

Anvendelse af certificerede referencematerialer til kvantificering af GMO i fødevarer og foder

Der udstikkes retningslinjer for korrekt anvendelse af IRMM's referencematerialer, der er certificeret for deres GM-massefraktion (GM = genetisk modificeret) af en specifik GM-event.

Der henvises i de nedenfor angivne oplysninger særligt til anvendelsen af CRM'erne ERM-BF410, ERM-BF411, ERM-BF412, ERM-BF413, ERM-BF414, ERM-BF415, ERM-BF416, ERM-BF417, ERM-BF418 og ERM-BF423.

INDLEDNING

I henhold til forordning (EF) nr. 1830/2003 skal fødevarer og foder, der består af eller indeholder mere end 0,9 % genetisk modificerede organismer (GMO'er), være mærket, forudsat at GMO'en er markedsført på det europæiske marked i overensstemmelse med fællesskabslovgivningen. Derfor skal kvantificering af GM i sådanne produkter foretages på pålidelig vis. Passende certificerede referencematerialer (CRM'er) er uundværlige kvalitetssikringsværktøjer til dette formål.

KARAKTERISTIKA FOR GMO-CRM

De certificerede værdier af de ovenfor anførte CRM'er er baseret på masserne af tørret pulver af genmodificeret frø og ikke-genmodificeret frø, der er anvendt i den gravimetrisk fremstilling. Masserne er korrigeret for deres vandindhold og anslåede renhed. GM-massebrøken beregnes som:

$$\frac{\text{korrigeret masse - GM - pulver}}{\text{korrigeret masse - GM - pulver} + \text{korrigeret masse - ikke - GM - pulver}}$$

Hvert GMO-CRM er certificeret til en massebrøk af en specifik genetisk modifikations-event (som angivet på certifikatet). Derfor kan CRM'et kun anvendes til at kvantificere den event, der er angivet på certifikatet, og det tilsvarende blindmateriale kan kun anvendes til at bevise, at denne event ikke er indtruffet under den tærskel, som er angivet på certifikatet.

ERM[®] - BF418c

| TØRRET MAJSPULVER | | |
|-------------------|--|--------------------------------------|
| | Massefraktion | |
| | Certificeret værdi ¹⁾ [g / kg] | Usikkerhed ²⁾ [g / kg] |
| 1507- majs | 9,9 | -0,6; +0,8 |

1) Den certificerede værdi er baseret på massefraktionen af tørret ikke-genetisk modificeret pulver og tørret genetisk modificeret pulver, der er blandet og korrigeret for vandindholdet. Den certificerede værdi er sporbar til SI'et.

2) Den certificerede usikkerhed er en udvidet usikkerhed, der er estimeret i overensstemmelse med Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) med en dækningsfaktor $k = 2$, svarende til et konfidensniveau på 95 %.

Figur 1: Del af certifikatet for GM-CRM-ERM-BF418c.

GMO-CRM'er, der for nyligt er frigivet af IRMM, er certificeret med et asymmetrisk usikkerhedsområde. Hvis et sådant CRM anvendes til afvigelseskontrol (se ERM Application Note 1), skal 'plususikkerheden' anvendes i tilfælde, hvor det gennemsnitlige måleresultat er højere end den certificerede værdi, og 'minususikkerheden' skal anvendes i tilfælde, hvor det gennemsnitlige måleresultat er lavere end den certificerede værdi.

ANVENDELSE AF REALTIME-PCR

Realtime-polymerasekædereaktion (rt-PCR) anvendes ofte til kvantificering af GM-fraktioner i fødevarer og foderprøver. Med denne DNA-baserede kvantificeringsteknik måles forholdet mellem transgent DNA, dvs. DNA som er afledt af den genetiske modifikation, og endogent DNA, som er specifikt for de biologiske arter.

Da de forskellige dele af enkimbladede planters frø (f.eks. majsfrøhvide, -frøskal og -kim) ikke har samme genetiske sammensætning, er DNA-forholdet i referencematerialet ikke nødvendigvis det samme som masseforholdet i det certificerede pulver. Dermed er forholdet mellem ekstraherbart transgent DNA og ekstraheret endogent DNA ikke nødvendigvis lig med forholdet mellem GM-majsmassen og den samlede majs masse, selv om begge DNA'er har sammenlignelige ekstraktionsudbytter.

Under fremstillingen af GMO-CRM'er har man især bestræbt sig på at sikre, at GM- og ikke-GMO-pulverne ligner hinanden med hensyn til partikelstørrelsesfordeling. Det er især vigtigt af hensyn til mængden af ekstraherbart DNA i begge pulvere. Forskellige DNA-ekstraktionseffektiviteter for GM- og ikke-GM-pulver ville påvirke den GM-koncentration, som måles ved rt-PCR. Derfor må der kun anvendes ekstraktionsmetoder, som er valideret til at opfylde dette krav.

Under certificering kontrolleres CRM'ets GM-massebrøk ved hjælp af en event-specifik rt-PCR-metode. Der skal imidlertid udvises forsigtighed med hensyn til at drage kvantitative konklusioner på baggrund af målinger af ukendte prøver, eftersom den DNA-baserede GM-kvantificering kan variere efter, hvilken sort der testes. Hvis denne ikke er tilgængelig andetsteds, anbefales

det at undersøge virkningen af forskellige sorter på rt-PCR-resultaterne under en intern validering [1].

Realtime-PCR-detektionsmetoder, der er forelagt og valideret i henhold til bestemmelserne i forordning (EF) nr. 1829/2003, er tilgængelige for offentligheden via hjemmesiden for EF-referencelaboratoriet for GM-fødevarer og -foder (<http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>).

RESULTATER UDTRYKT I RELATIVE ANTAL DNA-KOPIER

I Europa er den oftest anvendte metodik til GMO-quantificering rt-PCR, og derfor foreslås det i en nylig henstilling fra Kommissionen (2004/787/EF), at måleresultater for GM-prøver udtrykkes som antallet af DNA-kopier. Hvis der til kalibrering af målinger anvendes GMO-CRM'er, som er certificeret med hensyn til deres GM-massebrøk, og hvis det endelige resultat udtrykkes i relative antal kopier, må man være opmærksom på, at majs-CRM'erne er fremstillet under anvendelse af GMO-majs, der er heterozygot for transgenet. Oplysninger om zygositeten af de frømaterialer,

der er anvendt til fremstilling af CRM'erne, findes i den tilsvarende certificeringsrapport. Endvidere skal der tages højde for, at det relative GM-kopiantal for majs påvirkes af den måde, hvorpå GMO-hybridsorten er fremstillet, og af frøenes endoreduplikationsstatus, som øger virkningen af genomfordelingen i frøhviden. I de ekstreme tilfælde kan det relative GM-kopiantal enten være 33 % (transgen event, der stammer fra den fader, som blev anvendt til krydsning af det heterozygote frø) eller 66 % (transgen event, der stammer fra den moderplante, som blev anvendt til krydsning af det heterozygote frø) ud fra den antagelse, at endoreduplikation er så stærk, at frøhvidens virkning er tæt på 100 %. Alle andre tilfælde (mindre virkning af endoreduplikation og større virkning fra kimvævet) vil føre til værdier på mellem 33 og 66 %, forudsat at der kan ses bort fra frøskallens virkning sammenlignet med disse effekter.

Nedenfor er anført et eksempel på, hvordan et måleresultat og dets usikkerhed, der er opnået i g/kg, omregnes til relative kopiantal.

EKSEMPEL

Under anvendelse af CRM'er, der er certificeret med hensyn til deres GM-massebrøk, til kalibrering viste en majsprøve sig at indeholde 65 ± 20 g/kg majs-event 1507. Den udvidede måleusikkerhed på 20 g/kg blev beregnet under anvendelse af en dækningsfaktor på 2 og en måleusikkerhed for kvantificeringsmetoden på 15 %, der var skønnet ved en intern validering. For at omregne det resultat, der er opnået for GM-massebrøken, til et forhold mellem kopiantal skal resultatet i g/kg omregnes til procent ved at dividere det med 10. Der skal tages højde for, at de majs-GMO-CRM'er, der anvendes til kalibrering, er fremstillet ud fra heterozygote majsfrø, og derfor skal resultaterne divideres med 2:

$$\frac{\bar{x}}{10 \times 2} = \frac{65}{20} = 3,3 \quad \text{hvor } \bar{x} = \text{det gennemsnitlige GM-indhold fundet i g/kg}$$

Bemærk, at der skal anvendes en korrektionsfaktor i tilfælde, hvor der er observeret en forskellig DNA-ekstraherbarhed for de ikke-GMO- og GMO-basismaterialer, som er blevet anvendt til fremstilling af CRM'erne. Oplysninger om DNA-ekstraherbarhed findes i certificeringsrapporten. Under anvendelse af CTAB blev der fundet et forhold på $0,7 \pm 0,3$ for GMO-pulverets DNA-ekstraherbarhed divideret med ikke-GMO-pulverets. Dermed overvurderes det virkelige GM-indhold i den undersøgte prøve med hensyn til kopiantal, og det skal korrigeres:

$$3,3 * f = 3,3 * 0,7 = 2,3 \quad \text{hvor } f = \text{faktor til korrektion for, at det GMO- og ikke-GMO-pulver, der anvendes som CRM, har forskellig DNA-ekstraherbarhed.}$$

Effekten af endoreduplikation og forædlingen af den heterozygote majs-event skal tages i betragtning i forbindelse med måleresultaternes usikkerhed. Usikkerheden skal dække et område på 33 % (66 % minus 33 %), og den målte værdi kan afvige med 16,5 %. Til estimeringen af kopiantalsforholdet skal det DNA, der er ekstraheret fra den undersøgte majsprøve, kvantificeres, og antallet af majsgenomer skal estimeres. I forbindelse med denne estimering divideres DNA-koncentrationen med majs' genomstørrelse. Derfor skal den usikkerhed, der er forbundet med DNA-quantificeringen, og den usikkerhed, som er forbundet med genomstørrelsesestimeringen, tages i betragtning i usikkerhedsberegningen. I henhold til litteraturen er majsgenomstørrelser kendt for at variere med op til 36 % [2]. Under intern validering blev kvantificeringsmetodens reproducerbarhed bestemt til 22 %. Derfor kan den udvidede kombinerede usikkerhed for resultatet udtrykt i kopiantalsforhold (U_{cc}) beregnes som:

$$U_{cc} = k \sqrt{u_m^2 + u_{gs}^2 + u_{Dq}^2 + u_e^2}$$

$$U_{cc} = 2 \sqrt{15^2 + \left(\frac{18}{\sqrt{3}}\right)^2 + 22^2 + \left(\frac{16,5}{\sqrt{3}}\right)^2} \% = 60\%$$

hvor k = dækningsfaktor

u_m = usikkerhedsbidraget fra metoden til kvantificering af kopiantal

u_{gs} = usikkerhedsbidraget fra estimeringen af genomstørrelse

u_{Dq} = usikkerhedsbidraget fra DNA-quantificeringen

u_e = usikkerhedsbidraget fra forædlingen og endoreduplikationen

Udtrykt i kopiantal indeholder majsprøven $2,3 \pm 1,4$ transgene sekvenser for event 1507 pr. endogen sekvens. Sammenlignet med det resultat, der udtrykkes i 1507-massefraktioner på 65 ± 20 g/kg, er den relative udvidede usikkerhed steget fra 30 til 60 %.

[1] IUPAC Teknisk Rapport (2002): Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis.

[2] Poggio et al., Annals of Botany 85 (1998), 107-115.