

APLICAREA TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARA IN SECTORUL ALIMENTAR, CA METODE MODERNE DE ANALIZA SI CONTROL

**Drd. ing. Oana Niculae
Drd. biol. Marian Adascalului**

Cateva metode bazate pe analiza acizilor nucleici:

- Real Time Quantitative polymerase chain reaction methods (PCR)
- Next Generation Sequencing
- Oligonucleotide DNA microarrays
- Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)
- Ligation detection reaction-universal arrays (LDR-UA)
- Fragment analysis (PFGE, SSR, RAPD, iSSR etc)
- loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Molecula de ADN – acid dezoxiribonucleic



I. Organisme modificate genetic

- OMG – organisme (respectiv plante) al caror material genetic a fost “transformat “ prin aplicarea tehnicilor de recombinare ADN
- Molecule de ADN din diferite surse sunt “combinat” *in vitro* intr-o singura molecula. In general se urmareste obtinerea de noi gene/ combinatii de gene
- Acest ADN transferat intr-un nou organism determina aparitia unor noi trasaturi sau modificarea celor existente
- Modificarea genetica presupune insertia unui segment de ADN (insert), in genomul unui organism gazda

Trăsături induse Plantelor Modificate Genetic

- **Toleranța la erbicide:** permite renunțarea la tratamentele cu produse specifice, aplicabile cu restricții severe
- **Rezistența la insecte:** este obținută prin inserția de gene care provin de la *Bacillus thuringiensis*
- **Rezistența la virusuri:** este dată de gene care codifică proteina învelișului viral, izolate de la virusurile care generează respectivele maladii (virusul mozaicului, virusul petelor inelare).

Cum stim ca un produs este sau nu modificat genetic:

Identificarea fenotipică:

- majoritatea OMG sunt identice cu formele parentale

Metode bazate pe analiza acizilor nucleici:

- ADN sau ARN

Metode bazate pe analiza proteinelor:

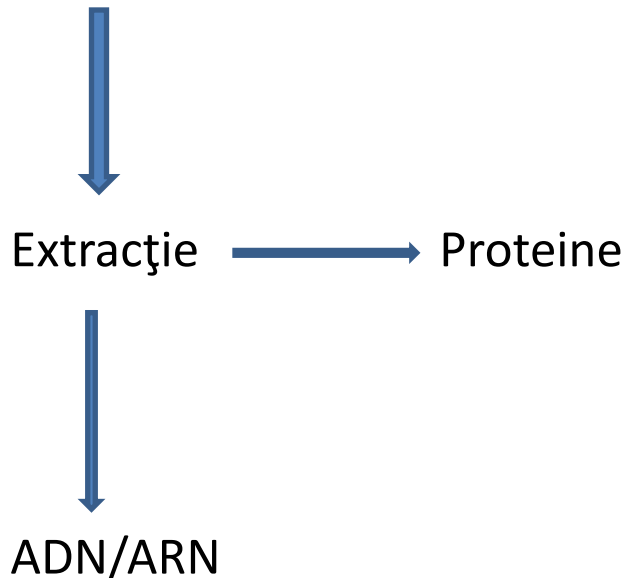
- transformarea este însoțită de producerea de noi proteine care pot fi identificate imunologic

Metode alternative:

-Cromatografie, spectrofotometrie in infrarosu

Metode de detecție a OMG:

Prepararea probei (omogenizare)



Detecția, identificarea și cuantificarea OMG → ELISA

Detecție OMG → PCR Calitativ

Identificare OMG

Cuantificare OMG → PCR Cantitativ

Pregatire proba - omogenizare

In functie de natura produselor se folosesc diferite metode de pregatire a probei:

- produse uscate (faină, produse de panificație)
- produse cu umiditate ridicată (pateu, tofu, iaurt, înghețată, sosuri)
- produse lichide (lapte, ulei, bere)
- Seminte (soia, porumb, grâu)



Extracția și purificarea ADN

- Exista un număr foarte mare de metode de extracție
- Cele mai des folosite sunt:
- Metoda de extracție și purificare cu CTAB
- Metoda Wizard Rezin sau alte metode pe bază de rășini
- Metoda de purificare ADN cu particule magnetice

Metode de detecție și cuantificare a OMG bazate pe analiza ADN

Principiul Real-Time PCR: monitorizarea în timp real a fluorescenței emise în timpul reacției ca un indicator al producerii de ampliconi în fiecare ciclu de PCR

Este extrem de sensibilă și se poate realiza pe produse alimentare din depozitele distribuitorilor sau produse din supermarket.

Avantajele Real-time PCR

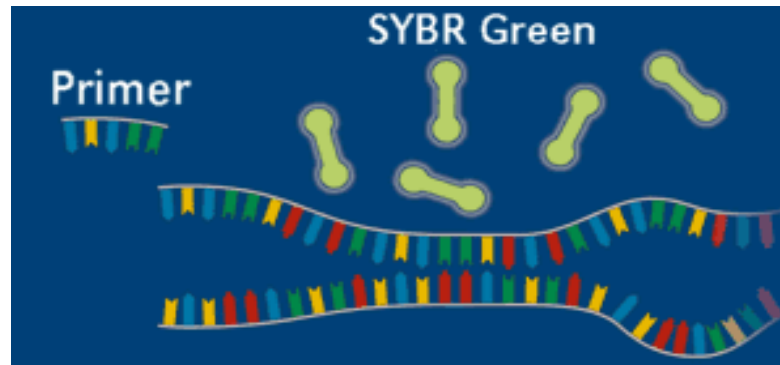
- acuratețea reacției de amplificare
- amplificare monitorizată în timp real
- metode de detecție mult mai sensibile
- domeniu de linearitate mult extins (sunt necesare mai puține diluții ale probelor)
- limita inferioară de detecție mult îmbunătățită

DEZAVANTAJE:

- Consumul de timp
- Posibilitatea contaminării

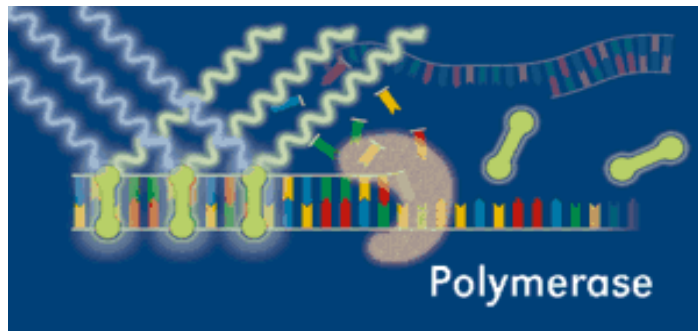
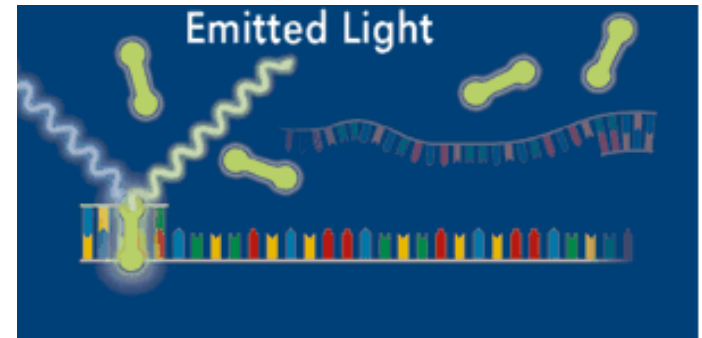
Polymerase Chain Reaction (PCR)

- compusul fluorescent SYBR green se leagă la cavitatea minoră a ADN dublu catenar
- fluorescența crește după legarea la ADN



- la începutul amplificării, amestecul de reacție conține ADN denaturat, primeri și molecule SYBR green
- moleculele nelegate produc un semnal fluorescent minim

Dupa legarea primerilor, câteva molecule fluorescente se pot lega la ADN, rezultând o creștere a emiterii de lumină de către moleculele SYBR green I



In timpul elongării, din ce în ce mai multe molecule se leagă la ADN nou sintetizat

Dacă reacția este monitorizată continuu, se observă în timp real o creștere a fluorescenței

Reacția de polimerizare în lanț – Real Time - PCR

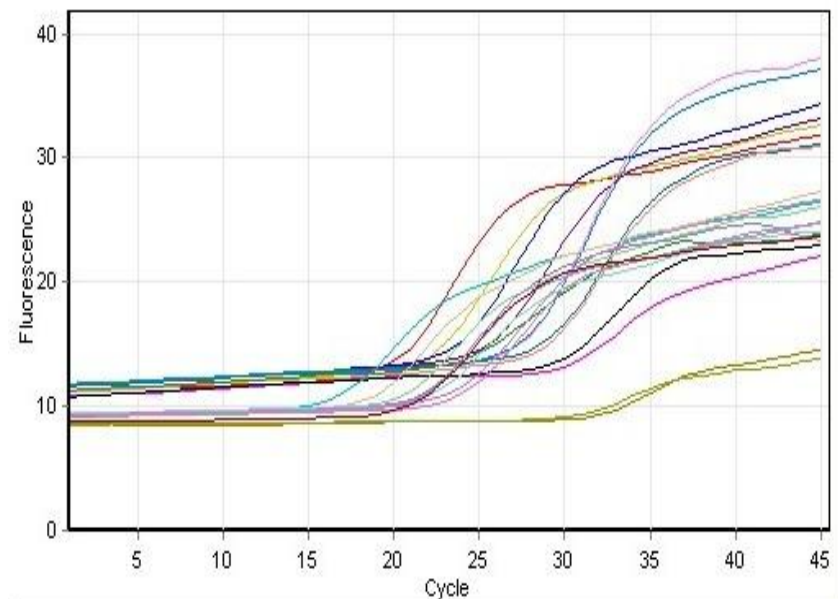
Metoda este complet automatizată și necesită un thermocycler special, echipat cu o cameră sensibilă care monitorizează fluorescența la intervale frecvente în timpul reacției RT-PCR.



Reacția de polimerizare în lanț – Real Time - PCR

Curbă standard obținută din materiale cu
concentrație cunoscută;
Materiale de referință certificate;
Amplificarea a două ținte:
Transgena
Gena specifică formei sălbatice

Raw Data For Cycling A.Green



Procentul de material transgenic

Reprezintă raportul dintre cantitatea de ADN transgenic și cantitatea de ADN endogen

ADN transgenic % = gena țintă / gena de referință x100

Sample	Transgene Copy Number	Endogenous copy number	% GMO
Unknown 1	1853	87500	2.12
Unknown 2	654	73280	0.89
Unknown 3	312	93989	0.33

AUTENTICITATEA PRODUSELOR ALIMENTARE

Adulterări deliberate în scop economic le întâlnim:

- În industria lactatelor, ex: înlocuirea laptelui de oaie cu cel de vacă;
- În industria cărnii, ex: înlocuirea cărnii de vita cu carne de cal;
- În cazul produselor cu denumire de origine controlata (reglementări la nivel European)

Ce pot influența adulterările produselor alimentare?

- Sănătatea (alergeni)
- Dieta (valoare nutrițională)
- Religia (absența porcului)
- Stilul de viață (persoane vegetariene, preferințe pentru produse bio)

II. Detectia și identificarea falsurilor din carne și produse din carne.

- Controlul calității produselor alimentare de origine animală abordează aspecte legate de calitatea cărnii/produselor din carne din punct de vedere al consumatorului, al societății și îmbunătățirea calității și siguranței alimentelor
- O altă problemă socio-economică, cu impact major în bugetele familiale, în special în condițiile economice actuale, este garantarea unor produse sigure și protecție împotriva practicilor comerciale neloiale, a fraudelor alimentare, care îmbracă o importanță capitală pe piața de retail.

Detecția și identificarea falsurilor din carne și produse din carne.

- În condițiile în care achiziționarea bunurilor alimentare absoarbe o parte substanțială din veniturile consumatorilor, în special a persoanelor cu venituri mici care constituie grupa cea mai vulnerabilă, asigurarea unor alimente sigure, constituie o prioritate maximă, iar raportul preț/calitate trebuie să fie în favoarea calității.
- Tehnicile de biologie moleculară vin în întâmpinarea acestor probleme, reprezentând o metodă de control a calității produselor alimentare.

METODE UTILIZATE ÎN IDENTIFICAREA DE SPECII

Anatomice
Histologice
Microscopice
Organoleptice

} convenționale

Imunologice
Electroforetice
Cromatografice

} analitice

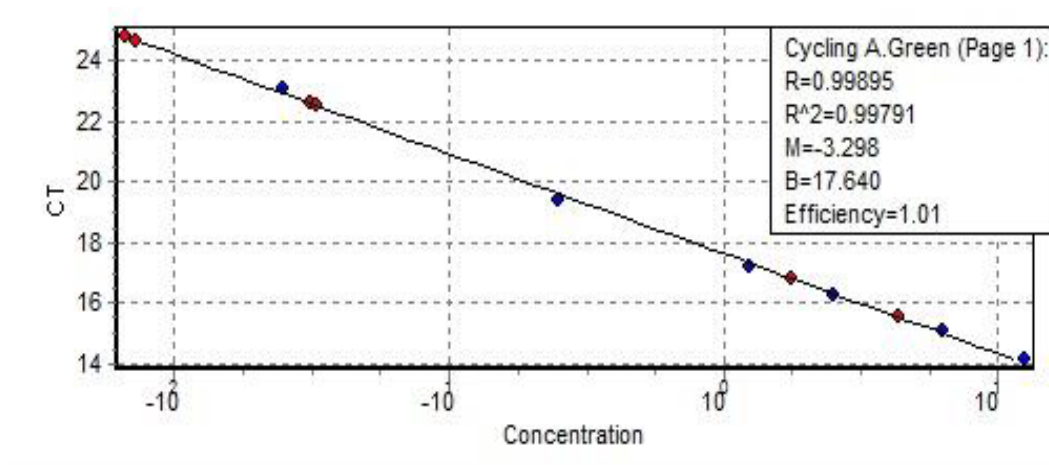
TEHNICILE DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

- Identificarea se realizează prin metode bazate pe ADN
- Mai sigure (ADN prezintă stabilitate la temperaturi ridicate, presiune și tratament chimic)
- Real Time PCR (cea mai populară metodă)
- Reproductibilitate și specificitate mari

TEHNICILE DE BIOLOGIE MOLECULARĂ PERMIT IDENTIFICAREA FALSURILOR CARE VIZEAZĂ:

- comercializarea altor specii decât cea declarată;
- substituirea, în conservele de carne, a unui tip de carne cu altul;
- substituirea cărnii cu derivatele de soia și amidonuri peste limita legală;
- conținutul de carne de bună calitate.

DETECȚIA ADN DE CAL DIN PRODUSE DE CARNE



Se poate realiza și pentru:

- Porc
- Vită
- Pui
- Curcan
- Măgar
- Catâr, etc

III. DETECTIA, IDENTIFICAREA SI CUANTIFICAREA MICROORGANISMELOR PATOGENE DIN PRODUSE ALIMENTARE

ISTORIE:

La începutul anilor 1900 mâncarea, apa și laptele contaminate au fost cauza multor boli;

Revoluție sanitară:

- Tratarea apei potabile (inclusiv canalizarea)
- Spălatul pe mâini
- Pasteurizarea laptelui- 1908
- Refrigerarea alimentelor la domiciliu- 1913
- Regulii stricte în cazul procesării carcaselor de animale din abatoare
- Legi referitoare la manipularea alimentelor

Intoxicația vs Infecția alimentară

- Intoxicația alimentară: cauzată de o endotoxină secretată de bacteria prezentă în alimentul contaminat

- Infecția alimentară: cauzată de ingerarea bacteriei vii, care colonizează tractul digestiv

Cele mai frecvente boli cauzate de microorganisme patogene:

- **Botulism** (*Clostridium botulinum*)
- **Febra Tifoidă** (*Salmonella typhi*)
- **Salmoneloze**
- **Shigeloze**
- **Holeră** (*Vibrio cholerae*)
- Boli asociate cu *E. Coli*
- **Camphylobacterioze si helicobacterioze**

Metodele utilizate în detecția microorganismelor patogene trebuie:

- Să fie rapide
- Să detecteze microorganismul patogen dorit
- Să fie sensitive la o cantitate mică de microorganism
- Să fie cantitative
- Să fie capabile să detecteze mai mult de un contaminant în același timp

VA MULTUMESC PENTRU ATENTIE !!!