

Používanie certifikovaných referenčných materiálov pri kvantifikácii GMO pomerom počtu DNA kópií

Táto poznámka k používaniu slúži ako návod na správne používanie európskych referenčných materiálov s certifikovaným pomerom počtu GM (geneticky modifikovaných) kópií určitých GM. Uvedené podrobnosti sa odvolávajú na použitie CRM (certifikovaných referenčných materiálov) ERM-BF413d a ERM-AD413 a pripravovaných CRM s certifikovaným pomerom počtu kópií.

Autor: Philippe Corbisier

European Commission - Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium
Email: philippe.corbisier@ec.europa.eu
www.erm-crm.org

ÚVOD

JRC-IRMM nedávno vyvinul dva nové typy GMO certifikovaných referenčných materiálov (CRM), ktoré umožňujú správne vykonávanie odporúčania (ES) 787/2004 [1] s použitím metrologicky sledovateľného systému. Táto poznámka poskytuje pokyny, ako sa majú nové CRM používať.

CHARAKTERISTICKÉ ČRTY NOVÝCH GMO CRM

A. Nová GMO matrica CRM

Certifikované hodnoty sú založené na dvoch rozdielnych meraciach jednotkách. Spolu s certifikáciou na hmotnostný obsah špecifickej genetickej modifikácie (pozri poznámku k používaniu 4) je tento nový CRM certifikovaný aj na pomer počtu kópií DNA. Tento parameter vyjadrený v % sa vypočítava nasledovne:

$$\text{pomer počtu DNA kópií} [\%] = \frac{\text{počet kópií GM DNA} [\text{cp}]}{\text{počet kópií taxonomicky špecifickej DNA} [\text{cp}]} \times 100$$

Certifikácia je založená na meraniach QRT-PCR (kvantifikácii PRC v reálnom čase). Tieto merania sú kalibrované s použitím určeného kalibrantu plazmidu DNA, ktorý je certifikovaný, že obsahuje jednu kópiu GM a taxonomicky špecifickej cieľovej sekvencie na plazmid (pozri časť B).

Preto sa pomer počtu kópií GM DNA kukurice priamo viaže na analyzované špecifické GM. Navyše v ďalej uvedenom príklade sa CRM ERM-BF413d môže použiť len spolu s CRM-AD413 ako kalibrantom ERM-AD413 a to len v prípade špecifickej detekčnej metódy MON 810 [2]. Certifikovaný pomer počtu DNA kópií MON 810 (0,57 %) sa odlišuje od certifikovaného podielu frakcie (10,0 g/kg alebo 1,0 %), pokiaľ sa zohľadní v pomere počtu kópií MON 810 zygotnosť, ploidita a stav endoreduplikácie osiva použitého na výrobu tohto materiálu.

Matrica CRM je určená na kontrolu kvality analytických postupov vrátane extrakcie DNA a purifikácie, ako aj postupu merania PCR pre určité prípady GM.

B. Nový CRM GMO plazmidu

Certifikované kalibranty obsahujú definované fragmenty DNA špecifické pre genetickú modifikáciu, ako aj definované fragmenty DNA špecifické pre analyzovaný taxón. Tento plazmid obsahuje 170 základných párových (bp) fragmentov z MON 810 5' kríženia *plant-P35S* a 351 bp fragmentov kukurice endogénnej skupiny génov vysokej mobility (*hmg*). Tieto certifikované hodnoty vychádzajú z počtu fragmentov DNA klonovaných GM a počtu fragmentov DNA špecifických pre taxón na plazmid. Pomer týchto dvoch počtov fragmentov DNA je uvedený, ako indikatívna hodnota získaná z duplexu a simplexu PCR v reálnom čase.

VYUŽITIE KALIBRANTA GMO PLASMIDU

Tento kalibrant sa musí použiť v prípade definovanej QRT-PCR metódy [1].

Každý kalibrant sa dodáva v suchom ľade v uzavretej plastickú nádobu a má sa udržiavať pri teplote -20 °C až do použitia. Obsahy sa musia najprv rozmraziť a potom premiešať a nakoniec otvoriť a zriediť pod laminárnym prúdením, aby sa obmedzilo riziko kontaminácie. Každá nádoba obsahuje priemerne 2×10^6 kópií (cp) plazmidu na μL a odporúčaný počiatočný objem na zriedenie je 50 μL . Na riedenie treba dodržať protokol riedenia uvedený na certifikáte. Tlmivý roztok sa nedodáva.

Séria zriedených roztokov sa pripravuje vždy čerstvá a akýkoľvek prebytok sa odstraňuje v uzavretých nádobách. Séria zriedených roztokov sa použije na prípravu dvoch kalibračných kriviek (KK), jedna KK pre transgénne a jedna KK pre špecifické gény pre taxón, každá s 5 bodmi, každý bod meraný trojnásobne v PCR reakcii (pozri príklad). Jedna nádoba obsahuje dostatok kalibrantu na prípravu 10 KK na obidva účely, čo znamená, že celkovo sa môže kvantifikovať 100 až 250 vzoriek z jednej nádoby. Odporúčaný objem vzorky na QRT-PCR je 5 μL vzorovej DNA na PCR zdroja.

Namerané fluorescenčné hraničné hodnoty (C_t hodnoty) musia byť v závislosti od teoretického počtu kópií obidvoch fragmentov na generovanie dvoch KK. Tieto KK sa používajú na kvantifikáciu materiálu špecifického pre taxón v neznámej vzorke. Výsledky možno vypočítať ako pomer obidvoch materiálov a možno ho vyjadriť v percentách podľa odporúčania (ES) 787/2004. Vnútná skúška kvality

(QC) PCR sa môže vykonať výpočtom priemerného pomeru meraných Ct hodnôt materiálov špecifických pre taxón a transgénnych materiálov pre kalibračné body zodpovedajúce 2000 cp/μL. Tento pomer by mal zodpovedať 1,04 % (rozšírená neurčitost' 0,06

%) pre simplexnú PCR, ako sa uvádza v certifikačnej správe (pozri tiež ERM Poznámka k používaniu 1).

PRÍKLAD

Genomická DNA extrahovaná z neznámej vzorky a z ERM-BF413d použitej ako QC materiál sa analyzuje pomocou PCR, pričom sa ERM-AD413 použije ako kalibrant. Ct hodnoty sa získajú za ERM-AD413 kalibrant po amplifikácii *hmg* a MON 810 fragmentov (Tabuľka 1). Priemerné Ct hodnoty neznámej vzorky, hodnoty 32,76 a 25,44 sa získali po amplifikácii MON 810 a *hmg* fragmentov. Za QC materiál, priemerné Ct hodnoty 31,22 a 22,20 sa získali za MON 810 a *hmg* fragmenty.

Aby sa vypočítal obsah MON 810 v obidvoch vzorkách, je potrebné určiť smernice a priesečníky týchto dvoch KK s osou y, pričom sa predpokladá, že priamka najlepšie vyhovuje modelovej funkcii. Na výpočet smerníc a priesečníkov KK s osou y možno využiť zabudované moduly programu Microsoft®Excel alebo akýkoľvek iný dostupný kalibračný/determinačný softvér.

Smernice (b) obidvoch lineárnych regresných priamok možno vypočítať pomocou vzorca:

$$b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$$

kde x predstavuje počet kópií amplifikovaného fragmentu a y predstavuje zodpovedajúcu hodnotu Ct. Smernice kalibračných kriviek *hmg* a MON 810 fragmentov uvedené v Tabuľke 1 sú -3,25 a -3,32.

Priesečníky lineárnych regresíí (a) s osou y sa vypočítajú s použitím vzorca: $a = \bar{y} - b\bar{x}$ keď $\log(x) = 0$. V našej vzorke a-hodnoty *hmg* a MON 810 regresných priamok sú 39,26 a 40,93. Tieto hodnoty predstavujú teoretické Ct hodnoty zodpovedajúce 1 cp obidvoch fragmentov. Smernica slúži na výpočet účinnosti PCR (ε) pomocou vzorca: $\epsilon = (10^{-1/b} - 1) * 100$. V našom prípade sa účinnosť PCR rovnala 99,7 % a 103,1 % za amplifikátory MON 810 a *hmg* fragmenty.

Počet kópií(cp) MON 810 v neznámej vzorke sa vypočíta ako: $cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}}\right)}$, kde Ct_{MON810} , a_{MON810} a b_{MON810} sú Ct hodnoty, priesečník s osou y a smernica získané pre amplifikáciu MON 810. Ten istý výpočet sa vykoná

na určenie počtu kópií *hmg* fragmentov pomocou vzorca: $cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}}\right)}$. V našom prípade sa odhaduje priemerný počet kópií MON810 a *hmg* fragmentov v neznámej vzorke 289 a 17878 cp. Obsah MON 810 v neznámej vzorke vyjadrený v percentách sa teda rovná: $\frac{291}{17834} \cdot cp_{MON810} * 100 = 1.63 \%$. Ten istý výpočet sa vykoná za QC materiál

obsahujúci MON 810: $\frac{836}{177205} \cdot cp_{MON810} * 100 = 0.47 \%$. Zohľadnením neistoty spojenej s ERM-BF413d a neistoty merania

(pozri ERM Poznámka k používaniu 1), možno overiť, či nameraná hodnota súhlasí s certifikovanými hodnotami ERM-BF413d. Vo vyššie uvedenom prípade je pomer priemerných Ct hodnôt 1,05 na 10000 cp (5 μL z ERM-AD413 pri 2000 cp/μL) v súlade s indikatívnou hodnotou $1,04 \pm 0,06$ uvedenou na certifikáte ERM-AD413, znamená to, že táto kvantifikácia GM prešla kontrolou úspešne.

[1] Odporúčanie Komisie č. 787/2004 zo 4. októbra 2004 o technických usmerneniach pre odber vzoriek a určovanie geneticky modifikovaných organizmov a materiálov vyrobených z geneticky modifikovaných organizmov ako výrobkov alebo vo výrobkoch, v súvislosti s nariadením (ES) č. 1830/2003. Ú. v. EÚ L 348 (2004) s. 18-26.

[2] ISO 21570:2005 Potraviny – Metódy analýz na stanovenie geneticky modifikovaných organizmov a derivovaných produktov – Kvantitatívne metódy stanovenia kyseliny nukleovej. Príloha D2 Viazané špecifické metódy na relatívnu kvantifikáciu kukurice MON 810 DNA s použitím PCR v reálnom čase. 93-99.

¹ Pokiaľ sa Ct hodnoty pre NTC odlišujú pre hodnoty PCR vykonaných cyklov, možno predpokladať krížové znečistenie alebo nešpecifické zosilnenie.

Celkový počet cp fragmentov MON 810	Namerané Ct hodnoty			priemer Ct
	replikácia 1	replikácia 2	replikácia 3	
50000	25,30	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	34,80	34,64
25	35,79	35,67	36,37	35,95
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00

Celkový počet cp fragmentov <i>hmg</i>	Namerané Ct hodnoty			priemer Ct
	replikácia 1	replikácia 2	replikácia 3	
500000	20,76	20,67	20,63	20,69
100000	22,92	23,00	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	45,00	45,00	45,00	45,00

Tabuľka 1: Príklad experimentálnych Ct hodnôt získaných s použitím ERM-AD413 ako kalibrantu. NTC = nekontrolovaná predloha.