

## Wykorzystanie certyfikowanych materiałów odniesienia do ilościowego określenia zawartości GMO w żywności i paszy

Niniejsza nota użytkowa dostarcza wskazówek dotyczących prawidłowego wykorzystania materiałów odniesienia certyfikowanych dla genetycznie zmodyfikowanej części wagowej specyficznej genetycznej modyfikacji, dostarczonych przez Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów (IRMM).

Podane poniżej szczegółowe wskazówki mają zastosowanie w szczególności w przypadku wykorzystania następujących certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM): ERM-BF410, ERM-BF411, ERM-BF412, ERM-BF413, ERM-BF414, ERM-BF415, ERM-BF416, ERM-BF417, ERM-BF418 oraz ERM-BF423

**Autor:** Stefanie Trapmann

Komisja Europejska- Wspólne Centrum  
Badawcze

Instytut Materiałów i Pomiarów Odniesienia  
(IRMM)

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgia

Email: [stefanie.trapmann@ec.europa.eu](mailto:stefanie.trapmann@ec.europa.eu)

[www.erm-crm.org](http://www.erm-crm.org)

### WPROWADZENIE

Rozporządzenie (WE) nr 1830/2003 nakłada wymóg, aby produkty żywnościowe lub paszowe składające się z organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) lub zawierające ponad 0,9% tych organizmów były opatrywane specjalnymi etykietami, o ile dany GMO został wprowadzony do obrotu na rynku Wspólnoty zgodnie z obowiązującymi przepisami. Z tego względu ilościowe oznaczenie zawartości organizmów genetycznie zmodyfikowanych w tego typu produktach musi być przeprowadzane w sposób miarodajny. Odpowiednie certyfikowane materiały odniesienia (CRM) są niezbędnym instrumentem zapewniającym wysoką jakość tego procesu.

### OPIS WŁAŚCIWOŚCI GMO CRM

Wymienione powyżej certyfikowane wartości CRM zostały opracowane w oparciu o masy wysuszonej mączki z nasion genetycznie zmodyfikowanych i wysuszonej mączki z nasion genetycznie niezmodyfikowanych, używanych w wagowym przygotowaniu. Masy te zostały skorygowane pod względem ich zawartości wody oraz oszacowania czystości. Część wagowa genetycznej modyfikacji jest obliczana w sposób następujący:

skorygowana masa genetycznie zmodyfikowanej mączki

skorygowana masa genetycznie zmodyfikowanej mączki + skorygowana masa genetycznie niezmodyfikowanej mączki

Każdy z GMO CRM jest certyfikowany dla części wagowej specyficznej genetycznej modyfikacji (określonej w certyfikacie). W rezultacie CRM może być wykorzystywany jedynie do ilościowego wyrażania modyfikacji określonej w certyfikacie zaś odpowiadająca mu ślepa próba może być wykorzystana jedynie w celu wykazania nieobecności danej modyfikacji poniżej progu określonego w certyfikacie.

### ERM® - BF418c

DRIED MAIZE POWDER		
	Mass Fraction	
	Certified value <sup>1)</sup> [g / kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [g / kg]
1507 maize	9.9	-0.6 ; +0.8

1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected for the water content. The certified value is traceable to the SI.

2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor  $k = 2$ , corresponding to a level of confidence of about 95 %.

Rysunek 1: Fragment certyfikatu GM CRM ERM-BF418c.

Ostatnio opublikowane przez Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów (IRMM) GMO CRM otrzymały certyfikaty z asymetrycznym zakresem niepewności. Jeśli tego typu CRM zostanie wykorzystany do kontroli

polaryzacji (patrz nota użytkowa ERM nr 1), „niepewność dodatnia” powinna być wykorzystywana w przypadku, gdy średnie wyniki pomiaru przekraczają wartość certyfikowaną, zaś „niepewność ujemna” powinna być wykorzystywana w przypadku, gdy średnie wyniki pomiaru są niższe niż wartość certyfikowana.

### POSŁUGIWANIE SIĘ REAKCJĄ ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERYZACJI W CZASIE RZECZYWISTYM

Reakcja łańcuchowej polimeryzacji w czasie rzeczywistym (rt-PCR) jest zazwyczaj wykorzystywana do ilościowego wyrażania części wagowej modyfikacji genetycznych w próbkach żywności i paszy. Ta oparta na DNA metoda kwantyfikacji mierzy stosunek pomiędzy transgenicznym kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA), tj. kwasem pochodzącym z modyfikacji genetycznej oraz DNA endogenicznym, specyficznym dla danego gatunku biologicznego.

Z uwagi na różniący się skład genetyczny różnych części nasion jednoliściennych (np. bielmo, okrywa nasienna i zarodek kukurydzy) wartość stosunku DNA w materiale odniesienia może różnić się od wartości części wagowej certyfikowanej mączki. Z tego względu stosunek poddającego się izolacji transgenicznego DNA i izolowanego endogenicznego DNA niekoniecznie musi być równy stosunkowi masy genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy do całkowitej masy kukurydzy, nawet, gdy oba typy DNA mają podobną wydajność izolacji.

W trakcie przygotowywania GMO CRM dołożono starań, aby mączki genetycznie zmodyfikowane oraz niezmodyfikowane miały podobny rozkład wielkości ziaren. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do ilości poddającego się izolacji DNA w obu typach mączek. Odmienne wydajności izolacji DNA w przypadku mączki genetycznie zmodyfikowanej i niezmodyfikowanej mogą wpływać na wartość stężenia modyfikacji genetycznej mierzonej przy pomocy rt-PCR. Z tego powodu należy posługiwać się jedynie zwalidowanymi metodami w celu spełnienia tego wymogu.

Podczas certyfikacji sprawdza się genetycznie zmodyfikowaną część wagową CRM przy pomocy specyficznej dla danej modyfikacji genetycznej metody rt-PCR. Nie należy jednak wyciągać pochopnych wniosków dotyczących ilości na podstawie pomiarów przeprowadzonych na nieznanach próbkach, ponieważ oparte na DNA ilościowe wyrażenie modyfikacji genetycznych może przyjmować różne wartości w zależności od testowanej odmiany. Jeśli dane nie są dostępne z innych źródeł, zaleca się zbadać, w ramach wewnętrznej walidacji, jaki wpływ wywierają różne odmiany na wyniki rt-PCR [1].

Metody detekcji oparte na rt-PCR, przedstawione i zatwierdzone na mocy przepisów rozporządzenia (WE) nr 1829/2003 są dostępne za pośrednictwem strony

internetowej wspólnotowego laboratorium referencyjnego dla genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy (<http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>).

## WYRAŻENIE WYNIKÓW POMIARU JAKO LICZBY KOPII DNA

W Europie najczęściej stosowaną metodą służącą do ilościowego oznaczenia GMO jest metoda rt-PCR. Z tego powodu w ostatnio opublikowanym zaleceniu Komisji (2004/787/WE) zaproponowano, aby wyrażać wyniki pomiarów na genetycznie zmodyfikowanych próbkach jako liczby kopii DNA. Jeśli stosuje się GMO CRM z certyfikowaną genetycznie zmodyfikowaną częścią wagową w celu kalibracji pomiarów i ostateczny wynik wyraża się jako odpowiednią liczbę kopii, należy pamiętać, że CRM kukurydzy zostały wyprodukowane przy wykorzystaniu kukurydzy genetycznie zmodyfikowanej o heterozygotycznym transgenie. Informacje na temat zygocynności materiału nasiennego wykorzystywanego do produkcji CRM można znaleźć w odpowiednim sprawozdaniu z certyfikacji. Ponadto należy wziąć pod uwagę fakt, że na odpowiednią liczbę genetycznie

zmodyfikowanych kopii w przypadku kukurydzy wpływ wywiera sposób, w jaki wyprodukowano odmianę mieszańcową GMO oraz stan endoreduplikacji chromosomów w nasionach, który z kolei zwiększa wpływ wywierany przez rozkład genomiczny w tkance bielma. Rozważając ekstremalne przypadki, odpowiednia liczba genetycznie zmodyfikowanych kopii może wynosić albo 33 % (wydarzenie transgeniczne w roślinie ojcowskiej użytej w krzyżówce z heterozygotycznym nasieniem) albo 66 % (wydarzenie transgeniczne w roślinie matecznej użytej w krzyżówce z heterozygotycznym nasieniem) przy założeniu, że endoreduplikacja jest tak intensywna, że wpływ wywierany przez bielmo jest bliski 100 %. We wszelkich innych możliwych przypadkach (mniejszy wpływ endoreduplikacji lub większy wpływ tkanki zarodka) wartości zawrą się w przedziale 33 - 66 %, przy założeniu, że w porównaniu do tych skutków, wpływ wywierany przez okrywę nasienną można pominąć. Poniżej podano przykład transformacji wyniku pomiaru i jego niepewności wyrażonego w g/kg na odpowiednią liczbę kopii.

### PRZYKŁAD

Przy stosowaniu dla celów kalibracji CRM z certyfikowaną genetycznie zmodyfikowaną częścią wagową udowodniono, że próbka kukurydzy zawiera  $65 \pm 20$  g/kg kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie 1507. Rozszerzoną niepewność pomiarową wynoszącą 20g/kg obliczono stosując współczynnik rozszerzenia 2 i niepewność pomiarową dla metody ilościowej 15% oznaczonej podczas walidacji wewnętrznej. Aby przekształcić wynik otrzymany dla genetycznie zmodyfikowanej części wagowej w liczbę kopii, wynik wyrażony w g/kg należy zamienić na wartość procentową dzieląc go przez 10. Biorąc pod uwagę fakt, że CRM genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy stosowanej dla celów kalibracji zostały wyprodukowane z heterozygotycznych nasion kukurydzy, wynik należy podzielić przez 2:

$$\frac{\bar{x}}{10 \times 2} = \frac{65}{20} = 3.3 \quad \text{przy czym } \bar{x} = \text{średnia genetycznie zmodyfikowanej zawartości w g/kg}$$

Proszę pamiętać, że w przypadkach, gdy zaobserwowano odmienną zdolność do izolacji DNA w materiale niezmodyfikowanym genetycznie oraz w materiale genetycznie zmodyfikowanym wykorzystywanym do produkcji CRM, należy zastosować współczynnik korygujący. Informacje na temat zdolności do izolacji DNA można znaleźć w sprawozdaniu certyfikacyjnym. Przy wykorzystaniu CTAB stwierdzono stosunek wynoszący  $0,7 \pm 0,3$  dla izolacji DNA z mączki GMO podzielonej przez mączkę niezmodyfikowaną genetycznie. Z tego względu prawdziwa zawartość GM w badanej próbce wyrażona w liczbie kopii jest zawyżona i wymaga korekty:

$$3.3 * f = 3.3 * 0.7 = 2.3 \quad \text{gdzie } f = \text{współczynnik korygujący związany z odmienną zdolnością do izolacji DNA w mączce niezmodyfikowanej genetycznie oraz w mączce genetycznie zmodyfikowanej wykorzystywanej jako CRM}$$

Efekt endoreduplikacji oraz hodowlę genetycznie zmodyfikowanej heterozygotycznej kukurydzy należy rozpatrywać z uwzględnieniem niepewności pomiarowej. Zakres niepewności wynosi 33 % (66 % minus 33 %), a mierzone wartości mogą wykazywać odchylenia o 16,5 %. Dla obliczenia stosunku liczby kopii należy wyrazić ilościowo wyizolowane z badanej próbki kukurydzy DNA oraz oszacować liczbę genomów kukurydzy. Dla celów tego obliczenia stężenie DNA należy podzielić przez rozmiar genomu kukurydzy. W efekcie, przy obliczaniu niepewności pomiaru należy uwzględnić niepewność związaną z ilościowym wyrażeniem DNA oraz niepewność związaną z oszacowywaniem rozmiaru genomu. Zgodnie z fachową literaturą rozmiary genomu kukurydzy mogą się różnić w granicach 36 % [2]. Podczas walidacji wewnętrznej powtarzalność metody ilościowej określono na 22 %. Zatem rozszerzoną łączną niepewność wyniku, wyrażoną jako stosunek liczby kopii ( $U_{cc}$ ), można obliczyć w następujący sposób:

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

$$U_{cc} = 2 \sqrt{15^2 + \left(\frac{18}{\sqrt{3}}\right)^2 + 22^2 + \left(\frac{16.5}{\sqrt{3}}\right)^2} \% = 60\%$$

Gdzie k = współczynnik rozszerzenia  
 $u_m$  = udział niepewności związanej z metodą ilościowego wyrażania liczby kopii  
 $u_{gs}$  = udział niepewności związanej z oszacowywaniem rozmiaru genomu  
 $u_{Dq}$  = udział niepewności związanej z ilościowym wyrażeniem DNA  
 $u_e$  = udział niepewności związanej z hodowlą i endoreduplikacją

Wyrażając to w liczbie kopii, próbka kukurydzy zawiera  $2,3 \pm 1,4$  sekwencji transgenicznego wydarzenia 1507 w odniesieniu do stu sekwencji endogennych. W porównaniu do wyniku wyrażonego jako część wagowa wydarzenia 1507:  $65 \pm 20$  g/kg, odpowiednia rozszerzona niepewność pomiarowa wzrosła od 30 do 60 %.

[1] Sprawozdanie techniczne IUPAC (2002): Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis

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