

## SOUČASNÉ TRENDY VE STANOVENÍ GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ (GMO)

JAROSLAVA OVESNÁ<sup>a</sup> a KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Oddělení molekulární biologie, Odbor genetiky a šlechtění kontroly kvality, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 607, 161 06 Praha 6, <sup>b</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
ovesna@vurv.cz

Došlo 18.2.14, přijato 20.3.14.

Klíčová slova: GMO, potraviny, krmiva, detekce, PCR, sekvenování nové generace

### Obsah

1. Úvod
2. Základní koncepce detekce geneticky modifikovaných organismů (GMO)
3. Postupy stanovení GMO
  - 3.1. Skríníng přítomnosti GMO
  - 3.2. Specifický průkaz GMO
  - 3.3. Kvantitativní zkouška GMO
  - 3.4. Alternativní přístupy ke stanovení GMO
4. GMO neschválené do oběhu v EU
5. Závěr

### 1. Úvod

Nebývalý rozvoj technologií a znalostí přinesl v 80. a 90. letech minulého století možnost manipulovat s genetickou informací buněk prokaryontních i eukaryontních organismů a začal vývoj geneticky modifikovaných organismů (GMO), které nesou cíleně navozenou změnu v sekvencích DNA. Do genomu těchto organismů je začleněna rekombinantní DNA, tj. DNA, která kombinuje elementy různého původu<sup>1,2</sup>. Rekombinantní kazeta se skládá z promotoru (např. odvozeného z viru), vlastní kódující sekvence daného organismu a terminátoru (např. z bakterie). Takový konstrukt by měl být stabilně integrován do genomické DNA a přenášen do dalších generací ve smyslu Mendelistické genetiky<sup>3</sup>.

GMO se využívají jak v uzavřených provozech, tak jsou uvolněny do životního prostředí. V uzavřených provozech se provádějí zejména výzkumné aktivity a využíva-

jí se v nich i geneticky modifikované mikroorganismy (GMM), které slouží např. k produkci řady farmaceutických látek, potravních doplňků, ale i některých průmyslových surovin. Rovněž GM živočichové se chovají v uzavřených prostorách<sup>4</sup>. V životním prostředí se setkáme s geneticky modifikovanými rostlinami odolnými k herbicidům nebo hmyzím škůdcům. Ve světě mají tyto rostliny široké uplatnění v zemědělské výrobě<sup>5</sup>. V poslední době se uvolňují pro pěstování i GM rostliny, které mají pozměněné složení olejů ve prospěch  $\omega$ -nenasycených mastných kyselin, mohou odolávat rostlinným virům nebo se vyznačují změnou barvou květu. Žádoucí je i odolnost vůči stresům, zejména k suchu<sup>6</sup>. Uvolňování GMO do prostředí a jejich následné využití jako potravin a krmiv je na celém světě regulováno. Základní principy byly dohodnuty na půdě WHO/FAO a *Codex Alimentarius*<sup>7</sup>. Jejich aplikace se však může v odlišných regionech lišit. V EU se vychází z principu předběžné opatrnosti a do oběhu mohou být uvolněny pouze GMO a od nich odvozené potraviny a krmiva, které byly pro tento účel schváleny. Schvalování zahrnuje vyhodnocení bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti konkrétního GMO a souhlas na úrovni všech členských států. Postup upravuje příslušná legislativa.

Základním legislativním dokumentem a základem právního rámce pro nakládání s GMO a odvozenými produkty v EU je nařízení Evropské komise 1829/2003 O geneticky modifikovaných potravinách a krmivech<sup>8</sup>. Dále je třeba vzít v úvahu nařízení, které upravuje sledovatelnost GMO a odvozených produktů<sup>9</sup>. Každé GMO a z něj odvozený produkt musí být označen tak, aby mohl, v případě, že by se objevil nežádoucí vliv příslušného GMO na životní prostředí, zvířata či člověka, stažen z trhu. Zajišťuje i informovanou volbu spotřebitele. V tomto smyslu je třeba zajistit sledovatelnost u všech GM a výrobků z nich odvozených, které jsou obchodovatelné. Znamená to, že musí být dokumentován postup zpracování od prvotní suroviny až po konečný výrobek<sup>10</sup>. Proto před schválením GMO do oběhu musí být k dispozici detekční metody, které jednoznačně identifikují dané GMO a odvozený produkt.

Zkušební a kontrolní laboratoře musí být schopné detegovat přítomnost GMO a event. jejich částí v potravinách a krmivech. Metody pro detekci GMO musí být specifické, robustní, vysoce reprodukcibilní a přesné. V EU odpovídá za kvalitu analytických metod pro detekci a kvantifikaci GMO Referenční laboratoř Evropského společenství (EU RL) při Společném výzkumném centru Evropského společenství (JRC EC) v Ispře, které asistuje Evropská síť GMO laboratoří (ENGL). Jedná se o konsorcium národních referenčních laboratoří a výzkumných laboratoří EU. Členové ENGL, jednotlivé GMO laboratoře, musí mít pro danou oblast zkoušek akreditaci podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 a splňovat její krité-

ria. Podílejí se na validaci detekčních metod a předkládají návrhy na nové postupy a nová řešení problematiky.

## 2. Základní koncepce detekce GMO

Stanovení GMO se stalo komplexní záležitostí, která zahrnuje kombinaci faktických, legislativních i komerčních aspektů. Stanovení GMO vyžaduje vhodné laboratorní protokoly, dostupné referenční materiály a vzorkovací plány<sup>11</sup>.

Základem koncepce detekce GMO je znalost jeho podstaty. Do každého GMO je vnesen specifický úsek DNA, který se projevuje na úrovni genomu (inzerce DNA), transkriptomu (specifická mRNA, která odpovídá vnesenému genu nebo iRNA), proteomu (specifický peptid, protein) a lze očekávat i změny metabolických profilů (metabolity). Všechny tyto molekuly lze detegovat příslušnými instrumentálními technikami<sup>12</sup>.

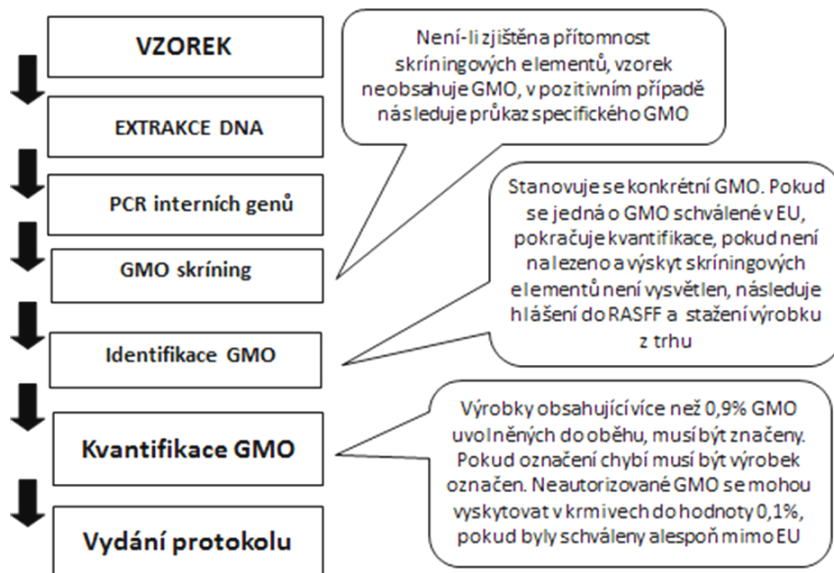
Vzhledem k nestabilitě RNA molekul se RNA jako analytický cíl nepoužívá. Analýza proteinů je možná pouze u nezpracovaných materiálů (zelené rostliny, semena, osiva, event. mouka a šrot). Využívá se enzymová imunoanalýza (ELISA) a to zejména pro orientační stanovení přítomnosti tzv. Bt plodin (Bt kukuřice, bavlna, brambory), což jsou transgenní rostliny, které jsou odolné vůči hmyzím škůdcům. Jsou do nich vpraveny geny kódující delta-endotoxin a jeho varianty<sup>13</sup>. U zpracovaných výrobků není možné ELISA testy použít, i když jsou rychlé a přesné. S rozvojem metabolických metod se zavádí i identifikace a kvantifikace metabolitů jednotlivých GMO<sup>14,15</sup>. Tyto metody je nutné ještě validovat a zjistit možnou šíři jejich využitelnosti.

Velmi stabilní molekulou je DNA. DNA je přítomna ve všech tkáních a pletivech<sup>16,17</sup>. DNA se i ve zpracovaných výrobcích zachovává alespoň ve fragmentované nebo jednořetězcové formě<sup>18,19</sup>. DNA a její identitu lze zjišťovat více způsoby. Nejpřesnější je sekvenování, také je možné používat Southernovu hybridizaci, která však vyžaduje vysokomolekulární DNA nebo tzv. sekvenování nové generace (NGS). Metodou první volby díky své citlivosti a specifitě jsou však zejména postupy založené na využití PCR<sup>20</sup>. Díky specifickým primerům, které hybridizují s vybranými místy genu, může dojít k amplifikaci milionů identických molekul – ampliconů, které odpovídají sekvenci vybraného transgenu. Pro provedení PCR je proto třeba znát sekvenci cílového ampliconu (vneseného genu a jeho okolí). Při stanovení GMO se využívají krátké amplicony, které jsou zachovány i ve zpracovaných produktech. Proto metody založené na PCR jsou schváleny pro použití v kontrolních laboratořích<sup>21</sup>.

## 3. Postupy stanovení GMO

Základní postup stanovení GMO vychází ze schopnosti PCR specificky amplifikovat jakoukoliv sekvenci přítomnou v genomu všech organismů a samotná zkouška se skládá ze 4 kroků: (1) ověření přítomnosti druhově specifické DNA, (2) skrínig obecných elementů, (3) přesnou identifikaci GMO a (4) jeho kvantifikaci. PCR je obecně schopna detegovat i jedinou molekulu templátu v reakci, praktický limit detekce (LOD) se pak pohybuje v rozmezí 10–30 molekul<sup>22,23</sup> (obr. 1).

Prvním krokem je amplifikace druhově specifického genu<sup>24</sup>. Tento krok se využívá jednak pro potvrzení kvality



Obr. 1. Základní postup stanovení GMO

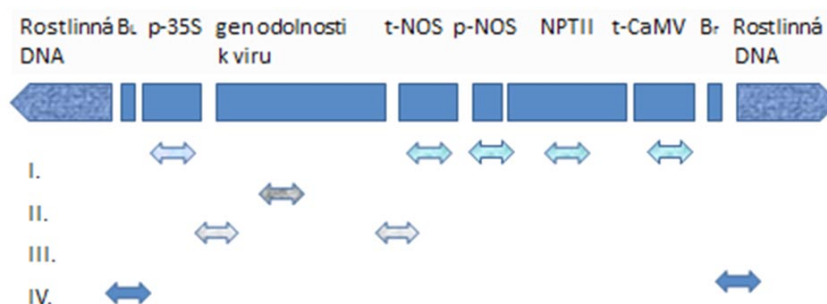
extrahované DNA jako cílového analytu. DNA nesmí obsahovat inhibitory nebo aktivátory PCR, které by mohly ovlivnit kvalitu získaných výsledků. Vzhledem k citlivosti PCR je první krok používán také pro odhalení přítomnosti všech druhů organismů nebo jejich částí ve směsích, ze kterých byl produkt vyroben. Jedná se o významnou informaci, která později umožňuje správnou interpretaci výsledků.

### 3.1. Skríníng přítomnosti GMO

Druhým krokem je provedení tzv. skríníngu. GM rostliny a odvozené produkty, které jsou nejčastějším cílem kontrol, mohou mít shodné regulační elementy – promotory a terminátory – a selekční geny. Současné GM rostliny často obsahují 35S promotor z viru mozaiky květáku (p-35S) a jeho varianty. Jedná se o konstitutivní promotor. Dalšími čtenějšími promotory jsou promotor nopalisyntasy *Agrobacterium tumefaciens* (p-NOS) nebo promotor viru mozaiky krtičníku (p-FMV). Jako terminátor se nejčastěji používá terminátor genu pro nopalisyntasu (t-NOS) nebo terminátor viru mozaiky květáku (t-CaMV). Často se jedná o elementy, které jsou součástí životního prostředí a je třeba se vyvarovat falešných pozitiv<sup>25</sup>. Transgenní kazety také obsahují selekční markery. Mohou to být geny odolnosti k antibiotikům, jako je neomycin fosfotransferasa (*NPTII*), která se příliš v komerčních produktech nepoužívá nebo geny odolnosti k herbicidům – fosfinitricinacetyl transferasa (*PAT*) nebo herbicidně tolerantní forma genu 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát syntasa<sup>26</sup> – AroA:CP4 (*CP4epsps*), aminoglykosid 3'-adenyltransferasa (*aadA*) a  $\beta$ -glukuronidasy (*uidA*). Před 10 lety se využívala pro skríníng GMO pouze kombinace elementů p-35SCaMV a t-NOS (cit.<sup>27</sup>). V té době se však na trhu vyskytoval velmi omezený počet GMO (Roundup Ready sója odolná ke glyfosatu a *Bt* kukuřice). Nyní je v EU schváleno do oběhu víc než 50 odlišných modifikací a ve světě je legálně možné využívat více než 300 GM plodin. Proto je třeba využívat celou sadu skrínin-

gových elementů, které zachytí přítomnost možných GMO. V současné době se kombinuje alespoň 5 elementů a ty ještě neumožňují detegovat všechny GM na trhu<sup>26,28</sup>. Pro detekci skríníngových elementů lze využívat konvenční PCR. Ta ale vyžaduje další manipulaci – elektroforetickou separaci produktů obvykle na agarosovém gelu. V současné době se daleko častěji využívá real-time PCR (RTi-PCR) v kombinaci s TaqMan sondou, která hybridizuje se specifickým úsekem amplikonu<sup>29,30</sup> a zaručuje tak vysokou specifitu zkoušky. Rovněž se stále častěji zvažuje multiplexové uspořádání reakce, které se nepokládalo dříve za příliš spolehlivé. PCR může být využita v multiplexu maximálně 5 reakcí, kde již začíná být problém s optimálním sestavením reakční směsi a sklonu PCR reakce produkovat falešně negativní výsledky. Systém pentaplexu byl již představen<sup>31</sup>. Narůstající počet GMO v EU a na trhu vedl až k vývoji zkoušky, která s využitím 384 jamkových destiček a multiplexu 47 druhově specifických a komplexu skríníngových elementů dovoluje detegovat až 95 % GMO, které se mohou vyskytovat na světovém trhu, a to současně u 7 vzorků. Autoři<sup>32</sup> prokázali specifitu dané zkoušky. Uspokojivý byl i další parametr – senzitivita zkoušky. Zkouška deteguje očekávaný počet kopií (1–16) hledaného genu. Směrem k vývoji 96 jamkového platu pro RTi PCR, které umožní identifikovat a částečně kvantifikovat povolené GMO v EU se vydala i EU RL při JRC EC (cit.<sup>33</sup>).

Vzhledem k tomu, že každé GMO je reprezentováno specifickou sadou elementů (např. Roundup Ready sója obsahuje p-35S, t-NOS, CP4-EPSPS, GMP GTS 40-3-2), takovou sestavu lze identifikovat pro každou GM událost (obr. 2). Lze sestavit matici, která vyjadřuje vztah mezi elementy a analyzovaným materiálem. V jednoduché formě lze využít tabulku, která definuje minimální počet elementů, které umožní identifikovat GMO, které se vyskytují na trhu v EU. Taková tabulka je k dispozici on-line a je konstantně doplňována podle toho, jak jsou schvalovány nové GMO v EU. Je možné využít i databáze (např. data-



Obr. 2. **Základní postup a identifikace GMO:** GMO je charakterizována přítomností několika elementů, které mohou být společné pro více GMO (I), může obsahovat i jedinečný gen (II), který v kombinaci s regulačními úseky lze detegovat konstrukt specifickými priméry (III), které se shodně vyskytují jen u několika GMO. Identitu lze určit analýzou oblasti překrývající DNA hostitelského a organismu a hraniční oblasti transgenů (IV). Bl, Br – pravá a levá hraniční oblast transgenů, p-35S, p-NOS – promotory, t-NOS, t-CaMV – terminátory, NPTII – selekční marker

báze vyvinuté v rámci projektů EU<sup>34,35</sup>.

Vyhledávání skriningových elementů představuje první úroveň stanovení GMO. Spolu s informací o přítomnosti druhů v daném výrobku indikují, jaký typ GMO se může v analyzovaném výrobku vyskytovat. Přítomné skriningové elementy mohou omezit počet GM událostí, které je nutné následně přesně identifikovat. V každém případě analýza pokračuje specifickým průkazem GMO události.

### 3.2. Specifický průkaz GMO

Každé GMO je charakterizováno nejen sadou elementů, ale i unikátním inzerčním místem v genomu. Sekvence DNA, které obklopují inzerť, jsou známy. Tato informace se využívá pro jednoznačnou identifikaci konkrétního GMO. Identifikace pak umožní rozhodnout, zda potravina nebo krmivo obsahuje GMO, které bylo uvolněno do oběhu. Pokud GMO schváleno nebylo, hlásí se výskyt do systému rychlého varování RASFF. V případě povoleného GMO se podle legislativy musí obsah kvantifikovat. Podle evropské legislativy musí být všechny potraviny a krmiva, které obsahují více než 0,9 % schválených GMO jako náhodnou příměs, označeny.

### 3.3. Kvantitativní zkouška GMO

Kvantifikace se obvykle provádí pomocí real-time PCR (RTi-PCR). RTi-PCR je metodou první volby pro kvantitativní měření množství transgenní DNA ve vzorku. Tato metoda má v současné době nejvyšší úroveň přesnosti. Praktický limit kvantifikace (LOQ) se udává obvykle 30–50 kopií, tj. 0,05 %. V současné době se ve směsných vzorcích může vyskytovat více GMO, proto stanovení může být obtížné a zejména u zpracovaných matric obsahujících více interferujících složek méně přesné. V některých případech je požadována kvantifikace kontaminací kolem 0,1 %. Využívají se metody validované EU RL a ENGL (cit.<sup>36</sup>).

Obsah GMO se vztahuje k nemodifikované složce analytu téhož druhu. To znamená, že pokud je produkt dvousložkový, např. směs sóji a kukuřice a obsahuje-li GM sóju, vypočítá se obsah pouze ve vztahu k sóji. Kontrolní laboratoře jsou obvykle vybaveny odpovídajícím zařízením pro RTi-PCR.

Očekával se také významný přínos digitální PCR. Digitální PCR je metoda, která umožňuje absolutní kvantifikaci cílového amplikonu. Je založena na statistickém vyhodnocení signálu z velmi malých reakčních objemů nízkého počtu kopií cílové molekuly DNA v mnoha opakováních. Výsledkem každého opakování je negativní nebo pozitivní výsledek reakce. Kvantifikace se provede počítáním pozitivních reakcí. V konvenční PCR je počet cyklů PCR amplifikace přímo úměrný počtu kopií výchozího amplikonu. Výsledek digitální PCR není závislý na počtu amplifikačních cyklů, což eliminuje závislost na exponenciálních datech pro kvantifikaci cílové nukleové kyseliny, a proto je kvantifikace absolutní. Morisset prokázal<sup>37</sup>, že digitální PCR má široký dynamický rozsah – přes

4 řády, je méně citlivá k inhibitorům a je vysoce reproduci-bilní. Rovněž Li ukázal<sup>38</sup> přednosti této metody. I když náklady na spotřební chemii jsou odpovídající, není metoda zatím nijak rozšířena. Burns upozornil<sup>39</sup>, že současné protokoly kvantifikace GMO by musely být pro digitální PCR revidovány a znovu validovány. Metoda také nepřekonává základní nedostatek validovaných metod založených na RTi-PCR – možnost efektivního stanovení různých GMO. Pokračuje zavádění nových metod a přístupů.

### 3.4. Alternativní přístupy ke stanovení GMO

Již Morisset poukázal<sup>40</sup> na nárůst počtu GMO, zvyšující se počet modifikovaných druhů, ale i rostoucí počet transgenů. To vyvolává potřebu zapojení nových přístupů a konceptů.

Jeden ze slibných přístupů je postup založený na využití DNA mikročipů. Tento postup využití kombinace amplifikace DNA a hybridizace templátových molekul s příslušnou sondou umožňuje detegovat více GMO současně. Sondy, které mohou hybridizovat s templátem, jsou ukotveny na skleněné podložce<sup>41,42</sup>. První čipy umožnily identifikovat 9 odlišných GM plodin. Jednalo se o nízkodensitní čipy, které nenašly tak velké rozšíření, jak se předpokládalo. Tento systém neumožňuje díky pre-amplifikačnímu kroku současnou kvantifikaci cílových molekul. Další možností jsou ligační sondy (Paddlock Ligation Probe) spojené s izotermickou amplifikací. Systém byl využit pro vyhledávání GMO ve spojení s DNA microarrays<sup>43</sup> bodových mutací i detekci patogenů<sup>44</sup>. Za další stupeň lze označit systém<sup>45</sup> představený Dobnikem, který byl odvozen od systému amplifikace RNA. Zahrnuje multiplexovou syntézu templátu s využitím specifických primerů, jejichž součástí jsou také univerzální oblasti, které umožní další amplifikační krok. Vizualizace se provádí po hybridizaci na DNA čipy. Kapacitu systému lze rozšířit. Výhodou je i proporcionalní syntéza templátu v prvním kroku, takže je možná kvantifikace produktů.

Další přístup, který umožňuje současně hodnocení řady elementů, je založený na využití přístroje Luminex xMAP<sup>46</sup>. Využívají se fluoreskující kuličky, které jsou komerčně dostupné ve 100 odlišných barevných sadách. Na každou odlišně zbarvenou sadu je navázána sonda, specifická pro určitou DNA sekvenci. Ačkoliv je tento postup velmi slibný, nevýhodou je nutnost vybavit kontrolní laboratoře zařízením firmy Luminex a validovat postup v mezilaboratorních testech.

Rovněž bylo popsáno využití izotermické amplifikace v systému LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Metoda je schopna automatického cyklování za izotermických podmínek mezi 60 a 65 °C. Tato metoda využívá sadu speciálně konstruovaných primerů, obsahující primery v obou orientacích (sense, antisense), které současně rozpoznávají více odlišných sekvencí v cílové oblasti. Metoda není nákladná a je vysoce specifická. Metoda je schopna detegovat 2–4 kopie cílového amplikonu. Lze ji využít jak pro detekci vybraných GMO<sup>38</sup>, tak i pro skrining<sup>47,53</sup>.

#### 4. GMO neschválené do oběhu v EU

Stále větším problémem se stává detekce neautorizovaných GMO na evropském trhu. Tento stav je dán jednak asynchronní autorizací mezi EU a zejména USA, Kanadou a Argentinou, na straně druhé únikem GMO z experimentálních zkoušek kdekoli ve světě. Za poslední léta stoupá počet takových případů, jmenovat lze transgenní len Triffid z Kanady, transgenní rýže z USA a zejména z Číny, papaya z jihoasijských zemí. Pro ochranu spotřebitele je nutné disponovat metodami, které pomohou odhalit i tyto, nepovolené GMO.

Pro detekci takových produktů se využívají zejména skriningové metody. Počet GMO ve světě roste, včetně množství konstruktů do nich vpravovaných. Např. odlišných linií transgenní rýže je k dispozici ve světě přes 500. V EU nebyla schválena zatím žádná. Hledají se proto možnosti jejich efektivního záchytu.

Pro tyto úkoly také musí být kontrolní laboratoře v celé EU obdobně vybaveny. Metodou první volby je stále konvenční a RTi PCR. Lze využít výše uvedené skriningové metody, protože řada produktů má shodné elementy (promotory, terminátory, selekční geny)<sup>35,48,49</sup>, ale zvažuje se využití i sekvenování nové generace – NGS (New Generation Sequencing) a pro identifikaci nepovolených GMO metoda procházení po chromosomu (Chromosome Walking).

Sekvenování nové generace (NGS) DNA je výkonný alternativní nástroj pro rychlé generování primárních dat genomu<sup>50</sup>, který lze použít i u dosud necharakterizovaného vzorku. Koncept byl ověřen<sup>51</sup> u rýže LL601. Data získaná sekvenováním nové generace byla porovnána s daty dostupnými pro konvenční rýži a byla potvrzena inserce předpokládané kazety do popsaného inzerčního místa. Data poskytnutá majitelem transgenního materiálu a získané výsledky byly identické. Koncept tak lze aplikovat na další případy nepovolených GMO, jejichž charakteristika není známa.

Vzhledem k tomu, že transgenní rýže se stává značným problémem, byl na rýži vyzkoušen i přístup kombinující amplifikaci úseků transgenu a oblasti genomické DNA přiléhající ke konstrukt<sup>52</sup>. Tento postup vyžadující kombinaci specifických primerů nesoucích i další univerzální oblasti a několik kroků amplifikace kombinované se sekvenováním, umožňuje dobře identifikovat hraniční oblasti a určit, o jaký transgenní organismus se jedná.

Je zřejmé, že problematika detekce GMO bude do budoucna vyžadovat nové inovativní přístupy. Metody musí být vysokoprůchozí, cenově dostupné a jejich výkonnostní parametry musí odpovídat stanoveným parametrům zkoušek. Je otázkou, zda bude možné využívat i další typy cílových analytů.

#### 5. Závěr

Stanovení GMO je vyžadováno na základě legislativy Evropského společenství. Postupy založené na využití

konvenční a RTi PCR umožňují základní stanovení, ale rostoucí počet GMO schválených do oběhu v EU vyvolávají nutnost zvažovat využití multiplexových reakcí i nových přístupů. Zejména však nutnost detegovat nepovolené GMO, které do EU vstupují ze třetích zemí, je další výzvou pro vývojové laboratoře. V současné chvíli se jeví jako nejučinnější využití pro stanovení kombinací vhodných analytických postupů spojených s efektivním využíváním rozhodovacích procesů<sup>53</sup>. Očekává se, že bude třeba i v kontrolních laboratořích zavést náročnější metody, jako je detailní sekvenování neznámých úseků chromosomů nebo celogenomové sekvenování nové generace.

*Tento příspěvek byl vypracován s podporou projektu Mze ČR NAZV QI101B267 a CZ0002700604. Děkujeme Ing. V. Pouchové za pomoc při zpracování rukopisu.*

#### LITERATURA

1. Tsaftaris A. S., Polidoros A. N., Karavangeli M., Nianiou-Obeidat I., Madesis P., Goudoula C.: *Resource Management-Connecting Science and Policy* (Balazs E., Galante E., Lynch J. M., Schepers J. S., Toutant J.-P., Werner D., Werry P. A. T. J., ed.), Springer, Berlin 2000.
2. Maksimenko O. G., Deykin A. V., Khodarovich Y. M., Georgiev P. G.: *Acta Naturae* 5, 33 (2013).
3. European Commission: Off. J. Eur. Communities L 106, 1 (2001).
4. Forabosco F., Lohmus M., Rydhmer L., Sundström L. F.: *Livest. Sci.* 153, 1 (2013).
5. Uzogara S. G.: *Biotechnol. Adv.* 18, 179 (2000).
6. Rodríguez-Lázaro D., Lombard B., Smith H., Rzezutka A., D'Agostino M., Helmuth R., Schroeter A., Malorny B., Miko A., Guerra B., Davison J., Kobilinsky A., Hernández M., Bertheau Y., Cook N.: *Trends Food Sci. Technol.* 18, 306 (2007).
7. Codex Alimentarius Commission. *Foods derived from modern biotechnology*. WHO, FAO, Rome 2009.
8. European Commission: Off. J. Eur. Union L 268, 1 (2003).
9. European Commission: Off. J. Eur. Union L 268, 24 (2003).
10. MacDaniel H. A., Sheridan M. K., McGrann J., Wiseman H.: *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20, 406 (2001).
11. Holst-Jensen A., De Loose M., Van Den Eede G.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 2799 (2006).
12. Holst-Jensen A., v knize: *Food toxicants analysis* (Pico Y. ed.), Elsevier, Amsterdam 2007.
13. Ermolli M., Fantozzi A., Marini M., Scotti D., Balla B., Hoffmann S., Querci M., Paoletti C., Van den Eede G.: *Accredit. Qual. Assur.* 11, 55 (2006).
14. Václavík L., Ovesná J., Kučera L., Hodek J., Demnerová K., Hajšlová J.: *Czech J. Food Sci.* 31, 368 (2013).
15. Valdes A., Simo C., Ibanez C., García-Cañas V.: *Trends Anal. Chem.* 52, 2 (2013).

16. Lockey A. K., Bardsley R. G.: *Trends Food Sci. Technol.* 11, 67 (2000).
17. Miraglia M., Berdal K., Brera C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok E., Marvin H, Schimmel H., Rentsch Van Rie J., Zagon J.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 1157 (2004).
18. Gryson N., Messens K., Dewettinck K.: *J. Sci. Food Agric.* 84, 1357 (2004).
19. Bergerová E., Hrnčířová Z., Staňková M., Lopašovská M., Siekel P.: *Food Anal. Methods* 3, 211 (2010).
20. Scharf S., Saiki R., Erlich H. A.: *Hum. Immunol.* 23, 143 (1988).
21. Mafra I., Ferreira I. M. P. L. V. O., Oliveira M. B. P. P.: *Eur. Food Res. Technol.* 227, 649 (2008).
22. Berdal K. G., Boydler C., Tengs T., Holst-Jensen A.: *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1149 (2008).
23. EU JRC, The European Network of Genetically Modified Organisms Laboratories: *Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials*. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2011.
24. Engel K. H., Moreano F., Ehlert A., Busch U.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 490 (2006).
25. Ovesná J., Kučera L., Hodek J., Demnerová K.: *Czech J. Food Sci.* 28, 133 (2010).
26. Guo J., Chen L., Liu X., Gao Y., Zhang D., Yang L.: *Food Chem.* 132, 1566 (2012).
27. Reiting R., Broll H., Wablinger H. U., Grohmann L.: *J. Consum. Prot. Food Saf.* 2, 116 (2007).
28. Dörries H. H., Remus I., Grönewald A., Grönewald C., Berghof-Jäger K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 2043 (2010).
29. Kutuyavin I. V., Afonina I. A., Mills A., Gorn V. V., Lukhtanov E. A., Belousov E. S., Singer M. J., Walburger D. K., Lokhov S. G., Gall A. A., Dempcy R., Reed M. W., Meyer R. B., Hedgpeth J.: *Nucleic Acids Res.* 28, 655 (2000).
30. Querci M., Foti N., Bogni A., Kluga L., Broll H., Van den Eede G.: *Food Anal. Method* 2, 325 (2009).
31. Huber I., Block A., Sebah D., Debode F., Morisset D., Grohmann L., Berben G., Stebih D., Milavec M., Zel J., Busch U.: *J. Agric. Food Chem.* 61, 10293 (2013).
32. Cottenet G., Blancpain C., Sonnard V., Chuah P.F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6831 (2013).
33. Querci M., Van den Bulcke M., Zel J., Van den Eede G., Broll H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1991(2010).
34. Block A., Debode F., Grohmann L., Hulin J., Taverniers I., Kluga L., Barbau-Piednoir E., Broeders S., Huber I., Van den Bulcke M., Heinze P., Berben G., Busch U., Roosens N., Janssen E., Zel J., Gruden K., Morisset D.: *BMC Bioinf.* 14, 256 (2013).
35. Broeders S., Barbau-Piednoir E., Vandermassen E., Debode F., Mazzara M., Roosens N.: *Eur. Food Res. Technol.* 236, 537 (2013).
36. Bonfini L., van den Bulcke M. H., Mazzara M. Ben E., Patak A.: *J. AOAC Int.* 95, 1713 (2012).
37. Morisset D., Stebih D., Milavec M., Gruden K., Žel J.: *PLoS ONE* 8, e62583 (2013).
38. Li L., Sui Z-W., Wang J., Zang Ch., Yu X-B.: *Prog. Biochem. Biophys.* 10, 1017 (2012).
39. Burns M. J., Burrell A. M., Foy C. A.: *Eur. Food Res. Technol.* 231, 353 (2010).
40. Morisset D., Stebih D., Cankar K., Zel J., Gruden K.: *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1287 (2008).
41. Germini A., Rossi S., Zanetti A., Corradini R., Fogher C., Marchelli R.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 3958 (2005).
42. Bordoni R., Germini A., Mezzelani A., Marchelli R., De Bellis G.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 912 (2005).
43. Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M.: *Mol. Plant Pathol.* 9, 73 (2008).
44. Smith J. H., Beals T. P.: *PLoS ONE* 8, e65053 (2013).
45. Dobnik D., Morisset D., Gruden K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 2229 (2010).
46. Fantozzi A., Ermolli M., Marini M., Balla B., Querci M., Van den Eede G.: *Food Anal. Methods* 1, 10 (2008).
47. Randhawa G. J., Singh M., Morisset D., Sood P., Žel J.: *J. Agric. Food Chem.* 61, 11338 (2013).
48. Waiblinger H. U., Grohmann L., Mankertz J., Engelbert D., Pietsch K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 2065 (2010).
49. Reiting R., Grohmann L., Moris G., Mäde D.: *Eur. Food Res. Technol.* 236, 715 (2013).
50. Metzker M. L.: *Nat. Rev. Genet.* 11, 31 (2010).
51. Wahler D., Schauer L., Bendiek J., Grohmann L.: *Food Anal. Methods* 6, 1718 (2013).
52. Fraiturea M. A., Herman P., Taverniers I., De Loose M., Deforce D., Roosens N. H.: *Food Chem.* 147, 60 (2014).
53. Demnerová K.: *Chem. Listy* 106, 920 (2012).

**J. Ovesná<sup>a</sup> and K. Demnerová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Molecular Biology, Research Institute of Plant Production, Prague,* <sup>b</sup> *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Current Trends in Determination of Genetically Modified Organisms (GMO)**

Genetically modified organisms and the derived food and feed are subject to legal restrictions. A number of EU regulations determine GMOs which may appear on the market and their contents in food and feed. These restrictions require accurate and sensitive methods for identification and quantification of GM products by PCR. Moreover, the threat of unauthorized GMO import necessitates the search for new approaches and methods.