 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10265.1 – Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR	Vydání	1
		Revize	2

VYHODNOCENÍ KVANTITATIVNÍHO STANOVENÍ GENETICKÝCH MODIFIKACÍ METODOU qPCR

1 Účel a rozsah


Postup slouží k vyjádření a hodnocení výsledků kvantitativní analýzy genetických modifikací metodou qPCR.

2 Princip

Při kvantitativní qPCR se porovnává koncentrace DNA s genetickou modifikací (s cílovým genem) ku koncentraci DNA s vnitřním genem (s referenčním genem) dané plodiny. Výsledkem je procentuální vyjádření obsahu genetické modifikace ve zkoumaném vzorku.

Poznámky

- 1 *Threshold je práh detekce vznikající fluorescence.*
- 2 *Ct je počet cyklů, který vznikající fluorescence potřebuje k překročení prahu detekce.*
- 3 *Efektivita (účinnost) qPCR E (%) je dána směrnici (slope) lineárního vynesení Ct vůči dekadickému logaritmu koncentrace DNA vzorku.*
- 4 *LOD, limit detekce, je definován jako minimální množství nebo koncentrace analytu ve zkušebním vzorku, které může být spolehlivě detekováno.*
- 5 *LOQ, limit kvantifikace, je definován jako nejnižší množství nebo koncentrace analytu ve zkušebním vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti.*
- 6 *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
VG – vnitřní gen GM (referenční gen)
ENV – kontrola čistoty prostředí
BT – beztemplátová kontrola
N – negativní kontrola
P – pozitivní kontrola

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10265.1 – Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR	Vydání	1
		Revize	2

3 Postup

Po ukončení amplifikačního programu termálního cyklu se všechna získaná data upraví a vyhodnotí pomocí příslušného software dodaného k přístroji.

Zpracování a úprava získaných dat:

Po ukončení amplifikačního programu je potřeba zkontrolovat průběh všech záznamů amplifikačních křivek pro

- cílový gen (kalibrační řadu + vzorky),
- referenční gen (kalibrační řadu + vzorky).

V případě potřeby je možné vyloučit odlehlé amplifikační křivky. Z tripletu může být vyloučena max. jedna amplifikační křivka.

Manuálně se nastaví threshold, který je třeba posunout tak, aby u kalibrační řady cílového genu se vzorky a u kalibrační řady referenčního genu se vzorky procházely exponenciální částí amplifikačních křivek. V bodě protnutí thresholdu a amplifikačních křivek se vede pomyslná kolmice na souřadnici x (cykly PCR), ze které se odečtou hodnoty Ct.

Software vygeneruje dva grafy: a) graf kalibrační křivky cílového genu + vzorky,
b) graf kalibrační křivky referenčního genu + vzorky.

Pro obě kalibrační křivky software vypočte z lineární závislosti Ct na logaritmu koncentrace DNA v reakci: koeficient determinace R^2 , směrnice regresní přímky, která slouží ke stanovení efektivity qPCR.

Vygenerované (získané) hodnoty koncentrace DNA zkoumaného GM vzorku se dosadí do níže uvedeného vzorce a vypočítá se skutečný procentuální obsah GM v analyzovaném vzorku.

Výpočet obsahu zkoumaného GM vzorku

$$GM (\%) = (\text{koncentrace DNA s GM} / \text{koncentrace DNA s VG}) \times 100$$

4 Hodnocení analýzy

Kritéria validity

Níže uvedené parametry musí být splněny, určují, zda PCR proběhla úspěšně.


Směrnice regresní přímky se musí nacházet v rozmezí od -3,6 do -3,1. Tomu odpovídá efektivity qPCR od 90 % do 110 %.

Koeficient determinace (R^2) $\geq 0,98$.

Správné výsledky analýzy

Amplifikační křivky **vykazují vzestup** do exponenciální fáze, následně do fáze lineární a poté fáze plateau u:

- kalibrační řady GM (cílového genu),
- kalibrační řady vnitřního genu (referenčního genu) dané plodiny,

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10265.1 – Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR	Vydání	1
		Revize	2

- pozitivní kontroly.

Naopak amplifikační křivky **nevykazují vzestup** do fáze exponenciální u:

- beztemplátové kontroly,
- kontroly čistoty prostředí,
- negativní kontroly.

Nejednoznačné výsledky analýzy:

V případě, že jeden z výše uvedených parametrů efektivity qPCR kalibračních křivek neodpovídá kritériím nebo dojde ke kontaminaci BT, ENV, N, je nutné daný běh amplifikace opakovat.

Vyjádření výsledků na protokolu:


Na protokolu se uvádí výpis genetických modifikací, hodnoty LOD, LOQ a odhad nejistoty stanovení. Tabulka 1 popisuje čtyři alternativy, které mohou nastat při vyhodnocení výsledků analýzy, a odpovídající vyjádření daného výsledku na protokolu.

Tabulka 1. Vyjádření výsledků na protokolu o zkouškách.

Výsledek analýzy	Vyjádření výsledku na protokolu
Nebyl detekován VG dané plodiny.	Nebyl detekován referenční gen <i>např.</i> „ <i>sóji – sójový lektin</i> “.
Byl detekován VG plodiny, avšak nebyl detekován cílový gen GM.	GM nebyla detekována.
Byl detekován VG plodiny i cílový gen GM, avšak stanovená koncentrace DNA s alespoň jedním genem byla nižší než rozsah příslušné kalibrační řady, případně vypočtený obsah GM (%) byl nižší než LOQ.	GM byla detekována.
Byl detekován VG plodiny i cílový gen GM, koncentrace DNA s jedním i druhým genem byla vyšší než nejnižší bod příslušné kalibrační řady a vypočtený obsah GM (%) byl vyšší než LOQ.	Obsah GM je <i>X</i> %.

5 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.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10265.1 – Vyhodnocení kvantitativního stanovení genetických modifikací metodou qPCR	Vydání	1
		Revize	2

- 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.