

Optymalizacja multipleksowych metod skryningowych PCR w celu wykrywania GMO w materiale siewnym



Magdalena Żurawska-Zajfert

Laboratorium Kontroli GMO

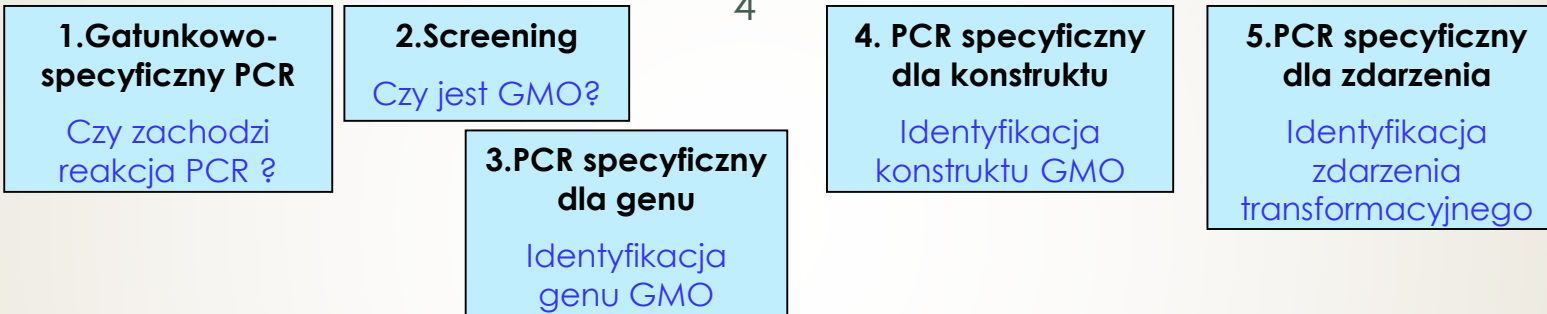
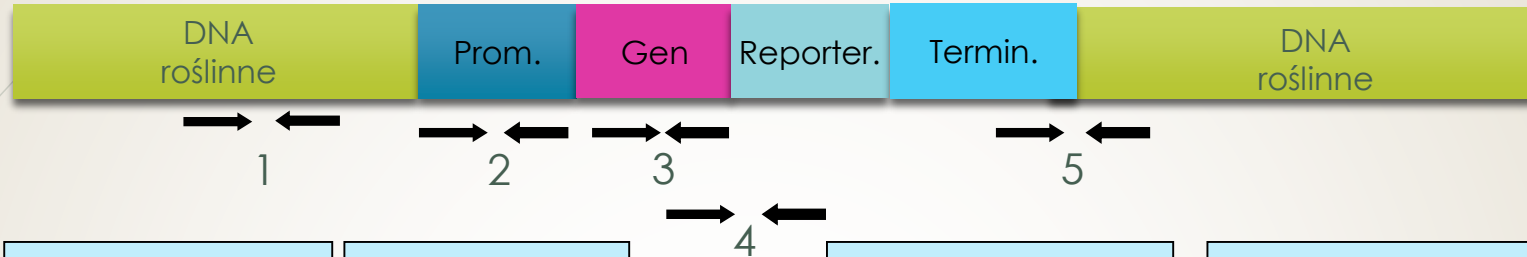
IHAR-PIB Radzików

Konferencja 24 - 25 stycznia 2022 r. Pułtusk, Projekt FITOEXPORT

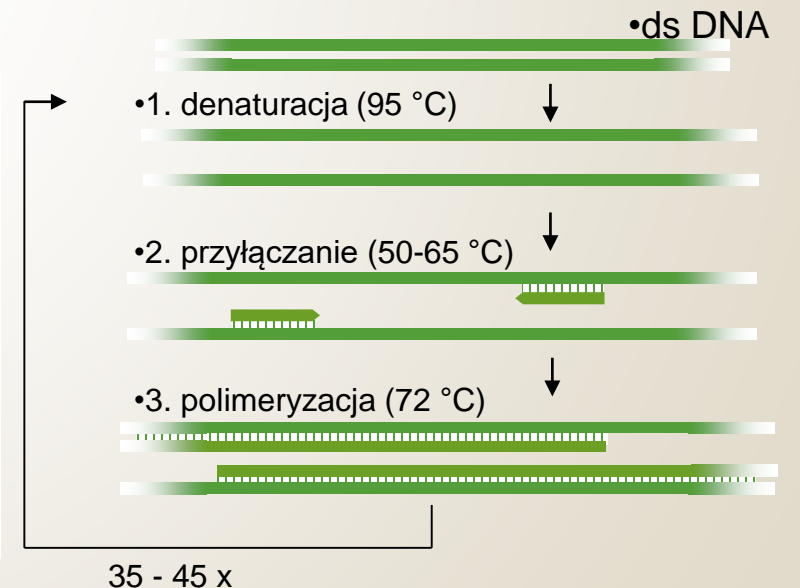
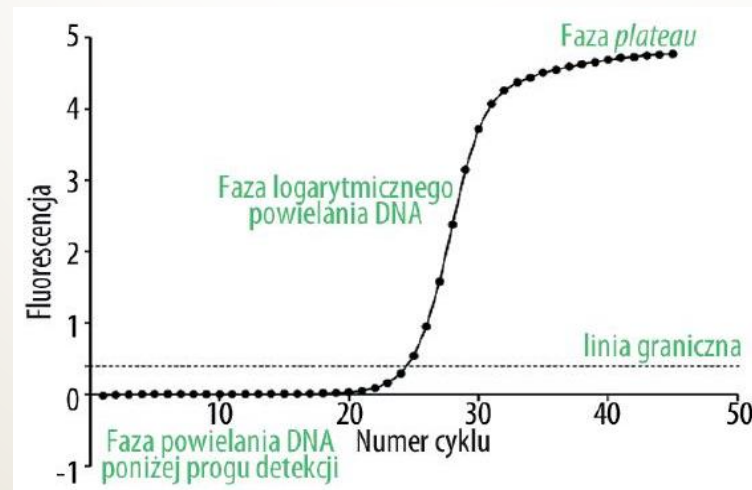
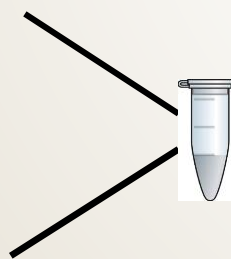
Zadanie: Efektywne wykrywanie organizmów zmodyfikowanych genetycznie w materiale siewnym przy użyciu multipleksowego qPCR

- Analiza sekwencji charakterystycznych dla modyfikacji genetycznych rzepaku i kukurydzy
- Projektowanie multipleksowych układów skrinigowych
- Projektowanie starterów
- Optymalizacja starterów i wybór najefektywniejszych par
- Projektowanie sond
- Wybór optymalnych układów skrinigowych dla kukurydzy i rzepaku pokrywających maksymalną liczbę modyfikacji
- **Optymalizacja i walidacja wewnątrzlaboratoryjna multipleksowych metod skrinigowych qPCR**
- Walidacja międzylaboratoryjna multipleksowych metod skrinigowych qPCR

Metody skringowe PCR w analizach GMO

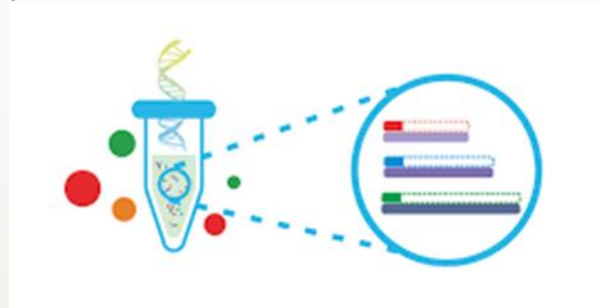


matrycowy DNA
 bufor
 woda
 startery
 deoksynukleotydy
 polimeraza DNA
 Mg^{2+}
 sonda



Multipleks PCR

- Multipleks PCR – technika amplifikacji wielu sekwencji w ramach jednej reakcji PCR.
- Sekwencje docelowe są powielane przy wykorzystaniu kilku par starterów w jednej mieszance reakcyjnej.
- Dupleks, tripleks...
- W porównaniu do klasycznego PCR metoda umożliwia oszczędność czasu i środków, bez istotnego obniżenia jakości detekcji PCR



Multipleks qPCR

- Reakcja multipleks PCR łatwiejsza dzięki użyciu sond znakowanych fluorescencyjnie np. sond TaqMan®, gdzie każda z sond znakowana jest innym barwnikiem fluorescencyjnym,
- Aparat do Real-time PCR rozróżnia fluorescencję kilku fluoroforów,
- Sygnał z każdego barwnika jest osobno liczony w celu ilościowego określenia danego produktu w reakcji.

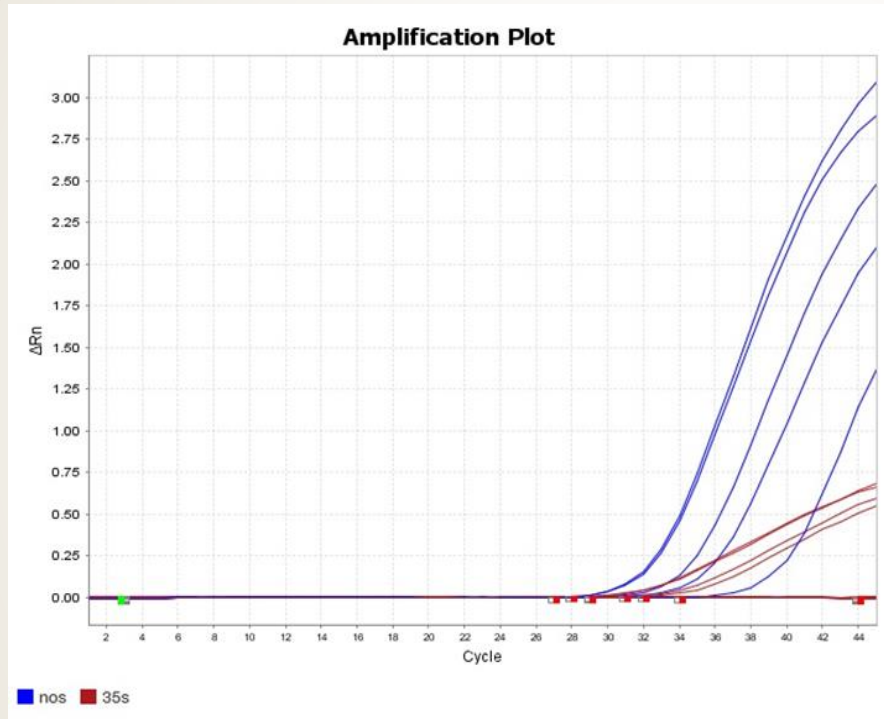


Optymalizacja multipleksowych metod skringowych qPCR

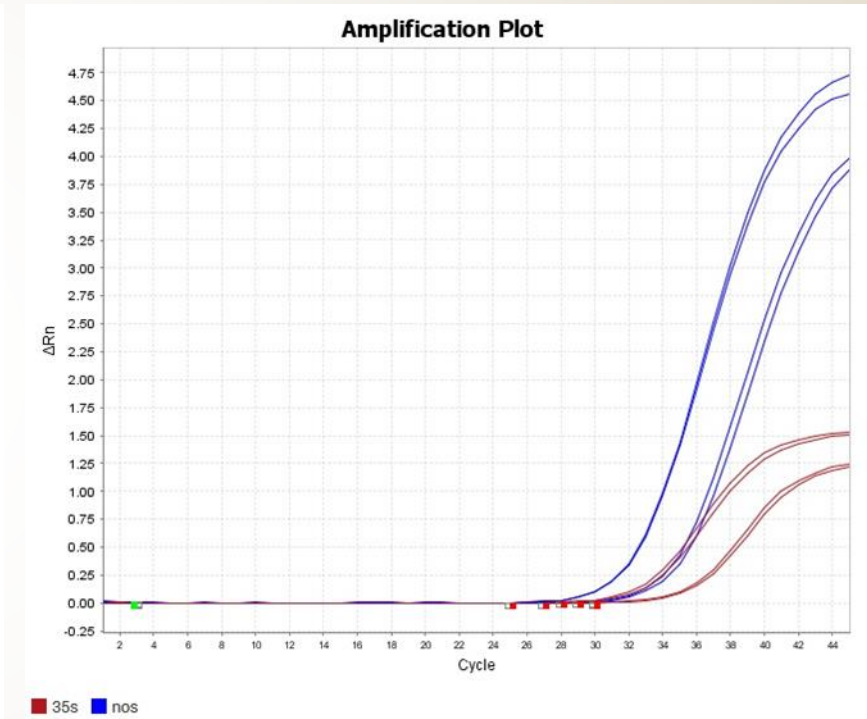
- Środowisko reakcji PCR
- Stężenia starterów i sond
- Warunki reakcji PCR
- Objętość reakcji
- Stężenie DNA

Środowisko reakcji

➤ Taq Man Universal Mastermix



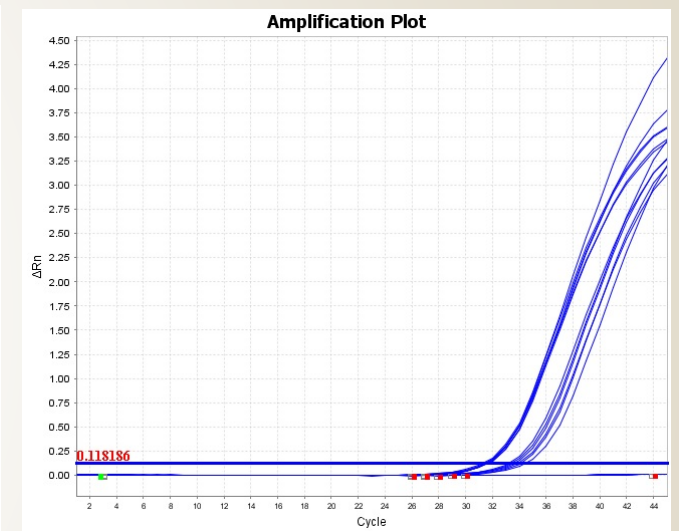
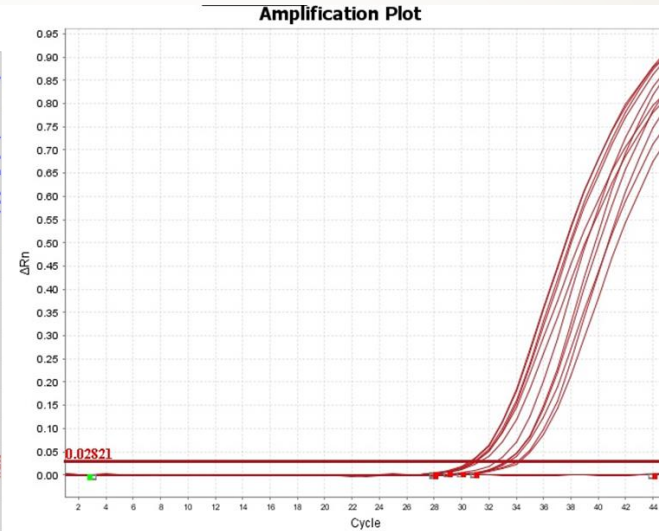
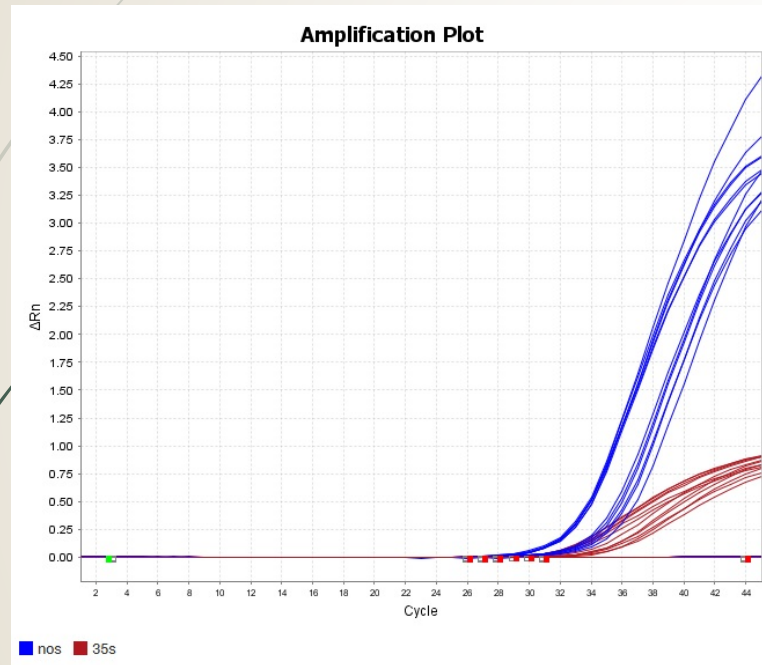
➤ Taq Man Multiplex Mastermix



Duplex P35s/tNOS (CRMy NK603 i Bt11)
 P35s startery 200 nM, sonda 150 nM
 tNOS startery 400 nM, sonda 150 nM

Stężenia starterów i sond

- P35S_HEX, stężenia starterów: 400, 300 i 200 nM
- NOS_FAM, stężenia starterów: 800, 600 i 400 nM



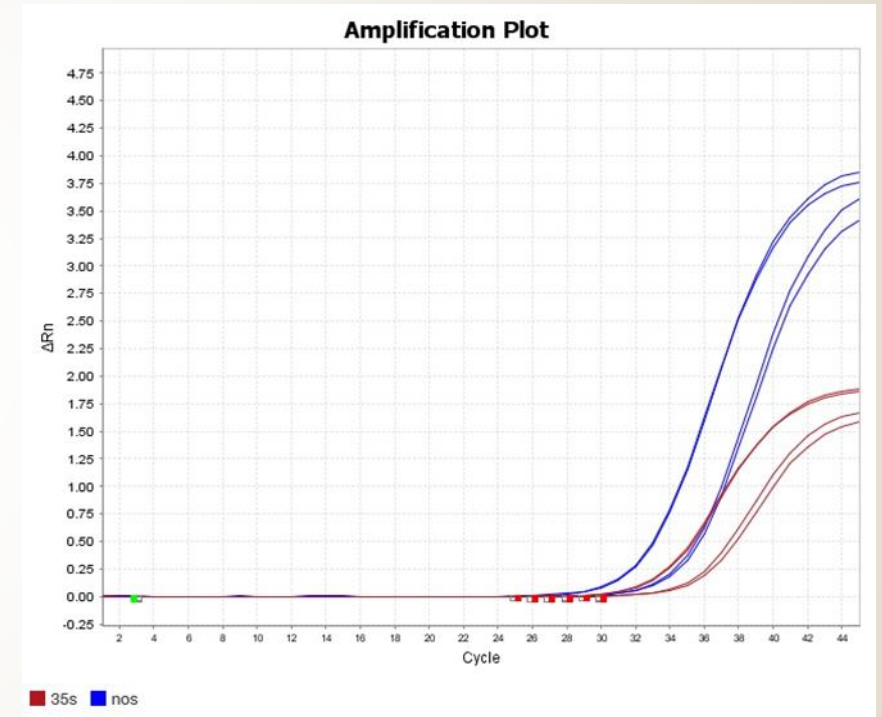
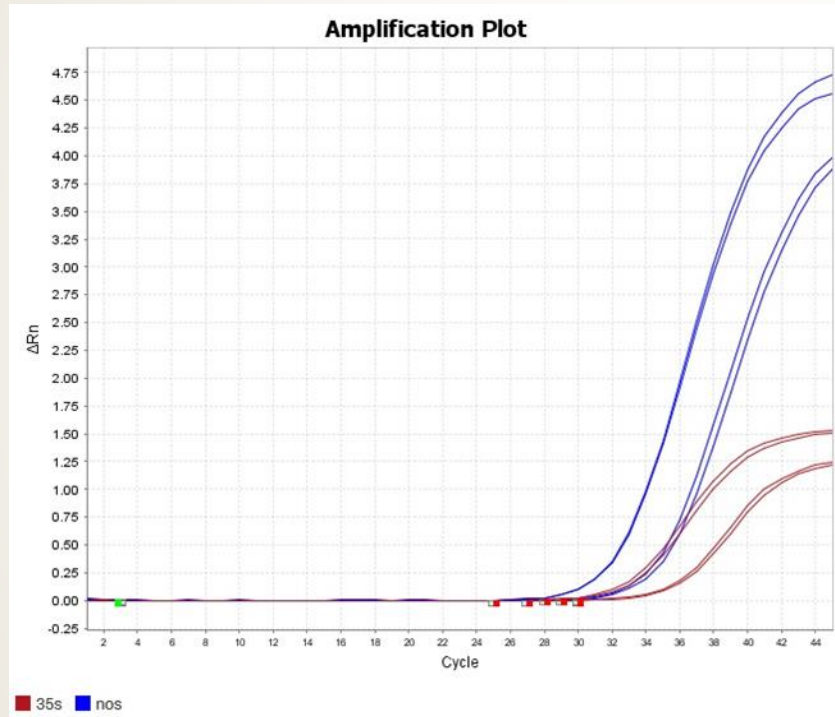
	Ct	
	1% Bt 11	2% NK603
400 nM	33	31
	32,5	31
300 nM	33	31
	34	31
200 nM	33,5	31,5
	34	31

nos	Ct	
	1% Bt11	2% NK603
800 nM	34	31,5
	33,5	31,5
600 nM	33	31,5
	34	31,5
400 nM	33	31
	34,5	31,5

Duplex P35s/tNOS (CRM_y NK603 i Bt11)

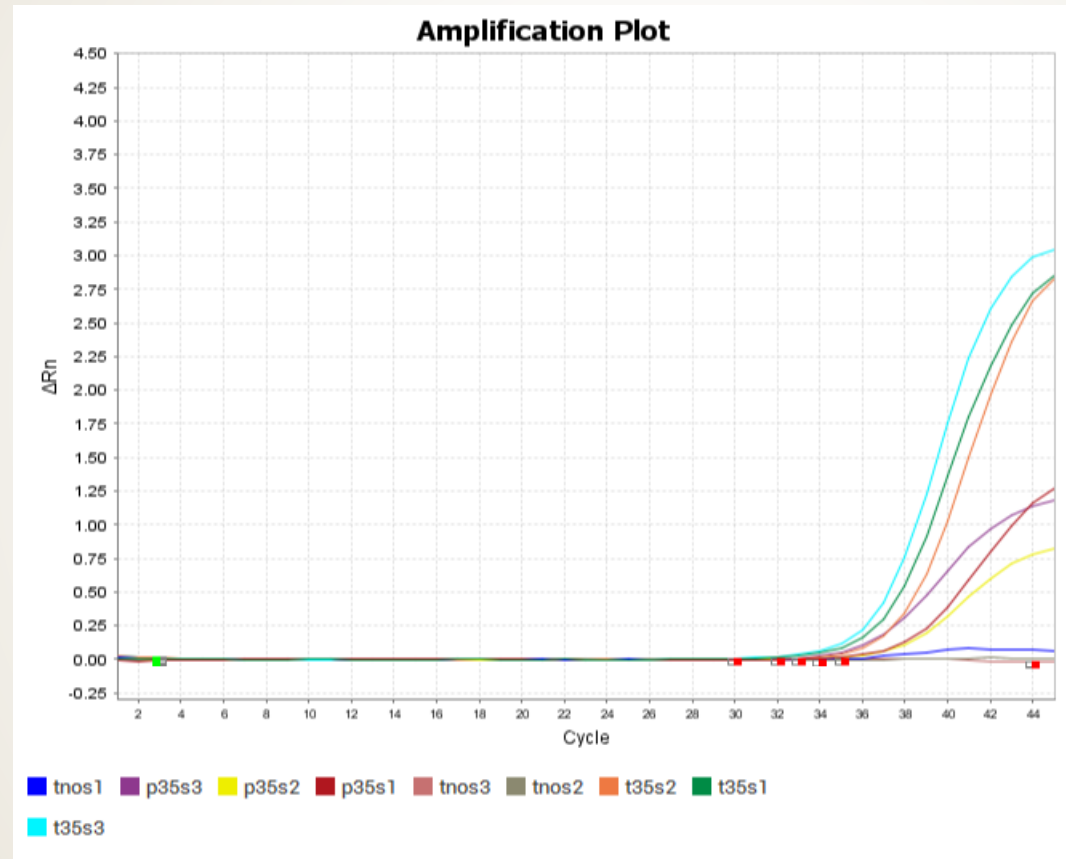
Stężenia starterów i sond

- P35s startery 200 nM, sonda 150 nM
- tNOS startery 400 nM, sonda 150 nM
- P35s startery 400 nM, sonda 200 nM
- tNOS startery 400 nM, sonda 150 nM



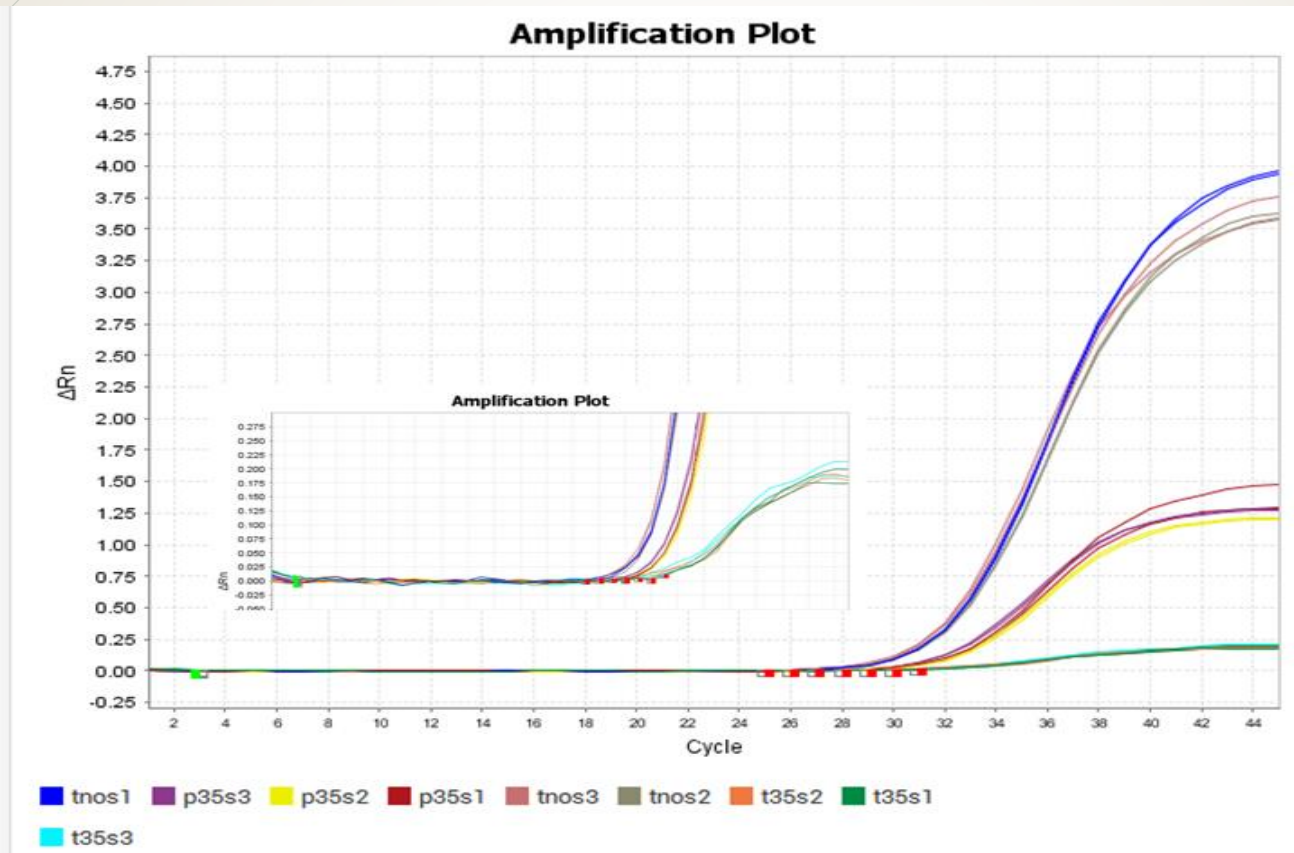
Duplex P35s/tNOS (CRMy NK603 i Bt11)
Taq Man Multiplex Mastermix

Porównanie amplifikacji przy 3 różnych stężeniach starterów i sond



Tripleks P35S/tNOS/t35S (CRM DP4114)

Przykładowy obraz dla niespecyficzných sygnatów z t35S w kukurydzy NK603:



Problem ze specyficznoscia dla NK603, niespecyficzne sygnaty o niskiej fluorescencji dla t35S w tripleksach (czego nie bylo w singlepleksach).

Tripleks P35S/tNOS/t35S (CRM NK603)

Wybór optymalnych układów multipleksowych metod skryningowych qPCR do wykrywania GMO w materiale siewnym

➤ kukurydza

- dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNOS
- dupleks – wykrywanie terminatora t35S i genu lAct1
- tripleks – wykrywanie promotora P35S, terminatora tNOS i genu referencyjnego *hmg*

➤ rzepak

- dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNOS
- dupleks – wykrywanie terminatora tPinII i genu Cp4 Epsps
- tripleks – wykrywanie promotora P35S, terminatora tNOS i genu referencyjnego *Cru*

Wybór optymalnych układów multipleksowych metod skryningowych qPCR do wykrywania GMO w materiale siewnym

- Kukurydza: dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNOS
- długość amplifikowanych fragmentów: P35S -132 pz, tNOS -97 pz
- warunki reakcji PCR
 - określone końcowe stężenia starterów i sond
 - objętość reakcji 25 μ l
 - ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 μ l DNA o stężeniu 40ng/ μ l)
 - warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 liczba cykli – 45

Wybór optymalnych układów multipleksowych metod skryningowych qPCR do wykrywania GMO w materiale siewnym

- Kukurydza: dupleks – wykrywanie terminatora t35S i genu aktywności IAct1
- długość amplifikowanych fragmentów: t35S -142 pz, IAct1-132 pz
- warunki reakcji PCR
 - określone końcowe stężenia starterów i sond
 - objętość reakcji 25 μ l
 - ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 μ l DNA o stężeniu 40ng/ μ l)
 - warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5, liczba cykli – 45

Wybór optymalnych układów multipleksowych metod skryningowych qPCR do wykrywania GMO w materiale siewnym

- Kukurydza: triplex – wykrywanie promotora P35S, terminatora tNOS i genu referencyjnego hmg
- długość amplifikowanych fragmentów: P35S -132 pz, tNos -97 pz, hmg – 79 pz
- warunki reakcji PCR
 - określone końcowe stężenia starterów i sond
 - objętość reakcji 25 μ l
 - ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 μ l DNA o stężeniu 40ng/ μ l)
 - warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5, liczba cykli – 45

Walidacja wewnętrznlaboratoryjna multipleksowych metod skringowych qPCR

- ▶ Walidacja jest potwierdzeniem przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione wymagania dotyczące konkretnie zamierzonego zastosowania. Walidacja jest kompromisem pomiędzy kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi.

(PN EN ISO/IEC 17025:2005)

- ▶ Walidacja powinna być na tyle obszerna, na ile jest to konieczne, aby spełnić potrzeby danego zastosowania lub obszaru zastosowania.

(PN EN ISO/IEC 17025:2018-02)

Walidacja może obejmować następujące parametry:

- dokładność
- **odtwarzalność**
- **powtarzalność**
- **czułość**
- precyzję
- **poprawność**
- liniowość
- **granice wykrywalności**
- granice oznaczalności
- **selektywność, specyficzność**
- zakres roboczy
- **stabilność**
- wydajność amplifikacji
- niepewność

Parametry walidacji:

- **Czułość** - najmniejsza ilość składnika, która daje sygnał i może być oznaczana daną metodą badawczą.
- **Selektywność, specyficzność** - miara zdolności metody do wykrywania określonego fragmentu DNA z mieszaniny.
- **Poprawność** - miara zdolności metody do wykrywania określonego fragmentu DNA
- **Powtarzalność** - stopień zgodności między wynikami przy powtarzaniu badania w określonych warunkach, tą samą metodą badawczą.
- **Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna** - stopień zgodności między wynikami przy powtarzaniu badania przez wszystkich analityków tą samą metodą badawczą w określonych warunkach.

Parametry walidacji:

- ▶ **Granica wykrywalności (LOD)** - najmniejsza ilość analitu lub najmniejsze jego stężenie w próbce badanej, możliwe do wykrycia w sposób nie podlegający wątpliwości, lecz niekoniecznie możliwe do oznaczenia ilościowego (PN-EN ISO 24276).
Prawdopodobieństwo, że w próbce nie ma składnika, a wynik pomiaru jest powyżej LOD wynosi 5%. Tak więc, zgodnie z zasadami przyjętymi w statystyce matematycznej, jeżeli wynik pomiaru przekracza LOD jest pewność, że w próbce występuje badany składnik.

- ▶ **Stabilność** - zdolność metody lub urządzenia do odporności na działanie czynników zewnętrznych - wytrzymałość metody, urządzenia. Np. dla metody PCR czynniki, które mogą wpływać na jej stabilność to: termocykler, master mix, objętość reakcji, stężenie starterów i sond, temperatura przyłączania starterów. Badanie stabilności (elastyczności) metody powinno udowodnić niezawodność analizy po wprowadzeniu niewielkich celowych zmian parametrów metody. Kryterium akceptacji: odchylenia przy niewielkich celowych zmianach nie powinny być większe niż $\pm 30\%$

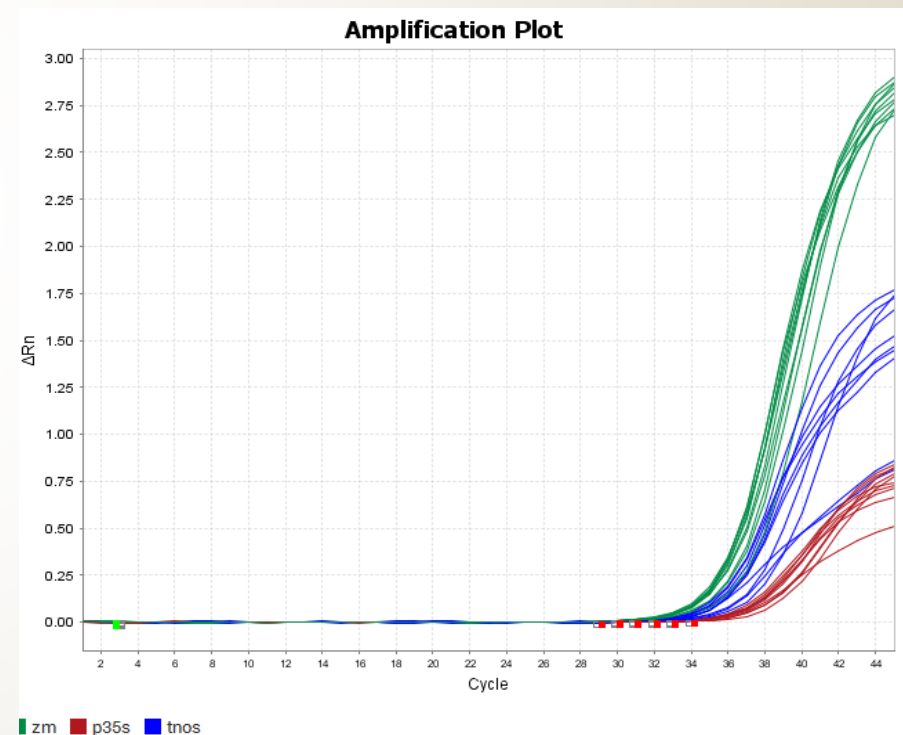
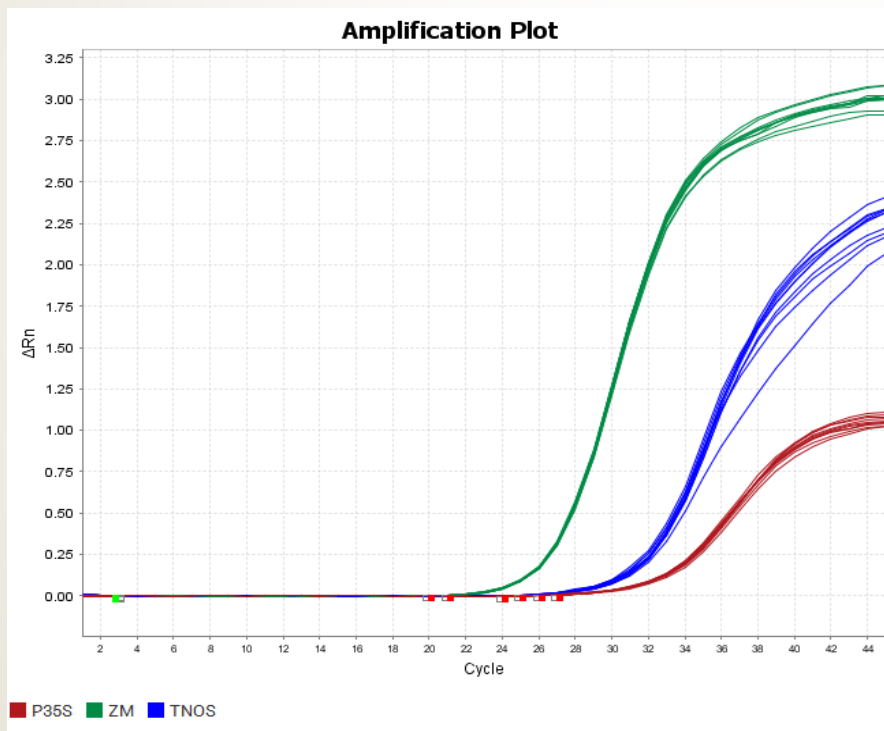
Schemat doświadczenia – stabilność

parametr	warunki 0	warunki 1
aparat do PCR	A	B
stężenie master mix	wyjściowe	-10%
stężenie starterów	wyjściowe	-30%
stężenie sondy	wyjściowe	-30%
objętość master mix	19ul	21ul
temperatura przyłączenia starterów	+1°C	-1°C

parametr	kombinacja							
	1	2	3	4	5	6	7	8
aparat do PCR	0	0	0	0	1	1	1	1
stężenie master mix	0	0	1	1	0	0	1	1
stężenie starterów	0	1	0	1	0	1	0	1
stężenie sondy	0	1	1	0	1	0	0	1
objętość master mix	0	0	1	1	1	1	0	0
temperatura przyłączenia starterów	0	1	0	1	1	0	1	0



Przykładowy obraz dla analizy LOD genu referencyjnego hmg w MON89034 w tripleksie P35S/tNOS/hmg



Walidacja wewnętrzzlaboratoryjna multipleksowych metod skringowych qPCR

kukurydza

- Metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNOS
 - Parametry walidacji:
 - LOD metody – poniżej 0,1% (CRM MON89034)
 - czułość metody – kilka kopii (CRM MON89034)
 - poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
 - powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
 - odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
 - specyficzność/selektywność – przetestowano na 16 certyfikowanych materiałach referencyjnych

Walidacja wewnętrzzlaboratoryjna multipleksowych metod skringowych qPCR

kukurydza

- Metoda typu dupleks – wykrywanie terminatora t35S i genu aktyny IAct1
 - Parametry walidacji:
 - LOD metody – poniżej 0,1% (CRM MON89034 i 4114)
 - czułość metody – kilka kopii (CRM MON89034 i 4114)
 - poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
 - powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
 - odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
 - specyficzność/selektywność – przetestowano na 11 certyfikowanych materiałach referencyjnych

Walidacja wewnątrzlaboratoryjna multipleksowych metod skriningowych qPCR

kukurydza

- ▶ Metoda typu triplex – wykrywanie promotora P35S, terminatora tNOS i genu referencyjnego hmg
 - ▶ Parametry walidacji:
 - ▶ LOD metody – poniżej 0,1%
 - ▶ czułość metody – kilka kopii
 - ▶ poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
 - ▶ powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
 - ▶ odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
 - ▶ specyficzność/selektywność dla genu referencyjnego hmg - potwierdzono

Walidacja wewnętrzzlaboratoryjna multipleksowych metod skringowych qPCR

rzepak

- Metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNOS
 - Parametry walidacji:
 - LOD metody – poniżej 0,1%
 - czułość metody – kilka kopii
 - poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
 - powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
 - odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
 - specyficzność/selektywność – przetestowano na 10 certyfikowanych materiałach referencyjnych

Walidacja wewnętrznlaboratoryjna multipleksowych metod skringowych qPCR

rzepak

- Metoda typu dupleks – wykrywanie terminatora TpinII i genu Cp4 Epsps
 - Parametry walidacji:
 - LOD metody – poniżej 0,1%
 - czułość metody – kilka kopii
 - poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
 - powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
 - odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
 - specyficzność/selektywność – przetestowano na 10 certyfikowanych materiałach referencyjnych

Walidacja wewnątrzlaboratoryjna multipleksowych metod skriningowych qPCR

rzepak

- ▶ Metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35s, terminatora tNos i genu referencyjnego Cru
 - ▶ Parametry walidacji:
 - ▶ LOD metody – poniżej 0,1%
 - ▶ czułość metody – kilka kopii
 - ▶ poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
 - ▶ powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
 - ▶ odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
 - ▶ specyficzność/selektywność – przetestowano na 10 certyfikowanych materiałach referencyjnych



Walidacja międzylaboratoryjna multipleksowych metod skriningowych qPCR

- 3 laboratoria
- aparaty do qPCR LC480 Roche
- te same warunki reakcji:
 - kalibracja aparatu
 - odczynniki
 - badane próbki
 - profil termiczny i czasowy PCR

Zespół LKGMO:

dr Sławomir Sowa

dr Joanna Chojak-Koźniewska

dr Anna Linkiewicz

dr Ewelina Żmijewska

dr Jarosław Nowosielski

mgr Katarzyna Grelewska-Nowotko

mgr Krzysztof Michalski

mgr Magdalena Żurawska-Zajfert

Dziękuję za uwagę