

Anvendelse af certificerede referencematerialer (CRM) til kvantificering af GMO som DNA-kopitalsforholdet

Denne Application Note opstiller retningslinjer for korrekt anvendelse af europæiske referencematerialer, der er certificeret for GM-kopitalsforholdet (GM=genetisk modificeret) for en bestemt transformationsbegivenhed. Der henvises i de nedenfor angivne oplysninger særligt til anvendelsen af CRM'erne ERM-BF413d og ERM-AD413 og de kommende CRM'er med certificeret kopitalsforhold.

Forfatter: Philippe Corbisier
Europa-Kommissionen – Det Fælles
Forskningscenter
Institut for Referencematerialer og -målinger
(IRMM)
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgien
Email: philippe.corbisier@ec.europa.eu

INDLEDNING

JRC-IRMM har for nylig udviklet to nye typer certificerede referencematerialer (CRM'er) for GMO'er (GMO=genetisk modificeret organisme). Takket være disse CRM'er kan henstilling 2004/787/EF [1] gennemføres korrekt ved hjælp af et måleteknisk sporbart system. Denne note giver instrukser i anvendelsen af de nye CRM'er.

EGENSKABERNE VED DE NYE GMO-CRM'ER

A. Nye matrix-CRM'er for GMO'er

De certificerede værdier er baseret på to forskellige måleenheder. Ud over en certificeret værdi for massebrøken af en specifik transformationsbegivenhed (jf. *application note 4*) er det nye CRM certificeret for DNA-kopitalsforholdet. Dette parameter, udtrykt i %, beregnes efter formlen:

$$\text{DNA copy number ratio [\%]} = \frac{\text{GM DNA copy number [cp]}}{\text{Target taxon-specific DNA copy number [cp]}} \times 100$$

Certificeringen er baseret på QRT-PCR (kvantitativ realtime PCR) målinger. Disse målinger kalibreres ved hjælp af en certificeret plasmid-DNA-kalibrator, der indeholder én kopi af både GM'en og den taxonspecifikke målsekvens pr. plasmid (se del B nedenfor).

DNA-kopitalsforholdet i GM-majs hænger derfor direkte sammen med den analyserede transformationsbegivenhed. I eksemplet nedenfor bør CRM ERM-BF413d endvidere kun anvendes sammen med plasmid-kalibratoren ERM-AD413 og den begivenhedsspecifikke detektionsmetode for MON 810 [2]. Det certificerede DNA- kopitalsforhold for MON 810 (0,57 %) adskiller sig fra den certificerede massebrøk (10,0 g/kg eller 1,0%), da det certificerede kopitalsforhold for MON 810 tager hensyn til zygositet, ploidi og endoreplikation i de frø, der anvendes til fremstilling af dette materiale.

Matrix-CRM'et skal bruges til kvalitetskontrol af analyseprocedurer, herunder DNA-ekstraktion og –rensning, og til de forskellige trin i PCR-målingen for en given transformationsbegivenhed.

B. Nye plasmid-CRM'er for GMO'er

De certificerede kalibratoren indeholder et nærmere defineret DNA-fragment, der er specifikt for en genetisk modifikation, og et nærmere defineret DNA-fragment, der er specifikt for den analyserede taxon. Dette plasmid indeholder et fragment på 170 basepar (bp) af MON 810 5' *plant-P35S*-overgangen og et fragment på 351 bp af det endogene majs gen *hmg* (high mobility group).

De certificerede værdier er henholdsvis antallet af klonede fragmenter af GM og antallet af taxonspecifikke DNA-fragmenter pr. plasmid. Talforholdet mellem disse to DNA-fragmenter angives som en vejledende værdi opnået ved realtime PCR (duplex og simplex).

ANVENDELSE AF GMO-PLASMID-KALIBRATORER

Kalibratoren skal anvendes sammen med en nærmere defineret QRT-PCR-metode [1].

Hver kalibrator leveres på tøris i et lukket plastglas og bør opbevares ved -20 °C indtil brug. Indholdet bør først optøs og dernæst blandes. Derefter skal glasset åbnes og indholdet fortyndes under en laminar luftstrøm, hvilket mindsker risikoen for kontaminering. Hvert glas indeholder ca. 2×10^6 kopier (cp) af plasmidet pr. μL , og det anbefalede startvolumen for fortyndingsrækken er 50 μL . Den fortyndingsprotokol, der er angivet på certifikatet, bør følges. Fortyndingsbuffer medfølger ikke.

Fortyndingsrækken bør altid være nyttilberedt, og eventuelt overskydende opløsninger bør bortskaffes i lukkede glas. Fortyndingsrækken anvendes til at tegne to kalibreringskurver (en kalibreringskurve for transgenet og en for det taxonspecifikke gen) med hver 5 punkter, som hvert måles tre gange for PCR-reaktionen (se eksemplet). Et glas indeholder en tilstrækkelig mængde kalibrator, til at der kan tegnes 10 kalibreringskurver for begge målsekvenser, hvilket betyder, at indholdet i ét glas er tilstrækkeligt til at kvantificere i alt 100 til 250 prøver. Den anbefalede mængde prøve for QRT-PCR er 5 μL template-DNA pr. PCR-brønd.

De målte fluorescensstærkelværdier (Ct-værdier) skal sammenholdes med det teoretiske antal kopier af begge fragmenterne, så der kan optegnes to kalibreringskurver. Disse anvendes til kvantificering af GM-målsekvensen i forhold til den taxonspecifikke målsekvens i en ukendt prøve. Resultaterne kan

der næst beregnes som forholdet mellem de to målskvenser og udtrykkes i procent i overensstemmelse med henstilling (EF) 787/2004. Der kan foretages PCR til intern kvalitetskontrol (QC) ved at beregne det gennemsnitlige forhold mellem de målte Ct-værdier for den taxonspecifikke og den transgene målskvens for de kalibreringspunkter, der svarer til

2000 cp/μL. Dette forhold bør stemme med 1,04 % (udvidet usikkerhed 0,06 %) for en simplex-PCR, som angivet i certificeringsrapporten (se også ERM Application Note 1).

EKSEMPEL

Genomisk DNA ekstraheret fra en ukendt prøve og fra ERM-BF413d (brugt som QC-materiale) analyseres med QRT-PCR med ERM-AD413 som kalibrator. Ct-værdierne opnås for ERM-AD413-kalibratoren efter amplifikation af *hmg*- og MON 810-fragmentet (**tabel 1**). For den ukendte prøve er de gennemsnitlige Ct-værdier for amplifikationen af MON 810- og *hmg*-fragmentet på henholdsvis 32,76 og 25,44. For QC- materialet er de gennemsnitlige Ct-værdier for MON 810- og *hmg*-fragmentet på henholdsvis 31,22 og 22,20.

De to kalibreringskurvers hældning og Y-skæringspunkt skal bestemmes med henblik på at beregne indholdet af MON 810 i begge prøver, idet modelfunktionen for bedste tilnærmelse antages at være en ret linje. De indbyggede moduler i Microsoft®Excel eller anden software til kalibrering og/eller bestemmelse kan benyttes til beregning af hældning og Y-skæringspunkt.

Hældningen (*b*) af begge de lineære regressionslinjer kan beregnes efter formlen: $b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$, hvor *x*

er antallet af kopier af det ampificerede fragment og *y* den tilsvarende Ct-værdi. Hældningen af kalibreringskurverne for *hmg*-fragmentet og MON 810-fragmentet i **tabel 1** er henholdsvis -3,25 og -3,32. Regressionslinjernes Y-skæringspunkt (*a*) beregnes efter formlen: $a = \bar{y} - b\bar{x}$, når $\log(x) = 0$. I vores eksempel er *a*-værdierne for *hmg*- og MON 810-regressionslinjerne henholdsvis 39,26 og 40,93. Disse værdier repræsenterer de teoretiske Ct-værdier svarende til 1 kopi af begge fragmenter. Hældningen tjener til at beregne PCR-effektiviteten (ϵ) med formlen: $\epsilon = (10^{1/b} - 1) * 100$. I vores eksempel var PCR-effektiviteten henholdsvis 99,7 % og 103,1 % for amplifikationen af MON 810-fragmentet og for *hmg*-fragmentet. Antallet af MON 810-kopier (*cp*) i den ukendte prøve beregnes som:

$cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}}\right)}$, hvor Ct_{MON810} , a_{MON810} og b_{MON810} henholdsvis er Ct-værdi, Y-skæringspunkt og hældning for MON 810-amplifikationen. Samme beregning foretages til at bestemme antallet af kopier af *hmg*-fragmentet med

formlen: $cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}}\right)}$. I vores eksempel er det skønnede gennemsnitlige antal kopier af MON 810-fragmentet og *hmg*-fragmentet i den ukendte prøve henholdsvis 289 og 17878. Indholdet af MON 810 i den ukendte prøve udtrykt i procent er derfor lig med: $\frac{289}{17878} cp_{MON810} * 100 = 1,62 \%$. Samme beregning foretages for QC-materialet, som indeholder:

$\frac{841}{177513} cp_{MON810} * 100 = 0,47 \%$ MON 810. Under hensyntagen til usikkerheden ved ERM-BF413d og måleusikkerheden (se

ERM Application Note 1) kan det kontrolleres, om den målte værdi stemmer overens med de certificerede værdier for ERM-BF413d. I eksemplet ovenfor stemmer forholdet mellem de gennemsnitlige Ct-værdier på 1,05 for 10000 cp (5 μL ERM-AD413 ved 2000 cp/μL) overens med den vejledende værdi på $1,04 \pm 0,06$, der er angivet på ERM-AD413-certifikatet, hvilket betyder, at denne GM-quantificering opfylder kravene.

[1] Europa-Kommissionens henstilling 2004/787/EF af 4. oktober 2004 om tekniske retningslinjer for prøvetagning og detektion af genetisk modificerede organismer og materiale fremstillet af genetisk modificerede organismer, der udgør eller indgår i produkter, inden for rammerne af forordning (EF) nr. 1830/2003 - EU-Tidende L 348 af 24.11.2004, s. 18-26.

[2] ISO 21570:2005 Fødevarer - Analysemetoder til bestemmelse af genetisk modificerede organismer og afledte produkter - Kvantitative nukleinsyrebaserede metoder. Annex D2 Event-specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR. 93-99.

[†] En afvigelse af Ct-værdierne for NTC fra antallet af udførte PCR-cykler bør vække mistanke om krydskontaminering eller uspecifik amplifikation.

Total number of cp of the MON 810 fragment	Ct values measured			average Ct
	replicate 1	replicate 2	replicate 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

Total number of cp of the <i>hmg</i> fragment				
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

Tabel 1: Eksempel på eksperimentelle Ct-værdier opnået ved anvendelse af ERM-AD413 som kalibrator. NTC[†] = no template control.