

## Wykorzystanie certyfikowanych materiałów odniesienia do ilościowego określenia zawartości GMO dla liczby kopii DNA

Niniejsza „Application Note” zawiera wskazówki dotyczące prawidłowego wykorzystania europejskich materiałów odniesienia certyfikowanych dla liczby kopii genetycznie zmodyfikowanego fragmentu DNA specyficznej genetycznej modyfikacji. Poniższe informacje dotyczą w szczególności wykorzystania certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM) ERM-BF413d oraz ERM-AD413, a także przyszłych materiałów odniesienia certyfikowanych dla liczby kopii DNA.

**Autor:** Philippe Corbisier  
Komisja Europejska – Wspólne Centrum  
Badawcze  
Instytut Materiałów Referencyjnych i Pomiarów  
(IRMM)  
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgia  
Email: philippe.corbisier@ec.europa.eu  
[www.erm-crm.org](http://www.erm-crm.org)

### WPROWADZENIE

Instytut Materiałów Referencyjnych i Pomiarów przy Wspólnym Centrum Badawczym (JRC-IRMM) opracował ostatnio dwa nowe rodzaje certyfikowanych materiałów odniesienia GMO (CRM-GMO), które umożliwiają właściwe stosowanie zalecenia Komisji 2004/787/WE [1] przy użyciu metrologicznie sprawdzalnego systemu. Niniejsza „Application Note” zawiera wskazówki dotyczące właściwego stosowania nowych CRM.

### WŁAŚCIWOŚCI NOWYCH CRM-GMO

#### A. Nowe matrycowe CRM-GMO

Certyfikowane wartości są oparte na dwóch różnych jednostkach miary. Oprócz certyfikowanej wartości dla części wagowej specyficznej genetycznej modyfikacji (por. „Application Note 4”), nowy CRM jest również certyfikowany dla liczby kopii DNA. Ten wyrażany w % parametr jest obliczany przy użyciu następującego wzoru:

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

Certyfikacja opiera się na ilościowych pomiarach reakcji łańcuchowej polimeryzacji DNA w czasie rzeczywistym (QRT-PCR). Pomiary te są kalibrowane przy pomocy certyfikowanego kalibratora plazmidu DNA, który zawiera jedną kopię sekwencji zmodyfikowanej genetycznie i jedną kopię specyficznej dla danego taksonu sekwencji docelowej na plazmid (por. pkt B).

Liczba kopii DNA zmodyfikowanej genetycznie kukurydzy jest więc bezpośrednio powiązana ze specyficzną genetyczną modyfikacją. Ponadto w poniższym przykładzie CRM ERM-BF413d powinien być wykorzystywany wyłącznie w połączeniu z kalibratorem plazmidu ERM-AD413 oraz z procedurą wykrywania specyficzną dla genetycznej modyfikacji MON 810 [2]. Certyfikowana liczba kopii DNA dla MON 810 (0,57 %) różni się od certyfikowanej części wagowej (10,0 g/kg lub 1,0 %), ponieważ certyfikowana liczba kopii DNA dla MON 810 odzwierciedla status zygocytowości, ploidalności i endoreduplikacji nasion wykorzystywanych do produkcji tego materiału.

Matrycowy CRM służy do kontroli jakości procedur analitycznych, w tym ekstrakcji i oczyszczania DNA,

oraz kroków pomiarowych PCR dla specyficznej genetycznej modyfikacji.

#### B. Nowe plazmidowe CRM-GMO

Certyfikowane kalibratory zawierają określony, specyficzny dla modyfikacji genetycznej fragment DNA, a także określony fragment DNA specyficzny dla analizowanego taksonu. Plazmid ten zawiera fragment połączenia 5' rośliny-P35S MON 810 o długości 170 par zasad (bp) oraz złożony z 351 bp fragment endogennej grupy genów kukurydzy o dużej ruchliwości (high mobility group – *hmg*).

Certyfikowane wartości to liczba sklonowanych, zmodyfikowanych genetycznie fragmentów DNA oraz liczba specyficznych dla taksonu fragmentów DNA na plazmid. Stosunek liczbowy tych dwóch fragmentów DNA to szacunkowa wartość uzyskana w wyniku reakcji łańcuchowej polimeryzacji DNA w czasie rzeczywistym, typu simplex i duplex.

### ZASTOSOWANIE KALIBRATORA PLAZMIDU GMO

Kalibrator należy stosować w połączeniu z określoną metodą QRT-PCR [1].

Każdy kalibrator jest dostarczany na suchym lodzie w zamkniętej rurce z tworzywa sztucznego i do momentu wykorzystania musi być przechowywany w temperaturze -20 °C. Zawartość należy najpierw rozmrozić, następnie wstrząsnąć, a na koniec otworzyć i rozcieńczyć w komorze z nawiewem laminarnym celem ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia. Każda rurka zawiera około  $2 \times 10^6$  kopii (cp) plazmidu na  $\mu\text{L}$ , a zalecana objętość początkowa dla serii rozcieńczeń wynosi 50  $\mu\text{L}$ . Należy przestrzegać podanego na certyfikacie protokołu rozcieńczenia. Roztwór buforowy nie jest dostarczany.

Seria rozcieńczeń powinna być zawsze świeżo przygotowywana, a nadmiar należy usuwać w zamkniętych rurkach. Seria rozcieńczeń służy do przygotowania dwóch krzywych kalibracji (CC – jednej dla transgeny i jednej dla genu specyficznego dla taksonu), z których każda obejmuje 5 punktów. Punkty te są mierzone trzykrotnie w reakcji PCR (por. przykład). Jedna rurka zawiera kalibrator w ilości wystarczającej do przygotowania 10 CC dla obu sekwencji docelowych, co oznacza, że przy pomocy jednej rurki można określić wartości dla łącznie 100 do

250 próbek. Zalecana wielkość próbki dla QRT-PCR wynosi 5 µL matrycy DNA na każdą studzienkę PCR. Zmierzone progowe wartości fluorescencji (wartości CT) są porównywane z teoretyczną liczbą kopii obu fragmentów celem wygenerowania dwóch krzywych kalibracji. Krzywe te służą do ilościowego określenia genetycznie zmodyfikowanej sekwencji docelowej w porównaniu ze specyficzną dla taksonu sekwencją docelową w nieznaną próbkę. Wyniki pozwalają następnie obliczyć stosunek obu sekwencji docelowych i wyrazić go procentowo zgodnie z zaleceniem Komisji 2004/787/WE. PCR do celów wewnętrznej kontroli

jakości może zostać przeprowadzone przez obliczenie przeciętnego stosunku zmierzonych wartości CT dla transgenicznego i dla specyficznego dla taksonu sekwencji docelowej w punktach kalibracyjnych odpowiadających 2000 cp/µL. Stosunek ten w przypadku PCR typu simplex powinien wynosić około 1,04 % (poszerzona niepewność pomiaru 0,06 %), jak wskazano w sprawozdaniu z certyfikacji (por. także „Application Note 1”).

## PRZYKŁAD

Genomowe DNA wyekstrahowane z nieznaną próbkę oraz z ERM-BF413d (wykorzystanego do kontroli jakości) są analizowane w oparciu o QRT-PCR, przy czym ERM-AD413 służy jako kalibrator. Wartości CT dla kalibratora ERM-AD413 są uzyskiwane po powieleniu fragmentów *hmg* i MON 810 (Tabela 1). W przypadku nieznaną próbkę średnie wartości CT uzyskane po powieleniu wynoszą 32,76 dla fragmentu MON 810 oraz 25,44 dla fragmentu *hmg*. W przypadku materiału wykorzystanego do kontroli jakości średnie wartości CT wynoszą 31,22 dla fragmentu MON 810 oraz 22,20 dla fragmentu *hmg*.

Aby obliczyć zawartość MON 810 w obu próbkach należy określić nachylenia oraz odcinki osi y obu krzywych kalibracji, przyjmując linię prostą jako najlepiej pasującą funkcję modelową. Do obliczenia nachyleń oraz odcinków osi y mogą zostać wykorzystane wbudowane moduły programu Microsoft®Excel lub innego dostępnego oprogramowania służącego do kalibracji/wyznaczania.

Nachylenia (*b*) obu linii regresji linearnej mogą być obliczone przy użyciu wzoru: 
$$b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$$
 gdzie *x* oznacza liczbę

kopii powielonego fragmentu, a *y* oznacza odpowiednią wartość CT. Nachylenia krzywych kalibracji fragmentów *hmg* i MON 810 podane w Tabeli 1 wynoszą odpowiednio -3,25 oraz -3,32. Odcinki osi y (a) linii regresji oblicza się przy użyciu wzoru:  $a = \bar{y} - b\bar{x}$ , gdzie  $\log(\bar{x}) = 0$ . W naszym przykładzie wartość *a* wynosi 39,26 dla linii regresji *hmg* oraz 40,93 dla linii regresji MON 810. Wartości te odpowiadają teoretycznym wartościom CT dla 1 cp każdego fragmentu. Nachylenie pozwala wyliczyć skuteczność PCR ( $\epsilon$ ) przy pomocy wzoru:  $\epsilon = (10^{1/b} - 1) * 100$ . W naszym przykładzie skuteczność PCR wyniosła 99,7 % dla powielenia fragmentu MON 810 oraz 103,1 % dla powielenia fragmentu *hmg*. Liczba kopii MON 810 (cp) w nieznaną próbkę jest obliczana przy użyciu wzoru:

$$cp_{MON810} = 10^{\left( \frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}} \right)}$$
 gdzie  $Ct_{MON810}$ ,  $a_{MON810}$  oraz  $b_{MON810}$  stanowią wartości CT, odcinka osi y oraz nachylenia uzyskane dla powielenia MON 810. Takich samych wyliczeń dokonuje się celem określenia liczby kopii fragmentu *hmg*, przy użyciu

wzoru: 
$$cp_{hmg} = 10^{\left( \frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}} \right)}$$
. W naszym przykładzie nieznaną próbka zawiera szacunkowo średnio 289 kopii fragmentu MON 810 oraz 17878 kopii fragmentu *hmg*. Procentowa zawartość MON 810 w nieznaną próbkę wynosi zatem: 
$$\frac{289}{17878} \cdot cp_{MON810} * 100 = 1,62 \%$$

W przypadku materiału wykorzystanego do kontroli jakości te same wyliczenia wskazują na: 
$$\frac{841}{177513} \cdot cp_{MON810} * 100 = 0,47 \%$$
 MON 810.

Uwzględniając niepewność związaną z ERM-BF413d oraz niepewność pomiaru (por. „Application Note 1”), można jedynie sprawdzić, czy zmierzona wartość odpowiada certyfikowanym wartościom ERM-BF413d. W powyższym przykładzie stosunek średnich wartości CT wynoszący 1,05 dla 10000 cp (5 µL ERM-AD413 i 2000 cp/µL) zgadza się z szacunkową wartością  $1,04 \pm 0,06$  wskazaną w certyfikacji ERM-AD413. Oznacza to, że ilościowe określenie modyfikacji genetycznej zostało dokonane w sposób prawidłowy.

[1] Zalecenie Komisji nr 2004/787/WE z dnia 4 października 2004 r. w sprawie wytycznych technicznych w zakresie pobierania próbek i wykrywania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz materiałów produkowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie lub w składzie produktów w kontekście rozporządzenia (WE) nr 1830/2003, Dz.U. L 348 z 24.11.2004, s. 18-26.

[2] ISO 21570:2005 Artykuły żywnościowe – Metody wykrywania organizmów zmodyfikowanych genetycznie i produktów pochodnych – Metody ilościowe oparte na kwasach nukleinowych. Załącznik D2: Specyficzna dla genetycznej modyfikacji metoda ilościowego określania względnej zawartości DNA gatunku kukurydzy MON 810 z zastosowaniem PCR w czasie rzeczywistym, s. 93-99.

<sup>†</sup> Jeżeli wartości CT dla NTC są różne dla poszczególnych cykli PCR, należy podejrzewać wzajemne zanieczyszczenie lub nieokreślone powielenie.

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	Ct values measured			average Ct
	replicate 1	replicate 2	replicate 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

Tabela 1: Przykład wyznaczania wartości CT przy użyciu ERM-AD413 jako kalibratora. NTC<sup>†</sup> = no template control.