

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2024**

**Ročník XXVIII, číslo 1/2024**

**Brno 2024**

## Obsah

- 1 Stanovení léčiv (amoxicilin, ampicilin a tiamulin) pro kontrolu kontaminace krmiv metodou LC-MS/MS**  
Marta Pnioková, Ladislava Benešová, Iva Křivánková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Praha,  
Za Opravnou 4, 155 06 Praha 1
- 2 Revalidace metody pro stanovení obsahu sulfonamidů (sulfamerazin, sulfadiazin, sulfametazin a sulfametoxazol) v krmivech s použitím LC-MS/MS Waters XEVO TQD**  
Eva Čurdová, Ladislava Benešová, Marta Pnioková, Iva Křivánková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Praha,  
Za Opravnou 4, 155 06 Praha 14
- 3 Zavedení kvalitativní detekce transgenů MS 11 u řepky**  
Hana Poláková Hájková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB Brno,  
Hroznová 2, 603 00 Brno 24
- 4 Zavedení kvalitativní detekce transgenů DAS 81910-7 u bavlny**  
Hana Poláková Hájková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB Brno,  
Hroznová 2, 603 00 Brno 37

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

# **Stanovení léčiv (amoxicilin, ampicilin a tiamulin) pro kontrolu kontaminace krmiv metodou LC-MS/MS**

*Marta Pnioková, Ladislava Benešová, Iva Křivánková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
OdNRL Praha, Za Opravnou 4, 155 06 Praha  
marta.pniokova@ukzuz.cz

## **1 Úvod**

V roce 1998 začala Evropská komise v souvislosti s přistoupením Švédska jednat o zákazu používání antibiotik jako doplňkových látek v krmivech pro hospodářská zvířata. Nejprve byla zakázána v roce 1999 antibiotika, která se používala současně v humánní a veterinární medicíně (tylosin, spiramycin, virginiamycin, zinc-bacitracin, avoparcin) a stimulanty růstu, které jsou považovány za potenciální karcinogeny (carbadox a olachindox). Od 1. ledna 2006 byl ve všech zemích Evropské unie vydán zákaz používání antibiotik v krmivech jako stimulantů užitečnosti v souladu s Nařízením EP a Rady (ES) č. 726/2004. Mezi zakázané antibiotické stimulanty patří konkrétně tylosin, spiramycin, virginiamycin, zinc-bacitracin, olachindox, carbadox, avilamycin, avoparcin a flavofosfolipol. Tento zákaz používání antibiotik jako růstových stimulantů v krmných směsích je potvrzen i v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 ze dne 11. prosince 2018 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES.

V roce 2019 bylo vydáno nařízení Nařízení (EU) 2019/4, o výrobě, uvádění na trh a používání medikovaných krmiv, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 a o zrušení směrnice Rady 90/167/EHS, ve kterém se věnuje ve článku 7 křížové kontaminaci v necílových krmivech. V paragrafu 3 uvádí, že k datu 28. 1. 2023 budou stanoveny maximální hodnoty pro křížovou kontaminaci. Stanovení těchto hodnot je důležité pro zamezení vzniku rezistence u některých mikroorganismů.

Evropská komise zmocnila EURL FA (Referenční laboratoř EU pro doplňkové látky v krmivech), aby doporučila analytické metody pro stanovení těchto látek. Při určování

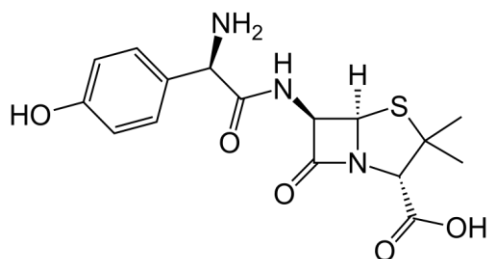
maximálních hodnot křížové kontaminace je žádoucí spolupráce a výměna informací mezi EURL, EFSA, EMA a národními autoritami při stanovení maximálních hodnot koncentrací pro křížovou kontaminaci s ohledem na jejich nebezpečnost. Kontrola křížové kontaminace léčivky bude spadat pod EURL FA.

Pro zajištění kvality a kontroly nezávadnosti krmiv je nutné sledovat jejich kontaminaci veterinárními léčivky v různých matricích. I když veterinární léčiva se nesmějí používat jako stimulatory růstu a zacházet s nimi jako s doplňkovými látkami, jsou ve stejných provozech, v jakých se vyrábí krmiva s doplňkovými látkami i medikovaná krmiva. Může tak, při nedodržení správné výrobní praxe, dojít ke křížové kontaminaci nemedikovaných krmiv nebo medikovaných krmiv necílovými léčivky.

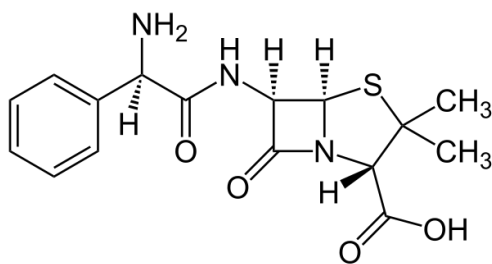
Pracoviště NRL, Oddělení Praha, se zúčastnilo validace vyvinutých metod v oblasti kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro pět zakázaných antibiotik (tylosin, spiramycin, virginiamycin, olachindox a carbadox). Pro tyto látky byla testovaná metoda LC-MS/MS validována a akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČIA) podle ČSN EN ISO 17025:2018. V současné době tato akreditovaná laboratoř stanovuje tyto zakázané stimulatory – carbadox, olachindox, virginiamycin, zinc-bacitracin, tylosin (LC-MS/MS) a amprolium, dimetridazol a nifursol (HPLC).

Mimo stimulatory mohou být krmiva kontaminována i léčivky z výroby medikovaných krmiv pro hospodářská zvířata, viz Tabulka 12 v Příloze.

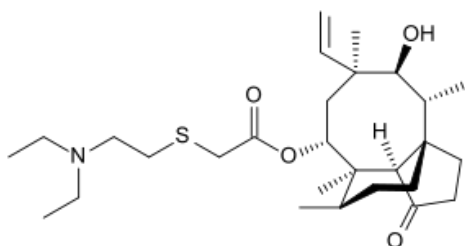
Tato práce je zaměřena na vývoj metody pro stanovení amoxicilinu, ampicilinu a tiamulinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.



Obrázek 1 Amoxicilin



Obrázek 2 Ampicilin



Obrázek 3 Tiamulin

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Princip

Vzorky krmných směsí se extrahují vodným roztokem methanolu. Naředěné extrakty se separují na reverzní fázi C18 a analyzují metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

#### 3.2 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí, např. Waters Xevo TQD.
- 2 Separační kolona, např. ACQUITY UPLC BEH C18; (50 × 2,1) mm × 1,7 μm.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 5 Laboratorní třepačka (50 – 100 kmitů/s).
- 6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou, 1500 g.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.

### 3.3a Chemikálie – Metoda a (tiamulin)

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1a Methanol, CH<sub>3</sub>OH, pro HPLC.
- 2a Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, pro HPLC.
- 3a Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 4a Kyselina mravenčí, HCOOH, 98 %, pro hmotnostní spektrometrii.
- 5a Methanol, CH<sub>3</sub>OH, 90% roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se smíchá 900 ml methanolu (1a) a 100 ml ultračisté vody (3a). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

- 6a Methanol, CH<sub>3</sub>OH, 50% roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se smíchá 500 ml methanolu (1a) s 500 ml ultračisté vody (3a). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

- 7a Základní standardní látka s deklarovanou čistotou.

Tiamulin, C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>4</sub>S, Mr = 493.74, CAS 55297-96-6.

- 8a Mobilní fáze A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml ultračisté vody (3a) a 1 ml kyseliny mravenčí (4a), doplní se vodou (3a) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

- 9a Mobilní fáze B: 0,1% roztok kyseliny mravenčí v methanolu.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml methanolu (1a) a 1 ml kyseliny mravenčí (4a), doplní se methanolem (1a) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

### 3.3b Chemikálie – Metoda b (amoxicilin a ampicilin)

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1b Methanol, CH<sub>3</sub>OH, pro HPLC.
- 2b Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 3b Kyselina mravenčí, HCOOH, 98 %, pro hmotnostní spektrometrii.

- 4b Methanol, CH<sub>3</sub>OH, 90% roztok.  
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se smíchá 900 ml methanolu (1b) a 100 ml ultračisté vody (2b). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.
- 5b Methanol, CH<sub>3</sub>OH, 20% roztok.  
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se smíchá 200 ml methanolu (1b) a 800 ml ultračisté vody (2b). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.
- 6b Okyselený metanol 1 % kyseliny mravenčí.  
Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se nalije asi 50 ml methanolu (1b), připipetuje se 1 ml kyseliny mravenčí (3b) a doplní po značku methanolem. Roztok se promíchá.
- 7b Základní standardní látky s deklarovanou čistotou.  
Amoxicilin C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S·3H<sub>2</sub>O, Mr = 419,45, CAS 61336-70-7.  
Ampicilin C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S·3H<sub>2</sub>O, Mr = 403,45, CAS 7177-48-2.
- 8b Mobilní fáze A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě.  
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml ultračisté vody (2b) a 1 ml kyseliny mravenčí (3b), doplní se vodou (2b) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.
- 9b Mobilní fáze B: 0,1% roztok kyseliny mravenčí v methanolu  
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml methanolu (1b) a 1 ml kyseliny mravenčí (3b), doplní se methanolem (1b) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě do vypořebenání.

## 4 Postup

### Metoda a

#### 4.1a Příprava standardních roztoků

Kalibrace se provádí před každým měřením.

##### **Tiamulin - zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 2 mg tiamulinu (7a) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní se acetonitrilem (2a) po značku. Při výpočtu výsledné

koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně 6 měsíců.

$c(\text{tiamulin}) \doteq 0,2 \text{ g/l}$ .

#### **Pracovní standardní roztok I**

Do 10ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství zásobního roztoku tiamulinu tak, aby výsledná koncentrace byla 10 mg/l a doplní po značku methanolem (1). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně 3 měsíce.

$c(\text{tiamulin}) = 10 \text{ mg/l}$ .

#### **Pracovní standardní roztok II**

Do 10ml odměrné baňky se odměří 1 ml pracovního standardního roztoku I a doplní po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$c(\text{tiamulin}) = 1 \text{ mg/l}$ .

### **4.2a Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky**

Do 10ml odměrných baněk se podle Tabulky 1a odměří odpovídající množství pracovního standardního roztoku II a doplní se asi 1 cm pod značku 50% methanolem (6a). Po promíchání a vytemperování se doplní 50% methanolem (6a) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,003 - 0,2) mg/l. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením. Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem.

**Tabulka 1a. Příprava kalibračních roztoků.**

Odměrná baňka 10 ml	1	2	3	4	5	6	7
Pracovní standardní roztok II (ml)	0,03	0,08	0,16	0,4	0,8	1,2	2,0
Koncentrace analytu (mg/l)	0,003	0,008	0,016	0,040	0,080	0,120	0,200

Lze použít i interní kalibraci u sporných vzorků s významným matričním efektem.

### **4.3a Extrakce léčiv ze vzorků**

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností 0,01 g a přidá se 25 ml 90% methanolu (5a). Zkumavka se uzavře a třepe se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 30 min při cca 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí



20 min při 1500 g na odstředivce s nastavenou teplotou 20 °C. Po vytemperování obsahu centrifugační zkumavky na laboratorní teplotu (zpravidla je dostatečná doba 10 min) se ze supernatantu pipetuje do 10ml odměrné baňky vhodný alikvot. Odměrná baňka se doplní po značku 50% methanolem (6a) podle Tabulky 1c a po promíchání se převede do vialky. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného referenčního materiálu.

## **Metoda b**

### **4.1b Příprava standardních roztoků**

Kalibrace se provádí před každým měřením. Připraví se zásobní standardní roztoky obou analytů a jejich směsné pracovní roztoky.

#### **Amoxicilin - zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 2 mg amoxicilinu (7b) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní se okyseleným methanolem (6b) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní týden.

$c(\text{amoxicillin}) \doteq 0,2 \text{ g/l}$ .

#### **Ampicilin - zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 2 mg ampicilinu (7b) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní se okyseleným methanolem (6b) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní týden.

$c(\text{ampicilin}) \doteq 0,2 \text{ g/l}$ .

#### **Směsný pracovní standardní roztok I**

Do 10ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství zásobního roztoku amoxicilinu a ampicilinu tak, aby výsledná koncentrace byla 10 mg/l a doplní po značku okyseleným methanolem (6b). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní 3 dny.

$c(\text{analyt}) = 10 \text{ mg/l}$ .

## Směsný pracovní standardní roztok II

Do 10ml odměrné baňky se odměří 1 ml směsného pracovního standardního roztoku I a doplní po značku okyseleným methanolem (6b). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$c(\text{analyt}) = 1 \text{ mg/l}$ .

### 4.2b Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky

Do 10ml odměrných baněk se podle Tabulky 1b odměří odpovídající množství směsného pracovního standardního roztoku II a doplní se asi 1 cm pod značku 20% methanolem (5b). Po promíchání a vytemperování se doplní 20% methanolem (5b) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,003 - 0,2) mg/l. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením. Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem.

#### *Poznámka 1*

Dobré vlastnosti píku u těchto analytů jsou podmíněny koncentrací methanolu.

**Tabulka 1b. Příprava kalibračních roztoků.**

Odměrná baňka 10 ml	1	2	3	4	5	6	7
Prac. standardní roztok II (ml)	0,03	0,08	0,16	0,4	0,8	1,2	2,0
H <sub>2</sub> O (2b) (ml)	-	-	-	-	-	3,8	8,0
20% methanol (5b) (ml)	doplní se do 10 ml					5	-
Koncentrace analytu (mg/l)	0,003	0,008	0,016	0,040	0,080	0,120	0,200

Lze použít i interní kalibraci u sporných vzorků s významným matričním efektem.

### 4.3b Extrakce léčiv ze vzorků

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 2 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností 0,01 g a přidá se 25 ml 90% methanolu (4b). Zkumavka se uzavře a třepa se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 20 min při asi 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 20 min při 1500 g na odstředivce s nastavenou teplotou 20 °C. Po vytemperování obsahu centrifugační zkumavky na laboratorní teplotu (zpravidla je dostatečná doba 10 min) se ze supernatantu pipetuje do 10ml odměrné baňky vhodný alikvot. Odměrná baňka se doplní po značku 20% methanolem (5b) podle Tabulky 1c a po promíchání se převede do vialky.

V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného referenčního materiálu.

**Tabulka 1c. Ředění extraktů krmiv.**

	Deklarace (mg/kg)	Ředění
Krmiva	< 10	10 ×
	10 – 100	100 ×
	> 100	1000 ×

**Pro obě metody**

#### **4.4 Vlastní stanovení léčiv ve vzorcích**

Stanovení se provádí za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v Tabulkách 2 až 4. Parametry stanovení platí pro sestavu LC-MS/MS Waters Xevo TQD a slouží jako příklad nastavení instrumentace.

**Tabulka 2. Chromatografické parametry stanovení.**

Kolona	např. ACQUITY UPLC BEH C18; (50 × 2,1) mm × 1,7 μm.
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (8) a mobilní fáze B (9) podle Tabulky 3
Celková doba analýzy	6 min
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	5 μl

**Tabulka 3. Gradientový program pro analýzu.**

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
0,54	100	0
0,6	90	10
4,20	80	20
5,0	0	100
5,3	100	0
6,0	100	0

**Tabulka 4. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.**

Analyt	Retenční čas (min)
Ampicilin	4,15
Amoxicilin	1,52
Tiamulin	5,02

**Parametry stanovení MS**

Pro identifikaci jednotlivých analytů se používá MRM mód (multiple reaction monitoring), sledování produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daných produktových iontů maximální, jsou uvedeny v Tabulce 5. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v Tabulce 6.

**Tabulka 5. Příklad parametrů MS detektoru.**

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,0 kV
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	600 l/h
Cone gas flow	50 l/h
CID gas	argon, p = 0,5 bar

**Tabulka 6. Příklad MRM parametrů pro analýzu jednotlivých analytů v krmivech.**

Prekurzorový iont (m/z)		Cone voltage (V)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Amoxicilin	366,1	20	113,9	28
			349,0	12
Ampicilin	350,1	22	105,8	20
			191,9	21
Tiamulin	494,2	40	119,0	47
			192,0	28

## 5 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah léčiva (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu:

$$X = \frac{c \times V \times R}{m},$$

kde

c je koncentrace léčiva ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

V objem extrakční směsi v ml, v tomto postupu 25 ml,

m hmotnost zkušebního vzorku v g,

R ředění, resp. zakoncentrování.

## 6 Validace

Metoda byla validována pro pracovní rozsah (0,2 – 10) mg/kg. Tento pracovní rozsah byl odvozen od požadované meze pro stanovení kontaminace krmiv léčivy.

Pro vyhodnocení validačních parametrů byl použit software Effvalidation 4,0.

Vstupní data viz Validační zpráva 1/2022 a 2/2022.

## 7 Závěr

Byly úspěšně vyvinuty metody stanovení léčiv v krmivech technikou LC-MS/MS. Zavedení těchto metod umožní sledovat, jak obsah léčiv v medikovaných krmivech, tak křížovou kontaminaci pro tato léčiva v nemedikovaných krmivech nebo v medikovaných krmivech necílovými léčivy.

V současné době probíhá podle požadavků evropské unie monitoring křížové kontaminace léčivy u 16 konkrétních látek a maximální limit pro křížovou kontaminaci léčivy byl určen jako 1 % z nejnižšího povoleného dávkovaného množství léčiva v medikovaném krmivu, viz Tabulka 7 v Příloze.

Bylo rozhodnuto provést validaci na čtyřech koncentračních hladinách – pro mez stanovitelnosti 0,5 a pro koncentraci 1 mg/kg, 4 mg/kg a 10 mg/kg u amoxicilinu a ampicilinu

a pro mez stanovitelnosti 1 mg/kg a pro koncentrace 4 mg/kg, 10 mg/kg a 100 mg/kg u tiamulinu.

Postupy mohou být rozšiřovány a validovány pro nižší koncentrační hladiny. Kalibrační křivky bez maticních vlivů vykazují linearitu v rozsahu 0,003 mg/l až 0,2 mg/l. Pro nižší koncentrace je však i přesto vhodné použít postup s maticí kalibrací nebo metodu standardního přídatku.

Byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce a stanovitelnosti pro koncentrace odpovídající předpokládaným koncentracím křížových kontaminací.

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřovaných metod k používání v rámci cíleného monitoringu léčiv v předem určeném kalibračním rozsahu.

## 8 Literatura

- 1 Zákon o krmivech č. 91/1996 Sb., § 3
- 2 Rozhodnutí Komise 2002/657/EC ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků.
- 3 J. J. Dibner, J. D. Richards: Antibiotic Growth in Agriculture: History and Mode of Action. Poultry Science Association, Inc ,2005, 84, 634-643.
- 4 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 767/2009 ze dne 13. července 2009 o uvádění na trh a používání krmiv, o změně nařízení (ES) č. 1831/2003 a o zrušení směrnice Rady 79/373/EHS, směrnice Komise 80/511/EHS, směrnice Rady 82/471/EHS, 83/228/EHS, 93/74/EHS, 93/113/ES a 96/25/ES a rozhodnutí Komise 2004/217/ES.
- 5 M. Douša, R. Hosmanová: Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 37, 2, 373-377.
- 6 Nařízení Komise (EU) č. 574/2011 ze dne 16. června 2011, kterým se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES.
- 7 K. George, U. Vincent, C. von Holst: Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1293 (2013), 60-74, rozšířeno 2018.
- 8 E. Patyra, C. Nebot, R. E. Gavilán, A. Cepeda, K. Kwiatek: Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of tiamulin, trimethoprim, plosin, sulfadiazine and sulfamethazine in medicated feed, Food Additives and Contaminants: Part A, 2018, DOI: 10.1080/19440049.2018.1426887.
- 9 Centner V. Uživatelská příručka *EffiValidation 4.0*, EffiChem, 2018.
- 10 ÚKZÚZ JPP ZK 10637.1.

- 11 ÚKZÚZ JPP ZK 10638.1.
- 12 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 ze dne 11. prosince 2018 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES.
- 13 Nařízení (EU) 2019/4, o výrobě, uvádění na trh a používání medikovaných krmiv, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 a o zrušení směrnice Rady 90/167/EHS.

**Příloha:**

**Tabulka 7**

Aktivní látka	Obvyklé dávkování v mg/kg v kompletních krmných směsích	Max hodnoty pro cross-kontaminací v mg/kg v nemedikovaných krmivech
Amoxicilin	Pigs: 250 – 500 Poultry: 100 – 200	1
Apramycin	100	1
Chlortetracycline	300 – 600	3
Colistin	Pigs: 120 – 150 Poultry: 50	0,5
Doxycycline	250	2,5
Flubendazole	7,5 – 30	0,1
Lincomycin	44 – 110 – 220 44 při použití se spectinomycinem	0,5
Neomycin	100 – 500	1
Spectinomycin	44	0,5
Sulfonamides	200 – 2000	2
Tetracyclines (OTC+CTC)	400 – 800	4
Tiamulin	100 – 200	1
Tilmicosin	200 – 400	2
Trimethoprim	40 – 150	0,5
Tylosin	100	1
Valnemulin	75 – 200	0,75
Ostatní látky		1 % z nejnižšího povoleného dávkovaného množství pro medikovaná krmiva

# **Revalidace metody pro stanovení obsahu sulfonamidů (sulfamerazin, sulfadiazin, sulfametazin a sulfametoxazol) v krmivech s použitím LC-MS/MS Waters XEVO TQD**

*Eva Čurdová, Ladislava Benešová, Marta Pnioková, Iva Křivánková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Praha,  
Za Opravnou 4, 155 06 Praha  
ladislava.benesova@ukzuz.cz

## **1 Úvod**

V roce 1998 začala Evropská komise v souvislosti s přistoupením Švédska jednat o zákazu používání antibiotik jako doplňkových látek v krmivech pro hospodářská zvířata. Nejprve byla zakázána v roce 1999 antibiotika, která se používala současně v humánní a veterinární medicíně (tylosin, spiramycin, virginiamycin, zinkbacitracin, avoparcin) a stimulanty růstu, které jsou považovány za potenciální karcinogeny (carbadox a olachindox). Od 1. ledna 2006 byl ve všech zemích EU vydán zákaz používání antibiotik v krmivech jako stimulantů užitkovosti v souladu s Nařízením EP a Rady (ES) č. 726/2004. Mezi zakázané antibiotické stimulanty patří konkrétně tylosin, spiramycin, virginiamycin, zinkbacitracin, olachindox, carbadox, avilamycin, avoparcin a flavofosfolipol. Tento zákaz používání antibiotik jako růstových stimulantů v krmných směsích je potvrzen i v novém Nařízení EP a Rady (EU) 2019/6 ze dne 11. prosince 2018 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES.

Nově je třeba věnovat také zvýšenou pozornost medikovaným krmivům a možnosti křížové kontaminace nemedikovaných krmiv a také medikovaných krmiv necílovými léčivy, zejména z důvodu vzniku antimikrobiální rezistence u zvířat i lidí.

V roce 2019 bylo vydáno Nařízení (EU) 2019/4, o výrobě, uvádění na trh a používání medikovaných krmiv, o změně Nařízení EP a Rady (ES) č. 183/2005 a o zrušení směrnice Rady 90/167/EHS, ve kterém se věnuje ve článku 7 křížové kontaminaci v necílových krmivech. V paragrafu 3 uvádí, že k datu 28. 1. 2023 budou stanoveny maximální hodnoty pro křížovou kontaminaci (Příloha č.1).



Evropská komise zmocnila EURL FA, aby doporučila analytické metody pro stanovení těchto látek. Při určování maximálních hodnot křížové kontaminace je žádoucí spolupráce a výměna informací mezi EURL, EFSA, EMA a národními autoritami při stanovení maximálních hodnot koncentrací pro křížovou kontaminaci s ohledem na jejich nebezpečnost.

Pro zajištění kvality a kontroly nezávadnosti krmiv je nutné sledovat jejich kontaminaci veterinárními léčivy v různých matricích. I když veterinární léčiva se nesmí používat jako stimulanty růstu a zacházet s nimi jako s doplňkovými látkami (DL), jsou ve stejných provozech, v jakých se vyrábí krmiva s DL i medikovaná krmiva. Tak by mohlo při nedodržení správné výrobní praxe dojít ke kontaminaci následně vyráběného krmiva.

V roce 2001 byl zahájen projekt “Screening and Identification Methods for Official Control of Banned Antibiotics and Growth Promoters in Feedingstuffs“ (SIMBAC FEED), podporovaný Evropskou komisí, Generální ředitelství pro výzkum, v rámci pátého rámcového programu pro konkurenceschopný a udržitelný růst (GROWTH), Contract no. G6RD-CT-2000-00413. V rámci tohoto projektu byly testovány metody stanovení antibiotických léčiv pomocí mikrobiologických, elektroforetických, tenkovrstvých a chromatografických metod. Výstupem tohoto projektu byly metody pro stanovení sedmi antibiotických stimulantů růstu (avoparcin, spiramycin, tylosin, virginiamycin and zinkbacitracin, carbadox and olaquinox) s požadovanými mezemi stanovitelnosti – 1 mg/kg pro antibiotika a 3 mg/kg pro stimulanty. Projekt byl dokončen v roce 2005 a validace byla provedena na různých typech krmiv pro hospodářská zvířata.

Pracoviště OdnRL Praha se zúčastnilo validace vyvinutých metod v oblasti kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro pět zakázaných antibiotik (tylosin, spiramycin, virginiamycin, olachindox a carbadox). Pro tyto látky byla testovaná metoda LC-MS/MS validována a akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČIA) podle ČSN EN ISO 17 025:2018.

V současné době tato akreditovaná laboratoř stanovuje tyto zakázané stimulanty – carbadox, olachindox, virginiamycin, zinkbacitracin, tylosin (LC-MS/MS) a amprolium, dimetridazol a nifursol (HPLC).

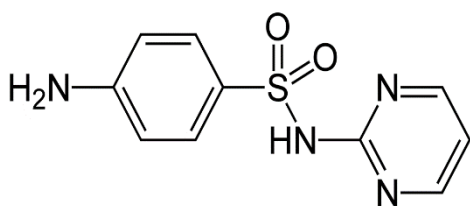
Mimo stimulantů mohou být krmiva kontaminována i léčivy z výroby medikovaných krmiv pro hospodářská zvířata. K výrobě těchto medikovaných krmiv se používají léčiva: tylvalosin (makrolidové antibiotikum), amoxicilin, chlortetracyklin, doxycyklin, sulfamerazin, tiamulin,

ampicilin, cloxacilin, colistinum, spectinomycin, (antibakteriální léčiva) a ivermectin (endektoparazitikum). Pro bažantí a koroptví kuřata se používá flubendazol a pro spárkatou zvěř mebendazol, rafoxanid (chlorované salicylanilidy) a ivermectin (antiparazitika).

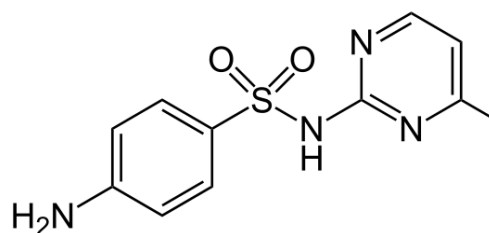
V rámci cílené kontroly kontaminace krmiv léčivy sleduje ústav následující léčiva: tetracyklin (TC), chlortetracyklin (CTC), doxycyklin (DOX), sulfonamidy (sulfamerazin, sulfadiazin, sulfametazin, sulfametoxazol) a tylosin.

Tato práce se zaměřila na vývoj metody pro stanovení sulfonamidů metodou LC-MS/MS.

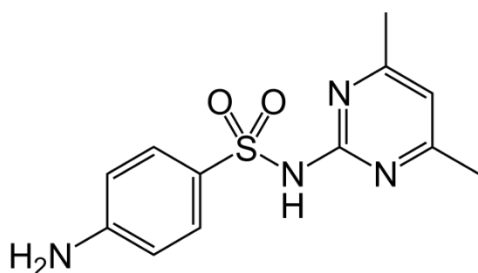
### Sulfadiazin



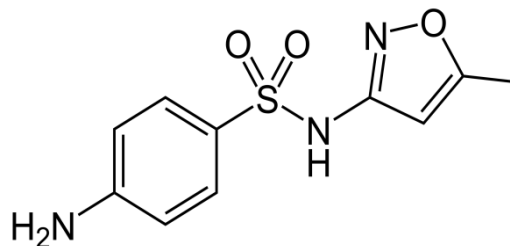
### Sulfamerazin



### Sulfametazin



### Sulfametoxazol



## 2 Materiál a metody

### 2.1 Princip metody

Vzorky krmných směsí se extrahují methanolem na třepačce. Extrakt se odstředí a vhodně naředí. Po naředění se vzorky analyzují na reverzní fázi C18 metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí v módu sledování vybraných přechodů (MRM).

## 2.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, HPLC čistoty.
- 2 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 3 Kyselina mravenčí pro hmotnostní spektrometrii 98 %,  $M_r = 46,03$
- 4 Základní standardní látky.

Sulfadiazin C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S, CAS 68-35-9,  $M_r = 250,278$ .

Sulfamerazin C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S, CAS 127-79-7,  $M_r = 264,305$ .

Sulfametazin (Sulfadimidin) C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S, CAS 57-68-1,  $M_r = 278,33$ .

Sulfametoxazol C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S, CAS 723-46-6,  $M_r = 253,279$ .

- 5 Mobilní fáze A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml ultračisté vody (2) a 1 ml kyseliny mravenčí (3), doplní se vodou (2) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

- 6 Mobilní fáze B: methanol + 0,1% kyselina mravenčí.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml methanolu (1) a 1 ml kyseliny mravenčí (3), doplní se methanolem (1) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

- 7 Extrakční roztok: 50% methanol

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 500 ml methanolu (1) a 500 ml vody (2). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

## 2.3 Přístroje a pomůcky

- 1 UPLC s MS/MS detekcí, Waters XEVO TQD.
- 2 Separační kolona, ACQUITY UPLC BEH C-18; 1,7 μm, (50 × 2,1) mm nebo jiná vhodná.
- 3 Ultrazvuková lázeň.

- 4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 5 Laboratorní třepačka (150–180 kmitů/s).
- 6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.
- 8 Centrifugační PE zkumavky.

## 3 Postup

### 3.1 Příprava standardních roztoků

#### **Sulfadiazin – zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 25 mg sulfadiazinu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfadiazin}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

#### **Sulfamerazin – zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 25 mg sulfamerazinu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfamerazin}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

#### **Sulfametazin – zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 25 mg sulfametazinu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfametazin}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

### **Sulfametoxazol – zásobní standardní roztok**

Naváží se přesně asi 25 mg sulfametoxazolu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfametoxazol}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

### **Směsný pracovní standardní roztok I**

Do 25ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství od každého jednotlivého zásobního roztoku (sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin a sulfametoxazol) tak, aby výsledná koncentrace byla 50 mg/l a doplní po značku methanolem (1). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{analyt}) = 50 \text{ mg/l.}$$

### **Směsný pracovní standardní roztok II**

Do 10ml odměrné baňky se odměří 2 ml směsného pracovního standardního roztoku I a doplní po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$$c(\text{analyt}) = 10 \text{ mg/l.}$$

### **Směsný pracovní standardní roztok III**

Do 10ml odměrné baňky se odměří 1 ml směsného pracovního standardního roztoku II a doplní po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$$c(\text{analyt}) = 1 \text{ mg/l.}$$

## **3.2 Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky**

Do 10ml odměrných baněk se podle tabulky 1 odměří odpovídající množství směsného pracovního standardního roztoku III a doplní se asi 1 cm pod značku extrakčním roztokem (7). Po promíchání a vytemperování se doplní extrakčním roztokem (7) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,0015–0,2) mg/l. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením.

Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem. Na základě kalibrační křivky vyhodnocovací program vypočte obsah analytu ve vzorcích.

**Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků do 10ml odměrných baněk.**

Odměrná banka číslo	1	2	3	4	5	6	7	8
Objem směsného pracovního standardního roztoku III (ml)	0,015	0,03	0,08	0,16	0,4	0,8	1,2	2,0
Koncentrace analytu (mg/l)	0,0015	0,003	0,008	0,016	0,040	0,080	0,120	0,200

### 3.3 Extrakce sulfonamidů ze vzorků

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností  $\pm 0,002$  g a přidá se 25 ml extrakčního roztoku (7). Zkumavka se uzavře zátkou a třepe se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 20 min při (150 – 180) kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 20 min při teplotě 20 °C při 1500 g. Po odstředění se vytemperuje na laboratorní teplotu, naředí se podle potřeby extrakčním roztokem (7) a převede se do vialky. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného IRM.

### 3.4 Vlastní stanovení sulfonamidů ve vzorcích

Stanovení se provádí za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v tabulkách 2 až 4. Parametry stanovení platí pro sestavu UPLC-MS/MS Waters XEVO TQD a slouží jako příklad nastavení instrumentace. Tyto parametry stanovení se mohou změnit použitím jiné vhodné kolony nebo jiné přístrojové sestavy LC-MS/MS.

**Tabulka 2. Chromatografické parametry stanovení - příklad.**

Kolona	ACQUITY UPLC BEH C-18; 1,7 $\mu$ m, (50 $\times$ 2,1) mm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A a mobilní fáze B podle tabulky 3
Celková doba analýzy	6 min
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	2,0 $\mu$ l

**Tabulka 3. Příklad gradientového programu pro analýzu.**

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
0,54	100	0
0,6	90	10
4,2	80	20
5,0	0	100
5,3	100	0
6,0	100	0

Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek jsou v tabulce 4.

**Tabulka 4. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.**

Analyt	Retenční čas (min)
Sulfadiazin	1,54
Sulfamerazin	2,03
Sulfametazin (Sulfadimidin)	2,70
Sulfametoxazol	3,53

### Parametry stanovení MS

Pro identifikaci jednotlivých analytů se použije MRM mód (multiple reaction monitoring), sledování produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu [5]. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daných produktových iontů maximální, jsou uvedeny v tabulce 5. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v tabulce 6.

**Tabulka 5. Příklad parametrů MS detektoru.**

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,00 kV
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	450 °C
Desolvation gas flow	1000 l/h
Cone gas flow	50 l/h
CID gas	argon, p = 0,5bar

**Tabulka 6. Příklad MRM parametrů pro analýzu jednotlivých analytů v krmivech.**

Prekurzorový iont (m/z)		Cone voltage (V)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Sulfadiazin	251,4	28	92,0	29
			108,0	30
			156,0	20
Sulfamerazin	265,1	35	92,0	31
			108,0	27
			156,8	20
			172,0	20
Sulfametazin (Sulfadimidin)	279,1	40	92,0	35
			108,0	27
			124,0	22
			155,9	22
			186,0	18
Sulfametoxazol	254,0	33	91,9	30
			107,9	30
			156,1	18

LC-MS podmínky byly optimalizovány tak, aby jednotlivé analyty byly spolehlivě identifikovány a kvantifikovány.

## 4 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah jednotlivých léčiv ( $X$ ) vyjádřených v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

$c$  je koncentrace léčiva ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

$V$  objem extrakční směsi v ml, v tomto postupu 25 ml,

$m$  hmotnost zkušebního vzorku v g, v tomto postupu 1,000 g,

$R$  ředění, resp. zkoncentrování.



## 5 Validace

Metoda byla validována pro pracovní rozsah (0,2–10) mg/kg. Tento pracovní rozsah byl odvozen od požadované meze pro stanovení kontaminace krmiv sulfonamidy.

Byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce a stanovitelnosti pro koncentrace odpovídající předpokládaným koncentracím křížových kontaminací.

Pro vyhodnocení validačních parametrů byl použit software EffiValidation 4,0.

## 6 Závěr

V rámci této práce byl aktualizován pracovní postup pro extrakci a měření obsahu sulfonamidů v krmivech.

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v rámci cíleného monitoringu léčiv v předem určeném kalibračním rozsahu.

Multireziduální metoda stanovení sulfonamidů v krmivech technikou LC-MS/MS byla úspěšně revalidována. Zavedení této metody umožní sledovat křížovou kontaminaci pro tuto skupinu sulfonamidů dávkovaných do medikovaných krmiv.

## 7 Literatura

- 1 Zákon o krmivech č. 91/1996 Sb., § 3
- 2 Nařízení komise (EU) č. 767/2009
- 3 Nařízení Evropského parlamentu (EP) č. 726/2004
- 4 Nařízení Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018
- 5 Nařízení Evropského parlamentu (EP) č. 183/2005
- 6 ÚKZÚZ JPP ZK 10622.1
- 7 Centner V. Uživatelská příručka EffiValidation 4.0, EffiChem, 2021

# Zavedení kvalitativní detekce transgenu MS 11 u řepky

*Hana Poláková Hájková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

OdMB Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno

Hana.PolakovaHajkova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je organismus, jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Dotčené techniky jsou uvedeny v Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb.

Geneticky modifikované (GM) plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií. Jedná se o šlechtitelské metody z oblasti biotechnologií, které mimo jiné umožňují mezidruhový přenos genů. Nejedná se však o tvorbu a vnášení uměle vytvořených genů.

MS 11 je geneticky modifikovaná řepka, jejíž DNA obsahuje gen *barnase*, gen *bar* a gen *barstar*. V případě genu *barnase* byl zdrojem *Bacillus amyloliquefaciens*, produktem je *barnase* ribonuclease enzym a výsledkem je narušení produkce RNA v buňkách prašníků, tím vzniká samčí sterilita.

V případě genu *bar* byl zdrojem *Streptomyces hygroscopicus*, produktem je fosfinothricin N-acetyltransferáza (PAT). Modifikovaná plodina vykazuje toleranci vůči herbicidu glufosinátu amonnému.

V případě genu *barstar* byl opět zdrojem *Bacillus amyloliquefaciens*. Jeho funkcí je inhibovat ribonukleázovou aktivitu *barnase* genu, se kterým tvoří pevně vázaný komplex v buňce.



**Obrázek č. 1. Schéma genového konstruktů modifikované řepky MS11 s místem hybridizace specifických primerů SHA086 a MDB371.**

Cílem práce je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u řepky o kvalitativní stanovení MS 11 a určení meze detekce stanovení.

Součástí zavádění stanovení transgenu MS 11 bude ověření detekce screeningových elementů T-NOS a bar.

## **2 Princip**

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí amplikonu na agarózovém gelu.

## **3 Materiál a metody**

Pro zavedení byly použity dva certifikované referenční materiály (CRM) American Oil Chemist's Society (AOCS), které byly dodány ve formě genomové DNA izolované z listů (CRM 10/2021) a ve formě řepkového semene (CRM 5/2006).

AOCS 1116-A, Ms11 canola leaf tissue genomic DNA, > 999,99 ng/μg , laboratorní označení CRM 10/2021.

AOCS 0304-A, Ms11 canola seed, non modified, laboratorní označení CRM 5/2006. Tento referenční materiál byl již dříve upraven a zhomogenizován do formy řepkové mouky.

Vzhledem k charakteru referenčních materiálů byla izolace DNA provedena pouze u CRM 5/2006 pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů tohoto CRM byla změřena koncentrace a otestována kvalita DNA.

CRM 10/2021 byl ve formě již vyextrahované DNA z listů řepky o dané koncentraci, jejíž hodnota byla uvedena v certifikátu. DNA obou referenčních materiálů byla otestována na amplifikovatelnost. Následně pak byly CRM naředěny na koncentraci 5 a 10 ng/μl.

### **3.1 Přístroje a pomůcky**

#### **Extrakce DNA**

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Přenosná UV lampa.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu$ l, špičky s filtrem.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2-2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

#### **Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza**

Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230 nm, 260 nm, 280 nm).

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pH metr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu$ l, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2-2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

#### **PCR reakce – amplifikace**

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cykler.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

### **3.2 Chemikálie**

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

**Extrakce DNA: NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv**

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

#### **Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza**

Agaróza pro molekulární biologii.

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ Load™ Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free).

### **PCR reakce – amplifikace**

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq)

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>.  
PCR voda.

### **Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů .**

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech:

VG řepky: MDB510 / MDB511

F: GGC CAG GGT TTC CGT GAT

R: CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG

T-NOS: NOS-1/NOS-3

F: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG

R: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA

Bar: RapB-F1/ RapB-R1

F: ACA AGC ACG GTC AAC TTC C

R: GAG GTC GTC CGT CCA CTC

MS 11: SHA086 / MDB371

F: GGC CAG GGT TTC CGT GAT

R: CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG

### 3.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR – kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO, JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

**Tabulka 1. Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR), vnitřní gen řepky, screening bar, screening T-NOS a MS11.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2x	1x	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	50 ng	5
Objem směsi vč. templátu			25

#### Vnitřní gen řepky (kruciferin A)

primery: MDB510 / MDB511

délka amplikonu: 101 bp

**Tabulka č. 2. Amplifikační program vnitřní gen řepky.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
<b>počáteční denaturace</b>	95	600	1
<b>denaturace</b>	95	15	40
<b>annealing a extenze</b>	60	60	

#### T-NOS

primery: NOS-1 / NOS-3

délka amplikonu: 180 bp

**Tabulka č. 3. Amplifikační program T-NOS.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
<b>počáteční denaturace</b>	94	60	1
<b>denaturace</b>	94	58	40
<b>annealing</b>	57,5	120	
<b>extenze</b>	72	105	
<b>závěrečná extenze</b>	72	180	1

**Bar**

primery: RapB-F1/ RapB-R1

délka amplikonu: 60 bp

**Tabulka č. 4. Amplifikační program bar.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
<b>počáteční denaturace</b>	95	900	1
<b>denaturace</b>	95	10	45
<b>annealing a extenze</b>	60	60	

**MS 11**

primery: SHA086 / MDB371

délka amplikonu: 124 bp

**Tabulka č. 5. Amplifikační program MS 11.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
<b>počáteční denaturace</b>	95	600	1
<b>denaturace</b>	95	15	45
<b>annealing a extenze</b>	60	60	



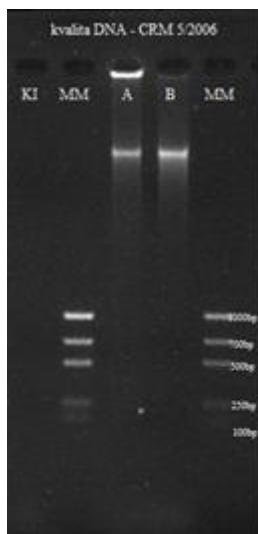
## 4 Výsledky a diskuse

### Kvalita DNA

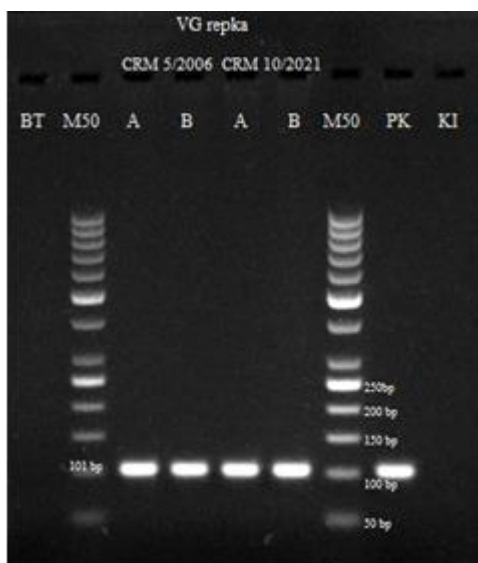
Pro zavádění byla extrahována DNA z CRM GM nemodifikované řepky (CRM 5/2006). Referenční materiál CRM 10/2021 byl dodán ve formě vyextrahované DNA z listů o koncentraci 271,1 ng/μl. U izolátů CRM 5/2006 byla změřena koncentrace (tabulka č. 6) a otestována kvalita na agarózovém gelu (obrázek 2). Amplifikovatelnost DNA byla testována na vnitřním genu řepky (kruciferin A) u obou referenčních materiálů (obrázek 3).

**Tabulka č. 6. CRM 5/2006 – hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

CRM		Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/230
Řepka CRM 5/2006	A	22,6	1,96	2,03
Izolace 4.11. 2021	B	23	1,97	2,05



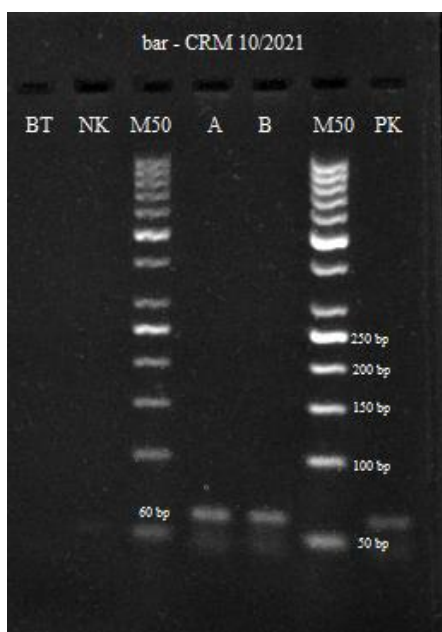
**Obrázek č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 5/2006 izoláty A, B. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.**



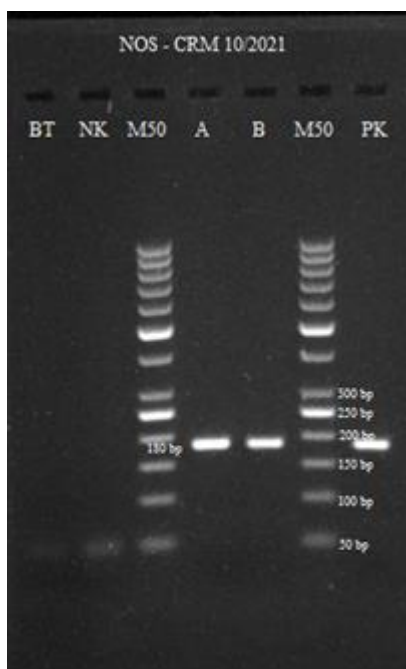
**Obrázek č. 3. Vnitřní gen řepky (101bp) - CRM 5/2006, (A,B), CRM 10/2021 (A,B), BT – beztemplátová kontrola, M50 – DNA marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-pozitivní kontrola CRM 4/2015.**

## Screening

U CRM 10/2021 bylo provedeno stanovení screeningových elementů bar a T-NOS s pozitivním výsledkem. CRM 5/2006 byl použit jako negativní kontrola NK (obrázek č. 4, 5)



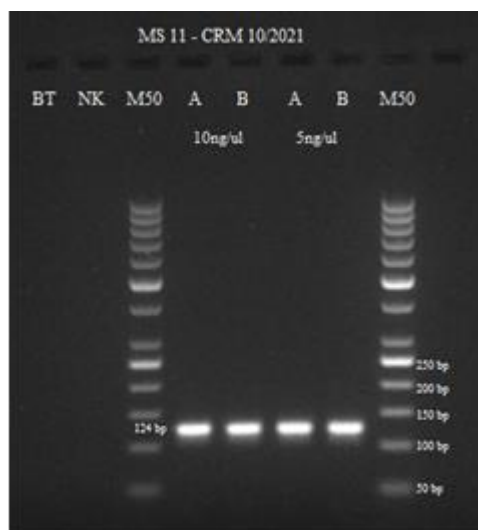
**Obrázek č. 4. Screening bar (60 bp), CRM 10/2021 (A,B), M50 – DNA marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, NK – CRM 5/2006, PK-pozitivní kontrola CRM 1/2020.**



**Obrázek č. 5. Screening T-NOS (180 bp), CRM 10/2021 (A, B), M50 – DNA marker 50 bp, BT– beztemplátová kontrola, NK – CRM 5/2006, PK-pozitivní kontrola CRM 27/2012.**

## **Správnost stanovení MS 11**

Bylo provedeno stanovení MS 11 z izolátů (A, B) CRM 10/2021 s koncentrací DNA 5ng/μl a s koncentrací DNA 10ng/μl. Zkoušky byly pozitivní. (obrázek č. 6).



**Obrázek č. 6. Stanovení MS 11 (124 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50 - DNA marker 50 bp, NK – CRM 5/2006, CRM 10/2021: izoláty A, B v koncentracích 5 ng DNA/μl a 10 ng DNA/μl.**

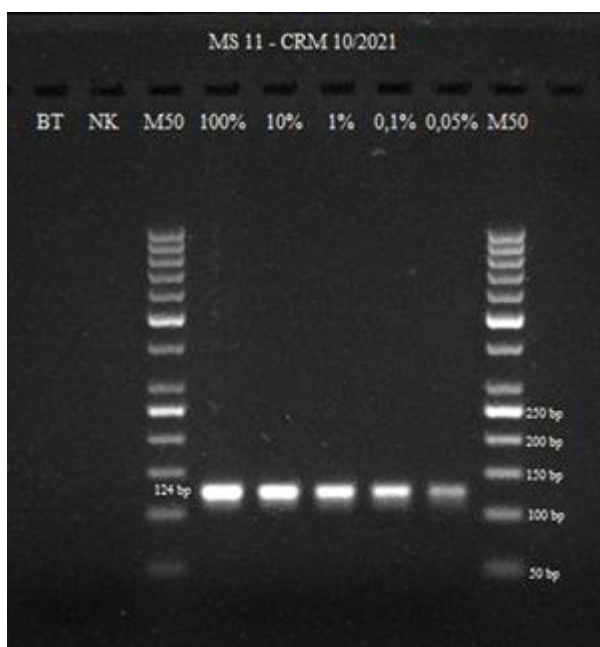
## Mez detekce stanovení MS 11

Dále byla stanovena mez detekce (MD) metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA řepky (CRM 5/2006). Nejprve byla otestována ředící řada 100 % - 0,05 % GM (obrázek č. 7.). Následně byly provedeny amplifikace izolátu CRM 10/2021 o obsahu modifikace 1 %; 0,1 % a 0,05 %.

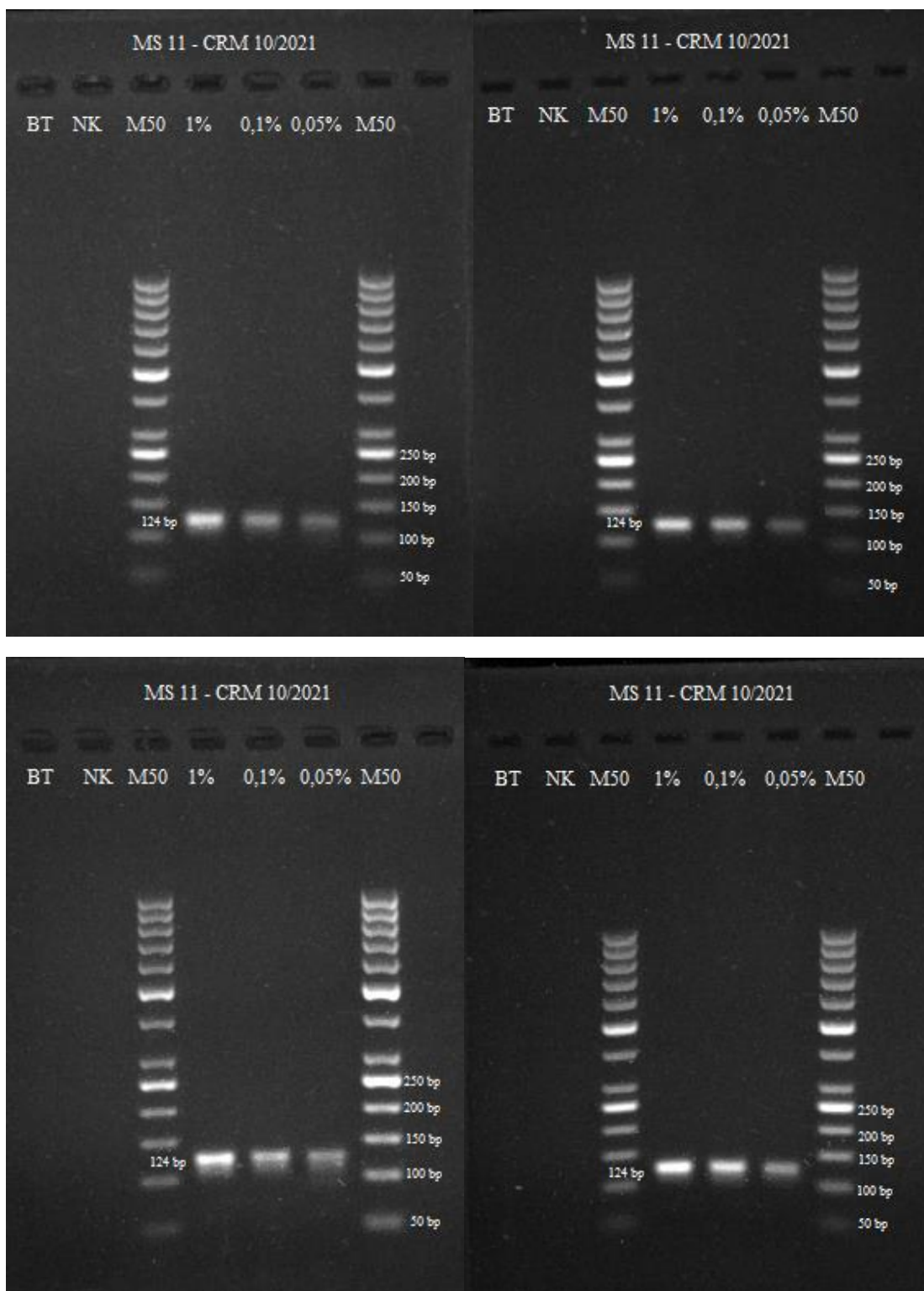
K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních (obrázky č. 8 až 11).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MS 11 lze detekovat na hladině 0,05 %.

Mez detekce se ověřila provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace MS 11.



**Obrázek č. 7. Stanovení MD transgenů MS 11 (124 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 5/2006, M50 – DNA marker 50 bp. CRM 10/2021: 100 (>99,9) %; 10 %; 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq. PCR s pozitivním výsledkem proběhla do koncentrace 0,05 %.**



**Obrázky č. 8 až 11. Stanovení MD transgenů MS 11 (124 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 5/2006, M50-marker 50 bp. CRM 10/2021: 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq. PCR s pozitivním výsledkem proběhla ve všech opakovaných amplifikacích do koncentrace 0,05 %.**

Během verifikace se postupovalo podle JPP, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1 a metody validované EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě.

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu a také samotné provedení elektroforézy.

## **5 Závěr**

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové genetické modifikace řepky MS 11 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení řepky MS 11 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací ve vzorcích krmiv a osiv.

## **6 Literatura**

- 1 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1
- 2 Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011
- 3 Event-Specific Method for the Quantification of oilseed rape MS11 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2019
- 4 Lee, DG., Park, JE., Kim, MJ. et al. Detection of GM Canola MS11, DP-073496-4, and MON88302 events using multiplex PCR coupled with capillary electrophoresis. Food Sci Biotechnol 30, 565–570(2021).
- 5 <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00882-3>

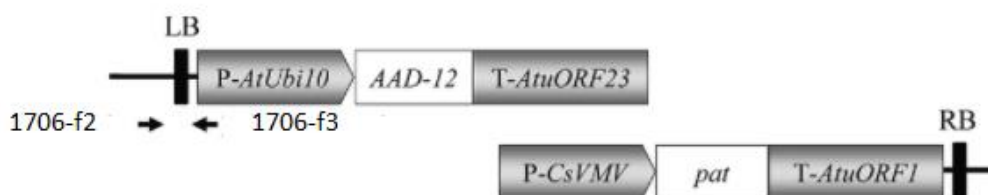
# Zavedení kvalitativní detekce transgenů DAS 81910-7 u bavlny

*Hana Poláková Hájková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
OdMB Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno  
Hana.PolakovaHajkova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

DAS 81910-7 je geneticky modifikovaná bavlna, jejíž DNA obsahuje gen *pat* a gen AAD-12. Oba geny pocházejí z *Agrobacterium tumefaciens*, jejich produktem jsou enzymy fosfinothricin N-acetyltransferáza a aryloxyalkanoát dioxygenáza-12. Modifikovaná plodina vykazuje toleranci vůči herbicidu glufosinátu amonnému a kyselině 2,4-dichlorfenoxycetové (2,4-D). Cílem práce je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u bavlny o kvalitativní stanovení DAS 81910-7 a určení meze detekce stanovení. Součástí zavádění stanovení transgenů DAS 81910-7 bude ověření detekce screeningového elementu *pat*.



**Obrázek č. 1. Schéma genového konstruktů modifikované bavlny DAS 81910-7 s místem hybridizace specifických primerů 1706-f2 a 1706-f3.**

## 2 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního

požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí ampliconu na agarózovém gelu.

### **3 Materiál a metody**

Pro zavedení byly použity tři certifikované referenční materiály (CRM) od IRMM (Institute for reference Material and Measurements) a American Oil Chemist's Society (AOCS).

ERM<sup>®</sup>-BF440d → 1% DAS 81910-7, interní ozn. CRM 1/2021.

ERM<sup>®</sup>-BF440c → 0,1% DAS 81910-7, interní ozn. CRM 2/2021

AOCS 1012-A → 0% non modified cotton powder, interní ozn. CRM 17/2014.

Izolace všech CRM byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin<sup>®</sup> Food – MACHERY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

#### **3.1 Přístroje a pomůcky**

##### **Extrakce DNA**

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Přenosná UV lampa.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu 2 ml - 2,5 ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

##### **Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza**

Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky 230 nm, 260 nm, 280 nm.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.



pH metr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu$ l, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2-2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

### **PCR reakce – amplifikace**

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cykler.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000)  $\mu$ l a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

## **3.2 Chemikálie**

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

**Extrakce DNA: NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv**

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin<sup>®</sup> Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

### **Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza**

Agaróza pro molekulární biologii.

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ Load<sup>TM</sup> Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free).

### **PCR reakce – amplifikace**

REDTaq<sup>®</sup> ReadyMix<sup>™</sup> PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq)

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>.

PCR voda.

### **Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů .**

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech

VG bavlna (Alkohol dehydrogenáza C): KVM157 / KVM158

F: CAC ATG ACT TAG CCC ATC TTT GC

R: CCC ACC CTT TTT TGG TTT AGC

Pat: pat\_16-L / pat\_16-R

F: GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT

R: TTC CAG GGC CCA GCG TAA G

DAS 81910-7: 1706-f2 / 1706-f3

F: AAG CTT AGG TGA TTT CGA TGA TG

R: GAC CTC AAT TGC GAG CTT TC

### 3.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO, JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

**Tabulka č. 1. Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR), vnitřní gen bavlny, pat i DAS 81910-7.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2x	1x	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	50 ng	5
Objem směsi vč. templátu			25

### Vnitřní gen bavlny (Alkohol dehydrogenáza C)

primery: KVM157 / KVM158

délka amplikonu: 73 bp

**Tabulka č. 2. Amplifikační program vnitřní gen bavlny.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
UNG	50	120	1
denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	45
annealing a extenze	60	60	

### pat

primery: pat\_16-L / pat\_16-R

délka amplikonu: 186 bp

**Tabulka č. 3. Amplifikační program pat.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	10	45
annealing a extenze	60	15	

### DAS 81910-7

primery: 1706-f2 / 1706-f3

délka amplikonu: 120 bp

**Tabulka č. 4. Amplifikační program DAS 81910-7.**

	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	45
annealing a extenze	60	60	

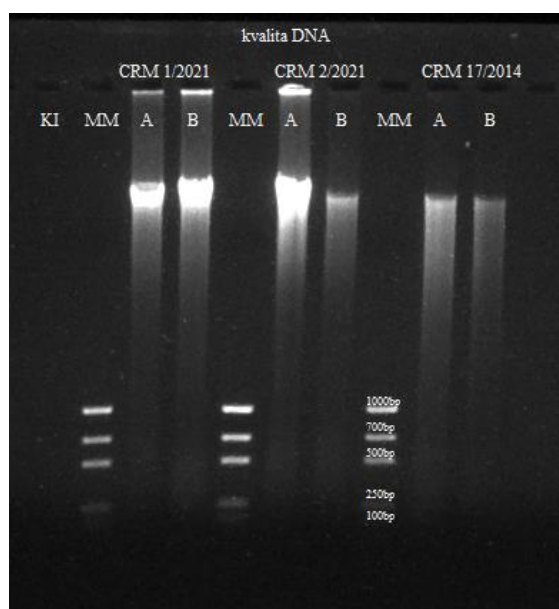
## 4 Výsledky a diskuse

### Kvalita DNA

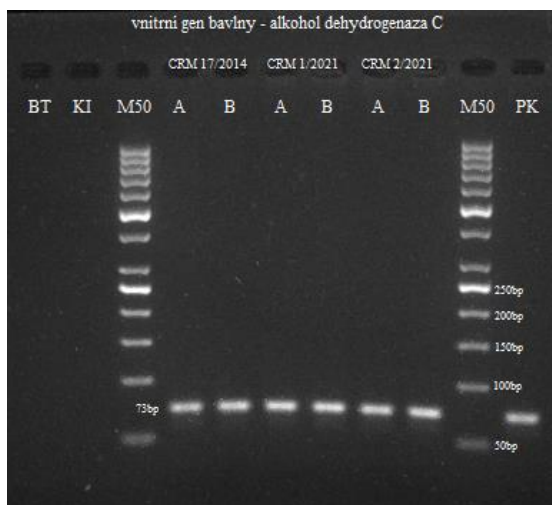
Pro zavádění, byla vyextrahována DNA z CRM GM negativní bavlny (CRM 17/2014) a z CRM bavlny DAS 81910-7 (CRM 1/2021 a 2/2021). U všech izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 5), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA (obrázky č. 2 a 3).

**Tabulka č.5. CRM 1/2021, CRM 2/2021 a CRM 17/2014 – hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

CRM	Izolát	Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 1/2021 1%	A	122,3	1,87	2,25
	B	116,7	1,88	2,17
CRM 2/2021 0,1%	A	169,8	1,87	2,27
	B	168,1	1,86	2,25
CRM 17/2014 0%	A	66,3	1,87	2,01
	B	62,5	1,86	2,03



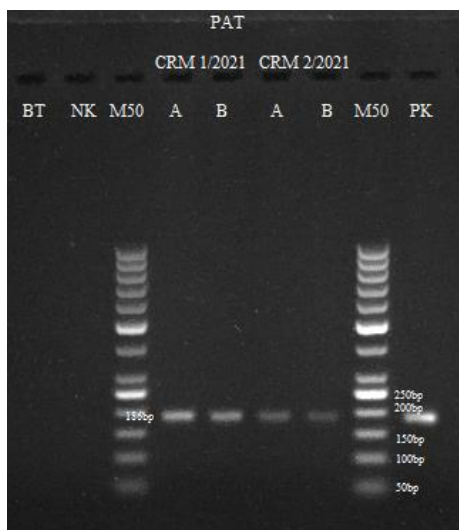
**Obrázek č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 1/2021 (A,B), CRM 2/2021 (A,B), CRM 17/2014 (A, B), MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.**



**Obrázek č. 3. Vnitřní gen bavlny (73bp) - CRM 1/2021 (A,B), CRM 2/2021 (A,B), CRM 17/2014 (A,B). M50 – DNA marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-pozitivní kontrola CRM 27/2012.**

## Screening

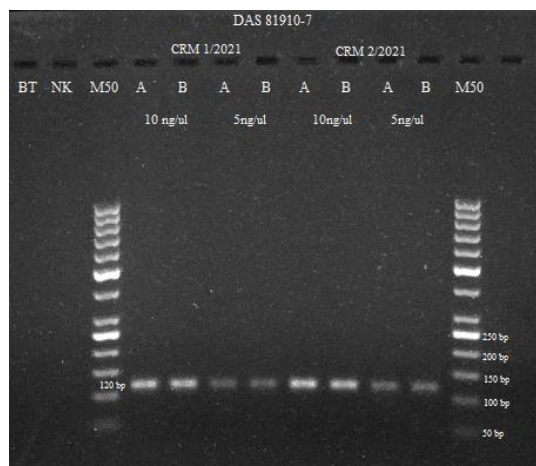
Bylo provedeno stanovení screeningového elementu pat s pozitivním výsledkem (obrázek č. 4). Jako negativní kontrola NK byl použit CRM 17/2014.



**Obrázek č. 4. Screening pat (186 bp), - CRM 1/2021 (A,B), CRM 2/2021 (A,B), M50 – DNA marker 50 bp, BT–beztemplátová kontrola, PK-pozitivní kontrola CRM 24/2012.**

## Správnost stanovení DAS 81910-7

Bylo provedeno stanovení DAS 81910-7 z izolátů (A, B) - CRM 1/2021 a CRM 2/2021, s koncentrací DNA 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Jako negativní kontrola NK byl použit CRM 17/2014. Zkoušky byly pozitivní. (obrázek č. 5).



**Obrázek č. 5. Stanovení DAS 81910-7 (120 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 17/2014, M50-DNA marker 50 bp, CRM 1/2021 a 2/2021 (A,B) v koncentracích 5 ng DNA/μl a 10 μg DNA/ul.**

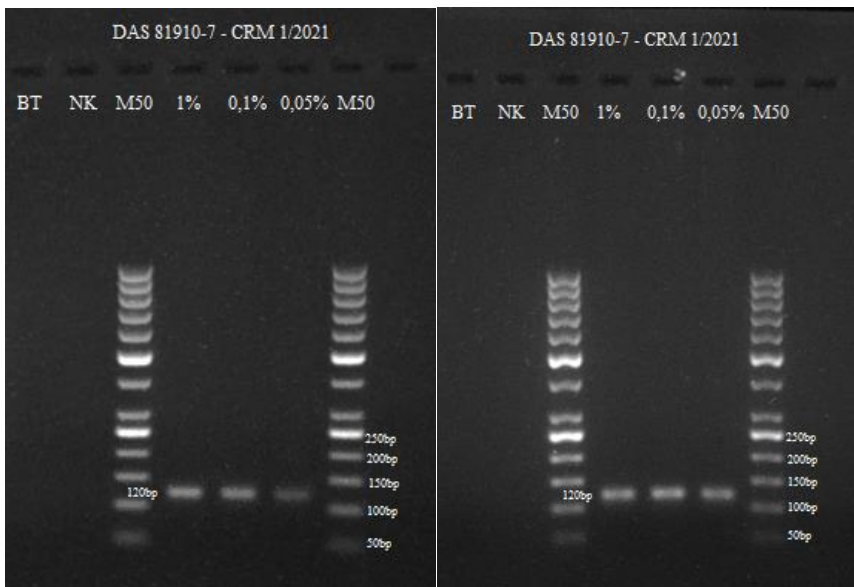
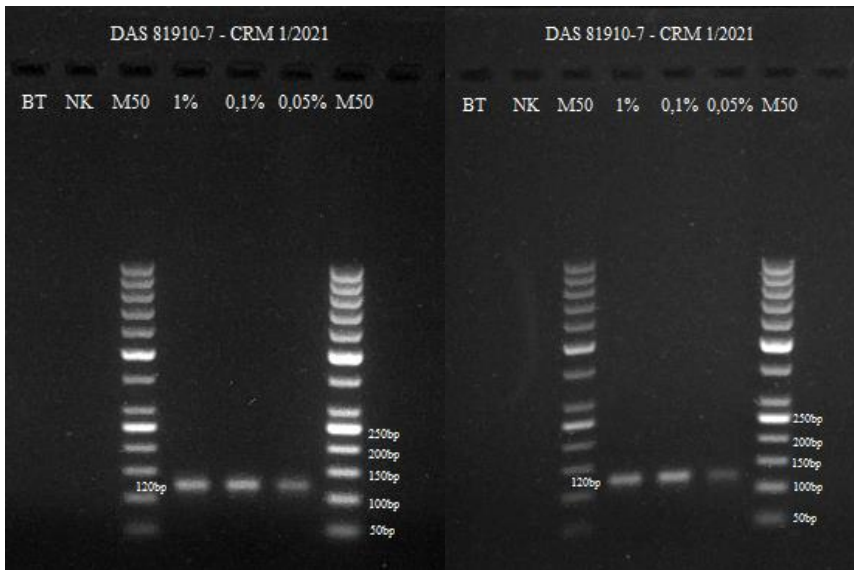
## Mez detekce stanovení DAS 81910-7

Mez detekce (MD) byla stanovena metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované bavlny (CRM 17/2014) a 1% modifikované bavlny (CRM 1/2021). Byly provedeny amplifikace izolátu CRM 1/2021 o obsahu modifikace 1 %; 0,1 % a 0,05 %. Jako negativní kontrola NK byl použit CRM 17/2014.

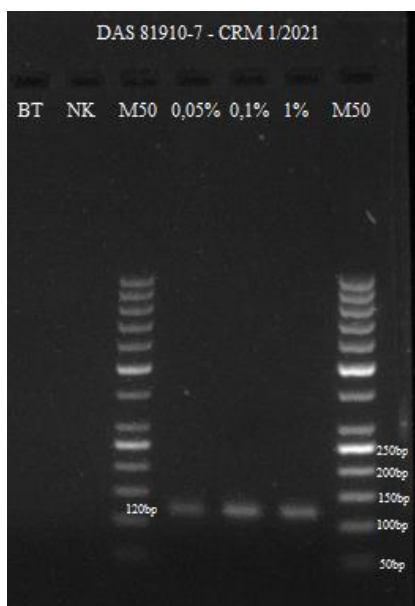
K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (obrázky č. 6-10)

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace DAS 81910-7 lze detekovat na hladině 0,05 %.

Mez detekce se ověřila provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace DAS 81910-7.







**Obrázky č. 6 až 10. Stanovení MD transgenů DAS 81910-7 (120 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 17/2014, M50-marker 50 bp. CRM 1/2021: 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq.**

PCR s pozitivním výsledkem proběhla do koncentrace 0,05 %.

Během verifikace se postupovalo podle JPP, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1 a metody validované EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě.

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá zejména na koncentraci a kvalitě templátové DNA, kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

## **5 Závěr**

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové genetické modifikace bavlny DAS 81910-7 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení bavlny DAS 81910-7 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

## 6 Literatura

- 1 Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1.
- 2 Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
- 3 Event-Specific Method for the Quantification of Cotton DAS 81910-7 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2019.
- 4 Eum, S.J., Kim, I.R., Lim, H.S. et al. Event-specific multiplex PCR method for four genetically modified cotton varieties, and its application. *Appl Biol Chem* 62, 52 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0459-8>.

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXVIII, 2024/1**

Ročník: XXVIII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2024

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 48

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196