

EFIKASNOST BRZIH IMUNOKROMATOGRAFSKIH TESTOVA ZA ANALIZU PRISUTNOSTI GENETSKI MODIFICIRANOG KUKURUZA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

**Damir Alihodžić^{1*}, Midhat Jašić², Benjamin Muhamedbegović²,
Drago Šubarić³, Amel Selimović²**

¹Agencija za certificiranje halal kvalitete, Turalibegova 73, 75000, Tuzla, Bosna i Hercegovina

²Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

³Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

izvorni znanstveni rad

Sažetak

Hrana porijeklom od genetski modificiranih organizama je sve češće prisutna u prehrani stanovništva. Posebno je česta genetska modifikacija soje i kukuruza, pa se na tržištu mogu naći i proizvodi koji vode porijeklo od ovih sirovina. U monitoringu i kontroli prisutnosti genetski modificiranog kukuruza mogu se koristiti brzi imunokromatografski testovi (eng. *Immunochromatographic Lateral Flow Test - ILF*) i konvencionalne metode.

Cilj rada bio je izvršiti analizu sastojaka porijeklom od genetski modificiranog kukuruza u ispitivanim uzorcima brzim ILF testovima i konvencionalnim metodama, a zatim usporediti dobivene rezultate.

U radu je istražena prisutnost genetski modificiranog kukuruza u pet proizvoda i to: palenta, smjesa za mafine i corn flakes porijeklom iz SAD-a, palenta porijeklom iz Norveške, te tortilja porijeklom iz Švedske. Za detekciju sastojaka porijeklom od GM kukuruza korišten je konvencionalni postupak baziran na polimeraznoj lančanoj reakciji (eng. *Polymerase Chain Reaction-PCR*), a od brzih metoda korišteni su brzi ILF testovi za detekciju CP4 ESPS proteina. Priprema uzoraka izvršena je homogenizacijom, a zatim se odvaže 1 g od uzorka, prenese i rastvori u polipropilenskoj epruveti s destiliranom vodom u odnosu 1:4. Rezultati su očitani na nitroceluloznom dijelu imunokromatografskog testa. Za PCR metodu iz pripremljenog uzorka urađena je izolacija DNA uz primjenu DNeasy Tissue Kit, zatim izvršena kvantifikacija izolirane DNA s BiotTek PowerWave HT Microplate spectrophotometerom i primjenom softvera Gen5 Data Analysis. Rezultati polimerazne lančane reakcije očitani su uz primjenu elektroforeze s 1,5 % agaroznim gelom.

Kod svih ispitivanih uzoraka dobiveni su isti rezultati s obje metode. Utvrđeno je da palenta i smjesa za mafine porijeklom iz SAD-a sadrže genetski modificirani kukuruz, dok u proizvodima iz Nordijskih zemalja nije detektiran.

Imunokromatografski strip tester i PCR metoda za detekciju GM kukuruza u prehrambenim proizvodima. Brze metode su višestruko jeftinije, primjenjive su izvan laboratorijskih uvjeta, a rezultati analiza su gotovi za 10 do 15 minuta.

Ključne riječi: GM kukuruz, brzi imunokromatografski test, PCR

Uvod

Kontrola kvalitete kako kvantitativna tako i kvalitativna danas je nezamisliva bez analitičkih laboratorijskih metoda. Osnovni atribut koji daje obilježje kvalitete prehrambenog proizvoda je zadovoljstvo potrošača (Jašić i sur., 2007). Interesi potrošača su otkrivanje obmana proizvođača iz razloga koji mogu biti ekonomski, kada se u nekom proizvodu upotrebljavaju lošije vrste sastojaka pod etiketom boljih; vjerski, kada sastojci u proizvodu koje određena vjerska grupacija ne konzumira; zdravstveni, kada se u prodaji nađu proizvodi štetni za zdravlje ljudi i životinja, u čijem sadržaju se nalaze nedozvoljene koncentracije teških metala, pesticida, hormona, mikotoksina, lijekova i drugi štetni sastojci (Veladžić i Čaklović, 2001).

Radi pravovremenog dobivanja rezultata laboratorijskih analiza, sve više se primjenjuju određene brze metode. Tako na primjer u kompanijama za proizvodnju ishrane za stoku ili hrane za ljude koje koriste sirovine koje su na svjetskom tržištu vrlo često genetski modificirane neophodno je izvršiti njihovu analizu na prisutnost genetski modificiranih organizama prije puštanja u proizvodnju. Ova analiza je potrebna radi usklađivanja sa zakonskim propisima o GMO, a time i usklađivanja deklaracije proizvoda i informiranja potrošača.

Tema o genetski modificiranim organizmima je u zadnje vrijeme tako snažno podijelila svjetsku javnost na one koji podržavaju i one koji su ogorčeni protivnici GMO-a. I dok jedni očekuju da će ova tehnologija unijeti brojne pozitivne promjene u naš život te znatno podići i unaprijediti kvalitetu života otvarajući neslućene perspektive, drugi izražavaju

otvoreni strah pred mogućim posljedicama prebacivanja gena iz organizma u organizam probijanjem svih prirodnih prepreka (Ballian, 2009). Genetski modificirani organizmi su organizmi koji sadrže jedan ili više gena koji se u njih umjetno unose u laboratorijima metodama genetičkog inženjerstva, pri čemu se geni uzimaju od druge, nesrodne ili čak posve udaljene vrste. Uneseni gen poznat je pod nazivom transgen, zbog čega se ovakvi organizmi zovu još i transgeni organizmi (Trkulja i sur., 2018).

Metode za analizu hrane

Za analizu hrane koristi se veliki broj laboratorijskih metoda i tehnika. S obzirom da je zdravstvena ispravnost proizvoda imperativ, najčešće se koriste metode za analizu zdravstvene ispravnosti prehrambenih proizvoda i namirnica za opću upotrebu. Pored toga određivanje kvalitete i porijekla proizvoda koristi se veliki broj različitih analitičkih metoda.

Analitičke metode su od naročitog značaja za forenzičku upotrebu, ali i za prehrambenu industriju. Postoje različite podjele laboratorijskih metoda i tehnika. Obzirom na način ispitivanja, ove analitičke metode mogu se svrstati u četiri grupe:

- biokemijske (imunološke),
- molekularno-genetske metode,
- spektroskopske i spektrometrijske te
- separacijske metode.

Navedene metode su najučinkovitije za primjenu u određivanju: kvalitativnih i kvantitativnih sastojaka hrane, ispravnosti hrane obzirom na patogene mikroorganizme, nutritivne alergene, ostatke pesticida i toksina, sljedivosti u skladu s geografskim i botaničkim porijeklom te utjecaju tehnološke obrade i skladištenja (Butorac i sur., 2013).

Za detekciju određenih sastojaka i onečišćenja u hrani koriste se različite laboratorijske metode.

Generalno se mogu podijeliti na konvencionalne (standardne) i suvremene brze (screening) metode za analizu hrane.

U suvremene brze metode spadaju imunokromatografski testovi (eng. *Immunochromatographic Lateral Flow Tests - ILF*) i vrlo često se označavaju kao brzi ili skrining testovi.

Za razliku od brzih metoda, klasične metode često su spore, zahtijevaju dosta materijala, radno angažiranje, laboratorijsku infrastrukturu i sofisticirano laboratorijsko znanje i nisu uvijek pogodne za određivanje kvalitete i porijekla hrane. Pored toga analiza uzoraka klasičnim metodama višestruko je skuplja od analize s brzim metodama. S druge strane

većina brzih metoda nije standardizirana i prihvaćena kod službenih analiza i laboratorijskih provjera.

Brzi imunokromatografski strip testovi za analizu prisutnosti genetski modificiranog kukuruza

Tijekom posljednjih godina došlo je do razvoja niza analitičkih metoda primjenom kojih je moguće identificirati strane supstance u proizvodima namijenjenima ljudskoj prehrani. Pojedini analitičkim metodama želi se zaštititi proizvod od mogućeg patvorenja od strane proizvođača te istovremeno zaštititi krajnjeg potrošača od mogućih prijevara na tržištu prehrambenih proizvoda (Gvozdanović i sur., 2017). Pored toga, često se ukazuje potreba za detekcijom drugih neželjenih sastojaka u hrani. U tu svrhu mogu se koristiti imunokromatografski testovi za detekciju mikotoksina, alergena, GMO, rezidua veterinarskih lijekova i sl. (Lai i sur., 2009; Zang i sur., 2006 i Holst-Jensen, 2009).

U analizi hrane imunološke metode se temelje na analizi specifičnih reakcija koje se odvijaju između antitijela i antigena, odnosno na sposobnosti antitijela da prepoznaju trodimenzionalnu strukturu i pokrenu biokemijsku reakciju. Njihova primjena je raznolika, od polja imunologije do identifikacije različitih drugih molekula kao što su proteini, malih organskih molekula ili složenih spojeva prisutnih u uzorcima hrane i prehrambenih spojeva (Nielsen, 2010). Imunološke metode su brze, visoko specifične i osjetljive te jednostavne za izvođenje (Lefkovits i Pernis, 2014). To su razlozi zbog kojih su postale prihvatljive u postupcima identificiranja različitih sastojaka u prehrambenim proizvodima. Proizvodnja specifičnih antitijela je ključni korak implementacije imunoloških metoda analize obzirom na to da se takvi spojevi koriste za "hvatanje" specifičnih antigena (Asensio i sur., 2008). Na principu detekcije antigena u uzorcima razvijeni su različiti brzi testovi za njihovu detekciju. U literaturi su poznati kao Imunokromatografski Lateral Flow testovi (ILF), *Rapid antigen tests - RADTs, Lateral flow strips - LFS, Immunochromatographic Test Strips, Lateral Flow Device - LFD* za različite namjene detekcije (Holst-Jensen, 2009; Tanaka i sur., 2006; Grothaus i sur., 2006). Koriste se u prehrambenoj industriji, medicini i veterinarskoj medicini, farmaciji, poljoprivredi i drugim poljima. Tako na primjer Europska komisija je donijela preporuke o strategijama testiranja na COVID-19, uključujući korištenje brzih testova na antigen (Commission Recommendation (EU) C/2020/7502).

Efikasnost se može definirati kao sposobnost postizanja željenih rezultata sa što manjim utroškom resursa. Pored toga potrebno je izvršiti validaciju brzih metoda. Svrha validacije je osiguranje da različiti podaci o analizama proizvoda vode do konzistentnih i visokokvalitetnih rezultata. Validacijom se utvrđuje

pouzdanost metode. Vrijednovanje (validacija) metode je potvrđivanje ispitivanjem i pribavljanjem objektivnih dokaza da su ispunjeni posebni zahtjevi za predviđenu specifičnu upotrebu zadovoljeni (*Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*; Službeni glasnik BiH br. 95/10).

Tablica 1 Prikaz parametara kvalitete za kvantitativne i kvalitativne metode analize (Trullols i sur., 2004)

Table 1. Overview of quality parameters for quantitative and qualitative analysis methods (Trullols et al., 2004).

Kvantitativne metode	Kvalitativne metode
Točnost: istinitost, preciznost	Osjetljivost i specifičnost
Neizvjesnost	Lažno pozitivne i negativne stope
Osjetljivost i specifičnost	Selektivnost
Selektivnost	Granica detekcije
Domet i linearnost	Granični limit
Granica otkrivanja	Regija nepouzdanosti
Robusnost	Robusnost

Kombinacijom navedenih parametara prikazanih u Tablici 1 oblikuje se plan validacije za svaku metodu. Najjednostavnija definicija validacija analitičkih metoda je postupak kojim se dokazuje da metoda služi svrsi za koju je namijenjena, a prije svega potrebno je znati/definirati svrhu metode. Nakon toga se utvrđuju postupci, tj. planiraju i provode eksperimenti čije rezultate treba prikupiti i prikazati kao dokaze o validnosti metode. Isti postupci neće se primjenjivati na sve metode – različito se pristupa validaciji kvalitativnih i kvantitativnih metoda; razlikuju se postupci validacije metode kojom se određuje analit koji preteže u uzorku i one kojom se određuju tragovi u kompleksnoj matrici. Svako se metodi pristupa individualno, procjenjuje se što treba napraviti za dokaz svrhovitosti (Lazarić, 2012).

Osjetljivost i specifičnost metode

U okvirima kvalitativne analize osjetljivost i specifičnost predstavljaju sposobnost testa za razlikovanje stvarno pozitivnih od stvarno negativnih uzoraka.

Osjetljivost je „sposobnost metode da otkrije istinski pozitivne uzorke kao pozitivne“, tako da je stopa osjetljivosti vjerojatnost da će metoda za datu koncentraciju testirani uzorak klasificirati kao pozitivan, s obzirom da je testirani uzorak od ranije poznat kao pozitivan. Osjetljivost se može izračunati prema relaciji (O’Rangers i sur., 2000):

$$\text{Osjetljivost} = \frac{IP}{(IP + LN)}$$

pri čemu je: *IP* – Istinski pozitivni rezultati; *LN* – lažno negativni rezultati.

Prema *Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata* specifičnost je svojstvo metode da se razlikuje analit koji se mjeri od drugih supstanci. Ova karakteristika je prije svega funkcija opisane tehnike mjerenja, ali može varirati ovisno od vrste spoja ili matriksa (*Službeni glasnik BiH br. 95/10*).

Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit.

Metoda kojom se može određivati više komponenata istovremeno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom.

Specifičnost se definira kao „sposobnost metode da otkrije istinski negativne uzorke kao negativne“. Stopa osjetljivosti je vjerojatnost da će metoda za datu koncentraciju, testirani uzorak klasificirati kao negativan, s obzirom da je testirani uzorak od ranije poznat kao negativan. Specifičnost se može izraziti prema sljedećoj relaciji (O’Rangers i sur., 2000):

$$\text{Specifičnost} = \frac{LN}{(LP + LN)}$$

pri čemu je: *LN* – lažno negativni rezultati; *LP* – Lažno pozitivni rezultati.

Metodom se mora u eksperimentalnim uvjetima razlikovati analit od drugih supstanci.

Mora se navesti procjena te mogućnosti. Pri primjeni metode moraju se izbjegavati sve predvidljive interferencije. Od najveće je važnosti ispitati interferencije koje bi mogli uzrokovati svi sastojci matriksa (*Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*, *Službeni glasnik BiH br. 95/10*).

Metoda je specifična kada omogućava određivanje samo jednog analita u analiziranom uzorku i pored prisutnosti i drugih spojeva u uzorku.

Lažno pozitivne i negativne stope

Lažno pozitivna stopa je vjerojatnost da testni uzorak poznat kao negativan, a testna metoda ga klasificira kao pozitivan. Lažno pozitivna stopa se može izraziti sa sljedećom formulom (Feldsine i sur., 2002):

$$\text{Lažno pozitivna stopa} = \frac{LP}{(IP + LP)}$$

pri čemu je: *LP – Lažno pozitivni rezultati; IP – istinski pozitivni rezultati.*

Lažno negativna stopa je vjerojatnost da testni uzorak poznat kao pozitivan, a testna metoda ga klasificira

kao negativan. Lažno negativna stopa se može izraziti sa sljedećom formulom (Feldsine i sur., 2002):

$$\text{Lažno negativna stopa} = \frac{LN}{(IP + LN)}$$

pri čemu je: *LN – lažno negativni rezultati; IP – istinski pozitivni rezultati.*

Prema Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata alfa (α) greška definira se kao vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno negativan, iako su dobiveni pozitivni rezultati (lažno pozitivni rezultat), a grešku beta (β), vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno pozitivan, iako su dobiveni negativni mjerni rezultati (lažno negativni rezultat).

Za supstance o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla greška može biti 1 % ili niža. Za sve ostale supstance greška može biti 5 % ili niža (*Službeni glasnik BiH br. 95/10*).

Tablica 2. Relacija između lažno pozitivnih i negativnih te stvarno pozitivnih i negativnih odziva (preuzeto iz: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, National Association of Testing Authorities, Australia 2012).

Table 2. The relationship between false positives and negatives, and true positives and negatives (adapted from: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, National Association of Testing Authorities, Australia 2012).

		Uzorci sa sadržajem genetski modificiranog kukuruza	
		Pozitivno	Negativno
Rezultati testa	Pozitivno	Istinski pozitivni <i>IP</i>	Lažno pozitivni <i>LP</i>
	Negativno	Lažno negativan <i>LN</i>	Istinski negativan <i>IN</i>

Materijali i metode

Za potrebe istraživanja korištene su dvije metode za detekciju genetski modificiranog kukuruza u proizvodima:

1. Brzi strip test (*Imunocromatografic Lateral Flow test*) i
2. Polimerazna lančana reakcija (eng. *Polimerase chain reaction*).

Brzi strip test korišten je *Agri-Screen for CP4 (Roundup Ready®) Strip Test*, proizvođača Neogen Corporation.

PCR metoda je korištena za validaciju rezultata dobivenih brzim strip testom za detekciju Genetski modificiranog kukuruza u uzorcima. Za obje metode korišteni su isti uzorci koji su pripremljeni za laboratorijsku analizu. Nakon provedenih analiza

uspoređeni su dobiveni rezultati te izračunati specifičnost i osjetljivost ILF strip testova za detekciju GM kukuruza u proizvodima.

Materijali i postupak rada ILF strip testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza

Za detekciju genetski modificiranog kukuruza u proizvodima korišteni su komercijalni gotovi proizvodi koji u svom sastavu sadrže kukuruzno brašno i kukuruznu krupicu. Na nekim proizvodima na deklaraciji navedena je prisutnost GM kukuruza.

Tablica 3. Prikaz sirovina i proizvoda planiranih za analizu i pripremu uzoraka u svrhu detekcije genetske modifikacije sirovina u proizvodima i uzorcima (Uzorcima uzeti iz laboratorija HIST Sveučilišta u Trondheimu)

Table 3. Overview of raw materials and products planned for analysis and sample preparation for the purpose of detecting genetic modification in raw materials within products and samples (Samples taken from the HIST laboratory at the University of Trondheim)

R. br.	Materijali / Uzorci	Deklarirani sastav proizvoda	Mjesto uzorkovanja	Zemlja porijekla
1.	Kukuruzni obrok	Brašno žutog kukuruza	*	SAD
2.	Kukuruzne pahuljice	Mljeveni kukuruz, šećer, aroma slada	*	SAD
3.	Smjesa za mafine	Pšenično brašno, brašno žutog kukuruza	*	SAD
4.	Palenta	Gotova kukuruzna krupica	*	Norveška
5.	Tortilja	Kukuruzno brašno	*	Švedska

*Uzorcima uzeti iz laboratorija HIST Sveučilišta u Trondheimu

Pribor i oprema za primjenu brzih ILF strip testova za kvalitativno određivanje GM kukuruza u proizvodima

Za pripremu uzoraka i provođenje imunokromatografskog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza korišten je sljedeći pribor i laboratorijska oprema:

- analitička vaga *sartorius* s 4 decimale,
- plastične epruvete za centrifugiranje zapremnine 50 ml,
- vrtložna mješalica *Vibrofix VF1*,
- plastične jednokratne *ependorf* mikro epruvete zapremnine 1,5 ml,
- laboratorijske špatule i
- tučak i avan.

Postupak analize uzoraka s ILF strip testovima

Od proizvoda koji su planirani za detekciju genetski modificiranog kukuruza odvagano je 0,2 g i preneseno u mikro epruvetu i dodano je oko 2,5 ml destilirane vode. Nakon dodavanja vode uzorak u mikro epruveti je izmiješan 30 sekundi uz primjenu vrtložne miješalice i ostavljen nekoliko minuta da se razdvoji čvrsta faza od tekuće. Kada su se razdvojile čvrsta i tekuća faza uronjen je tester u otopinu do oznake obilježene strelicama na testeru. Tester je u tekućini zadržan 20 sekundi kako bi otopina iz uzorka dospjela do testne i kontrolne linije. Nakon što je tester izvađen iz otopine ostavljen je na podlogu, kako bi došlo do razvijanja boje na testnoj (ukoliko je uzorak pozitivan na prisutnost GM kukuruza) i kontrolnoj liniji. Nakon 10 minuta očitani su rezultati na osnovu pojave linije/linija na predviđenom području na testeru.

Tablica 4. Pregled rezultata dobivenih primjenom imunokromatografskog testa za detekciju GM kukuruza u uzorcima

Table 4. Overview of results obtained using the immunochromatographic test for the detection of GM corn in samples

R. br.	Vrsta uzorka	Testirana vrsta	Kontrolna linija	Testna linija	Validnost testa	Rezultat uzorka
1.	Kukuruzni obrok	Detekcija GM kukuruza	+	+	Test je validan	Pozitivan
2.	Smjesa za mafine	Detekcija GM kukuruza	+	-	Test je validan	Negativan
3.	Kukuruzne pahuljice	Detekcija GM kukuruza	+	+	Test je validan	Pozitivan
4.	Palenta	Detekcija GM kukuruza	+	-	Test je validan	Negativan
5.	Tortilja	Detekcija GM kukuruza	+	-	Test je validan	Negativan

Legenda: + Označava da je testna ili kontrolna linija vidljiva na testu; - Označava da testna ili kontrolna linija nije vidljiva na testu.

Na testnom području očitani su rezultati na osnovu pojave testnih i kontrolnih linija. Iz Tablice 4 je vidljivo da je na svim testiranim uzorcima izražena kontrolna linija koja potvrđuje da su analize uspješno provedene i nije ih potrebno ponavljati.

Od navedenih uzoraka/proizvoda napravljene su dvije smjese: Smjesa s uzorcima pod rednim brojem 1 i 4 i smjesa sa svim navedenim uzorcima. Na tri uzorka su vidljive obje linije koje označavaju da uzorak sadrži genetski modificirani kukuruz. Na dva proizvoda je

izostala linija na testnom području, što označava da je uzorak negativan na prisutnost genetski modificiranog kukuruza. Obje pripremljene smjese su bile pozitivne na GM kukuruz.



Slika 5. Vizuelno očitavanje rezultata prisutnosti GM sirovina u uzorku
Figure 5. Visual interpretation of the results for the presence of GM materials in the sample

Postupak validacijske PCR metode za detekciju GM soje i kukuruza

Za provođenje PCR analize potrebno je izvršiti ekstrakciju i purifikaciju DNA iz uzorka, nakon toga kvantificirati DNA i odrediti količinu ekstrahirane DNA, zatim provesti amplifikaciju ekstrahirane DNA primjenom PCR termalnog ciklusa i očitavanje rezultata s elektroforezom.

Pribor i oprema za PCR analizu

Za provođenje PCR analiza potrebni su sljedeći pribor oprema:

1. Precizne mikro pipete s nastavcima,
2. Stalak za eppendorf mikro epruvete,
3. Spectrophotometer PowerWave XS Microplate čitač za kvantifikaciju izolirane DNA,
4. Uređaj za PCR amplifikaciju BIORAD C1000 Termal Cycler,
5. Prajmeri,
6. Uređaj za elektroforezu BIORAD Power Pac 300 i
7. Uređaj za očitavanje rezultata s elektroforeze BIORAD Gel doc 2000 s pripadajućim softverom za vizualizaciju rezultata.

Ekstrakcija i purifikacija DNA iz uzoraka

Od pripremljenih uzoraka izvršena je ekstrakcija i purifikacija DNA prema sljedećem postupku:

1. Odvagano je 20 mg od svakog uzorka i preneseno u 1,5 ml eppendorf mikrocentrifugirajuću epruvetu. Nakon toga dodano je 180 µl ATL Buffer-a.
2. Dodano je 20 µl proteinaze K. Temeljito izmiješano uz upotrebu vrtložne miješalice

(vortex) i inkubirano na temperaturi od 56 °C da se tkivo kompletno rastvori. Period inkubacije trajao je 1 sat u termomikseru na brzini od 300 rpm.

3. Nakon perioda inkubacije sadržaj je izmiješan s vrtložnom miješalicom 15 sekundi.
4. Dodano 200 µl bufera AL u uzorak i promiješano s vrtložnom miješalicom.
5. Zatim je dodano 200 µl etanola (96 %) i ponovo izmiješano s vrtložnom miješalicom.
6. Iz ovako pripremljene otopine s uzorkom mješavina je pipetirana (zajedno s talogom) i prenesena u Dneasy Mini spin kolonu postavljenu u kolekcijsku tubu. Nakon toga centrifugirano je na brzini od 8000 u vremenu od jedne minute. Kolekcijska tuba zajedno sa permeatom je bačena.
7. U novu kolekcijski tubu od 2 ml dodano je 500 µl bufera AW1 i centrifugirano jednu minutu pri brzini od 8000 obrtaja. Ponovo je bačena kolekcijska tuba zajedno sa permeatom.
8. U novu kolekcijsku tubu od 2 ml dodano je 500 µl bufera AW2 i centrifugirano 3 minute pri brzini od 14000 obrtaja da se osuši na DNeasy membrani. Kolekcijska tuba sa permeatom je bačena.
9. DNeasy mini spin kolona je ubačena u čistu 2 ml mikrocentrifugirajuću tubu i pipetirano 100 µl AE bufera direktno na DNeasy membranu. Zatim je inkubirano na sobnoj temperaturi jednu minutu, a nakon toga centrifugirano na 8000 obrtaja u trajanju od jedne minute.
10. Radi dobivanja maksimalnog prinosa DNA ponovljen je korak 9.

Kvantifikacija ekstrahiranog DNA iz uzorka

Kvantifikacija DNA se radi s ciljem određivanja koncentracije DNA i njezine čistoće, kako bi se provela PCR analiza. Kvantifikacija je izvršena uz upotrebu uređaja BioTek Power Wave XS mikroplate spektrofotometra, a očitavanje rezultata uz upotrebu softvera *Gene 5TM*. Najmanja količina koja je potrebna za kvalitetno provođenje PCR analize je 15 µg/µl.

Na ploču za uzorke pipetira se 2 µl ranije ekstrahirane DNA i pažljivo se nanosi na predviđena mjesta na ploči za uzorke tako da nanosena količina ekstrahirane DNA bude u obliku male kapljice. Nakon toga ploča s nanosenim DNA uzorcima se pažljivo preklopi i ubaci u mikroplate spektrofotometar i rezultati očitaju uz primjenu softvera *Gen 5* na računalu. Nakon pokretanja softvera na monitoru su prikazane absorbance izražene u ng/ml.



Slika 6. BioTek Power Wave XS mikroplate spektrofotometar
Figure 6. BioTek Power Wave XS Microplate Spectrophotometer

Priprema master mixa

Nakon izolacije i kvantifikacije DNA iz uzorka, izvršena je priprema DNA za provođenje PCR analize. Prvi korak je priprema *master mix*-a. Za PCR analizu GM kukuruza pripremljena su četiri *master mix*-a s četiri različita prajmera:

- Prajmer za *master mix* 1: sttmf3a+sttmf2a,
- Prajmer za *master mix* 2: Ivr-F+Ivr-R,
- Prajmer za *master mix* 3: 35SFZMP1+35SFZMP2,
- Prajmer za *master mix* 4: nosFZMP1+nosFZMP2.

Tablica 5. Priprema *master mix*-a po koracima
Table 5. Step-by-step preparation of the *master mix*

Koraci	Naziv rastvora	Volumen x1	Volumen x10
Korak 1	10 x PCR – Buffer	2,5 µl	25 µl
Korak 2	dNTP	0,5 µl	5 µl
Korak 3	Prajmer LecMP1 (10 µm)	1,00 µl	10 µl
Korak 4	Prajmer LecMP2 (10 µm)	1,00 µl	10 µl
Korak 5	Enzim (Taq)*	0,15 µl	1,5 µl
Korak 6	Voda NFW (nuclease free water)	17,85 µl	178,5 µl

*Prilikom dodavanja enzima neophodno je enzim dodati unutar otopine. Volumen koji je dobiven dodavanjem rastvora i prajmera iznosi 23 µl i 2 µl izolirane DNA.

Svi prajmeri koji su korišteni u istraživanju su od proizvođača Invitrogen otopljeni s *nuclease free water* (NFW) otopinom. Za potrebe PCR-a neophodna je količina prajmera od 25 µl. Na osnovu referenci i ranijih istraživanja odredi se količina koja će biti korištena u analizi te količina prajmera, dNTP rastvor

10xPCR bufera i enzima Taq polimeraza. Nakon toga oduzme se od količine od 25 µl da bi se odredila količina NFW vode koju je potrebno dodati u *master mix*.

Tablica 6. Sekvence prajmera korištenih za PCR analizu**Table 6.** Primer sequences used for PCR analysis

Prajmer	Target	Orijentacija	Sekvenca	Length (bp)
sttmf3a	Cp4-esps	Forward	GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC	145
sttmf2a		Reverse	CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC	
Ivr-F	Maize invertase gene	Forward	CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C	226
Ivr-R		Reverse	GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT	
35SFZMP1	P35S	Forward	CCG ACA GTG GTC CCA AAG ATG	158
35SFZMP2		Reverse	AGA GGA AGG GTC TTG CGA AGG	
nosFZMP1	NOS ter	Forward	GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG	125
nosFZMP2		Reverse	GCG GGA CTC TAA TCA TAA AAA CC	

Svi ovi rastvori se pomnože s brojem uzoraka koji se analiziraju te za po jedan uzorak za pozitivnu i negativnu probu i jedan dodatni uzorak.

Za pripremu master mix-a korišteni su sljedeći rastvori i dodavani redom jedan za drugim prikazani u Tablici 5.

Nakon pripreme master mix otopine u mikrotubice dodaje se 23 μ l i 2 μ l ekstrahirane DNA od svakog uzorka u različite mikrotubice.

Neophodno je dobro označiti tubice kako bi kasnije mogli identificirati uzorke.



Slika 3. Priprema mastermiksa dodavanjem različitih reagenasa
Figure 3. Preparation of the master mix by adding various reagents

Umnožavanje DNA uz upotrebu PCR termalnog ciklusa

Nakon što je izvršeno kvantificiranje ukupne izolirane DNK, te pripremljenog master mixa pristupa se

amplifikaciji (umnožavanju) ciljanog segmenta pomoću PCR-a aparata BIO RAD C1000™ Thermal cycler.



Slika 4. PCR Termalni ciklus korišten za umnožavanje DNA
Figure 4. PCR Thermocycler used for DNA amplification

Trideset ciklusa amplifikacije (umnožavanja) DNA programirano je sa sljedećim vremenskim i temperaturnim parametrima:

- inicijalna denaturacija (engl. *Initial denaturation*) podešena je na 94 °C i vremenu 4 minute,
- standardna denaturacija na temperaturi pri 94 °C i vremenom od 30 sekundi,
- nalijeganje/učvršćivanje prajmera (eng. *Primer annealing*) na temperaturi 50 °C i vremenom 30 sekundi,
- produženje prajmera (eng. *Primer extension*) na temperaturi 72 °C i vremenom 30 sekundi. Posljednje produženje podešeno je 5 minuta duže.

Metodologija elektroforeze za očitavanje PCR rezultata

Za očitavanje i vizualizaciju rezultata nakon amplifikacije korištena je metoda Elektroforeze na agaroznom gelu. Prvenstveno pripremljen je agarozni gel u kojeg će se unijeti amplificirani DNA uzorci. Za pripremu agaroznog gela potrebno je:

- TBE bufer (Tris/borat/EDTA)
- Agaroz
- Mikrovalna pećnica

Postupak pripreme agaroznog gela za elektroforezu

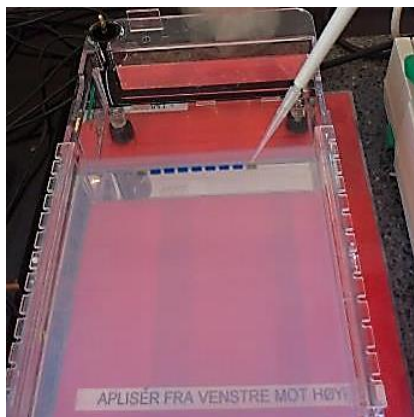
U erlenmajericu dodano je 0,5 % TBE bufera i 2 % agaroze odnosno 3 grama u 150 ml. Izvagano je 3 g agaroze u prahu i preneseno u erlenmajericu. Nakon toga dodano je 150 ml TBE bufera. Lagano je titrirano dok se agarozna nije otopila u TBE buferu. Erlenmajerica s pripremljenom otopinom ubačena je u pećnicu i zagrijavana oko 40 sekundi. Nakon toga

erlenmajerica s otopinom je izvađena iz pećnice i ponovo titrirana da se dobro otopi agarozna. Ovaj postupak je ponavljan nekoliko puta s tim da se skraćuje vrijeme držanja erlenmajerice u mikrovalnoj pećnici. Potvrda da je agarozna dobro otopljena u buferu, ukoliko se ne vide komadići gela u erlenmajerici. Nakon što je otopljena agarozna u TBE buferu dodana je *gelred* boja u otopinu u iznosu 8 µl. Ovako pripremljena agarozna otopina prenese se u kalup kako bi došlo do stvrdnjavanja odnosno stvaranja gela nakon što se ohladi. Nakon toga u još toplu agaroznu otopinu postavljani s češljevi s 15 režnjeva pri vrhu kako bi se napravila udubljenja u koja će se stavljati uzorci DNA koji su amplificirani u PCR termalnom ciklusu. Nakon što je agarozna otopina očvrstnula u kalupu izvađena je i prenesena u kalup u kojoj će se raditi elektroforeza.

Zatim je ubačen ranije pripremljeni stvrdnuti agarozni gel, izvađen češalj za elektroforezu iz gela, te u kalup dadan TBE bufer tako da prekrije agarozni gel.

U međuvremenu izvađene su mikrotubice iz PCR termalnog ciklusa i u svaku mikrotubicu dodano je 5µl 5x DNA load bufera. Pažljivo svaki DNA uzorak izmiješan je u mikrotubicama prilikom dodavanja load bufera mikropipetom na način što je pažljivo uvlačen i ispuštan naizmjenično sadržaj u mikrotubicama. Svaki put prilikom dodavanja bufera i miješanja sadržaja u mikrotubicama nastavak na pipetama je obavezno zamijenjen novim nastavkom da ne bi došlo do kontaminacije uzorka sa prethodnim.

Nakon što je dodan DNA load bufer u DNA uzorke u mikrotubicama uzorci su zatim prenijeti u kalup u udubljenja gdje su prethodno napravljena s češljem za elektroforezu u agaroznom gelu. Na krajnjim mjestima su dodani markeri. Uvijek su korišteni novi nastavci na mikro pipetama prilikom prenošenja DNA uzoraka u agarozni gel da ne bi došlo do kontaminacije DNA uzorka sa prethodnim.



Slika 5. Dodavanje DNA amplificiranih uzoraka u agarozni gel
Figure 5. Addition of DNA amplified samples to agarose gel

Nakon što su amplificirani DNA uzorci prenijeti u agarozni gel pokrenuta je metoda elektroforeze s podešenim parametrima od 45 minuta s jačinom napona od 100 V. Uzorci su u agarozni gel dodavani na prethodno napravljenim udubljenjima. Na slici 5 prikazano je dodavanje uzoraka, markera i jednog negativnog uzorka sa sadržajem destilirane vode u deset polja precizno s mikro pipetom. Markeri su dodani u krajnje desno i krajnje lijevo polje na gelu, negativni uzorak u predzadnjem dijelu lijevog polja, a uzorci koji se analiziraju između njih. Pozicije markera, uzoraka i negativne kontrole (destilirana

voda) mogu se vidjeti na PCR produktu nakon očitavanja rezultata na slikama 7, 8, 9 i 10.

Očitavanje rezultata PCR analize

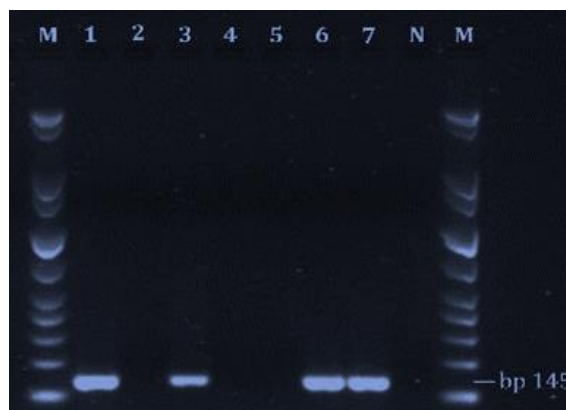
Završetkom procesa elektroforeze, agarozni gel s fragmentiranim uzorcima iz kalupa za elektroforezu je pažljivo prenijet u UV transiluminator (BIO RAD Gel Doc 2000) za vizualizaciju rezultata i očitavanje primjenom računala i softvera (Quantity One, version 4.4.0).



Slika 6. UV transiluminator – Uređaj za vizualizaciju i očitavanje rezultata s elektroforeze
Figure 6. UV transilluminator – Device for visualizing and reading results from electrophoresis

Rezultati se očitavaju pojavom linija na trakama (engl. lanes) na određenom nivou koji se uspoređuje s

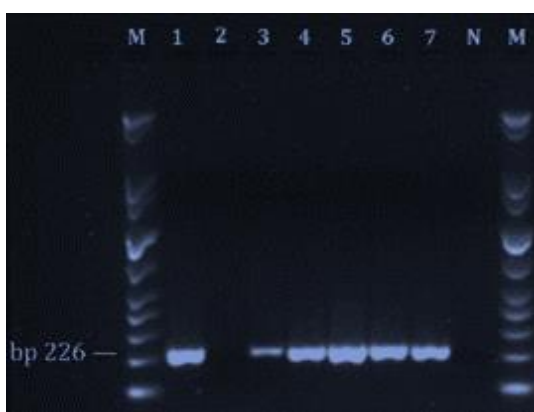
ljestvama (engl. *Lader*) koji se formira dodavanjem markera na početnoj i/ili krajnjoj strani agaroznog gela.



Slika 7. PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: sttmf3a+sttmf2a;
M - markeri; N – negativan uzorak (destilirana voda); 1 - kukuruzni obrok; 2 – kukuruzne pahuljice; 3 – smjesa za mafine;
4 – palenta; 5 – tortilja; 6 – mješavina proizvoda 1 i 4; 7 – mješavina proizvoda 1, 2, 3, 4, 5
Figure 7. PCR detection of GM corn using primers: sttmf3a+sttmf2a; M – markers; N – negative sample (distilled water);
1 – cornmeal; 2 – corn flakes; 3 – muffin mix; 4 – polenta; 5 – tortilla; 6 – mixture of products 1 and 4;
7 – mixture of products 1, 2, 3, 4, 5

Par prajmera *sttmf3a* i *sttmr2a*, usmjeren je prema transgenu *cp4-epsps* i pojačava amplificirani DNK fragment od 145 bp. Izvor gena je *Agrobacterium tumefaciens strain CP4*. Oblik 5-enolpiruvulshikimate-3-fosfat sintaza (EPSPS) tolerantan na herbicide. Na slici 7 pod oznakom 1 do 7 su analizirani uzorci ranije dodani u udubljena polja na agaroznom gelu. Na krajevima pod oznakom M su markeri, a pod oznakom N je negativan

uzorak u koji je dodana destilirana voda. Sa slike je vidljiva pojava svijetlog fragmenata, što označava da su uzorci pozitivni na prisutnost GM sirovina. Na označenim mjestima 2, 4, 5 nema svijetlog fragmenta, što označava da uzorci ne sadrže genetski modificirani kukuruz. To svakako potvrđuje i izostanak fragmenta na označenom mjestu N koji je negativna kontrola i koji sadrži samo destiliranu vodu.



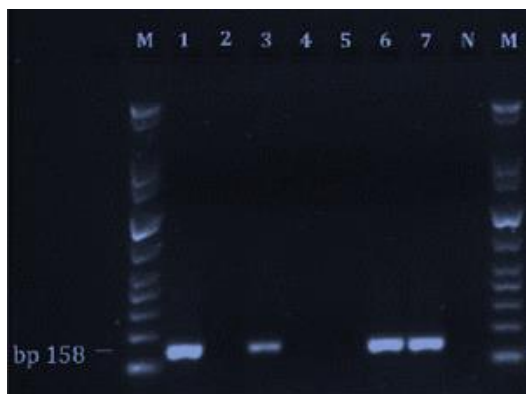
Slika 8. PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: *Ivr-F+Ivr-R*;

M - markeri; 1 - kukuruzni obrok; 2 – kukuruzne pahuljice; 3 – smjesa za mafine; 4 – palenta; 5 – tortilja; 6 – mješavina proizvoda 1 i 4; 7 – mješavina proizvoda 1,2,3,4,5; N – negativan uzorak (destilirana voda)

Figure 8. PCR detection of GM corn using primers: *Ivr-F + Ivr-R*; M – markers; 1 – corn meal; 2 – corn flakes; 3 – muffin mix; 4 – polenta; 5 – tortilla; 6 – mixture of products 1 and 4; 7 – mixture of products 1, 2, 3, 4, and 5; N – negative sample (distilled water)

Par prajmera, *Ivr-F* i *Ivr-R* (fragment od 226 bp), ciljaju na endogeni gen invertaze, korišten je za potvrdu prisutnosti DNK kukuruza u uzorcima koji se može pojačati. Očekivani fragment od 226 bp bio je prisutan u svim uzorcima kukuruza osim na uzorku 2 (kukuruzne

pahuljice) koji su testirani. Proizvod pod rednim brojem 2 ili ne sadrži kukuruz ili nije izolirana dovoljna količina DNA. Obzirom da je izostao fragment na označenom mjestu N koji sadrži destiliranu vodu može se tvrditi da je analiza uspješno provedena.



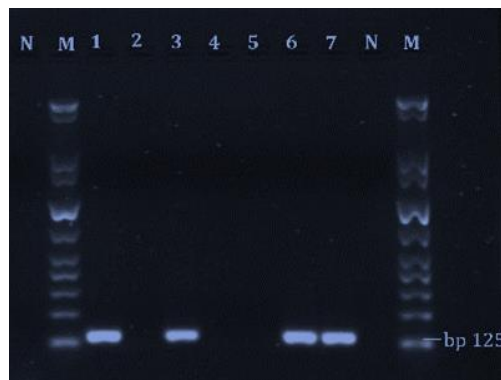
Slika 9. PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: 35SFZMP1+35SFZMP2;

M - markeri; 1 - kukuruzni obrok; 2 – kukuruzne pahuljice; 3 – smjesa za mafine; 4 – palenta; 5 – tortilja; 6 – mješavina proizvoda 1 i 4; 7 – mješavina proizvoda 1,2,3,4,5

Figure 9. PCR detection of GM corn using primers: 35SFZMP1+35SFZMP2; M - markers; 1 - cornmeal; 2 - corn flakes; 3 - muffin mix; 4 - polenta; 5 - tortilla; 6 - mixture of products 1 and 4; 7 - mixture of products 1, 2, 3, 4, 5

Par prajmera 35SFZMP1 i 35SFZMP2 cilja na 35S promotor i pojačava fragment od 158 bp. *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promotor (P35S) je često korištena meta za otkrivanje genetski modificiranih organizama (GMO). Na slici 9 očekivani fragment od 158 bp bio je prisutan u uzorcima 1, 3, 6 i 7, koji ustvari pokazuje da su uzorci na trakama 1, 3, 6 i 7 pozitivni na

prisutnost genetski modificiranog kukuruza. Na mjestima označenim s 2, 4, 5 su analizirani uzorci i izostanak svijetlog fragmenta označava da uzorci ne sadrže sirovine genetski modificiranog kukuruza. Također na označenom mjestu N izostao je pojačani fragment koji je negativna kontrola, a koji sadrži samo destiliranu vodu.



Slika 10. PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: nosFZMP1+nosFZMP2;

M – markeri; N – negativan uzorak (destilirana voda); 1 - kukuruzni obrok; 2 – kukuruzne pahuljice;

3 – smjesa za mafine; 4 – palenta; 5 – tortilja; 6 – mješavina proizvoda 1 i 4; 7 – mješavina proizvoda 1, 2, 3, 4, 5

Figure 10. PCR detection of GM corn using primers: nosFZMP1+nosFZMP2;

M – markers; N – negative sample (distilled water); 1 – cornmeal; 2 – corn flakes; 3 – muffin mix; 4 – polenta; 5 – tortilla;

6 – mixture of products 1 and 4; 7 – mixture of products 1, 2, 3, 4, 5. As with previous analyses using the PCR method.

Rezultati analize ILF testa za detekciju GM kukuruza

Hrana za perad najvećim dijelom sadrži sojinu sačmu i kukuruz. To su žitarice koje su najčešće genetski modificirane od svih biljaka u svijetu (Trkulja i sur., 2018). Genetski modificirana soja i kukuruz sadrže CP4 EPSPS gen umetnut da bi se postigla tolerantnost prema herbicidima na bazi glifosata (Trkulja i sur., 2018). Proizvod ili uzorak koji sadrži CP4 ESPS označava da je genetski modificiran. Postoji i niz drugih vrsta genetskih modifikacija soje i kukuruza.

Za detekciju GM kukuruza analizirano je 5 uzoraka i provedeno 23 analize s brzim imunokromatografskim lateral flow testom.

Svi imunokromatografski testerji koji su korišteni za analizu pokazali su kontrolnu liniju koja potvrđuje da je analiza provedena uspješno. Uzorci 1, 2, 3, 4, 5 i 7 su rađeni po 3 puta s ILF metodom dok je uzorak pod rednim brojem 7 rađen 5 puta. Svi uzorci su rađeni 4 puta s PCR metodom s različitim prajmerima. U svakom ponovljenoj testiranju uzorci s prisutnosti GM- kukuruza su pokazali pozitivan rezultat na prisutnost GM. Uzorci s odsustvom GM kukuruza u svakom ponovljenom testu su pokazali negativne rezultate.

Tablica 7. Usporedba analiziranih uzoraka testiranih imunokromatskim lateral flow testom (ILFT) i PCR metodom

Table 7. Comparison of analyzed samples tested by immunochromatographic lateral flow test (ILFT) and PCR method

R.br.	Testirani uzorci	Rezultati			
		ILFT		PCR	
		Broj provedenih analiza	Rezultati Analize	Broj provedenih analiza	Rezultati Analize
1.	Kukuruzni obrok	3	(+)	4	(+)
2.	Smjesa za mafine	3	(-)	4	(-)
3.	Kukuruzne pahuljice	3	(+)	4	(+)
4.	Palenta	3	(-)	4	(-)
5.	Tortilja	3	(-)	4	(-)
6.	Smjesa proizvoda pod R. br. 1 i 4	5	(+)	4	(+)
7.	Smjesa proizvoda svih proizvoda	3	(+)	4	(+)
Ukupno			14+ i 9-		
Ukupan broj analiziranih uzoraka po metodama		23		28	

Od ukupno 7 uzoraka provedeno je 23 uzastopna ponavljanja od čega je 14 testova je bilo pozitivno na prisutnost GM kukuruza, a 9 negativno.

Točnost ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza

Rezultati analize primjenom ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza u uzorcima potvrđeni su PCR metodom.

Tablica 8. Prikaz istinski pozitivnih i negativnih, lažno pozitivnih i negativnih rezultata
Table 8. Overview of true positive and negative, and false positive and negative results

		Uzorcima sadržajem genetski modificiranog kukuruza	
		Pozitivno	Negativno
Rezultati testa	Pozitivno	Istinski pozitivni $IP = 14$	Lažno pozitivni $LP = 0$
	Negativno	Lažno negativan $LN = 0$	Istinski negativan $IN = 9$

Osjetljivost ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza

Rezultati pokazuju da je 14 analiza istinski pozitivno, a niti jedna lažno negativna. Uvrštavanjem rezultata u relaciju za određivanje osjetljivosti dobit će se:

$$Osjetljivost = \frac{IP}{(IP + LN)} = \frac{14}{(14 + 0)} \cdot 100 = 100 \%$$

Sve analize su pokazale pozitivan rezultat na prisutnost GM kukuruza. Ovi rezultati su potvrđeni s validacijskom PCR metodom.

Na osnovu provedenih analiza i rezultata može se utvrditi da je imunokromatografski test veoma osjetljiv obzirom da je osjetljivost iznad granice *cut off* vrijednosti 100 %.

Specifičnost ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza

Analiza uzoraka s imunokromatografskim testom su pokazali da nije bilo lažno negativnih analiza i nije bilo niti jedne analize s lažno pozitivnim rezultatom.

$$Specifičnost = \frac{IN}{(IN + LP)} = \frac{12}{(12 + 0)} \cdot 100 = 100 \%$$

Uvrštavanjem rezultata u formulu za određivanje specifičnosti i proračunom može se utvrditi da je metoda/test sposoban da otkrije zaista negativne uzorke kao negativne.

Određivanje lažno pozitivne stope imunokromatografskog testa za detekciju GM kukuruza

Uvrštavanjem rezultata analiza u relaciju za određivanje stope lažno pozitivnih rezultata dobit će se lažno pozitivna stopa imunokromatografskog testa za detekciju genetski modificirane soje u uzorku.

$$Lažno poz. stopa = \frac{LP}{(IP + LP)} = \frac{0}{(14 + 0)} \cdot 100 = 0 \%$$

Određivanje lažno negativne stope ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza

Rezultati analize su pokazali da nije bilo uzoraka koji su pokazali lažno negativne rezultate, a 14 analiza su pokazale istinski pozitivne rezultate. Uvrštavanje rezultata u relaciju za određivanje stope lažno negativnih rezultata dobit će se lažno negativna stopa imunokromatografskog testa za detekciju GM kukuruza u uzorku.

$$Lažno neg. stopa = \frac{LN}{(IP + LN)} = \frac{0}{(14 + 0)} \cdot 100 = 0 \%$$

Obzirom da je lažno pozitivna stopa 0 %, odnosno da je: $\beta < 5 \%$, može se utvrditi da ovaj test ne prikazuje lažno negativne rezultate za detekciju CP4 ESPS proteina koji označava proizvod i ne sadrži genetske modifikacije.

Zaključak

Za detekciju genetski modificiranog kukuruza na 7 uzoraka rađena su 23 analize od kojih je 14 bilo istinski pozitivno, a 9 istinski negativno.

Rezultati analiza za detekciju genetski modificiranog kukuruza dobiveni primjenom ILF testa potvrđeni su PCR metodom.

Tijekom analize GM kukuruza nisu utvrđeni lažno negativni i lažno pozitivni rezultati. Osjetljivost i specifičnost brzog ILF testa za detekciju sadržaja GM kukuruza iznosi 100 %.

Analizom i proračunom utvrđena je: lažno pozitivna stopa brzog ILF testa koja iznosi 0 %, pogreška $\alpha < 5 \%$, i lažno negativna stopa od 0 %, pogreška $\beta < 5 \%$.

Ovaj test ne prikazuje lažno pozitivne i lažno negativne rezultate za detekciju GM kukuruza. Rezultati validacije pokazuju da je ILF test točan i pouzdan za detekciju genetski modificiranog kukuruza.

U praksi se često pojavljuje potreba za brzom detekcijom GM sirovina soje i kukuruza, posebno prilikom prijema i otkupa od farmera koja se može provesti primjenom ovih ILF testova.

Na osnovu deklaracije proizvođača brzi ILF test može detektirati GM soju i GM kukuruz i obzirom da pokazuje kvalitativne rezultate ne može se odrediti da li uzorak sadrži GM soju ili GM kukuruz.

Literatura

- Asensio, L., Gonzáles, I., García, T., Martin, R. (2008): Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Food Control* 19, 1–8.
- Ballian, D. (2009): Bioetika i genetičko zagađenje šuma. Inegrativna bioetika i interkulturalnost. Zbornik radova: 285–296. Bioetičko društvo u BiH, Sarajevo.
- Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013): Analitičke metode u forenzici hrane, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 8 (3-4), 90-101.
- DNeasy Blood & Tissue Handbook, July 2006.
- European Commission, Commission Recommendation on COVID-19 Testing strategies, including the use of rapid antigen tests C(2020) 7502 final (2020); Official Journal of the European Union L 360/43.
- Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W.H. (2002): AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis; AOAC Int. 85 1187.
- Grothaus, G. D., Bandla, M., Currier, T., Giroux, R., Jenkins, G. R., Lipp, M., Shan, G., Stave, J. W., Pantella, V. (2006): Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology, *Journal of AOAC International* 89 (4).
- Gvozdanović, K., Margeta, P., Margeta, V. (2017): Application of analytical methods for food authentication, *Stočarstvo* 71 (1), 29-38.
- Holst-Jensen, A. (2009): Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives, *Biotechnology Advances* 27, 1071–1082.
- Jašić, M., Bašić, M., Sakić, A., Čengić, F. (2007): Halal status aditiva u mlijeku i mliječnim proizvodima, *Mljekarstvo* 57 (2), 153-159.
- Lai, W., Fung, Y.C D., Xu, Y., Liu, R., Xiong, Y. (2009): Development of a colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A with mimotope peptide, *Food Control* 20, 791–795.
- Lazarić, K. (2012): Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri* 1, 61-64.
- Lefkovits, I., Pernis, B. (2014): Immunological methods (Vol. 3) Elsevier.
- Nielsen, S.S. (2010): Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. In Food Analysis Laboratory Manual (pp. 47-53). Springer US.
- O’Rangers, J.J., Condon, R.J., in: Kay, J.F., MacNeil, J.D., O’Rangers, J.J.(Editors) (2000): Current Issues in Regulatory Chemistry, AOAC Int., Gaithersburg, Maryland, USA.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata; Službeni glasnik BiH br. 95/10.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata; Službeni glasnik BiH br. 95/10.
- Tanaka, R., Yuhi, T., Nagatani, N., Endo, T., Kerman, K., Takamura, Y., Tamiya, E. (2006): A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles, *Anal Bioanal Chem* 385, 1414–1420.
- Trkulja, V., Ballian, D., Vidović, S., Terzić, R., Ostojić, I., Čaklovića, F., Džubur, A., Hajrić, Dž., Perković, G., Brenjo, D., Čolaković, A. (2018): Genetski modificirani organizmi, stanje i perspektive, Agencija za sigurnost hrane BiH.
- Trullols, E., Ruisanchez, I., Rius, X.F. (2004): Validation of qualitative analytical methods, *Trends in analytical chemistry* 23 (2).
- Uputstvo za upotrebu; CP4 (Roundup Ready®) Strip Test; Neogen Corporation.
- Veladžić, M., Čaklovića, F. (2001): Instrumentalne metode u biološkoj analizi, Naučna i univerzitetska knjiga, IK «Ljiljan», Sarajevo.
- Zakon o genetski modificiranim organizmima „Službeni glasnik BiH”, broj 23/09.

EFFECTIVENESS OF THE RAPID STRIP TESTS IN THE ANALYSIS OF THE GENETICALLY MODIFIED CORN'S PRESENCE IN FOOD PRODUCTS

**Damir Alihodžić¹, Midhat Jašić², Benjamin Muhamedbegović²,
Drago Šubarić³, Amel Selimović²**

¹Agency for Halal Quality Certification, Turalibegova 73, 75000, Tuzla, Bosnia and Herzegovina

²Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

³Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

original scientific paper

Summary

Food derived from genetically modified organisms is increasingly present in the diet of the world population. Genetic modification of soy and corn is especially frequent, resulting in products originating from these raw materials found in the market. Rapid and conventional methods may be used for monitoring and controlling the presence of genetically modified corn. The aim of this study was to compare the use of rapid methods with conventional methods when analyzing ingredients derived from genetically modified corn.

In this study the presence of genetically modified corn has been analyzed in five products: polenta, muffin mixture and corn flakes from the USA, polenta from Norway and tortillas from Sweden. Conventional procedure based on polymerase chain reaction (PCR) and rapid method immunochromatography strip tests for CP4 ESPS protein detection were used to detect the ingredients originating from genetically modified corn. Sample preparation was done through homogenization and dissolved in polypropylene tube with distilled water in ratio 1:4. The results were read at nitrocellulose part of the strip test. For PCR method, the isolation of the DNA with application DNEasy Tissue Kit was done from prepared sample, followed by quantification of the isolated DNA with BioTek Powerwave HT Microplate spectrometer and application of Gen5 Data Analysis software. The PCR results were read with the application of electrophoresis with 1.5% of agar gel.

Both the rapid method and the conventional method showed similar results for all samples analysed. Polenta and muffin mixture originating from the USA contained genetically modified corn, whereas the products from the Nordic countries showed non-detectable levels.

Immunochromatography strip tests are equally reliable as the PCR method in detection of genetically modified corn in food products. The rapid methods are several times cheaper, applicable outside the laboratory conditions and the analysis results are ready in 10-15 minutes.

Keywords: genetically modified corn, immunochromatography strip test, PCR