	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10263.1 – Vyhodnocení kvalitativního stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR	Revize	0

VYHODNOCENÍ KVALITATIVNÍHO STANOVENÍ SCREENINGOVÝCH ELEMENTŮ A GENETICKÝCH MODIFIKACÍ METODOU qPCR

1 Účel a rozsah

Postup slouží k vyjádření a hodnocení výsledků kvalitativní analýzy screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR.

2 Princip

Při kvalitativní qPCR se porovnává časový průběh fluorescence zkoumaného vzorku a pozitivní kontroly CRM zaznamenaný jako amplifikační křivka.

Poznámky

- 1 *LOD, tedy limit detekce, je definován jako minimální množství nebo koncentrace analytu ve zkušebním vzorku, které může být spolehlivě detekováno.*
- 2 *Seznam použitých zkratk*
GM – genetická modifikace (cílový gen)
PCR – polymerázová řetězová reakce
qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce, real-time PCR
DNA – deoxyribonukleová kyselina, z anglického deoxyribonucleic acid
CRM – certifikovaný referenční materiál
ENV – kontrola čistoty prostředí
BT – beztemplátová kontrola
N – negativní kontrola
P – pozitivní kontrola

3 Hodnocení analýzy


Pozitivní kontrola (P) qPCR: vykazuje jasný vzestup amplifikační křivky do exponenciální fáze, následně do lineární fáze a fáze plateau.

Beztemplátová kontrola (BT), kontrola čistoty prostředí (ENV), negativní kontrola (N) qPCR: nevykazují vzestup amplifikační křivky do exponenciální fáze, následně do lineární fáze a fáze plateau.

V případě správných výsledků kontrol je možné konstatovat, že:

Vzorky negativní pro daný amplikon jsou vzorky, jejichž amplifikační křivky se nezvedají do exponenciální fáze, stejně jako negativní kontrola (N).

Vzorky pozitivní pro daný amplikon jsou vzorky, jejichž amplifikační křivky se zvedají do exponenciální fáze vůči negativní kontrole.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10263.1 – Vyhodnocení kvalitativního stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR	Revize	0

Vyjádření nejednoznačných výsledků:

V případě nejasného nebo chybného výsledku (např. kontaminace BT, ENV) je nutné daný běh amplifikace opakovat.

Výsledky paralelek vzorku musejí být shodné. Pokud je jedna paralelka vzorku pozitivní a druhá negativní, musí se daný běh amplifikace opakovat.

V případě opakovaného neshodného výsledku, je třeba provést novou izolaci DNA a následně novou amplifikaci. Pokud se při opakování izolace obě nové paralelky vzorku shodnou, zkouška se vyhodnotí podle těchto nových izolátů. Pokud ani v tomto případě nevede analýza k jednoznačným výsledkům, na protokolu se uvede, že screeningový element či GM nejsou detekovány s limitem detekce.

V případě nedostatečného množství DNA nebo neamplifikovatelnosti DNA vzorku, se na protokolu uvede, že daný parametr nebyl stanoven.

Vyjádření výsledků na protokolu:

Na protokolu se uvede výpis stanovovaných screeningových elementů a genetických modifikací s výsledkem detekován v případě pozitivního výsledku analýzy nebo nedetekován v případě negativního výsledku analýzy, popřípadě nestanoveno a důvody nestanovení. Dále se na protokolu uvede hodnota LOD.

4 Literatura

- 1 Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL): Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, 2011.
- 2 ČSN EN ISO 21570 Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů - Metody založené na kvantitativním stanovení kyseliny nukleové.
- 3 ČSN EN ISO 21571 Metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů – Extrakce nukleové kyseliny.
- 4 ČSN EN ISO 24276 Metody pro detekci modifikovaných organismů a odvozených produktů, Všeobecné požadavky a definice.