

Application Note 4



Uporaba certificiranih referentnih materijala za kvantifikaciju GMO u hrani i stočnoj hrani

Ova uputa za primjenu pruža informacije i smjernice za ispravnu uporabu JRC-ovih referentnih materijala certificiranih za njihov GM (genetski modificiran) maseni udio određenog GM događaja. U njoj se objašnjava kako je određen sustav mjeranja kvantifikacije GMO u kontekstu EU.

UVOD

U EU, genetski modificirani organizmi (GMO) moraju biti odobreni prije nego im se odobri stavljanje na europsko tržište. Odredba (EZ) br. 1830/2003 zahtijeva da hrana i proizvodi za stočnu hranu koji sadrže više od 0,09% GMO moraju biti označeni. Prema Uredbi (EU) br. 619/2011 stočna hrana može sadržavati 0,1 (m/m)% GMO-a za koji je u tijeku postupak odobrenja ili za koji je odobrenje u EU isteklo. Za primjenu zakona EU, mora se obaviti pouzdana kvantifikacija GMO u proizvodima za hranu/stočnu hranu. Zbog toga, odluka o odobrenju svakog GMO-a, koju je objavila EZ, navodi metodu otkrivanja i certificirani referentni materijal (CRM) koji određuje mjerni sustav za utvrđivanje kvantifikacije. Zvanični CRM koristi se za kalibriranje određenog događaja referentnom metodom kvantitativnog PCR-a koji je potvrdio Europski referentni laboratorij za GM hranu i stočnu hranu (EU-RL GMFF).

OSOBINE CRM-a ZA GMO

Certificirane vrijednosti svih CRM-a za GMO od JRC-a zasnivaju se na masama suhog, genetski modificiranog biljnog materijala (u većini slučajeva sjeme u prahu) i/ili suhog modificiranog biljnog materijala koji nije GM. ZA CRM-e koji zahtijevaju miješanje GM i materijala koji nisu GM, mase su korigirane radi njihove procjene sadržaja vode i čistoće tijekom certifikacije. Maseni udio GM-a izračunava se na sljedeći način:

korigirana GM masa

korigirana GM masa + korigirana masa koja nije GM

Svaki CRM za GMO certificiran je za maseni udio određenog GM događaja (naveden na certifikatu). CRM se može koristiti isključivo za kvantifikaciju ovog događaja a odgovarajući slijepi materijal (koji nije GM materijal) može se koristiti isključivo za dokazivanja odsustva ovog događaja ispod praga navedenog na certifikatu.

Za svaki CRM za GMO, preporučeni uvjeti skladištenja navedeni su na certifikatu. Proizvođač RM-a (referentnog materijala) ne može snositi odgovornost za promjene koje se mogu dogoditi tijekom skladištenja materijala u prostorijama kupca, posebice otvorenih uzoraka. Ako se CRM za GMO koristi više puta, potrošnja vode higroskopskih

materijala treba se umanjiti zatvaranjem boce odmah nakon uzimanja uzorka.

METODA KVANTIFIKACIJE GMO-a

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (qPCR) uobičajeno se koristi za kvantifikaciju GM sadržaja u uzorcima hrane i stočne hrane. Ova tehnika kvantifikacije mjeri omjer između transgenične deoksiribonukleinske kiseline (DNK), tj. DNK dobivene genetskom modifikacijom, i endogenične DNK, koja je karakteristična za biološke vrste.

CRM-i za GMO koje je objavila JRC namijenjeni su za korištenje u spoju s referentnom metodom kvantitativnog PCR-a koja je specifična za događaj i potvrđena od strane EU-RL GMFF. Metode detekcije kvantitativne PCR koje su predane i odobrene na temelju Uredbe (EZ) br. 1829/2003 dostupne su javnosti putem početne stranice EU-RL GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>StatusOfDossiers.aspx>). Ako se CRM-i koriste u screening analizama, korisnik mora uzeti u obzir da CRM-i koji nisu GMO mogu stvoriti pozitivne signale u screening analizi iako su stvarno negativni primjeri za metodu specifičnu za događaj. Posljedično, pozitivni se signali screeninga moraju tumačiti s oprezom.

Tijekom pripreme CRM-a za GMO vodila se posebna briga kako bi se osiguralo da GM prah i prah koji nije GMO budu slični po distribuciji veličine čestica. Ovo je naročito važno jer je količina DNK, koja se može ekstrahirati, u uzajamnoj vezi s veličinom čestica. Različite učinkovitosti ekstrakcije DNK iz GM praha i praha koji nije GM bi utjecale na sadržaj GM koji se mjeri pomoću qPCR. Nadalje, moraju se koristiti samo metode ekstrakcije DNK za koje je potvrđeno da ispunjavaju zahteve za kvantifikaciju GMO-a i za koje je dokazano da djeluju na različite sorte iste se vrste. Tijekom certifikacije, maseni udio GM-a u CRM-u se verificira pomoću metode qPCR-a koja je specifična za događaj. Ako se primjeti drugačija ekstrakcija DNK, ta informacija će se staviti na raspolaganje.

Genetski sastav različitih dijelova sjemena jednosupnica (npr. endosperm kukuruza, ovojnica sjemena i embrij) se razlikuje, i vrijednost omjera DNK u integralnom brašnu, proizvedenom od cijelog zrna razlikuje se od brašna proizvedenog od rafiniranog zrna (koje sadrži samo endosperm). JRC

Rujan 2006.

Datum zadnje revizije: Kolovoz 2019.

Autor: Stefanie Trapmann

Europska komisija - Zajednički istraživački centar

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgija

E-pošta: stefanie trapmann@ec.europa.eu

koristi brašno od cijelog zrna za svoje CRM-e za GMO.

Svi CRM-i za GMO od JRC proizvedeni su gravimetrički korištenjem čistih biljnih materijala koji nisu GM i koji su GM. Oni su certificirani za maseni udio GM-a, podržavajući provedbu pragova masenih udjela utvrđenih u odgovarajućim EU zakonima o hrani i hrani za životinje. Većina CRM-a za GMO namijenjena je za korištenje u vidu kalibranata za qPCR mjerjenja.

Sustav mjerjenja za kvantifikaciju GMO-a u pravnom kontekstu EU utvrđen je prema zvaničnom CRM-u, navedenom u odluci o odobrenju i prema metodi mjerjenja koju je potvrdio EU-RL, stoga nema potrebe za primjenom korekcija. Također, zamjenjivost, koja je ključna osobina za referentne materijale ako se primjenjuju drugačije metode mjerjenja, ovdje se ne mora razmatrati.

ŠIFRA CRM-a ZA GMO

Svaki CRM za GMO ima pojedinačnu šifru koja se sastoji od kombinacije slova i znamenki. Opći format je ERM-BF123xy. "ERM®" navodi brand (zaštićeni registrirani žig za Europski referentni materijal) a BF označava da je biljka koja služi kao CRM certificirana na GM sadržaj. Sljedeće tri znamenke karakteristične su za svaki pojedinačni događaj. "x" je malo slovo u rasponu od "a" do "g" i dodano iza šifre događaja, kako bi se označila razina masenog udjela (tj. ERM-BF412a = nominalna 0 g/kg, ERM-BF412b = nominalna 1000 g/kg, ERM-BF412c = nominalna 1 g/kg, ERM-BF412d = 10 g/kg, nominalna ERM-BF412e = 100 g/kg). "y" je malo slovo u rasponu od "K" do "z" i označava drugu, treću, itd. proizvodnu seriju CRM-a. Prva proizvodna serija dolazi bez ovog dodatnog slova "y". U većini slučajeva, različite razine koncentracije proizvode se po kompletu: nominalna 0 i 100%, i mješavine 0,1, 1, 10 (m/m)%. Čepovi šifrirani po bojama koriste se za olakšavanje identifikacije različitih razina masenog udjela: nominalna 0 g/kg = srebrni, nominalna 1000 g/kg = crni, nominalna 1 g/kg = zlatni, nominalna 10 g/kg = crveni, nominalna 100 g/kg = smeđi.

Svaka proizvodna serija CRM-a obrađuje se korištenjem različitih biljnih materijala (npr. lotovi sjemena). Dodatno, distribucija veličine čestica može se razlikovati unatoč svim naporima da se očuva konstantnost između starijih i novijih serija. Stoga, utvrđene linije kalibracije s bilo kojim novim serijama CRM-a mogu se razlikovati od linija kalibracije utvrđenih sa starijim serijama i potrebno je krenuti s novim grafikonom kontrole kvalitete kada se CRM iz nove serije koristi prvi put. Također, preporučljivo je obaviti promjenu za sve primjene, uključujući kalibraciju i kontrolu kvalitete prilikom korištenja stare serije u novoj seriji. Zbog sljedivosti, uvek je potrebno navesti specifični CRM korišten za kalibraciju.



Slika 1: Komplet CRM-a za GMO

KARAKTERISTIČNI ASPEKTI CERTIFIKACIJE

Za većinu CRM-a za GMO, također su dostupni čisti prah koji nije GMO i čisti prah koji je GMO. Onaj koji nije GMO certificiran je da sadrži "manje od" datog masenog udjela GMO-a na temelju detekcije granice (LOD), metode korištene za karakterizaciju. Čisti GMO prah certificiran je da sadrži "više od" datog masenog udjela na temelju broja ispitanih sjemena i statističke procjene. Kada se koristi za kalibraciju, laboratorij mora osigurati uporabu certificiranih vrijednosti (pogledajte primjer).

Nekolicina CRM-a za GMO ima certifikat za svoj identitet (tj. ERM-BF421b). Takvi CRM-i namijenjeni su za uporabu u vidu pozitivnih kontrolnih uzoraka u, npr. postupcima screeninga. Oni se trebaju koristiti za potvrdu prisustva (ili odsustva) određenog GMO događaja, ali nisu prikladni za kvantifikaciju GMO-a.

Neki CRM-i za GMO certificirani su pomoću asimetričnog opsega nesigurnosti. Ako se takav CRM koristi za kontrolu odstupanja (pogledajte ERM Uputu za primjenu 1), "plus nesigurnost" se mora koristiti slučaju u kojem prosječni mjerni rezultat premašuje certificiranu vrijednost, a "minus nesigurnost" se mora koristiti u slučaju u kojem je prosječni mjerni rezultat niži od certificirane vrijednosti.

Na omjer broja kopija DNK je certificirana nekolicina CRM-a za GMO specifične razine koncentracije, pored masenog udjela GMO (tj. ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c) a na raspolaganje je stavljen odgovarajući plazmid kalibranta (tj. ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Ako se koristi za ispitivanje na sukladnost sa zakonom u EU, rezultati mjerjenja moraju se konvertirati iz omjera broja kopija DNK u masene udjele. Obratite pažnju da EU-RL GMFF u ovu svrhu pruža utvrđene čimbenike konverzije.

PRIMJER UPORABE ČISTIH CRM-A ZA GMO I NJIHOVE NESIGURNOSTI

Sljedeće informacije mogu se naći na certifikatima analiza ERM-BF412ak i ERM-BF412bk (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

	Bt11 maseni udio kukuruza ¹⁾	
	Certificirana vrijednost [g/kg]	Nesigurnost [g/kg] ⁴⁾
ERM-BF412ak	< 0,12 ²⁾	-
ERM-BF412bk	> 970 ³⁾	-

1) Genetski modificiran kukuruz s jedinstvenim identifikatorom SYN-BTØ11-1.
 2) Certificirani referentni materijal proizведен je od konvencionalnih, nemodificiranih sjemena kukuruza. U ovom materijalu nije detektirana kontaminacija prilikom korištenja specifične za događaj kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze usmjerenje na Bt11 događaj kukuruza. Detekcija granice (LOD) bila je 0,12 g/kg. S 95% sigurnosti, stvarni maseni udio kukuruza Bt11 u materijalu je ispod 0,12 g/kg. Certificirana vrijednost sljediva je u Međunarodnom sustavu mjernih jedinica (SI).
 3) Ovaj certificirani referentni materijal proizведен je od genetski modificiranih sjemena kukuruza Bt11. Certificirana vrijednost temelji se na genetskoj čistoći praha kukuruza u odnosu na kukuruz Bt11. Ukupno je, pojedinačno, ispitano 209 sjemena na prisutnost događaja kukuruza Bt11, od čega je 207 sjemena imalo pozitivne rezultate. S 95% sigurnosti, stvarni maseni udio kukuruza Bt11 u materijalu je iznad 970 g/kg. Certificirana vrijednost sljediva je u Međunarodnom sustavu mjernih jedinica (SI).
 4) Nesigurnost je proširena nesigurnost s faktorom pokrivanja $k = 2$ koji odgovara razini sigurnosti od oko 95%, procijenjene prema ISO/IEC Vodiču 98-3, Vodič za izražavanje nesigurnosti u mjerenu (GUM:1995), ISO, 2008.

Na temelju gore navedenih informacija, može se zaključiti da je potvrđeno da CRM ERM-BF412ak sadrži < 0,12 g Bt11/kg te da u prahu materijala nije detektirana kontaminacija. S 95 % sigurnosti, stvarni maseni udio kukuruza Bt11 u materijalu je ispod 0,12 g/kg. Stoga, za dalje izračune, uključujući određivanje kalibracijskih krivulja, treba se koristiti vrijednost od 0 g/kg.

Potvrđeno je da CRM ERM-BF412bk sadrži > 970 g/kg. 207 od 209 ispitanih sjemena bilo je pozitivno na prisutnost događaja kukuruza Bt11. S 95% sigurnosti, stvarni maseni udio kukuruza Bt11 u materijalu je iznad 970 g/kg. Za dalje izračune, prilikom određivanja kalibracijskih krivulja za ovaj GM, treba se koristiti procijenjena genetska čistoća od 990 g/kg. Imajte na umu da se za čiste CRM-e za GMO prah u kojem nije nađena kontaminacija treba koristiti 1000 g / kg.

U svim slučajevima, nesigurnost koja će se koristiti izračunata je korištenjem intervala između brojčane vrijednosti i date granice podijeljeno s $\sqrt{3}$. Na primjer:

ERM-BF412ak: Korištena vrijednost je 0,0 g/kg; nesigurnost je 0,12 g/kg – 0 g/kg/ $\sqrt{3} = 0,07$ g/kg

ERM-BF412bk: Korištena vrijednost, temeljena na genetskoj čistoći je $207 / 209 * 1000 = 990$ g/kg. "Minus nesigurnost" je $990 - 970) / \sqrt{3} = 11.5$ g/kg. "Plus nesigurnost" je 10 g/kg jer mogući sadržaj GM-a ne smije premašiti 1000 g/kg.