

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2022**

**Ročník XXVI, číslo 3/2022**

**Brno 2022**

## Obsah

<b>1</b>	<b>Zavedení metody stanovení nepolárních uhlovodíků C10-C40</b> Petra Kosubová, Veronika Nagyová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno Hroznová 2, 603 00 Brno	1
<b>2</b>	<b>Stanovení glyfosátu po derivatizaci</b> Petra Kosubová, Klára Ondreášová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno Hroznová 2, 603 00 Brno	7
<b>3</b>	<b>Zavedení kvalitativní detekce transgenů MON 87411, MON 87403 a DP-004114-3 u kukuřice</b> Jana Stehlíková Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB, Hroznová 2, 603 00 Brno	15
<b>4</b>	<b>Zavedení kvalitativní detekce screeningového elementu CP4 epsps genu z Agrobacterium tumefaciens typ I a II.</b> Jana Stehlíková Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB, Hroznová 2, 603 00 Brno	39

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

# Zavedení metody stanovení nepolárních uhlovodíků

## C10-C40

*Petra Kosubová, Veronika Nagyová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno

Hroznová 2, 603 00 Brno

[petra.kosubova@ukzuz.cz](mailto:petra.kosubova@ukzuz.cz)

## 1 Úvod

V laboratořích ÚKZÚZ byl zadán požadavek na stanovení nepolární frakce uhlovodíků C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> v půdách a sedimentech za účelem kontroly těchto materiálů a jejich hodnocení podle příslušných legislativních limitů.

Porovnávány byly dva postupy přípravy vzorků. Prvním byl postup podle ČSN EN 14039 (1) a druhým postup uvedený v JPP AP II, kap. 4.8 (2). Úspěšnost byla ověřena účastí v kruhovém testu SETOC, pořádaném v rámci programu Setoc (WEPAL). Ve dvouletém období se analyzovalo 75 vzorků sedimentů a půd, z toho bylo 96 % vzorků vyhovujících.

## 2 Teoretická část

Homogenizovaný vzorek se extrahuje směsí acetonu a hexanu, organická fáze se oddělí a polární látky se odstraní na sloupci Florisilu. Vyčištěný extrakt se analyzuje plynovou chromatografií (GC) s plamenově-ionizačním detektorem (FID). Vyhodnocuje se celková plocha píků, jejichž retenční časy leží mezi retenčními časy n-dekanu (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>) a n-tetrakontanu (C<sub>40</sub>H<sub>82</sub>).

## **3 Praktická část**

### **3.1 Materiál a metody**

#### **3.1.1 Standardy a referenční materiály**

Roztok standardu uhlovodíků pro určení okna retenčních časů (RTW) obsahující tetrakontan (30 mg/l) a dekan (30 µl/l) rozpuštěné v hexanu. Standard pro kvantifikaci Mineral Oil Standard Mixture Type A and B for DIN EN ISO 9377-2 rozpuštěný v heptanu (Sigma-Aldrich).

#### **3.1.2 Chemikálie**

Aceton (Lachner), hexan (Lachner), síran sodný bezvodý (Sigma-Aldrich), Florisil (150 – 250 µm) aktivovaný 16 h při 140 °C (Merck), deionizovaná voda.

#### **3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku**

Analytické váhy (Sartorius), horizontální třepačka, odstředivka Sigma 2-16K (Sigma), dělicí nálevky, skleněné kolonky k čištění extraktu, skleněné vialky, běžné laboratorní vybavení a laboratorní sklo.

#### **3.1.4 Postup přípravy podle ČSN EN 14039**

Do skleněné Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 20 g homogenizovaného vzorku, přidáno 40 ml acetonu a 20 ml roztoku standardu RTW. Vzorek byl extrahován 1 h třepáním na horizontální třepačce. Roztok byl převeden do dělicí nálevky. Aceton byl odstraněn promytím organické fáze dvakrát 100 ml deionizované vody. Organická vrstva byla odebrána do 20ml EPA vialky. Aby se netvořila emulze, bylo přidáno (0,25 – 0,50) g bezvodého síranu sodného. Deset ml extraktu bylo přečištěno na kolonce se 2 g florisilu a 2 g síranu sodného bezvodého. Alikvotní podíl vyčištěného extraktu byl převeden do vialky a analyzován pomocí GC-FID.

#### **3.1.5 Postup přípravy podle JPP AP II, postup 30720.1 B**

Do skleněné baňky bylo naváženo 20 g homogenizovaného vzorku, přidáno 20 ml acetonu a 10 ml roztoku standardu RTW. Vzorek byl extrahován 30 min třepáním na horizontální třepačce a dekantací převeden do centrifugační nádoby, kam bylo přidáno 30 ml deionizované vody. Následovalo protřepání 1 min a odstředění tak, aby došlo k oddělení fází. Organická fáze

byla převedena pipetou do další centrifugační nádoby, kam bylo přidáno 10 ml deionizované vody. Po opětovném protřepání a odstředění byla organická fáze převedena do skleněné baňky. 10 ml extraktu bylo přečištěno na kolonce se 2 g florisilu a 2 g síranu sodného bezvodého. Alikvotní podíl vyčištěného extraktu byl převeden do vialky a analyzován pomocí GC-FID.

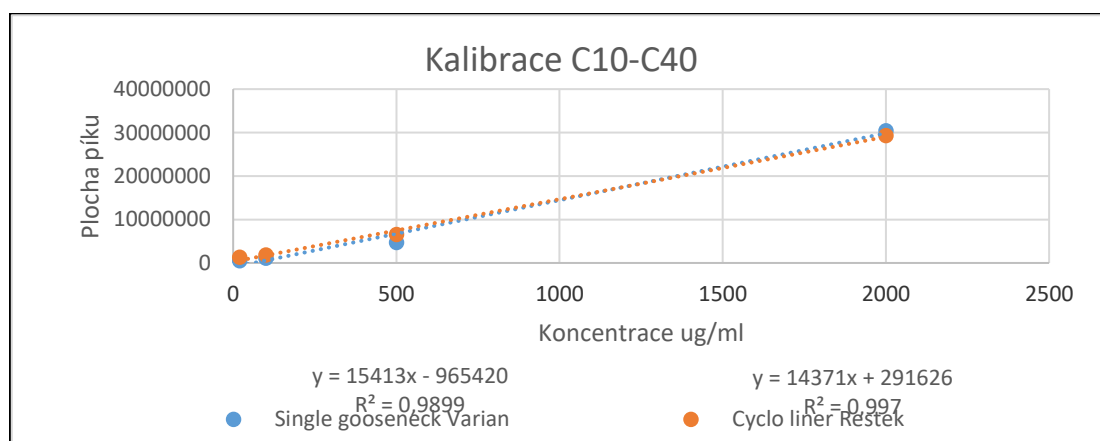
### 3.1.6. Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

GC-FID CP3800 (Varian): teplota injektoru 300 °C, 1 µl nástřik bez děliče toku (splitless) po 0,8 min, teplotní program (50 °C – 1 min – 20 °C/min – 320 °C – 15 min), průtok nosného plynu N<sub>2</sub> 1,2 ml/min, teplota detektoru 320 °C, průtok make up N<sub>2</sub> 29 ml/min, průtok H<sub>2</sub> 30 ml/min, průtok vzduchu 300 ml/min.

## 4 Výsledky a diskuse

### Optimalizace metody

V první fázi byla optimalizována měřicí metoda. Jedním z důležitých kroků je injektáž vzorku, přičemž doporučovanou technikou je PTV nástřik. Varian CP3800 je osazen pouze injektorem umožňující split/splitless nástřik. Ověřili jsme vliv různých typů linerů a pro další práci zvolili speciální liner Cyclo Restek, který poskytoval lineární proložení kalibračními body (viz Obrázek 1).



Obrázek 1. Kalibrační závislosti C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> získané s použitím různých linerů.

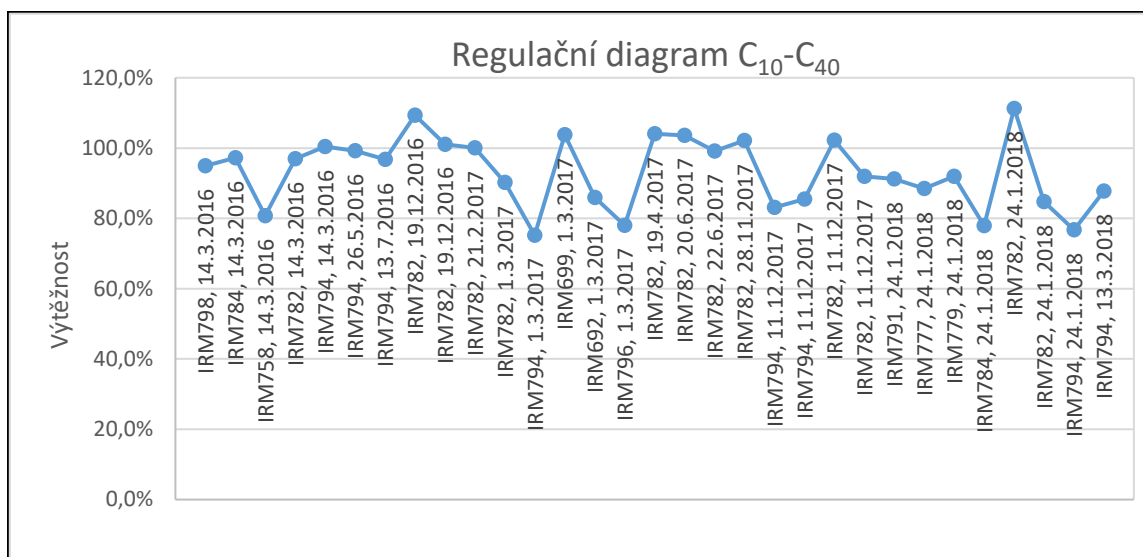
## Ověření metody

Správnost a přesnost metody byla ověřena analýzou interních referenčních materiálů (IRM), konkrétně vzorků získaných z kruhového testu Setoc (Wepal). Pro 5 IRM se výtěžnosti pohybovaly v rozsahu (81 – 100) %, viz Tabulka 1, což je v souladu v požadavky na správnost stanovení uvedenými v Rozhodnutí Komise 2002/657/ES o provádění analytických metod a interpretaci výsledků. Pro obsahy vyšší než 0,01 mg/kg je povolený rozsah výtěžnosti (80 – 110) % (3). Opakovatelnost metody byla 7 %, což je opět hodnota vyhovující požadavkům na přesnost pro obsahy C10-C40 stanovené v IRM.

**Tabulka 1. Výtěžnosti a opakovatelnosti C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> stanovené pomocí IRM.**

Materiál	Obsah C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub> (mg/kg)	Stanovený obsah (mg/kg)	Referenční obsah (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Opakovatelnost (%)
IRM798	24,11	23,03	24,26	95	4,1
IRM798	22,66				
IRM798	22,32				
IRM784	417,6	482,2	496,1	97	18,9
IRM784	546,7				
IRM758	177,0	176,4	218,5	81	2,7
IRM758	180,7				
IRM758	171,4				
IRM782	336,5	337,4	347,9	97	0,3
IRM782	338,4				
IRM782	337,4				
IRM794	480,2	531,4	529,2	100	9,5
IRM794	494,3				
IRM794	580,1				
IRM794	590,3				
IRM794	512,3				
Metoda				94	7

Od roku 2016 bylo stanoveno 31 hodnot obsahu C10-C40 v různých IRM, které byly přepočteny na výtěžnost a použity pro konstrukci regulačního diagramu (RD). Důvodem pro zvolený způsob zápisu IRM do RD je skutečnost, že navážky vzorků jsou relativně vysoké a není možné jedno IRM používat dlouhodobě.



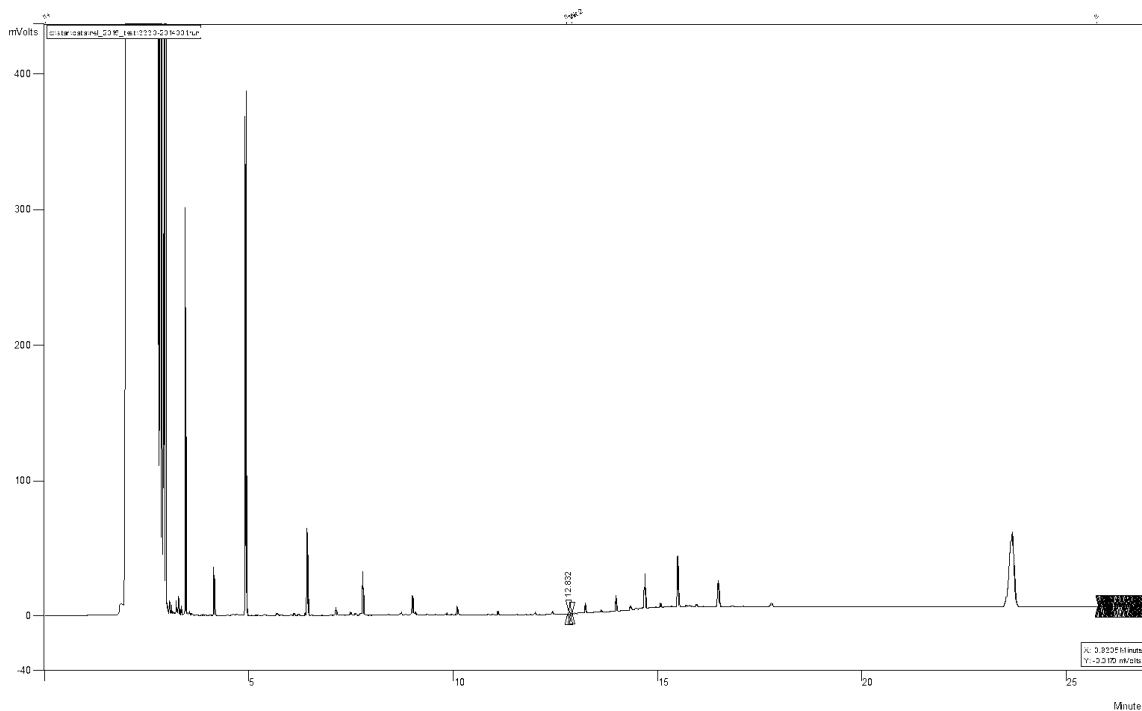
Obrázek 2. Regulační diagram pro stanovení C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>.

### Analýza reálných vzorků

Ve dvouletém období se analyzovalo 75 vzorků sedimentů a půd, z toho bylo 96 % vzorků vyhovujících (viz Tabulka 2). Z celkového počtu 34 vzorků půd bylo 30 vzorků s obsahem C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> pod mezí stanovitelnosti a maximální nález C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> byl 273,2 mg/kg. U sedimentů byla situace opačná, pouze 4 vzorky ze 34 analyzovaných byly negativní. Soubor 30 sedimentů vykazoval průměrný obsah C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> 118,4 mg/kg, medián 68,3 mg/kg a maximální nález C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> 944,1 mg/kg.

Tabulka 2. Počty analyzovaných vzorků.

Druh vzorku	Sedimenty	Půdy
Limit obsahu C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub> (mg/kg)	300 <sup>a)</sup>	100 <sup>b)</sup>
Počet vzorků ve dvouletém období	41	34
Počet vzorků s obsahem < LOQ	5	30
Počet vzorků přesahujících limit	2	1
a) Vyhláška č. 257/2009 Sb., o používání sedimentů na zemědělské půdě b) Vyhláška č. 153/2016 Sb., o stanovení podrobnosti ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu		



**Obrázek 3. Chromatogram extraktu sedimentu s obsahem C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> 61,1 mg/kg.**

## 5 Závěr

Metoda stanovení frakce nepolárních uhlovodíků C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> s využitím GC-FID byla zavedena pro účely kontroly kvality půd a sedimentů. Metoda je charakterizována limitem kvantifikace 20 mg/kg a rozšířenou nejistotou 30 %. Ročně se využívá k analýzám 30-40 vzorků sedimentů a půd z programu BMZP.

## 6 Literatura

1. ČSN EN 14039. Charakterizace odpadů - Stanovení obsahu uhlovodíků C<sub>10</sub> až C<sub>40</sub> plynovou chromatografií. Praha: Český normalizační institut, 2005.
2. Zbíral, J., kol.: Jednotné pracovní postupy, Analýza půd II, postup 30720.1, 2019.
3. Rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 12. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/E o používání analytických metod a interpretaci výsledků.



# Stanovení glyfosátu po derivatizaci

*Petra Kosubová, Klára Ondreášová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno

Hroznová 2, 603 00 Brno

[petra.kosubova@ukzuz.cz](mailto:petra.kosubova@ukzuz.cz)

## 1 Úvod

Glyfosát patří mezi celosvětově nejpoužívanější herbicidy. Z důvodu masivního používání glyfosátu je nutné sledovat jeho výskyt nejen v životním prostředí, ale také v potravním řetězci. Doporučená metodika evropské referenční laboratoře QuPPE neposkytuje s využitím dostupného vybavení dostatečně nízké limity stanovení, a to hlavně pro kontrolu ekologické produkce. Analýza derivatizovaného glyfosátu umožnila snížit limit stanovení na 0,006 mg/kg. Vybraná metodika, která zahrnuje tento derivatizační krok, byla testována a poté validována pomocí obohacených vzorků rostlinného materiálu a interních referenčních materiálů krmných surovin.

## 2 Teoretická část

Glyfosát, [N-(fosfonomethyl)glycin], je širokospektrální systémový herbicid používaný celosvětově proti plevelu. V zemědělství se používá při pěstování geneticky modifikovaných plodin odolných proti glyfosátu, ale také se často využívá na zahradách a dalších místech s nezemědělským využitím (1). Glyfosát se aplikuje na povrchové části rostlin, ze kterých je rozveden cévními svazky a následně způsobuje odumření rostliny. V půdě se glyfosát sorbuje a degraduje a jeho hlavním metabolitem je kyselina aminomethylfosfonová (AMPA) (2).

Glyfosát je méně toxický než jiné herbicidy, ale přesto může být nebezpečný pro lidské zdraví. Jeho výskyt je proto legislativně limitován v potravinách a krmivech. Vzhledem k jeho intenzivnímu používání při zemědělských i nezemědělských aplikacích je výskyt glyfosátu a jeho metabolitů sledován také v dalších složkách životního prostředí, např. ve vodě.

Stanovení reziduí glyfosátu a AMPA je analyticky náročné kvůli jejich amfoternímu a vysoce polárnímu charakteru, jejich nízké hmotnosti a nedostatku funkčních skupin, které by mohly usnadnit jejich detekci (3). V půdních vzorcích a rostlinném materiálu stanovení komplikuje složitost matrice a s tím související množství matričních interferentů. Proto jsou ve většině případů metody pro stanovení glyfosátu a AMPA obtížné. Zahrnují zdoluhavou přípravu vzorku, která vede k eliminaci rušivých koextraktů a také derivatizační krok pro zvýšení citlivosti detekce a zlepšení chromatografické separace. Nejčastěji se k derivatizaci využívá fluorenylmethylchloroformát (FMOC), který poskytuje fluoreskující derivát snadno stanovitelný metodou kapalinové chromatografie (LC) s fluorescenční detekcí. Tento přístup je zpracován v podobě ČSN ISO 21458, která je určena pro analýzu vzorků vod (4). U složitějších materiálů rostlinného či živočišného původu může být průběh derivatizace ovlivněn matričními koextrakty. Rozvoj techniky LC s tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (MS/MS) umožnil zlepšení předchozí metodiky založené na konvenčních detektorech, neboť FMOC deriváty snadno ionizují v elektrospreji a poskytují dobrou odezvu při MS/MS detekci. Dalším důvodem derivatizace glyfosátu je dosažení dostatečné retence na běžně používaných reverzních fázích C18, na kterých jsou nativní glyfosát a AMPA eluovány v mrtvém objemu kolony (5).

Cílem práce bylo zavést metodu pro stanovení glyfosátu po derivatizaci činidlem FMOC v krmivech a rostlinách a tím dosáhnout nižších kvantifikačních limitů. To umožní kontrolovat přítomnost glyfosátu v produktech ekologického zemědělství.

## **3 Praktická část**

### **3.1 Materiál a metody**

#### **Standardy a referenční materiály**

Standardy pesticidů v pevném nebo kapalném skupenství s deklarovanou čistotou: Glyphosate ( $C_3H_8NO_5P$ ), CAS [1071-83-6] (Sigma-Aldrich).

Vnitřní isotopově značené standardy (ILIS):

Glyphosate- $^{13}C_2$ ,  $^{15}N$  ( $^{13}C_2CH_8^{15}NO_5P$ ),  $c = 1 \text{ mg/ml H}_2O$ .

Interní referenční materiál (IRM): vzorky získané v rámci účasti v evropských testech způsobilosti (EUPT) pořádané Referenčními laboratořemi Evropské Unie (EURL) pro rezidua pesticidů.

### **Chemikálie**

Voda (ultračistá), methanol (CH<sub>3</sub>OH, pro HPLC a pro LC-MS), kyselina mravenčí (HCOOH), hydroxid sodný (NaOH), kyselina boritá (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), chlorid draselný (KCl), dichloromethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, chromasolv), acetonitril (CH<sub>3</sub>CN, chromasolv), derivatizační činidlo FMOC-Cl, octan amonný (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>).

### **Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku**

Analytické váhy, horizontální třepačka (300 kmitů/min), centrifuga (5000 ot/min), centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem (15 ml; 50 ml), SPE kolonky Oasis HLB 200 mg (Waters), SPE manifold, vývěva, vysokorychlostní míchadlo (např. Vortex), termovap, filtrační materiál (stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm), vialky (2 ml).

### **Postup přípravy vzorku**

Vzorek byl k analýze připraven podle práce K. Banerjee (6). Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky. Navážka se liší v závislosti na povaze materiálu, např. u suchých vzorků, jako jsou obiloviny, luštěniny, olejnatá semínka a rostliny se navažuje 2,5 g, zatímco u vzorků s vysokým obsahem vody (zelenina), např. brambor, je navážka 5 g. Ke vzorku se přidá 20 ml 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a 20 ml dichlormethanu (DCM). Vzorek se extrahuje třepáním 10 min při 300 kmitech/min. Poté se vzorek odstředí 5 min při 4000 ot/min, při teplotě 5 °C. 4ml podíl vodného supernatantu se převede do čisté 50ml centrifugační zkumavky a přidá se k němu ILIS, 4 ml borátového pufru a 4 ml 20mM roztoku FMOC-Cl. Směs se třepá 30 min při 300 kmitech/min a poté se doplní do 50 ml 1% kyselinou mravenčí a odstředí se při 4000 ot/min. Následuje čištění metodou SPE. Kolonky se nejprve promyjí 3 ml methanolu a 3 ml 1% kyselinou mravenčí. Pak se na kolonky nanese vzorek. Poté následuje promytí 10 ml vody a 5 ml DCM. Eluce se provede 5 ml methanolu. Eluát se následně odfouká pod dusíkem téměř do sucha a rekonstituuje 1 ml 50% methanolu. Po promíchání na Vortexu se vzorek 1 min ultrazvukuje a poté filtruje do vialky.

### **Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení**

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (např. ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters) nebo LC-MS/MS 6420 (Agilent)), vybavený UPLC kolonou (např. ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters)) nebo UHPLC kolonou (např. ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm (Agilent)).

Chromatografická separace byla provedena podle práce S. Gosciny gradientovou elucí mobilní fáze A složené z vody a methanolu v poměru 90 : 10 modifikované 5 mM roztokem octanu amonného, a mobilní fáze B složené z vody a methanolu v poměru 10 : 90 při průtoku 0,45 ml/min a teplotě kolony 45 °C (7). Objem nástřiku byl 2,5 μl. Ionizace byla provedena elektrosprejem v pozitivním módu při teplotě iontového zdroje 150 °C, desolvační teplotě 450 °C a průtoku desolvačního plynu 900 L/hr. Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných přechodů (MRM). Detailní informace k proceduře, chemikáliím a analýze jsou zpracovány v JPP ÚKZÚZ, postup č. 10606.1 (8).

**Tabulka 1. Sledované MRM přechody.**

	<b>MRM (m/z)</b>	<b>Napětí na konusu (V)</b>	<b>Kolizní energie (V)</b>
Glyfosát-FMOC	392→88	20	20
Glyfosát-FMOC	392→179	20	30
ILIS-glyfosát-FMOC	395→91	20	20
ILIS-glyfosát-FMOC	395→179	20	30

## **3.2 Výsledky**

### **Prvotní testování**

V první fázi byl testován postup popsáný v práci S. Gosciny (7), kde je vzorek extrahován směsí vody, methanolu a DCM a po odstředění DCM je celý supernatant odpařen téměř k suchu, rekonstituován 1 ml vody, derivatizován FMOC v prostředí borátového pufru a nadbytek činidla nakonec odstraněn DCM. Výhodou této procedury při použití ILIS byla možnost kvantifikaci reálných vzorků pomocí solventové kalibrace. Shodnost matriční a solventové kalibrace vypočtená v SW Effivaldation porovnáním kalibračních přímek byla

100,2 %. Metoda však vykazovala také řadu nevýhod, jako např. časově náročné zkoncentrování supernatantu a nedostatečné odstranění nadbytku derivatizačního činidla, které při finální LC-MS/MS analýze silně kontaminuje iontový zdroj.

Druhý testovaný postup podle K. Banerjee (6) není časově výhodnější, ale zahrnuje efektivnější odstranění FMOC pomocí extrakce na pevnou fázi (SPE) s využitím kolonek HLB Oasis. Nejprve byla ověřena použitelnost tohoto postupu pro rutinní analýzu různorodého rostlinného materiálu a poté následovala jeho validace.

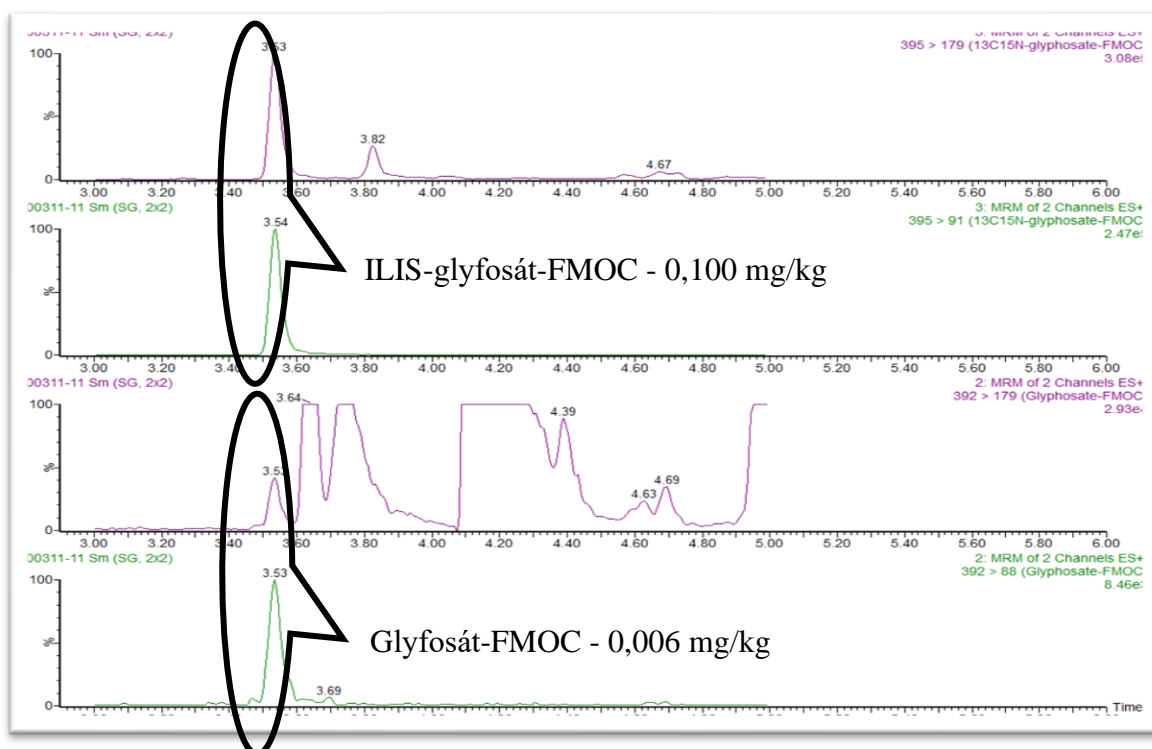
### Validační experiment

Metoda byla validována pomocí interních referenčních materiálů a vícenásobných stanovení obohacených vzorků obilovin (kukuřičná mouka) a rostlin (směsný vzorek). Vybrané matrice bez přítomnosti glyfosátu byly obohaceny na hladinách 0,006 mg/kg (kukuřičná mouka) a 0,040 mg/kg (rostliny) v minimálně pěti opakováních. Stanovená přesnost (opakovatelnost) a správnost (výťažnost) postupu vyhovovala validačním kritériím podle SANTE/11945/2015, tj. výťažnost v rozmezí (70 – 120) % a opakovatelnost  $\leq 20$  % (9). Výsledky validace jsou zobrazeny v tabulce 2.

**Tabulka 2. Přesnost a správnost opakovaných stanovení validovaných materiálů.**

Materiál	Obohacení/ obsah v IRM (mg/kg)	Naměřený obsah (mg/kg)	Výťažnost (%)	Opakovatelnost (%)	Počet opakování
Kukuřičná mouka-SP	0,006	0,0066	105,2	6,6	6
Rostlinný směsný materiál-SP	0,040	0,0339	84,7	9,2	5
Kukuřičná mouka-IRM	0,568	0,5873	103,4	0,4	6
Čočka-IRM	0,827	0,8763	106,0	1,1	6
Brambor-IRM	0,340	0,3618	106,4	4,9	6

Nejnižší validovaná hladina označovaná také jako reportovací limit byla 0,006 mg/kg a je na protokolu uváděna jako mez stanovitelnosti postupu s derivatizací. Tento reportovací limit umožňuje kontrolovat konvenční i ekologickou zemědělskou produkci. Na obrázku 1 je uveden chromatogram derivatizovaného glyfosátu-FMOC na hladině reportovacího limitu v kukuřici.



**Obrázek 1. Chromatogram derivatizovaného glyfosátu a příslušného ILIS v kukuřici.**

K identifikaci látek byla použita konfirmační kritéria, tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných, kvantifikačních a konfirmačních iontů. Pro správnou kvantifikaci je nutné používat izotopově značený vnitřní standard (ILIS) nebo metodu standardního přídávku. Na obrázku 1 je uveden chromatogram derivatizovaného ILIS-glyfosátu-FMOC na hladině 0,100 mg/kg v kukuřici.

### Ověření metody

Nově zavedená metoda s derivatizací FMOC byla v ve dvou letech ověřena účastí v EUPT-SRM (10, 11).

**Tabulka 3. Přehled výsledků testů EUPT-SRM.**

EUPT	Rok	Testovací vzorek	Vztažná hodnota (mg/kg)	Stanovená hodnota (mg/kg)	z-skóre
SRM12	2017	Jahodové pyré	0,306	0,297	-0,1
SRM13	2018	Sojová mouka	0,903	0,954	0,2

## 4 Závěr

Zavedená metoda, která zahrnuje derivatizaci FMOC, představuje citlivější metodu stanovení glyfosátu v porovnání s původní postupem (12), založeným na metodice QuPPE (13), určeným pro analýzu nativního glyfosátu v konvenčních krmných surovinách a poškozeném rostlinném materiálu s mezí stanovitelnosti (0,1 – 0,5) mg/kg. V rámci validace byly požadavky na správnost a přesnost nové metody s derivatizací splněny na hladině 0,006 mg/kg, která tedy představuje mez stanovitelnosti této metody a umožňuje její využití při kontrole produkce z ekologického zemědělství. Metoda se dále využívá při analýze problematictějších krmných surovin, jako jsou luštěniny a olejnin. Správnost validované metody byla ověřena úspěšnou účastí v kruhových testech EUPT-SRM.

## 5 Literatura

1. COX, C. Herbicide Factsheet: Glyphosate. *Journal of Pesticide Reform*. 2004, roč. 24, č. 4, s. 10–15.
2. BOTERO-COY, A.M., M. IBÁÑEZ, J.V. SANCHO a F. HERNÁNDEZ. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, vol. 1292, s. 132-141. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.007.
3. BOTERO-COY, A.M., M. IBÁÑEZ, J.V. SANCHO a F. HERNÁNDEZ. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *Journal of Chromatography A*. 2013, vol. 1313, s. 157-165. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.037.
4. ČSN ISO 21458. *Jakost vod: Stanovení glyfosátu a AMPA - Metoda vysokoúčinné kapalínové chromatografie (HPLC) s fluorimetrickou detekcí*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010.
5. PEREIRA, L. LC/MS of Glyphosate and AMPA. *Thermo Fisher Scientific*, Application note 20029. 2006.
6. BANERJEE, K., D.P. OULKAR a P.G. ADSULE. Development and validation of a novel residue analysis method for glyphosate and AMPA in plant matrices by LC-MS/MS. Prezentace na konferenci EPRW 2012, Vídeň.
7. GOSCINNY, S., H. UNTERLUGGAUER, J. ALDRIAN, V. HANOT a S. MASSELTHER. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". DOI: 10.1007/s12161-011-9361-7. ISBN 10.1007/s12161-011-9361-7. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9361-7>.

8. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10606.1
9. SANTE/11945/2015 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
10. ANNASTASSIADES, M., et al.: EU Proficiency test: Residues of pesticides requiring single residue methods in strawberry purée, EUPT-SRM12 final report, 2017.
11. ANNASTASSIADES, M., et al.: EU Proficiency test on the analysis of pesticides residues requiring single residue methods in soybean flour, EUPT-SRM13 final report, 2018.
12. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10605.3.
13. ANNASTASSIADES, M., et al. QuPPE. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement (version 9.3, April 2017).



# Zavedení kvalitativní detekce transgenů MON 87411, MON 87403 a DP-004114-3 u kukuřice

*Jana Stehlíková*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
OdMB, Hroznová 2, 603 00 Brno  
jana.stehlikova@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.

MON 87411 je geneticky modifikovaná kukuřice, jejíž DNA byla modifikována pomocí DvSnf7 supresní kazety (z Western Corn Rootworm - *Diabrotica virgifera virgifera*) a Cry3Bb1 (z *Bacillus thuringiensis* subsp. kumamotoensis) s výslednou rezistencí vůči bázlivci kukuřičnému (*Diabrotica virgifera*, *Coleoptera*). Dále je obsažen cp4 epsps gen (z *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4) pro dosažení tolerance vůči glyfosátovým herbicidům.

MON 87403 je geneticky modifikovaná kukuřice, vyvinutá s cílem zvýšit biomasu klasů v rané fázi reprodukce prostřednictvím exprese bílkoviny AtHB17Δ113 (kódované genem pocházejícím z *Arabidopsis thaliana*).

DP 4114-3 je geneticky modifikovaná kukuřice, jejíž DNA byla modifikována pomocí cry1F, cry34Ab1, cry35Ab1 z (*Bacillus thuringiensis* var. Aizawai) s výslednou rezistencí vůči některým škůdcům z řádu Lepidoptera a Coleoptera. Dále je obsažen cp4 epsps gen (z *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4) pro dosažení tolerance vůči glyfosátovým herbicidům.

## **2 Cíl**

Cílem práce bylo rozšířit spektrum stanovovaných genetických modifikací u kukuřice o kvalitativní stanovení MON87403, MON87411, DP4114-3 a určení meze detekce stanovení pro jednotlivé modifikace. U MON87411 se ověřila detekce screeningového elementu cp4epsps a u DP-4114-3 detekce promotoru p35S.

## **3 Princip**

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o běžně používanou 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.

## **4 Materiál a metody**

Pro zavedení byly použity izoláty DNA z certifikovaných referenčních materiálů od The American Oil Chemists' Society (AOCS) a od JRC, Institute for Reference Materials and Measurements, European Reference materials (ERM)

AOCS 0411-C, Non-Modified Maize, (pure) – laboratorní značení: CRM 14/2016.

AOCS 0215-B, Maize Monsanto Event MON87411 Powder, (pure) – laboratorní značení: CRM 2/2019.

AOCS 0216-A, Maize Monsanto Event MON87403 Powder, (pure) – laboratorní značení: CRM 3/2019.

ERM<sup>®</sup>-BF439d Genetically Modified DP-004114-3 Maize (nominal 1 %)– laboratorní značení: CRM 9/2019.

ERM<sup>®</sup>-BF439c Genetically Modified DP-004114-3 Maize (nominal 0,1 %)– laboratorní značení: CRM 12/2019.

DNA byla izolována pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

## **4.1 Přístroje a pomůcky**

### **Extrakce DNA**

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pHmetr.

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.

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

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

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

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pHmetr.

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.

## 4.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

**Extrakce DNA:** NucleoSpin<sup>®</sup> 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>TM</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.

Vnitřní (referenční) gen kukuřice – škrobová invertáza:

IVRI-F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC

IVRI-R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C

MON 87403

87403 QF: CTT TCT TTT TCT CCA TAT TGA CCA TCA TAC

87403 QR: TAC TCC GGA ATG AGT GCT CTG TAT C

MON 87411

87411 QF: CTC TGT AAC AGA AAA CAC CAT CTA GAG

87411 QR: ACA AAA GTC AAC TAG TTC TAG GGT AGA T

DP-004114-3

PHN164689: GCT TTG GAG CCT CTC GTT TGT A

PHN164190: GCG TTT AAA CTA TCA GAT CTG TGT TGA A

p35S

35s-cf3: CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG

35s-cf4: TCC TCT CCA AAT GAA ATG CCA TTC C

CP4epsps

GT73-TmF: GGG ATG ACG TTA ATT GGC TCT G

GT73-TmR: GGC TGC TTG CAC CGT GAA G

### 4.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity tyto postupy Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ:

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,

JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR), vnitřní gen kukuřice, p35S, cp4epsps, MON 87403, MON 87411, DP-4114-3.

**Tabulka č. 1.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2 ×	1 ×	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 kukuřice (škrobová invertáza)

primery: IVRI-F / IVRI-R

délka amplikonu: 225 bp

#### Tabulka č. 2. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	35
Annealing	68	110	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

### P35S

primery: 35s-cf3/35s-cf4

délka amplikonu: 123bp

#### Tabulka č. 3. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	58	40
Annealing	57,5	120	
Extenze	72	105	
Závěrečná extenze	72	180	1

### cp4epsps

primery: GT73-TmF/GT73-TmR

délka amplikonu: 88bp

#### Tabulka č. 4: Amplifikační program

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	



**MON 87403**

primery: 87403 QF/87403 QR:

délka amplikonu: 88bp

**Tabulka č. 5. Amplifikační program.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

**MON 87411**

primery: 87411 QF/87411 QR:

délka amplikonu: 109bp

**Tabulka č. 6. Amplifikační program.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

**DP-004114-3**

primery: PHN164689/PHN164190:

délka amplikonu: 80 bp

**Tabulka č. 7. Amplifikační program.**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	180	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	30	

## 5 Výsledky a diskuse

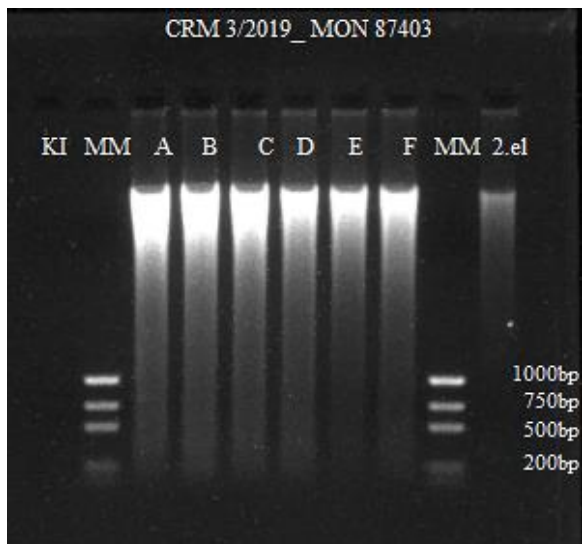
### 5.1 Kvalita DNA

Pro zavádění, byla extrahována DNA z CRM GM negativní kukuřice (CRM 14/2016) a z CRM GM kukuřic MON87403 (CRM 3/2019), MON87411 (CRM 2/2019) a DP4114-6 (CRM 9/2019, CRM 12/2019). U izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 8), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA (obrázky č. 1 až 7).

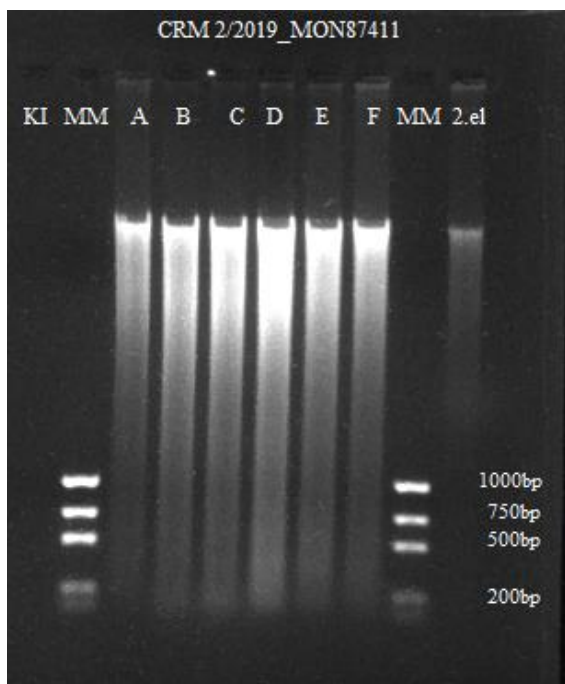
Kritéria čistoty daná poměrem A 260/280 byla splněna u všech izolátů (doporučený poměr absorbancí je v rozmezí 1,7 až 2,0), u poměru A 260/230 jsou hodnoty také vyhovující (doporučený poměr absorbancí je v rozmezí 1,6 až 2,2). Kvalita na gelu a koncentrace izolátů vyhovovala požadavkům na analýzu a všechny izoláty byly pro analýzy vyhovující.

**Tabulka č. 8. CRM 3/2019, CRM 4/2019, CRM 9/2019 a CRM 12/2019 – hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.**

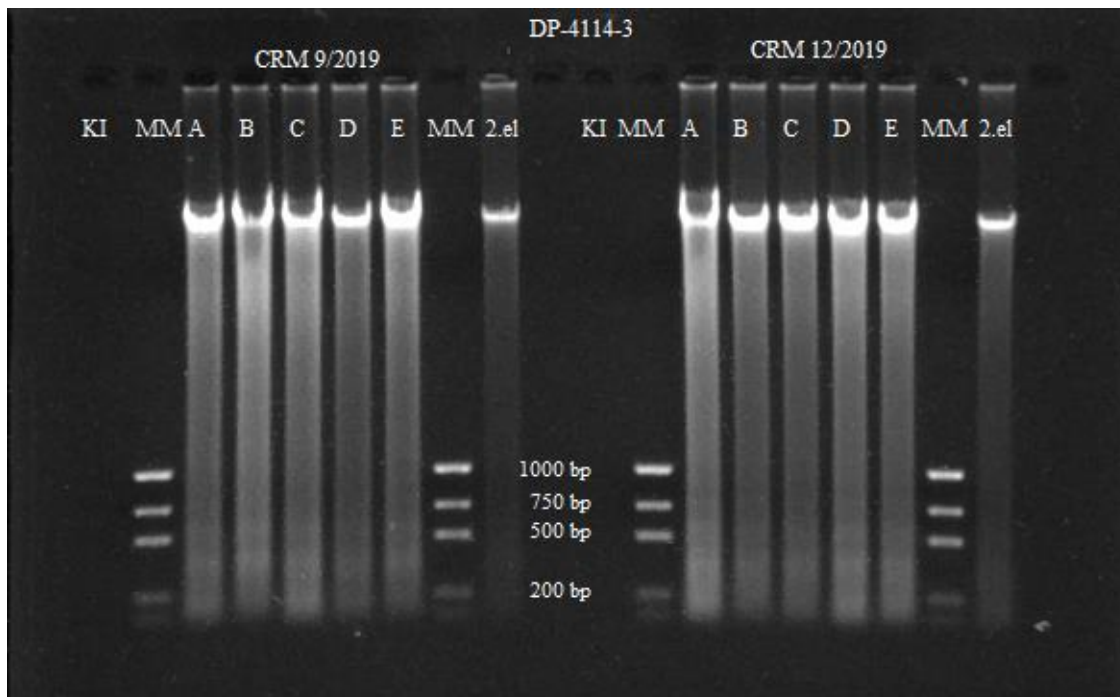
CRM		Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/230
MON 87403 CRM 3/2019 100 % GM m/m Izolace 11.3. 2019	A	126,4	1,88	2,16
	B	110,9	1,87	2,17
	C	98,2	1,89	2,16
	D	93,7	1,88	2,17
	E	80,1	1,87	2,10
MON 87411 CRM 2/2019 100 % GM m/m Izolace 8. 3. 2019	A	74,8	1,87	1,99
	B	99,8	1,86	1,98
	C	107,0	1,86	2,06
	D	123,7	1,89	2,07
	E	103,6	1,88	2,15
CRM 9/2019 VCO-01981-5 1 % GM m/m Izolace 18. 7. 2019	A	173,9	1,89	2,14
	B	233,7	1,89	2,19
	C	204,3	1,89	2,19
	D	121,6	1,87	2,15
	E	188,2	1,88	2,18
CRM 12/2019 VCO-01981-5 0,1 % GM m/m Izolace 18. 7. 2019	A	249,4	1,89	2,21
	B	120,0	1,86	2,20
	C	128,0	1,86	2,17
	D	166,3	1,88	2,19
	E	156,7	1,88	2,17



**Obrázek č. 1. Kvalita izolátů DNA, CRM 3/2019\_ izoláty A, B, C, D, E, směs z 2.eluce.  
MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.**

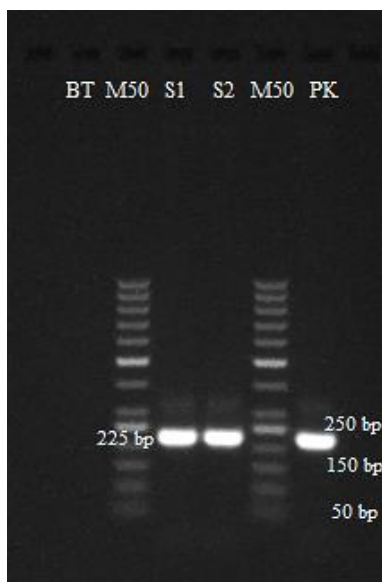


**Obrázek č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 2/2019\_ izoláty A, B, C, D, E, směs z 2.eluce.  
MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.**

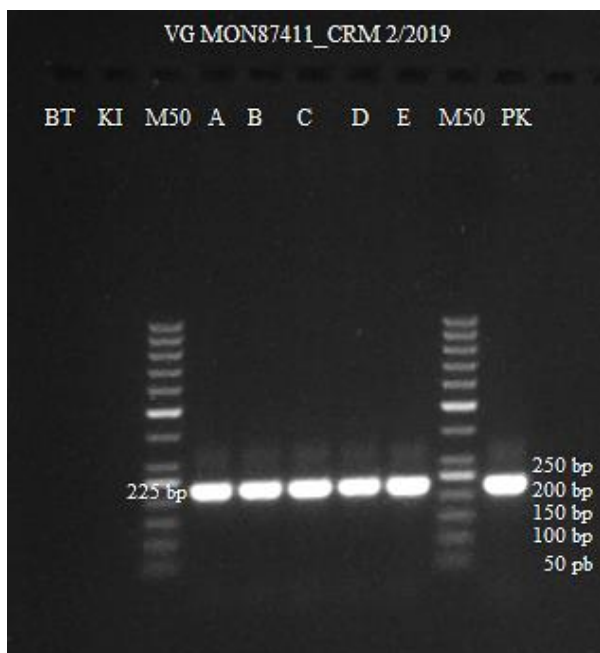


Obrázek č. 3. Kvalita izolátů DNA\_CRM 9/2019 a 12/2019\_ izoláty A, B, C, D, E, směs z 2.eluce. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.

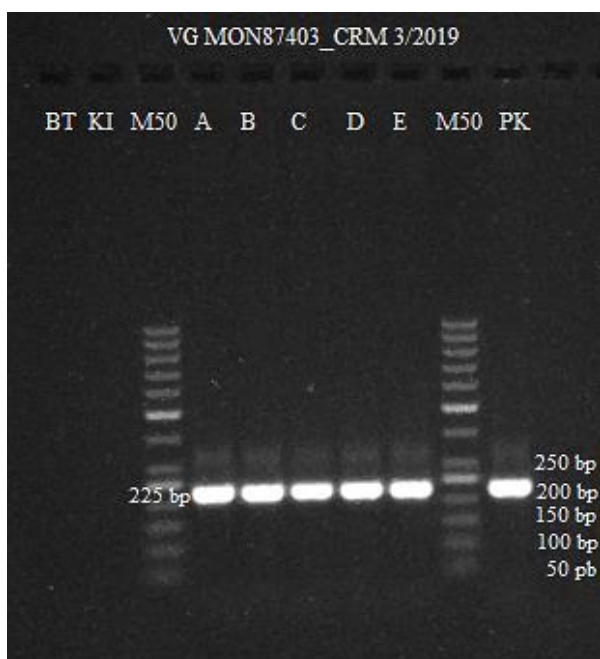
## 5.2 Vnitřní gen kukuřice



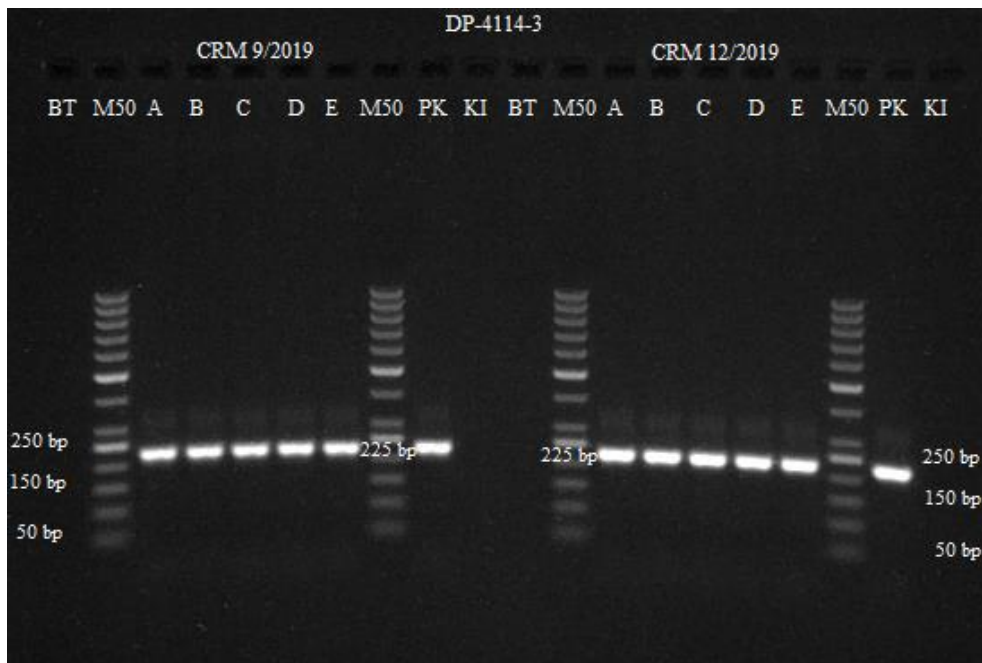
Obrázek č. 4. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 14/2016, izoláty S1 a S2, BT-beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, PK-CRM 15/2014.



**Obrázek č. 5. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 2/2019, izoláty A, B, C, D, E, směs z 2.eluce, BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.**



**Obrázek č. 6. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 3/2019, izoláty A, B, C, D, E, směs z 2.eluce, BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.**

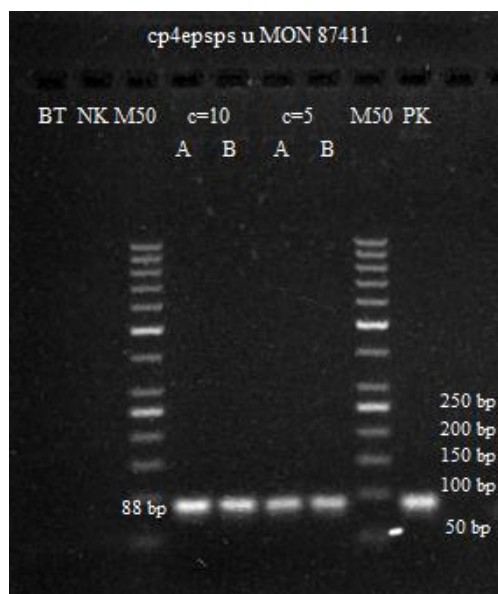


26.7

**Obrázek č. 7. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 9/2019 a 12/2019 izoláty A, B, C, D, E, směs z 2.eluce, BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.**

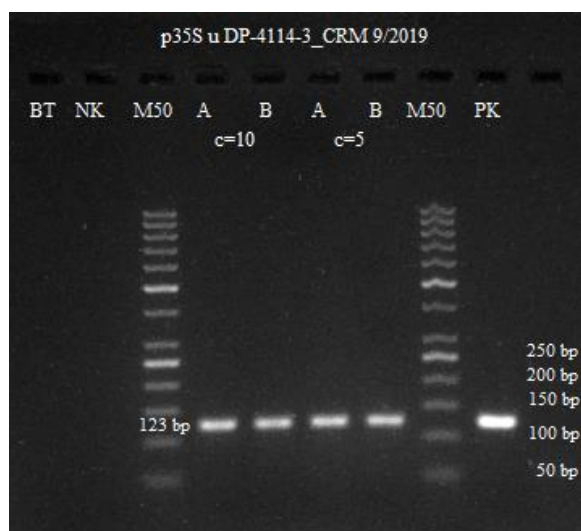
### 5.3 Screeningové elementy

U MON87411 byla ověřena detekce screeningového elementu cp4epsps. Obrázek č. 8.



**Obrázek č. 8. cp4epsps (88 bp) – MON87411\_CRM 2/2019, izoláty A, B; koncentrace DNA v izolátu 10 a 5 ng/ul, BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, NK – CRM 14/2016, PK-CRM 34/2012.**

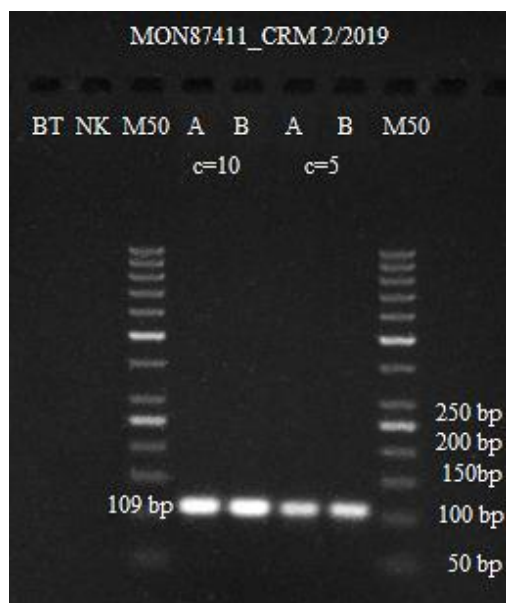
U DP-4114-3 byla ověřena detekce promotoru p35S. Obrázek č. 9.



**Obrázek č. 9. p35S (123 bp) – DP4114-3\_CRM 9/2019, izoláty A, B; koncentrace DNA v izolátu 10 a 5 ng/ul, BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, NK – CRM 14/2016, PK-CRM 24/2012.**

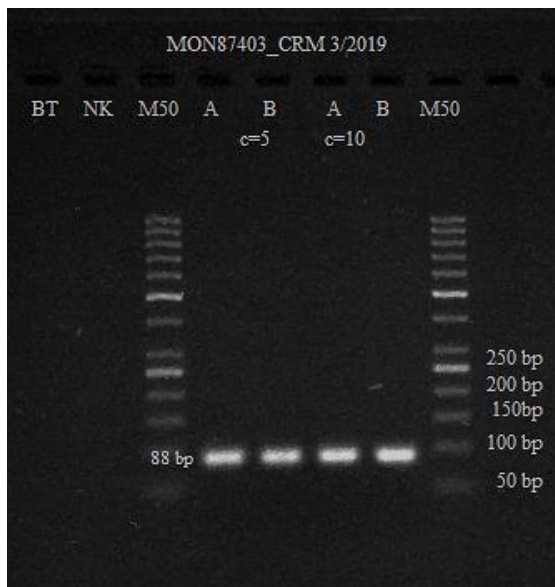
## 5.4 Správnost stanovení

U MON87403, MON87411 a DP-004114-3 byla z izolátů (A, B) CRM 2/2019, CRM 3/2019 , CRM 9/2019 a CRM 12/2019 provedena PCR s koncentrací DNA v izolátu 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Zkoušky byly pozitivní. (obrázky č. 10 až 12).

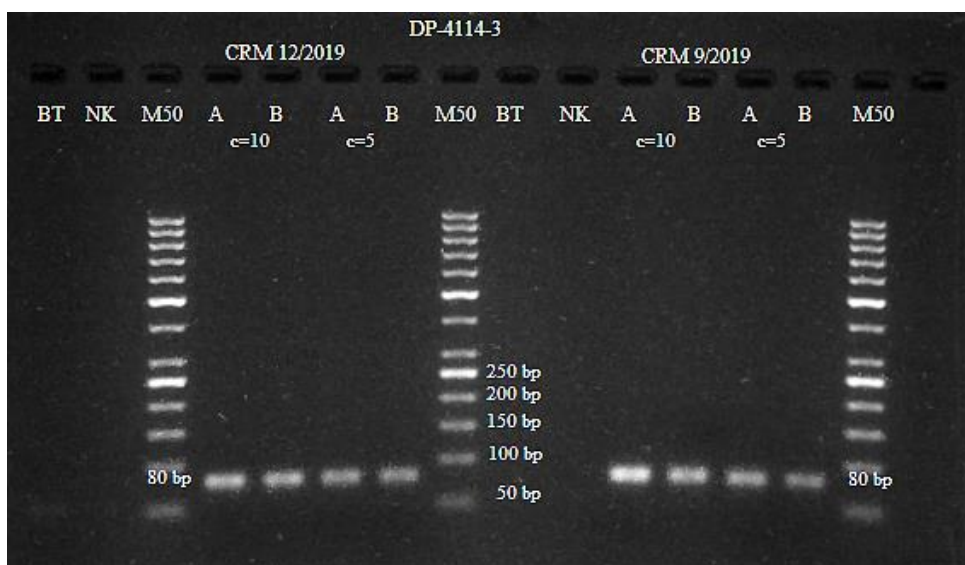


**Obrázek č. 10. Stanovení MON87411 (109 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50-marker 50 bp, NK – CRM 14/2016, CRM 2/2019: Izoláty A, B v koncentracích 10 ng DNA/ul a 5 ng DNA/ul.**





**Obrázek č. 11. Stanovení MON87403 (88 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50-marker 50 bp, NK – CRM 14/2016, CRM 3/2019: Izoláty A, B v koncentracích 5 ng DNA/ul a 10 ng DNA/ul.**



**Obrázek č. 12. Stanovení DP4114-3 (80 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50-marker 50 bp, NK – CRM 14/2016, CRM 9/2019, CRM 12/2019: Izoláty A, B v koncentracích 5 ng DNA/ul a 10 ng DNA/ul.**

## 5.5 Mez detekce stanovení

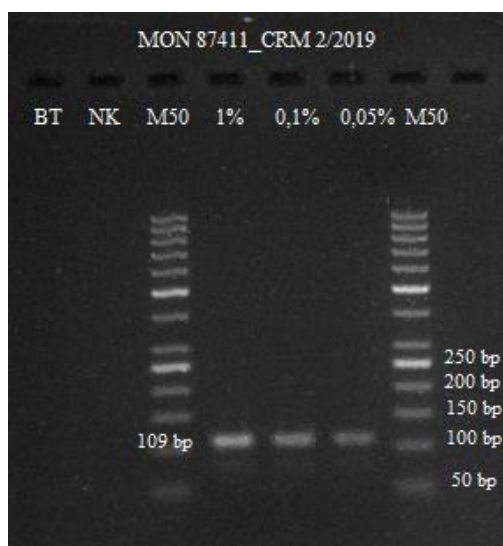
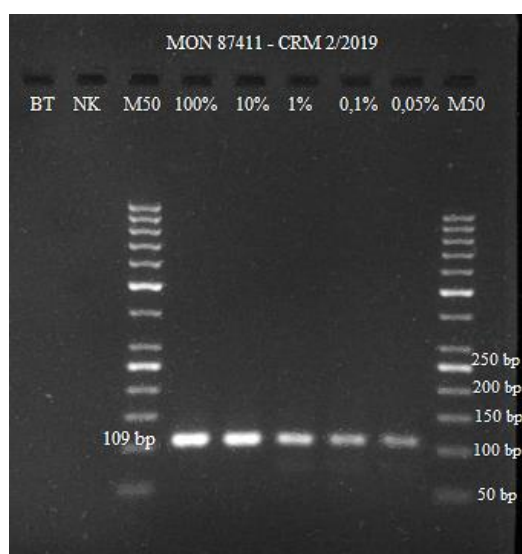
### MON 87411

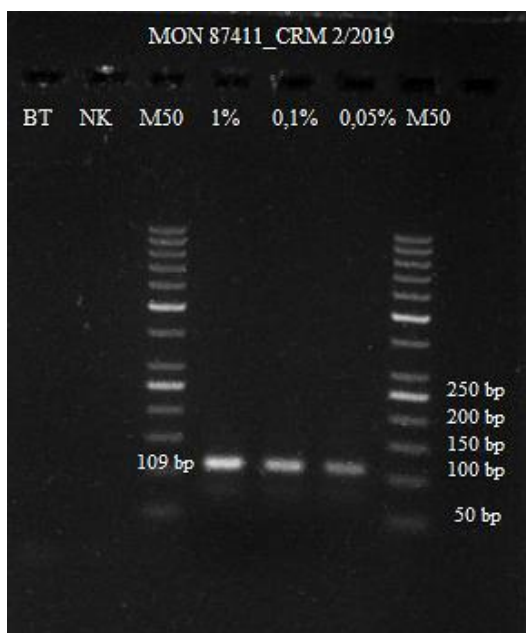
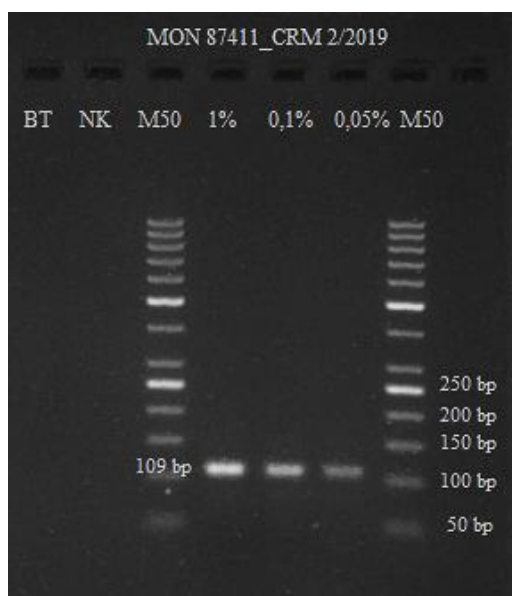
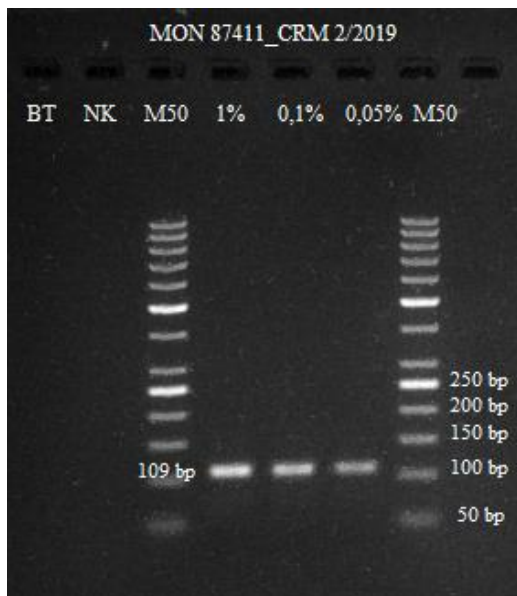
Dále byla stanovena mez detekce metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA kukuřice (CRM 14/2019). Byla provedena amplifikace izolátu CRM 2/2019 o obsahu modifikace 1 %, 0,1 % a 0,05 % m/m.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (obrázky č. 13 až 17).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MON87411 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m

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





**Obrázky č. 13 až 17. Stanovení MD transgenu MON87411 (109 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 14/2016, M50-marker 50 bp. CRM 2/2019: 1 %; 0,1 %; 0,05 % GM m/m. Amplifikační kit REDTaq. PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.**

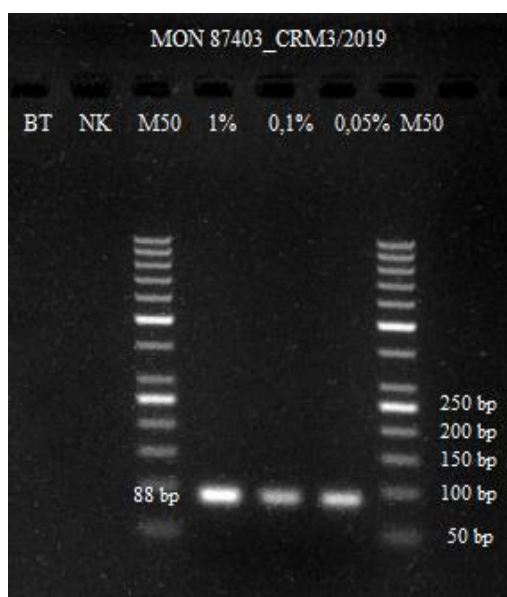
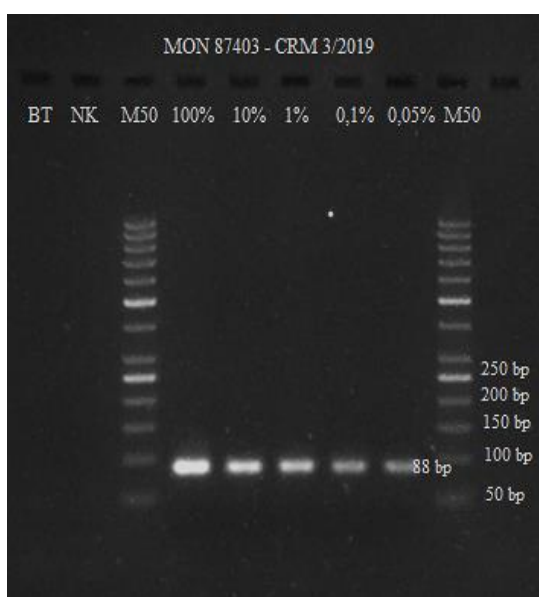
### MON87403

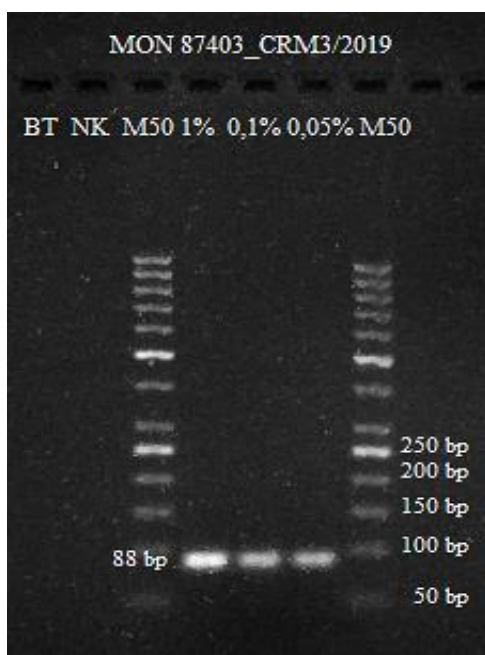
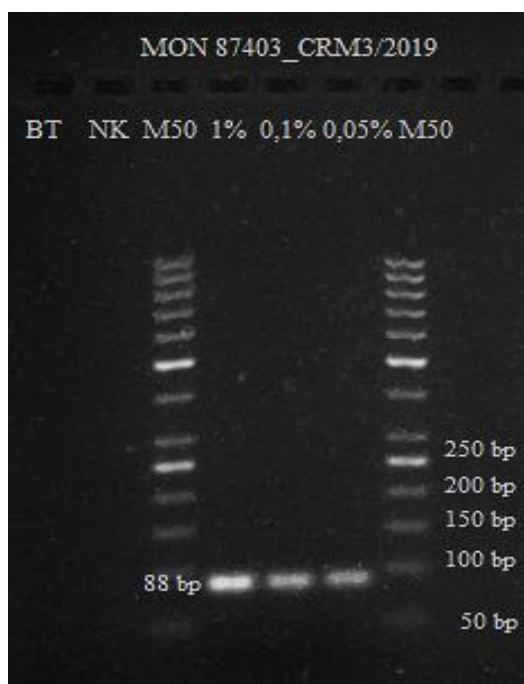
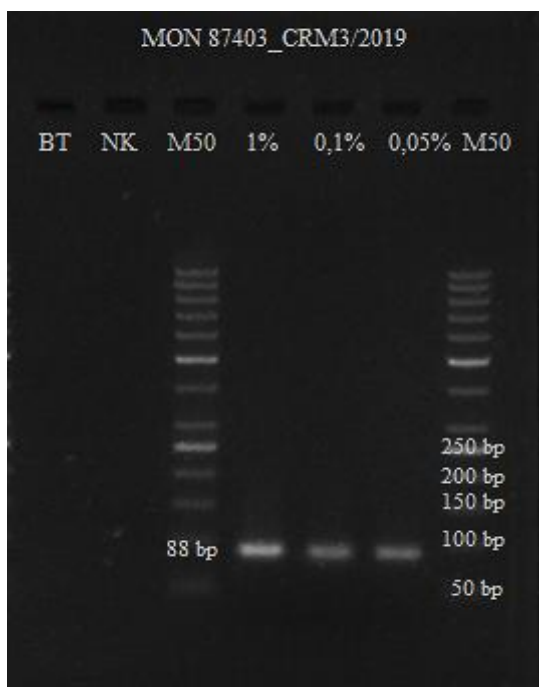
Dále byla stanovena mez detekce metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA kukuřice (CRM 14/2019). Byla provedena amplifikace izolátu CRM 3/2019 o obsahu modifikace 1 %, 0,1 % a 0,05 % m/m.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (obrázky č. 18 až 22).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MON87403 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m

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





Obrázky č. 18 až 22. Stanovení MD transgenu MON87403 (88 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 14/2016, M50-marker 50 bp. CRM 3/2019: 1 %; 0,1 %; 0,05 % GM m/m. Amplifikační kit REDTaq. PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.

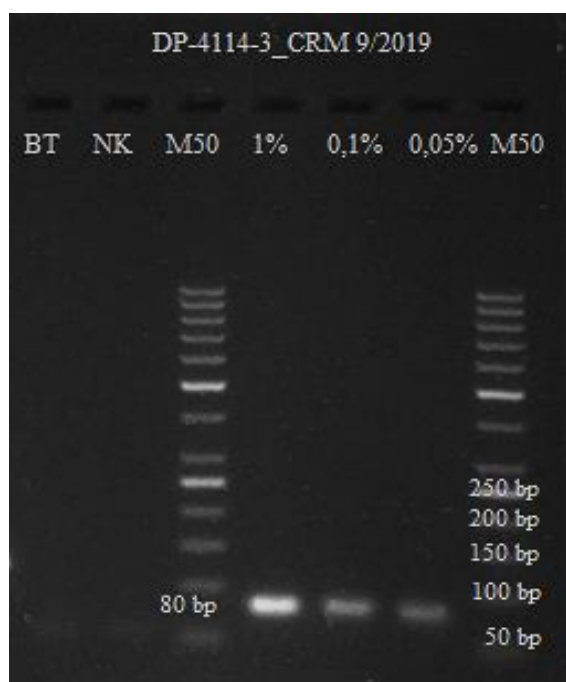
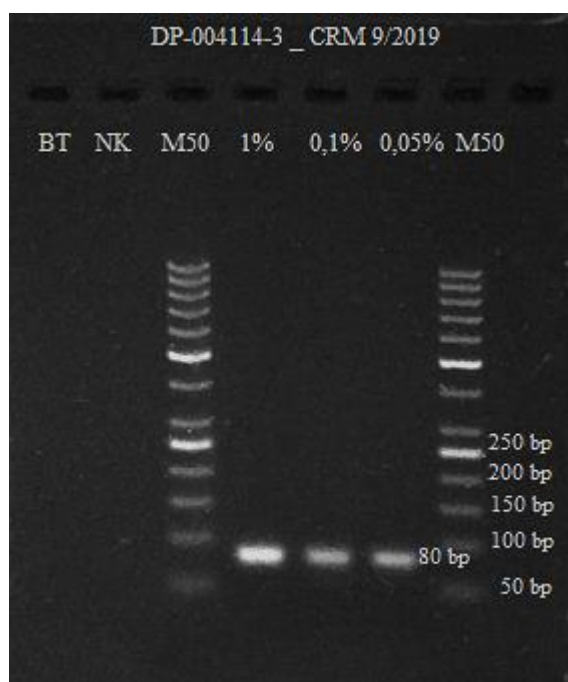
### DP-4114-3

Dále byla stanovena mez detekce metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA kukuřice (CRM 14/2019). Byla provedena amplifikace izolátu CRM 9/2019 o obsahu modifikace 1 %, 0,1 % a 0,05 % m/m.

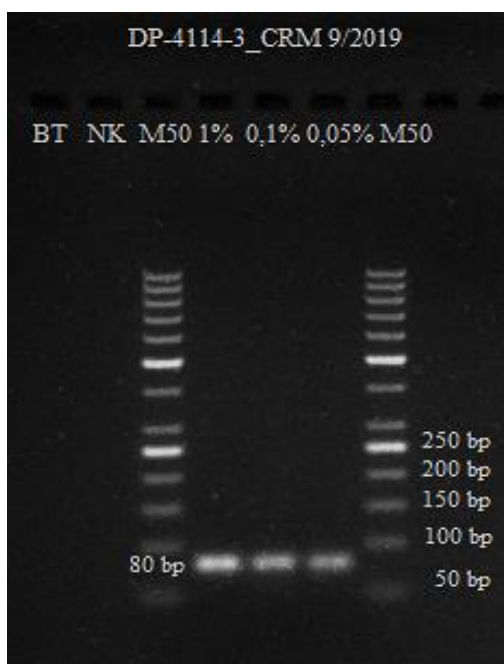
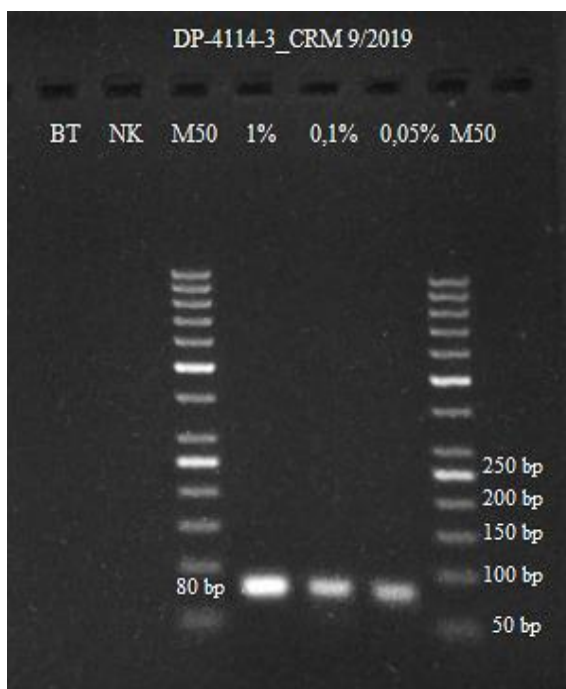
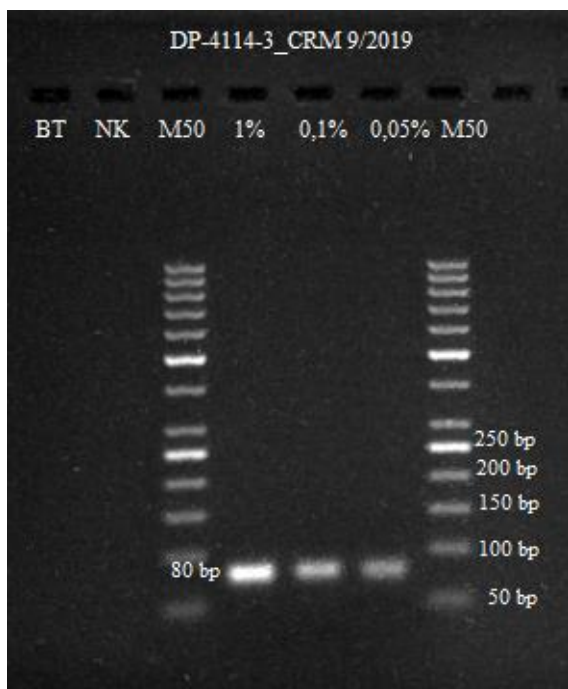
K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních (obrázky č. 23 až 27).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace DP-4114-3 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m

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







Během verifikace se postupovalo podle metod JPP (postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1) a metod validovaných EURL. Zachovaly se sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testované certifikované referenční materiály vykazují pruhy v příslušných místech.

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

## 6 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nových genetických modifikací kukuřic MON87403, MON87411, DP4114-3 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metody stanovení MON87403, MON87411, DP4114-3 byly zavedeny s mezí detekce 0,05 % GM m/m.

Tyto metody se zařadí jako další parametry při zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

## 7 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 maize MON 87403 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC111720
4. Event-specific Method for the Quantification of maize MON 87411 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC102146
5. Event-specific Method for the Quantification of maize DP-004114-3 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC111600



# Zavedení kvalitativní detekce screeningového elementu CP4 epsps genu z *Agrobacterium tumefaciens* typ I a II

*Jana Stehliková*

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

## 1 Úvod

Cílem práce bylo alternativní stanovení screeningového elementu cp4epsps pomocí kvalitativní duplexní PCR, která umožní vyhodnotit vzorky, jejichž výsledky byly se stávajícím stanovením sekvence úseku mezi CTP2 z *Arabidopsis thaliana* epsps a CP4 epsps genem z *Agrobacterium tumefaciens* (CTP2-Cepsps) problematické z důvodu nespecifických produktů PCR.

Cp4 epsps gen, který pochází z *Agrobacterium tumefaciens* typ I, II, je sekvence, která kóduje enzym EPSPS (5-enolpyruvylsukcínát-3-fosfát syntáza). Tento enzym pochází z *Agrobacterium* sp., kmen CP4 a způsobuje tkáňově specifickou toleranci k herbicidu glyfosátu v celé rostlině, kromě pylu.

## 2 Princip

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

### 3 Materiál a metody

Pro zavedení analýzy byly použity izoláty DNA z certifikovaných referenčních materiálů od The American Oil Chemists' Society (AOCS), od JRC, Institute for Reference Materials and Measurements, European Reference materials (ERM) a Sigma-Aldrich.

ERM-BF413ak, MON 810 Maize (nominal < 0,09 %) – laboratorní značení: CRM 3/2018.

ERM-BF412b, Bt-11 Maize (0,098 %) – laboratorní značení: CRM 4/2006.

ERM-BF412e, Bt-11 Maize (1,96 %) – laboratorní značení: CRM 2/2017.

ERM-BF413ck, MOM 810 Maize (0,49 %) – laboratorní značení: CRM 10/2014.

ERM-BF413ek, MOM 810 Maize (1,98 %) – laboratorní značení: CRM 11/2014.

AOCS 0609-A, non-modified soybean (pure) – laboratorní značení: CRM 11/2018.

ERM-BF410bk, GTS40-3-2 soya bean (0,1 %) – laboratorní značení: CRM 8/2016.

ERM-BF410dp, GTS40-3-2 soya bean (1 %) – laboratorní značení: CRM 2/2018.

AOCS 0304-A, non-modified rape, (Roundup Ready <0,05 %) – laboratorní značení: CRM 5/2006.

Sigma-Aldrich GMO Genomic DNA Standard Set For Canola DNA GT73 (~ 1%) – laboratorní značení: CRM 13/2019/1.

Sigma-Aldrich GMO Genomic DNA Standard Set For Canola DNA MS8xRF3 (~ 1%) – laboratorní značení: CRM 13/2019/3.

AOCS 0304-B2, GT73/RT73 canola (pure) – laboratorní značení: CRM 4/2017.

AOCS 0804-B, cotton powder MON88913 (> 99,4 %) – laboratorní značení: CRM 27/2012.

AOCS 0906-D, cotton powder MON1445 (> 99,4 %) – laboratorní značení: CRM 30/2012.

AOCS 0210A, Soybean Monsanto Company Event MON87705 Powder (pure) – laboratorní značení: CRM 13/2014.

AOCS 1208-A, soybean powder MON89788 (99,4 %) – laboratorní značení: CRM 34/2012.

AOCS 0406-D, maize powder MON88017 (> 99,05 %) – laboratorní značení: CRM 31/2012.

AOCS 0512-A2, maize powder MON87427 (>99,4 %) – laboratorní značení: CRM 16/2016.

Sigma-Aldrich GMO Genomic DNA Standard Set For Maize NK603 (~ 1%) – laboratorní značení: CRM 6/2017/1.

Pro zavádění byly využity izoláty DNA, získané z CRM v rámci dřívějších vývojových úkolů při zavádění jednotlivých GM. Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). Izoláty byly skladovány v hlubokomrazícím boxu. U izolátů DNA byla před použitím změřena koncentrace a byly otestovány na amplifikovatelnost DNA (obrázky č. 1,3,5).

### **3.1 Přístroje a pomůcky**

#### **Extrakce DNA**

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pH metr.

Lednice.

Mrazicí box.

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

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, 260, 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<sup>®</sup> 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

REDExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Plant PCR Kit , výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDExtact).

### **Další potřebné chemikálie nedodávané v kitech.**

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

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

Primery pro vnitřní (referenční) gen sóji, sójový lektin:

GMO-3: 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC G-3'

GMO-4: 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'

Vnitřní (referenční) gen kukuřice – škrobová invertáza:

IVRI-F: 5'-CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC-3'

IVRI-R: 5'-GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C-3'

Vnitřní (referenční) gen řepky – cruciferin A:

MDB510F: 5'-GGC CAG GGT TTC CGT GAT-3'

MDB511R: 5'-CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG-3'

CP4epsps gen

CP4epsps I.F: 5'-GCA TGC TTC ACG GTG CAA-3'

CP4epsps I.R: 5'-TGA AGG ACC GGT GGG AGA T-3'

CP4epsps II.F: 5'-GCA TGC TTC ACG GTG CAA-3'

CP4epsps II.R: 5'-TGA AGG ACC TGT GGG AGA T-3'

### **3.3 Pracovní postup**

Pro zavádění byly použity postupy Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ:

JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food,

JPP 10254.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu REDExtract pro stanovení GMO,

JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO,

JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR

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 kukuřice, vnitřní gen sóji, vnitřní gen řepky.**

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2 ×	1 ×	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

**Tabulka č. 2. Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit (duplexní PCR), cp4epsps gen.**

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

### Vnitřní gen sóji

Primery: GMO3 /GMO4

Délka amplikonu: 118 bp

#### Tabulka č. 3. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	45	35
Annealing	57	50	
Elongace	72	60	
Závěrečná elongace	72	355	1

### Vnitřní gen kukuřice (škrobová invertáza)

Primery: IVRI-F / IVRI-R

Délka amplikonu: 225 bp

#### Tabulka č. 4. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	35
Annealing	68	110	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1



### Vnitřní gen řepky ( cruciferin A)

Primery: MDB510F / MDB511R

Délka amplikonu: 101 bp

#### Tabulka č. 5. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční dekontaminace	50	60	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a elongace	60	60	

### CP4epsps gen

Primery: CP4epsps I.F / CP4epsps I.R

Délka amplikonu: 108 bp

Primery: CP4epsps II.F / CP4epsps II.R

Délka amplikonu: 108 bp

#### Tabulka č. 6. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a elongace	60	60	

## 4 Výsledky a diskuse

Pro zavádění byly použity extrakty DNA z CRM geneticky nemodifikované kukuřice, sóji a řepky. Dále pak z CRM geneticky modifikovaných plodin, které obsahují nebo neobsahují cp4epsps gen v rozsahu 0,1 % GM m/m až 100 % GM m/m (BT11, MON810, MON 40-3-2, GT73, RF3).

Pro doplnění byla ověřena pozitivní detekce cp4epsps i u všech dosud zavedených GM plodin, kde je cp4epsps deklarován (NK603, MON87427, MON88017, MON87705, MON89788, MON89013 a MON1445).

**Tabulka č. 7. Shrnutí výsledků analýz.**

<b>CRM</b> (% GM)	<b>Kukuřice</b> CRM 3/2018 (0 %)	<b>BT11</b> CRM 4/2006 (0,1 %)	<b>BT11</b> CRM 2/2017 (2 %)	<b>MON810</b> CRM 10/2014 (0,5 %)	<b>MON810</b> CRM 11/2014 (2 %)	<b>Sója</b> CRM 11/2018 (0 %)	<b>MON40-3-2</b> CRM 8/2016 (0,1 %)
<b>Deklar./ stanov.</b>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
<b>CRM</b>	<b>MON40-3-2</b> CRM2/2018 (1 %)	<b>Řepka</b> CRM 5/2006 (0 %)	<b>GT73</b> CRM 13/2019/1 (cca 1 %)	<b>GT73</b> CRM 4/2017 (100 %)	<b>RF 3</b> CRM 13/2019/3 (cca 1 %)	<b>MON88913</b> CRM 27/2012 (100 %)	<b>MON1445</b> CRM 30/2012 (100 %)
<b>Deklar./ stanov.</b>	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+
<b>CRM</b>	<b>MON87705</b> CRM 13/2014 (100 %)	<b>MON89788</b> CRM 34/2012 (100 %)	<b>MON88017</b> CRM 31/2012 (100 %)	<b>MON87427</b> CRM 16/2016 (100 %)	<b>NK603</b> CRM 6/2017/1 (1 %)		
<b>Deklar./ stanov.</b>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+		

## 4.1 Zavedení stanovení cp4 epsps

Správnost byla vyhodnocena na základě výsledků pěti časově nezávislých paralelních stanovení. K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech 10 opakováních.

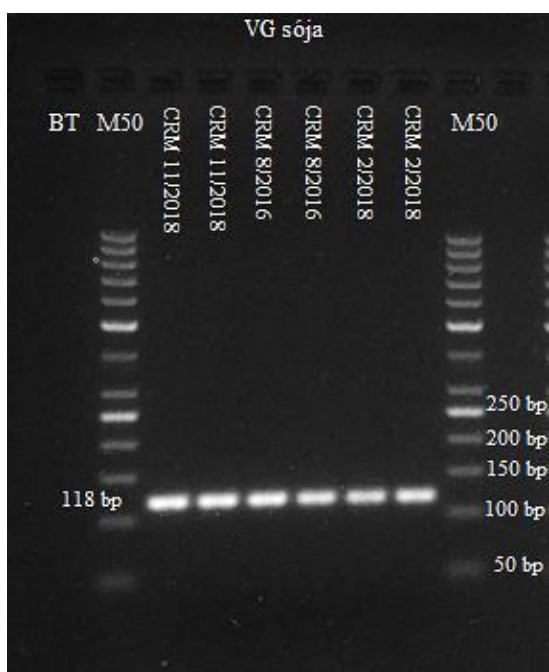
Níže jsou na obrázcích č. 1, 3 a 5 výsledky amplifikací vnitřních genů jednotlivých CRM.

Na obrázku č. 2. je fotografie elektroforetického gelu s vizualizací výsledku amplifikace sekvence cp4epsps pro CRM nemodifikované sóji a CRM MON 40-3-2 (GTS40-3-2).

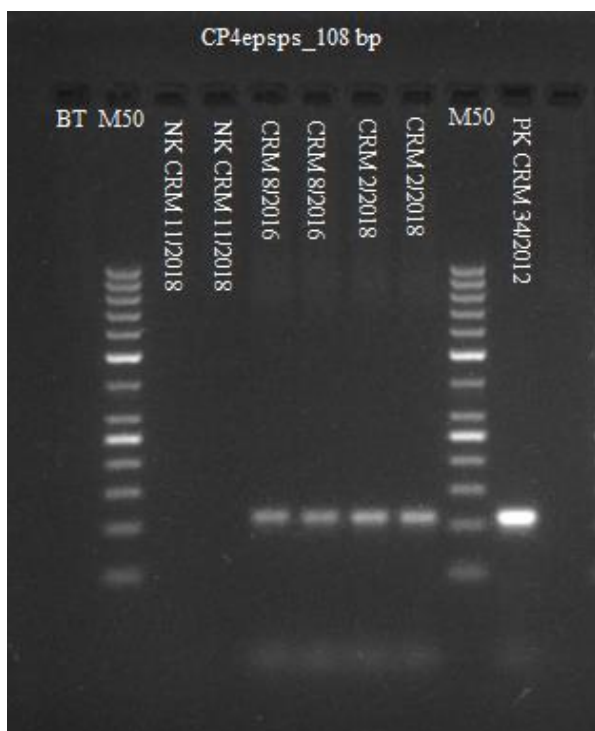
Na obrázku č. 4 je fotografie elektroforetického gelu s vizualizací výsledku amplifikace sekvence cp4epsps pro CRM nemodikovanou kukuřici, BT 11 (0,1 % GM a 2 % GM), MON 810 (0,5 % GM a 2 % GM).

Na obrázku č. 6 je fotografie elektroforetického gelu s vizualizací výsledku amplifikace sekvence cp4epsps pro CRM nemodikovanou řepku, RF3 (cca 1 % GM), GT 73 (~ 1 % GM a 100 % GM).

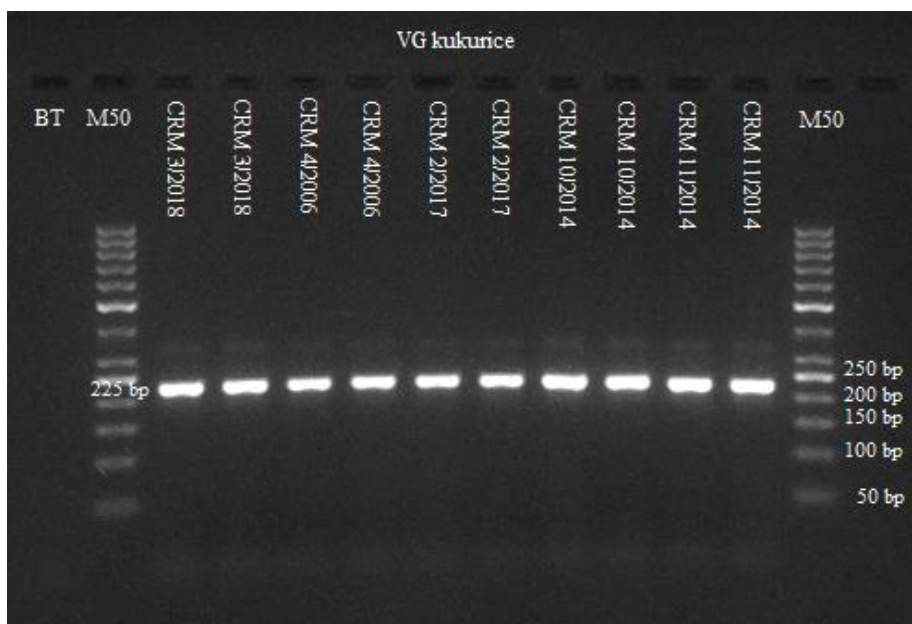
Délka ampliconů obou párů primerů je 108 bp, na fotografiích elektroforetických gelů je tedy při pozitivní reakci pouze jeden band, ačkoli jde o duplexní PCR.



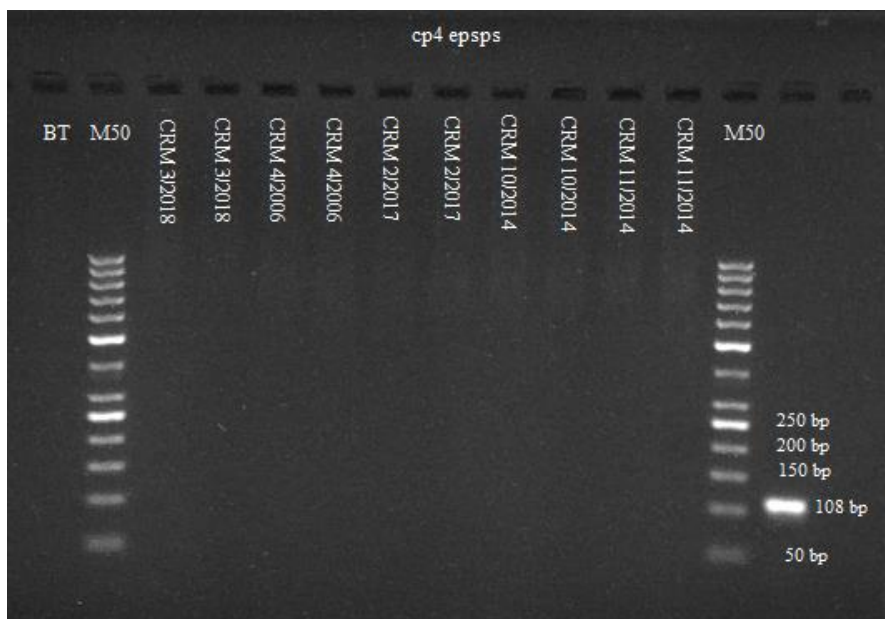
**Obrázek č.1. Vnitřní gen sóji (118bp) - CRM 11/2018, 8/2016, CRM 2/2018; BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp.**



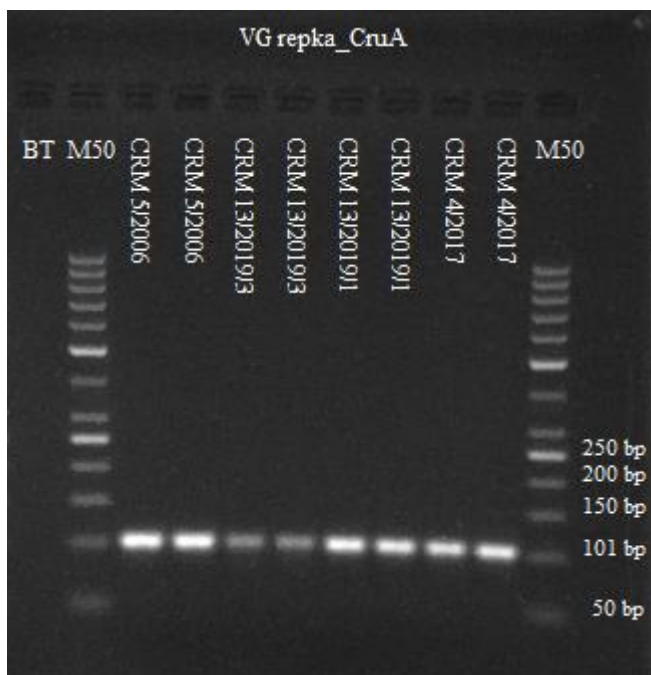
Obrázek č. 2. Stanovení přítomnosti cp4epsps (108 bp) u MON 40-3-2 ( 0,1 % a 1 % GM m/m), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 11/2018, PK-CRM 34/2012. M50-marker 50 bp. Amplifikační kit REDEExtract.



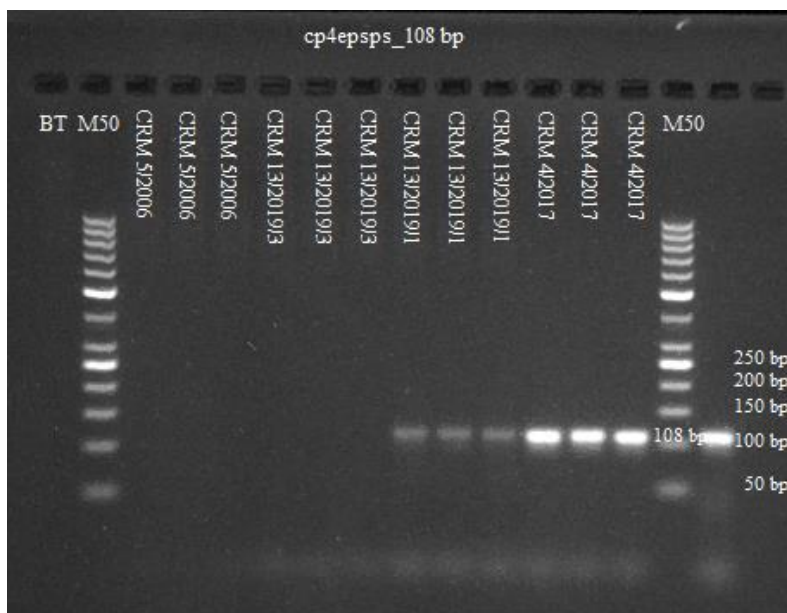
Obrázek č. 3. Vnitřní gen kukuřice (225 bp) - CRM 3/2018, 4/2006, CRM 2/2017, CRM 10/2014, CRM 11/2014; BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp.



**Obrázek č. 4. Stanovení přítomnosti cp4epsps (108 bp) u BT11 (0,1 % a 2 % GM m/m) a MON810 (0,5 % a 2 % GM m/m), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 3/2018, PK-CRM 34/2012. M50-marker 50 bp. Amplifikační kit REDEExtract.**



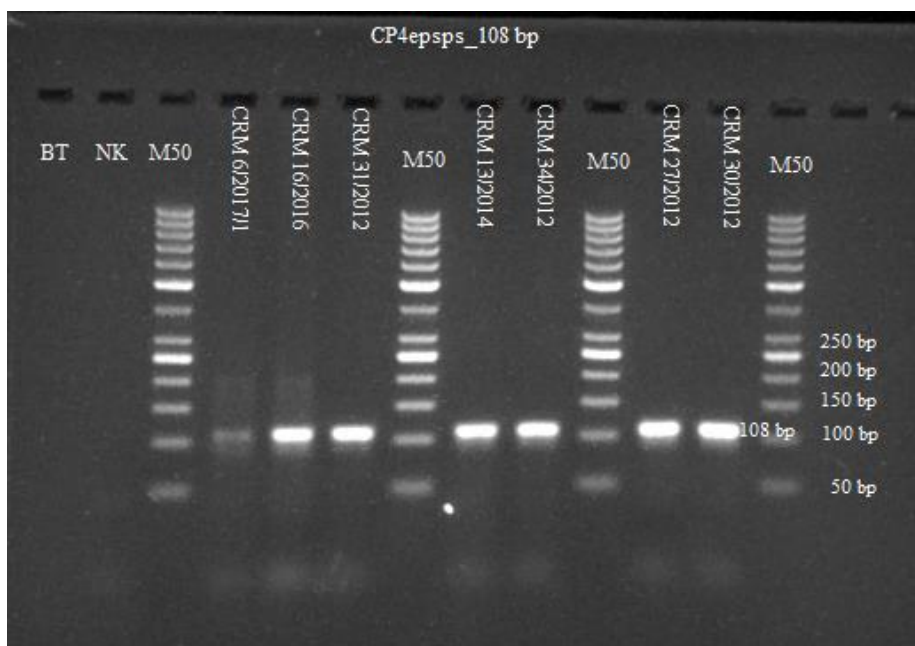
**Obrázek č. 5. Vnitřní gen řepky\_CruA (101 bp) - CRM 5/2006, CRM 13/2019/3, CRM 13/2019/1, CRM 4/2017, BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp.**



**Obrázek č. 6. Stanovení přítomnosti cp4epsps (108 bp) u RF3 (~ 1 % GM m/m) a GT73 (~ 1 % a 100 % GM m/m), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 5/2006, PK-CRM 34/2012. M50-marker 50 bp. Amplifikační kit REDEExtract.**

## **4.2 Ověření detekce cp4 epsps u GM plodin za vedených v OdMB**

Na obrázku č. 7 je fotografie elektroforetického gelu s vizualizací výsledku amplifikace cp4epsps pro CRM modifikace NK603, MON87427, MON88017, MON87705, MON89788, MON89013 a MON1445. Všechny tyto GM plodiny obsahují sekvenci DNA pro CP4epsps. Koncentrace v % GM m/m je uvedena v tabulce č. 7.



**Obrázek č. 7. Stanovení přítomnosti cp4epsps (108 bp) u NK603, MON87427, MON88017, MON87705, MON89788, MON89013 a MON1445, BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 19/2014, M50-marker 50 bp. Amplifikační kit REDEExtract.**

Během verifikace se postupovalo podle metod JPP (postupy č. 10252.1, 10254.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1) a metody Qualitative PCR method for detection of CP4 epsps gene (Barbau-Piednoir et al., 2014), JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. Byly zachovány 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, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

## **5 Závěr**

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci cp4epsps a rozšířit tak možnosti při stanovování geneticky modifikovaných plodin v laboratoři OdMB.

Správnost metody byla ověřena.

Kvalitativní stanovení genetických modifikací je zařazeno do postupů zkoušení u vzorků krmiv a osiv, nově bude doplněno o variantu stanovení parametru cp4epsps.

## **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. Qualitative PCR method for detection of CP4 epsps gene (Barbau-Piednoir et al., 2014), JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis.



---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXVI, 2022/3**

Ročník: XXVI, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2022

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 54

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196