

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

LZE VYUŽÍT METABOLOMICKÉ PROFILOVÁNÍ PRO AUTENTICITU GENETICKY MODIFIKOVANÉ SÓJI?

VOJTĚCH HRBEK^a, JAROSLAVA OVESNÁ^b,
KATEŘINA DEMNEROVÁ^c
a JANA HAJŠLOVÁ^a

^a Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6,

^b Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze Ruzyni, Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6, ^c Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
jana.hajslova@vscht.cz

Došlo 13.3.14, přijato 15.5.14.

Klíčová slova: sója, geneticky modifikovaná sója, metabolika, hmotnostní spektrometrie, autenticita

Úvod

Geneticky modifikované plodiny se komerčně pěstují od roku 1994, kdy byla poprvé představena geneticky modifikovaná odrůda rajského jablka¹. Od té doby se objevilo mnoho dalších geneticky upravených zemědělských plodin (např. kukuřice, brambora nebo rýže)². Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je organismus, jehož genetický materiál (DNA) byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací, nýbrž pomocí genových technologií. Geneticky modifikované plodiny se vyznačují různými specifickými vlastnostmi, mezi které patří zejména odolnost vůči škodlivým činitelům – škůdcům, chorobám, chladu, suchu apod., anebo tolerance vůči postřiku neselektivním herbicidem, který ničí všechny ostatní, nežádoucí rostliny (plevele)^{3,4}.

Jednou z nejrozšířenějších geneticky modifikovaných zemědělských plodin jsou sójové boby. Tak zvaná geneticky modifikovaná neboli transgenická sója se podle odhadů podílí na světové produkci sóji asi 65 %. Tento odhad není přesný, protože v některých zemích je nebo byla geneticky modifikovaná sója pěstována neoficiálně nebo přímo ilegálně. Nejběžnější geneticky modifikovanou (GM) odrůdou je sója formy Monsanto s odolností proti totálnímu herbicidu Roundup s účinnou látkou glyfosátem, který je specifickým inhibitorem enzymu EPSP (enolpyruvyl-šikimát-3-fosfát) syntasy, která je důležitým mezipřechodem syntézy aromatických aminokyselin. Po aplikaci glyfosátu

tak rostlina odumírá na nedostatek těchto aminokyselin. Do GM sóji byla vložena jiná varianta genu pro EPSP syntasy pocházející z půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tento enzym není glyfosátem inhibován, rostlina tak získá k němu rezistenci^{5–7}.

Přestože GM plodiny mají řadu výhod pro farmáře, s ohledem na jejich např. vyšší výnosy, jsou geneticky modifikované plodiny stále předmětem diskusí z hlediska jejich zdravotního rizika při konzumaci jak pro člověka, tak i pro zvířata. Obzvláště v EU byla provedena řada studií zabývajících se tímto aspektem^{8–10}. Geneticky modifikované plodiny resp. potraviny z nich odvozené jsou v řadě zemí povoleny a v řadě zemí (převážně státy EU) jsou naopak zakázány. V EU a tedy i v ČR lze pěstovat pouze geneticky modifikovanou kukuřici MON810.

S ohledem na různé postoje zemí světa ke GM plodinám je celosvětově důležité označování geneticky modifikovaných plodin a potravin z nich vyrobených¹¹. V Evropě platí povinnost označovat potraviny jako GM potraviny, pokud obsahují více jak 0,9 % geneticky modifikované ingredience dle Direktivy 2001/18/EC, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 a č. 1830/2003 (cit.^{12,13}).

Správné či chybné označení potravin je prověřováno v kontrolních laboratořích GMO. Pro kontrolu GM potravin se v současné době nejvíce využívají analytické metody založené na analýze DNA, především kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR, Polymerase Chain Reaction) tzv. real-time PCR (cit.^{14–16}).

Pro autentikaci GM nebo konvenční potraviny je možno využít i tzv. metabolického přístupu, kdy se k hodnocení autenticity potravin využívá charakteristického profilu („fingerpruntu“) nízkomolekulárních složek dané komodity^{17,18}. V případě rozlišení GM se dá předpokládat, že určitá genetická modifikace má vliv na změnu metabolomu dané plodiny. Analýza metabolomu, resp. získání výše uvedeného charakteristického profilu však představuje nesnadný úkol, kterého lze úspěšně dosáhnout pouze za pomoci moderních analytických technik. Vedle dalších metod lze především využít hmotnostní spektrometrie, ať už ve spojení s chromatografickými separačními technikami nebo v přímém uspořádání. Jako jedna z nevhodnějších technik pro tyto účely se jeví použití ionizační techniky přímé analýzy v reálném čase ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (DART-MS, Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry)¹⁹. Tato technika se již osvědčila jako velmi vhodný a účinný nástroj pro hodnocení autenticity a detekci falšování v několika předchozích studiích zabývajících se např. hodnocením kvality olivových olejů²⁰, odlišením různých druhů živočišných tuků²¹, zjištěním přísady rostlinných olejů do mléčných výrobků²² apod.

V rámci této práce byl studován potenciál DART-MS techniky pro rychlé profilování GM a konvenční sóji

a hodnocení jejich autenticity s využitím metabolomických profilů a multivariační statistické analýzy^{23,24}.

Experimentální část

Vzorky

Vzorky pro tuto studii byly zajištěny výzkumným ústavem rostlinné výroby (VÚRV) v Praze Ruzyni. Pro tuto studii bylo použito celkem 49 vzorků sóji, z nichž bylo 30 vzorků geneticky modifikované sóji a 19 vzorků konvenční sóji. Potvrzení geneticky modifikovaných a konvenčních vzorků provedli pracovníci VÚRV analýzou DNA metodou PCR.

Příprava vzorku

Vzorky sóji byly homogenizovány v laboratorním homogenizátoru. Poté byly naváženy 2 g vzorku do 15ml polypropylenové centrifugační kyvety a ručně třepány s 10 ml 80% methanickým roztokem ve vodě po dobu 2 min. Směs byla následně odstředěna (5 min, 20 °C, 10000 otáček za minutu). Supernatant byl odebrán do 5ml plastové stříkačky a přefiltrován přes 0,22 μ m filtr. Filtrát byl převeden do 2ml autosamplerové vialky a do doby analýzy uschován v suchu a tmě při 5 °C.

Analýza vzorku

Pro instrumentální metabolomickou analýzu byly použity následující přístroje: iontový zdroj DART, model SVP (IonSense, USA) ve spojení s hybridním hmotnostním spektrometrem s analyzátozem typu orbitrap – Exactive (Thermo Fisher Scientific, USA) a posuvným automa-

tickým dávkovačem (IonSense, USA).

Podmínky nastavení parametrů pro měření/získání charakteristických metabolomických profilů jsou shrnuty v tab. I.

Vzorek (extrakt) je nanesen na skleněnou tyčinku a umístěn do automatického podavače vzorků. Vzorek je následně z tyčinky desorbován pomocí vysoké teploty a ihned ionizován proudem metastabilních částic plynu (He). Vzniklé ionty pak vstupují do hmotnostního spektrometru, který zaznamená hmotnostní spektrum, tj. charakteristický metabolomický fingerprint. Vzorky byly vyšetřeny jak v pozitivním, tak i v negativním módu ionizace. Ke zpracování naměřených dat byl použit program Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Výsledky a diskuse

DART-MS data

Na obr. 1 je vidět porovnání fingerprintů konvenční sóji (A) a transgenní sóji (B) získaných pomocí techniky DART-MS v pozitivním ionizačním módu. Fingerprinty se na první pohled příliš neliší, nicméně je nutno vzít v úvahu poměry relativních intenzit jednotlivých iontů, které vykazují známky odlišnosti, a jsou tak klíčové pro odlišení vzorků sóji. Mimo tuto skutečnost se podařilo najít charakteristický ion m/z 163, který se vyskytuje v konvenční sóje a v transgenní buď zcela chybí, nebo je zastoupen ve výrazně nižší koncentraci. Ionu m/z 163 odpovídá elementární složení $C_6H_{10}O_5$, které koresponduje s elementárním složením 1,6-anhydroglukosu, jež může vznikat např. fragmentací glykogenu, glukůzů nebo celulosy.

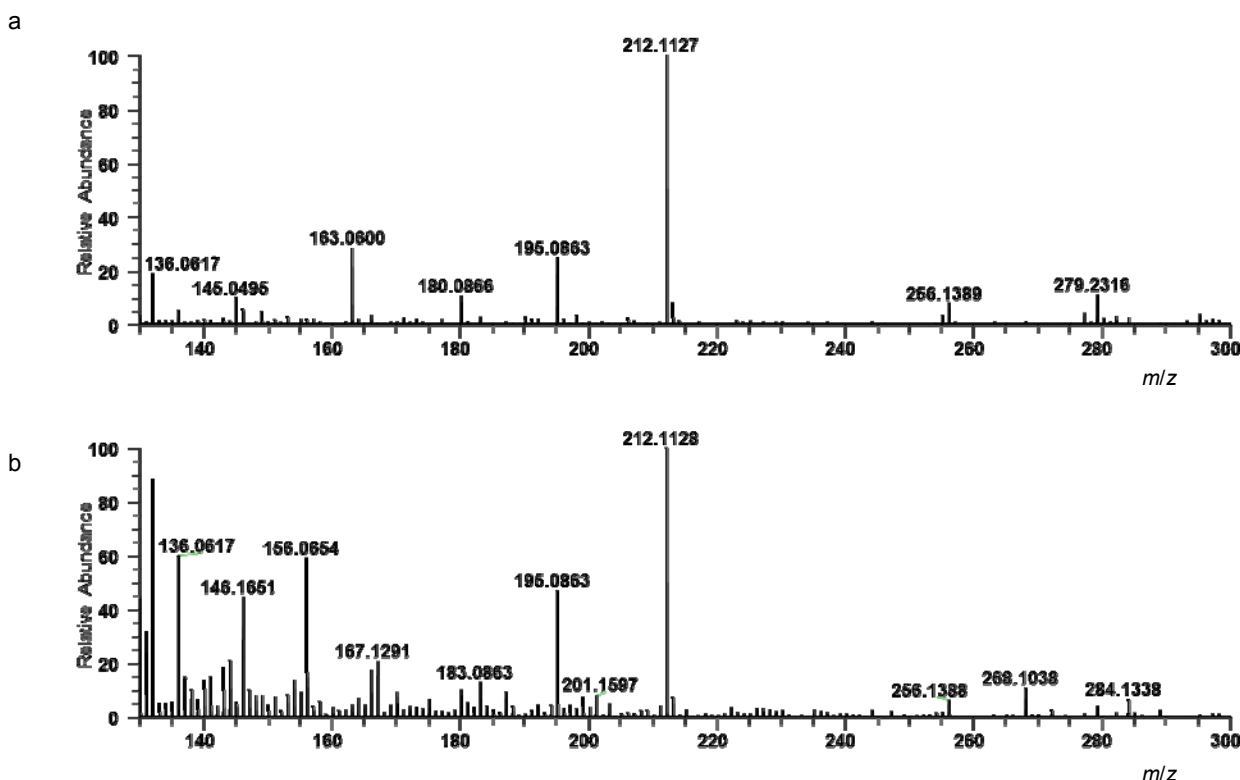
Obdobně je na obr. 2 ukázáno porovnání fingerprintů konvenční sóji (A) a transgenní sóji (B) získaných techni-

Tabulka I

Přehled optimálního nastavení DART-MS systému

Parametry	Positivní mód	Negativní mód
<i>DART-SVP</i>		
Ionizační plyn	helium	helium
Teplota ionizačního plynu, °C	450	400
Tlak ionizačního plynu, bar	4,5	4,5
Rychlost posunu autosampleru, mm s ⁻¹	0,5	0,5
<i>OrbitrapMS</i>		
Napětí na kapiláře, V	60	-60
Napětí iontové optiky, V	150	-150
Teplota kapiláry, °C	250	250
Rozlišovací schopnost ^a	50000 FWHM	50000 FWHM
Hmotnostní rozsah, m/z	50–1000	50–1000
Napětí na iontovém zdroji, V	1,5	1,5

^a FWHM = Full width at half maximum – šířka píku v polovině maxima jeho výšky



Obr. 1. DART(+)-MS hmotnostní spektra (m/z 130–300) získaná analýzou 80% methanolického extraktu (A) konvenční sóji a (B) transgenní sóji

kou DART-MS v negativním ionizačním módu. Zde je situace výrazně jiná, protože při porovnání obou fingerprintů jsou zjevně výrazné rozdíly, a to jak v přítomnosti iontů, tak i v poměrech jejich relativních intenzit. Byly nalezeny a částečně identifikovány ionty, které výrazně odlišují oba typy vzorků sóji. Jsou to např. ionty m/z 293 ($C_{18}H_{30}O_3$), m/z 295 ($C_{18}H_{32}O_3$) kyselina vernolová, m/z 311 ($C_{18}H_{32}O_4$), m/z 313 ($C_{18}H_{34}O_4$), m/z 327 ($C_{18}H_{32}O_5$), m/z 329 ($C_{18}H_{34}O_5$).

Pro demonstraci odlišnosti jednotlivých vzorků pomocí těchto popsaných markerů je na obr. 3 zobrazen chronogram pro iont m/z 311, kde jsou rozdíly mezi vzorky jasně vidět. DART ionizace je podobná technika APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku) ionizací, proto vznikají převážně pseudomolekulární ionty $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$. Získaná data byla dále zpracována pomocí statistických chemometrických analýz, jejichž výsledky jsou ukázány níže (obr. 4 a 5).

Chronogram je záznam signálu v čase, při analýze vzorků dochází v momentě desorpce, ionizace a detekce analytů přítomných v extraktu vzorku k tvorbě tzv. desorpčního píku. Díky absenci separace analytů před vlastní DART-MS analýzou jsou veškeré desorbovatelné a ionizovatelné analyty zaznamenávány najednou, proto zprvu desorpční pík ukazuje záznam pro všechny detegované analyty tzv. celkový záznam iontů (TIC, celkový

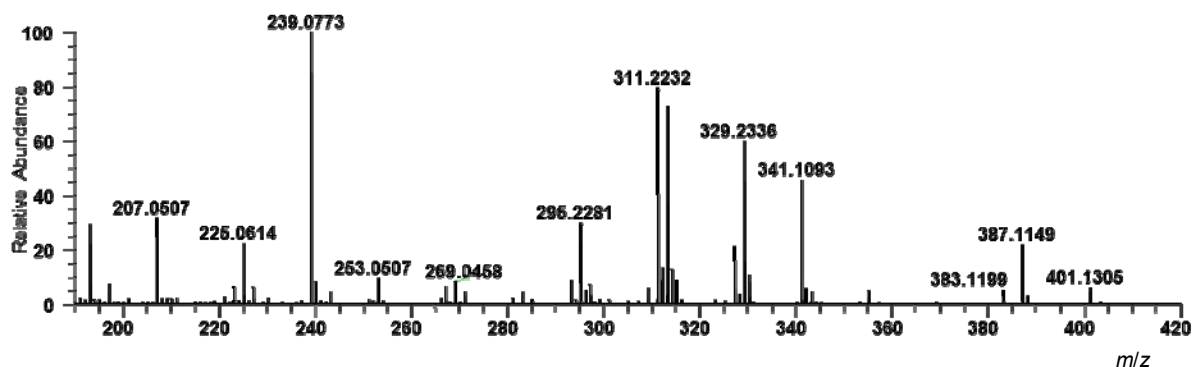
chromatografický záznam všech iontů). Charakteristický metabolický profil získáme zprůměrováním všech hmotnostních spekter naměřených od začátku do konce desorpčního píku (softwarová záležitost). Software umožňuje též vybrat si určitý charakteristický iont, přítomný v metabolickém profilu, pro daný vzorek a při vizualizaci záznamu tohoto vybraného iontu v chronogramu se opět objeví desorpční píky, tentokrát pouze již pro jeden vybraný iont resp. pro jeden vybraný analyt. Taktovizualizovaný desorpční pík pro určitý iont se objeví pouze u vzorků, které vybraný iont obsahují. Tímto způsobem byl získán záznam na obr. 3.

Statistika

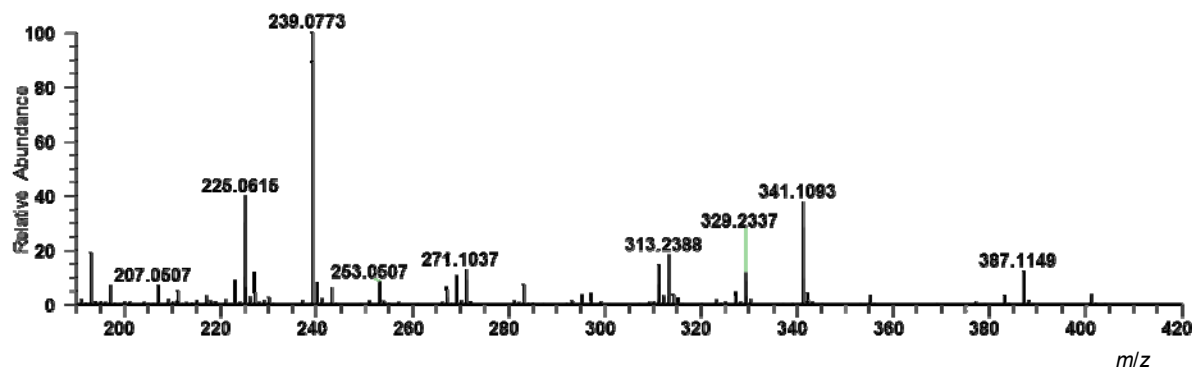
Cílem statistické analýzy je zhodnotit potenciál získaných dat pro diskriminaci konvenční a transgenní sóji/výrobků ze sóji (např. sójová mouka), dále pak identifikovat signály (markery), které je charakterizují a odlišují.

Ke zpracování a interpretaci vícerozměrných dat získaných během metabolických analýz jsou často využívány metody multivariační statistické analýzy. Mezi nejčastěji používanou statistickou metodou, která umožňuje prozkoumat strukturu komplexních dat, je analýza hlavních komponent (PCA). Při tvorbě matematických modelů pro klasifikaci neznámých vzorků se uplatňuje především

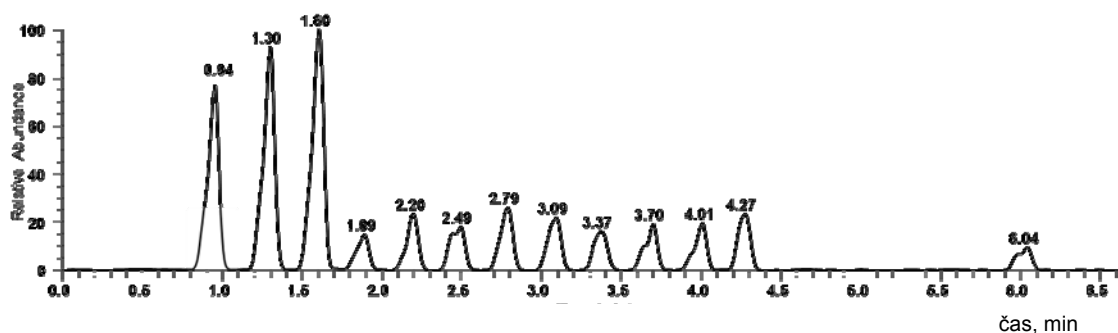
a



b



Obr. 2. DART(-)-MS hmotnostní spektra (m/z 190–420) získaná analýzou 80% methanolického extraktu (A) konvenční sóji a (B) transgené sóji

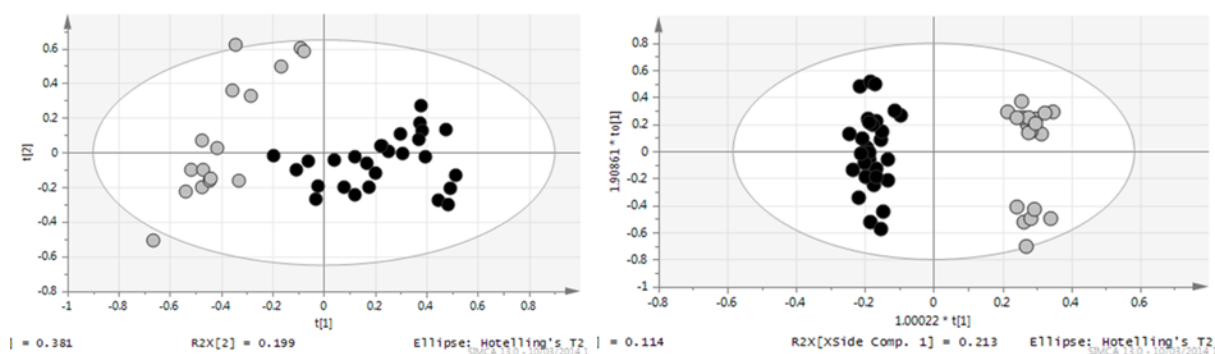


Obr. 3. DART(-)-HRMS: Chronogram pro vybraný charakteristický iont m/z 311 pro vzorky konvenční sóji (první 3 desorpční píky) a v menším množství pro vzorky transgené sóji (desorpční píky 4–12)

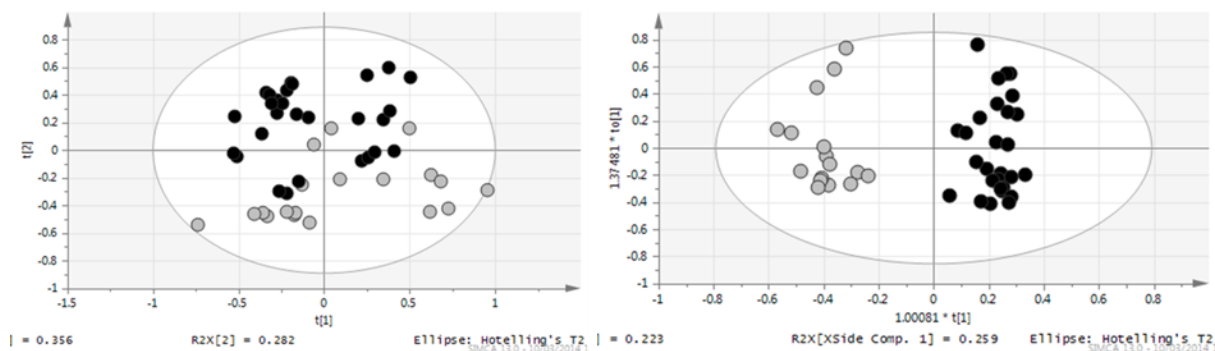
lineární diskriminační analýza (LDA) nebo diskriminační analýza nejmenších čtverců (PLS-DA) případně nejvhodnější chemometrickou analýzu pro odlišení dvou skupin vzorků tj. ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA).

Prvním krokem při analýze dat bývá nejčastěji využití metody PCA s cílem určit strukturu naměřených dat. PCA zredukuje dimenzi dat, umožní jejich vizualizaci a zachová

co možná nejvíce informaci přítomných v původních datech. PCA transformuje původní naměřené proměnné do nových nekorelovaných proměnných tzv. hlavních komponent (PC). Každá hlavní komponenta je lineární kombinací původních měřených veličin. Tato technika poskytuje skupinu kolmých souřadnic, které představují směr největší variability v datech. První hlavní komponenta (PC1) odpovídá maximu z celkové variability. Druhá komponenta



Obr. 4. Výsledky chemometrické analýzy vzorků analyzovaných DART-MS v pozitivním módu, vlevo je porovnání vzorků konvenční sóji (šedá barva) a vzorků transgenní sóji (černá barva) metodou PCA a vpravo metodou OPLS-DA



Obr. 5. Výsledky chemometrické analýzy vzorků analyzovaných DART-MS v negativním módu, vlevo je porovnání vzorků konvenční sóji (šedá barva) a vzorků transgenní sóji (černá barva) metodou PCA a vpravo metodou OPLS-DA

(PC2), která nekoreluje s PC1, podává informaci o maximu ze zbývající variability, a tak dále, dokud není popsána celková variabilita²³.

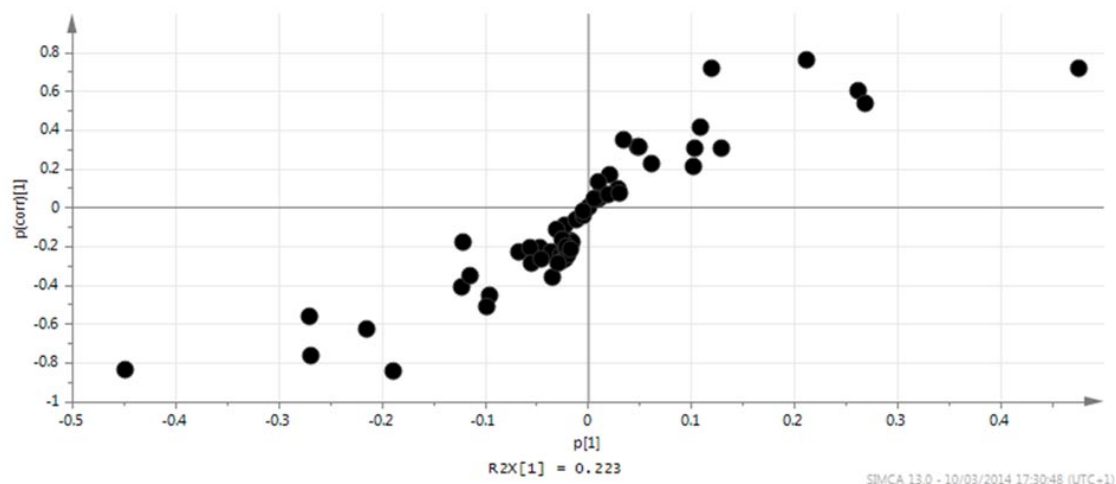
LDA udává směr, který dosahuje maximální separace mezi danými třídami. Principem je stanovení lineárních diskriminačních funkcí, které maximalizují poměr variability mezi jednotlivými třídami a minimalizují poměr variability uvnitř jednotlivých tříd.

Technika OPLS je používána pro popis kvantitativního vztahu mezi maticí X (spektrální nebo chromatografická data) a Y (kvantitativní hodnoty, např. koncentrace metabolitů). OPLS je možné použít i pro diskriminační analýzu (OPLS-DA), kde matice Y je nahrazena údaji o třídě (např. zdravá vs. nemocná populace). OPLS-DA model tak vyjadřuje lineární vztah mezi třídami ($n \times 1$) a proměnnými ($n \times p$). V rámci OPLS-DA dochází k tvorbě nových „skrytých proměnných“ (LV), přičemž optimální počet LV je zjišťován pomocí validace daného modelu²⁴.

Získaná data z jednotlivých měření pomocí různých technik byla statisticky zpracována pomocí multivariačních chemometrických analýz PCA a OPLS-DA. Výsledky těchto analýz pro jednotlivé techniky a ionizační módy

jsou uvedeny na následujících obr. 4 a 5, kde je ukázáno grafické zpracování získaných dat pomocí multivariačních statistických analýz PCA a OPLS-DA. Jak je patrné z obr. 4 a 5, prvotní PCA analýza ukázala schopnost získaných dat tvořit skupiny a oddělovat je dle typu sóji (konvenční a transgenní). Při porovnání PCA analýz dat získaných v pozitivním a negativním ionizačním módu se ukázalo, že u dat získaných při pozitivní ionizaci došlo k o něco lepšímu oddělení než v případě dat získaných za negativní ionizace. Následná OPLS-DA analýza potvrdila závěry zjištěné z PCA analýzy a díky jinému mechanismu statistického zpracování dat došlo k ještě výraznějšímu oddělení jednotlivých typů vzorků tentokrát v obou ionizačních módech.

Na obr. 6 je ukázán příklad S-plotu, který ukazuje rozložení jednotlivých markerů, které byly použity pro statistické hodnocení. Na opačných koncích, nejvzdálenější ionty, jsou markery s největší vahou na oddělení vzorků. V tab. II jsou shrnuty všechny tyto důležité markery. U jednotlivých iontů byla navržena i identifikace na základě měření přesné hmoty a výpočtu sumárního vzorce. Vzhledem k tomu, že během analýzy nedochází



Obr. 6. Příklad S-plotu ze statistické analýzy OPLS-DA, graf rozložení váhy jednotlivých iontů/látek tzv. markerů, markery s největší vahou jsou vyznačeny černým oválem

Tabulka II

Souhrn významných markerů získaných technikou DART(+,-)-MS

(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	Sumární vzorec	Identifikace	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	Sumární vzorec	Identifikace
<i>DART-MS nejvýznamnější markery pro odlišení vzorků - pozitivní ionizace</i>					
104.0708	C ₄ H ₉ O ₂ N		195.0863	C ₇ H ₁₄ O ₆	methylglukosid
127.0390	C ₆ H ₆ O ₃	maltol, isomaltol, pyrogallol, hydroxyquinol	285.0760	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	glycitein, acetin, biochanin A, 5- <i>O</i> -methylgenistein
163.0600	C ₆ H ₁₀ O ₅	1,6-anhydroglukosy			
<i>DART-MS nejvýznamnější markery pro odlišení vzorků - negativní ionizace</i>					
105.0184	C ₃ H ₆ O ₄	kyselina glycerová	295.2282	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	kyselina vernolová
128.0345	C ₅ H ₇ O ₃ N	kyselina pyroglutamová	311.2231	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	
181.0710	C ₆ H ₁₄ O ₆		313.2387	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	
253.0507	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	daidzein, chrysin, chrysofenová kyselina	327.2181	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	
269.0459	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	genistein	329.2338	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	
293.2126	C ₁₈ H ₃₀ O ₃				

k chromatografické separaci a nebyly použity žádné standardy pro konfirmaci identifikace, bylo pro některé ionty navrženo více možností identifikace sloučenin.

Závěr

Závěrem lze říci, že přístup metabolického profilování vzorků sóji s využitím techniky DART-MS ve spojení s multivariačními statistickými metodami (PCA a OPLS-DA) umožňuje rychlé a elegantní ověření autenticity GM a konvenční sóji.

Práce byla připravena s podporou projektu MZE QI101B267.

LITERATURA

1. Nap J. P., Mety P. L. J., Escaler M., Conner A. J.: *Plant J.* 33, 1 (2003).
2. James C.: *ISSA Briefs 2011*, 42.
3. Phipps R. H., Park J. R.: *J. Anim. Feed Sci.* 11, 1 (2002).
4. Senior I. J., Dale P. J.: *Plant Breed.* 121, 97 (2002).
5. Arun Ö. Ö., Yilmaz F., Muratoglu K.: *Food Control* 32, 525 (2013).

6. Dinon A. Z., Treml D., Mello C. S., Arisi A. C. M.: *J. Food Compos. Anal.* 23, 226 (2010)
7. Ujhelyi G., Vajda B., Béki E., Neszlényi K., Jakab J., Jánosi A.: *Food Control* 19, 967 (2008).
8. Hilbeck A., Weiss G., Oehen B., Römbke J., Jänsch S., Teichmann H., Lang A., Otto M., Tappeser B.: *Ecol. Indic.* 36, 367 (2014).
9. Rajan S. R., Letourneau D. K.: *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, P. 1-8 (2012).
10. Dlugosch K. M., Whitton J.: *Mol. Ecol.* 17, 1167 (2008).
11. Tutelyan V. A.: *Genetically Modified Food Sources: Safety Assessment And Control*. Elsevier Inc., San Diego 2013.
12. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 pro geneticky modifikované potraviny a krmiva. *Off. J. Eur. Union* 2003; L. 268, P. 24-28.
13. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 o původu a označení geneticky modifikovaných organismů a původu potravin a krmiv vyrobených z nich, které upravuje Direktivu 2001/18/EC., *Off. J. Eur. Union* 2003; L. 268, P. 24-28.
14. Del Gaudio S., Cirillo A., Di Bernardo G., Galderisi U., Cipollaro M.: *J. Food Qual.* 35, 442 (2012).
15. Zhang D., Guo J.: *J. Integr. Plant Biol.* 53, 539 (2011).
16. Mavropoulou A. K., Koraki T., Ioannou P. C., Christopoulos T. K.: *Anal. Chem.* 77, 4785 (2005).
17. Clarke J. D., Alexander D. C., Ward D. P., Ryals J. A., Mitchell M. W., Wulff J. E., Guo L.: *Sci. Rep.* (2014) doi:10.1038/srep03871.
18. Vaclavik L., Ovesna J., Kucera L., Hodek J., Demnerova K., Hajslova J.: *Czech J. Food Sci.* 31, 368 (2013).
19. Cody R. B., Laramée J. A., Durst H. D.: *Anal. Chem.* 77, 2297 (2005).
20. Vaclavik L., Cajka T., Hrbek V., Hajslova J.: *Anal. Chim. Acta* 645, 56 (2009).
21. Vaclavik L., Hrbek V., Cajka T., Rohlik B. A., Pipek P., Hajslova J.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 5919 (2001).
22. Hrbek V., Vaclavik L., Elich O., Hajslova J.: *Food Control* 36, 138 (2014).
23. Stewart S., Ivy M. A., Anslyn E. V.: *Chem. Soc. Rev.* 43, 70 (2014).
24. Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J. K., Holmes E., Trygg J.: *J. Chemom.* 20, 341 (2006).

V. Hrbek^a, J. Ovesná^b, K. Demnerová^c, and J. Hajslová^a (^a*Department of Food Analysis and Nutrition, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Research Institute of Plant Production, Prague,* ^c*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Can Metabolomic Profiling Be Used for Authenticity of Genetically Modified Soya?**

Samples of genetically modified (GM) and conventional soybeans were analyzed using DART-MS techniques. The metabolomic profiles of soybean 80% methanolic extracts were obtained. The data were processed by statistical analysis (OPLS-DA). The method can be used for differentiation of GM and conventional soybeans.