

Sertifikuotų etaloninių medžiagų naudojimas GMO kiekybiniam įvertinimui DNR kopijų skaičiaus santykiu

2007 m. lapkričio mėn.

Šiame naudojimo vadove pateikiamos rekomendacijos, kaip tinkamai naudoti Europos etalones medžiagas su sertifikuota konkrečia genetinio modifikavimo įvykio genetiškai modifikuotų (GM) kopijų skaičiaus dalimi. Toliau pateikiamos rekomendacijos visų pirma skirtos etaloninių medžiagų ERM-BF413d bei ERM-AD413 ir būsimų etaloninių medžiagų, kurių kopijų skaičiaus santykis bus sertifikuotas, naudojimui.

Autorius: Philippe Corbisier

Europos Komisija – Jungtinių tyrimų centras
Etaloninių medžiagų ir matavimų institutas
(IRMM)

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

E. paštas philippe.corbisier@ec.europa.eu

www.erm-crm.org

ĮVADAS

Jungtinio tyrimų centro Etaloninių medžiagų ir matavimų institutas neseniai sukūrė dvi naujas GMO sertifikuotų etaloninių medžiagų (SEM) rūšis, todėl galima tinkamai įgyvendinti Rekomendaciją (EB) 787/2004 [1] naudojant metrologinio atsekamumo sistemą. Šiame vadove pateikiami nurodymai, kaip taikyti naująsias SEM.

NAUJŪJŲ GMO SEM SAVYBĖS

A. Naujos GMO matricinės SEM

Sertifikuotos vertės pagrįstos dviem skirtingais matavimo vienetais. Sertifikuota ne tik konkrečia genetinės modifikacijos įvykio masės dalies vertė (žr. Naudojimo vadovą 4) – naujoji SEM sertifikuota ir DNR kopijų skaičiaus santykio atžvilgiu. Šis parametras, išreikštas procentais, apskaičiuojamas taip:

$$\text{DNR kopijų skaičiaus santykis (\%)} = \frac{\text{GM DNR kopijų skaičius (cp)}}{\text{Tikslinis taksonui specifinių DNR kopijų skaičius (cp)}} \times 100$$

Sertifikavimas pagrįstas kiekybinės realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos (KRL PGR) matavimais. Šie matavimai kalibruojami naudojant specialų plazmidės DNR kalibratorių, kurio plazmidė pagal sertifikavimą gali turėti GM sekos kopiją ir taksonui specifinės tikslinės sekos kopiją (žr. B dalį).

Todėl genetiškai modifikuotų kukurūzų DNR kopijų skaičiaus santykis yra tiesiogiai susijęs su analizuojamu GM įvykiu. Be to, toliau pateiktame pavyzdyje SEM ERM-BF413d turėtų būti naudojama tik kartu naudojant plazmidės kalibratorių ERM-AD413 ir taikant konkrečiam įvykiui skirtą MON 810 nustatymo metodą [2]. Sertifikuotas MON 810 DNR kopijų skaičiaus santykis (0,57 %) skiriasi nuo sertifikuotos masės dalies (10,0 g/kg arba 1,0 %), nes sertifikuotu MON 810 kopijų skaičiaus santykiu atsižvelgiama į šios medžiagos gamybai naudotų sėklų zigotų skaičių, ploidiškumą ir endoreduplikacijos fazę.

Matricinė SEM skirta analizės procedūrai, įskaitant DNR išskyrimą bei išgryninimą, ir tam tikro GM įvykio PGR matavimo etapų kokybės kontrolei užtikrinti.

B. Naujosios GMO plazmidės SEM

Sertifikuoti kalibratoriai turi apibrėžtą genetiniam modifikavimui specifinį DNR fragmentą ir apibrėžtą

analizuojamam taksonui specifinį DNR fragmentą. Toje plazmidėje yra MON 810 5' *augalo*-P35S jungties 170 bazių porų (bp) fragmentas ir kukurūzų endogeninių didelio judrumo grupės (angl. *hmg*) genų 351 bp fragmentas.

Sertifikuotos vertės – klonuotų GM skaičius ir taksonui specifinių DNR fragmentų skaičius vienai plazmidėi. Šių dviejų DNR fragmentų skaičiaus santykis pateikiamas kaip orientacinė vertė, gauta atiekant dvigubą ir paprastą realaus laiko PGR.

GMO PLAZMIDĖS KALIBRATORIAUS NAUDOJIMAS

Kalibratorių reikia naudoti kartu taikant apibrėžtą KRL PGR metodą [1].

Kiekvienas kalibratorius pateikiamas uždarame plastikiniame mėgintuvėlyje su sausu ledu ir iki naudojimo turėtų būti laikomas -20 °C temperatūroje. Turinį pirmiausia reikia atšildyti, sumaišyti ir atidarius mėgintuvėlį atskiesti laminarinės srovės spintoje siekiant sumažinti užteršimo pavojų. Kiekviename mėgintuvėlyje yra maždaug 2×10^6 kopijų plazmidės vienam μL , o rekomenduojamas pradinis skiedimo serijos kiekis yra 50 μL . Reikėtų laikytis sertifikate nurodyto skiedimo protokolo. Skiedimo buferinis tirpalas nepateikiamas.

Skiedimo serija visada turėtų būti paruošiama prieš pat ją naudojant, o bet koks likutis išmetamas uždaruose mėgintuvėliuose. Skiedimo serija naudojama dviem kalibravimo kreivėms (KK) sudaryti (viena KK – transgeniui, kita KK – taksonui specifiniam genui). Kiekvienoje kreivėje yra 5 taškai, kurių kiekvienas matuojamas tris kartus, atliekant PGR (žr. toliau pateikiamą pavyzdį). Viename mėgintuvėlyje esančio kalibratoriaus pakanka 10 abiejų tyrimo objektų kalibravimo kreivių sudaryti; tai reiškia, kad viename mėgintuvėlyje esančio kiekio pakanka nuo 100 iki 250 mėginių. Rekomenduojamas KRL PGR mėginio kiekis – 5 μL DNR šablono vienai PGR.

Kad būtų gautos dvi KK, išmatuotos mažiausios fluorescencijos ribinės vertės (Ct vertės) pateikiamos kreivėje kaip abiejų fragmentų kopijų teorinio skaičiaus funkcija. Tos KK naudojamos GM tyrimo objektui, susijusiam su taksonui specifiniu tyrimo objektu nežinomame mėginyje, kiekybiškai įvertinti. Tada vadovaujantis Rekomendacija (EB) 787/2004 rezultatus galima apskaičiuoti kaip abiejų tyrimo objektų santykį ir išreikšti procentais. Galima atlikti vidaus kokybės kontrolės PGR apskaičiuojant vidutinį išmatuotų taksonui specifinių ir transgeninių tyrimo objektų Ct

verčių santykį kalibravimo taškuose, atitinkančiuose 2000 kopijų/μL. Tas santykis paprastos PGR atveju turėtų būti lygus 1,04 % (išplėstoji neapibrėžtis lygi

0,06 %), kaip nurodyta sertifikavimo ataskaitoje (taip pat žr. ERM naudojimo vadovą 1).

PAVYZDYS

Genomo DNR, išgautas iš nežinomo mėginio ir iš kaip kokybės kontrolės medžiaga naudojamos ERM-BF413d, yra analizuojamos atliekant KRL PGR, kaip kalibratorių naudojant ERM-AD413. Amplifikavus *hmg* ir MON 810 fragmentus gaunamos ERM-AD413 kalibratoriaus Ct vertės (**1 lentelė**). Nežinomo mėginio vidutinės Ct vertės – atitinkamai 32,76 ir 25,44 – gaunamos amplifikavus MON 810 ir *hmg* fragmentus. Naudojant kokybės kontrolės medžiagą gaunamos vidutinės MON 810 ir *hmg* fragmentų Ct vertės – atitinkamai 31,22 ir 22,20.

Kad būtų galima apskaičiuoti MON 810 kiekį abiejuose mėginiuose, reikia nustatyti abiejų kalibravimo kreivių nuolydį ir pažymėti taškus Y ašyje, darant prielaidą, kad tiesi linija yra

tinkamiausia modelio funkcija. Kalibravimo kreivių nuolydžius ir taškus Y ašyje galima apskaičiuoti naudojant įtaisytuosius Microsoft® Excel modulius arba bet kurią kitą esamą kalibravimo ir (arba) nustatymo programinę įrangą.

Abiejų tiesinės regresijos tiesių nuolydžiai (*b*) gali būti apskaičiuojami pagal formulę $b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$, kur *x* – amplifikuoto

fragmento kopijų skaičius, *y* – atitinkama Ct vertė. **1 lentelėje** pateiktą *hmg* ir MON 810 fragmentų kalibravimo kreivių nuolydžiai – atitinkamai -3,25 ir -3,32. Regresijos tiesių taškai Y ašyje (*a*) apskaičiuojami pagal formulę $a = y - b\bar{x}$, kai $\log(x) = 0$. Šiame pavyzdyje *hmg* ir MON 810 regresijos tiesių *a* vertės atitinkamai lygios 39,26 ir 40,93. Tos vertės yra teorinės Ct vertės, atitinkančios vieną abiejų fragmentų kopiją. Vertinant nuolydį galima apskaičiuoti PGR veiksmingumą (ϵ) pagal formulę $\epsilon = (10^{-1/b} - 1) * 100$. Šiame pavyzdyje PGR veiksmingumas amplifikavus MON 810 ir *hmg* fragmentus atitinkamai lygus 99,7 % ir 103,1 %. Nežinomame mėginyje

esančių MON 810 kopijų (*cp*) skaičius apskaičiuojamas pagal formulę $cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}}\right)}$, kur Ct_{MON810} yra MON 810 amplifikacijos Ct vertės, a_{MON810} – jos sankirtos su Y ašimi taškas, o b_{MON810} – jos nuolydis. Taip pat apskaičiuojamas ir *hmg* fragmento

kopijų skaičius pagal formulę $cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}}\right)}$. Šiame pavyzdyje numatomas nežinomame mėginyje esančių MON 810 ir *hmg* fragmentų kopijų vidutinis skaičius yra atitinkamai 289 ir 17878. Todėl procentais išreikštas nežinomo mėginio MON 810 kiekis yra lygus $\frac{289}{17878} cp_{MON810} * 100 = 1,62 \%$. Taip pat apskaičiuojamas ir MON 810 kiekis kokybės kontrolei naudojamose medžiagoje:

$$\frac{17878}{177513} cp_{hmg}$$

$\frac{841}{177513} cp_{MON810} * 100 = 0,47 \%$. Atsižvelgiant į su ERM-BF413d susijusių neapibrėžčių ir matavimo neapibrėžčių (žr. ERM naudojimo vadovą

1), galima patvirtinti, ar išmatuota vertė atitinka ERM-BF413d sertifikuotas vertes. Pirmiau pateiktame pavyzdyje vidutinių Ct verčių santykis, 1,05, gautas iš 10 000 kopijų (5 μL ERM-AD413, kai yra 2000 kopijų/μL), atitinka orientacinę vertę, lygią $1,04 \pm 0,06$, nurodytą ERM-AD413 sertifikate, o tai reiškia, kad šis GM kiekybinis įvertinimas tinkamas.

[1] 2004 m. spalio 4 d. Europos Komisijos rekomendacija (EB) Nr. 787/2004 dėl genetiškai modifikuotų organizmų ir iš jų pagamintų produktų bei juose esančių medžiagų mėginių ėmimo ir aptikimo techninių gairių remiantis Reglamentu (EB) Nr. 1830/2003 (OL L 348, p. 18–26).

[2] ISO 21570:2005 Maisto produktai. Analizės metodai genetiškai modifikuotiems organizmams ir antriniam produktams nustatyti. Kiekybiniai metodai naudojant nukleino rūgštis. D2 priedas. Įvykiui specifinis metodas santykiniam kukurūzų linijos MON 810 DNR kiekiui apskaičiuoti atliekant realaus laiko PGR. 93-99.

[†] Jeigu, netaikius šablono kontrolės, gautos Ct vertės skiriasi nuo atliktų PGR ciklų skaičiaus, reikėtų manyti, kad įvyko kryžminis užsiteršimas arba amplifikacija buvo numatyta netiksliai.

Visas MON 810 fragmento kopijų skaičius	Išmatuotos Ct vertės			Vidutinė Ct
	1 kartas	2 kartas	3 kartas	
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
ŠKN	45.00	45.00	45.00	45.00

Visas <i>hmg</i> fragmento kopijų skaičius				
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
ŠKN	45.00	45.00	45.00	45.00

1 lentelė: Eksperimentinių Ct verčių, gautų naudojant ERM-AD413 kaip kalibrantą, pavyzdys. ŠKN[†] = šablono kontrolė netaikyta.