

МЕТОДИ

УДК 57.08:575

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

В. Г. Спиридонов
Л. М. Іщенко
С. Д. Мельничук

Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК,
Національний університет біоресурсів і природокористування
України, Київ

E-mail: spyrydonov@ukr.net

Проведено внутрішньолабораторну валідацію методики якісного та кількісного визначення генетично модифікованих зернових культур методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Для запобігання аналітичним помилкам, псевдопозитивним та псевдонегативним результатам дослідження запропоновано системи контролю та стратегію оброблення даних, що забезпечує максимальний ступінь вірогідності одержаних результатів.

Ключові слова: валідація методики, генетично модифіковані рослини, полімеразна ланцюгова реакція.

В умовах сьогодення генетично модифіковані (ГМ) рослини стали невід'ємною частиною сільського господарства в багатьох країнах світу. У Мексиці, США, Японії ставлення уряду до цієї біотехнологічної продукції позитивне, водночас у країнах Європейського Союзу діють жорсткі вимоги щодо тестування безпечності кожної окремої ГМ-лінії рослин. Однак, яким би не було ставлення до вирощування ГМ-рослин, незаперечною є необхідність проведення широкомасштабного моніторингу за їх поширенням та маркування продукції, виготовленої із ГМ-сировини [3, 4]. Це у свою чергу потребує впровадження у практику надійних методів якісного та кількісного визначення вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО). Найбільш ефективним методом детекції ГМО на сьогодні є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі, який дозволяє не тільки виявити ГМО, але й визначити їх кількість [4, 7]. Співдружність референсних лабораторій з визначення ГМО у продуктах харчування і в кормах (Community Reference Laboratories for GM Food and Feed, CRL-GMFF), яку створено в контексті європейської директиви (Commission Regulation EC No

1829/2003), разом із Європейською мережею лабораторій з визначення ГМО (European Network of Genetically Modified Organism Laboratories, ENGL) розробляють методики якісного та кількісного визначення ГМО методом ПЛР та проводять їх валідацію. Ці методики рекомендовано для практичного впровадження в роботу лабораторій, які займаються виявленням ГМО, однак необхідною умовою є проведення їх внутрішньолабораторної валідації, що дозволяє оцінити, наскільки цей аналітичний метод забезпечує точність, правильність і лінійність отриманих результатів в умовах окремої лабораторії [1, 6, 9].

Метою нашої роботи було провести внутрішньолабораторну валідацію методики якісного та кількісного визначення ГМ зернових культур методом ПЛР у реальному часі.

Матеріали і методи

Дослідження проводили у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК на приладі ABI PRISM SDS 7000

(Applied Biosystems, Великобританія). Матеріалом дослідження були сертифіковані референс-матеріали генетично модифікованих сої (GTS 40-3-2) та кукурудзи (MON 810) зі вмістом ГМО 0,1%; 0,5; 1; 2 і 5% (IRMM, Бельгія). Валідацію методики проводили згідно з вимогами, які рекомендовані Європейською мережею лабораторій з визначення ГМО [2].

Виділення ДНК із сої та кукурудзи здійснювали загальноприйнятим методом [8]. Застосовували ПЛР-аналіз, спрямований на одночасне виявлення двох мішеней: 35 S-промотору і внутрішнього контролю, специфічного для рослинного компонента, що аналізується (для сої — ділянка гена лектину, для кукурудзи — алкогольдегідрогенази). Ампліфікацію проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл такого складу: 1x ПЛР буфер; 2,5 мМ MgCl₂; 1,5 мМ кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів; 5 рМ праймерів для детекції 35S-промотору, 5 рМ праймерів для детекції внутрішнього контролю; 2,5 рМ флуоресцентних зондів; 20 мкМ флуоресцентного барвника ROX; 0,2 од. урацил-ДНК-глікозилази та 1 од. ДНК-полімерази. ДНК вносили в кількості 100–200 нг. Для отримання якісних і достовірних результатів використовували серію контролів: негативний, позитивний та контроль без матриці (NTC).

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3. Основним критерієм оцінки отриманих результатів є значення граничного циклу (Ct), що характеризує певний цикл ПЛР, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції порівняно з базовим рівнем. Зразок вважали позитивним у разі отримання Ct експоненціальних кривих ампліфікації за каналом FAM (35S-промотор) не більше 36 та зі значенням Ct за каналом JOE (внутрішній контроль) 23–24 для сої та 24,5–25,5 — для кукурудзи. Зразок вважали негативним за відсутності ампліфікації за каналом FAM і за ампліфікації внутрішнього контролю зі значенням Ct не більше 23–24 для сої та 24,5–25,5 — для кукурудзи. У випадку, коли відсутня крива ампліфікації за каналом FAM, а значення Ct кривої ампліфікації внутрішнього контролю становила більше 23–24 для сої та 24,5–25,5 — для кукурудзи, зразок вважали сумнівним і проводили повторний аналіз.

Статистичний аналіз здійснювали з використанням програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3, за допомогою якого

визначали стандартне відхилення паралельних вимірювань.

Результати та обговорення

Проведення внутрішньолабораторної валідації методики якісного та кількісного визначення ГМО є необхідною умовою для отримання достовірних результатів у практиці окремої лабораторії. Це насамперед пов'язано з кількісним визначенням вмісту ГМО, на яке впливають різноманітні фактори, такі як пробопідготовка зразків для дослідження, кількість та якість виділеної ДНК, якість реакційного середовища для проведення ПЛР та багато інших, які є різними в усіх лабораторіях. Незнання таких факторів може призвести до невірного визначення кількісного вмісту ГМО, що є небажаним як для споживача, так і для виробника. Зокрема, оцінка параметрів внутрішньолабораторної валідації, отриманих в умовах окремої лабораторії, дозволяє оцінити, наскільки її внутрішні чинники виконання методу впливають на точність, правильність та достовірність отриманих результатів. Під час проведення внутрішньолабораторної валідації нами було вивчено такі параметри.

Ефективність та лінійність ампліфікації. Для визначення лінійності та ефективності ампліфікації методики використовували сертифіковані референс-матеріали ГМ сої та кукурудзи. Експеримент проводили у трьох повторях. Ампліфікацію кожного зі зразків також здійснювали у трьох повторях. За отриманими графіками ампліфікації визначали середнє значення Ct для кожного зразка. Результати оцінювали за допомогою регресійного аналізу та побудови стандартного графіка залежності Ct від логарифма початкової концентрації субстрату (рис. 1, 2).

У табл. 1 наведено значення кута нахилу (slope), ефективності ампліфікації та коефіцієнта кореляції лінійної регресії (R²) калібрувальних графіків з використанням референс-матеріалів для сої та кукурудзи. Ефективність ампліфікації визначали за значеннями кута нахилу:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100.$$

Слід відзначити високий рівень ефективності ампліфікації (припустимі значення –3,1 slope –3,6) та лінійності даного методу (припустимі значення R² > 0,98) (табл. 1) [2].

Робочий діапазон. Окремо для ДНК сої та кукурудзи, виділених із відповідних 5%-х референс-матеріалів ГМ, готували серію п'ятиразових розведень:

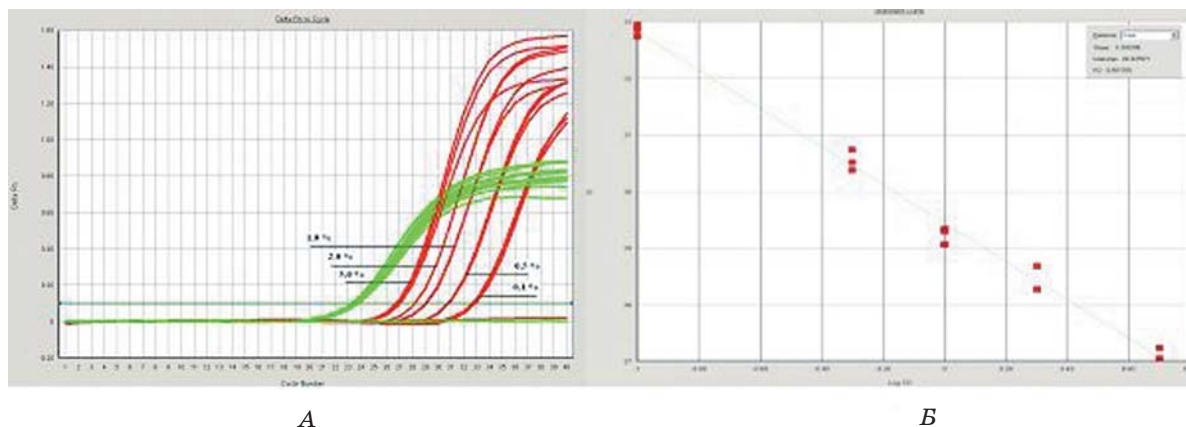


Рис. 1. Криві ампліфікації 35S-промотору 5% -го; 2; 1; 0,5 і 0,1% -го референс-матеріалів ГМ сої лінії GTS 40-3-2 (А) і стандартний графік залежності C_t від логарифма початкової концентрації субстрату (Б)

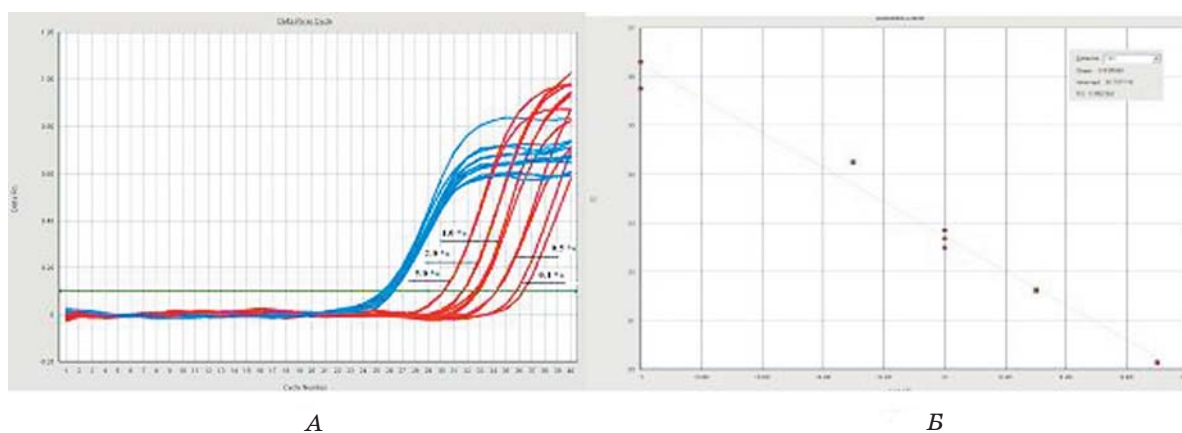


Рис. 2. Графік ампліфікації 35S-промотору 5% -го; 2; 1; 0,5 і 0,1% -го референс-матеріалів ГМ кукурудза лінії MON 810 (А) і стандартний графік залежності C_t від логарифма початкової концентрації субстрату (Б)

Таблиця 1. Ефективність та лінійність ампліфікації методу

	N	Нахил (slope)	Ефективність ПЛР, E (%)	Лінійність, R ²
Соя	1	-3,38	980	0,98
	2	-3,52	92	0,98
	3	-3,31	100	0,98
Середнє значення		-3,40	96,6	0,98
Кукурудза	1	-3,12	100	0,98
	2	-3,43	96	0,99
	3	-3,28	98	0,98
Середнє значення		-3,27	98,0	0,98

ДНК_{GTS 40-3-2}: 405 нг/мкл → 81 нг/мкл →
 → 16,2 нг/мкл → 3,2 нг/мкл → 0,6 нг/мкл →
 → 0,1 нг/мкл → 0,03 нг/мкл.

ДНК_{MON810}: 160 нг/мкл → 32,4 нг/мкл →
 → 6,5 нг/мкл → 1,3 нг/мкл → 0,3 нг/мкл →
 → 0,05 нг/мкл.

Ампліфікацію кожного зразка проводили у трьох повторах. Робочий діапазон концентрацій оцінювали за лінійністю візуальною перевіркою графіка вимірених значень C_t від логарифма концентрацій відповідних зразків (рис. 3).

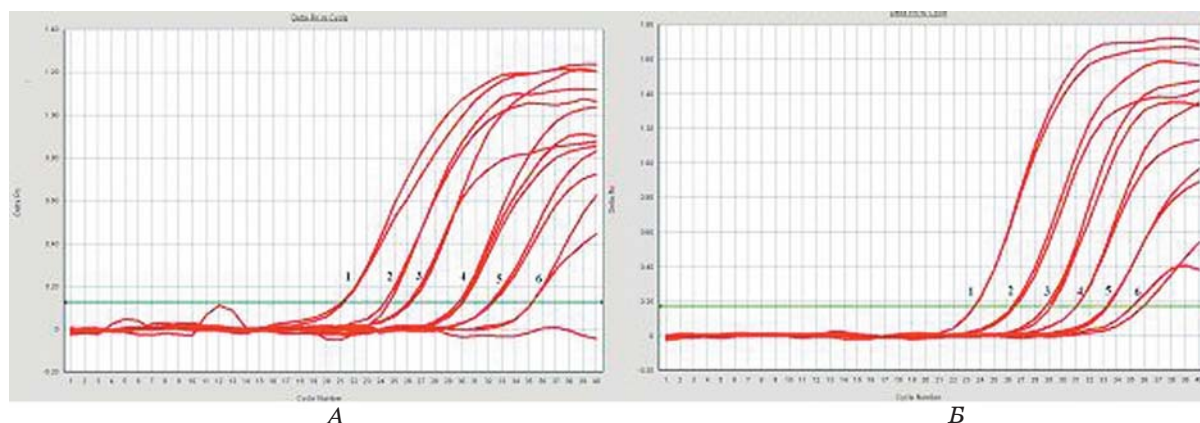


Рис. 3. Робочі діапазони концентрацій ДНК (А — сої, Б —кукурудзи)

Робочий діапазон методу становив 0,1–400 нг для ГМ сої та 0,3–160 нг для ГМ кукурудзи, що відповідає 0,005–20% ГМ сої, та 0,015–8% ГМ кукурудзи. Цей діапазон охоплює граничне значення допустимого вмісту ГМО у зразку (0,9% у ЄС). Утім, значення верхньої межі робочого діапазону може бути вищим, оскільки відповідає початковій концентрації експериментальних зразків.

Межа виявлення (*LOD*) та межа кількісного визначення (*LOQ*). Для встановлення *LOD* та *LOQ* готували серію п'ятиразових розведень зразка ДНК, виділеної із 5% -х референс-матеріалів ГМ сої та кукурудзи. За даними *Ct* визначали мінімальну концентрацію аналіту, яка може бути виявлена зі статистичною достовірністю (*LOD*). Усі зразки зі значенням *Ct* < 40 вважали позитивними. Для встановлення мінімальної концентрації аналіту з прийнятним рівнем достовірності ($RSD_r \leq 25\%$) на графіку залежності *Ct* від логарифму початкової концентрації субстрату визначали крайню точку лінійного діапазону концентрацій.

Межа виявлення (*LOD*) методу становить 0,005 % ГМ сої та 0,01 % ГМ кукурудзи, а межа кількісного визначення (*LOQ*) — 0,03 та 0,05 % відповідно.

Правильність (*trueness*). Правильність методу відображає те, наскільки результати випробувань близькі до приписаного значення. Проводили три незалежних вимірювань референс-матеріалів ГМ сої зі вмістом ГМО 5,0 % і 0,5 % та кукурудзи зі вмістом ГМО 5,0 % і 0,1 % та визначали середнє значення. Розрахунок правильності проводили за формулою:

$$\text{Правильність} = (\text{середнє значення} / \text{дійсне значення}) \times 100.$$

Значення правильності має бути в межах $\pm 25\%$ від приписаного [2], що простежується в наших дослідженнях (табл. 2).

Таблиця 2. Експериментальні дані щодо правильності методу

	Приписане значення ГМО, %	Середнє значення отриманого ГМО, %	Правильність, %
Соя	0,5	0,53	106,0
	5,0	4,88	98,0
Кукурудза	0,1	0,12	120,0
	5,0	5,32	106,4

Збіжність (RSD_r). Збіжність методу відображає, наскільки отримані результати відрізняються від приписаного за багаторазового визначення одного й того самого зразка. Проводили 6 незалежних вимірювань референс-матеріалів ГМ сої та кукурудзи зі вмістом ГМО 5,0% і 0,5%. Потім для кожної концентрації визначали стандартне відхилення значень відсотка ГМО паралельних вимірювань. Розрахунок збіжності здійснювали за формулою:

$$\text{Збіжність} = (\text{стандартне відхилення} / \text{середнє значення}) \times 100.$$

Значення RSD_r має бути $\leq 25\%$ [2], що також простежується в наших дослідженнях (табл. 3).

Внутрішньолабораторна відтворюваність (RSD_R). Внутрішньолабораторну відтворюваність оцінювали на основі результатів реальних проб, отриманих в умовах відтворюваності, тобто в умовах, які характеризують довготермінову варіацію всіх факторів, що можуть вплинути на результат вимірювання в лабораторії на кожному з етапів

Таблиця 3. Експериментальні дані збіжності методу

	Приписане значення ГМО, %	Середнє значення отриманого ГМО, %	Стандартне відхилення, (SD)	Збіжність (RSD_r), %
Соя	0,5	0,52	0,06	11,54
	5,0	5,10	0,94	18,43
Кукурудза	0,5	0,52	0,08	15,38
	5,0	5,32	0,79	14,84

визначення ГМО [5]. Одержане значення внутрішньолабораторної відтворюваності RSD_R для сої становить 7,71%, для кукурудзи — 4,97%, що не перевищує значення нормованої межі < 35% для цілої низки зразків [2].

Невизначеність методу. Основою для розрахунку невизначеності результату є експериментальні дані оцінки внутрішньолабораторної відтворюваності та визначення правильності методу з використанням сертифікованих референс-матеріалів (табл. 4) [5].

Таблиця 4. Невизначеність методу для експериментальних зразків

	Приписане значення ГМО, %	Середнє значення отриманого ГМО, %	Невизначеність, %
Соя	0,5	0,53	0,40
	5,0	4,88	1,06
Кукурудза	0,1	0,12	0,08
	5,0	5,06	0,34

Джерела невизначеності:

- внутрішньолабораторна відтворюваність, на яку впливають об'єм зразка, остаточний об'єм реакційного середовища, похибка під час зважування стандарту тощо;
- систематична складова невизначеності (зміщення), яку розраховують на основі визначення правильності методів виконання з використанням сертифікованих референс-матеріалів.

Отже, уперше в Україні згідно з міжнародними вимогами проведено внутрішньолабораторну валідацію методики якісного та кількісного визначення генетично модифікованої сої і кукурудзи методом ПЛР у реальному часі. Отримані параметри валідації в умовах відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК задовольняють вимогам європейських стандартів [2], що дає змогу застосувати зазначену методику в практиці лабораторії.

Дані дослідження можна використовувати як приклад для проведення внутрішньолабораторної валідації в лабораторіях, які здійснюють визначення ГМО.

ЛІТЕРАТУРА

1. Commission Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.
2. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing Europe Network of GMO Laboratories (ENGL). Version 25.01.2008.
3. Graef F., Schmidt G., Schröder W., Stachow U. Determining ecoregions for environmental and GMO monitoring networks // Environ. Monit. Assess. — 2005. — V. 108 (1–3). — P. 189–203.
4. Remus I., Grönewald A. et al. Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs) // Anal. Bioanal. Chem. — 2009 (October). — Original Paper.
5. Traumann S., Burns M., Broll H. et al. Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories // European Commission. — 2009.
6. International Standard (ISO) 17025. 2000. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland. — 2000.
7. Holst-Jensen A., Ronning S. B., Lovseth A., Berdal K. G PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — V. 375. — P. 1985–993.
8. Boom R., Sol C. J., Salimans M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. — 1990. — V. 28 (3). — P. 495–503.
9. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. — Eurachem, 1998. <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ
КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЗЕРНОВЫХ
КУЛЬТУР МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

*В. Г. Спиридонов
Л. М. Ищенко
С. Д. Мельничук*

Украинская лаборатория качества
и безопасности продукции АПК,
Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

E-mail: spyrydonov@ukr.net

Проведена внутрилабораторная валидация методики качественного и количественного определения генетически модифицированных зерновых культур методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для предупреждения аналитических ошибок, ложноположительных и ложноотрицательных результатов предложены системы контроля и стратегия обработки результатов.

Ключевые слова: валидация методики, генетически модифицированные растения, полимеразная цепная реакция.

**VALIDATION OF METHOD
OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE
DETERMINATION OF GENETICALLY
MODIFIED GRAIN-CROPS
BY THE REAL-TIME POLYMERASE
CHAIN REACTION**

*V. G. Spyrydonov
L. M. Ischenko
S. D. Melnychuk*

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety
of AIC Products,
National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: spyrydonov@ukr.net

Validation of in-house method of quality and quantitative determination of genetically modified grain-crops by the real-time polymerase chain reaction was carried out. For prevention of analytical errors, false-positive and false-negative results of assays, the offered systems of controls and strategy of results evaluation were proposed. This provides the maximal degree of authenticity of the received results.

Key words: validation of method, genetically modified plants, polymerase chain reaction.