

Utilizarea materialelor de referință certificate pentru cuantificarea OMG în raportul numărului de copii de ADN

Noiembrie 2007

Autor: Philippe Corbisier

Comisia Europeană – Centrul Comun de cercetare

Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgia

E-mail: philippe.corbisier@ec.europa.eu

www.erm-crm.org

Prezenta notă de aplicare cuprinde orientări cu privire la utilizarea corectă a materialelor europene de referință certificate în ceea ce privește raportul numărului de copii MG (modificate genetic) corespunzătoare unui eveniment specific de MG. Datele prezentate mai jos se referă în special la utilizarea materialelor de referință certificate ERM-BF413d și ERM-AD413 și a materialelor de referință care vor fi certificate ulterior pentru raportul numărului de copii.

INTRODUCERE

CCC-IRMM a dezvoltat recent două tipuri noi de materiale de referință certificate (MRC), care permit aplicarea adecvată a Recomandării (CE) 787/2004 [1] prin utilizarea unui sistem de trasabilitate metrologică. Această notă cuprinde instrucțiuni cu privire la modul de aplicare a noilor MRC.

CARACTERISTICILE NOILOR MRC PENTRU OMG

A. Noile MRC matrice pentru OMG

Valorile certificate se bazează pe două unități de măsură diferite. În afară de o valoare certificată a fracției masice a unui eveniment special de modificare genetică (a se vedea nota de aplicare 4) noul MRC este certificat pentru raportul numărului de copii de ADN. Acest parametru, exprimat în procente (%), se calculează după cum urmează:

$$\text{raport nr. copii ADN } [\%] = \frac{\text{nr. copii ADN MG } [\text{cp}]}{\text{nr. copii ADN specific taxonului țintă } [\text{cp}]} \times 100$$

Certificarea se bazează pe măsurile QRT-PCR (PCR cantitativă în timp real). Aceste măsuri se calibrează cu ajutorul unui ADN plasmidic specific, certificat ca conținând o copie a secvenței MG și o copie a secvenței specifice a taxonului țintă per plasmidă (a se vedea partea B de mai jos).

Prin urmare, raportul numărului de copii al ADN-ului porumbului MG se raportează direct la evenimentul de MG analizat. Mai mult, în exemplul de mai jos, MRC ERM-BF413d ar trebui să fie utilizat numai în combinație cu materialul plasmidic de calibrare ERM-AD413 și cu metoda de detectare MON 810 [2] specifică evenimentului. Raportul certificat al numărului de copii de ADN al MON 810 (0,57%) este diferit de fracția masică certificată (10,0 g/kg sau 1,0 %), dat fiind faptul că raportul certificat al numărului de copii al MON 810 ține seama de zigozitatea, de ploidia și de procesul de endoreduplicare a semințelor utilizate pentru a produce acest material.

MRC matrice servește la controlarea calității procedurilor analitice, inclusiv extragerea și purificarea ADN-ului și etapele de măsurare ale PCR corespunzătoare unui eveniment specific de modificare genetică.

B. Noile MRC plasmidice pentru OMG

Materialele de calibrare certificate conțin un fragment determinat de ADN specific unei modificări genetice, precum și un fragment definit de ADN specific taxonului analizat. Această plasmidă conține un fragment de 170 de perechi de bază (pb) la joncțiunea MON 810 5' plant-P35S și un fragment de 351 pb ale genei grupului de înaltă mobilitate endogenă (*hmg*) al porumbului. Valorile certificate corespund numărului de copii MG clonate și, respectiv, numărului de fragmente de ADN specific taxonului per plasmidă. Raportul dintre aceste numere are o valoare indicativă, obținută prin PCR duplex și PCR simplex în timp real.

UTILIZAREA MATERIALULUI PLASMIIDIC DE CALIBRARE PENTRU OMG

Materialul de calibrare trebuie utilizat în combinație cu o metodă QRT-PCR determinată [1].

Fiecare material de calibrare se livrează pe gheață carbonică, într-un tub de plastic închis, și se păstrează la -20°C până în momentul utilizării. Într-o primă fază, conținuturile trebuie decongelate și amestecate. După deschiderea tubului, amestecurile trebuie diluate sub un flux laminar, pentru a reduce riscul de contaminare. Fiecare tub conține aproximativ 2×10^6 copii (cp) de plasmidă per μL , iar volumul inițial recomandat pentru seria de diluție este de 50 μL . Protocolul de diluare indicat pe certificat trebuie urmat. Soluția tampon de diluare nu este furnizată.

Seria de diluție trebuie să fie întotdeauna proaspăt pregătită, iar orice exces trebuie aruncat în tuburi închise. Seria de diluție se utilizează pentru stabilirea a două curbe de calibrare (CC), (una pentru transgenă și una pentru gena specifică taxonului), fiecare având 5 puncte, fiecare punct făcând obiectul a trei măsurători în cursul PCR (a se vedea exemplul). În fiecare tub există suficient material de calibrare pentru stabilirea a 10 CC pentru fiecare dintre cele două ținte, ceea ce înseamnă că pot fi cuantificate în total între 100 și 250 eşantioane cu un singur tub. Pentru QRT-PCR se recomandă prelevarea unui eşantion de 5 μL de matriță ADN pentru fiecare sondă PCR.

Pentru a genera cele două CC, valorile pragurilor de fluorescență măsurate (valorile Ct) trebuie reprezentate grafic împreună cu cele ale numărului teoretic de copii din ambele fragmente. Aceste CC sunt utilizate pentru cuantificarea țintei MG în raport cu ținta specifică taxonului într-un eşantion necunoscut. Rezultatele pot fi apoi calculate ca raportul dintre cele două ținte și

exprimate ca procentaj, în conformitate cu Recomandarea (CE) 787/2004. Un control de calitate intern al rezultatelor PCR se poate realiza prin calcularea raportului mediu al valorilor Ct măsurate pentru ținta specifică taxonului și ținta transgenică, pentru punctele de calibrare care corespund unui număr de 2 000 cp/μL. Acest raport trebuie să

corespundă valorii de 1,04% (incertitudine extinsă 0,06%) în cazul unei PCR simplex, astfel cum se indică în raportul de certificare (a se vedea, de asemenea, Nota de aplicare 1 a ERM).

EXEMPLU

ADN-ul genomic extras dintr-un eșantion necunoscut și din ERM-BF413d, utilizat ca material de control al calității, este analizat prin QRT-PCR, ERM-AD413 fiind utilizat drept material de calibrare. Valorile Ct se obțin pentru materialul de calibrare ERM-AD413 după amplificarea fragmentelor *hmg* și MON 810 (Tabelul 1). Valorile Ct medii pentru eșantionul necunoscut – 32,76 și 25,44 – se obțin pentru amplificarea fragmentelor MON 810 și respectiv *hmg*. În ceea ce privește materialul de control al calității, valorile Ct medii de 31,22 și 22,20 se obțin pentru fragmentele MON 810 și respectiv *hmg*.

Pentru a calcula conținutul de MON 810 din cele două eșantioane, pantele și intersecțiile cu axa Y ale celor două curbe de calibrare trebuie determinate printr-o dreaptă ca model cu funcție liniară care să constituie cea mai bună corelare. Pentru a calcula pantele și intersecțiile cu axa Y, se pot folosi modulele disponibile în programul

Microsoft®Excel sau în orice alt software de calibrare/determinare disponibil.

Pantele (*b*) ale celor două linii de regresie se pot calcula cu

ajutorul formulei:
$$b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$$
, unde *x*

reprezintă numărul de copii ale fragmentului amplificat, iar *y* reprezintă valoarea Ct corespunzătoare. Pantele curbilor de calibrare ale fragmentelor *hmg* și MON 810 prezentate în Tabelul 1 sunt de -3,25 și respectiv -3,32. Punctele de intersecție cu axa Y, notate cu (*a*), ale liniilor de regresie se calculează cu ajutorul formulei: $a = \bar{y} - b\bar{x}$, unde $\log(\bar{x}) = 0$. În exemplul nostru, valorile *a* pentru liniile de regresie *hmg* și MON 810 sunt de 39,26 și respectiv 40,93. Aceste valori reprezintă valorile Ct teoretice corespunzătoare unei copii din fiecare din cele două fragmente. Panta servește la calcularea eficienței PCR (*ε*) cu ajutorul formulei: $\epsilon = (10^{-1/b} - 1) \cdot 100$. În exemplul de față, eficiențele PCR au fost egale cu 99,7% și 103,1% pentru amplificarea fragmentelor de MON 810 și, respectiv, a fragmentelor

hmg. Numărul de copii de MON 810 prezente în eșantionul necunoscut se calculează ca: $cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}} \right)}$, unde Ct_{MON810} , a_{MON810} și b_{MON810} reprezintă valoarea Ct, a punctelor de intersecție cu axa Y și a pantei obținute pentru amplificarea MON 810. Același calcul se realizează pentru determinarea numărului de copii ale fragmentului *hmg*, după formula:

$cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}} \right)}$. În exemplul nostru, media estimată a numărului de copii de fragmente MON 810 și *hmg* prezente în eșantionul necunoscut este de 289 și respectiv 17 878 cp. Conținutul de MON 810 al eșantionului necunoscut exprimat în procente este, prin urmare, egal cu: $\frac{289}{17878} \cdot cp_{MON810} \cdot 100 = 1,62\%$. Același calcul se efectuează pentru materialul de control al calității, care conține:

$\frac{841}{177513} \cdot cp_{MON810} \cdot 100 = 0,47\%$ MON 810. Ținând seama de incertitudinea asociată ERM-BF413d și de incertitudinea măsurătorilor (a se

vedea Nota de aplicare 1 a ERM), se poate verifica dacă valoarea măsurată corespunde valorilor certificate ale ERM-BF413d. În exemplul prezentat anterior, raportul de 1,05 al valorilor Ct medii obținut pentru 10 000 cp (5 μL de ERM-AD413 la 2 000 cp/μL) corespunde valorii indicative de 1,04 ± 0,06 raportate în certificatul ERM-AD413, ceea ce înseamnă că această cuantificare MG a fost sub control.

[1] Recomandarea (CE) nr. 787/2004 a Comisiei Europene din 4 octombrie 2004 privind cadrul general tehnic în materie de eșantionare și detectare a organismelor modificate genetic și a materialului obținut din organisme modificate genetic ca și produse sau în compoziția acestora, în contextul Regulamentului (CE) nr. 1831/2003 (Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L 348, 2004, pp. 18-26).

[2] ISO 21570:2005 *Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic based methods. Annex D2 Event-specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR. 93-99*. (Produse alimentare – Metode de analiză pentru detectarea organismelor modificate genetic și a produselor derivate – Metode cantitative bazate pe utilizarea acidului nucleic. Anexa D2 Metodă specifică evenimentului considerat pentru cuantificarea relativă a ADN-ului din varietatea de porumb MON 810 prin metoda PCR în timp real) 93-99.

[†] În cazurile în care valorile Ct pentru NTC sunt diferite de numărul de cicluri de PCR efectuate, trebuie suspectată o contaminare încrucișată sau o amplificare nespecifică.

Numărul total de copii ale fragmentului MON 810	Valorile Ct măsurate			Valoarea Ct medie
	măsur. 1	măsur. 2	măsur. 3	
50000	25,3	25,19	25,15	25,21
10000	27,57	27,62	27,66	27,62
1000	31,19	30,89	31,14	31,07
100	33,99	35,12	34,8	34,64
25	35,79	35,67	36,37	35,95
NTC	45	45	45	45
Numărul total de copii ale fragmentului <i>hmg</i>				
500000	20,76	20,67	20,63	20,69
100000	22,92	23	23,04	22,99
10000	26,39	26,36	26,33	26,36
5000	27,31	27,29	27,37	27,32
1000	29,38	29,19	29,57	29,38
NTC	45	45	45	45

Tabelul 1: Exemplu de valori Ct experimentale obținute cu ajutorul materialului de calibrare ERM-AD413. NTC[†] = eșantion de control fără etalon.