatgcc	
FAZ F1	cctcttccttggtgcttctcacc	724 bp
FAZ R2	cggagagccttgaagcaaaagacc	
Psn-F	tcgtcttggtgaaacctgat	1371 bp
Psn-R	ttttgctgttcctggttggtg	

1 - primer, 2 - sequence, 3 - length of PCR products.

pod číslom X66368, fazuľový lektínový gén pod číslom AJ439563 a fazuľový fazeolínový gén pod číslom J01263, použitím programu Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts, USA).

PCR reakcia prebiehala v termocykléri Personal Cyler (Biometra, Göttingen, Nemecko) alebo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), podľa teplotného programu uvedeného v tab. 4.

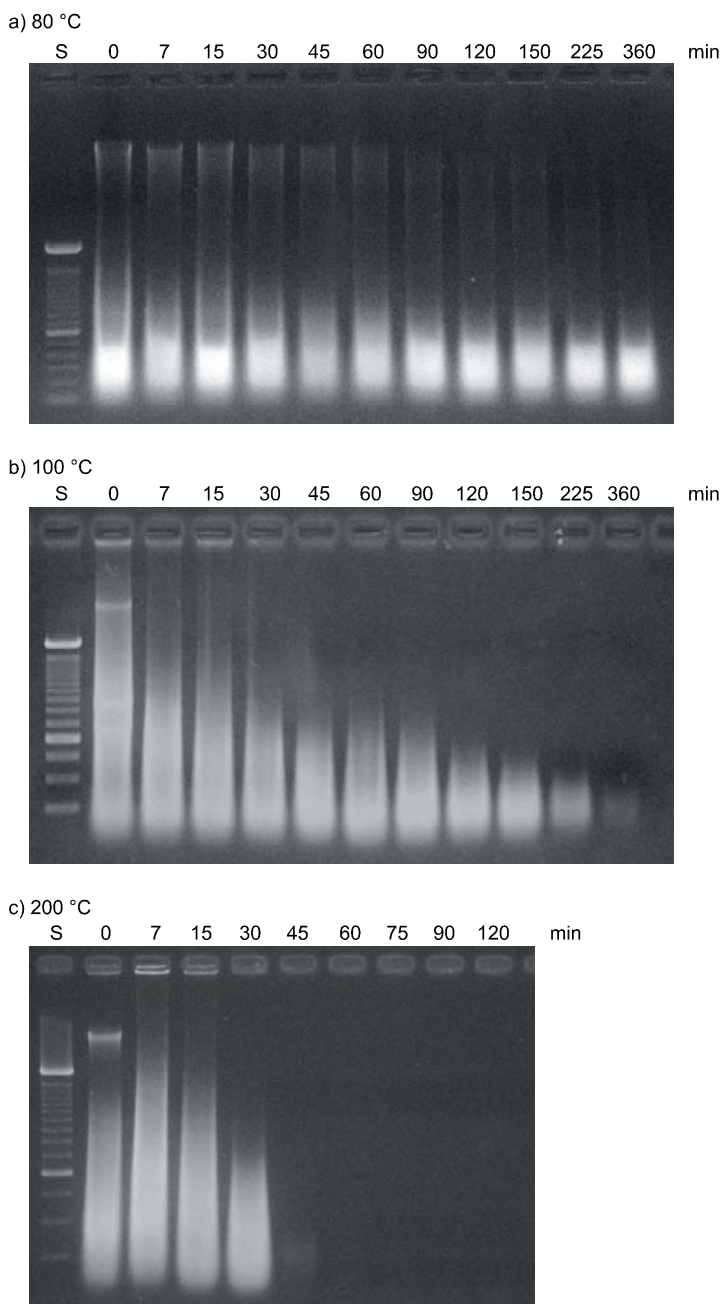
Produkty PCR sa analyzovali elektroforeticky rovnako ako v prípade zisťovania kvality DNA po jej izolácii.

Tab. 4. Teplotný program na amplifikáciu lektínového a fazeolínového génu.

Tab. 4. Temperature programme for amplification of lectin and phaseolin genes.

Krok ¹	Teplota ²	Čas ³
Počiatočná denaturácia ⁴	95 °C	15:00 min
30 cyklov ⁵	94 °C	0:30 min
	58 °C	0:30 min
	72 °C	1:00 min
	72 °C	5:00 min
Záverečná polymerizácia ⁶	72 °C	5:00 min
Ochladenie ⁷	4 °C	∞

1 - step, 2 - temperature, 3 - time, 4 - initial denaturation, 5 - cycles, 6 - terminal polymerization, 7 - cooling.



OBR. 1. Degradácia DNA v hrachu pri tepelnom opracovaní pri 80 °C, 100 °C a 200 °C.
S - štandard molekulovej hmotnosti 250 bp.

FIG. 1. DNA degradation in pea during heat processing at 80 °C, 100 °C and 200 °C.
S - molecular weight standard 250 bp.

Výsledky a diskusia

Celkový obsah DNA v potravinách a jej kvalita závisí od stupňa technologického spracovania, počas ktorého dochádza k postupnej fragmentácii DNA [19]. Po objavení geneticky modifikovaných rastlín na trhu sa pozornosť upriamila na skúmanie vlastností a správania transgénnej DNA. V procese genetickej modifikácie sa používajú tzv. markerové gény, najmä gény rezistencie voči antibiotikám, o ktorých sa uvažuje, že sa môžu horizontálne prenášať z geneticky modifikovaných rastlín na črevné a pôdne baktérie. Fragmentácia DNA prebieha počas technologického opracovania, ako aj počas prechodu potravín tráviacim traktom, čím sa znižuje pravdepodobnosť horizontálneho prenosu [8, 15].

Degradácia DNA v semenách hrachu a fazule sa sledovala pri rôznych teplotách a v rôznych časových intervaloch. Po elektroforetickej analýze sa sledovala fragmentácia DNA, ktorá bola odlišná v rámci sledovaných teplôt a časových intervalov. V závislosti od tepelnej úpravy semien sa zistil vyšší stupeň degradácie DNA pri 100 °C a 200 °C ako pri 80 °C (obr. 1). Podobný priebeh degradácie DNA sa pozoroval pri pečení chleba, kde po 5–10 min došlo k výraznému poklesu výťažku DNA [19]. Okrem teploty môže zohrávať významnú úlohu pri technologickom spracovaní potravín aj pH. Pri kombinácii obidvoch parametrov má však teplota menší vplyv na stupeň degradácie ako pH [3].

Na sledovanie prítomnosti hrachového lektínového génu, fazuľového lektínového génu a fazeolínového génu sa využila PCR. Kombinácie primérov použitých v PCR umožňujú pripraviť rôzne veľké produkty PCR. Maximálna veľkosť produktu PCR, ktorý je možné získať, odráža stupeň degradácie DNA v závislosti od stupňa tepelného opracovania.

TAB. 5. Degradácia DNA v hrachu.
TAB. 5. DNA degradation in pea.

	t [min]			
	122 bp HRACH F3, HRACH R1	417 bp HRACH F2, HRACH R1	748 bp HRACH F2, HRACH R2	874 bp HRACH F3, HRACH R3
80 °C	360	360	360	360
100 °C	225	60	60	60
200 °C	120	30	30	30

t - čas, kedy bol ešte elektroforeticky detegovateľný produkt PCR.

t - time of the last detection of the PCR product by electrophoresis.

TAB. 6. Degradácia DNA vo fazuli.

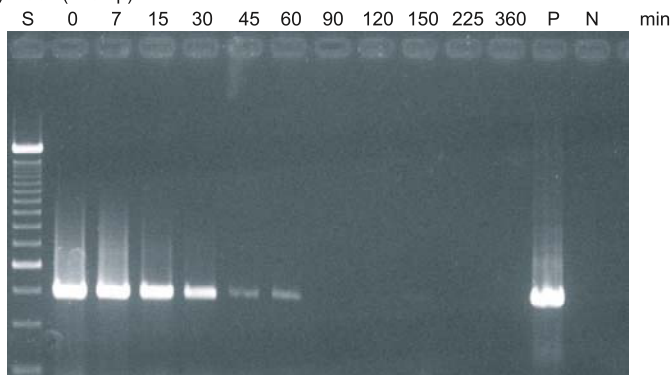
TAB. 6. DNA degradation in beans.

	t [min]			
	116 bp FAZ F2, FAZ R2	469 bp FAZ F1, FAZ R1	724 bp FAZ F1, FAZ R2	1371 bp Psn-F, Psn-R
80 °C	360	360	360	225
100 °C	360	120	45	45
200 °C	75	45	45	45

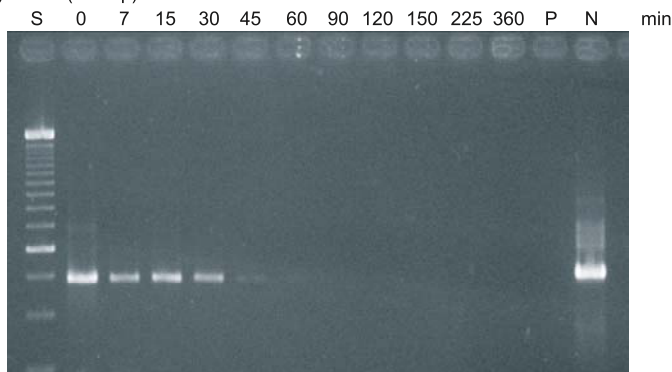
t - čas, kedy bol ešte elektroforeticky detegovateľný produkt PCR.

t - time of the last detection of the PCR product by electrophoresis.

a) hrach (748 bp)



b) fazuľa (724 bp)



OBR. 2. Amplifikácia fragmentu lektínového génu hrachu a fazule po tepelnom spracovaní pri 100 °C.

S - štandard molekulej hmotnosti 250 bp, P - pozitívna kontrola, N - negatívna kontrola.

FIG. 2. Amplification of the lectin gene fragment of pea and beans after the thermal treatment at 100 °C.

a) pea, b) beans. S - molecular weight standard 250 bp, P - positive control, N - negative control.

Degradácia DNA hrachu a fazule pri všetkých analyzovaných teplotách a časových intervaloch neovplyvnila amplifikovateľnosť menších fragmentov v PCR (tab. 5 a tab. 6). Väčšie fragmenty boli amplifikovateľné do 60 min v prípade spracovania pri 100 °C a do 30 min v prípade spracovania pri 200 °C. V prípade spracovania pri 80 °C sa všetky fragmenty rôznych dĺžok amplifikovali do 360 min. Stupeň amplifikovateľnosti sa výrazne neodlišoval medzi sledovanými vzorkami hrachu a fazule, čo znázorňuje obr. 2.

Pri PCR analýze fazeolínového génu fazule sa detegoval fragment veľkosti 1379 bp, ktorý sa zachovával minimálne 45 min počas tepelného spracovania pri 80 °C, 100 °C a 200 °C (tab. 6). Naše výsledky sú v súlade s autormi, ktorí zistili, že fragment DNA kukurice Bt-176 o veľkosti 1225 bp bolo možné identifikovať po tepelnej úprave pri 65 °C a pH 4,0 po 30 min [3]. Okrem technologického spracovania, degradácia DNA prebieha aj v gastrointestinálnom trakte [8, 15].

Zistilo sa, že úprava matríc homogenizáciou je dôležitá pri zisťovaní amplifikovateľnosti produktov PCR rôznej dĺžky. Kvantitatívny výťažok DNA závisí od dôkladnej homogenizácie matríc (vyšší stupeň zomletia) a tiež od vhodne zvolenej izolačnej súpravy [20].

Táto práca bola podporovaná štátnym podprogramom výskumu a vývoja „Potraviny - kvalita a bezpečnosť“ číslo 2003SP270280E010280E01 a Agentúrou na podporu vedy a techniky, APVT, Grant číslo 397865

Literatúra

1. 97/618/EC: Commission Recommendation of 29 July 1997 concerning the scientific aspects and the presentation of information necessary to support applications for the placing on the market of novel foods and novel food ingredients and the preparation of initial assessment reports under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Communities, L 253, 16. 9. 1997, s. 1-36.
2. LAMMERDING, A. M. - PAOLI, G. M.: Quantitative risk assessment: An emerging tool for emerging foodborne pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 1997, č. 4, s. 483-487.
3. BAUER, T. - WELLER, P. - HAMMES, W. P. - HERTEL, C.: The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, 217, 2003, s. 338-343.
4. DE VRIES, J. - WACKERNAGEL, W.: Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2002, č. 4, s. 2094-2099.
5. BAUER, F. - HERTEL, C. - HAMMES, W. P.: Transformation of *Escherichia coli* in foodstuffs. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 1999, č. 2, s. 161-168.
6. BRÄUTIGAM, M. - HERTEL, C. - HAMMES, W. P.: Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs. *FEMS Microbiology letters*, 155, 1997, s. 93-98.

7. ZENZ, K. I. - NEVE, H. - GEIS, A. - HELLER, K. J.: *Bacillus subtilis* develops competence for uptake of plasmid DNA when growing in milk products. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 1998, č. 1, s. 28-32.
8. JONAS, D. A. - ELMADFA, I. - ENGEL, K. H. - HELLER, K. J. - KOZIANOWSKI, G. - KÖNIG, A. - MÜLLER, D. - NARBONNE, J. F. - WACKERNAGEL, W. - KLEINER, J.: Safety consideration of DNA in food. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 45, 2001, s. 235-254.
9. BERDAL, K. G. - HOLST JENSEN, A.: Roundup Ready (r) soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in gmo analyses. *European Food Research and Technology*, 213, 2001, č. 6, s. 432-438.
10. HUBNER, P. - WAIBLINGER, H. U. - PIETSCH, K. - BRODMANN, P.: Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International*, 84, 2001, č. 6, s. 1855-1864.
11. ALLMANN, M. - CANDRIAN, U. - LUTHY, J.: Detection of wheat contamination in dietary non-wheat products by PCR. *Lancet*, 339, 1992, s. 309.
12. EBBEHOJ, K. F. - THOMSEN, P. D.: Species differentiation of heated meat products by DNA hybridisation. *Meat Science*, 30, 1991, s. 221-234.
13. MEYER, R. - CHARDONNENS, F. - HUBNER, P. - LUTHY, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 203, 1996, s. 339-344.
14. DUGGAN, P. S. - CHAMBERS, P. A. - HERITAGE, J. - FORBES, J. M.: Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiology Letters*, 191, 2000, s. 71-77.
15. MARTÍN-ORÚE, S. - O'DONNELL, A. G. - ARIÑO, J. - NETHERWOOD, T. - GILBERT, H. - MATHERS, J.: Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human gastrointestinal simulations. *British Journal of Nutrition*, 87, 2002, s. 533-542.
16. MOSER, M. A. - KNIEL, B. - SCHMITZ-WINNENTHAL, J. - HUPFER, C. - ENGEL, K. H.: Einfluss verfahrenstechnischer Parameter auf den analytischen Nachweis gentechnisch veränderter Zutaten in Backwaren. *Getreide Mehl und Brot*, 53, 1999, s. 334-341.
17. STRAUB, J. A. - HERTEL, C. - HAMMES, W. P.: Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 208, 1999, č. 2, s. 77-82.
18. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
19. TILLEY, M.: PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking. *Cereal Chemistry*, 81, 2004, č. 1, s. 44-47.
20. PEANO, C. - SAMSON, M. C. - PALMIERI, L. - GULLI, M. - MARMIROLI, N.: Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO food-stuffs with four different extraction methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 2004, s. 6962-6968.

Do redakcie došlo 23. 2. 2005.

Monitoring of DNA degradation in legumes by PCR methods

KOLLÁROVIČ, G. - KRETOVÁ, M. - SIEKEL, P.: Bull. potravn. Výsk., 44, 2005, p. 43-52.

SUMMARY. DNA degradation was monitored in legume seed in relation to the temperature and duration of the heat processing. PCR was used for the determination of the extent of DNA degradation. To determine the degree of degradation, primers oriented to the lectin and phaseolin genes were designed in a way that PCR products of various sizes were obtained. Smaller DNA fragments were amplified in all samples. Larger fragments were amplified only if the heat treatment lasted 60 min at 100 °C and 30 min at 200 °C. At heat treatment at 80 °C, all fragments of various lengths were amplified until 360 min.

KEYWORDS: DNA degradation; legumes; heat processing; PCR