

Hitelesített referenciaanyagok használata az élelmiszerek és takarmányok GM tartalmának mennyiségi meghatározásához

Ez az alkalmazási feljegyzés információt és útmutatást nyújt a Közös Kutatóközpont által egy meghatározott GM (génmódosított) esemény GM tömegaránya szerint hitelesített referenciaanyagok megfelelő használatához. Ismerteti, hogyan állították össze a GM mennyiségi meghatározási mérőrendszert az EU vonatkozásában.

Szerző: Stefanie Trapmann

Európai Bizottság – Közös Kutatóközpont
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

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

BEVEZETÉS

Az EU-ban a géntechnológiával módosított szervezeteket (GM-ek) engedélyezni kell, mielőtt azok az európai piacra kerülhetnek. Az 1830/2003/EK rendelet előírja a 0,9%-ot meghaladó mértékben GM-et tartalmazó élelmiszer- és takarmánytermékek jelölését. A 619/2011/EU rendelet szerint 0,1 tömegszázalék (m/m%) lehet azoknak a takarmányoknak a GM tartalma, amelyek engedélyezési eljárása függőben van vagy amelyek engedélye lejárt az EU-ban. Az EU jogszabályok alkalmazása érdekében a GM tartalom mennyiségi meghatározását az élelmiszer- és takarmánytermékekben megbízható módon kell elvégezni. Ezért az EK által kiadott minden egyes GM engedélyben fel van tüntetve a kimutatás módja és a mennyiségi meghatározási rendszer beállításához alkalmazott hitelesített referenciaanyagminta (certified reference material, CRM). A géntechnológiával módosított élelmiszereket és takarmányokat vizsgáló európai referencialaboratórium (European Reference Laboratory for GM Food and Feed, EU-RL GMFF) által validált, eseményspecifikus kvantitatív PCR referenciamódszerének kalibrálásához a hivatalos CRM-et kell használni.

A GM MÉRÉSÉRE SZOLGÁLÓ CRM-EK JELLEMZŐI

A Közös Kutatóközpontból származó minden GM-CRM hitelesített értéke a száraz, genetikailag módosított növényi anyag (legtöbb esetben magőrlemény) és/vagy a száraz, genetikailag nem módosított növényi anyag tömegén alapul. Azon CRM-ek esetében, amelyeknél előírás a GM és nem GM anyagok összekeverése, a tömeget a hitelesítés során a víztartalmuk és a becsült tisztaságuk szerint korrigálják. A GM tömeghányad a következő képlettel számolható ki:

$$\frac{\text{korrigált GM tömeg}}{\text{korrigált GM tömeg} + \text{korrigált nem GM tömeg}}$$

Minden GM-CRM-et egy adott génmódosított eseményre, annak tömegaránya alapján tanúsítanak (amelyet a tanúsítványon megjelölnek). Egy adott CRM-et csak a tanúsítványon feltüntetett esemény mérésére lehet használni, és a megfelelő vakminta (nem GM anyag) csak annak bizonyítására alkalmas, hogy az adott GM esemény a tanúsítványban meghatározott küszöbérték alatt van jelen.

Minden GM-CRM esetében feltüntetik a javasolt tárolási körülményeket a tanúsítványon. A referenciaanyag gyártója nem tehető felelőssé az anyagnak a vásárló telephelyén történő tárolása alatt bekövetkező változásaiért, különösen a felbontott minták esetén. Ha egy GM-CRM-et többször is használnak, a higroszkópos anyagok vízmegkötését minimálisra kell csökkenteni úgy, hogy a tartóedényt azonnal le kell zárni a minta kivétele után.

GM KVANTIFIKÁLÁSI MÓDSZER

Az élelmiszer- és takarmánymintákban lévő GM tartalom mennyiségi meghatározására általánosan elterjedt módszer a kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) alkalmazása. Ez a DNS mérésen alapuló mérési módszer a transzgenikus, vagyis genetikailag módosított dezoxiribonukleinsav (DNS) és a biológiai fajokat meghatározó endogén DNS mennyisége közötti arányt vizsgálja.

A Közös Kutatóközpont által kiadott GM-CRM-eket együtt kell használni az EU-RL GMFF által validált, eseményre specifikus kvantitatív PCR referenciamódszerrel. Az 1829/2003/EK rendelet alapján benyújtott és validált kvantitatív PCR detektálási módszerek listája hozzáférhető az EU-RL GMFF honlapján (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Ha a CRM-eket szűrési assay-khez használják, a felhasználónak figyelembe kell vennie, hogy a nem GM-CRM pozitív jeleket adhat a szűrési assay-vel, miközben azok valós negatívok az adott eseményre specifikus módszerek esetén.

Ennek következtében a pozitív szűrési jeleket kellő körültekintéssel kell értelmezni.

A GM mérésére szolgáló CRM-ek elkészítésekor különös figyelmet fordítottak annak biztosítására, hogy a GM és nem-GM örlemények szemcseméret-eloszlása azonos legyen. Ez különösen fontos, mivel a kivonható DNS mennyisége korrelál a részecskemérettel. A GM és nem-GM örlemények eltérő DNS extrakciós hatékonysága befolyásolná a pPCR-rel mért GM koncentráció értékét. Továbbá csak olyan validált DNS-kivonási módszereket szabad használni, amelyek teljesítik a GM mennyiségi meghatározási feltételeit, és amelyek bizonyítottan hatásosak ugyanazon faj különböző fajtái esetében. A hitelesítés során egy CRM GM-tömeghányadát egy eseményre specifikus qPCR módszerrel ellenőrzik. Ha eltérő DNS-kivonhatóságot észlelnek, ezt az információt is feltüntetik.

Az egyszikűek különböző magrészeinek (pl. kukorica endospermium, magburok és embrió) genetikai összetétele eltérő, így a DNS arányszám különbözik az egész gabonaszeméből készült teljes kiőrlésű lisztben és a finomított (csak az endospermiumot tartalmazó) gabonaszeméből származó lisztben. A Közös Kutatóközpont egész gabonaszeméből készült lisztet használ a GM-CRM-ekhez.

A Közös Kutatóközpont valamennyi GM-CRM-jét gravimetrikus módszerrel állítják elő tiszta nem GM és GM növényi anyagokból. Hitelesítéssel rendelkeznek a GM tömegarányára vonatkozóan, amely megfelel az élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó EU szabályozásban meghatározott tömegarány küszöbértékeinek. A legtöbb GM-CRM a qPCR eljárások kalibrátoraként használatos.

A GM-ek mennyiségi meghatározásának mérési rendszerét EU jogi értelemben véve a hivatalos (az engedélyezési határozatban megjelölt) CRM, valamint az EU-RL validált mérési módszere határozza meg, ezért nincs szükség korrekció alkalmazására. Hasonlóképpen nem kell figyelembe venni a szállíthatóságot sem, amely a referenciaanyagok jellemzésekor kritikus fontosságú, ha különböző mérési módszereket alkalmaznak.

A GM-CRM KÓDOLÁSA

Minden GM-CRM egyedi kóddal rendelkezik, amely betűk és számok kombinációjából áll. Az általános formátum ERM-BF123xy. Az „ERM[®]” megadja a márkanevet (oltalom alatt álló védjegy, jelentése: European Reference Material), a BF pedig megadja, hogy ez egy hitelesített GM tartalmú növényi CRM. Az ezt követő három

számjegy az egyes meghatározott eseményekre jellemző. Az x egy „a” és „g” közötti kisbetű; az esemény kódja mögött áll, és a tömeghányad szintjét jelöli (azaz ERM-BF412a = névlegesen 0 g/kg, ERM-BF412b = névlegesen 1000 g/kg, ERM-BF412c = névlegesen 1 g/kg, ERM-BF412d = névlegesen 10 g/kg, ERM-BF412e = névlegesen 100 g/kg). Az y egy „k” és „z” közötti kisbetű, és a második, harmadik stb. CRM gyártási sorozatot jelöli. Az első gyártási sorozat ezen további y betű nélkül kerül forgalomba. A legtöbb esetben készletenként öt különböző koncentrációsintet gyártanak: névlegesen 0 és 100%, valamint keverékek 0,1, 1 és 10 m/m%-kal. A színekkel ellátott kupakok megkönnyítik a különböző tömeghányadszintek azonosítását: névlegesen 0 g/kg = ezüst, névlegesen 1000 g/kg = fekete, névlegesen 1 g/kg = arany, névlegesen 10 g/kg = piros, névlegesen 100 g/kg = barna.

Minden egyes CRM gyártási sorozatot különböző növényi anyagok (pl. mag tételek) felhasználásával dolgoztak fel. Emellett a szemcseméret-eloszlás is különbözhet, noha mindent megtesznek azért, hogy ez egyenletes maradjon a régebbi és az újabb sorozatok között. Ezért az új CRM sorozatokkal meghatározott kalibrációs vonalak különbözhetnek a régi sorozattal meghatározott kalibrációs vonalaktól, és új minőség-ellenőrző diagramot kell készíteni, amikor először kerül felhasználásra egy új sorozatból származó CRM. Hasonlóképpen javasolt a módosítás minden alkalmazásnak (beleértve a kalibrációt és a minőség-ellenőrzést is) a régi sorozata és az új sorozata között. A nyomkövethetőség érdekében a kalibráláshoz használt konkrét CRM-et mindig fel kell tüntetni.



BF: hitelesített GM tartalmú növényi CRM
 412: az egyes meghatározott GM eseményekre specifikus számok
 c: „a” és „g” közötti kisbetűk, amelyek megadják a tömeghányad szintjét
 k: „k” és „z” közötti kisbetűk, amelyek a második, harmadik stb. gyártási sorozatot jelölik

1. ábra: GM-CRM készlet

SPECIFIKUS HITELESÍTÉSI SZEMPONTOK

A GM-CRM-ek többségénél tiszta nem GM őrlemény és tiszta GM őrlemény egyaránt rendelkezésre áll. A nem GM őrlemény a hitelesítése szerint „kevesebb mint” egy meghatározott tömegarányú GM-et tartalmaz a jellemzéshez használt módszer detektálási határértéke (LOD) alapján. A tiszta GM őrlemény a hitelesítése szerint „több mint” egy meghatározott tömeghányadot tartalmaz a vizsgált magszám és a statisztikai értékelés alapján. Amikor kalibráláshoz használják, a laboratóriumnak kell gondoskodnia a hitelesített értékek használatáról (lásd a példát).

Néhány GM-CRM az azonosítója (azaz ERM-BF421b) alapján van hitelesítve. Az ilyen CRM-ek pozitív kontrollmintaként használatosak, pl. szűrési felhasználás során. Arra szolgálnak, hogy igazolják egy bizonyos GM esemény jelenlétét (vagy hiányát), de nem alkalmasak a GM tartalom mennyiségi meghatározására.

Egyes GM-CRM-eket aszimmetrikus bizonytalansági tartomány szerint hitelesítettek. Ha ilyen CRM-et használnak a részrehajlás szabályozására (lásd „ERM Application Note 1”) a „pozitív bizonytalanságot” akkor kell használni, ha az átlagos mérési eredmény meghaladja a hitelesített értéket, és a „negatív bizonytalanságot” akkor kell használni, ha az átlagos mérési eredmény alacsonyabb, mint a hitelesített érték.

Néhány, bizonyos koncentrációsintű GM-CRM-et a GM tömeghányad mellett a GM-DNS kópiaszám-arány szerint (azaz ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c) is hitelesítettek, és a megfeleltetett plazmidalapú kalibrálószert is elérhetővé tették (azaz ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Ha jogi megfelelési teszteléshez használják az EU-ban, a mérési eredményeket át kell váltani DNS kópiaszám-arányokról tömeghányadokra. Megjegyzendő, hogy az EU-RL GMFF megalapozott átváltási tényezőket ad meg erre a célra.

PÉLDA A TISZTA GM-CRM-EK HASZNÁLATÁRA ÉS A BIZONYTALANSÁGUKRA

Az alábbi információk megtalálhatók az ERM-BF412ak és az ERM-BF412bk elemzésének tanúsítványán (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

| | Bt11 kukorica tömeghányad ¹⁾ | |
|-------------|---|-------------------------------------|
| | Hitelesített érték [g/kg] | Bizonytalanság [g/kg] ⁴⁾ |
| ERM-BF412ak | < 0,12 ²⁾ | – |
| ERM-BF412bk | > 970 ³⁾ | – |

1) SYN-BTØ11-1 egyedi azonosítóval jelzett, genetikailag módosított kukorica.

2) A hitelesített referenciaanyagot hagyományos, nem módosított kukoricamagból készítették. Ebben az anyagban nem mutattak ki szennyeződést a Bt11 kukoricát célzó, eseményre specifikus kvantitatív polimeráz láncreakció assay használatakor. A detektálási határérték (LOD) 0,12 g/kg volt. A valódi Bt11 kukorica tömeghányada az anyagban 95%-os megbízhatósággal 0,12 g/kg alatt van. A hitelesített érték visszavezethető a nemzetközi mértékegységrendszerre (SI).

3) Ezt a hitelesített referenciaanyagot genetikailag módosított Bt11 kukoricamagból készítették. A hitelesített érték a kukoricaörlemény genetikai tisztaságán alapul, a Bt11 kukoricára vonatkozóan. Összesen 209 darab magot teszteltek egyesével a Bt11 kukorica jelenléte szempontjából, amelyből 207 mag tesztje lett pozitív. A valódi Bt11 kukorica tömegszázaléka az anyagban 95%-os megbízhatósággal 970 g/kg felett van. A hitelesített érték visszavezethető a nemzetközi mértékegységrendszerre (SI).

4) A bizonytalanság a kiterjesztett bizonytalanság a $k = 2$ kiterjesztési tényezővel, amely megfelel körülbelül 95%-os megbízhatósági szintnek, az ISO/IEC útmutató 98-3 (Mérési bizonytalanság megadására vonatkozó útmutató [GUM:1995], ISO, 2008) szerint becsülve.

A fenti információk alapján az az eredmény született, hogy a CRM ERM-BF412ak hitelesítés szerint < 0,12 g Bt11/kg tartalommal bír, és az örleményanyagban nem mutattak ki szennyeződést. A valódi Bt11 kukorica tömegszázaléka az anyagban 95%-os megbízhatósággal 0,12 g/kg alatt van. Ennek következtében a további számításokhoz – beleértve a kalibrációs görbék megadását is – a 0 g/kg értéket kell használni.

Az ERM-BF412bk jelű CRM hitelesített tartalma > 970 g/kg. A 209 darab tesztelt magból 207-et találtak pozitívnak a Bt11 kukorica jelenléte szempontjából. A valódi Bt11 kukorica tömegszázaléka az anyagban 95%-os megbízhatósággal 970 g/kg felett van. A további számításokhoz, amikor ezen GM esetben kalibrációs görbét állítanak fel, a 990 g/kg becsült genetikai tisztaságot kell használni. Megjegyzendő, hogy tiszta GM örlemény CRM-je esetében, amelyben nem találtak szennyeződést, 1000 g/kg használandó.

Minden esetben úgy kell kiszámítani a használandó bizonytalanságot, hogy a számérték és a megadott határérték közötti különbséget el kell osztani $\sqrt{3}$ -mal. Példa:

ERM-BF412ak: A felhasznált érték 0,0 g/kg; a bizonytalanság 0,12 g/kg – 0 g/kg) / $\sqrt{3} = 0,07$ g/kg.

ERM-BF412bk: A felhasznált érték a genetikai tisztaság alapján $207 / 209 * 1000 = 990$ g/kg. A „negatív bizonytalanság” $(990 - 970) / \sqrt{3} = 11,5$ g/kg. A „pozitív bizonytalanság” 10 g/kg, mivel a pozitív GM tartalom nem haladhatja meg az 1000 g/kg-ot.