



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE



Badanie próbek żywności na obecność Genetycznie Zmodyfikowanych Organizmów

Rozdział 10

Wykrywanie GMO metodą ilościowego PCR

F. Weighardt

WORLD HEALTH ORGANIZATION
REGIONAL OFFICE FOR EUROPE

WELTGESUNDHEITSORGANISATION
REGIONALBÜRO FÜR EUROPA



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
BUREAU REGIONAL DE L'EUROPE

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ЕВРОПЕЙСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ БЮРО

Spis treści

Rozdział 10

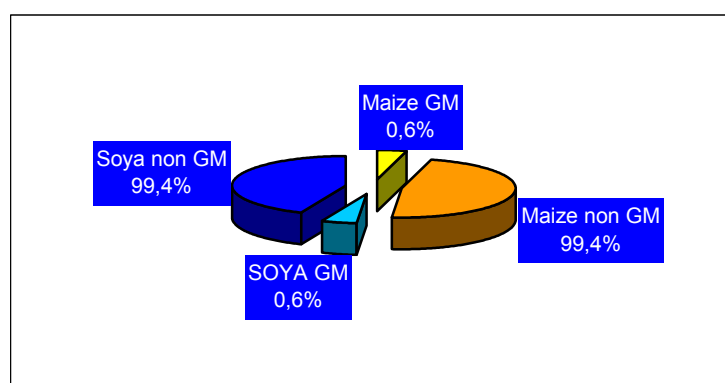
Wykrywanie GMO metodą ilościowego PCR

<i>Wstęp</i>	3
Metody PCR służące do ilościowej oceny GMO	4
Historia technik Pcr w czasie rzeczywistym (real-time pcr)	6
Zasady działania pcr w czasie rzeczywistym (real-time pcr)	6
zasady ilościowego oznaczania metodą pcr w czasie rzeczywistym (real-time pcr)	13
<i>Literatura</i>	19

Wstęp

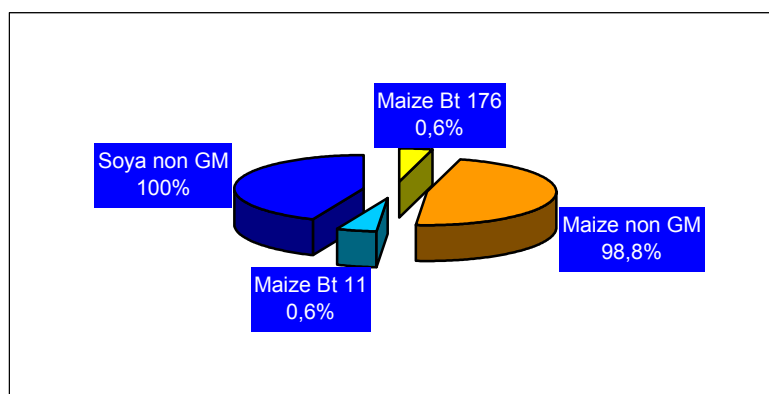
W przypadku, gdy analiza jakościowa produktu żywnościowego dała pozytywny wynik na obecność jednej lub kilku genetycznych modyfikacji (soja Roundup Ready®, kukurydza Bt-176, Bt-11, MON810 i T25), to następny etap analityczny polega na oszacowaniu, czy ich zawartość jest zgodna z prawem (Regulacja (EC) 1829/2003, Regulacja (EC) 1830/2003). W związku z tym konieczna jest analiza ilościowa każdej modyfikacji obecnej w indywidualnym składniku (Rysunek1).

Wyżej wspomniane Regulacje zakładają, że wszystkie produkty składające się lub zawierające GMO albo produkowane z GMO muszą być znakowane w sposób następujący: znakowanie nie jest wymagane dla produktów, w których rozważane składniki zawierają poniżej 1% (obecnie 0.9%) GMO, ponieważ taka ilość GMO może być przypadkowa lub technicznie nieunikniona. Wszystkie składniki (mąka, grysik, olej, itd.) pochodzące z jednego gatunku (np. z kukurydzy, soi, rzepaku itd.) są brane pod uwagę łącznie jako jeden indywidualny składnik (np. kukurydza).



Rysunek 1. Znakowanie nie jest wymagane. Ilość zarówno soi GM jak i kukurydzy GM jest poniżej legalnego progu.

Jeśli, na przykład, składnik pochodzący wyłącznie z kukurydzy zawiera mniej niż 1% (obecnie 0.9%) kukurydzy GM, nie jest konieczne znakowanie produktu żywnościowego pochodzącego z niej. Z drugiej strony, jeśli zawiera więcej niż 1% (obecnie 0.9%) kukurydzy GM, produkt z niej pochodzący musi być oznakowany. Dzieje się tak nawet wtedy, jeśli w końcowym produkcie zawierającym sumę wszystkich składników pochodzących z różnych gatunków (np. soja i kukurydza), względna ilość kukurydzy GM kształtuje się poniżej 0.9%. Jeśli są obecne dwie lub więcej odmian kukurydzy GM, to ich zawartość sumuje się i ich sumaryczny udział procentowy decyduje o konieczności znakowania (Rysunek 2). Jeśli suma ta jest poniżej progu 0.9%, znakowanie nie jest wymagane.



Rysunek 2. Znakowanie jest wymagane ze względu na kukurydzę. Suma kukurydzy Bt-11 (0.6%) i Bt-176 (0.6%) przekracza próg 0.9%.

Względna zawartość GMO (procentowa) określana jest jako stosunek ilości specyficznych sekwencji GMO do ilości genu specyficznego dla rośliny (np. lektyny dla soi i inwertazy lub zeiny dla kukurydzy). Wyliczony w ten sposób procent GMO jest wyrażony następująco: $GMO (\%) = \frac{GM-DNA}{referencyjny-DNA} \times 100$.

Metody PCR służące do ilościowej oceny GMO

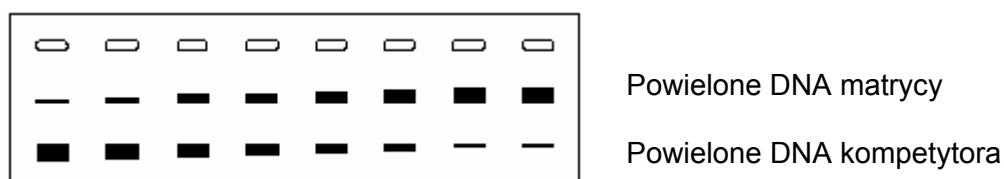
Głównym mankamentem konwencjonalnego PCR jest brak dokładnej informacji ilościowej z powodu wydajności amplifikacji. Jeśli wydajność reakcji dla każdego cyklu powielania jest stała, stężenie DNA po reakcji PCR powinno być wprost proporcjonalne do początkowej ilości matrycowego DNA. Niestety, wydajność powielania zmienia się zarówno pomiędzy reakcjami, jak i w kolejnym cyklu jednej reakcji. Szczególnie w późniejszych cyklach reakcji PCR produkty powielania powstają w sposób nie-ekspotencjalny i wydajności reakcji nie jest znana.

Ilościowe oznaczenie DNA w konwencjonalnym PCR polega na pomiarze w punkcie końcowym reakcji i ma największą czułość, gdy powielanie osiąga maximum wydajności (faza plateau). Na tym etapie reakcja przestaje mieć charakter ekspotencjalny z powodu wyczerpywania się składników i stopniowej termicznej inaktywacji zastosowanej polimerazy. Z tego powodu korelacja między stężeniem końcowego produktu a początkową liczbą cząsteczek matrycowych jest ograniczona. Aby przezwyciężyć te problemy powstały takie techniki jak: ilościowo-kompetytywne PCR (quantitative-competitive QC-PCR) i PCR w czasie rzeczywistym (real-time

PCR), które pozwalają na określenie zależności między stężeniem matrycowego DNA a ilością produktów PCR powstałych podczas powielania.

Ilościowo-kompetytywny PCR

Ilościowo-kompetytywny PCR (Giacca *et al.*, 1994; Studer *et al.*, 1998; Hardegger *et al.*, 1999) jest jedną z najwcześniej rozwiniętych metod ilościowego PCR. Metoda ta opiera się na jednoczesnym powielaniu matrycowego DNA i określonej ilości wewnętrznego standardu DNA (kompetytora) posiadających takie same miejsca wiązania startera. Ponieważ początkowa ilość kompetytora jest znana i zakładając, że wydajność amplifikacji DNA matrycowego i kompetytora jest taka sama, to stosunek ilości produktów PCR oszacowanych np. elektroforetycznie odpowiada stosunkowi matrycowego DNA i kompetytora w próbce przed reakcją.



Rysunek 3. Jednoczesne powielanie określonej ilości matrycowego DNA z różną ilością kompetytora.

Kompetytywny PCR jest z powodzeniem używany do określania ilości zarówno DNA jak i RNA, lecz zakres jego działania jest ograniczony przez stosunek ilości matrycy do kompetytora i mieści się w granicach od 1:10 do 10:1. W rzeczywistości największa dokładność jest osiągnięta w punkcie równowagi, przy którym stosunek matrycy do kompetytora wynosi 1:1 (Rysunek 3). Można go określić poprzez przetestowanie serii rozcieńczeń i znaleźć odpowiedni stosunek matrycy do kompetytora.

Kolejną niedogodnością kompetytywnego PCR jest konieczność scharakteryzowania i skonstruowania różnych kompetytorów dla każdego rodzaju matrycy, jaka ma być oznaczona ilościowo. W rzeczywistości nawet niewielkie różnice w wydajności powielania poważnie wpływają na dokładność oznaczenia przy użyciu tej metody. Co więcej, po zakończeniu reakcji kompetytywny PCR wymaga dokładnego określenia ilości

amplikonów matrycy i kompetytora, co zazwyczaj wymaga kolejnego pracochłonnego etapu po reakcji PCR.

Kompetytywny PCR jest pół-ilościową metodą wymagającą standardu (kompetytora), do którego odnosi się próbki. Wyniki mogą wskazywać tylko wartości poniżej, równe lub powyżej określonego stężenia standardu.

Zaletą systemu kompetytywnego PCR jest jednak to, że nie wymaga specjalistycznego sprzętu, jedynie standardowego aparatu PCR i wyposażenia takiego jak w standardowym laboratorium biologii molekularnej.

PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Dokładniejszą i obecnie szerzej stosowaną metodą do ilościowego oznaczania DNA jest PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). W przeciwieństwie do poprzedniego systemu, gdzie oznaczanie zachodziło w końcowym punkcie reakcji, system ten pozwala na monitorowanie reakcji w czasie, w którym ona rzeczywiście zachodzi. W tego rodzaju systemie reakcja PCR jest związana z emisją sygnału fluorescencyjnego proporcjonalnego do ilości produktu generowanego w każdym cyklu reakcji. Poprzez pomiar fluorescencji w każdym cyklu reakcji, jest możliwe śledzenie reakcji w fazie eksponentyjnej. Pierwszy znaczący wzrost fluorescencji jest skorelowany z początkową ilością matrycy (Ahmed, 2002).

Historia technik PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Pionierami badania kinetyki reakcji PCR poprzez stworzenie systemu zdolnego do detekcji produktów PCR podczas ich akumulacji byli Higuchi i wsp. (1992, 1993). Ten „real time” system zawierał w mieszaninie reakcyjnej interkalującą cząsteczkę bromku etydyny. Termocykler był zaadaptowany do naświetlania próbek promieniowaniem UV i był zdolny do detekcji powstałej fluorescencji przy użyciu kamery CCD (charge coupled device) połączonej z komputerem. Gdy zachodziło powielanie, wzrastała ilość dwuniciowego DNA, z którym interkalował bromek etydyny, co w efekcie prowadziło do wzrostu fluorescencji. Wykreślając zależność pomiędzy fluorescencją a numerem cyklu otrzymuje się wykres dający pełniejszy obraz zachodzących procesów niż analizując akumulację produktów po określonej ilości cykli.

Zasady działania PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Specyficzność metody PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) zależy zarówno od chemicznego sposobu generowania i monitorowania reakcji powielania, jak i od instrumentu stosowanego do śledzenia sygnału. Do metody tej opracowano różne inerkujące barwniki (bromek etydyny, SYBR Green I) i hybrydujące sondy (TaqMan, Fluorescence Resonance Energy Transfer, Molecular Beacons, Scorpions, TaqMan Minor Groove Binder).

PCR w czasie rzeczywistym oparty o barwnik SYBR Green I

Pierwsze zastosowanie metody PCR w czasie rzeczywistym wpływało bezpośrednio z badań Higuchi'ego i wsp. (1992, 1993), ale bromek etydyny zastąpiono mniej toksycznym i bardziej specyficznym oraz bardziej czułym (10-25 razy) fluorescencyjnym barwnikiem SYBR Green I (Haugland. 2002) przyłączającym się do dwuniciowego (ds) DNA.

Barwnik SYBR Green łączy się z mniejszą bruzdą dsDNA, ale nie wiąże się z ssDNA. W konsekwencji tego wiązania wzrasta fluorescencja (wzbudzenie ok. 388nm i 254nm; emisja ok. 560nm). Z chwilą rozpoczęcia reakcji PCR wzrastająca ilość nowo syntetyzowanej nici powoduje wzrost sygnału fluorescencyjnego. Ograniczeniem tego systemu bazującego na SYBR Green I jest to, że rozpoznaje on sekwencje DNA niespecyficzne. W rzeczywistości zliczana jest każda dwuniciowa cząsteczka DNA obecna w mieszaninie reakcyjnej, łącznie z niespecyficznymi produktami reakcji PCR i dimerami utworzonymi przez startery. Aby przezwyciężyć ten problem i odjąć komponenty powstałe z powodu niespecyficznego DNA i dimerów utworzonych przez startery, w niektórych aparatach jest możliwe przeprowadzenie analizy krzywej topnienia. Po ostatnim etapie PCR produkty są powoli podgrzewane aż do dysocjacji i analizowana jest fluorescencja. Ponieważ każdy dsDNA ma specyficzną temperaturę topnienia, jest możliwe ilościowe określenie w jednej mieszaninie reakcyjnej komponentów mających różne temperatury topnienia i w ten sposób wyeliminowanie z ilościowego oznaczenia komponentów niespecyficznych.

Metody real-time PCR oparte o sondy specyficzne względem sekwencji

Problem specyficzności fluorescencyjnej detekcji amplikonu został rozwiązany przez zastosowanie sekwencyjnie specyficznych sond znakowanych fluorescencyjnie umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR. Proces hybrydizacji (i ewentualnie degradacji) zazwyczaj nie interferuje z eksponentyjną akumulacją produktów PCR. Obecnie stosowanych jest kilka różnych podejść do specyficznych reakcji ilościowych bazujących na PCR w czasie rzeczywistym.

Sondy FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

FRET opiera się na transferze energii od fluorofora będącego donorem do fluorofora będącego akceptorem (Rysunek 4) (Haugland, 2002). Główne założenia systemu FRET są następujące:

cząsteczki donora i akceptora muszą być w bliskiej odległości (najczęściej 10-100Å).

spektrum absorpcji akceptora musi się nakładać ze spektrum emisji fluorescencji donora

Orientacje przejściowych dipoli donora i akceptora muszą być równoległe

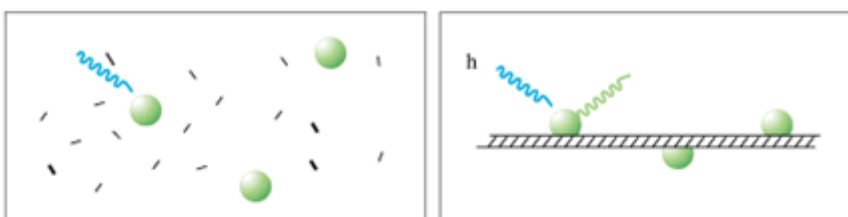
Jeśli donor i akceptor są w bliskiej odległości wzbudzenie donora niebieskim światłem powoduje przeniesienie energii do akceptora, który następnie emituje światło o większej długości fali. Tworzenie produktu PCR może być monitorowane przez dodanie do starterów PCR dwu sekwencyjnie specyficznych sond znakowanych fluorescencyjnie zwanych sondami hybrydizacyjnymi. Sondy hybrydizacyjne stanowią parę, przy czym jedna sonda jest znakowana za pomocą barwnika będącego donorem (3'- Fluorescyna), a druga przy użyciu barwnika pełniącego funkcję akceptora (5'- Red 640 lub 5'-Red 705). Ponieważ FRET maleje wraz z odległością, sondy hybrydizacyjne muszą być tak zaprojektowane, aby hybrydizowały w sąsiadujących obszarach matrycy DNA (zazwyczaj są rozdzielone 1-5 nukleotydową przerwą). Jeśli obie sondy hybrydyzują, to oba barwniki są blisko siebie i przeniesienie energii od donora do akceptora powoduje powstawanie sygnału mierzalnego za pomocą fluorymetru.

Degradujące sondy (zasady działania systemu TaqMan)

System TaqMan wykorzystuje 5'-3' egzonukleolityczną aktywność *Taq* DNA polimerazy, dzięki której może podczas reakcji PCR degradować sondę (Lie and Petropoulos, 1998). Sonda TaqMan jest zazwyczaj oligonukleotydem o długości 20-30 zasad (zazwyczaj ma T_m o 10°C wyższą niż T_m starterów) i zawiera na końcu 5' fluorescencyjny barwnik reporterowy a na końcu 3' – wygaszacz (Rysunek 4). Ponieważ koniec 3' jest zablokowany, sonda nie może być wydłużana tak jak starter. Podczas reakcji PCR, sonda

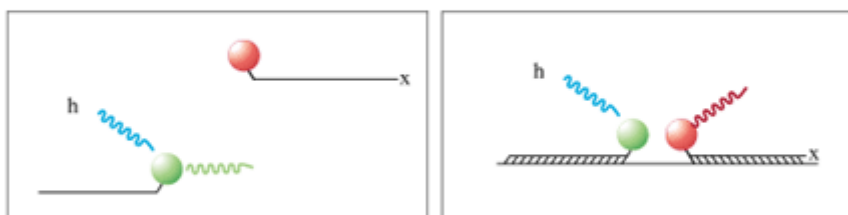
wiąże się specyficznie z matrycą pomiędzy miejscami wiązania starterów. Kiedy sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika i wygaszacza powoduje supresję fluorescencji (Forster, 1948; Lakowicz, 1983). Jeśli sonda zhybryzowała z matrycą, to podczas reakcji PCR, 5'-3' egzonukleolityczną aktywność *Taq* DNA polimerazy degraduje sondę w miejscu między reporterem a wygaszaczem. Powoduje to wzrost fluorescencji, co jest następstwem powielania. Akumulacja produktów PCR jest wykrywana poprzez monitorowanie wzrostu fluorescencji barwnika reporterowego. Proces ten zachodzi w każdym cyklu i nie interferuje z eksponentywną akumulacją produktu. W odróżnieniu od sondy FRET, degradująca sonda uwalnia fluorochrom w każdym cyklu dodając nowy barwnik do uwolnionego poprzednio. W konsekwencji sygnał fluorescencyjny jest mocno wzmacniany w każdym cyklu. TagMan system używa uniwersalnych parametrów termicznych i warunków reakcji PCR. Jedynym specyficznym wymaganiem dla fluorogenicznych sond jest to, aby nie było na końcu 5' zasady G, ponieważ jej obecność blisko barwnika reporterowego wygasza jego fluorescencję nawet po rozszczepieniu.

I. SYBR Green



Rysunek 4. Różne zasady działania PCR w czasie rzeczywistym:

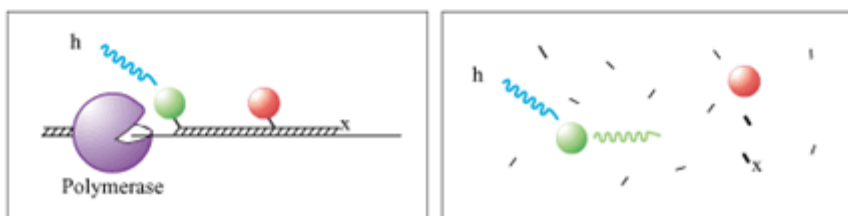
II. Hybridization Probes



I. SYBR green I.

II. sondy FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

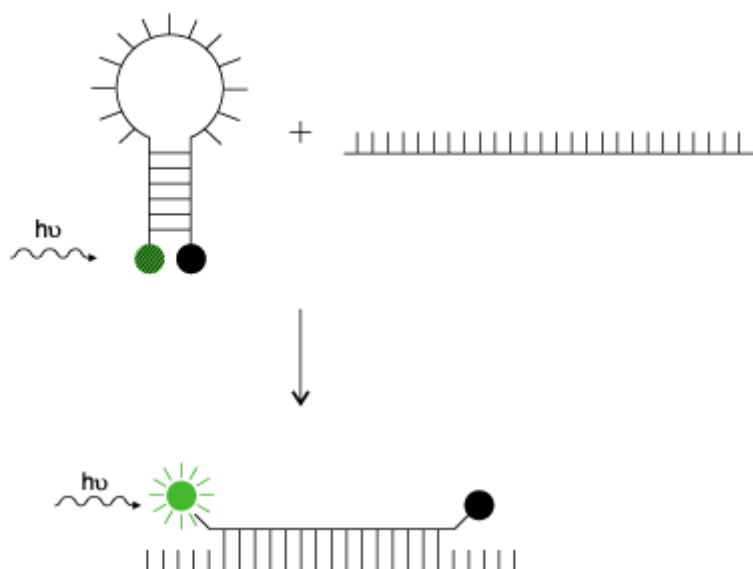
III. TaqMan Probes



III. 5'-3' degradujące sondy TaqMan probes.

Molecular Beacons

Molecular Beacons są to sondy DNA mające strukturę typu szpilki do włosów. Sekwencja pętli jest komplementarna do specyficznej matrycy, a sekwencje pnia są komplementarne jedna do drugiej (Rysunek 5) (Tyagi i Kramer, 1996). Końce 5' i 3' sondy są kowalencyjnie związane z fluoroforem i wygaszaczem. Kiedy struktura szpilki jest zamknięta, wówczas fluorofor i wygaszacz są blisko siebie. W tym przypadku wszystkie fotony emitowane przez fluorofor są absorbowane przez wygaszacz. W obecności sekwencji komplementarnej, sonda rozwija się i hybrydyzuje do matrycy. Fluorofor zostaje rozdzielony z wygaszaczem i sonda zaczyna fluoryzować.

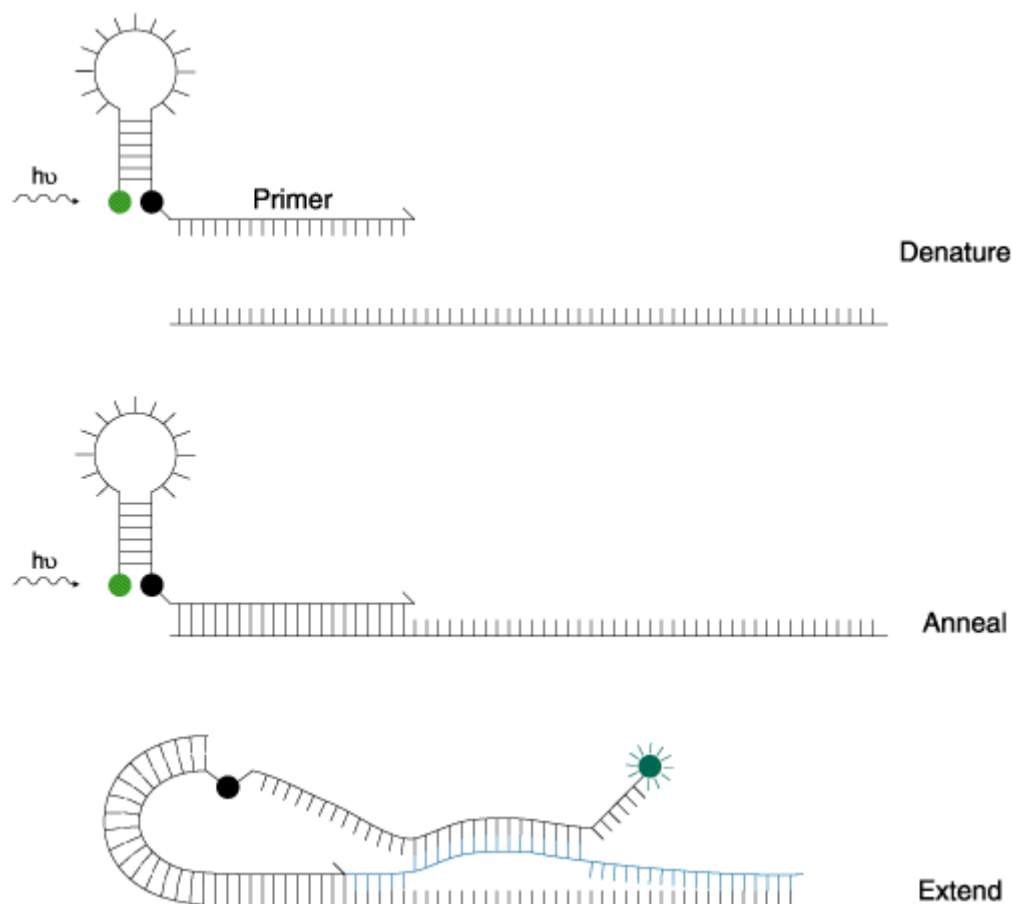


Rysunek 5. Zasada działania sondy typu Molecular Beacons.

Sondy typu Skorpion

Kolejne sondy są reprezentowane przez rodzinę sond zwanych „Skorpiony”. Składają się one ze specyficznej sekwencji sondy oraz struktury szpilki (Rysunek 6) (Thelwell i in., 2000).

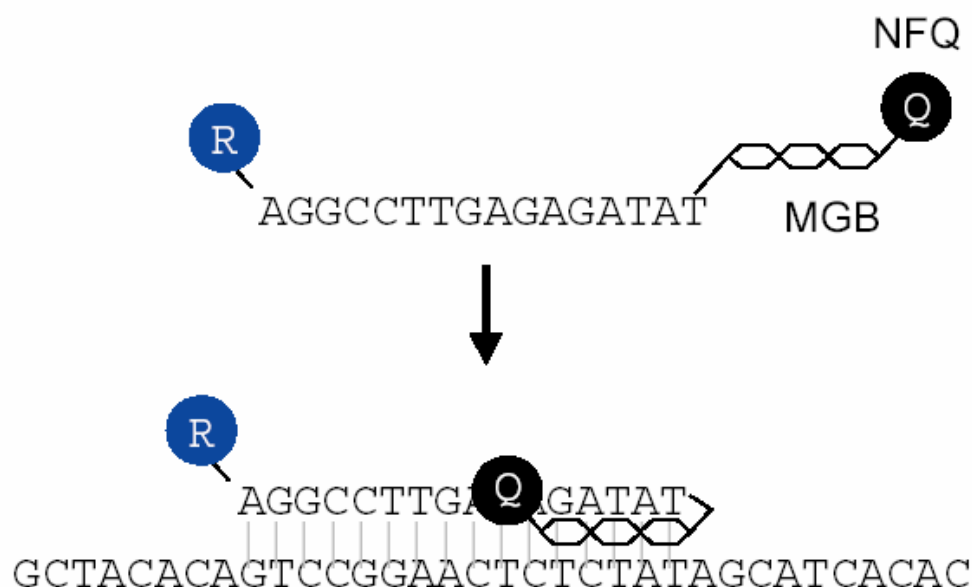
Fluorofor jest przyłączony do końca 5' i daje sygnał fluorescencyjny, który jest wygaszany w obrębie konfiguracji szpilki przez fragment przyłączony do końca 3'. Po wydłużeniu startera sondy Skorpiona, podczas powielania, specyficzna sekwencja sondy jest zdolna do związania się z sekwencjami komplementarnymi w obrębie tej samej nici DNA. Hybrydyzacja otwiera pętle w kształcie szpilki do włosów, co powoduje że fluorescencja nie jest dłużej wygaszana i obserwuje się wzrost sygnału. Zablokowanie reakcji PCR między starterem a sekwencją pnia zapobiega przypadkowemu odczytaniu sekwencji pętli, co mogłoby prowadzić do otwarcia struktury szpilki do włosów pod nieobecność specyficznej sekwencji matrycy. Umieszczenie sondy i startera w jednej cząsteczce daje pewną przewagę nad systemami z sondą homogeną. W przeciwieństwie do systemów Molecular Beacons, TaqMan czy FRET, metoda Skorpion oprócz starterów nie wymaga osobnej sondy.



Rysunek 6. Zasada działania sond typu Skorpion.

Sondy TaqMan MGB

Sonda MGB (Minor Groove Binder – przyłączająca się do mniejszej bruzdy DNA) jest małą cząsteczką w kształcie półksiężyca, która pasuje dokładnie do mniejszej bruzdy duplexu DNA (Kutyavin i in., 2000). W sondach TaqMan grupa MGB jest przyłączona do końca 3' razem z barwnikiem wygaszającym (Rysunek 7). Kiedy sonda TaqMan hybrydyzuje, grupa MGB stabilizuje przyłączenie poprzez zagięcie do mniejszej bruzdy duplexu DNA utworzonego pomiędzy sondą a sekwencją matrycy. Stabilizacja jest daleko bardziej efektywna, gdy duplexy pasują dokładnie (tzn. gdy nie ma żadnych błędnych parowań). Oprócz wzmożonej siły dyskryminacyjnej, wzrost stabilności związany jest z tym, że sondy TaqMan MGB są bardzo krótkie (zazwyczaj 13-20mery) w porównaniu do standardowych sond TaqMan (zazwyczaj 18-40mery). Sondy TaqMan MGB mają kilka przewag w ilościowym PCR, szczególnie w analizie multipleksowej. Poprawiona wydajność spektralna pozwala na większą precyzję i zgodność między indywidualnymi analizami, a większa specyficzność hybrydyzacji umożliwia większą dyskryminację matrycy. Co więcej, krótsza sonda ułatwia przeprowadzenie analizy, gdyż pasuje ona do większej ilości miejsc w obrębie krótszego regionu matrycy. Rozmiar amplikonu może być zredukowany do minimum poprzez użycie krótszych sond MGB, co w konsekwencji może poprawić zgodność między analizami.



Rysunek 7. Zasada działania sond MGB.

Zasady ilościowego oznaczania metodą PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Ilościowe oznaczanie względne

Zawartość GMO w próbce może być wyrażona jako ilość materiału genetycznie zmodyfikowanego w stosunku do całkowitej ilości materiału. Aby określić tę wartość przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym, konieczne jest określenie ilości sekwencji endogenego genu referencyjnego (używanego jako normalizator) oraz ilości specyficznych sekwencji GMO. Jako geny referencyjne powinny być wybrane geny gatunkowo specyficzne, obecne jako pojedyncze kopie w genomie haploidalnym, reprezentatywne dla różnych linii tego samego gatunku i będące powielane podczas analizy tak jak GMO (choć to głównie zależy od dobrego zaprojektowania starterów i sondy). We względnym oznaczaniu ilości GMO powstaje problem wynikający z interpretacji procentowej zawartości GMO, dlatego procentowa zawartość GM może być określana jako waga czystego modyfikowanego składnika do całkowitej wagi samego składnika (tj. waga kukurydzy GM do całkowitej wagi wszystkiej kukurydzy zawartej w próbce). Z analitycznego punktu widzenia odpowiednim sposobem kalkulowania zawartości procentowej GMO jest podawanie ilości sekwencji GMO w stosunku do ilości sekwencji specyficznych gatunkowo. Ta definicja jednak w niewystarczający sposób charakteryzuje linie GMO; dlatego w interpretacji wyników trzeba wziąć pod uwagę dodatkowo następujące parametry:

- a) ploidalność danego zdarzenia transformacyjnego. Jest możliwe, że roślina otrzymana w wyniku danego zdarzenia transformacyjnego ma inną ploidalność od wyjściowej rośliny dzikiej wt (np. tertaploid zamiast diploidu)
- b) zygotyczność rośliny otrzymanej w wyniku zdarzenia transformacyjnego. Cecha GM może być homozygotyczna lub heterozygotyczna.
- c) Liczbę insercji pojedynczego sztucznego konstruktów na genom haploidalny. Jeden konstrukt może być wstawiony jako pojedyncza kopia w genomie haploidalnym bądź w wielu kopiach.

Punkt c. może być ominięty przez zaprojektowanie systemu starter-sonda obejmującego rejon graniczny wstawienia konstruktów do genomu. Ponieważ sekwencje graniczne są unikalne daje to podwójną korzyść, gdyż taki system jest specyficzny dla zdarzenia transformacyjnego i wyklucza z kalkulacji wielokrotne insercje tego samego konstruktów. Punkty a. i b. są omijane empirycznie przez użycie materiałów referencyjnych homogennych z próbką (np. materiał referencyjny w postaci mączki kukurydzy do

ilościowego oznaczania mączki kukurydzy). Alternatywnie, standardy ilościowe inne niż certyfikowane materiały referencyjne (np. sekwencje klonowanego DNA lub mieszanina genomowego DNA) powinny być kalibrowane wobec materiałów referencyjnych, aby skorygować rozbieżności w ilościowym oznaczeniu. Ogólnie akceptowanym sposobem rozwiązania tego problemu w odniesieniu do punktów a) i b) jest wyrażenie procentu GMO w odniesieniu do genomów haploidalnych. Podczas opracowywania metod ten aspekt ilościowego oznaczenia powinien być wzięty pod uwagę w każdym przypadku, ponieważ na limit detekcji (LOD) i limit oznaczenia ilościowego (LOQ) wpływa realna liczba kopii, która jest oznaczana.

Projektowanie eksperymentu ilościowego oznaczania GMO.

Projektowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym musi obejmować następujące komponenty:

- jeden system PCR zaprojektowany do detekcji sekwencji DNA GMO specyficznych
- drugi system PCR zaprojektowany do detekcji referencyjnych sekwencji endogennych, będących gatunkowo specyficznymi i odpowiednimi do zastosowania jako normalizator w obliczaniu względnej zawartości GM.
- krzywą standardową zarówno dla specyficznych sekwencji GMO jak i dla referencyjnych sekwencji endogennych. Dla każdej eksperymentalnej próbki ilość specyficznych sekwencji GMO jak i referencyjnych sekwencji endogennych jest wyliczana z odpowiedniej krzywej standardowej. Aby uzyskać względną zawartość specyficznych sekwencji GMO, ich ilość jest normalizowana poprzez ilość referencyjnych sekwencji endogennych. Zgodnie z wymogami statystycznymi krzywa standardowa powinna zawierać przynajmniej cztery punkty o różnym stężeniu. Każdy punkt krzywej standardowej i każda próbka powinna być nakładana przynajmniej w trzech powtórzeniach.

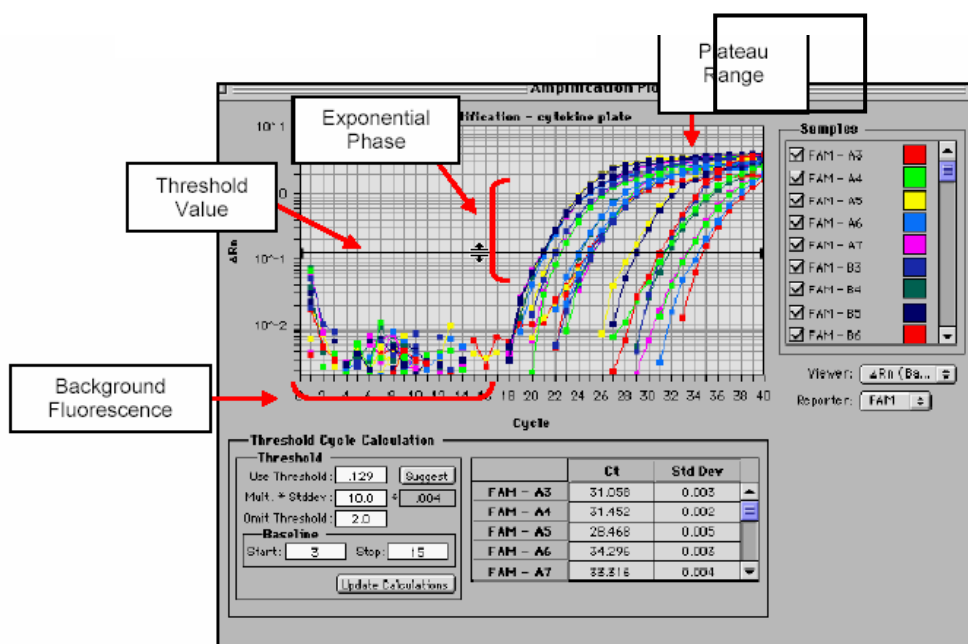
Oprócz tego, zarówno podczas ilościowego oznaczania genu referencyjnego jak i GMO musi być dodawana kontrola negatywna reakcji (NTC – no template control). Można zastosować też inne kontrole (np. negatywna kontrola DNA, pozytywna kontrola DNA). Wreszcie, ilościowe oznaczenie genu referencyjnego i specyficznych sekwencji GMO powinny zachodzić podczas jednego przebiegu reakcji PCR (współpowielanie), a nie w osobnych przebiegach, co pozwala uniknąć możliwych błędów statystycznych pomiędzy różnymi eksperymentami.

Multipleksowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym

W zależności od odczynników i aparatury zastosowanej do oznaczania ilościowego, możliwe jest takie zaprojektowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym, aby przeprowadzić ilościowe oznaczenie sekwencji referencyjnych i GMO oddzielnie w odrębnych próbkach lub w tych samych próbkach jako reakcję multipleksową. Oba układy mają wady i zalety: reakcja multipleksowa oszczędza czas i odczynniki (w jednym eksperymencie możliwe jest analizowanie podwójnej liczby próbek), unikając w ten sposób błędów pomiędzy pomiarem genów referencyjnych i GMO, ponieważ reakcja zachodzi w tej samej próbce, ale jest ona mniej czuła (w odniesieniu do LOQ) z powodu interferencji między obiema reakcjami i różnym zużyciem reagentów w obu reakcjach. Z drugiej strony, rozdzielone reakcje PCR, w których mierzy się ilość genu referencyjnego i GMO są bardziej czułe w odniesieniu do LOQ, lecz wymagają podwójnej ilości reagentów i studzienek na płytce do PCR i są bardziej narażone na ryzyko np. błędu pipetowania niż gdy mierzona jest jedna próbka. Zastosowanie różnych barwników reporterowych dla sond TaqMan stwarza możliwość detekcji powielania więcej niż jednej matrycy w tej samej próbce. Barwniki reporterowe FAM i VIC są rozróżnialne, ponieważ charakteryzują się maximum emisji przy różnych długościach fal. Do przeprowadzenia multipleksowej reakcji TaqMan można zastosować różne barwniki emitujące różne długości fal (FAM, TET, VIC i JOE). Barwnik TAMRA jest stosowany w sondzie jako wygaszacz, natomiast ROX jest w mieszaninie reakcyjnej barwnikiem pasywnym. W celu uzyskania lepszych wyników rekomendowana jest kombinacja barwników FAM (DNA docelowy) i VIC (kontrola endogenna), ponieważ wykazują największe różnice w maximum emisji. Z drugiej strony JOE i VIC nie powinny być stosowane razem. Multipleksowa reakcja TaqMan może być przeprowadzona na aparatach ABI PRISM 7700, 7900, 7500, 7300 i 7000, ponieważ te aparaty są zdolne do detekcji kilku barwników wykazujących emisję przy różnych długościach fal.

Graficzna analiza danych otrzymanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym

W czasie reakcji PCR zbierane są dane fluorescencyjne i konstruowany jest wykres zależności wielkości sygnału od liczby cykli (lub czasu). Zazwyczaj wykres jest przedstawiany w skali półlogarytmicznej. W reakcji PCR w czasie rzeczywistym wyróżnia się trzy różne fazy: pierwsza obejmująca na wykresie słabe fluktuacje odpowiadające sygnałowi tła, druga eksponentialna faza z wykresami wzrastającymi równolegle i trzecia faza, gdzie wykresy osiągają „plateau” (Rysunek 8).



Rysunek 8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym. Zaznaczono typowe fazy reakcji.

Istotą reakcji PCR w czasie rzeczywistym jest to, że oznaczenie ilościowe zachodzi nie w punkcie końcowym reakcji PCR (plateau), ale na etapie, gdy ekspotencjalny wzrost ilości powielanego DNA (wartość R_n) osiąga poziom znacznie wyższy od sygnału tła. Taki sposób pomiaru znacznie poprawia dokładność oznaczenia ilościowego, ponieważ wówczas istnieje bezpośrednia korelacja między ilością początkową matrycy a cyklem, przy którym powielanie zaczyna mieć charakter ekspotencjalny. W reakcji PCR w czasie rzeczywistym cykl progowy (C_T) jest zdefiniowany eksperymentalnie jako cykl, przy którym sygnał fluorescencyjny osiąga średnią sygnałów fluorescencyjnych mierzonych pomiędzy trzecim a piętnastym cyklem plus odchylenie standardowe. Im większa jest początkowa ilość genomowego DNA, tym wcześniej jest wykrywany produkt powstający w reakcji PCR i tym niższa jest wartość C_T . W praktyce, wybór linii progowej determinującej wartość C_T należy często do operatora i jest jednym z subiektywnych elementów PCR w czasie rzeczywistym. Linia progowa powinna być umieszczona powyżej jakichkolwiek fluktuacji linii bazowej i w obrębie fazy ekspotencjalnego wzrostu, który po przetransformowaniu do skali logarytmicznej wygląda liniowo (wszystkie wykresy są równoległe). W niektórych przypadkach linia progowa powinna być umieszczona na takim poziomie, gdzie wykresy, dla kolejnych powtórzeń, zaczynają być najbardziej zgodne. W rzeczywistości, czasami zdarza się, że wykresy dla powtórzeń w bardzo wczesnym etapie fazy ekspotencjalnej, wykazują rozbieżność, która maleje lub całkowicie zanika podczas przebiegu reakcji.

Nachylenie krzywej odzwierciedla wydajność reakcji. Aby to nachylenie było wskaźnikiem rzeczywistej wydajności (a nie sygnał fluorescencyjny) należy obserwować punkt przegięcia krzywej. Jest to punkt początkowy fazy linearnej i reprezentuje największe tempo zmian wzdłuż całej krzywej.

Kalkulacja zawartości GMO

Wyjściowymi danymi reakcji PCR w czasie rzeczywistym jest ΔR_n będąca różnicą pomiędzy R_n+ (sygnał fluorescencyjny obejmujący wszystkie komponenty) i R_n- (sygnał tła reakcji – linia bazowa lub odczyt dla próbki NTC).

Zawartość GMO w próbce może być określona dwoma sposobami:

1. Wykreślanie dwu krzywych standardowych opartych o różne ilości DNA
 - pierwsza krzywa z systemem ilościowym specyficznym dla genu referencyjnego
 - druga krzywa z systemem ilościowym specyficznym dla matrycy GM

Dla każdej próbki ilość genu specyficznego i genu referencyjnego są określane przez interpolację krzywej standardowej. Zawartość procentowa GMO DNA jest obliczana jako stosunek ilości sekwencji GM do ilości sekwencji genu referencyjnego: $(GM/gen\ referencyjny \times 100)$.

Należy wziąć również pod uwagę to, że analizowane próbki muszą mieścić się w granicach obu krzywych standardowych. Próbki wychodzące poza krzywe muszą być odrzucane, ponieważ mogą powodować błędy w ilościowym oznaczeniu.

2. Porównawcza metoda C_T ($\Delta\Delta C_T$): W metodzie tej porównuje się względne ilości sekwencji GMO w odniesieniu do sekwencji genu referencyjnego. Krzywą standardową uzyskuje się przez zastosowanie serii próbek o różnych znanych zawartościach GMO (np. certyfikowane materiały referencyjne z IRMM). W rezultacie otrzymuje się jedną krzywą standardową wartości ($\Delta\Delta C_T$) ($\Delta C_T = C_{T\ referencyjnego} - C_{T\ GMO}$). Zawartość GMO otrzymuje się przez obliczenie wartości ΔC_T próbki i porównanie jej z wartościami otrzymanymi dla standardów. Aby ta metoda była zadawalająca, wydajności reakcji powielania dla obu systemów PCR (dla GMO i genu referencyjnego) powinny być podobne. Metodą kontrolującą wydajności reakcji jest obserwacja jak zmienia się ΔC_T (różnica pomiędzy dwoma wartościami obu reakcji PCR dla tej samej początkowej ilości matrycy) w zależności od rozcieńczenia matrycy. Jeśli wydajności dla dwu amplikonów są prawie równe, wykres logarytmu wyjściowej ilości od ΔC_T powinien być linią prawie horyzontalną (nachylenie <0.10). Oznacza to, że oba systemy PCR pracują z podobną wydajnością w zakresie początkowej ilości matrycy. Jeśli wykres wykazuje niejednakową wydajność, do ilościowego oznaczania

GMO powinna być użyta metoda krzywej standardowej. Zakres dynamiczny powinien być określony zarówno dla (1) minimalnego i maksymalnego stężenia matrycy, w zakresie w jakim otrzymamy precyzyjne wyniki i (2) minimalnego i maksymalnego stosunku ilości obu oznaczanych genów, dla których wyniki są precyzyjne. W konwencjonalnym kompetywnym RT-PCR, zakres dynamiczny jest ograniczony do stosunku GMO/kompetytor od około 10:1 do 1:10 (największa dokładność jest uzyskiwana dla stosunku 1:1). W PCR w czasie rzeczywistym jest możliwe uzyskanie dużo szerszego zakresu dynamicznego.

Literatura

Regulation (EC) 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. OJ L 268, 18.10.2003, pp. 1-23.

Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. OJ L 268, 18.10.2003, pp 24-28.

Ahmed, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 5, 215-23.

Forster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys (Leipzig)* 2, 55-75.

Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S. and Falaschi, A. (1994). Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91, 7119-23.

Hardegger, M., Brodmann, P. and Hermann, A. (1999). Quantitative detection of the 35S promoter and the *nos* terminator using quantitative competitive PCR. *European Food Research Technology* 209, 83–87.

Haugland, R.P. (2002). The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, *Ninth Edition*. Molecular Probes, Inc. <http://www.probes.com>

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413–417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030.

Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B.

and Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28, 655-61.

Lakowicz, J.R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, chapter 2.

Lie, Y. S. and Petropoulos, C. J. (1998). Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinion Biotechnol* 9, 43-48.

Studer, E., Rhyner, C., Lüthy, J. and Hübner, P. (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 207, 207–213.

Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* and Brown, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research* 28, 3752-3761.

Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1996). Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridisation. *Nature Biotechnology* 14, 303-308.

Vařtilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. and Brignon, P. (1999). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47, 5261–5266.