

## Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial zur Quantifizierung von GVO im Verhältnis der Anzahl von DNA-Kopien

*Diese Application Note enthält Hinweise für die korrekte Verwendung von Europäischen Referenzmaterialien, die für den zahlenmäßigen Anteil genetisch veränderter (GV) DNA-Kopien eines spezifischen GV-Ereignisses zertifiziert sind. Die nachstehenden Angaben beziehen sich insbesondere auf die Verwendung der zertifizierten Referenzmaterialien ERM-BF413d und ERM-AD413 sowie auf künftig für ein DNA-Kopien-Verhältnis zertifizierte Referenzmaterialien.*

**Autor:** Philippe Corbisier  
Europäische Kommission – Gemeinsame Forschungsstelle  
Institut für Referenzmaterialien und -messungen (IRMM)  
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgien  
E-Mail: philippe.corbisier@ec.europa.eu  
[www.erm-crm.org](http://www.erm-crm.org)

### EINFÜHRUNG

Das Institut für Referenzmaterialien und -messungen (IRMM) der Gemeinsamen Forschungsstelle hat kürzlich zwei neue Arten von zertifizierten GVO-Referenzmaterialien (CRM) entwickelt, die mit Hilfe eines metrologisch rückverfolgbaren Systems die korrekte Anwendung der Empfehlung (EG) 787/2004 [1] ermöglichen. Die vorliegende „Application Note“ enthält Hinweise zur Anwendung dieser neuen CRM.

### EIGENSCHAFTEN DER NEUEN GVO-CRM

#### A. Neue GVO-Matrix-CRM

Die zertifizierten Werte beruhen auf zwei unterschiedlichen Maßeinheiten. Neben einem zertifizierten Wert für die Massenfraktion eines spezifischen GV-Ereignisses (siehe Application Note 4) ist das neue CRM auch für das Verhältnis der Anzahl von DNA-Kopien zertifiziert. Dieses prozentuale Verhältnis errechnet sich wie folgt:

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

Die Zertifizierung basiert auf der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR). Die Messungen werden mit Hilfe eines zertifizierten Plasmid-DNA-Kalibrators kalibriert, der pro Plasmid eine Kopie der genetisch veränderten Sequenz und der taxonspezifischen Zielsequenz enthält (siehe Abschnitt B).

Das Verhältnis der Anzahl von DNA-Kopien bei genetisch verändertem Mais bezieht sich daher direkt auf das analysierte GV-Ereignis. Im nachstehenden Beispiel ist das CRM ERM-BF413d darüber hinaus nur im Zusammenhang mit dem Plasmid-Kalibrator ERM-AD413 und dem ereignisspezifischen Nachweisverfahren für MON 810 [2] zu verwenden. Das zertifizierte Verhältnis der Anzahl von DNA-Kopien bei MON 810 (0,57 %) weicht von der zertifizierten Massenfraktion (10,0 g/kg oder 1,0 %) ab, da das zertifizierte Verhältnis der Kopienzahl bei MON 810 den Zygotitäts-, Ploiditäts- und Endoreduplikationsstatus der bei der Herstellung des Materials verwendeten Saat widerspiegelt.

Die Matrix-CRM dient zur Qualitätskontrolle der analytischen Verfahren wie der DNA-Extraktion und –

Reinigung und der PCR-Messschritte für ein bestimmtes GV-Ereignis.

#### B. Neue GVO-Plasmid-CRM

Die zertifizierten Kalibratoren enthalten ein bestimmtes GV-spezifisches DNA-Fragment sowie ein bestimmtes taxonspezifisches DNA-Fragment. Dieses Plasmid enthält ein Fragment der 5'-Pflanze-P35S-Verbindungsstelle von MON 810 mit einer Länge von 170 Basenpaaren (bp) und ein aus 351 bp bestehendes Fragment des endogenen High-Mobility-Group-(*hmg*)-Mais-Gens.

Die Zertifizierung bezieht sich auf die Anzahl der geklonten GV-DNA-Fragmente und die Anzahl der taxonspezifischen DNA-Fragmente pro Plasmid. Das Zahlenverhältnis dieser beiden DNA-Fragmente dient als Richtwert, der bei der Duplex- und Simplex-Echtzeit-PCR ermittelt wurde.

### VERWENDUNG DES GVO-PLASMID-KALIBRATORS

Der Kalibrator ist in Verbindung mit einem bestimmten QRT-PCR-Verfahren zu verwenden [1].

Die Kalibratoren werden stets in verschlossenen Plastikröhrchen auf Trockeneis geliefert und sind bis zur Verwendung bei -20 °C aufzubewahren. Der Inhalt ist zunächst aufzutauen, zu schütteln und zu öffnen und dann unter einer laminaren Strömung zu verdünnen, um das Verunreinigungsrisiko zu minimieren. Jedes Röhrchen enthält ca.  $2 \times 10^6$  Kopien (cp) des Plasmids pro  $\mu\text{L}$ ; das empfohlene Ausgangsvolumen für die Verdünnungsreihe beträgt 50  $\mu\text{L}$ . Das auf dem Zertifikat angegebene Verdünnungsprotokoll ist einzuhalten. Die Pufferlösung wird nicht mitgeliefert.

Die Verdünnungsreihe sollte immer frisch erstellt werden, und überschüssige Verdünnungslösung ist in verschlossenen Behältern zu entsorgen. Anhand der Verdünnungsreihe werden zwei Kalibrationskurven (KK) (jeweils eine KK für das Transgen und für das taxonspezifische Gen) erstellt, die jeweils 5 Punkte umfassen. Diese werden bei der PCR-Reaktion jeweils dreifach gemessen (siehe das nachstehende Beispiel). Ein Röhrchen enthält eine ausreichende Kalibratormenge für 10 KK beider Zielsequenzen, so dass mit einem Röhrchen insgesamt 100 bis 250 Proben ausgewertet werden können. Die empfohlene Probenmenge für die QRT-PCR beträgt 5  $\mu\text{L}$  Template-DNA pro PCR-Well.

Die gemessenen Fluoreszenz-Schwellenwerte (CT-Werte) werden der theoretischen Anzahl der Kopien beider Fragmente gegenübergestellt und in zwei KK eingetragen. Diese KK dienen zur Quantifizierung der genetisch veränderten Zielsequenz im Vergleich zur taxonspezifischen Zielsequenz in einer unbekannt Probe. Aus den Ergebnissen lässt sich das Verhältnis der beiden Zielsequenzen errechnen und gemäß der Empfehlung (EG) 787/2004 prozentual angeben. Zur internen Qualitätskontrolle (QK) kann eine PCR

durchgeführt werden, mit der das Durchschnittsverhältnis der gemessenen CT-Werte für die taxonspezifische und die transgene Zielsequenz beim Kalibrationspunkt 2000 cp/μL errechnet wird. Nach dem Zertifizierungsbericht sollte dieses Verhältnis bei der Simplex-PCR etwa 1,04 % betragen (erweiterte Messunsicherheit 0,06 %) (siehe auch ERM Application Note 1).

## BEISPIEL

Genomische DNA aus einer unbekannt Probe und aus ERM-BF413d (zur Qualitätskontrolle (QK)) wird mit Hilfe einer QRT-PCR analysiert, wobei ERM-AD413 als Kalibrator dient. Die CT-Werte des ERM-AD413-Kalibrators werden nach Amplifizierung des *hmg*- und MON-810-Fragments bestimmt (Tabelle 1). Bei der unbekannt Probe werden für die Amplifikation Durchschnitts-CT-Werte von 32,76 für das MON-810-Fragment und 25,44 für das *hmg*-Fragment ermittelt. Bei dem QK-Material werden Durchschnitts-CT-Werte von 31,22 für MON 810 und 22,20 für *hmg* bestimmt.

Um den MON-810-Gehalt in beiden Proben zu berechnen, sind die Steigungen und y-Achsenabschnitte der beiden Kalibrationskurven zu bestimmen, wobei von einer Geraden als geeignetster Modellfunktion auszugehen ist. Die Steigungen und y-Achsenabschnitte lassen sich mit Hilfe der eingebauten Module von Microsoft Excel oder einer sonstigen Kalibrations-/Berechnungssoftware bestimmen.

Die Steigungen (*b*) der beiden linearen Regressionslinien können

wie folgt berechnet werden: 
$$b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$$

wobei *x* die Anzahl der Kopien des amplifizierten Fragments und *y* den entsprechenden CT-Wert angibt. Die Steigungen der Kalibrationskurven des *hmg*-Fragments und des MON-810-Fragments aus Tabelle 1 betragen -3,25 bzw. -3,32.

Die y-Achsenabschnitte (*a*) der Regressionslinie errechnen sich wie folgt:  $a = \bar{y} - b\bar{x}$ , wobei  $\log(\bar{x}) = 0$ . In unserem Beispiel beträgt der Wert *a* für die *hmg*-Regressionslinie 39,26 und für die MON-810-Regressionslinie 40,93. Dabei handelt es sich um die theoretischen CT-Werte für jeweils 1 cp der beiden Fragmente. Aus der Steigung lässt sich die PCR-Effizienz ( $\epsilon$ ) wie folgt errechnen:  $\epsilon = (10^{-1/b} - 1) * 100$ . In unserem Beispiel betrug die PCR-Effizienz für die Amplifikation des MON-810-Fragments 99,7 % und für die Amplifikation des *hmg*-Fragments 103,1 %.

Die Anzahl der MON-810-Kopien (*cp*) in der unbekannt Probe errechnet sich wie folgt:  $cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}}\right)}$ , wobei  $Ct_{MON810}$ ,  $a_{MON810}$  und  $b_{MON810}$  für die CT-Werte, den y-Achsenabschnitt und die Steigung stehen, die jeweils für die Amplifizierung von MON 810 errechnet wurden. Die gleiche Berechnung wird zur Bestimmung der Anzahl von Kopien des *hmg*-Fragments durchgeführt:

$cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}}\right)}$ . In unserem Beispiel beträgt die geschätzte Durchschnittszahl der Kopien von MON 810 und *hmg* 289 bzw. 17878. Der prozentuale Gehalt an MON 810 in der unbekannt Probe ist damit:

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

ergibt die Berechnung Folgendes:  $\frac{841}{177513} \cdot cp_{MON810} * 100 = 0.47 \%$  MON 810. Unter Berücksichtigung der mit ERM-BF413d verbundenen

Unsicherheit sowie der Messunsicherheit (siehe ERM Application Note 1) kann nun geprüft werden, ob der gemessene Wert mit den zertifizierten Werten von ERM-BF413d übereinstimmt. Im obigen Beispiel stimmt das für 10000 cp (5 μL ERM-AD413 bei 2000 cp/μL) errechnete Verhältnis der Durchschnitts-CT-Werte von 1,05 mit dem auf dem ERM-AD413-Zertifikat angegebenen Richtwert von 1,04 ± 0,06 überein. Dies bedeutet, dass die GV-Quantifizierung kontrolliert erfolgt ist.

[1] Empfehlung der Kommission 2004/787/EG vom 4.10.2004 für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkte oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003, ABl. L 348 (2004), S. 18-26.

[2] ISO 21570:2005 „Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren“. Anhang D2: Ereignisspezifisches Verfahren zur relativen Quantifizierung der DNA der Maissorte MON 810 mit Hilfe der Echtzeit-PCR, S. 93-99.

<sup>1</sup> Falls sich die CT-Werte für die NTC von der Anzahl der PCR-Zyklen unterscheiden, ist von einer Kreuzkontamination oder unspezifischen Amplifizierung auszugehen.