

Utilização de materiais de referência certificados para a quantificação de OGM em função do rácio do número de cópias de ADN

A presente nota de aplicação fornece orientações para a correcta utilização dos Materiais de Referência Europeus com certificação da fracção do número de cópias geneticamente modificadas (GM) correspondentes a um determinado evento de modificação genética. Os dados a seguir apresentados dizem respeito, em particular, à utilização dos MRC ERM-BF413d e ERM-AD4133, bem como de futuros materiais de referência com certificação do rácio do número de cópias de ADN.

INTRODUÇÃO

O CCI-IRMM desenvolveu recentemente dois novos tipos de materiais de referência certificados (MRC) de OGM que permitem a correcta aplicação da Recomendação (CE) 787/2004 [1] com base num sistema de medição objectivo. A presente nota contém as instruções necessárias à utilização dos novos MRC.

CARACTERÍSTICAS DOS NOVOS MRC DE OGM

A. Novos MRC de matrizes de OGM

Os valores certificados baseiam-se em duas unidades de medição diferentes. Para além de um valor certificado correspondente à fracção mássica de um determinado evento de modificação genética (ver a nota de aplicação 4), o novo MRC é certificado em termos do rácio do número de cópias de ADN. Esse parâmetro, expresso em percentagem, é calculado pela seguinte expressão:

$$\text{Rácio n.º cópias ADN [\%]} = \frac{\text{N.º cópias ADN GM [cp]}}{\text{N.º cópias ADN específico do táxon [cp]}} \times 100$$

A certificação baseia-se em medições QTR-PCR (polimerização em cadeia quantitativa em tempo real), calibradas contra um plasmídeo-padrão específico de ADN que contém certificadamente uma cópia da sequência geneticamente modificada e uma cópia da sequência-alvo específica do táxon por plasmídeo (ver a parte B).

Logo, o rácio de número de cópias de ADN de milho geneticamente modificado está directamente relacionado com o evento de modificação genética em análise. Mais ainda, no exemplo a seguir descrito, o material de referência ERM-BF413d só pode ser utilizado em conjunção com o plasmídeo-padrão ERM-AD413, no quadro do método de detecção específico para o evento MON 810 [2]. O rácio certificado de número de cópias de ADN do milho MON 810 (0,57%) é diferente da sua fracção mássica certificada (10 g/kg, ou 1,0%), na medida em que o rácio certificado em número de cópias de MON 810 tem em conta a zigosidade, a ploidia e o estado de endo-reduplicação das sementes utilizadas na produção deste material.

A matriz do MRC destina-se ao controlo de qualidade de procedimentos analíticos, incluindo a extracção e purificação de ADN e ainda os diferentes passos da

medição por PCR de um determinado evento de modificação genética.

B. Novos MRC de plasmídeos de OGM

Os padrões certificados contêm um fragmento de ADN específico da modificação genética e também um fragmento de ADN característico do táxon em análise. O plasmídeo contém um fragmento com 170 pares de bases (pb) da junção 5' *planta-P35S* do milho MON 810 e um fragmento com 351 pb do gene do grupo de alta mobilidade (*hmg*) endógeno do milho.

Os valores certificados correspondem, respectivamente, ao número de fragmentos clonados da sequência geneticamente modificada e ao número de fragmentos clonados do ADN específico do táxon presentes em cada plasmídeo. O rácio numérico entre esses dois fragmentos de ADN, obtido por PCR em tempo real (simplex ou duplex), constitui um valor indicativo.

UTILIZAÇÃO DO PLASMÍDEO-PADRÃO DE OGM

O padrão deve ser utilizado em conjunção com um determinado método QRT-PCR [1].

Os padrões são fornecidos em gelo seco, em tubo de plástico fechado, e devem ser conservados a -20°C até serem utilizados. O conteúdo deve primeiro ser descongelado e misturado e só depois aberto e diluído em câmara de fluxo laminar, para reduzir o risco de contaminação. Cada tubo contém aproximadamente 2×10^6 cópias (cp) de plasmídeo por μl , sendo recomendado iniciar a série de diluições com um volume de 50 μl . Deve seguir-se o protocolo de diluição que consta do certificado. O tampão a utilizar para a diluição não é fornecido.

A série de diluições deve ser sempre preparada de fresco e qualquer quantidade que sobre deve ser eliminada em tubos fechados. A série de diluições é utilizada para representar duas curvas de calibração (CC), uma para o transgene e outra para o gene específico do táxon), cada uma com 5 pontos medidos em triplicado por PCR (ver o exemplo). Um tubo contém padrão suficiente para dez CC para os dois genes-alvo, o que equivale a dizer que o conteúdo de um tubo permite quantificar 100 a 250 amostras. A quantidade de amostra recomendada para o QRT-PCR é equivalente a 5 μl de ADN-alvo por célula de PCR.

Os valores do limiar de fluorescência medidos (valores Ct) são representados em função do número teórico de cópias de ambos os fragmentos, de modo a gerar duas

CC. Essas CC são utilizadas para quantificar a relação entre o ADN-alvo geneticamente modificado e o ADN-alvo específico do táxon presentes numa amostra desconhecida. Os resultados podem depois ser calculados como o rácio entre os dois ADN-alvo e expressos em percentagem, em conformidade com a Recomendação (CE) 787/2004. Pode proceder-se a uma análise PCR para controlo de qualidade (CQ) interno, calculando o rácio médio dos valores Ct do

ADN-alvo específico do táxon e do ADN transgénico, para os pontos de calibração correspondentes a 2000 cp/μl. Esse rácio deve ser coerente com o valor de 1,04% (incerteza expandida de 0,06%) numa análise PCR simplex, conforme se indica no relatório de certificação (ver também a nota de aplicação ERM 1).

EXEMPLO

O ADN genómico extraído de uma amostra desconhecida e do material de referência ERM-BF413d, utilizado para o CQ, são analisados por QTR-PCR, usando o material ERM-AD413 como padrão. Os valores Ct do padrão ERM-AD413 são obtidos após amplificação dos fragmentos *hmg* e MON 810 (**quadro 1**). Os valores Ct médios da amostra desconhecida, 32,76 e 25,44, são obtidos por amplificação dos fragmentos MON 810 e *hmg*, respectivamente. No que respeita ao material utilizado para o CQ, os valores Ct médios, 31,22 e 22,20, foram obtidos para os fragmentos MON 810 e *hmg*, respectivamente.

Para o cálculo do teor de MON 810 em ambas as amostras, devem ser determinados os declives e os pontos de intercepção dos dois traçados de calibração com o eixo das ordenadas, assumindo como modelo a função linear que apresente a melhor correlação com os pontos medidos. Para o cálculo dos declives e dos pontos de intercepção com o eixo das ordenadas, podem ser utilizados os módulos integrados no programa Microsoft®Excel ou qualquer outro programa informático de calibração/determinação de curvas disponível.

Os declives (*b*) de ambos os traçados de regressão linear podem ser calculados através da fórmula:

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

representa o número de cópias do fragmento amplificado e *y* representa o valor Ct correspondente. Os declives das curvas de calibração dos fragmentos *hmg* e MON 810, apresentados no **quadro 1**, são, respectivamente, -3,25 e -3,32. Os pontos de intercepção do eixo das ordenadas, (*a*), dos traçados de regressão linear são calculados através da fórmula: $a = \bar{y} - b\bar{x}$ quando $\log(x) = 0$. No exemplo apresentado, os valores *a* dos traçados de regressão para o *hmg* e para o MON 810 são, respectivamente, 39,26 e 40,93. Esses valores representam os valores Ct teóricos correspondentes a 1 cp de ambos os fragmentos. O declive pode ser utilizado para calcular a eficiência da PCR, (ϵ), através da fórmula: $\epsilon = (10^{-1/b} - 1) * 100$. No exemplo apresentado, as eficiências da PCR foram de 99,7 % e de 103,1% para a amplificação dos fragmentos MON 810 e *hmg*, respectivamente. O número de cópias (cp) de

MON 810 presentes na amostra desconhecida é calculado por: $cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}}\right)}$, em que Ct_{MON810} , a_{MON810} e b_{MON810} are são os valores do Ct, da intercepção do eixo das ordenadas e do declive obtidos para a amplificação de MON 810. Proceder-se ao

mesmo cálculo para determinar o número de cópias do fragmento *hmg*, através da fórmula: $cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}}\right)}$. No exemplo apresentado, o número médio estimado de cópias dos fragmentos MON810 e *hmg* presentes na amostra desconhecida correspondem a 289 e a 17878 cp, respectivamente. O teor de MON 810 na amostra desconhecida, expresso em percentagem, é portanto igual a:

$$\frac{289}{17878} cp_{MON810} * 100 = 1.62 \%$$

de MON810 Tendo em conta a incerteza associada ao ERM-BF413d e as incertezas da medição (ver a

$$\frac{841}{177513} cp_{MON810} * 100 = 0.47 \%$$

nota de aplicação ERM 1), pode verificar-se se o valor medido é concordante com os valores certificados para o ERM-BF314d. No exemplo apresentado, o rácio dos valores Ct médios obtido para 10000 cp (5 μl de ERM-AD413, 2000 cp/μl), 1,05, é coerente com o valor indicativo de 1,04 ± 0,06 recomendado no certificado do ERM-AD413, pelo que se conclui que a determinação do material geneticamente modificado foi correcta.

[1] Recomendação 2004/787/CE da Comissão Europeia, de 4.10.2004, relativa a orientações técnicas para a colheita de amostras e a detecção de organismos geneticamente modificados e de matérias produzidas a partir de organismos geneticamente modificados, enquanto produtos ou incorporados em produtos, no quadro do Regulamento (CE) n.º 1830/2003. JO L 348, pp. 18-26.

[2] ISO 21570:2005 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic based methods. Annex D2 Event-specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR. 93-99.

[†] Nos casos em que os valores de Ct do branco forem diferentes do número de ciclos de PCR efectuados, deve colocar-se a hipótese de contaminação da amostra ou de amplificação não específica.

N.º total de cp do fragmento MON 810	valores Ct médios			média Ct
	replicado 1	replicado 2	replicado 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	34.20	34.64
25	35.79	35.67	36.37	35.95
NTC	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00
N.º total de cp do fragmento hmg				
50000	20.76	20.67	20.63	20.69
10000	22.92	23.00	23.04	22.99
1000	26.39	26.36	26.33	26.36
500	27.31	27.29	27.37	27.32
100	29.38	29.19	29.57	29.38
NTC	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00

Quadro 1: Exemplo de valores experimentais de Ct obtidos com ERM-AD413 como padrão. NTC = branco.