

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dejan ŠTEBIH

**RAZVOJ METOD KAPLJIČNE DIGITALNE
VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA
DOLOČANJE GENSKO SPREMENJENIH
ORGANIZMOV**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dejan ŠTEBIH

**RAZVOJ METOD KAPLJIČNE DIGITALNE VERIŽNE
REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČANJE GENSKO
SPREMENJENIH ORGANIZMOV**

MAGISTRSKO DELO

**DEVELOPMENT OF DROPLET DIGITAL PCR METHODS FOR
DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa seje Komisije za doktorski študij UL z dne 14.12.2015 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja biotehnologije.

Delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo.

Senat Biotehniške fakultete je dne 15. 10. 2015 za mentorico magistrskega dela imenoval prof. dr. Jano Žel.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut BOHANEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Kristina GRUDEN
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 18. 3. 2016

Podpisani izjavljam, da je delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na Univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Dejan Štebih

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 604.6:57.088.7(043.3)
KG Gensko spremenjeni organizmi / digitalna PCR / diagnostika / večtarčne analize
AV ŠTEBIH, Dejan, univ. dipl. biol.
SA ŽEL, Jana (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI 2016
IN RAZVOJ METOD KAPLJIČNE DIGITALNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČANJE GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV
TD Magistrsko delo
OP XIII, 87 str., 38 pregl., 18 sl., 109 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V okviru magistrske naloge je bil razvit nov pristop analize gensko spremenjenih organizmov (GSO) s pomočjo kapljične digitalne verižne reakcije s polimerazo (ddPCR). To je bila prva uporaba ddPCR pri analizah hrane in krme. Z ddPCR smo z dvo tarčnim načinom v vzorcih merili absolutno število tarčnih zaporedij genskega zaporedja MON810 in referenčnega gena HmgA in ugotovili, da ddPCR omogoča natančno absolutno in relativno kvantifikacijo brez kalibracije. Metoda ddPCR je bila manj občutljiva na inhibitorje kot kvantitativna PCR (qPCR). Sistem ddPCR ima dva filtra za fluorescentno svetlobo kar omogoča le dvo barven način analize. Za bolj učinkovito analizo smo razvili nov pristop več tarčne analize. Razvili smo dva štiri tarčna testa za kvantitativno določanje 8 tarčnih DNA zaporedij (7 GS linij koruze in referenčni gen). V vsakem testu dve tarčni zaporedji zaznavamo z enim fluoroforom, dve pa z drugim. Strošek analize GSO z ddPCR je primerljiv s qPCR. Ugotovili smo, da so razvite ddPCR metode v dvo tarčnem in štiri tarčnem načinu po parametrih, očutljivosti in natančnosti primerne za določanje GS linij koruze, enak pristop več tarčne analize pa se lahko uporabi tudi na drugih področjih, kjer je potreba po natančnem in zanesljivem kvantitativnem določanju tarčnih DNA zaporedij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 604.6:57.088.7(043.3)
CX Genetically modified organisms/ digital PCR/ diagnostics / multitarget analysis
AU ŠTEBIH, Dejan
AA ŽEL, Jana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
PY 2016
TI DEVELOPMENT OF DROPLET DIGITAL PCR METHODS FOR DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS
DT M.Sc. Thesis
NO XIII, 87 p., 38 tab., 18 fig., 109 ref.
IJ sl
JI sl/en
AI We have developed a new approach in GMO analysis using droplet digital PCR (ddPCR). This is the first time ddPCR was used for analysis of food and feed. Using ddPCR duplex assay, we have measured the absolute numbers of MON810 transgene and HmgA maize reference gene copies in DNA samples. The developed ddPCR system was shown to offer precise absolute and relative quantification of targets, without the need for calibration curves. ddPCR assay showed greater tolerance to inhibitors than qPCR. ddPCR platform uses two filters for fluorescence measurements, enabling two colour detection only. To achieve better cost efficiency of the analysis, new approach was developed including two 4-plex assays for quantification of 8 different DNA targets (7 GM maize lines and maize endogene). Per assay, two of the targets were labeled with one fluorophore and two with another. Performance of the developed methods is better compared to qPCR, while cost of routine GMO quantification with ddPCR is comparable to qPCR. It is thus concluded that ddPCR technology with duplex or the two multiplex assays is suitable for quantification of GMO maize events and the same approach can be used in any other field with a need for accurate and reliable quantification of DNA targets in multiplex fashion.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	XI
OKRAJSAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI MAGISTRSKE NALOGE	2
1.2 HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 GENSKO SPREMENJENI ORGANIZMI (GSO)	4
2.2 ZAKONODAJA O GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMIH	5
2.3 METODE DOLOČANJA GSO	6
2.3.1 Imunološke metode.....	6
2.3.2 Molekularne metode.....	7
2.3.3 Shema določanja GSO	7
2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	8
2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)	8
2.4.2 Digitalna verižna reakcija s polimerazo (dPCR)	10
2.4.2.1 Princip dPCR.....	10
2.4.2.2 Izvedba dPCR.....	11
2.4.2.3 Uporaba dPCR za določanje GSO	12
2.5 VEČ TARČNE ANALIZE	15
2.6 MERSKA ENOTA	16
2.7 REFERENČNI MATERIALI.....	16
2.8 VALIDACIJA METOD	17
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 RAZVOJ DVO TARČNE METODE ddPCR ZA DOLOČANJE GS KORUZE MON810.....	21
3.1.1 Referenčni material, preizkušeni vzorci	21
3.1.2 Osamitev DNA	22

3.1.2.1	Osamitev DNA s kompletom NucleoSpin® Food.....	22
3.1.2.2	Osamitev DNA z metodo CTAB	23
3.1.3	Restrikcija DNA.....	25
3.1.4	qPCR.....	26
3.1.5	Kapljična digitalna PCR (ddPCR).....	28
3.1.5.1	Priprava kapljic	28
3.1.5.2	PCR	29
3.1.5.3	Analiza kapljic.....	29
3.1.6	Primerjava eno tarčnega in dvo tarčnega načina.....	30
3.1.7	Specifičnost dvo tarčne metode ddPCR	30
3.1.8	Dinamično območje metode, LOD in LOQ dvo tarčne metode ddPCR.	30
3.1.9	Ponovljivost dvo tarčne metode ddPCR.....	30
3.1.10	Resničnost meritev dvo tarčne metode ddPCR	31
3.1.11	Uporabnost dvo tarčne metode ddPCR.....	31
3.1.12	Analiza vzorcev z inhibicijo z dvo tarčno metodo ddPCR.....	31
3.1.13	Praktičnost dvo tarčne metode ddPCR	31
3.2	RAZVOJ NOVEGA PRISTOPA ZA HKRATNO DOLOČANJE 7	
	GS LINIJ KORUZE Z ddPCR	32
3.2.1	Referenčni material, preizkušeni vzorci.....	32
3.2.2	qPCR in ddPCR.....	33
3.2.3	Priprava kemikalij za več tarčno analizo	33
3.2.3.1	Priprava pozitivne kontrole za MEQ1 in MEQ2.....	34
3.2.4	Analiza rezultatov več tarčne metode ddPCR	35
3.2.5	Dinamično območje metode, LOD in LOQ več tarčne metode ddPCR .	36
3.2.6	Resničnost meritev več tarčne metode ddPCR	37
3.2.7	Ponovljivost več tarčne metode ddPCR	37
3.2.8	Specifičnost več tarčne metode ddPCR	37
3.2.9	Asimetrična občutljivost več tarčne metode ddPCR.....	37
3.2.10	Uporabnost več tarčne metode ddPCR	38
3.2.11	Praktičnost več tarčne metode ddPCR.....	38

4 REZULTATI.....	39
4.1 RAZVOJ DVO TARČNE METODE ddPCR ZA DOLOČANJE GS KORUZE MON810.....	39
4.1.1 Preverjanje metode za določanje MON810 s qPCR	39
4.1.2 Navzkrižna analiza referenčnih materialov s qPCR	39
4.1.3 Preverjanje dvo tarčnega načina analize s qPCR.....	40
4.1.4 Preizkus ddPCR za analizo MON810.....	42
4.1.5 Vpliv restrikcije na rezultate kvantifikacije MON810 z ddPCR	44
4.1.6 Specifičnost dvo tarčne metode ddPCR	47
4.1.7 Dinamično območje, določitev LOD in LOQ dvo tarčne metode ddPCR	48
4.1.8 Resničnost meritev dvo tarčne metode ddPCR	50
4.1.9 Ponovljivost dvo tarčne metode ddPCR.....	50
4.1.10 Uporabnost dvo tarčne metode ddPCR.....	51
4.1.11 Analiza vzorcev z inhibicijo pri qPCR	52
4.1.12 Praktičnost	52
4.2 RAZVOJ NOVEGA PRISTOPA ZA HKRATNO DOLOČANJE 7 LINIJ GS KORUZE Z ddPCR	54
4.2.1 Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond in načrtovanje več tarčnih reakcij MEQ1 in MEQ2	54
4.2.2 Priprava skupne kontrole	57
4.2.3 Dinamično območje, določitev LOD in LOQ več tarčne metode ddPCR	57
4.2.4 Ponovljivost več tarčne metode ddPCR	60
4.2.5 Resničnost meritev več tarčne metode ddPCR	60
4.2.6 Specifičnost.....	62
4.2.7 Asimetrična meja detekcije (LODasym) več tarčne metode ddPCR.....	63
4.2.8 Uporabnost več tarčne metode ddPCR	64
4.2.9 Praktičnost več tarčne metode ddPCR.....	64

5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	65
5.1 RAZPRAVA	65
5.1.1 Razvoj dvo tarčne metode ddPCR za določanje GS koruze MON810...	65
5.1.2 Razvoj novega pristopa za hkratno določanje 7 GS linij koruze z ddPCR.....	69
5.2 SKLEPI	74
6 POVZETEK (SUMMARY).....	75
6.1 POVZETEK.....	75
6.2 SUMMARY	77
7 VIRI	79
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljeni referenčni material za razvoj metode ddPCR za določanje MON810	20
Pregl. 2: Vzorci iz analiz, uporabljeni za preizkus uporabnosti ddPCR.....	22
Pregl. 3: Sestava raztopine CTAB	24
Pregl. 4: Sestava precipitacijske raztopine CTAB.....	24
Pregl. 5: Začetni oligonukleotidi za reakcijo qPCR in ddPCR z nukleotidnim zaporedjem in koncentracijo v reakciji.....	26
Pregl. 6: Temperaturni program qPCR.....	27
Pregl. 7: Končne koncentracije kemikalij za preverjanje dvo tarčnega načina qPCR	28
Pregl. 8: Temperaturni program PCR.....	29
Pregl. 9: Seznam uporabljenih referenčnih materialov	32
Pregl. 10: Vzorci iz analiz, uporabljeni za preizkus resničnosti in uporabnosti več tarčne metode ddPCR.....	32
Pregl. 11: Začetni oligonukleotidi za več tarčni reakciji ddPCR (MEQ1 in MEQ2).....	34
Pregl. 12: Delež MON810 v izbranih vzorcih, izmerjen z metodo za določanje GS koruze MON810 s qPCR in rezultati iz predhodnih analiz laboratorija NIB.....	39
Pregl. 13: Rezultati analize vzorcev ter referenčnih materialov s qPCR, z upoštevanjem referenčnih vrednosti v m/m in cp/cp (%).	40
Pregl. 14: Cq vrednosti za eno tarčen in dvo tarčen način qPCR z HmgA in MON810.....	41
Pregl. 15: Primerjava povprečnih Cq vrednosti za ERM-BF413f v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu qPCR	42
Pregl. 16: Povprečno št. kopij za HmgA in MON810 v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu ddPCR	43
Pregl. 17: Vrednosti Cq analize qPCR za DNA ERM-BF413f pred in po restrikciji, analizirani v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu.....	45
Pregl. 18: Vrednosti Cq analize qPCR za DNA plazmida ERM-AD413 pred in po restrikciji, analizirani s qPCR v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu	45
Pregl. 19: Št. kopij HmgA in MON810 ter delež MON810 v ERM-BF413ek pred in po restrikciji v 2x in 6x redčini, izmerjeno z dvo tarčnim načinom ddPCR ...	46
Pregl. 20: Rezultati testa specifičnosti dvo tarčne metode ddPCR.....	47
Pregl. 21: Povprečno št. kopij HmgA in MON810 na reakcijo in koeficient variabilnosti v redčitveni vrsti DNA ERM-BF413gk ter delež MON810 v posameznih redčinah s koeficientom variabilnosti.....	48

Pregl. 22: Primerjava rezultatov kvantifikacije MON810 z dvo tarčnim načinom ddPCR in znanih vrednosti.....	50
Pregl. 23: Rezultati analize ponovljivosti dvo tarčne ddPCR metode.....	51
Pregl. 24: Delež MON810 (cp/cp) izmerjen z eno tarčnim načinom qPCR, dvo tarčnim načinom ddPCR ter znana (določena) vrednost	51
Pregl. 25: Delež MON810 iz različnih redčin DNA vzorcev.....	52
Pregl. 26: Cena analize na vzorec (€)	52
Pregl. 27: Jakost fluorescence kapljic glede na koncentracijo oligonukleotidov	54
Pregl. 28: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov za MEQ1 in MEQ2.....	55
Pregl. 29: Rezultati analize skupne kontrole z ddPCR z eno tarčnim načinom in z več tarčnim načinom.....	57
Pregl. 30: Rezultati analize redčitvene vrste skupne pozitivne kontrole z MEQ1	58
Pregl. 31: Rezultati analize redčitvene vrste skupne pozitivne kontrole z MEQ2	58
Pregl. 32: Deleži GSO v redčinah redčitvene vrste skupne kontrole	59
Pregl. 33: LOD in LOQ za posamezna tarčna zaporedja v kopijah na reakcijo.....	59
Pregl. 34: Primerjava rezultatov kvantifikacije s qPCR in z več tarčno metodo ddPCR (cp/cp)	61
Pregl. 35: Resničnost več tarčne metode ddPCR (m/m)	61
Pregl. 36: Rezultati kvantifikacije vzorcev s qPCR in več tarčno metodo ddPCR (m/m) ..	62
Pregl. 37: Izmerjeno št. kopij v reakcijah brez ali z nizko količino posameznega tarčnega zaporedja.....	62
Pregl. 38: Stroški analize 1 - 7 vzorcev z ddPCR in qPCR (€)	64

KAZALO SLIK

Sl. 1: Struktura genskega elementa.....	4
Sl. 2: Potek analize ddPCR.....	12
Sl. 3: Kartuša za pripravo emulzije reakcijske mešanice v olju v nosilcu.....	29
Sl. 4: Postavitev mejne jakosti fluorescence za izvoz podatkov v treh korakih.....	35
Sl. 5: Primerjava krivulj pomnoževanja v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu qPCR.....	41
Sl. 6: Intenziteta fluorescence za HmgA v eno tarčnem načinu (A) in dvo tarčnem načinu (B) ddPCR.....	43
Sl. 7: Intenziteta fluorescence za MON810 v eno tarčnem načinu (A) in dvo tarčnem načinu (B) ddPCR.....	43
Sl. 8: Agarozna gelska elektroforeza vzorcev pred in po restrikciji z restrikcijskim encimom Taq1.....	44
Sl. 9: Rezultati analize DNA ERM-BF413f z ddPCR v dvo tarčnem načinu pred (zgoraj) in po restrikciji (spodaj) v dvodimensionalnem pogledu.	46
Sl. 10: Jakost fluorescence pri analizi plazmida ERM-AD413 za MON810 v dvo tarčnem načinu ddPCR	47
Sl. 11: Dinamično območje dvo tarčne metode ddPCR za tarčno zaporedje HmgA	49
Sl. 12: Dinamično območje dvo tarčne metode ddPCR za tarčno zaporedje MON810.....	49
Sl. 13: Primerjava cene analize na vzorec	53
Sl. 14: Prikaz preverjanja ustrezone fluorescence za različna tarčna zaporedja ter razločevanja pozitivnih in negativnih kapljic v postopku razvoja več tarčne metode ddPCR.....	56
Sl. 15: Vsebina pozitivnih kapljic za MEQ1.....	56
Sl. 16: Linearnost pomnoževanja tarčnih zaporedij znotraj dinamičnega območja.	60
Sl. 17: Primer lažno pozitivnih rezultatov za MEQ2.....	63
Sl. 18: Nižanje stroška analize na vzorec z večanjem števila hkrati analiziranih vzorcev..	64

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOCS	Ameriško združenje kemikov za olja (angl.: American Oil Chemists Society)
BHQ	temni dušilec (angl.: Black Hole Quencher)
cdPCR	kamrična digitalna verižna reakcija s polimerazo (angl.: chamber digital polymerase chain reaction)
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid (angl.: hexadecyltrimethylammonium bromide)
cp/cp	merska enota za razmerje med količino tarčnega zaporedja, značilnega za GSO in referenčnega tarčnega zaporedja, značilnega za rastlinsko vrsto
CRM	certificiran referenčni material
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
ddPCR	kapljična digitalna verižna reakcija s polimerazo (angl.: droplet digital polymerase chain reaction)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat (angl.: deoxyribonucleotide triphosphate)
DP98140	GS koruza DP-Ø9814Ø-6
dPCR	digitalna verižna reakcija s polimerazo (angl.: digital polymerase chain reaction)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl.: ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISA	encimski imunoserološki test (angl.: enzyme linked immunosorbent assay)
ENGL	Evropska mreža laboratorijev za določanje GSO (angl.: European Network of GMO Laboratories)
ES	Evropska skupnost
EURL-GMFF	Referenčni laboratorij Evropske unije za GSO v hrani in krmi (angl.: European Reference Laboratory for GM Food and Feed)
F	smiseln začetni oligonukleotid (angl.: forward primer)
FAM	6-karboksofluorescein (angl.: 6-carboxyfluorescein)
GA21	GS koruza MON-ØØØ21-9
GSO	gensko spremenjeni organizmi
GSR	gensko spremenjene rastline
HEX	heksakloro-6-karboksifluorescein (angl.: hexachloro-6-carboxyfluorescein)

IRMM	Inštitut za referenčne materiale in meritve (angl.: Institute for Reference Materials and Measurements)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (angl.: International Organization for Standardization)
M	enota za molarnost (mol/l)
MGB	Protein za tesnejšo vezavo sonde na DNA (angl.: minor groove binder)
MIR162	GS koruza SYN-IR162-4
MIR604	GS koruza SYN-IR6Ø4-5
MON810	GS koruza MON-ØØ81Ø-6
MON863	GS koruza MON-ØØ863-5
MON89034	GS koruza MON-89Ø34-3
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
m/m	merska enota za razmerje med maso snovi, ki izvira iz GSO in skupno maso snovi te rastlinske vrste v vzorcu
nl	nano liter
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov (angl.: potential of hydrogen)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real-time polymerase chain reaction, quantitative PCR)
R	protismiseln končni oligonukleotid (angl.: reverse primer)
RNA	ribonukleinska kislina (angl.: ribonucleic acid)
RM	referenčni material

1 UVOD

Gensko spremenjeni organizmi (GSO) so v zadnjih dvajsetih letih postali stalnica na tržišču. Zakonodaja ureja postopek njihove odobritve (Commission Regulation (EC) No 1829, 2003) ter zahteva sledljivost in označevanje proizvodov, ki so sestavljeni iz ali vsebujejo GSO, živil, proizvedenih iz GSO, in krme, proizvedene iz GSO (Commission Regulation (EC) No 1830, 2003). Število odobrenih GSO hitro narašča in trenutno je v Evropski skupnosti (ES) odobrenih 78 gensko spremenjenih (GS) linij rastlin (vključno z njihovimi križanci), kar predstavlja vedno večji izziv za analitske laboratorije in ustvarja potrebo po novih, bolj učinkovitih analitskih metodah. Določanje GSO je možno na več načinov. Možno je določanje prisotnosti produkta vnesenega gena, to je proteina, za kar se uporablajo imunološke metode, ki temeljijo na uporabi specifičnih protiteles. Slabost imunoloških metod je, da so večinoma uporabne le na nepredelanih produktih, tekom predelave pa so proteini odstranjeni ali pa denaturirani, zato jih protitelesa ne zaznajo več. Zato se za določanje GSO največ uporablajo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki določajo prisotnost GSO na osnovi deoksi nukleinskih kislin (DNA). Metode so lahko presejalne in zaznavajo prisotnost promotorskih ali terminatorskih regij ali pa zaznavajo prisotnost točno določene vrste GSO (Holst-Jensen in sod., 2003).

S PCR pomnožujemo del DNA med dvema zaporedjema, ki ju prepoznavajo oligonukleotidni začetniki. Produkte PCR nato zaznavamo z gelsko elektroforezo in barvili, ki obarvajo DNA, lahko pa produkte PCR zaznavamo že tekom pomnoževanja, z uporabo interkalirajočih barvil ali uporabo tretjega začetnega oligonukleotida, označenega s fluorescentnimi barvili (sondo), kar omogoča merjenje fluorescence med reakcijo. Jakost fluorescence je odvisna od količine tarčnega zaporedja na začetku reakcije, zato lahko z uporabo referenčnih materialov (RM) in primerjavo fluorescence RM ter fluorescence vzorca določimo količino tarčnega zaporedja na začetku oz. v vzorcu. Takšno izvedbo PCR imenujemo kvantitativna PCR (qPCR). Za ustrezno meritev je nujno, da je učinkovitost pomnoževanja DNA referenčnega materiala in DNA vzorca zelo podobna, sicer pride do odstopanj in posledično do napačnega rezultata (Cankar in sod., 2006; Demeke in Jenkins, 2010). Na uspešnost pomnoževanja DNA vplivajo količina DNA v reakciji, snovi iz vzorca, ki jih nismo uspeli odstraniti in ostanki kemikalij, ki jih uporabljamo za osamitev in čiščenje DNA. Slabost qPCR je, da je potrebno zmeraj vzporedno analizirati umeritveno krivuljo iz referenčnega materiala, kar poveča stroške analize. Metoda qPCR je mogoča tudi v več tarčni izvedbi, ko v eni reakciji zaznavamo več tarčnih zaporedij hkrati (Taverniers in sod., 2004), vendar pa metode več tarčnih kvantitativnih analiz z metodo qPCR za določanje GSO niso v uporabi, saj zaradi medsebojnega vpliva ter običajno velike razlike v količini dveh ali več tarčnih zaporedij, prihaja do razlik v učinkovitosti pomnoževanja in napačnih rezultatov.

Eden od načinov kvantitativne analize na osnovi PCR je tako imenovana digitalna PCR (dPCR), ki omogoča absolutno kvantifikacijo (Vogelstein in Kinzler, 1999). Temelji na porazdelitvi DNA vzorca na veliko število posameznih delov, v katerem v vsakem poteka

PCR reakcija. Po končanem pomnoževanju se presteje število pozitivnih in negativnih reakcij po digitalnem principu "0" oz. "1". Na ta način lahko dobimo neposredno število kopij določenega zaporedja v vzorcu. Ker tako rekoč prestejemo št. določenih zaporedij v vzorcu, tak način imenujemo absolutna kvantifikacija. Določitev deleža GSO z metodo dPCR ne potrebuje umeritvene krivulje iz RM, kar močno zmanjša število potrebnih reakcij za analizo (Bhat in sod., 2009). Ker se pri dPCR upošteva končni rezultat PCR reakcije, se predvideva, da razlike v učinkovitosti pomnoževanja nimajo vpliva na rezultat, kar bi pomenilo manjše število potrebnih analiz in zmanjšanje stroškov. Zaradi upoštevanja le končnega rezultata analize se predvideva tudi, da bi se lahko uporabljal tudi več tarčni način analize, kar bi dodatno optimiziralo analize. Za izvedbo dPCR je potrebno veliko število reakcij. Instrumenti, ki so obstajali za izvedbo dPCR, so sicer omogočali analizo GSO, vendar so bile te analize zelo drage prav tako pa zaradi le nekaj tisoč reakcij nimajo velikega dinamičnega območja (Corbisier in sod., 2010). S pojavom tehnologije kapljične dPCR (ddPCR), ki reakcijsko mešanico razdeli na nekaj deset ali sto tisoč delov kot emulzijo reakcijske mešanice v olju (Pinheiro in sod., 2012), pa bi lahko metoda dPCR postala uporabna tudi za določanje GSO v rutinskih laboratorijih. Kljub zaznavanju le dveh barvil v reakciji, je s kombiniranjem pogojev reakcije PCR ter koncentracij in dolžin začetnih oligonukleotidov mogoče določanje več tarč hkrati (Sedlak in sod., 2014).

dPCR bi lahko bil primeren tudi za analize GSO, zato želimo v okviru naloge razviti metodo ddPCR za določanje gensko spremenjene (GS) linije koruze MON-ØØ81Ø-6 (MON810) v dvo tarčnem načinu in tako preveriti primernost metode ddPCR za določanje GSO.

Poleg dvotarčne metode bomo razvili nov pristop več tarčne metode ddPCR, s katero bomo lahko s kombiniranjem koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond določali štiri tarčna zaporedja v eni reakciji. Tako bo več tarčna metoda ddPCR v dveh reakcijah omogočala določanje prisotnosti in deleža 7 linij GS koruze.

1.1 CILJI MAGISTRSKE NALOGE

Pričakujemo uspešen razvoj metode ddPCR za določanje GSO v živilih in krmi. Metoda bo primerljiva s sedaj uporabljano metodo qPCR, ob tem pa bo manj občutljiva na inhibitorje. Za analizo ne bo potrebna vzporedna analiza RM, kar bo analize poenostavilo in zmanjšalo stroške.

Razvili bomo nov pristop več tarčne metode ddPCR, ki bo omogočala določitev in kvantifikacijo 7 linij GS koruze v dveh reakcijah brez vzporedne analize RM. Učinkovitost analize GSO se bo tako zelo povečala, pristop pa bo prenosljiv tudi za kvantitativno analizo drugih tarč, ne le GSO, kot so npr. genetski označevalci.

1.2 HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE

Razvili bomo ddPCR pristop za določanje prisotnosti in deleža GSO ter jo primerjali s trenutno najbolj uporabljano metodo qPCR. Predvidevamo, da bo metoda enostavnejša za izvedbo, natančnejša, manj občutljiva na inhibitorje reakcije PCR in bo omogočala več tarčno analizo ter določanje GSO brez uporabe RM v enotah razmerja kopij transgena in referenčnega gena.

Razvili bomo več tarčni pristop za ddPCR, ki bo omogočil hkratno določanje 7 linij GS koruz. Predvidevamo, da bo z več tarčnim pristopom mogoče natančno hkrati določiti prisotnost in količino določenih GS linij koruze ter tako poenostaviti in poceniti analize GSO.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GENSKO SPREMENJENI ORGANIZMI (GSO)

Gensko spremenjeni organizmi postajajo zmeraj bolj uporabljeni v svetovnem kmetijstvu in površine, posajene z GSO so vsako leto večje. Površina, posajena z gensko spremenjenimi rastlinami (GSR) se je tako iz 1,8 milijona hektarjev v letu 1996 povečala na 181,5 hektarjev v letu 2014. Ob povečanju površin, posajenih z GSR, se povečuje tudi število odobrenih različnih GS poljščin. V letu 2014 je bilo tako posajenih že 12 gensko spremenjenih poljščin. Povečuje se tudi število vnesenih lastnosti. Ob najpogosteje uporabljenih, toleranca na herbicide in odpornost na škodljivce, kot so žuželke ali virusi, se pojavljajo GSR s povečano odpornostjo na sušo, s spremenjeno sestavo maščob, vsebnostjo lignina, vsebnostjo akrilamida, odpornostjo na poškodbe, itd. Tudi površine, posajene z GSR z naloženimi geni, to je GSR, kjer s križanjem posameznih GS linij v eni rastlini združijo več GS lastnosti, se povečujejo in so v letu 2014 predstavljale 28% površin, posajenih z GSR (James, 2014).

Gensko spremenjeni organizmi, ki so trenutno odobreni za uporabo, vsebujejo genske elemente s promotorsko regijo za začetek prepisovanja gena, gen za željeno lastnost ter terminatorsko regijo za končanje prepisovanja (Holst-Jensen in sod., 2003) (Slika 1). V enem genskem elementu je lahko tudi več genov (skupaj s promotorjem in terminatorjem).



Slika 1: Struktura genskega elementa

Figure 1: Structure of genetic insert

Genske elemente v rastline vnašajo v glavnem s pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* ali pa z obstrelevanjem celic rastline z genskimi elementi na izstrelkih iz zlata ali volframa. Za določanje GSO je pomembno poznavanje zaporedja nukleotidov vnesenega genskega elementa kot tudi zaporedja DNA prejemnega organizma ob vnesenem genskem zaporedju.

Vedno več je odobrenih tudi GSR, ki so pridobljeni s pomočjo križanj GSR s posameznim genskim elementom ali večimi in na koncu vsebujejo dva ali več genskih elementov. Take GSR imenujemo GSR z naloženimi geni. Sorta koruze s komercialnim imenom Genuity® SmartStax® RIB Complete®, vsebuje 8 vnesenih GS elementov (Genuity, 2015).

2.2 ZAKONODAJA O GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMIH

Po slovenski zakonodaji je "GSO organizem, z izjemo človeka, ali mikroorganizem, katerega genski material je spremenjen s postopki, ki spreminja ta material drugače kot to poteka v naravnih razmerah s križanjem ali rekombinacijo" (Zakon o ravnjanju ..., 2005; Zakon o spremembah ..., 2010). Evropska zakonodaja (Commission Directive (EC) No 18, 2001) in mednarodni protokol (Ukaz o razglasitvi ..., 2002) opredeljujeta GSO na podoben način: "GSO pomeni organizem z izjemo človeka, katerega genski material je bil spremenjen na način, ki se ne pojavlja v naravi s križanjem in/ali naravno rekombinacijo" oz. "GSO je organizem z novo kombinacijo genskega materiala, ki je nastala z uporabo sodobne biotehnologije".

Zakonodaja ureja postopek odobritve GSO (Commission Regulation (EC) No 1829, 2003) ter zahteva sledljivost in označevanje proizvodov, ki so sestavljeni iz ali vsebujejo GSO, živil, proizvedenih iz GSO, in krme, proizvedene iz GSO (Commission Regulation (EC) No 1830, 2003).

Uredba Commission Regulation (EC) No 1830 (2003) ureja zahteve glede označevanja in sledljivosti GSO, katerim je treba zadostiti pri označevanju in zagotavljanju sledljivosti GSO skozi celotno tržno verigo in to v tistem delu, ki se nanaša na označevanje izdelkov, ki imajo dovoljenje skladno z uredbo Commission Regulation (EC) No 1829 (2003), ki zahteva označevanja živil, ki vsebujejo odobrene GSO, razen živil, vsebujočih material, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljen ali proizведен, v deležu največ 0,9 odstotkov posamičnih sestavin živila ali živila iz ene same sestavine, pod pogojem, da je njegova prisotnost naključna ali tehnično neizogibna. Podobno velja za krmo, ki mora biti označena, da vsebuje GSO, razen krma, vsebujoča material, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljen ali proizведен, v deležu največ 0,9 odstotkov krme in vsake krme, iz katere je sestavljena, pod pogojem, da je njegova prisotnost naključna ali tehnično neizogibna. Ta uredba prav tako zahteva da prijavitelj novega GSO da na voljo metodo za določanje tega GSO in da je na voljo referenčni material (RM).

Označevanje izdelkov, ki vsebujejo GSO je po svetu različno urejeno. Marsikje zakonodaje o označevanju ni, ponekod, npr. v ZDA in Kanadi je le-to prostovoljno. V državah, kjer je označevanje določeno, je običajno določena tudi meja označevanja. Tako je meja označevanja v Rusiji, podobno kot v ES, 0,9%, v Braziliji 1%, v Južni Koreji 3%, na Japonskem 5% in na Kitajskem 0% (Gruère in Rao, 2007; Žel in sod., 2012).

V prilogi I uredbe Commission Regulation (EC) 641(2004) so navedeni tehnični predpisi o vrsti informacij metode detekcije, ki jih mora vlagatelj zagotoviti in so potrebne za preverjanje predpogojev za ustreznost metode v skladu z zahtevami Evropske komisije (Definition, 2015), priloga II uredbe Commission Regulation (EC) 641(2004) pa opisuje zahteve za RM.

Uredba Commission Regulation (EC) 619 (2011) v krmi dovoljuje prisotnost 0,1% GSO, za katerega se je začel postopek odobritve po uredbi Commission Regulation (EC) No 1829 (2003) pred več kot tremi meseci in Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) zanj ni ugotovila, da škodljivo vpliva na zdravje in okolje, ko je prisoten pod 0,1% masnega deleža, in je zahtevano kvantitativno metodo za določanje tega GSO validiral in objavil Referenčni laboratorij Evropske unije za GSO v hrani in krmi (EURL-GMFF) ter certificiran referenčni material (CRM) izpolnjuje pogoje iz člena 3 te uredbe.

Število odobrenih GSO hitro narašča. Trenutno je v Evropski skupnosti (ES) odobrenih 78 gensko spremenjenih linij rastlin (vključno z njihovimi križanci), od tega je 21 gensko spremenjenih linij rastlin dovoljenih po uredbi Commission Regulation (EC) 619 (2011) (EU register, 2015). Za uporabo sta v skladu z direktivo Commission Regulation (EC) No 1829 (2003) odobrena tudi dva mikroorganizma. Število odobrenih GSO še narašča, kar predstavlja vedno večji izziv za analitske laboratorije in ustvarja potrebo po novih, bolj učinkovitih analitskih metodah.

2.3 METODE DOLOČANJA GSO

Za določanje prisotnosti GSO se uporablja več pristopov. Najbolj razširjene so molekularne metode, kjer določamo prisotnost vnesenega genskega elementa ter imunološke, kjer z uporabo protiteles določamo prisotnost produktov vnesenih genov. Razvite so bile tudi metode na osnovi masne spektrometrije, kromatografije, bližnje infrardeče spektroskopije, ki prav tako zaznavajo prisotnost produktov vnesenih genov (Fraiture in sod., 2015). Določanje nekaterih GSO je mogoče tudi z analizo pridobljenih fenotipskih lastnosti, npr toleranco na herbicide (Anklam in sod., 2002; Hernandez in sod., 2005).

V laboratorijih ES za uradni nadzor se za določanje GSO uporablja molekularna metoda verižna reakcija s polimerazo v realnem času (kvantitativna PCR, qPCR), ki omogoča zaznavanje in določanje deleža GSO (Anklam in sod., 2002; Fraiture in sod., 2015).

2.3.1 Imunološke metode

Imunološke metode za določanje prisotnosti uporabljajo specifična monoklonska ali poliklonska protitelesa, ki prepoznavajo epitope (specifična mesta) na površini produktov vnesenih genov. Uporabljajo se v obliki encimsko-imunskeih testov (ELISA) ali pa v obliki hitrih seroloških testov (lateral flow device) (Ahmed, 2002). Primerne so za določanje prisotnosti GSO v nepredelanih kmetijskih pridelkih, ker se med predelavo proteini običajno denaturirajo in jih protitelesa ne zaznajo več oz. je za denaturirane proteine potrebno uporabiti druga protitelesa, ki prepoznavajo denaturirano obliko proteina (Stave, 2002). Niso pa primerne za tiste GSO, kjer genska spremembra ne vpliva na nivo izražanja proteinov ali pa je nivo izražanja prenizek (Bonfini in sod., 2002). Prav tako niso primerne za kvantifikacijo GSO, ker je izražanje proteinov lahko zelo različno glede na različne

okoljske dejavnike, fazo rasti rastline ter na tip rastlinskega tkiva. Imunološke metode so hitre in relativno poceni glede na molekularne metode (Ahmed, 2002).

2.3.2 Molekularne metode

Molekularne metode zaznavajo prisotnost specifičnih zaporedij nukleinskih kislin. Le te so lahko ribonukleinske kisline (RNA) ali deoksiribonukleinske kisline (DNA). Ker se GS DNA ne prepisuje zmeraj v RNA, metode zaznavanja RNA niso primerne za določanje GSO. Molekula DNA je dovolj stabilna, da jo lahko določamo v organizmih in v procesiranih izdelkih (Holst-Jensen in sod., 2003).

Izmed molekularnih tehnik so najbolj uporabljane metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR) in sicer v osnovni obliki in v obliku kvantitativne PCR (qPCR) (Fraiture in sod., 2015). V uporabo prihaja tudi digitalna PCR (dPCR) (Baker, 2012; Bhat in sod., 2009; Morisset in sod., 2013; Köppel in Bucher, 2015). Obstajajo tudi številne alternative PCR metodam kot je metoda izotermalnega pomnoževanja, ki omogoča hitrejo analizo. Med njimi je najbolj poznana metoda izotermalnega pomnoževanja, posredovanega z zanko za določanje nukleinskih kislin LAMP (angl. Loop-mediated isothermal AMPlification) (Chen in sod., 2011; Feng in sod., 2015). Metode mikromrež omogočajo zaznavanje številnih tarčnih zaporedij hkrati. Razvita je bila tudi metoda, ki vključuje izotermalno pomnoževanje in zaznavanje z mikromrežami, t. im. NAIMA (Dobnik in sod., 2010). Zaznavanje več tarčnih zaporedij hkrati omogočajo tudi tehnologija Luminex (Fantozzi in sod., 2008) in kapilarna gelska elektroforeza PCR produktov (García-Cañas in sod., 2002). Metode nove generacije sekveniranja omogočajo zaznavanje GSO, katerih DNA zaporedje ni poznano oz. je poznano le delno (Fraiture in sod., 2015).

2.3.3 Shema določanja GSO

Pri analizah GSO s qPCR zaradi velikega števila GSO običajno izvedemo presejalno analizo, s katero zaznavamo genska zaporedja, ki so vnesena v več GSO. Običajno so to promotorski in terminatorski genski elementi, kot npr promotor 35S virusa CaMV ali terminator NOS iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (Holst-Jensen in sod., 2003). Analiza je pogosto izvedena v več tarčnem načinu z namenom zmanjšanja števila potrebnih analiz (Huber in sod., 2013).

Presejalni analizi nato na osnovi rezultatov sledi identifikacija GSO z metodami, ki zaznavajo posamezne GSO. Tako določamo le prisotnost tistih GSO, ki vsebujejo genske elemente, ki smo jih zaznali s presejalno analizo. Če je potrebno se izvede še kvantitativna analiza, s katero se določi delež GSO v vzorcu (Holst-Jensen in sod., 2003). Ta se določi z razmerjem med količino referenčnega gena, značilnega za posamezno rastlinsko vrsto in GSO.

2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

PCR je zaradi občutljivosti, specifičnosti in zanesljivosti že dolgo uporabljana za določanje GSO (Holst-Jensen in sod., 2003), v izvedbi qPCR je trenutno najbolj uporabljana tehnika za določanje GSO (Cankar in sod., 2006; Fraiture in sod., 2015). dPCR je zaenkrat bila predstavljena kot zelo natančna metoda določanja GSO, vendar zaradi visokih stroškov ni bila uporabljana v laboratorijih za analizo vzorcev, ampak predlagana za certificiranje referenčnih materialov za določanje razmerja kopij med GSO in referenčnim genom (cp/cp) (Corbisier in sod., 2010). Tudi zahteve Evropske komisije glede parametrov za metode določanja GSO, ki jih morajo upoštevati prijavitelji novega GSO za razvoj metode za določanje tega GSO, se nanašajo na metode na osnovi PCR (Definition ..., 2015).

Z reakcijo PCR pomnožujemo specifične odseke tarčne DNA. Vsak cikel reakcije je sestavljen iz treh korakov: denaturacije DNA, prileganja začetnih oligonukleotidov ter prepisovanja verige; drugi in tretji korak sta pri dvostopenjski izvedbi združena. V koraku denaturacije DNA pri temperaturi 95 °C pridobimo enoverižno molekulo, ki služi kot matrica pri pomnoževanju. V drugi fazi reakcije se nanjo vežejo specifični začetni oligonukleotidi, ki jih prepozna encim DNA-polimeraza. Temperatura druge faze je odvisna od zaporedja nukleotidov začetnih oligonukleotidov, običajno je med 50 °C in 60 °C. V fazi pomnoževanja polimeraza DNA prepiše matrično DNA v komplementarno verigo. V vsakem ciklu se število pomnoženih molekul podvoji in med potekom reakcije eksponencialno narašča. Proti koncu reakcije se eksponencialno pomnoževanje preneha zaradi porabe omejene količine reagentov ali akumulacije tarčnih molekul in reakcija PCR doseže fazo platoja. PCR produkte zaznavamo po končani reakciji, običajno z agarozno gelsko elektroforezo, zato količina nastalega produkta ne odraža začetnega števila tarčnih molekul (Bustin, 2005; Ginzinger, 2002).

PCR se pogosto uporablja v več tarčnem načinu v kombinaciji z drugimi metodami zaznavanja PCR produktov, npr. z mikromrežami ali kapilarno gelsko elektroforezo (García-Cañas in sod., 2002; Holek in sod., 2010).

2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Pri kvantitativnem PCR (PCR v realnem času oz. qPCR) pomnoženo DNA označimo s fluorescentnimi barvili in naraščanje fluorescence spremljamo v vsakem ciklu. Fluorescenca je sorazmerna količini produkta in se z vsakim ciklom povečuje. Rezultat qPCR je število ciklov oz. Cq (angl. quantification cycle), pri katerem zaznamo fluorescenco v fazi eksponentnega pomnoževanja. Jakost oddane svetlobe se tako povečuje z vsakim ciklom, in ciklu, kjer doseže določeno vrednost rečemo Cq. Vrednost Cq je odvisna od začetne količine tarče v reakciji. Za označevanje so raziskovalci razvili številne kemije za detekcijo, ki delujejo na treh osnovnih principih fluorescentnega označevanja produktov PCR: (i) fluorescentna barvila, ki se nespecifično vežejo na dvo verižno molekulo DNA, (ii) fluorescentno označeni začetni oligonukleotidi, (iii) dodaten

fluorescentno označen nukleotid, ki ga imenujemo sonda (Kubista in sod., 2006). Fluorescenza interkalirajočih barvil (i), ki se vklopijo v mali žleb novonastale dvo verižne DNA tekom koraka pomnoževanja, se ob vklopitvi močno poveča, zato se ob pomnoževanju poveča tudi skupna fluorescenza reakcije (Higuchi in sod., 1993), katere intenziteta je premo sorazmerna s količino nastalega produkta (Schneeberger in sod., 1993). Za označevanje se največ uporabljo asimetrična cianinska barvila, predvsem SYBR Green in EVA Green. Razvite so bile številne metode za določanje GSO, ki uporabljo interkalirajoča barvila (Hernandez in sod., 2004; Taverniers in sod., 2001; Terry in sod., 2002; Terry in Harris, 2001).

Fluorescentno označene začetne oligonukleotide (ii) uporablja tehnologije Lux (Nazarenko in sod., 2002), Plexor (Sherrill in sod., 2004), Amplifluor (Nazarenko in sod., 1997) ter Scorpion (Whitcombe in sod., 1999). Razvite so bile metode za določanje GSO na osnovi tehnologij Ampliflour in Scorpion (Hernandez in sod., 2004; Terry in sod., 2002; Terry in Harris, 2001). Buh Gašparič in sod. (2010) so primerjali uporabnost Lux in Plexor tehnologij s TaqMan tehnologijo.

Sonde (iii) so sintetični oligonukleotidi, ki so na 5' terminalnem koncu označeni z reporterjem in na 3' terminalnem koncu z dušilcem. Emisijski in absorbcijski spekter uporabljenih barvil se prekrivata, zato ne zaznamo fluorescence reporterskega barvila, dokler je v neposredni bližini dušilca. V koraku prepisovanja polimeraza DNA razgradi sondi, pri čemer pride do prostorske ločitve reporterskega barvila od dušilca, kar omogoči zaznavo njegove fluorescence (Bustin, 2005; Bustin in sod., 2009; Ginzinger, 2002). Mehanizem, s katerim dušilec pretvori energijo, ki jo je sprejel od donorja, imenujemo mehanizem FRET (angl. fluorescence resonance energy transfer) oz. mehanizem fluorescenčnega resonančnega prenosa energije z donorske na akceptorsko molekulo (Holland in sod., 1991). Najpogosteje uporabljene so TaqMan sonde, močnejšo vezavo lahko dosežemo z uporabo sond, na katere je pritrjena proteinska molekula, ki se veže v mali žleb DNA in jo s kratico imenujemo MGB (angl. minor groove binder) (Kutyavin in sod., 2000). Uporaba modificiranih nukleotidov kot npr. peptidne nukleinske kisline (PNA) in »zaklenjene« nukleinske kisline (LNA, locked nucleic acid) omogoča načrtovanje krajsih in bolj specifičnih sond (Kubista in sod., 2006).

Za kvantitativno določanje GSO se kot kalibranti uporablja RM, katerih količina tarčnega zaporedja je znana, in nato primerjamo vrednosti Cq kalibrantov in naših vzorcev. Zato tak način imenujemo relativna kvantifikacija (Holst-Jensen in sod., 2003).

Za natančno določanje št. tarčnih zaporedij s qPCR je zelo pomembno, da ne pride do odstopanj tekom pomnoževanja. V fazi pomnoževanja se v vsakem ciklu PCR vsako tarčno zaporedje podvoji. Lahko pa pride do t. im. inhibicije pomnoževanja, če npr. določene kemikalije motijo pomnoževanje, lahko iz vsake tarče nastane manj ali več kot 1 kopija na cikel. V tem primeru se tarčna zaporedja sicer pomnožujejo, vendar neustrezno.

Fluorescenza, ki jo merimo, zato ne odraža več št. kopij tarčnega zaporedja na začetku, zato je kvantifikacija napačna (Cankar in sod., 2006).

Za večjo zanesljivost oz natančnost analize pri nizkem številu kopij tarčnega zaporedja v reakciji qPCR, so razvili statistične pristope, ki na osnovi razmerja med pozitivnimi in negativnimi reakcijami, natančneje kvantificirajo tarčno zaporedje v vzorcu (Berdal in sod., 2008) oz. po principu, podobnem dPCR, omogočajo določanje GSO brez uporabe referenčnega materiala (La Mura in sod., 2011; Lee in sod., 2010).

2.4.2 Digitalna verižna reakcija s polimerazo (dPCR)

2.4.2.1 Princip dPCR

Izraz digitalna PCR sta prva predstavila Vogelstein in Kinzler (1999), sam princip uporabe analize mejnih redčin DNA vzorca s PCR pa so predstavili Sykes in sod. že leta 1992. Princip digitalnega PCR temelji na analizi DNA vzorca, ki jo razdelimo na toliko reakcij, da je vsaj nekaj reakcij brez tarče, večina reakcij, ki vsebujejo tarčo, vsebuje eno tarčo, nekaj pa tudi 2, 3 ali več kopij tarče. Takšno porazdelitev statistično opisuje Poissonova porazdelitev. Po končanem pomnoževanju nato prestejemo število pozitivnih in negativnih reakcij in z uporabo binomske Poissonove statistike dobimo začetno št. kopij tarče v znani količini vzorca:

$$T = \frac{-D \times 1000}{V_d} \times \ln\left(1 - \left(\frac{P}{R}\right)\right) \quad \dots (1)$$

kjer je T število tarčnih zaporedij v 1 µl osamljene DNA vzorca, D je stopnja redčitve DNA vzorca za dPCR reakcijo, V_d je povprečen volumen reakcij (nl), P je število pozitivnih reakcij in R je število vseh reakcij (Pinheiro in sod., 2012). S pomočjo te enačbe nato dobimo bolj ustrezni rezultat štetja tarč, kot če bi upoštevali le razmerje med pozitivnimi in negativnimi reakcijami, še posebej, ko se število tarč približuje št. vseh reakcij (Sykes in sod., 1992).

dPCR zaradi drage izvedbe dolgo ni prišla v splošno uporabo, saj je izvedba temeljila na velikem številu PCR reakcij. Z razvojem tehnike za avtomatizirano pripravo velikega števila PCR v majhnih volumnih sta bili nekaj let na voljo le platformi kamrične dPCR (cdPCR) BioMark™ in OpenArray® Real-time PCR proizvajalcev Fluidigm in Applied Biosystems, ki pa zaradi visoke cene nista bili najbolj primerni za rutinsko uporabo. V zadnjih nekaj letih je razvoj mikrofluidike ter ustreznih kemij napredoval in na trgu so se pojavile aparature, ki omogočajo dPCR v kapljični (QX100™ Droplet Digital™ PCR System, BIO-RAD, in RainDrop® Digital PCR System, Raindance) in kamrični izvedbi (Quant Studio™ 12 K Flex Real-time PCR System in Quant Studio® 3D Digital PCR System, Life Technologies) po ceni, primerljivi s qPCR (Baker, 2012). Vsi instrumenti za

dPCR zaznavajo flourescentno označeno DNA, nekateri omogočajo uporabo interkalirajočih barvil in sond, nekateri le sond.

Prednost dPCR pred qPCR je v uporabi velikega števila kvalitativnih rezultatov za izračun kvantitativnega rezultata, zaradi česar razlike v učinkovitosti pomnoževanja, ki so lahko posledica inhibitorjev PCR reakcije, ne vplivajo na rezultat kvantitativne analize (Morisset in sod., 2013; Sedlak in sod., 2014; Rački in sod., 2014). Prav tako za določitev števila kopij tarčnega zaporedja v vzorcu ni potrebna uporaba kalibranta, rezultat analize je pa v enotah cp/cp. Ker tako rekoč preštejemo št. tarč v vzorcu, tak način imenujemo absolutna kvantifikacija (Bhat in sod., 2009).

2.4.2.2 Izvedba dPCR

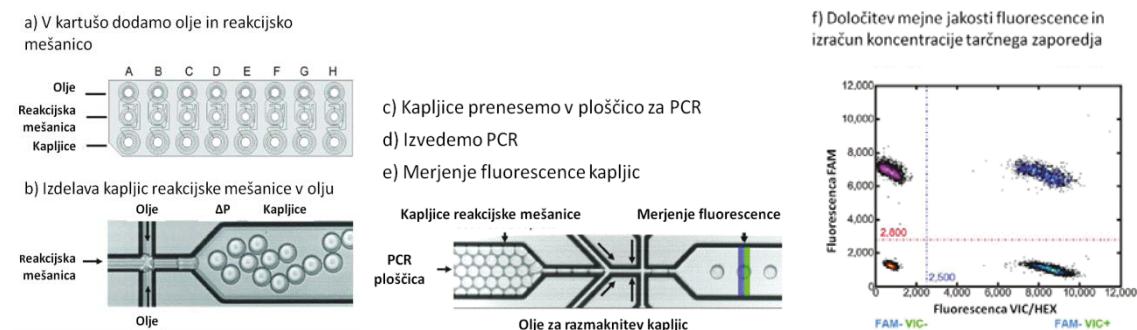
Razdelitev reakcijske mešanice v veliko število poteka na dva načina. V kamrični izvedbi dPCR (cdPCR) reakcijsko mešanico, ki vsebuje vse kemikalije, potrebne za potek reakcije PCR, ter izolirano DNA vzorca, razdelimo v prostore v trdnem nosilcu (čipu), ki ga nato segrevamo in ohlajamo, da poteče reakcija PCR. Fluorescenco reakcij lahko spremljamo že med pomnoževanjem, lahko pa fluorescenco odčitamo po končani reakciji ter določimo število vseh upoštevanih reakcij, število pozitivnih reakcij in število negativnih reakcij.

V primeru proizvajalca Fluidigm instrument s pomočjo nadtlaka potisne reakcijsko mešanico v mrežo drobnih kanalčkov v čipu iz posebne plastične mase, ki se končujejo z majhnimi kamricami, med sabo pa jih nato loči s pomočjo posebnega olja. Ponujajo dva tipa čipov in sicer takšnega, ki omogoča analizo 12 vzorcev s 765 kamricami vsak, ter za analizo 48 vzorcev s 770 kamricami vsak. En vzorec lahko razdelimo v vseh 12 oz. vseh 48 polj in na tak način vzorec analiziramo z 9180 reakcijami oz z 36960 reakcijami. Velikost posamezne reakcije je 6 nl oz 0,65 nl. Čip vstavimo v instrument PCR, ki meri tudi fluorescenco. Instrument omogoča hkratno določanje treh različnih tarč v vzorcu, če so sonde za posamezno tarčo označene s svojimi barvili (Fluidigm, 2015a).

Sistema Open Array® Real-time PCR System in Quant Studio™ 12 K Flex Real-time PCR System proizvajalca Life Technologies sta zasnovana na posebnem čipu z 3072 luknjicami velikosti 33 nl, katerih zunanjji rob je hidrofoben, notranjost pa hidrofilna, zato reakcijska mešanica po dodajanju na čip ostane v luknjicah. Čip nato vstavimo v PCR, ki tudi meri fluorescenco in po končanem postopku pomnoževanja aparatura določi število pozitivnih in negativnih reakcij. Sistema omogočata hkratno pomnoževanje in analizo 4 čipov ter tako analizo vzorca v 12288 kamricah v eni analizi. Aparaturi omogočata hkratno detekcijo vsaj 3 tarč. Na trgu je tudi njihov nov izdelek QuantStudio® 3D Digital PCR System, ki omogoča razdelitev vzorca v 20000 kamric na enem čipu. Instrument omogoča hkratno detekcijo dveh tarč (Life Technologies, 2015).

V kapljični izvedbi dPCR (ddPCR) reakcijsko mešanico emulgiramo v olju, da dobimo emulzijo kapljic reakcijske mešanice v olju. Takšno emulzijo proizvedemo s pošiljanjem

olja in reakcijske mešanice z različno hitrostjo iz posameznih kanalčkov v skupni kanal, kjer hidrofobna reakcijska mešanica v večji količini olja tvori drobne kapljice (Slika 2). Vsaka kapljica predstavlja svojo reakcijo. Posebne kemikalije omogočajo stabilizacijo tako nastalih kapljic, da ne pride do združevanja oz. razpada tekom PCR. Tako pripravljeno emulzijo prenesemo v PCR ploščico in izvedemo običajen PCR, nato pa ploščico prenesemo v drugo aparaturo sistema, ki posrka emulzijo in jo črpa skozi tanke kapilare mimo vira svetlobe in detektorja. Kapilara, po kateri potujejo kapljice je tako tanka, da mimo senzorja zmeraj potuje le ena kapljica. Aparatura na tak način presteje št. kapljic, kjer je potekla reakcija in kjer ni. QX100™ Droplet Digital™ PCR System proizvajalca BIO-RAD omogoča izdelavo do 20000 kapljic iz enega vzorca, na eno PCR ploščico pa lahko nanesemo 96 tako pripravljenih emulzij, torej lahko v enem eksperimentu analiziramo do 1920000 reakcij. Volumen kapljic, upoštevan tudi v izračunih, je bil 9,1 nl, Corbisier in sod. (2015) pa so ugotovili, da je realen volumen manjši in sicer 8,39 nl, zato je BIO-RAD v novejšo verzijo programske opreme vnesel velikost kapljice 8,5 nl. Instrument omogoča hkratno zaznavanje dveh reporterjev (BIO-RAD, 2015). Aparaturo QX100™ Droplet Digital™ PCR System smo uporabili v naših poskusih.



Slika 2: Potez priprave in analize ddPCR: a) V kartušo dodamo reakcijsko mešanico (jamice srednje vrste) in olje (jamice gornje vrste). b) Generator kapljic z uporabo vakuma tvori kapljice reakcijske mešanice v olju. c) Emulzijo prenesemo v ploščico za PCR. d) Izvedemo PCR. e) Z čitalcem kapljic izmerimo fluorescenco kapljic v dveh delih svetlobnega spektra. f) Določimo mejno jakost fluorescence za določitev pozitivnih in negativnih kapljic (Hindson in sod., 2011: 2).

Figure 2: ddPCR worflow: a) Samples and droplet generation oil are loaded into an eight-channel droplet generator cartridge. b) Droplets of reaction mixture in oil are formed in Droplet Generator by applying vacuum to the wells. c) Emulsion is transferred to PCR plate. d) Conventional PCR is performed. e) Droplet reader analyses droplets with two-color detector. f) Fluorescence amplitude thresholds are applied to assign droplets as positive or negative (Hindson et al., 2011: 2).

Sistem RainDrop® Digital PCR System proizvajalca Raindance Technologies omogoča izdelavo še manjših kapljic in sicer iz 50 ul reakcijske mešanice izdela do 10 milijonov reakcij volumna 4 pl. S pomočjo sistema označevanja sond je mogoče hkrati zaznavati 10 različnih tarč. Sistem omogoča pripravo 8 reakcij, potencialno skupno število kapljic v eni analizi je tako lahko do 80000000 (Raindance, 2015).

2.4.2.3 Uporaba dPCR za določanje GSO

Open Array® Real-time PCR System je bil podrobno predstavljen leta 2006 (Morrison in sod., 2006) za analizo diferencialne ekspresije genov za kinazo in diferencialno ekspresijo genov sintezne poti NK-β kot primerljiv po specifičnosti, točnosti, dinamičnem območju in ponovljivosti s qPCR, Pérez Urquiza in Acatzi Silva (2014) pa sta ga skupaj s sistemom BioMark™ uporabila za določanje razmerja kopij transgen – referenčni gen v GS koruzi, soji in pšenici in ugotovila primerljivost obeh sistemov. Sistem BioMark™ je bil predstavljen leta 2006, ko so Ottesen in sod. (2006) s sistemom BioMark™ analizirali bakterije iz okolja, Bhat in sod. (2009) pa so z meritvami plazmida ERM-AD413 preučili dejavnike, ki vplivajo na točnost in natančnost meritev z dPCR. Pomembna je naključna porazdelitev tarčnih molekul ter konsistentno pomnoževanje enega tarčnega zaporedja na reakcijo. Ugotovili so, da pri manjšem deležu reakcij, ki vsebujejo eno tarčno zaporedje, pomnoževanje ni optimalno, saj so bile Cq vrednosti višje kot pri večini, kar je verjetno posledica nepodvojitve tarčnega zaporedja v prvih ciklih PCR. Neupoštevanje teh rezultatov lahko predstavlja težavo pri analizi vzorcev, ker bi imelo za posledico nepravilen rezultat. Pokazali so, da razrez DNA z restriktičnim encimom izboljša učinkovitost reakcije PCR in zmanjša napako ocene št. kopij. Izpostavili so pomembnost poznavanja volumna reakcij, še posebej kadar analize ne izvajamo v dvo tarčnem načinu, ko to ni tako pomembno. Točnost meritev je boljša, če je število tarčnih molekul v optimalnem delu dinamičnega območja in s povečanjem št. analiziranih reakcij na vzorec.

Corbisier in sod. (2010) so kot prvi z instrumentom BioMark™ določali GSO z dPCR. Merili so razmerje MON810:HmgA na seriji referenčnih materialov, certificiranih za masno razmerje med GSO in neGSO materialom (m/m). Za RM, certificiran tudi za razmerje števila kopij (cp/cp) (ERM-BF413d, $0,57\% \pm 0,17\%$), so izmerili delež MON810 0,39 %, s standardnim odklonom 0,06 %. Princip meritve ima visoko meroslovno vrednost in ker dPCR ne potrebuje kalibratorja, so ga videli kot uporabnega za certificiranje RM, medtem ko ga niso prepoznali kot uporabnega za rutinske analize zaradi visokih stroškov. Burns in sod. (2010) so potrdili pomembnost uporabe ustreznih redčin DNA vzorca. Število tarčnih zaporedij mora biti v optimalnem območju (200-700 na panel), saj suboptimalno število povzroči podcenjevanje ocene št. kopij, nadoptimalno pa precenjevanje. Prav tako so potrdili primernost metode za določanje št. kopij v RM ter uporabnost za določanje mej detekcije metod qPCR.

Chabert in sod. (2006) so za demonstracijo platforme za izdelavo kapljic zaradi zahtevnosti PCR v smislu navzkrižne kontaminacije (eksponencialno pomnoževanje) ter stabilnosti kapljic (ciklično spremicanje temperature) izvedli kapljični PCR. Niso ga uporabili v smislu digitalnega PCR. Leta 2011 so Hindson in sod. predstavili sistem za ddPCR QX100™ Droplet Digital™ PCR System proizvajalca BIO-RADn a primerih meritve spremembe št. kopij zarodne linije (CNV, Copy Number Variation), detekcije mutirane DNA v ozadju 100000 kopij nemutirane DNA ter kvantifikacije fetalne in materine DNA v plazmi. To je zelo pomembno, saj so to področja pogoste uporabe dPCR. Prikazali so

natančnost in uporabnost sistema. Pinheiro in sod. (2012) so QX100™ Droplet Digital™ PCR System ocenjevali za določanje spremembe št. kopij ter ga primerjali s cdPCR sistemom BioMark™ z eno tarčnim in dvo tarčnim načinom. Prikazali so dinamično območje sistema QX100™ med 37 in 131000 kopijami tarčnega zaporedja na reakcijo, sistem QX100™ pa se je izkazal za primerljivega s sistemom BioMark™ v točnosti ter natančnejši kot sistem BioMark™. Razširjena relativna merilna negotovost za dvo tarčen način je bila za sistem QX100™ 2,8 %, za sistem BioMark™ pa 6,1 %. Uporaba sistema QX100™ je cenejša, obenem pa omogoča hkratno analizo precej večjega št. vzorcev (Baker, 2012). V objavi Morisset in sod. (2013), ki vsebuje tudi rezultate te magistrske naloge, smo s QX100™ sistemom analizirali referenčne materiale za MON810 ter ugotovili, da je metoda primerna za določanje GSO, da je bolj odporna na inhibitorje PCR reakcije kot qPCR metoda in da je prenos qPCR metode v ddPCR enostaven. Omogoča tudi dvo tarčno analizo, ki s qPCR metodo ni delovala. Metoda je cenovno primerljiva s qPCR v primeru analize več vzorcev hkrati. Demeke in sod. (2014) so s sistemom RainDrop® uspešno kvantificirali GS oljno ogrščico OXY-235 in GS sojo DP305423 do 0,01 % tako v eno tarčnem kot dvo tarčnem načinu. Ugotovili so, da so bili rezultati boljši, če so DNA vzorca poleg segrevanja tudi fragmentirali. Cenovno je metoda dražja od qPCR.

Köppel in Bucher (2015) sta za prenos 33 metod qPCR na ddPCR z QX200™ sistemom prilagodila koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond. Rezultati dvo tarčnih načinov (ki so določali referenčni gen in GSO) so bili primerljivi z eno tarčnimi načini in s qPCR rezultati. Köppel in sod. (2015) so primerjali pet tarčno analizo qPCR za 4 GS linije soje in referenčni gen z dvo tarčnimi načini ddPCR s sistemom QX200™ za vsako posamezno GS sojo in referenčni gen. Rezultati so bili primerljivi, ddPCR je imela manjšo merilno negotovost pri 1% GSO, zaradi višjih stroškov pa za presejalno analizo priporočajo qPCR metodo, za kvantifikacijo pa ddPCR.

Corbisier in sod. (2015) so z BioMark™ sistemom certificiran referenčni material analizirali s sistemom QX100™ in ugotovili, da so kapljice manjše (0,834 nl) kot predvideva proizvajalec (0,91 nl). Rezultati so bili nižji od predvidenih, ker je velikost reakcije dejavnik v izračunu koncentracije tarčnega zaporedja. Velikost kapljic ne vpliva na rezultat, kadar količino dveh tarč analiziramo v dvo tarčnem načinu oz. relativno eno na drugo, vpliva pa na določanje absolutne količine tarčnega zaporedja. Na osnovi teh rezultatov je proizvajalec BIO-RAD v verziji 1.6.6.0320 programa QuantaSoft za zajem in obdelavo podatkov spremenil velikost kapljic na 0,85 nl. Tudi Dong in sod. (2015) so primerjali instrumente za dPCR. Podobno kot Corbisier in sod. (2015) so izmerili manjši volumen kapljic za sistem QX100™ (8,37 nl), prav tako so izmerili manjši volumen kot ga za sistem RainDrop® navaja proizvajalec. Namesto 5 pl so izmerili 4,39 pl. Tudi za Quant Studio™ 12K in BioMark™ so izmerili volumen reakcije. Z uporabo izmerjenih vrednosti velikosti reakcije so dobili primerljive rezultate meritev certificiranega plazmidnega referenčnega materiala. Meritve so bile primerljive za lineariziran plazmidni referenčni

material, medtem ko so bile meritve nerazrezanega plazmida neustrezne za oba sistema za ddPCR. Ugotovili so, da konformacija plazmida vpliva na ddPCR.

Postopki za qPCR metode niso zmeraj direktno prenosljivi v ddPCR format, kot smo predstavili Morisset in sod. (2013), ker se lahko pojavlja veliko kapljic z neoptimalnim pomnoževanjem, kar otežuje ločevanje med pozitivnimi in negativnimi kapljicami (Jones in sod., 2014). Slednjo so z namenom boljše analize v primeru nizkega števila tarčnih zaporedij razvili programsko opremo DefineTheRain za analizo rezultatov ddPCR. Dreo in sod. (2014) so primerjali različne pristope analize rezultatov ddPCR ob prenosu dveh metod qPCR v ddPCR ter ugotovili, da je ena delovala primerljivo v qPCR in ddPCR, lastnosti druge pa so se ob prenosu v ddPCR izboljšale.

Zaradi merjenja fluorescence ob koncu reakcije je dPCR bolj robustna. Vsi instrumenti omogočajo zaznavanje vsaj dveh različnih barvil in na vseh platformah so dvo tarčne metode delovale primerljivo z eno tarčnimi.

2.5 VEČ TARČNE ANALIZE

Več tarčne analize, ki omogočajo analizo vzorcev na več tarč, so v uporabi v vseh izvedbah PCR: PCR, qPCR in dPCR. Omogočajo cenejšo in hitrejšo izvedbo analiz (Wittwer in sod., 2001). Več tarčne metode PCR so zapletenejše za razvoj in optimizacijo, ker pogojev za posamezno metodo ne moremo optimizirati ločeno. V reakciji prihaja do tekmovanja za kemikalije, navzkrižno reagiranje začetnih oligonukleotidov pa lahko povzroči tudi lažno pozitivne rezultate ali pa zmanjša mejo detekcije. Za določanje GSO je bilo razvitetih veliko več tarčnih metod na osnovi PCR (Pla in sod., 2013), z naraščanjem števila GSO pa se potrebe po več tarčnih analizah še povečujejo. Razvita je bila, npr., pet tarčna metoda, ki omogoča določanje prisotnosti in identifikacijo 5 presejalnih elementov (Huber in sod., 2013) z uporabo 5 različnih reporterskih barvil, s katerimi označimo sonde. Razvita je bila tudi 6 tarčna metoda, ki zaznava dva referenčna gena, tri presejalne elemente, eno tarčno zaporedje je pa notranja kontrola PCR reakcije (Bahrdt in sod., 2010). Köppel in sod. (2015) so razvili 5 tarčno analizo qPCR za kvantitativno določanje 4 linij GS soj in referenčnega gena in jo primerjali z dvo tarčnim načinom sistema QX200TM za vsako GS linijo posebej ter ugotovili uporabnost obeh metod za rutinske analize.

Kljub zaznavanju dveh barvil je metode mogoče prilagoditi za zaznavanje več kot dveh tarč. Dobnik in sod. (2015) so tako razvili več tarčno metodo ddPCR, s katero hkrati zaznavajo deset tarčnih zaporedij hkrati. Referenčni gen koruze HmgA je označen z enim barvilom (HEX), sonde za gensko spremenjene linije pa so vse označene z enakim barvilom (FAM). Metoda ne omogoča identifikacije posamezne GSO linije, ampak je rezultat količina vseh analiziranih GSO linij skupaj. Zhong in sod. (2011) so s sistemom RainDrop[®] razvili pet tarčno metodo ddPCR, kjer so uporabili z FAM in VIC označene sonde. Z različnimi koncentracijami sonde za posamezno sondno se namreč fluorescensa pozitivnih kapljic razlikuje glede na to katera tarča je prisotna v kapljici. Ker je zaradi več

milionov kapljic v vsaki kapljici res le ena tarča, so tako lahko določali in razlikovali 5 tarčnih zaporedij hkrati. Pretto in sod. (2015) so z označevanjem sond z FAM, HEX in VIC barvili razvili tri tarčno analizo za ddPCR sistem QX200™. Na osnovi fluorescence posameznih kapljic so lahko določili ali kapljica vsebuje eno, dve ali tri različna tarčna zaporedja. Sedlak in sod. (2014) so razvili tri tarčno metodo kjer so sondi za eno tarčno zaporedje označili z barvilkom FAM, sonda za drugo tarčno zaporedje z barvilkom HEX, sonda za tretje tarčno zaporedje je bila pa pripravljena tako, da je bila polovica označena s FAM, polovica pa s HEX. Zaradi različne fluorescence v dveh dimenzijah so tako lahko razlikovali med tremi tarčnimi zaporedji.

Dvo tarčna metoda je mogoča tudi z uporabo interkalirajočega barvila, saj je jakost fluorescence kapljic odvisna od dolžine PCR produkta. Tako so Mcdermott in sod. (2013) ter Miotke in sod. (2014) lahko razlikovali med kapljicami pozitivnimi za eno, drugo ali obe tarčni zaporedji in kvantificirali dve tarčni zaporedji v eni reakciji brez uporabe hibridizirajočih sond.

2.6 MERSKA ENOTA

Za določanje GSO sta trenutno v uporabi dve merski enoti in sicer razmerje mas med GSO materialom in ne GSO materialom (angl. mass/mass oz. m/m) ter razmerje med kopijami DNA, ki so GS in ki so značilna za posamezno vrsto (angl. copy/copy oz. cp/cp) (Trapmann in sod., 2010; Holst-Jensen in sod., 2006). Enoti nista primerljivi, ampak je razmerje med njima odvisno od zigotnosti semen ter od donorja genske spremembe. Priporočilo Commission Recommendation (EC) 787 (2004) priporoča enoto cp/cp, regulativa Commission Regulation 619 (2011) določa, da mora biti poročanje rezultatov v enotah m/m. Ostali dokumenti, kot npr Commission Regulation 1829 (2003), ki določa mejo označevanja, pri tem ne določa merske enote. Navodilo laboratorijem Technical ... (2011) priporoča laboratorijem, naj rezultate, ki so v enotah cp/cp, pretvorijo v enote m/m z uporabo faktorja 0,5 za GSO, ki se pridelujejo kot heterozigoti, npr. koruza, oz faktorja 1 za GSO, ki se pridelujejo kot homozigoti, npr. soja. Delež DNA, ki ga heterozigotno seme prejme od staršev, je lahko med 0,36 – 0,6, odvisno od tega ali je donor genske spremembe moška ali ženska rastlina (Trifa in Zhang, 2004). Zato je faktor 0,5 približek, ki ga je potrebno upoštevati tudi pri izračunu merilne negotovosti (Trapmann, 2006).

RM, ki so na voljo na tržišču v obliki moke ali genomske DNA, so certificirani v enoti m/m, nekateri med njimi so certificirani tudi v enoti cp/cp. Caprioara-Buda in sod. (2012) ugotavlja, da je enota cp/cp meroslovno bolj primerna, saj se razmerje kopij v vzorcu ne spreminja. Ker imajo različne serije RM, certificirane v m/m, različno razmerje cp/cp, čeprav je masni delež enak, to rezultira v različnem rezultatu za isti vzorec, analiziran z uporabo dveh RM iz različnih serij. Tudi zato so plazmidni RM mnogo bolj primerni kot kalibranti za določanje GSO, saj omogočajo pridobitev rezultatov v enotah cp/cp.

2.7 REFERENČNI MATERIALI

Priloga II Regulative Commission Regulation 641 (2004) določa RM kot material ali snov, katere ena ali več vrednosti njenih lastnosti je dovolj homogena in dobro uveljavljena, da se uporablja za umerjanje laboratorijske naprave, oceno meritne metode ali za določanje vrednosti snovem. CRM je RM s priloženim certifikatom, katere ena ali več vrednosti njenih lastnosti je potrjena s postopkom, ki omogoča sledljivost do točne realizacije enote, v kateri so izražene vrednosti njenih lastnosti, in za katero vsako potrjeno vrednost spremišča meritna negotovost.

Priloga II Regulative Commission Regulation 641 (2004) določa kriterije, ki jih mora izpolnjevati RM, kot npr. embalaža RM, preskušanje obstojnosti, preskušanje homogenosti, opis značilnosti serije, končno skladiščenje ter izdaja certifikata.

RM so laboratorijem potrebni za verifikacijo metod ter kot kalibranti za določanje deleža GSO.

RM za določanje GSO v obliki moke proizvajata Inštitut za referenčne materiale in meritve, Geel, Belgija (IRMM) in Ameriško združenje kemikov za olja, Urbana, ZDA (AOCS). RM za nekatere GSO so na voljo le kot 100 % RM, za nekatere pa so na voljo tudi RM z nižjim deležem GSO. Zaradi uredbe Commission Regulation 619 (2011) IRMM proizvaja tudi RM z deležem GSO 0,1 %, ki jih laboratoriji potrebujejo za verifikacijo metod. RM v obliki moke so uporabni tudi za imunološke metode določanja GSO. Za uporabo teh referenčnih materialov z molekularnimi metodami je potrebno najprej osamiti DNA, za kar se uporablajo iste metode kot za osamitev DNA iz vzorcev (Trapmann in sod., 2002). Pomembno je, da se tak RM lahko uporablja za določanje GSO z različnimi metodami PCR.

Referenčni materiali v obliki plazmidov so na prvi pogled boljša izbira, tudi iz meroсловnega vidika (Trapmann in sod., 2010), je pa omejitev da so uporabni le za določanje DNA zaporedij, ki so vneseni v plazmid (Burns in sod., 2006; Lin in sod., 2011; Taverniers in sod., 2004). Lahko vsebujejo več različnih DNA zaporedij, razmerje kopij je 1:1, merska enota je razmerje kopij (cp/cp). Plazmidna DNA se včasih v qPCR reakciji obnaša drugače kot pa genomska DNA (Allnutt in sod., 2005; Charels in sod., 2007). Plazmidni DNA se lahko doda še genomska DNA nesorodnega organizma, ki potem ustvarja razmere v reakciji kot bi analizirali genomske DNA. IRMM je izdelal nekaj plazmidnih RM, npr. za GS koruze MON810, NK603 in DP98140 ter za GS sojo DP305423. Različne kalibrante v obliki plazmidne DNA so proizvedli številni laboratoriji, nekateri vsebujejo tudi do 8 različnih tarčnih zaporedij za določanje deleža 7 GSO (Kuribara in sod., 2002; Shindo in sod., 2002).

RM v obliki genomske DNA, pri katerih proizvajalec osami DNA, so za laboratorije podobnih značilnosti kot RM v obliki moke.

2.8 VALIDACIJA METOD

Validacija metode je potrditev s preiskovanjem in zagotovitev objektivnih dokazov, da so izpolnjene posebne zahteve za predvideno uporabo (ISO/IEC 17025, 2005).

Validirati metodo pomeni preveriti ali so izpoljeni analitični cilji metode, da torej omogoča pridobitev ustreznih rezultatov s sprejemljivo meritno negotovostjo (ISO/IEC 17025, 2005). Izraz validacija se običajno nanaša na postopek preverjanja metode, ko je metoda preverjena tudi v medlaboratorijski primerjavi. Verifikacija metod je potrditev, z zagotavljanjem objektivnih dokazov, da so izpolnjene določene zahteve (ISO 9000, 2015). Verifikacija, da lahko laboratorij ustrezeno izvaja standardno metodo, zahteva, da laboratorij zagotovi objektiven dokaz, da so bili doseženi parametri zmogljivosti, določeni v preskusni metodi na vrsti vzorcev, za katere se metoda izvaja. Najbolj pogoste kritične zahteve so resničnost (običajno izražena v pristranskosti) in natančnost (splošno sprejeta kot ponovljivosti in obnovljivost), ki se odražajo v meritni negotovosti.

Na področju GSO oz. področju določanja na osnovi DNA se uporablja t.i. modularni pristop (Holst-Jensen in Berdal, 2004), po katerem se za preverjanje modula PCR preverja le tega, seveda ob predpostavki, da je osamljena DNA ustrezena.

Laboratoriji razvijajo in uporabljajo tudi druge metode, kot so npr. presejalne metode ali več tarčne metode, ki morajo prav tako zadostiti podobnim kriterijem. Pogosto za razvito metodo ni bila opravljena medlaboratorijska validacija in mora laboratorij sam izvesti verifikacijo metode ob uvedbi metode v laboratoriju (Broeders in sod., 2014; Hübner in sod., 2001; Žel in sod., 2008).

ES določa katerim pogojem mora ustrezati metoda za določanje GSO, ki jo po regulativi Commission regulation 1829 (2003) in v skladu s pripadajočim Anexom 1 regulative Commission Regulation 641 (2004) prijavitelj GSO poda v vlogi za odobritev, da EUR-L-GMFF začne validacijo metode ter katerim pogojem mora metoda zadostiti tekom validacije (Definition ..., 2015). EUR-L-GMFF preveri ustreznost metode iz podatkov v vlogi, nato pa organizira medlaboratorijsko preverjanje metode.

EUR-L-GMFF za primernost metode iz priložene dokumentacije o preizkušanju metode s strani prijavitelja GSO skupaj z rezultati za vse module presoja:

- **uporabnost:** prijavitelj mora opisati analit, tip vzorcev in koncentracijo analita, ki ga lahko merimo z predlagano metodo. Metoda mora biti uporabna za analizo vzorcev hrane, krme, kontrolnih vzorcev in referenčnih materialov.
- **praktičnost:** presoja se enostavnost uporabe metode, zahtevnost in izvedljivost uvedbe metode, strošek uporabe metode. Metoda mora biti podobna ostalim metodam za podoben namen, npr. predlagana metoda naj ne uporablja novega tipa instrumentov ali zelo drage opreme, temperaturni program PCR za GS in referenčni gen mora biti enak,

volumen reakcije ne sme biti večji od 25 µl in pa po porabi časa, kemikalij in drugih stroških predlagana metoda ne sme odstopati od drugih metod za podoben namen.

Za posamezne module nato preverja:

- Modul DNA ekstrakcije in čiščenja DNA:
 - **konzentracija DNA** – koncentracija DNA mora biti zadostna za izvedbo analize, torej mora biti vsaj tolikšna, kot jo metoda zahteva v modulu PCR.
 - **količina osamljene DNA** - skupna količina osamljene DNA mora zadostovati za analizo GSO.
 - **razgrajenost DNA** – presoja se stopnja razgrajenosti genomske DNA v manjše kose. Večina kosov DNA mora biti daljša od dolžine tarčnega zaporedja metode.
 - **čistost osamljene DNA** – osamljena DNA ne sme vsebovati snovi, ki motijo pomnoževanje DNA s PCR. Čistost se preverja s testom inhibicije qPCR reakcije. Razlika med ekstrapolirano Cq vrednostjo prve redčine in izmerjeno Cq vrednostjo mora biti manjša od 0,5, naklon krivulje inhibicije pa mora biti med -3,6 in -3,1. Prva analizirana redčina mora vsebovati vsaj tolikšno količino DNA, kot jo metoda predvideva v modulu PCR.
- Modul analize DNA s PCR
 - **specifičnost** – metoda mora zaznavati le analit, za katerega je namenjena. V primeru metod, ki jih podajo prijavitelji GSO, mora metoda zaznavati le GSO iz prijave.
 - **dinamično območje metode** – razpon koncentracije merjenca (analita), v katerem metoda deluje linearно s sprejemljivo resničnostjo in natančnostjo. Dinamično območje mora obsegati vsaj 1/10 in 5x vrednost meje označevanja, torej mora biti vsaj med 0,09 % in 4,5 % m/m GSO. Dinamično območje metode, izraženo v kopijah tarčnega zaporedja na reakcijo, mora biti med 50 in vsaj 2520 kopijami za GSO tarčno zaporedje in med 50 in vsaj 56000 kopijami za referenčni gen.
 - **resničnost meritev** – Rezultati analize vzorcev z znano koncentracijo morajo biti ustrezni. Meja sprejemljivosti je 25 % razlike čez celotno dinamično območje metode.
 - **učinkovitost pomnoževanja PCR** – učinkovitost pomnoževanja naj bo blizu 100 % v vsakem ciklu. Ob 100 % učinkovitosti je naklon umeritvene krivulje -3,32. Metoda je ustrezna, če je povprečen naklon med -3,6 in -3,1.
 - **R² koeficient** – korelacijski koeficient umeritvene krivulje, izračunan z analizo linearne regresije. Povprečna vrednost R² mora biti $\geq 0,98$.
 - **ponovljivost** (Precision – Relative Repeatability Standard Deviation (RSD_r)) – relativna standardna deviacija rezultatov analiz, opravljenih v pogojih ponovljivosti (enaka metoda, isti vzorec, isti operater, ista oprema, opravljeno v

kratkem časovnem intervalu). Meja sprejemljivosti je $\leq 25\%$ čez celotno dinamično območje metode.

- **meja kvantifikacije (LOQ)** – najnižja koncentracija analita, ki ga lahko kvantificiramo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. Meja kvantifikacije mora biti vsaj 1/10 meje označevanja, torej $\leq 0,09\% \text{ m/m}$ oz. ≤ 50 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo. RSD_R vzorca z vsebnostjo 0,09 % m/m oz. 50 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo mora biti $\leq 25\%$.
- **meja detekcije (LOD)** – najnižja koncentracija analita, ki ga lahko zanesljivo zaznamo in ne nujno tudi kvantificiramo. Meja detekcije mora biti vsaj 1/20 meje označevanja, torej $< 0,045\% \text{ m/m}$ oz. < 25 kopij tarčnega zaporedja. Delež lažno negativnih rezultatov vzorca s to vrednostjo mora biti $\leq 5\%$.
- **asimetrična meja detekcija za več tarčne metode (LODasym)** je izražena kot razmerje med št. kopij, ki jih metoda še zazna in številom ostalih tarč v reakciji, z manj kot 5 % lažno negativnimi rezultati. Določimo jo z analizo določenega tarčnega zaporedja s št. kopij na reakcijo blizu LOD, ko je v reakciji prisotna naraščajoča količina drugih tarčnih zaporedij.
- **robustnost metode** – metoda mora delovati tudi pri manjših spremembah pogojev analize, opisanih v dokumentaciji. Te spremembe za qPCR metode so uporaba različnih instrumentov, uporaba različnih končnih koncentracij pufrov s polimerazo DNA in nukleotidi, uporaba različnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sonde, uporaba različnih temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov. Razlika ne sme biti večja od 30 %.

Predlagano metodo EURL-GMFF validira v sodelovanju z laboratoriji Evropske mreže laboratorijs za določanje GSO (European Network of GMO Laboratories, ENGL) ter preveri:

- **obnovljivost** (Precision - Relative Reproducibility Standard Deviation (RSD_R))
- Relativna standardna deviacija rezultatov analiz, opravljenih v pogojih obnovljivosti (enaka metoda, isti vzorec, različni laboratorij, različna oprema, različni operaterji). Meja sprejemljivosti je $< 35\%$ čez celotno dinamično območje metode. Za koncentracije GSO manjše od 0,2 % m/m ali manj kot 100 kopij tarčnega zaporedja je meja sprejemljivosti $< 50\%$.
- **resničnost meritev** – rezultati analize vzorcev z znano koncentracijo morajo biti ustrezni. Meja sprejemljivosti je 25 % razlike čez celotno dinamično območje metode.
- **stopnja lažno pozitivno rezultatov**, kadar v vzorcu analit ni prisoten. Meja sprejemljivosti je $< 5\%$.
- **stopnja lažno negativnih rezultatov**, kadar je v vzorcu prisoten analit nad LOD. Meja sprejemljivosti je $< 5\%$.
- **verjetnost zaznavanja** (Probability of detection (POD)) je verjetnost pozitivnega rezultata za kvalitativne metode za določen tip vzorca z določeno koncentracijo analita. Prijavitelj mora določiti POD.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RAZVOJ DVO TARČNE METODE ddPCR ZA DOLOČANJE GS KORUZE MON810

Za razvoj dvo tarčne metode ddPCR smo uporabili metodo, ki je bila validirana za uporabo s qPCR, zato smo jo najprej preverili s qPCR, nato pa uporabili za ddPCR v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu. Preverili smo nujnost uporabe restrikcije DNA vzorcev, nato pa dvo tarčno metodo ddPCR za določanje GS koruze MON810 validirali v laboratoriju po mednarodnih navodilih za metode določanja GSO, kot jih predpisuje ES (Definition ..., 2015).

3.1.1 Referenčni material, preizkušeni vzorci

Za razvoj metode ddPCR smo uporabili certificirane referenčne materiale proizvajalca IRMM za GS koruzo MON10, certificirane za razmerje mas (m/m). Nekateri so certificirani tudi za razmerje kopij MON810 - referenčni gen (HmgA) (cp/cp) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Uporabljeni referenčni materiali za razvoj metode ddPCR za določanje MON810.

Table 1: Reference materials used for the development of ddPCR method for detection of MON810

Oznaka RM	Tip materiala	Delež MON810 (m/m)	Delež MON810 (cp/cp)
ERM-BF413d	koruzna moka	1 % ± 0,3 %	0,57 % ± 0,17 %
ERM-BF413f	koruzna moka	5 % ± 0,2 %	2,85 % ^a
ERM-BF413ek	koruzna moka	1,98 % ± 0,15 %	0,77 % ± 0,08 %
ERM-BF413gk	koruzna moka	9,9 % ± 0,5 %	3,85 % ^b
ERM-AD413	plazmid	/	100 % (1:1)

a – Pričakovani delež MON810 v cp/cp, preračunan na osnovi podatkov za ERM-BF413d (referenčni material iz iste serije s certificirano vrednostjo cp/cp).

b – Pričakovani delež MON810 v cp/cp, preračunan na osnovi podatkov za ERM-BF413ek (referenčni material iz iste serije s certificirano vrednostjo cp/cp).

Metodo smo preverili na vzorcih, ki so bili tekom rutinskega določanja GSO analizirani v laboratoriju NIB z metodo qPCR ki so jo razvili Holck in sod. (2002), za metodo ddPCR pa smo uporabili metodo QT-EVE-ZM-020, ki jo je validiral EUR-L-GMFF (Mazzara in sod., 2009), zato smo vzorce ponovno analizirali s qPCR z metodo QT-EVE-ZM-020, da preverimo primerljivost rezultatov oz. metod (Preglednica 2). Vzorci so iz medlaboratorijskih primerjav in iz rutinskih analiz.

Preglednica 2: Vzorci iz analiz, uporabljeni za preizkus uporabnosti ddPCR
 Table 2: Samples from routine analysis used for demonstration of applicability

Vzorec	Izvor vzorca	Tip vzorca	Delež MON810 (m/m)	Delež MON810 (cp/cp)
G009/04	Medlaboratorijska primerjava	koruzna moka	0,30 % ^a	0,29 % ± 0,13 % ^c
G180/07	Medlaboratorijska primerjava	koruzna moka	< 0,1 % ^a	0,04 % ± 0,02 % ^c
G211/10	Medlaboratorijska primerjava	koruzna moka	0,81 % ± 0,07 % ^a	0,45 % ± 0,098 % ^a
G212/10	Medlaboratorijska primerjava	koruzna moka	3,83% ± 0,17 % ^a	2,10 % ± 0,35 % ^a
G147/08	Medlaboratorijska primerjava	pšenična moka s sledovi koruze MON810	52 % ± 16% ^b	29,6 % ± 8,9 % ^d
G231/11	Vzorec	koruzni kosmiči	4,6 % ± 1,4 % ^b	2,64 % ± 0,8 % ^d
G254/11	Vzorec	krma s koruzo	6,7 % ± 2,0 % ^b	3,82 % ± 1,1 % ^d
G031/12	Vzorec	mleko	Ni zaznano	Ni zaznano
G053/12	Vzorec	krma s koruzo	Ni zaznano	Ni zaznano

^a – Delež MON810 glede na poročilo medlaboratorijske primerjave.

^b – Delež MON810, določen s qPCR na osnovi referenčnega materiala, certificiranega v m/m.

^c – Delež MON810, določen s qPCR na osnovi drugega referenčnega materiala, certificiranega v cp/cp iz iste serije.

^d – Delež MON810, določen s qPCR na osnovi referenčnega materiala, certificiranega v cp/cp.

3.1.2 Osamitev DNA

DNA referenčnih materialov in vzorcev smo osamili s kompletom NucleoSpin® Food Kit. DNA vzorca G147/08 smo osamili tudi s postopkom CTAB.

3.1.2.1 Osamitev DNA s kompletom NucleoSpin® Food

DNA smo osamili s kompletom NucleoSpin® Food kit (Macherey-Nagel, 740945.50, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Priloženi liofilizirani Proteinazi K smo dodali 600 µl raztopine PB. Koncentracija Proteinaze K je bila 10 mg/ml. Koncentratu raztopine C5 smo dodali 80 µl 96 – 100 % etanola. Raztopino C2 smo dodali raztopini C3 in tako pripravili raztopino C4.

200 mg vzorca smo dodali 550 µl predogretega (65 °C) pufra CF in previdno premešali. V mešanico smo dodali 10 µl proteinaze K in spet premešali ter 30 minut inkubirali pri 65 °C. Po inkubaciji smo vzorec 10 minut centrifugirali pri 10000 g. 300 µl čistega (bistrega)

supernatanta smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko, dodali 300 µl pufra C4 in 300 µl etanola ter stresali 30 sekund. 650 µl dobljene mešanice smo nanesli na zbirno kolono, nameščeno v 2 ml zbiralni mikrocentrifugirki in centrifugirali 1 min pri 11000 g. Kolono smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, uporabljeno zbiralno mikrocentrifugirko pa zavrgli. Dodali smo 400 µl pufra CQW in centrifugirali 1 min pri 11000 g. Kolono smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, uporabljeno zbiralno mikrocentrifugirko pa zavrgli. Dodali smo 650 µl pufra C5 in 1 min centrifugirali pri 11000 g. Kolono smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, uporabljeno zbiralno mikrocentrifugirko pa zavrgli. Dodali smo še 250 µl pufra C5 in 2 min centrifugirali pri 11000 g. Kolono smo prestavili v 2 ml mikrocentrifugirko, ki smo ji porezali pokrov, in 1 min centrifugirali pri 11000 g. Po centrifugiranju smo kolono previdno prestavili v označeno prazno 1,5 ml mikrocentrifugirko, nato pa kolono pustili nekaj minut odprto, da je etanol izhlapel. Na membrano zbirne kolone smo nanesli 100 µl predogretega (70 °C) pufra CE, 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi ter eluirali DNK s centrifugiranjem 1 min pri 11000 g. Na kolonco smo še enkrat nanesli 100 µl predogretega (70 °C) pufra CE, tako da smo DNA skupno eluirali v 200 µl pufra CE.

3.1.2.2 Osamitev DNA z metodo CTAB

Za pripravo raztopin, uporabljenih za osamitev DNA po metodi CTAB (ISO 21571, 2005), smo uporabili:

- CTAB (heksadeciltrimetilamonijev bromid, angl.: hexadecyltrimethylammonium bromide); Sigma H6269
- TRIS HCl (trizma hidroklorid, angl.: trizma hydrochloride); Sigma T-5941
- NaCl; Merck 1.06404
- Na₂EDTA; Sigma, E-5134
- Etanol; Merck, 1.00983
- Kloroform; Merck, 1.02445
- Izopropanol; Sigma, I-9516
- NaOH; Merck, 1.06498
- Proteinaza K + Proteinase Buffer PB; Macherey Nagel, 740506
- RNAza A, 100 mg/ml; Sigma,

Pripravili smo raztopino CTAB, precipitacijsko raztopino CTAB, 1,2 % NaCl, 70 % etanol, raztopino proteinaze K, raztopino RNAAze A.

- Priprava raztopine CTAB
 - Odtehtali smo sestavine raztopin kakor je navedeno v Preglednici 3.
 - Dodali smo 100 / 350 / 700 ml deionizirane vode.
 - Umerili smo pH na vrednost 8 (z 1M NaOH); približno 40-50 ml za 500 ml raztopine.
 - Z deionizirano vodo smo dopolnili do končnega volumena (200 / 500 / 1000 ml) in avtoklavirali 10 min pri 121 °C.

Preglednica 3: Sestava raztopine CTAB
Table 3: Composition of CTAB solution

Sestavina	konzentracija	200 ml	500 ml	1000 ml
CTAB	20 g/l (2 %)	4 g	10 g	20 g
NaCl	1,4 M	16,4 g	41,0 g	82,0 g
Tris – HCl	0,1 M	3,15 g	7,88 g	15,75 g
Na ₂ EDTA	20 mM	1,5 g	3,75 g	7,5 g

- Priprava precipitacijske raztopine CTAB
 - Odtehtali smo sestavine raztopin kakor je navedeno v Preglednica 4.
 - Dodali smo 100 / 350 / 700 ml deionizirane vode.
 - Umerili smo pH na vrednost 8 (z 0,1 M NaOH); približno 40-50 ml za 500 ml raztopine.
 - Z deionizirano vodo smo dopolnili do končnega volumna (200 / 500 / 1000 ml) in avtoklavirali 10 min pri 121 °C.

Preglednica 4: Sestava precipitacijske raztopine CTAB
Table 4: Composition of CTAB precipitation solution

Sestavina	konzentracija	200 ml	500 ml	1000 ml
CTAB	20 g/l (2 %)	4 g	10 g	20 g
Na ₂ EDTA	20 mM	1,5 g	3,75 g	7,5 g

- Priprava 1,2 M raztopine NaCl

V 100 ml vode smo raztopili 7 g NaCl in avtoklavirali 10 min pri 121 °C.

- Priprava raztopine Proteinaze K

50 mg liofilizirane Proteinaze K smo dodali 2,5 ml raztopine PB. Koncentracija Proteinaze K je bila 20 mg/ml.

- Postopek osamitve DNA s CTAB

200 mg vzorca smo dodali 600 µl vode, 1000 µl pufra CTAB in 40 µl raztopine Proteinaze K (20 mg/ml) ter premešali. Nato smo vzorec 30 – 90 minut inkubirali pri 65 °C v termobloku, dodali 4 µl raztopine RNaze A (100 mg/ml) in 5 – 10 minut inkubirali pri 65 °C v termobloku. Nato smo ga 10 minut centrifugirali pri 13000 rpm (obrati / minuto),

supernatant nato preneseli v novo sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko s 500 µl kloroform in stresali 30 sekund ter centrifugirali 10 minut pri 13000 rpm. 800 µl zgornjega sloja smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko z 800 µl kloroform in stresali 30 sekund, centrifugirali 5 minut pri 13000 rpm in nato zgornji sloj prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko. Dodali smo 2 volumna precipitacijske raztopine CTAB, premešali s pipetiranjem in 60 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo vzorec 5 minut centrifugirali pri 13000 rpm, odstranili supernatant, precipitat pa raztopili v 350 µl NaCl (1,2 M). Dodali smo 350 µl kloroform in stresali 30 sekund, centrifugirali 10 minut pri 13000 rpm in nato zgornji sloj prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko. Dodali smo 0,6 volumna izopropanola in stresali ter 10 minut centrifugirali pri 13000 rpm. Supernatant smo odstranili, dodali 500 µl 70 % etanola in previdno stresali. Nato smo vzorec 10 minut centrifugirali pri 13000 rpm, odstranili supernatant in pustili mikrocentrifugirko odprt, da se je usedlina posušila. Posušeno DNA smo nato raztopili v 100 µl sterilne, deionizirane vode.

3.1.3 Restrikcija DNA

Proizvajalec instrumenta za izvedbo ddPCR BIO-RAD priporoča obdelavo genomske DNA z restrikcijskim encimom ali fragmentiranje genomske DNA na kak drug način. Za restrikcijo DNA smo uporabili restrikcijski encim Taq1 proizvajalca New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Nemčija, Part No: R0149S. Uporabili smo pripadajoči pufer NEB4, istega proizvajalca.

Pripravili smo reakcijsko mešanico:

- 15 µl voda (Sigma-Aldrich Chemie, kat. št.: W4502)
- 2 µl Taq1 (40 enot)
- 3 µl NEB4 10x pufer
- 10 µl DNA

Mešanico smo 2 uri (genomska DNA) oz. 1 uro (plazmidna DNA) inkubirali pri 65 °C, nato pa smo encim inaktivirali z 10 minutno inkubacijo pri 80 °C. Z restrikcijskim encimom smo razrezali DNA referenčnega materiala ERM-BF413f, ERM-BF413gk ter plazmida ERM AD413. DNA pred in po restrikciji smo analizirali s pomočjo gelske elektroforeze na agaroznem gelu.

Pripravili smo ustrezno količino 1 % agaroznega gela:

- 1 x modificiran TAE pufer (400 mM tris-acetat pH 8,0 in 0,1 mM EDTA)
- Agaroza (Sigma, A-6013)
- 1 µl etidijevega bromida (založna raztopina 10 mg/ml) na 20 ml agaroznega gela

Pripravljeno raztopino agaroze smo vlili v nosilec, v katerega smo prej vstavili glavniček s poljubnim številom zobcev. V ohlajen gel smo skupaj z nanašalnim pufrom (bromfenol modro, ksilen cianol FF, glicerol) nanesli po 6 µl vzorca ter 1 µl lestvice nukleinskih kislin

(GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas; MassRuler DNA Ladder Mix, Fermentas). Elektroforeza je potekala v elektroforetskem aparatu (BIO-RAD) pri napetosti 100 V, 35 do 45 min. Po poteku elektroforeze smo gel pregledali pod UV svetlobo in fotografirali s CCD kamero.

Razrezano in nerazrezano DNA smo analizirali s qPCR v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu ter z ddPCR v dvotarčnem načinu ter primerjali rezultate. Analizirali smo 2x in 6x redčino ERM-BF413ek, ERM-BF413f ter DNA plazmida AD-413.

3.1.4 qPCR

Analize qPCR smo izvajali na instrumentu ABI7900 Sequence Detection System proizvajalca Life Technologies, s termoblokom, ki omogoča uporabo ploščic za QPCR s 384 luknjicami.

Uporabljena metoda je validirana s strani EUR-LGMFF (Mazzara, M. 2009). Za pomnoževanje specifičnih zaporedij smo uporabili začetne oligonukleotide proizvajalca Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija, in so navedeni v Preglednici 5.

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za reakcijo qPCR in ddPCR z nukleotidnim zaporedjem in koncentracijo v reakciji

Table 5: Oligonucleotide primers for qPCR and ddPCR reaction with nucleotide sequence and concentration in reaction

Začetni oligonukleotid	Zaporedje (5' – 3')	Konc. v reakciji
HmgA F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	300 nM
HmgA R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCC T	300 nM
HmgA P	FAM-CAATCCACACAAACGACGCGTA-BHQ1	180 nM
MON810 F	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	300 nM
MON810 R	GCCACCTTCCTTTCCACTATCTT	300 nM
MON810 P	HEX-AACATCCTTGCCATTGCCAGC-BHQ1	180 nM

FAM: 6-carboxyfluorescein, BHQ1: black hole quencher 1, HEX: hexachloro-6-carboxyfluorescein.

Začetne oligonukleotide smo predhodno zmešali tako, da so bili 10x koncentrirani glede na končni volumen reakcije, ki je bil 20 µl.

Priprava reakcijske mešanice za qPCR:

- 10 µl TaqMan Universal Master Mix, Life Technologies, kataloška številka: 4304437
- 6 µl 10x koncentrirane mešanice začetnih oligonukleotidov

Mešanico smo razdelili v jamice ploščice za qPCR (ABI PRISM™ Optical 384-Well Clear Reaction Plates with Barcodes, Life Technologies, kat. št.: 4309849); nato pa v jamice dodali 4 ul vzorca. Ploščico smo zatesnili s prozorno plastično folijo (ABI PRISM Optical

Adhesive Covers, Life Technologies, kat. Št.: 4311971). Ploščico smo nato 2 minuti centrifugirali pri 1000 g, in jo prenesli v instrument za qPCR ter zagnali program, kot je naveden v Preglednici 6.

Preglednica 6: Temperaturni program qPCR
Table 6: qPCR cycling program

Dejavnost	Čas in temperatura
UNG aktivnost	2 min / 50 °C
Začetna denaturacija	10 min / 95 °C
Pomnoževanje (45 ponovitev)	15 s / 95 °C 60 s / 60 °C

Programska oprema za analizo qPCR je SDS, verzija 2.3. Nadaljnje analize smo izvedli v programu Microsoft Excel.

Vzorce smo analizirali v več redčinah, da smo preverili ustreznost pomnoževanja. Za določanje deleža MON810 smo analizirali redčine DNA referenčnega materiala, iz dobljenih Cq vrednosti in relativnih količin endogene reference in GSO izračunali umeritveno krivuljo, z uporabo katere smo nato izračunali (po načinu relativne kvantifikacije) količino HmgA oz. MON810 v vzorcu. Delež MON810 smo izračunali po enačbi:

$$\text{Delež MON810 (\%)} = \frac{\text{količina MON810}}{\text{količina HmgA}} \times 100 \quad \dots (2)$$

DNA referenčnih materialov smo pripravili v serijskih redčinah in nato pri računanju deleža MON810 ločeno uporabili vse štiri referenčne materiale za umeritveno krivuljo. Kot referenčno vrednost smo upoštevali razmerje m/m kot tudi cp/cp.

Kemikalije MON810 in HmgA, ki smo jih nameravali uporabiti za ddPCR, smo s qPCR preverili tudi v dvo tarčnem načinu. Z dvo tarčnim načinom smo analizirali 2x in 8x redčino DNA referenčnega materiala ERM-BF413f. Pripravili smo reakcije z različnimi koncentracijami začetnih oligonuklotidov (Preglednica 7) in primerjali Cq vrednosti dvo tarčnega načina s Cq vrednostmi eno tarčnega načina.

Preglednica 7: Končne koncentracije kemikalij za preverjanje dvo tarčnega načina qPCR
Table 7: Final concentrations of primers and probes in duplex qPCR

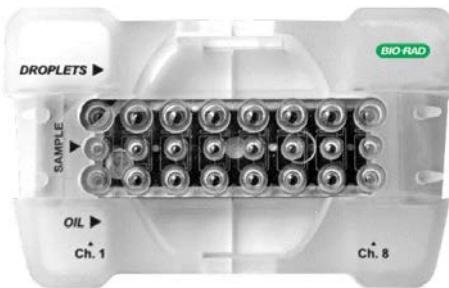
Začetni oligonukleotid	Končna koncentracija (nmol)					
	A	B	C	D	E	F
HmgA-F	300	150	150	150	300	300
HmgA-R	300	150	150	150	300	300
HmgA-P	180	90	90	90	180	180
MON810-F	300	300	450	600	450	600
MON810 -R	300	300	450	600	450	600
MON810 -P	180	180	270	360	270	360

3.1.5 Kapljična digitalna PCR (ddPCR)

Princip ddPCR je predstavljen na Sliki 2. ddPCR smo izvajali na instrumentu QX100™ Droplet Digital™ PCR System proizvajalca BIO-RAD, ki ima dva dela: generator kapljic ter čitalec kapljic. Izvedba kapljične digitalne PCR poteka v treh korakih:

3.1.5.1 Priprava kapljic

Za pripravo reakcijske mešanice smo pufru Supermix for Probes, BIO-RAD, kat. št.: 1863010, ki vsebuje DNA polimerazo in nukleotide, dodali začetne oligonukleotide (Preglednica 5) ter po 17,6 µl reakcijske mešanice razdelili v posamezne mikrocentrifugirke. V vsako smo dodali 4,4 µl vzorca. Nato smo jih pokrili s pokrovom ter dobro premešali in centrifugirali. 20 µl tako pripravljene reakcijske mešanice smo prenesli v jamico za vzorec na kartuši BIO-RAD, kat. št.: 1864008, ki smo jo predhodno vstavili v nosilec za kartuše (BIO-RAD, kat. št.: 1863051) (Slika 3). Ko smo zapolnili vse jamicice za vzorce, smo v jamicice za olje dodali še 70 µl olja za pripravo emulzije Droplet Generation Oil, BIO-RAD, kat. št.: 1863005. Na kartušo smo nato namestili tesnilo (BIO-RAD, kat. št.: 1863009) ter jo prenesli v generator kapljic, ki s pomočjo pritiska v sistemu mikrofluidnih kanalčkov združi olje in reakcijsko mešanico z vzorcem. 40 µl tako pripravljene emulzije smo z multikanalno pipeto prenesli v PCR ploščico s 96 jamicami, Eppendorf, Twin TEc, jo pokrili z aluminijasto folijo Piercable Foil Heat Seal (BIO-RAD, kat. št.: 1814040) ter zapekli na ploščico s toplotnim zatesnjevalcem proizvajalca Eppendorf, Nemčija, kat. št.: 5390.



Slika 3: Kartuša za pripravo emulzije reakcijske mešanice v olju v nosilcu. V jamice spodnje vrstice dodamo olje za tvorbo kapljic, v jamice srednje vrstice dodamo reakcijsko mešanico. Po tvorbi emulzije v generatorju kapljic emulzijo poberemo iz jamic gornje vrstice in jo prenesemo v ploščico za PCR.
Figure 3: Cartridge for preparation of reaction mixture emulsion in oil in cartridge holder. In wells of lower row droplet Generation oil is added and in middle row reaction mixture is added. After droplet generation in Droplet Generator, emulsion is collected from upper row and transferred to PCR plate.

3.1.5.2 PCR

Ploščico smo vstavili v PCR instrument GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA) in zagnali temperaturni program, kot je opisan v Preglednici 8.

Preglednica 8: Temperaturni program PCR

Table 8: PCR cycling program

Dejavnost	Čas in temperatura
UNG aktivnost	2 min / 50 °C
Začetna denaturacija	10 min / 95 °C
Pomnoževanje (45 ponovitev)	15 s / 95 °C 60 s / 60 °C
Stabilizacija kapljic	1 min 98 °C
∞	12 °C

3.1.5.3 Analiza kapljic

Ploščico smo prenesli v čitalec kapljic ter analizirali reakcije. Pri analiziranju kapljic instrument uporablja olje Droplet Reader Oil, BIO-RAD, kat. št.: 1863004. Instrument omogoča eno tarčen in dvo tarčen način zbiranja podatkov, ker zaznava obarvanost kapljic v dveh delih svetlobnega spektra. Prvi kanal zaznava fluorescenco valovnih dolžin okrog 520 nm, kjer je emisijski maksimum fluorescence barvila FAM (6-karboksofluorescein), drugi kanal pa svetlogovalovnih dolžin okrog 555 nm, kjer je emisijski maksimum fluorescence barvila HEX (heksakloro-6-karboksifluorescein). Programska oprema instrumenta (QuantaSoft, verzija 1.3.2.0) podaja rezultate v št. kopij na 1 µl reakcijske mešanice. Nadaljnje analize smo opravili s programom Microsoft Excell. Da dobimo število kopij v dodani DNA, pomnožimo dobljen rezultat z 20, ker je volumen reakcijske

mešanice 20 µl. Za določitev koncentracije kopij tarčnega zaporedja v vzorcu pa ga delimo z volumnom dodane DNA vzorca na 20 µl reakcije, v našem primeru 4 µl, in tako dobimo koncentracijo tarčnega zaporedja na 1 µl DNA.

3.1.6 Primerjava eno tarčnega in dvo tarčnega načina

ddPCR za določanje količine HmgA in MON810 smo izvedli v eno tarčnem načinu in v dvo tarčnem načinu HmgA-MON810. Končna koncentracija posameznih začetnih oligonukleotidov je bila v obeh načinih enaka. Z eno tarčnim načinom smo analizirali 7 reakcij za HmgA in 7 reakcij za MON810, z dvo tarčnim načinom pa 7 reakcij za HmgA x MON810. Analizirali smo DNA referenčnega materiala ERM-BF413ek (Preglednica 1). Iz povprečja smo izračunali delež MON810 za eno tarčni in dvo tarčni način in primerjali rezultate.

3.1.7 Specifičnost dvo tarčne metode ddPCR

Specifičnost začetnih oligonukleotidov je že bila preverjena s strani EURL-GMFF. Za določanje specifičnosti v dvo tarčnem načinu smo analizirali DNA iz vzorca krme, ki vsebuje koruzo (G053/12) in DNA iz vzorca mleka (G031/12), ki ne vsebujeta gensko spremenjenih linij oz. koruze, kar smo potrdili s predhodnimi analizami tekom rutinskega določanja GSO (Preglednica 2).

3.1.8 Dinamično območje metode, LOD in LOQ dvo tarčne metode ddPCR

Za določanje dinamičnega območja smo pripravili serijske redčine DNA referenčnega materiala ERM-BF413gk (Preglednica 1). Iz založne raztopine smo pripravili redčitveno vrsto s 3x, 4x, 16x, 81x, 162x, 243x, 729x 2187x, 4374x, 6561x, 19683x, 59049x, 177147x, 1594323x in 15943230x redčino, ki smo jih analizirali s qPCR v dveh paralelkah in z ddPCR v dvo tarčnem načinu v 5 paralelkah.

Meja detekcije dvo tarčne ddPCR metode je bila določena kot najmanjše število kopij tarčnega zaporedja v reakciji, za katero je bil rezultat za vseh 5 reakcij pozitiven. Kot pozitivne reakcije smo upoštevali reakcije z vsaj tremi pozitivnimi kapljicami.

Meja kvantifikacije metode je bila določena kot najmanjše število kopij tarčnega zaporedja v reakciji, za katero je bil koeficient variacije (CV) izmerjene količine tarčnega zaporedja pod 25 %.

3.1.9 Ponovljivost dvo tarčne metode ddPCR

Za preverjanje ponovljivosti dvo tarčnega načina smo uporabili DNA referenčnega materiala ERM-BF413ek. V vsaki kartuši smo DNA referenčnega materiala ERM-

BF413ek analizirali 7 x, ena reakcija je bila zmeraj NTC. Poskus smo ponovili 5x. Skupaj smo pripravili 35 reakcij v dvo tarčnem načinu. Nato smo izračunali povprečno št. tarčnih zaporedij za reakcije posamezne kartuše ter povprečen delež MON810 za vsako kartušo. Izračunali smo povprečje števila izmerjenih tarčnih zaporedij ter delež MON810 za vse reakcije skupaj.

3.1.10 Resničnost meritev dvo tarčne metode ddPCR

Za preverjanje resničnosti rezultatov metode ddPCR, smo izmerjene vrednosti meritev RM (Preglednica 1) z dvo tarčno metodo ddPCR primerjali s certificirano vrednostjo za ERM-BF413d in ERM-BF413gk. Vrednosti za ERM-BF413f in ERM-BF413gk v cp/cp smo izračunali glede razmerje cp/cp drugih dveh referenčnih materialov iz iste serije.

3.1.11 Uporabnost dvo tarčne metode ddPCR

Referenčne materiale in izbrane vzorce (Preglednica 1 in Preglednica 2) smo analizirali s qPCR in dvo tarčno metodo ddPCR. Za qPCR in ddPCR smo uporabili iste redčine DNA. Kot mersko enoto smo zaradi primerljivosti z ddPCR pri analizah qPCR upoštevali vrednosti referenčnega materiala v cp/cp. Vzorce smo analizirali v več redčinah, da smo preverili inibicijo PCR reakcije.

3.1.12 Analiza vzorcev z inhibicijo z dvo tarčno metodo ddPCR

Analizirali smo vzorce, ki so tekom rutinskih analiz potrebovali redčenje DNA, da je analiza ustrezala kriterijem za kvantitativno analizo in ni prišlo do inhibicije. Pripravili smo redčine DNA in jih analizirali s qPCR. Kriterij za določitev inhibicije qPCR je bila razlika v naklonu med dvema redčinama DNA vzorca v primerjavi z naklonom umeritvene krivulje več kot 0,3. Deleže MON810 smo izračunali po enačbi ... (2) iz vseh analiziranih redčin. Redčine DNA vzorcev smo analizirali tudi z ddPCR v dvo tarčnem načinu.

3.1.13 Praktičnost dvo tarčne metode ddPCR

Primerjali smo strošek analize vzorca s qPCR in ddPCR metodo. Upoštevali smo stroške kemikalij, potrošnega materiala ter čas potreben za izvedbo analize s qPCR in ddPCR. Za primerjavo smo upoštevali le čas, potreben za izvedbo analize qPCR oz. ddPCR od priprave redčin vzorcev naprej, ker so predhodni koraki (osamitev DNA, priprava redčin DNA vzorca) identični. Prav tako za primerjavo nismo upoštevali korakov nadaljnje analize po pridobitvi podatkov iz aparature, kot je npr. preverjanje ustreznosti kriterijem analize.

3.2 RAZVOJ NOVEGA PRISTOPA ZA HKRATNO DOLOČANJE 7 GS LINIJ KORUZE Z ddPCR

Za določanje 7 GS linij koruze smo uporabili nov pristop več tarčne analize z ddPCR, kjer smo s spremjanjem koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde v reakciji določali štiri tarčna zaporedja v eni reakciji oz osem tarčnih zaporedij v dveh reakcijah. Po določitvi ustreznih koncentracij smo metodo validirali v laboratoriju po navodilih za metode določanja GSO, kot jih predpisuje ES (Definition ..., 2015).

3.2.1 Referenčni material, preizkušeni vzorci

Za razvoj več tarčne metode ddPCR smo uporabili certificirane referenčne materiale proizvajalcev IRMM in AOCS (Preglednica 9).

Preglednica 9: Seznam uporabljenih referenčnih materialov

Table 9: List of reference materials used

Oznaka RM	GSO	Tip vzorca	Proizvajalec	Delež GSO (m/m)
ERM-BF416d	MON863	koruzna moka	IRMM	9,85 %
ERM-BF413gk	MON810	koruzna moka	IRMM	9,9 %
ERM-BF427d	DP98140	koruzna moka	IRMM	10 %
AOCS 0607-A2	MIR604	koruzna moka	AOCS	99,98 %
AOCS 0607-A2	MIR162	koruzna moka	AOCS	99,88 %
AOCS 0906-E	MON89034	koruzna moka	AOCS	99,425 %
AOCS 0407-B	GA21	koruzna moka	AOCS	99,98 %

Razvito metodo smo preverili na vzorcih, ki so bili tekom rutinskega določanja GSO analizirani v našem laboratoriju (Preglednica 10) z metodo qPCR. Vzorci so iz medlaboratorijskih primerjav in iz rutinskih analiz.

Preglednica 10: Vzorci iz analiz, uporabljeni za preizkus resničnosti in uporabnosti več tarčne metode ddPCR

Table 10: Samples from routine analysis to asses trueness and applicability of multi target ddPCR method

Vzorec	Izvor vzorca	Tip vzorca
G181/08	medlaboratorijska primerjava	koruzna moka
G188/09	medlaboratorijska primerjava	koruzna moka
G191/09	medlaboratorijska primerjava	koruzna moka
G187/14	vzorec	zrnje koruze
G189/14	vzorec	koruzna moka

DNA referenčnih materialov smo osamili z metodo CTAB, DNA vzorcev pa z metodo NucleoSpin® Food, kot je opisano v poglavju 3.1.2.

3.2.2 qPCR in ddPCR

Postopka qPCR in ddPCR sta potekala kot je opisano v poglavjih 3.1.4. in 3.1.5. Uporabili smo metode, predhodno validirane s strani EURL-GMFF (EURL-GMFF, 2015). Začetne oligonukleotide smo lahko uporabili neposredno. Reportersko barvilo za sonde smo prilagodili zaradi združevanja v reakcijah, dušilec je bil zmeraj BHQ1, razen za MON89034, kjer je uporabljen MGB (Preglednica 11). Za razvoj večtarčne metode ddPCR smo uporabili novejšo reakcijsko mešanico Supermix for probes No UNG (BIO-RAD, kat. št.: 1863024).

Ker lahko z uporabljenim pristopom določamo štiri tarčna zaporedja v eni reakciji, smo s prvo reakcijo (MEQ1 - Multiple Events Quantification 1) določali prisotnost in količino tarčnih zaporedij HmgA, MON863, DP98140 in MON810, z drugo reakcijo (MEQ2) pa smo določali prisotnost in količino tarčnih zaporedij MON89034, MIR604, MIR162, in GA21.

3.2.3 Priprava kemikalij za več tarčno analizo

DNA uporabljenih RM smo najprej analizirali z eno tarčnim načinom ddPCR za vsako tarčno zaporedje, da smo določili koncentracijo tarčnih zaporedij v RM. Na osnovi teh podatkov smo pripravili različne mešanice DNA, ki smo jih uporabili kot kontrole v postopku razvoja več tarčnega načina. S tem smo preverili tudi ustreznost kemikalij za ddPCR. RM smo nato analizirali z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond v eno tarčnem načinu. Podatke o absolutni fluorescenci negativnih in pozitivnih kapljic za vsako tarčno zaporedje smo uporabili za prilagoditev koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond na tak način, da je bilo v več tarčnem načinu mogoče razlikovati med negativnimi kapljicami, med kapljicami, pozitivnimi za tarčno zaporedje z nižjo fluorescenco, med kapljicami, pozitivnimi za tarčno zaporedje z višjo fluorescenco ter med kapljicami, pozitivnimi za obe tarčni zaporedji, ki jih zaznavamo v enem delu svetlobnega spektra.

Ustreznost delovanja več tarčne analize smo najprej preverili na dvo tarčnih sistemih, kjer smo tarčna zaporedja, ki ju določamo s sondami, označenima z enakim reporterskim barvilom, nato pa smo pripravili še mešanici za štiri tarčni analizi MEQ1 in MEQ2.

Preglednica 11: Začetni oligonukleotidi za več tarčni reakciji ddPCR (MEQ1 in MEQ2)
 Table 11: Oligonucleotide primers for multitarget ddPCR reaction (MEQ1 in MEQ2)

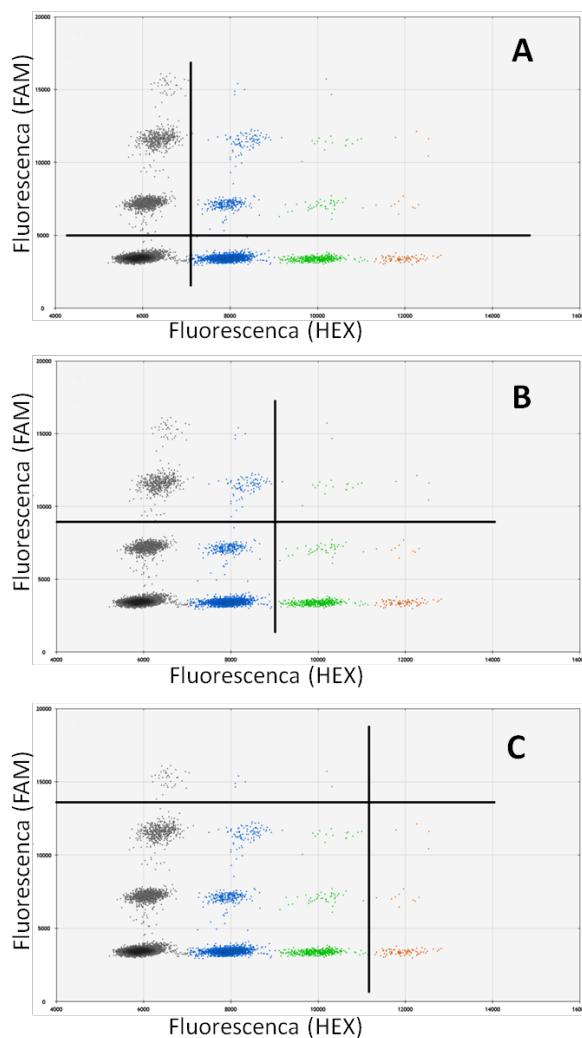
	Začetni oligonukleotid	Zaporedje (5' – 3')	Oznaka metode
MEQ1	HmgA F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	QT-TAX-
	HmgA R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCC T	ZM-002
	HmgA P	FAM-CAATCCACACAAACGCACCGCGTA-BHQ1	
	MON863 - F	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC	QT-EVE-
	MON863 - R	TGTTACGGCCTAAATGCTGAECT	ZM-009
	MON863 - P	FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA-BHQ1	
	DP98140 - F	GTGTGTATGTCCTTGCTTGGTCTT	QT-EVE-
	DP98140 - R	GATTGTCGTTCCCGCCTTC-	ZM-021
	DP98140 - P	HEX-CTCTATCGATCCCCCTTTGATAAGTTAACT-BHQ1	
	MON810 F	TCGAAG GACGAAGGACTCTAACGT	QT-EVE-
MEQ2	MON810 R	GCCACCTTCCTTTCCACTATCTT	ZM-020
	MON810 P	HEX-AACATCCTTGCCATTGCCAGC-BHQ1	
	MON89034 - F	TTCTCCATATTGACCATCATCTCATT	QT-EVE-
	MON89034 - R	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTAAA	ZM-018
	MON89034 - P	FAM-ATC CCC GGA AAT TAT GTT-MGBNFQ	
	MIR604 - F	GCGCACGCAATTCAACAG	QT-EVE-
	MIR604 - R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT	ZM-013
	MIR604 - P	FAM- AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-BHQ1	
	MIR162 - F	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	QT-EVE-
	MIR162 - R	TGCCCTATCTGTTGCCTTCAGA	ZM-022
	MIR162 - P	HEX-TCTAGACAATTCACTACATAAAAACGTCCGCCA-BHQ1	
	GA21 - F	CGTTATGCTATTGCAACTTTAGACA	QT-EVE-
	GA21 - R	GCGATCCTCCTCGCGTT	ZM-014
	GA21 - P	HEX-TTTCTAACAGCAGGTGGGTCCGGGT-BHQ1	

3.2.3.1 Priprava pozitivne kontrole za MEQ1 in MEQ2

Pripravili smo pozitivno kontrolo, ki je vsebovala vseh 7 GS linij, ki smo jih določali z več tarčno metodo ddPCR. Zmešali smo osamljeno DNA naštetih GS linij, ki smo jih predhodno že karakterizirali z eno tarčno ddPCR. Pozitivno kontrolo smo nato preverili z eno tarčnim načinom ddPCR, da smo določili končno koncentracijo posameznih tarčnih zaporedij oz. delež posameznih GS linij v pozitivni kontroli, nato pa smo jo uporabljali za nadaljnje preverjanje več tarčnega načina ddPCR.

3.2.4 Analiza rezultatov več tarčne metode ddPCR

Rezultate več tarčne analize smo analizirali tako, da smo zmeraj uporabili pozitivno kontrolo, ki vsebuje vse preiskovane elemente. Postopek za izvoz rezultatov meritve je potekal v treh korakih. Najprej smo mejno jakost fluorescence (threshold) postavili na takšno mesto, da so bile negativne kapljice v spodnjem levem delu (Slika 4, A). Zatem smo križ postavili za eno skupino više in v desno (Slika 4, B) ter izvozili podatke ter postopek ponovili za še eno skupino rezultatov više in v desno (Slika 4, C) ter izvozili podatke. Z Microsoft Excel-om smo nato z enačbo ... (2) preračunali dobljene rezultate in izračunali deleže posamezne GS linije.



Slika 4: Postavitev mejne jakosti fluorescence za izvoz podatkov v treh korakih. A) Mejna vrednost je postavljena nad kapljice, ki ne vseujejo nobenega tarčnega zaporedja. B) Mejna vrednost je postavljena nad kapljice, ki vsebujejo le tarčna zaporedja z nizko fluorescenco FAM oz. HEX. C) Mejna vrednost je postavljena nad kapljice, ki vsebujejo le tarčna zaporedja z visoko fluorescenco FAM oz. HEX.

Figure 4: Threshold positions for data export in three steps. A) Threshold is set above the negative droplets. B) Threshold is set above the droplets with low fluorescence (FAM and HEX) amplicon. C) Threshold is set above the droplets with high fluorescence (FAM and HEX) amplicon.

Izračun števila kapljic, pozitivnih za posamezno tarčno zaporedje v reakciji:

- število kapljic, pozitivnih za tarčno zaporedje z nizko fluorescenco:

$$\begin{aligned} \text{št. kapljic, pozitivnih za tarčno zaporedje z nizko fluorescenco} &= \\ \text{št. pozitivnih kapljic prvega izvoza} - & \\ \text{št. pozitivnih kapljic drugega izvoza} + & \dots (3) \\ \text{št. pozitivnih kapljic tretjega izvoza} & \end{aligned}$$

- število kapljic, pozitivnih za tarčno zaporedje z višjo fluorescenco:

$$\begin{aligned} \text{št. pozitivnih kapljic za tarčno zaporedje z višjo fluorescenco} &= \dots (4) \\ \text{št. pozitivnih kapljic drugega izvoza} & \end{aligned}$$

Izračun količine posameznega tarčnega zaporedja (primer HmgA):

$$\text{št. kopij HmgA na reakcijo} = 20 \times \left(\frac{\ln \left(1 - \frac{\text{št. pozitivnih kapljic za HmgA}}{\text{št. vseh kapljic}} \right)}{0,85} \right) \times 100 \quad \dots (5)$$

Za volumen reakcije smo glede na objavo Corbisier in sod. (2015) uporabili volumen 0,85 nl.

Za določanje deleža posamezne GS linije koruze, smo koncentracijo tarčnega zaporedja posamezne GS linije koruze (cp/μl) delili s koncentracijo tarčnega zaporedja HmgA (cp/μl) ter množili s 100 (primer MIR162):

$$\text{delež MIR162 (\%)} = \frac{\text{MIR162 (cp/μl)}}{\text{HmgA (cp/μl)}} \times 100 \quad \dots (6)$$

3.2.5 Dinamično območje metode, LOD in LOQ več tarčne metode ddPCR

Za določanje dinamičnega območja, LOD in LOQ smo pripravili serijske redčine pozitivne kontrole, katere zadnja redčina ni vsebovala več nobenega tarčnega zaporedja in sicer smo pripravili 3x, 9x, 27x, 81x, 243x, 729x, 2.187x, 6.561x, 19.683x, 59.049x, 177.147x in 531.441x redčino ter jih analizirali v dveh dneh v skupaj 5 ponovitvah.

Meja detekcije dvo tarčne ddPCR metode je bila določena kot najmanjše število kopij tarčnega zaporedja v reakciji, za katero je bil rezultat za vseh 5 reakcij pozitiven. Kot pozitivne reakcije smo upoštevali reakcije z vsaj tremi pozitivnimi kapljicami.

Meja kvantifikacije metode je bila določena kot najmanjše število kopij tarčnega zaporedja v reakciji, za katero je bil koeficient variacije (CV) izmerjene količine tarčnega zaporedja pod 25 %.

3.2.6 Resničnost meritev več tarčne metode ddPCR

Za preverjanje resničnosti meritev smo skupno pozitivno kontrolo analizirali s qPCR in sicer smo določili delež vsake GS linije. Postopek smo izvedli, kot je opisano v poglavju 3.1.4 qPCR in sicer smo za vsako transgeno linijo uporabili referenčni material, ki smo mu pripisali referenčno vrednost v enotah cp/cp. Le to smo pridobili z analizami referenčnih materialov z ddPCR v enotarčnem načinu. Rezultate analize skupne kontrole s qPCR smo primerjali z rezultati večtarčne metode ddPCR. Vzorce medlaboratorijske primerjave (Preglednica 10) smo analizirali z večarno metodo ddPCR in rezultate v skladu z Mazzara (2011) preračunali v enoto m/m s faktorjem 0,5 ter jih primerjali s povprečnim rezultatom v medlaboratorijski primerjavi udeleženih laboratorijev.

qPCR rezultate vzorcev iz rutinskih analiz (Preglednica 10) smo v cp/cp enote preračunali podobno kot vzorce medlaboratorijskih primerjav, dodatno pa še s faktorjem, ki smo ga pridobili z enotarčno analizo ddPCR uporabljenih referenčnih materialov, ki smo jih uporabili za umeritveno krivuljo v qPCR analizah.

3.2.7 Ponovljivost več tarčne metode ddPCR

Za določanje ponovljivosti smo upoštevali analizo 1x, 3x in 9x redčine skupne pozitivne kontrole, ko smo skupno pozitivno kontrolo analizirali v petih ponovitvah, vsakič v drugi kartuši, v dveh dneh. Nato smo izračunali št. tarčnih zaporedij ter delež GS linij za reakcije posamezne kartuše. Izračunali smo povprečje števila izmerjenih tarčnih zaporedij ter povprečje deležev GS linij vseh reakcij ene redčine.

3.2.8 Specifičnost več tarčne metode ddPCR

Za določanje specifičnosti več tarčne metode smo pripravili mešanice DNA referenčnih materialov, ki so vsebovale referenčne materiale GS linij, ki jih določamo z ceč tarčno metodo, razen tistega, za katerega smo preverjali speifičnost, ter jih analizirali z obema več tarčnima metodama. Na ta način smo preverili, da metoda nima lažno pozitivnih rezultatov.

3.2.9 Asimetrična občutljivost več tarčne metode ddPCR

Visoka vsebnost tarč lahko povzroči lažno negativen rezultat za tarčno zaporedje, ki je v vzorcu prisotno v nizki količini. Glede na predhodno določeno število kopij posameznega

GS tarčnega zaporedja v DNA referenčnih materialov smo pripravili mešanice, kjer je bilo enega GS tarčnega zaporedja približno 20 in 40 kopij na reakcijo, število ostalih pa približno 56000 kopij na reakcijo za MEQ1 ter med 13000 in 29000 kopij na reakcijo za MEQ2.

3.2.10 Uporabnost več tarčne metode ddPCR

Uporabnost več tarčne metode smo preverili na resničnih vzorcih iz medlaboratorijskih primerjav in dveh vzorcih, ki sta vsebovala nekatere GS linije, ki jih zaznava več tarčna analiza (Preglednica 10). Postopek primerjave je opisan v poglavju 3.2.6. Resničnost.

3.2.11 Praktičnost več tarčne metode ddPCR

Primerjali smo stroške analize in v izračun vključili strošek kemikalij, potrošnega materiala in porabljenega časa za izvedbo analize. Podobno kot za dvo tarčno metodo ddPCR za določanje MON810, smo za primerjavo upoštevali čas, potreben za izvedbo analize qPCR oz. ddPCR od priprave redčin vzorcev naprej, ker so predhodni koraki (osamitev DNA, priprava redčin DNA vzorca) identični. Za primerjavo nismo upoštevali korakov nadaljnje analize po pridobitvi podatkov iz aparature kot je npr. preverjanje ustreznosti kriterijem analize.

Po shemi GSO analize s qPCR v vzorcu glede na rezultate presejalne analize najprej določimo katere GS linije so prisotne v vzorcu in nato v naslednjem koraku analize določimo njihov delež. Več tarčna ddPCR metoda ta dva koraka združi v eni analizi zato smo dodatno primerjali uporabo več tarčne metode ddPCR kot metodo identifikacije GS linij in kot hkratno metodo identifikacije in kvantifikacije.

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ DVO TARČNE METODE ddPCR ZA DOLOČANJE GS KORUZE MON810

Za razvoj metode ddPCR smo najprej preverili ustreznost metode qPCR za določanje GS koruze MON810 z ddPCR v eno tarčnem sistemu z analizo referenčnega materiala, certificiranega za razmerje kopij MON810:HmgA. Nato smo preverili delovanje metode ddPCR v dvo tarčnem načinu in ugotovili, da metoda deluje v dvo tarčnem načinu ter da restrikcija genomske DNA vzorca ne vpliva na delovanje metode. Nadaljnja preverjanja metode smo izvajali v dvo tarčnem načinu z uporabo nerazrezane DNA.

4.1.1 Preverjanje metode za določanje MON810 s qPCR

Vzorce in referenčne materiale smo analizirali s qPCR. Uporabili smo eno tarčni način reakcije, torej ločene reakcijske mešanice za HmgA in MON810. Primerjali smo rezultate analize z rezultati predhodnih analiz laboratorija NIB, kjer smo uporabili druge metode za določanje GS koruze MON810 s qPCR, da preverimo ustrezeno delovanje novejše metode (Preglednica 12). Delež MON810 smo izračunali z uporabo referenčnega materiala ERM-BF413f kot kalibranta, ki je bil uporabljen tudi v predhodnih analizah.

Preglednica 12: Delež koruze MON810 v izbranih vzorcih, izmerjen z metodo za določanje GS koruze MON810 s qPCR ter rezultati iz predhodnih analiz laboratorija NIB

Table 12: Percentage of MON810 in tested samples, measured with method for detection of MON810 with qPCR and results from previous analyses in NIB laboratory

Vzorec	MON810	Predhodne analize	Razlika (%)
G009/04	0,39 %	0,50 %	28,2
G180/07	0,031 (<0,1 %)	<0,1 %	/
G211/10	0,86 %	0,8 %	-7,0
G212/10	3,9 %	4,2 %	7,7
G147/08	35 %	29 %	-17,8

Z rezultati smo potrdili primerljivost predhodnih rutinskih analiz in analize, kjer smo uporabili metodo za določanje GS koruze MON810 s qPCR, ki smo jo v nadalnjih analizah uporabljali za qPCR in ddPCR.

4.1.2 Navzkrižna analiza referenčnih materialov s qPCR

S qPCR smo navzkrižno analizirali RM (Preglednica 1) in sicer smo za umeritveno krivuljo zmeraj vzeli drug RM ter upoštevali m/m in cp/cp vrednost. Analizirali smo tudi vzorce ter izračunali delež MON810 v m/m in cp/cp enotah.

Preglednica 13: Rezultati analize vzorcev ter referenčnih materialov s qPCR, z upoštevanjem referenčnih vrednosti v m/m in cp/cp (%).

Table 13: Results of analysis of ERM reference materials and samples with qPCR, with results in m/m and cp/cp (%).

vzorec	Uporabljen referenčni material za umeritveno krivuljo				cp/cp		
	m/m						
	ERM-BF413gk	ERM-BF413ek	ERM-BF413f	ERM-BF413d	ERM-AD413	ERM-BF413d	ERM-BF413ek
ERM-BF413gk	9,1	12	5,5	6,0	2,8	3,6	4,5
ERM-BF413ek	1,8	2,1	1,1	1,0	0,5	0,58	0,9
ERM-BF413f	8,1	10,2	5,0	4,0	2,3	2,3	3,9
ERM-BF413d	1,4	1,7	0,83	0,90	0,4	0,46	0,65
ERM-AD413	365	515	206	91	102	145	200
G009/04	0,84	1,0	0,51	0,50	0,24	0,29	0,40
G147/08 CTAB	68	67	43	52	18	30	26
G147/08 NSF	59	67	38	NQ	17	NQ	26
G180/07	0,09	0,10	0,05	0,06	0,02	0,04	0,04
G211/10	1,3	2,0	0,80	1,2	0,37	0,50	0,83
G212/10	6,2	7,410	3,8	4,0	1,8	2,3	2,9
G254/11	10	11	5,8	NQ	2,7	NQ	4,2
G231/11	8,0	9,6	4,9	4,6	2,3	2,6	3,7

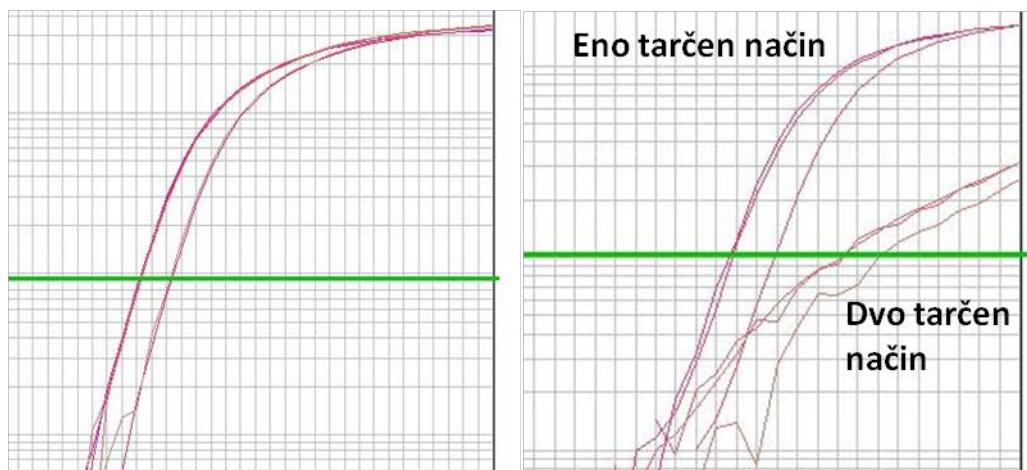
NQ – zaradi prevelike razlike v učinkovitosti pomnoževanja DNA vzorca in kalibranta določitev deleža ni bila mogoča.

4.1.3 Preverjanje dvo tarčnega načina analize s qPCR

Metodo, ki smo jo nameravali uporabiti za ddPCR, smo s qPCR preverili tudi v dvo tarčnem načinu. Rezultati so pokazali, da uporaba dvo tarčnega načina ni imela bistvenega vpliva na učinkovitost reakcije za tarčno zaporedje HmgA (Preglednica 14), kjer praktično ni razlike v pomnoževanju (Slika 5, levo), je pa močno vplivala na tarčno zaporedje MON810, kjer so se Cq vrednosti premaknile za 5,5 in bi bili rezultati kvantifikacije zato neustrezni. Tudi krivulje pomnoževanja niso ustrezne (Slika 5, desno), zato smo poskušali s spremjanjem koncentracije kemikalij za HmgA in MON810 poiskati kombinacijo, ki bi delovala.

Preglednica 14: Cq vrednosti za eno tarčen in dvo tarčen način qPCR s HmgA in MON810
 Table 14: Cq values for single and duplex assay for HmgA and MON810

Način analize	Redčitev	Cq HmgA	Cq MON810
Eno tarčen	2x	21,3	30,7
	8x	23,2	32,9
Dvo tarčen	2x	21,2	36,2
	8x	23,4	38,3



Slika 5: Primerjava krivulj pomnoževanja v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu qPCR za HmgA, kjer se krivulje eno tarčnega in dvo tarčnega načina prekrivajo (levo), in za MON810 (desno), kjer je bilo pomnoževanje v dvo tarčnem načinu neustrezno.

Figure 5: Comparison of amplification curves in single and duplex qPCR reaction for HmgA, where amplification curves of single and duplex assays are overlapping (left) and for MON810 (right), where amplification in duplex assay was not appropriate.

Dvo tarčni način smo preizkusili s šestimi različnimi kombinacijami koncentracij začetnih oligonukleotidov (Preglednica 7), da bi z različnimi koncentracijami morda dosegli ustrezno pomnoževanje za obe tarčni zaporedji. Primerjali smo jih s Cq vrednostmi eno tarčnega načina in z dvo tarčnim načinom (A), kjer so koncentracije enake kot v eno tarčnem načinu (Preglednica 5, Preglednica 15).

Krivulje pomnoževanja za MON810 v nobenem primeru niso bile ustrezne, prav tako ima dvo tarčen način vpliv na Cq vrednosti, zato smo zaključili, da dvo tarčen način HmgA in MON810 ne deluje. Z dvo tarčnim načinom pri qPCR nismo nadaljevali, smo pa z rezultati ddPCR ugotovili, da dvo tarčen sistem deluje z ddPCR. Morda gre za vpliv druge reakcijske mešanice, verjetno pa je ustrezno delovanje dvo tarčnega načina ddPCR posledica odčitavanja rezultatov ob koncu pomnoževanja, ko je signal enak ne glede na učinkovitost pomnoževanja.

Preglednica 15: Primerjava povprečnih Cq vrednosti za ERM-BF413f v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu qPCR

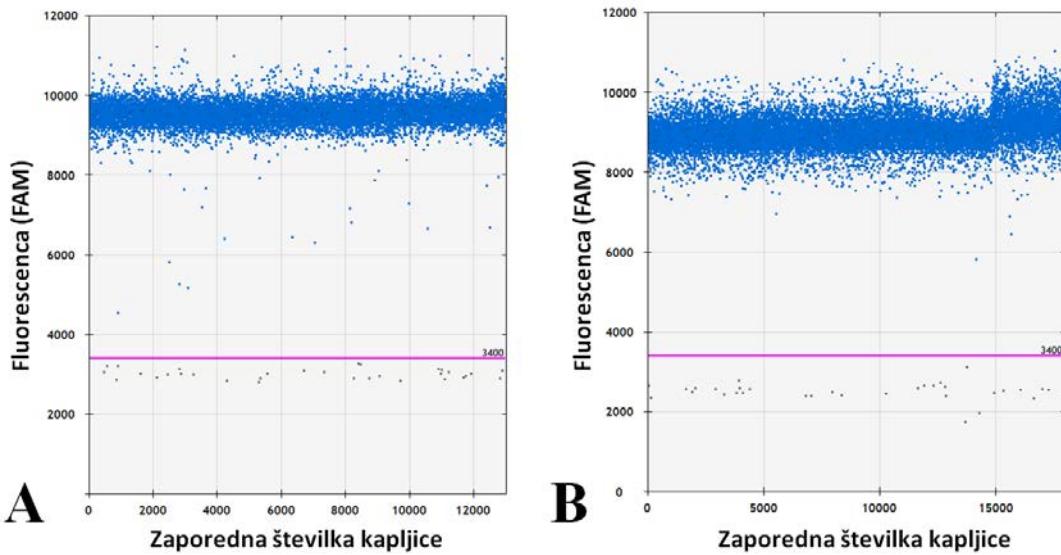
Table 15: Comparison of average Cq values for ERM-BF413f in sin singleplex and duplex qPCR

Način analize	Cq	HmgA		MON810		
		Razlika od eno tarčnega načina	Razlika od A	Cq	Razlika od eno tarčnega načina	Razlika od A
Eno tarčen način	24,8	/	/	31,8	/	/
A	24,7	0,1	/	31,9	-0,1	/
B	25,2	-0,4	-0,5	31,9	-0,1	0
C	25,3	-0,5	-0,6	31,0	0,8	0,9
D	25,1	-0,3	-0,4	31,0	0,8	0,9
E	24,7	0,1	0	31,2	0,5	0,7
F	24,7	0,1	0	30,0	1,8	1,9

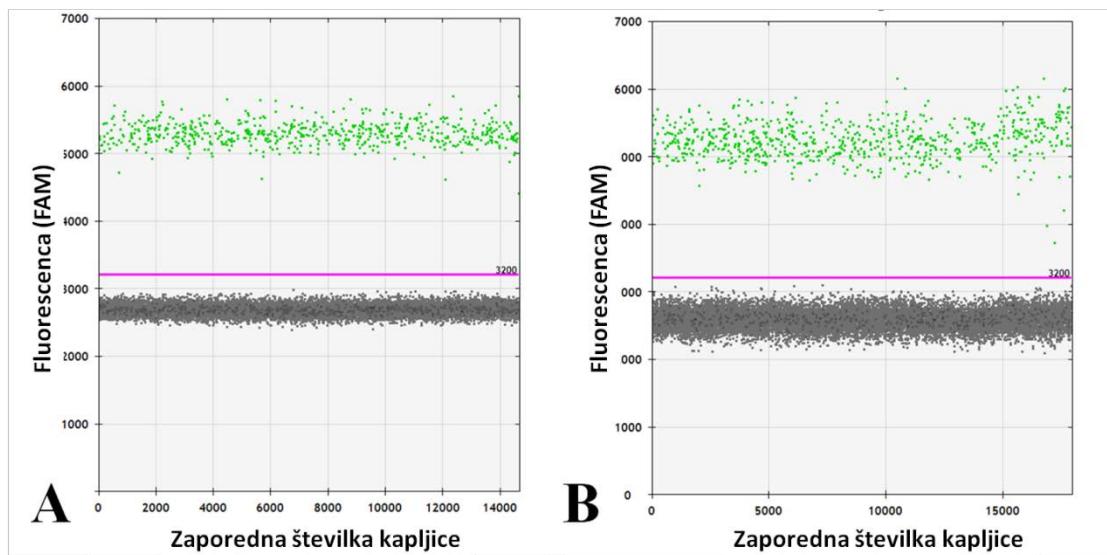
4.1.4 Preizkus ddPCR za analizo MON810

Najprej smo preverili delovanje ddPCR za HmgA in MON810 v eno tarčnem načinu na referenčnem materialu ERM-BF413ek. Ta RM je certificiran tudi za razmerje med HmgA in MON810 in sicer znaša razmerje cp/cp $0,77\% \pm 0,08\%$. Ker je odčitavanje rezultatov pri ddPCR na koncu reakcije, se predvideva, da morebitna inhibicija oz. spremembe v učinkovitosti pomnoževanja ne vplivajo na rezultat kvantitativne analize z ddPCR, dokler pomnoževanje poteka. Z eno tarčnim načinom ddPCR izmerjen delež MON810 znaša $0,68\% \text{ cp/cp}$. Nato smo podobno kot za qPCR, ddPCR izvedli v dvo tarčnem načinu za HmgA in MON810. Rezultati ($0,72\% \text{ cp/cp}$) so bili podobni certificirani vrednosti in rezultatom iz eno tarčnega načina. Tudi fluorescensa se za nobeno tarčno zaporedje ni spremenjala (Slika 6 in Slika 7). Razlika med certificirano vrednostjo in izmerjenimi vrednostmi je bila pri dvo tarčnem načinu znotraj intervala zaupanja ($0,77\% \pm 0,08\% \text{ cp/cp}$), za eno tarčen način pa tik pod njim. Tudi v izmerjeni količini št. kopij HmgA in MON810 ni bilo velike razlike med eno in dvo tarčnim načinom (Preglednica 16).

Ker se s tem zmanjša strošek ter potreben čas za analizo, smo vse nadaljnje analize izvajali v dvo tarčnem načinu.



Slika 6: Intenziteta fluorescence za HmgA v eno tarčnem načinu (A) in dvo tarčnem načinu (B) ddPCR
 Figure 6: Fluorescence intensity for HmgA in singleplex (A) and duplex ddPCR (B)



Slika 7: Intenziteta fluorescence za MON810 v eno tarčnem načinu (A) in dvo tarčnem načinu (B) ddPCR
 Figure 7: Fluorescence intensity for MON810 in singleplex (A) and duplex ddPCR (B)

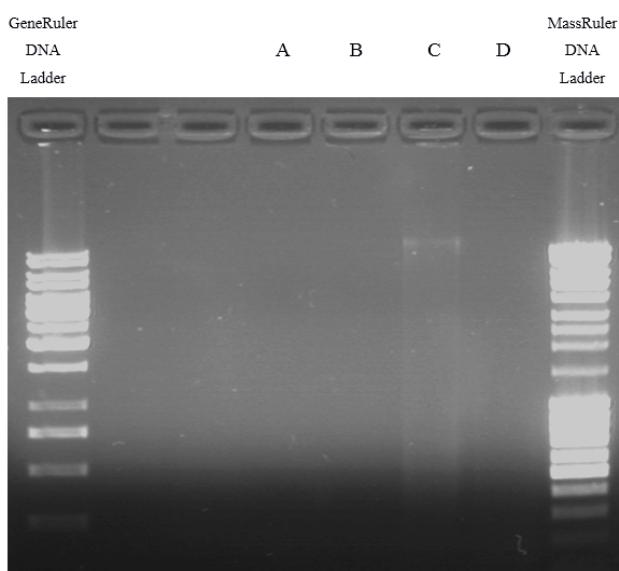
Preglednica 16: Povprečno št. kopij za HmgA in MON810 v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu ddPCR
 Table 16: Average copy number per reaction of HmgA and MON810 in single and duplex ddPCR

Amplikon	Povprečno št. kopij (eno tarčen način)	Cv (eno tarčen način)	Povprečno št. kopij (dvo tarčen način)	Cv (dvo tarčen način)	Razlika dvo tarčen / eno tarčen način
HmgA	47971	1,6 %	47086	1,3 %	-1,8 %
MON810	328	9,4 %	340	7,2 %	3,7 %

4.1.5 Vpliv restrikcije na rezultate kvantifikacije MON810 z ddPCR

Z restriktionskim encimom Taq1 smo razrezali genomsko DNA referenčnega materiala ERM AD413f ter plazmidno DNA plazmida ERM-AD413. Razrezano in nerazrezano DNA smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo, qPCR ter ddPCR.

Koncentracija plazmidov je bila prenizka, da bi bila DNA vidna na agaroznem gelu (Slika 8). Pri genomski DNA lahko vidimo pas DNA pri nerazrezani DNA, medtem ko ga pri razrezani DNA ni več, kar potrjuje razrezanost DNA (Slika 8).



Slika 8: Agarozna gelska elektroforeza vzorcev pred in po restrikciji z restriktionskim encimom Taq1. A) plazmid ERM-AD413; B) plazmid ERM-AD413 po restrikciji; C) ERM-BF413f; D) ERM-BF413f po restrikciji.

Figure 8: Agarose gel electrophoresis before and after restriction with restriction enzyme Taq1. A) Plasmid ERM-AD413; B) plasmid ERM-AD413 after restriction; C) ERM-BF413f; D) ERM-BF413f after restriction.

S qPCR smo analizirali vzorce na prisotnost HmgA in MON810. Analizo smo izvedli tudi v dvo tarčnem načinu. Restrikcija je v primeru genomske DNA povzročila dvig povprečne Cq vrednosti (Preglednica 17), v primerih plazmidne DNA pa so imeli razrezani vzorci nižje Cq vrednosti (Preglednica 18).

Preglednica 17: Vrednosti Cq analize qPCR za DNA ERM-BF413f pred in po restrikciji, analizirani v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu

Table 17: Cq values for ERM-BF413f before and after restriction, analysed with qPCR in single and duplex reactions

Vzorec	HmgA			MON810		
	Eno tarčen način	Dvo tarčen način	Razlika	Eno tarčen način	Dvo tarčen način	Razlika
MON810 ERM-BF413f	24,8	24,7	-0,1	31,8	31,9	0,1
MON810 ERM-BF413f restr.	25,2	25,5	0,3	32,4	33,4	1,0
Razlika	0,4	0,8		0,6	1,5	

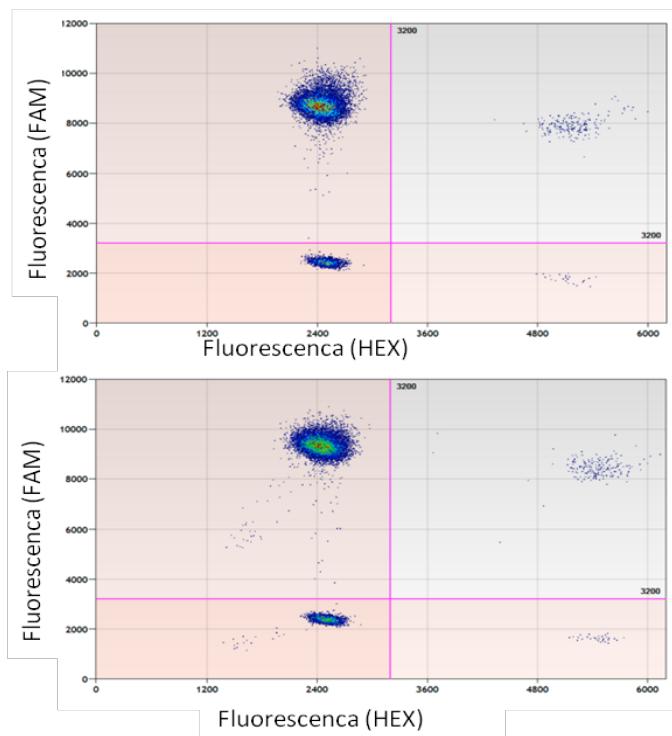
Preglednica 18: Vrednosti Cq analize qPCR za DNA plazmida ERM-AD413 pred in po restrikciji, analizirani s qPCR v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu

Table 18: Cq values for plasmid ERM-AD413 before and after restriction, analysed with qPCR in single and duplex reactions

Vzorec	HmgA			MON810		
	Eno tarčen način	Dvo tarčen način	Razlika	Eno tarčen način	Dvo tarčen način	Razlika
plazmid ERM-AD413	21,3	21,0	-0,3	22,7	22,2	-0,5
plazmid ERM-AD413 restr.	20,2	19,9	-0,3	21,3	20,9	-0,4
Razlika	-1,1	-1,1		-1,4	-1,3	

Analiza DNA referenčnega materiala ERM-BF413f pred in po restrikciji z dvo tarčnim načinom ddPCR ni pokazala velikih razlik (Slika 9, Preglednica 19). BIO-RAD priporoča uporabo fragmentirane DNA za boljšo izdelavo kapljic, vendar v naših poskusih nismo opazili razlik ne v številu kapljic, ne v jakosti fluorescence, ne v rezultatu kvantifikacije, zato smo nadaljnje analize izvedli v dvo tarčnem načinu brez restrikcije.

Primerjava rezultatov ddPCR analize DNA, razrezane z encimom Taq1 ter nerazrezane DNA, je pokazala, da se je absolutno število kopij nekoliko zmanjšalo, delež MON810 je pa ostal enak (Preglednica 19). To bi lahko razložili tudi z dodatnimi koraki pipetiranja pri izvedbi restrikcije s katerimi se povečuje napaka, še posebej, ker je zmanjšanje števila kopij za HmgA in MON810 zelo podobno. Zaključili smo, da restrikcija ni imela vpliva na rezultat določanja deleža MON810, in smo zato nadaljnje analize opravljali brez restrikcije. Glede na enako razporeditev kapljic, pozitivnih za HmgA ali MON810, in kapljic, pozitivnih za HmgA in MON810, smo tudi potrdili, da zaporedji za HmgA in MON810 nista locirani blizu skupaj na kromosому in torej nista povezani (Slika 9).



Slika 9: Rezultati analize DNA referenčnega materiala ERM-BF413f z ddPCR v dvo tarčnem načinu pred (zgoraj) in po restrikciji (spodaj) v dvodimenzionalni pogledu.

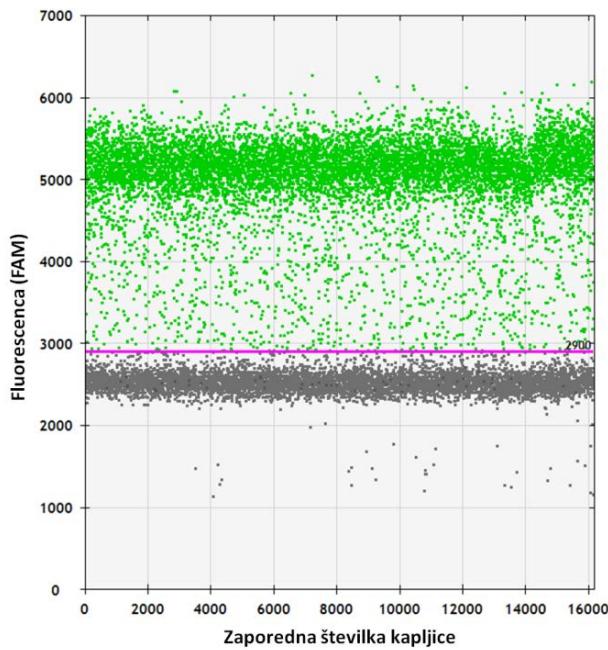
Figure 9: Results of duplex ddPCR analysis of ERM-BF413f before (top) and after restriction (bottom).

Preglednica 19: Št. kopij HmgA in MON810 ter delež MON810 v ERM-BF413ek pred in po restrikciji v 2x in 6x redčini, izmerjeno z dvo tarčnim načinom ddPCR.

Table 19: Copy number of HmgA and MON810 and MON810 percentage for ERM-BF413ek before and after restriction in 2x and 6x diluted DNA, measured with duplex ddPCR.

	Redčina	Št. kopij HmgA	Št. kopij MON810	Delež MON810 (%)
Pred restrikcijo	2x	130910	883	0,67
Po restrikciji	2x	125970	893	0,71
Razlika		4940 (-3,8 %)	10 (-1,1 %)	0,04 (-5,0 %)
Pred restrikcijo	6x	44270	302	0,68
Po restrikciji	6x	37620	249	0,66
Razlika		6650 (15,0 %)	53 (17,6 %)	0,02 (3,0 %)

Rezultati analize plazmidne DNA z ddPCR pa so pokazali, da ddPCR ni primeren za analizo tega plazmida, saj so imele pozitivne kapljice za oba amplikona zelo različno fluorescenco, kar je poimenovano kot dež in onemogoča jasno postavitev meje med pozitivnimi in negativnimi kapljicami (Slika 10). Ker je za analize vzorcev relevantna genomska DNA, smo v nadalnjih analizah uporabljali le genomsko DNA.



Slika 10: Jakost fluorescence pri analizi plazmida ERM-AD413 za MON810 v dvo tarčnem načinu ddPCR
 Figure 10: Fluorescence intensity of plasmid ERM-AD413 for MON810 in duplex ddPCR

4.1.6 Specifičnost dvo tarčne metode ddPCR

Specifičnost metode qPCR za določanje MON810 je bila preverjena v EURL-GMFF za metodo qPCR. Dodatno smo jo preverili na DNA vzorca koruze, ki ne vsebuje MON810 (G053/12), ter na DNA vzorca mleka (G031/12).

Tekom poskusov so bile negativne tudi kontrole reakcije NTC (reakcija z vodo namesto DNA, no template control), torej ni bilo lažno pozitivnih rezultatov.

Preglednica 20: Rezultati testa specifičnosti dvo tarčne metode ddPCR
 Table 20: Results of specificity test for duplex ddPCR

Vzorec	HmgA				MON810			
	Število pozit. reakcij	Delež pozit. reakcij	Število pozit. kapljic	Delež pozit. kapljic	Število pozit. reakcij	Delež pozit. reakcij	Število pozit. kapljic	Delež pozit. kapljic
G031/12	0/8*	0 %	1/106133	9e-4 %	0/8*	0 %	1/106133	9e-4 %
G053/12	Ni relev.	Ni relev.	Ni relev.	Ni relev.	0/8	0 %	1/110903	0 %
Skupaj	0/8*	0 %	1/106133	9e-4 %	0/16*	0 %	1/217036	5e-4 %

* - Reakcija je smatrana kot pozitivna, če sta vsaj dve kapljici pozitivni. Ena reakcija je imela eno pozitivno kapljico.

4.1.7 Dinamično območje, določitev LOD in LOQ dvo tarčne metode ddPCR

Za določitev dinamičnega območja metode, LOD in LOQ dvo tarčne metode ddPCR smo analizirali redčitveno vrsto DNA referenčnega materiala ERM-BF413gk (9,9 % MON810 m/m) v petih neodvisnih ponovitvah (Preglednica 21).

Za LOQ smo določili kriterij, da mora biti cv ponovitev $< 25\%$. Tako je meja kvantifikacije za tarčno zaporedje HmgA 5 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo in za tarčno zaporedje MON810 18 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo.

Za LOD smo določili, da kot pozitivne štejemo tiste reakcije, ki imajo vsaj dve pozitivni kapljici. Vse reakcije (5) so morale biti pozitivne. Za LOD smo določili količino tarčnega zaporedja na reakcijo, ki v 5 ponovitvah zmeraj dala pozitiven rezultat. LOD za tarčno zaporedje HmgA je enaka kot LOQ, to je 5 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo. LOD za MON810 je 6 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo.

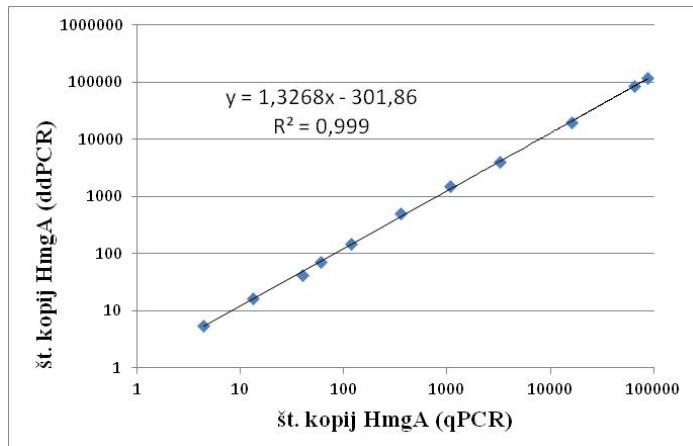
Preglednica 21: Povprečno št. kopij HmgA in MON810 na reakcijo in koeficient variabilnosti v redčitveni vrsti DNA ERM-BF413gk ter delež MON810 v posameznih redčinah s koeficientom variabilnosti

Table 21: Average copy number of HmgA and MON810 per reaction with Coefficient of variability and MON810 percentage with Coefficient of variability in serial dilution of DNA from ERM-BF413gk

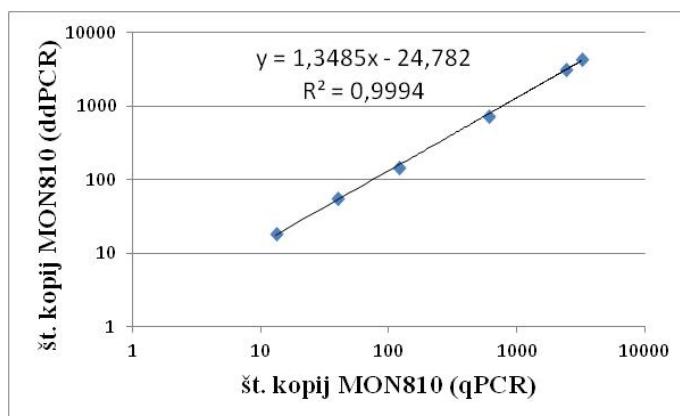
Redčina DNA	Povprečno št. kopij HmgA na reakcijo	CV št. kopij HmgA (%)	Povprečno št. kopij MON810 na reakcijo	CV št. kopij MON810 (%)	Delež MON810 (%)	CV deleža MON810 (%)
3	117920	1,4	4340	1,8	3,7	2,1
4	84120	3,5	3156	2,1	3,8	2,3
16	19552	1,3	726	4,8	3,7	4,1
81	3968	3,6	145	8,3	3,7	8,5
243	1536	2,8	55	16,5	3,6	13,6
729	494	5,2	18	19,7	3,7	18,4
2187	150	11,5	6	43,7	4,0	42,5
4374	71	17,7	3	94,4	4,9	69,9
6561	42	15,9	2	74,8	4,8	61,7
19683	17	24,8	0,3	223,6	0,0	/
59049	5	14,0	0,3	223,6	0,0	/
177147	2	69,0	0,00	/	/	/
1594323	0,3	223,6	0,00	/	/	/
15943230	0,00	/	0,00	/	/	/

Metoda ddPCR se je izkazala za linearno v preizkušanem območju in sicer je metoda linearja od 117000 do 5 kopij tarčnega zaporedja za referenčno tarčno zaporedje HmgA

(Slika 11). Za MON810 je bilo na voljo nižje maksimalno število kopij, zato je dinamično območje metode za MON810 med 4340 in 18 kopijami tarčnega zaporedja na reakcijo (Slika 12).



Slika 11: Dinamično območje dvo tarčne metode ddPCR za tarčno zaporedje HmgA
Figure 11: Dynamic range for HmgA assay of duplex ddPCR



Slika 12: Dinamično območje dvo tarčne metode ddPCR za tarčno zaporedje MON810
Figure 12: Dynamic range for MON810 assay of duplex ddPCR

Prav tako je čez celotno dinamično območje ustrezен rezultat kvantifikacije referenčnega materiala ERM-BF413gk, certificiranega le za m/m, ki smo mu glede na certificirano vrednost za ERM-BF413ek iz iste serije pripisali vrednost za razmerje MON810:HmgA 3,85 % (Preglednica 1). Če kot mejo upoštevamo odstopanje manjše od 25 %, kar pri vrednosti 3,85 % pomeni med 2,89 % in 4,81 % MON810, lahko iz Preglednice 21 razberemo, da so izmerjene vrednosti deleža MON810 zmeraj blizu prave vrednosti čez celotno dinamično območje.

4.1.8 Resničnost meritev dvo tarčne metode ddPCR

Resničnost smo potrdili z analizami referenčnih materialov, ki so certificirani za cp/cp razmerje, ali pa smo jim cp/cp razmerje pripisali glede na drug referenčni material iz iste serije ter na vzorcih medlaboratorijskih primerjav (Preglednica 22). Le za G147/08 je bila z dvo tarčno metodo ddPCR izmerjena vrednost za več kot 25 % nižja od vrednosti, izmerjene s qPCR.

Preglednica 22: Primerjava rezultatov kvantifikacije MON810 z dvo tarčnim načinom ddPCR in znanih vrednosti.

Table 22: Comparison of known value of MON810 % and result of measurement with duplex ddPCR

Vzorec	Znana vrednost (Preglednica 1, Preglednica 2)	Delež MON810 (ddPCR)	Razlika MON810 (ddPCR) – znana vrednost
ERM-BF413d	0.57 %	0.62 %	8.0 %
ERM-BF413f	2.85 %	2.92 %	2.5 %
ERM-BF413ek	0.77 %	0.70 %	-9.0 %
ERM-BF413gk	3.85 %	3.68 %	-4.1 %
G009/04	0.29 %	0.26 %	-12 %
G0180/07	0.04 %	0.04 %	2.9 %
G211/10	0.45 %	0.46 %	-1.8 %
G147/08	30 %	22 %	-27 %

4.1.9 Ponovljivost dvo tarčne metode ddPCR

Ponovljivost dvotarčne metode ddPCR smo preverili z analizo referenčnega materiala ERM-BF413ek v petih kartušah, s katerimi smo analizirali 35 reakcij. 3x redčino ERM-BF413ek smo analizirali s 5 kartušami. Na vsaki kartuši je bila ena reakcija negativne kontrole reakcije (NTC), 7 jih je bilo za analizo vzorca v dvotarčnem načinu. DNA referenčnega materiala smo analizirali tako, da sta po dve kartuši pripravila dva operaterja, en operater pa je eno kartušo pripravil drug dan.

Tako rezultati po posameznih kartušah kot skupni rezultati imajo cv manjši od 25 %. Metoda je zelo natančna absolutno (izmerjeno št. kopij HmgA in MON810), prav tako je zelo natančen rezultat deleža MON810 (Preglednica 23).

Preglednica 23: Rezultati analize ponovljivosti dvo tarčne ddPCR metode
 Table 23: Repeatability analysis of duplex ddPCR method

	Kartuša 1	Kartuša 2	Kartuša 3	Kartuša 4	Kartuša 5	Povprečje rezultatov
povprečno št. kopij HmgA v reakciji	46457	46057	46486	47286	47086	46674
cv št. kopij Hmg v reakciji	1,7	1,7	1,6	2,1	1,3	1,9
povprečno št. kopij MON810 v reakciji	314	311	327	344	341	327
cv št. kopij MON810 v reakciji	8,2	7,9	4,2	6,4	7,2	7,7
Povprečni delež MON810 v kartuši	0,68	0,67	0,70	0,73	0,72	0,70
cv deleža MON810 v kartuši	8,0	7,7	4,2	7,9	6,4	7,3

4.1.10 Uporabnost dvo tarčne metode ddPCR

Vzorce ter referenčne materiale smo analizirali s qPCR, kjer smo kot referenčno vrednost upoštevali razmerje v kopijah, ter z ddPCR, katerega rezultati so prav tako v razmerju kopij. Rezultati meritev z ddPCR so zelo blizu pričakovanim vrednostim tako za referenčne materiale kot za vzorce, razen za vzorec G147/08 (Preglednica 24).

Preglednica 24: Delež MON810 (cp/cp) izmerjen z eno tarčnim načinom qPCR, dvo tarčnim načinom ddPCR ter znana (določena) vrednost

Table 24: MON810 percentage as measured with singleplex qPCR, duplex ddPCR method and assigned value.

Vzorec	Znana vrednost (Preglednica 1, Preglednica 2)	Delež MON810 (ddPCR)	Razlika MON810 (ddPCR) – znana vrednost	Delež MON810 (qPCR)	Razlika MON810 (qPCR) – znana vrednost
ERM-BF413d	0,57 %	0,62%	8,0%	0,46%	-19,3%
ERM-BF413f	2,85 %	2,92%	2,5%	2,29%	-19,6%
ERM-BF413ek	0,77 %	0,70 %	-9,0 %	0,58 %	-24,7 %
ERM-BF413gk	3,85 %	3,68 %	-4,1 %	3,66 %	-4,9 %
G009/04	0,29 %	0,26 %	-11,7 %	0,29 %	/*
G0180/07	0,04 %	0,04 %	2,9 %	0,04 %	/*
G211/10	0,45 %	0,46 %	-1,8 %	0,50 %	11,1 %
G212/10	2,1 %	2,3 %	10,4 %	2,3 %	9,5 %
G231/11	2,6 %	2,3 %	-12,4 %	2,6 %	/*
G147/08	30 %	22 %	-26,7 %	30 %	/*
G254/11	3,8 %	3,5 %	-9,2 %	3,8 %	/*

*- Znana vrednost je določena z analizo s qPCR.

4.1.11 Analiza vzorcev z inhibicijo pri qPCR

S qPCR smo v eno tarčnem načinu določili delež MON810 v vzorcih G147/08 in G254/11, kjer je bilo tekom rutinskih analiz potrebno redčiti DNA, da je analiza ustrezala kriterijem za kvantitativno analizo in ni prišlo do inhibicije. DNA vzorca G147/08 smo izolirali z metodo CTAB in NucleoSpin® Food. Deleže MON810 smo izračunali iz različnih redčin, tudi iz inhibiranih.

Rezultati pokažejo, da je v 1x redčini G147/08 (NSF) višji delež MON810 kot v 3x redčini. Podobno velja za vzorec G254/11. V obeh primerih je bilo tarčno zaporedje HmgA bolj občutljiv na inhibitorje, zato je bila napaka zmeraj v večje deleže MON810. Rezultati ddPCR pa so primerljivi ne glede na uporabljeno redčino, iz česar lahko sklepamo, da morebitna inhibicija PCR ni imela vpliva na rezultat kvantifikacije.

Preglednica 25: Delež MON810 iz različnih redčin DNA vzorcev

Table 25: MON810 percentage calculated from different dilutions of sample DNA

Vzorec in redčina	Delež MON810 qPCR (%)	Delež MON810 (ddPCR) (%)
G147/08 CTAB 1x	30*	22
G147/08 CTAB 3x	31	21
G147/08 NSF 1x	50	20
G147/08 NSF 3x	27*	20
G254/11 1x	5,6	3,4
G254/11 4x	3,8*	3,5

*- rezultat meritve brez inhibicije

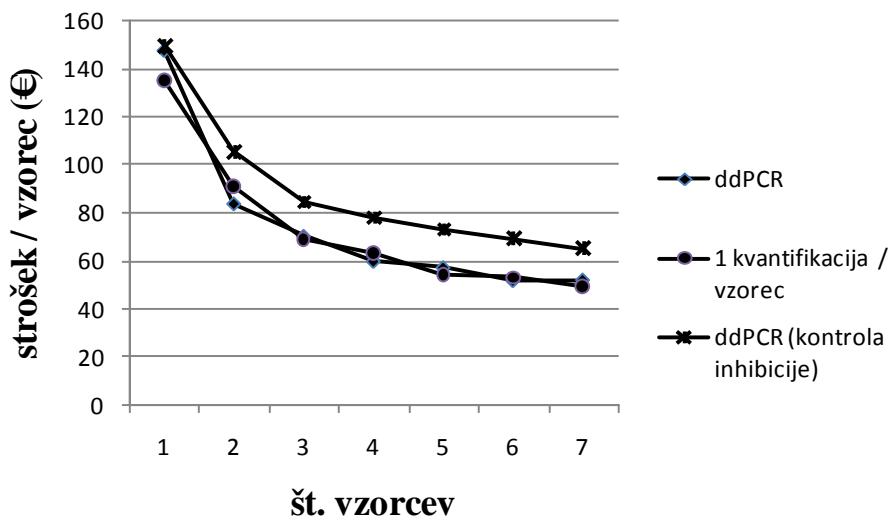
4.1.12 Praktičnost

Primerjali smo stroške analize s qPCR in ddPCR ter čas potreben za analizo. V primerjavo ni vključena izolacija DNA in priprava redčin DNA, ker sta skupni za obe analizi, prav tako ne nadaljnja analiza rezultatov s programom Microsoft Excell. Primerjali smo strošek analize 1 - 7 vzorcev z ddPCR metodo in sicer brez redčine za kontrolo inhibicije in z njo, s stroškom kvantifikacije MON810 s qPCR (Preglednica 26, Slika 13).

Preglednica 26: Cena analize na vzorec (€)

Table 26: Cost of analysis per sample (€)

Št. vzorcev	1	2	3	4	5	6	7
ddPCR	147	84	70	60	57	52	52
ddPCR (s kontrolo inhibicije)	150	106	85	78	73	69	65
1 kvantifikacija / vzorec (qPCR)	135	91	69	64	55	53	50



Slika 13: Primerjava cene analize na vzorec
Figure 13: Comparison of analysis cost per sample

Pri kvantitativni analizi s qPCR je pogosto potrebno ponoviti analizo zaradi neustrezaanja vsem kriterijem, vendar je težko oceniti, kako bi bilo pri analizah z ddPCR, ker nimamo nobenih izkušenj. Predvidevamo pa, da bi bilo število potrebnih ponavljanj precej manjše.

4.2 RAZVOJ NOVEGA PRISTOPA ZA HKRATNO DOLOČANJE 7 LINIJ GS KORUZE Z ddPCR

Zaradi večje učinkovitosti ddPCR smo razvili več tarčno metodo s katero lahko hkrati zaznavamo več tarčnih zaporedij v eni reakciji. Za razvoj več tarčne metode ddPCR smo izbrali GS linije koruze, ki vsebujejo promotor 35S in terminator NOS. Nato smo izmerili jakost fluorescence pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov in sond ter na teh podatkih v posamezne večtarčne reakcije (MEQ - Multiple Event Quantification) uvrstili po 4 tarčna zaporedja. Zatem smo metodo validirali po navodilih EURL-GMFF za metode določanja GSO (Definition ..., 2015).

4.2.1 Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond in načrtovanje več tarčnih reakcij MEQ1 in MEQ2

Za vsako GS linijo smo izvedli eno tarčno analizo ddPCR z različnimi koncentracijami oligonukleotidov. Preverili smo jakost fluorescence pri visoki (900 nM) in nizki (300 nM) koncentraciji začetnih oligonukleotidov ter nato še z visoko (300 nM) in nižjo (100 nM) koncentracijo sonde (Preglednica 27).

Preglednica 27: Jakost fluorescence kapljic glede na koncentracijo oligonukleotidov
Table 27: Fluorescence intensity of droplets when using different oligonucleotide concentrations

tarčno zaporedje	Visoki F - Visoki R -		Nizki F - Nizki R -		Nizki F - Nizki R - Nizki	
	Visoki P	Negativne	Negativne	Visoki P	Negativne	P
HmgA	6626	21384	1231	9096	292	3822
MON863	1171	10540	5491	16749	2029	7321
MON810	3985	9813	3885	8387	1875	3731
DP98140	4545	9157	4432	8005	2039	3584
MIR604	2442	14658	3068	11127	735	4964
MON89034	2950	14120	3130	10621	810	4578
MIR162	5059	9157	4701	8060	2171	3638
GA21	2573	10502	2329	7304	1331	4051

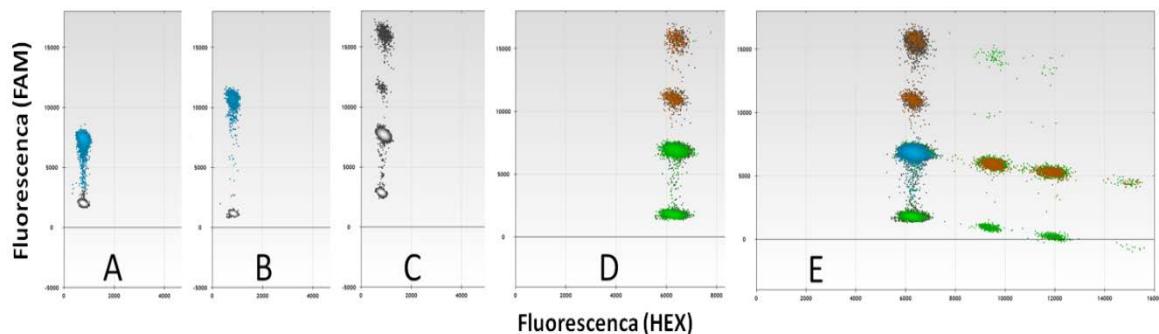
Nato smo glede na jakost fluorescence izbrali takšne končne koncentracije (Preglednica 28), ki so omogočale razlikovanje med negativnimi kapljicami, med kapljicami pozitivnimi za tarčno zaporedje z nizko fluorescenco, kapljicami, pozitivnimi za tarčno zaporedje z visoko fluorescenco ter kapljicami z obema tarčnima zaporednjema. Glede na jakost fluorescence smo se odločili, katera tarčna zaporedja bomo določali v kateri reakciji, in sicer smo v prvo (MEQ1) vključili referenčni gena HmgA (nižja fluorescence) in MON863

(višja fluorescenza), označeni s FAM, ter DP98140 (nižja fluorescenza) in MON810 (višja fluorescenza), označeni s HEX. V drugo (MEQ2) smo vključili MON89034 (nižja fluorescenza) in MIR604 (višja fluorescenza), označeni s FAM, ter MIR162 (nižja fluorescenza) in GA21 (višja fluorescenza), označeni s HEX.

Preglednica 28: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov za MEQ1 in MEQ2
Table 28: Final concentration of oligonucleotides in reaction for MEQ1 and MEQ2

MEQ1		MEQ2	
Oligonukleotid	Končna koncentracija	Oligonukleotid	Končna koncentracija
HmgA F	300 nM	MON89034 - F	300 nM
HmgA R	300 nM	MON89034 - R	300 nM
HmgA Probe - FAM	100 nM	MON89034 – P - FAM	100 nM
MON863 - F	900 nM	MIR604 - F	300 nM
MON863 - R	900 nM	MIR604 - R	300 nM
MON863 – P - FAM	300 nM	MIR604 – P - FAM	300 nM
DP98140 - F	300 nM	MIR162 - F	300 nM
DP98140 - R	300 nM	MIR162 - R	300 nM
DP98140 – P - HEX	200 nM	MIR162 – P - HEX	300 nM
MON810 F	900 nM	GA21 - F	900 nM
MON810 R	900 nM	GA21 - R	900 nM
MON810 P - HEX	300 nM	GA21 – P - HEX	300 nM

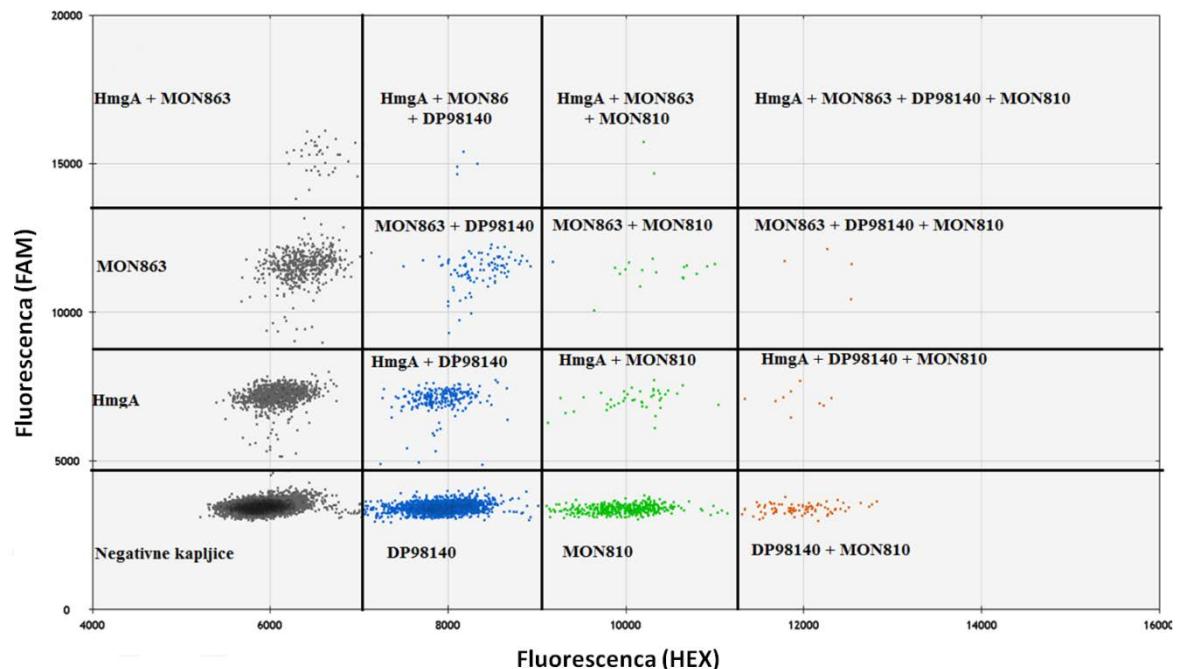
Najprej smo preverili jakost fluorescence za posamezna tarčna zaporedja v eno tarčni analizi (Slika 14, A in B), zatem pa pripravili dvo tarčne reakcije (Slika 14, C), kjer smo v reakciji združili kemikalije za tarčna zaporedja, katerih sonda je označena z enakim barvilom ter preverili delovanje principa razločevanja dveh enako označenih tarčnih zaporedij v eni reakciji za vse predvidene koncentracije. Končno smo v dveh reakcijah združili kemikalije za štiri tarčna zaporedja in preverili ustreznost rezultatov najprej na DNA le dveh GS, ki sta označena z istim barvilm (Slika 14, D, primer dveh FAM označenih amplikonov), končno pa smo analizirali 4 tarčno reakcijo za vsa tarčna zaporedja (Slika 14, E).



Slika 14: Prikaz preverjanja ustreznega fluorescenčnega zazora za različna tarčna zaporedja ter razločevanja pozitivnih in negativnih kapljic v postopku razvoja več tarčne metode ddPCR. A) Ena tarčna reakcija za tarčno zaporedje z nizko fluorescenco. B) Ena tarčna reakcija za tarčno zaporedje z visoko fluorescenco. C) dvo tarčen način ddPCR z DNA dveh analiziranih RM. D) štiri tarčen način ddPCR z DNA dveh RM. E) štiri tarčen način ddPCR z DNA vseh štirih RM.

Figure 14: Testing appropriate fluorescence intensity for different amplicons and differentiation between positive and negative droplets when multiplexing ddPCR method. A) Single target ddPCR for the amplicon with low fluorescence. B) Single target ddPCR for the amplicon with high fluorescence. C) Duplex ddPCR with two RM analysed. D) Fourplex ddPCR with two RM analysed. E) Fourplex ddPCR with all four RM analysed.

Slika 15 prikazuje katere kapljice so pozitivne za kateri amplikon na primeru MEQ1. Nekatere kapljice vsebujejo le eno tarčno zaporedje, nekatere dve, nekatere tri, kapljic s štirimi tarčnimi zaporedji ni, ker so bile koncentracije GS tarčnih zaporedij prenizke.



Slika 15: Fluorescenza kapljic za MEQ1.

Figure 15: Fluorescence of droplets for MEQ1.

4.2.2 Priprava skupne kontrole

Skupno pozitivno kontrolo smo karakterizirali z ddPCR v eno tarčnem načinu za vsako GS linijo posebej ter za HmgA in določili koncentracijo kopij posameznega amplikona ter delež posamezne GS linije. Zatem smo skupno pozitivno kontrolo analizirali še z MEQ1 in MEQ2.

Razlike v deležih GSO med meritvami v eno tarčnih načinih in štiri tarčnim načinom so bile nižje kot v primeru števila kopij na reakcijo, kar lahko razložimo z napako pipetiranja, pri kateri se spremeni absolutno št. kopij v reakciji, njihovo razmerje pa ostaja enako.

Preglednica 29: Rezultati analize skupne kontrole z ddPCR z eno tarčnim načinom in z več tarčnim načinom
Table 29: Results of analysis of positive control with singleplex and 4-plex ddPCR

Tarčno zaporedje	Povprečno število kopij tarčnega zaporedja na reakcijo		Razlika v št. kopij med eno tarčnim in 4 tarčnim načinom (%)	Dlež GSO (%)		Razlika v deležu GSO med eno tarčnim in 4 tarčnim načinom (%)
	Eno tarčen način	4 tarčen način		Eno tarčen način	4 tarčen način	
HmgA	67576	62109	-8.1	/	/	/
MON863	936	755	-19.4	1,4	1,2	-12,2
MON810	1184	1022	-13.7	1,7	1,6	-6,1
DP98140	1237	1119	-9.5	1,8	1,8	-1,6
MON89034	837	849	1.5	1,2	1,4	10,4
MIR604	803	769	-4.3	1,2	1,2	4,2
MIR162	887	848	-4.4	1,3	1,4	4,0
GA21	767	721	-6.0	1,1	1,2	2,3

4.2.3 Dinamično območje, določitev LOD in LOQ več tarčne metode ddPCR

Redčitveno vrsto pozitivne kontrole smo analizirali z več tarčno metodo (Preglednica 30, Preglednica 31 in Preglednica 32). Kot mejo detekcije smo upoštevali št. kopij v reakciji, kjer so vsaj 3 pozitivne kapljice za posamezno tarčno zaporedje.

Kot mejo kvantifikacije metode smo upoštevali št. kopij tarčnega zaporedja v reakciji, kjer je koeficient variacije manjši od 25 %.

Vsa tarčna zaporedja so imela R^2 višji od 0,98 (HmgA - 0,9885, MON863 - 0,9920, DP98140 - 0,9913, MON810 - 0,9922, MON89034 - 0,9901, MIR604 - 0,9954, MIR162 - 0,9986, GA21 - 0,9988),

Preglednica 30: Rezultati analize redčitvene vrste skupne pozitivne kontrole z MEQ1
 Table 30: Results of analysis of serial dilution of positive control with MEQ1

Redčina	HmgA		MON863		DP98140		MON810	
	Povprečno št. kopij	cv %						
1x	62109	7,3	755	7,8	1119	11,5	1022	10,6
3x	26905	4,6	324	8,3	467	4,1	418	11,4
9x	10905	1,4	127	15,5	202	20,4	194	11,7
27x	3525	2,6	44	13,6	65	7,1	59	12,0
81x	1128	4,6	13	49,1	18	22,5	23	10,6
243x	356	8,4	neg		neg		neg	
729x	110	17,0	neg		neg		neg	
2187x	41	21,6	neg		neg		neg	
6561x	15	22,9	neg		neg		neg	
19683x	neg		neg		neg		neg	
59049x	neg		neg		neg		neg	
177147x	neg		neg		neg		neg	
531441x	neg		neg		neg		neg	

Preglednica 31: Rezultati analize redčitvene vrste skupne pozitivne kontrole z MEQ2
 Table 31: Results of analysis of serial dilution of positive control with MEQ2

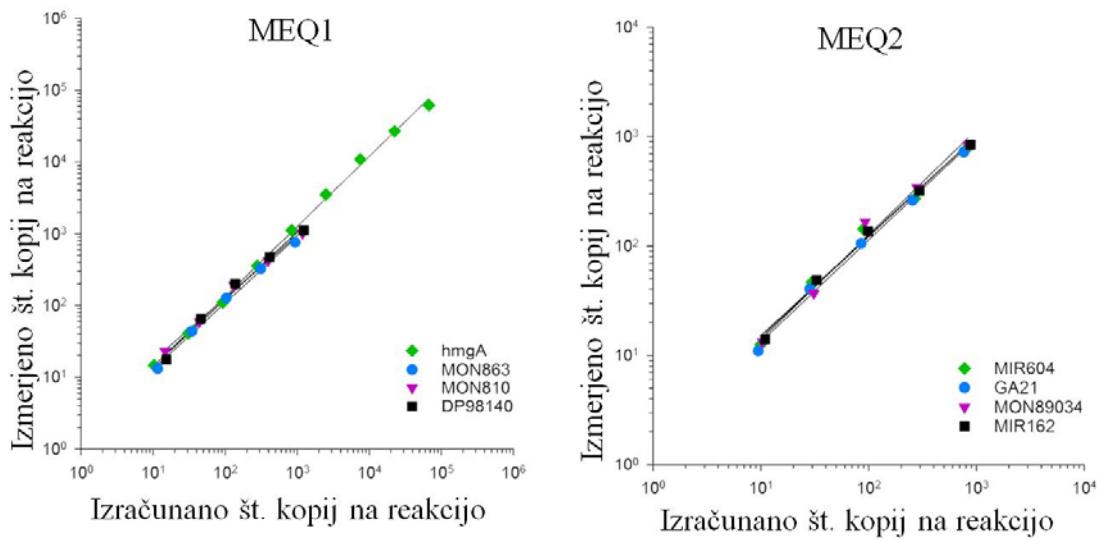
Redčina	MON89034		MIR604		MIR162		GA21	
	Povprečno št. kopij	cv %						
1x	849	3,8	769	7,2	848	6	721	2,6
3x	344	5,9	272	6,7	319	9	261	5,9
9x	166	6,1	143	7,2	137	11	106	22,5
27x	37	20,3	47	16,2	49	22	40	20,4
81x	13	21,7	12	11,7	14	37	11	19,4
243x	neg		neg		neg		neg	
729x	0,7	223,6	0,7	223,6	0,7	136,9	1,0	223,6
2187x	1,1	150,9	0,0		0,0		0,4	223,6
6561x	0,0		0,0		0,4	223,6	0,0	

Preglednica 32: Deleži GSO v redčinah redčitvene vrste skupne kontrole
 Table 32: GM percentage in serial dilution of positive control

	MON863		DP98140		MON810		MON89034		MIR604		MIR162		GA21	
redčina	%	cv (%)	%	cv (%)	%	cv (%)	%	cv (%)	%	cv (%)	%	cv (%)	%	cv (%)
1x	1,2	3,1	1,9	6,7	1,6	5,1	1,4	8,2	1,2	13,8	1,4	11,8	1,1	9,2
3x	1,2	8,8	1,8	6,4	1,5	7,6	1,3	9,8	1,0	3,7	1,2	9,2	1,0	6,9
9x	1,2	15,8	1,9	19,8	1,8	11,2	1,5	5,7	1,3	7,1	1,3	9,6	1,0	23,0
27x	1,2	12,8	1,9	9,0	1,7	11,3	1,3	31,2	1,2	29,5	1,4	23,0	1,1	21,5
81x	1,2	50,3	1,6	22,1	1,8	28,8	1,2	18,0	1,1	13,8	1,2	38,0	1,0	17,3
243x	0,8	112,2	1,7	37,1	1,8	42,1	0,9	34,4	1,1	80,5	1,3	56,7	0,7	87,0
729x	1,2	94,5	1,2	95,6	1,8	63,9	0,6	223,6	0,7	223,6	0,7	142,0	1,0	223,6
2187x	2,2	223,6	1,1	223,6	0,0	/	2,3	142,9	0,0	/	0,0	/	0,7	223,6
6561x	0,0	/	6,2	146,0	4,4	223,6	0,0	/	0,0	/	2,2	223,6	0,0	/

Preglednica 33: LOD in LOQ za posamezna tarčna zaporedja v kopijah na reakcijo
 Table 33: LOD and LOQ for different amplicons in copies per reaction

Tarčno zaporedje	LOD	LOQ
HmgA	15	15
MON863	13	44
DP98140	18	18
MON810	23	23
MON89034	13	13
MIR604	13	13
MIR162	14	49
GA21	11	11



Slika 16: Linearnost pomnoževanja tarčnih zaporedij znotraj dinamičnega območja.

Figure 16: Linearity of amplicon amplification in the dynamic range.

4.2.4 Ponovljivost več tarčne metode ddPCR

Za preverjanje ponovljivosti smo uporabili podatke iz meritev dinamičnega območja, ki so bile opravljene v ponovljivih pogojih. Cv meritev za vsa tarčna zaporedja v 1x, 3x in 9x redčinah je pod 25 % tako za št. kopij tarčnih zaporedij (Preglednica 30 in Preglednica 31) kot tudi za rezultate kvantitativne analize za vse analizirane GS linije (Preglednica 32).

4.2.5 Resničnost meritev več tarčne metode ddPCR

Resničnost meritev več tarčne metode smo preverili na skupni pozitivni kontroli, ki smo jo analizirali s qPCR in več tarčno analizo ddPCR (Preglednica 35), prav tako smo jo analizirali tudi z eno tarčnimi metodami ddPCR (Preglednica 29). Rezultate analize s qPCR smo v enote cp/cp pretvorili glede na cp/cp razmerje uporabljenih referenčnih materialov.

Preglednica 34: Primerjava rezultatov kvantifikacije s qPCR in z več tarčno metodo ddPCR (cp/cp)
 Table 34: GMO % in positive control, measured by qPCR and multitarget ddPCR (cp/cp)

Tarčno zaporedje	Delež GSO (%)		Razlika med qPCR in ddPCR (%)
	qPCR	ddPCR	
MON863	1,4	1,2	-12,9
DP98140	1,6	1,8	13,4
MON810	1,6	1,7	8,0
MON89034	1,2	1,3	8,4
MIR604	1,0	1,2	19,7
MIR162	1,2	1,3	6,4
GA21	1,0	1,0	4,5

Analizirali smo tudi vzorce iz medlaboratorijskih primerjav. Kot pravo vrednost smo upoštevali povprečje poročanih rezultatov udeleženih laboratorijev. Rezultate ddPCR smo iz enote cp/cp v m/m pretvorili s faktorjem 0,5 (Preglednica 35).

Preglednica 35: Resničnost več tarčne metode ddPCR (m/m)
 Table 35: Trueness of multitarget ddPCR method (m/m)

Vzorec	Tarčno zaporedje	Prava vrednost (%)	delež GS ddPCR (%)	Razlika prava vrednost - ddPCR (%)
181/08	MON863	0,56	0,46	-16,7
	MON810	0,13	0,04	-68,3
	MIR604	1,10	0,93	-14,7
	GA21	0,35	0,22	-37,0
188/09	MON810	0,63	0,55	-13,0
	MIR604	0,39	0,40	0,7
	GA21	0,19	0,21	7,6
190/09	MON863	0,62	0,70	12,7
	MON810	0,53	0,43	-19,3
	MIR604	0,09	0,07	-23,2
	GA21	0,29	0,34	17,4

Vzorca iz rutinskih analiz smo analizirali še z več tarčno ddPCR metodo (Preglednica 36). Rezultate, izmerjene z ddPCR smo pretvorili v m/m z uporabo faktorja 0,5 ter z uporabo razmerja GS : referenčni gen uporabljenih referenčnih materialov v analizi qPCR.

Preglednica 36: Rezultati kvantifikacije vzorcev s qPCR in več tarčno metodo ddPCR (m/m)
 Table 36: Results of quantitative analysis of samples with qPCR and multitarget ddPCR (m/m)

Vzorec	Tarčno zaporedje	Delež GSO (qPCR) (%)	Delež GSO (ddPCR), faktor 0,5 (%)	Razlika ddPCR (0,5) - qPCR (%)	Delež GSO (ddPCR), faktor RM (%)	Razlika ddPCR (RM) - qPCR (%)
G187/14	MON810	27	20	-26	26	-5,2
	MON89034	54	81	50	67	23,4
	DP98140	/	0,2	/	0,1	/
G189/14	MON810	62	57	-7,7	73	18,4
	MON89034	36	42	17	37	-3,9
	DP98140	/	0,6	/	0,4	/

4.2.6 Specifičnost

Specifičnost smo preverili na mešanicah DNA, kjer ni bilo dodanega enega referenčnega materiala. Rezultati so zbrani v Preglednici 37 (0 cp).

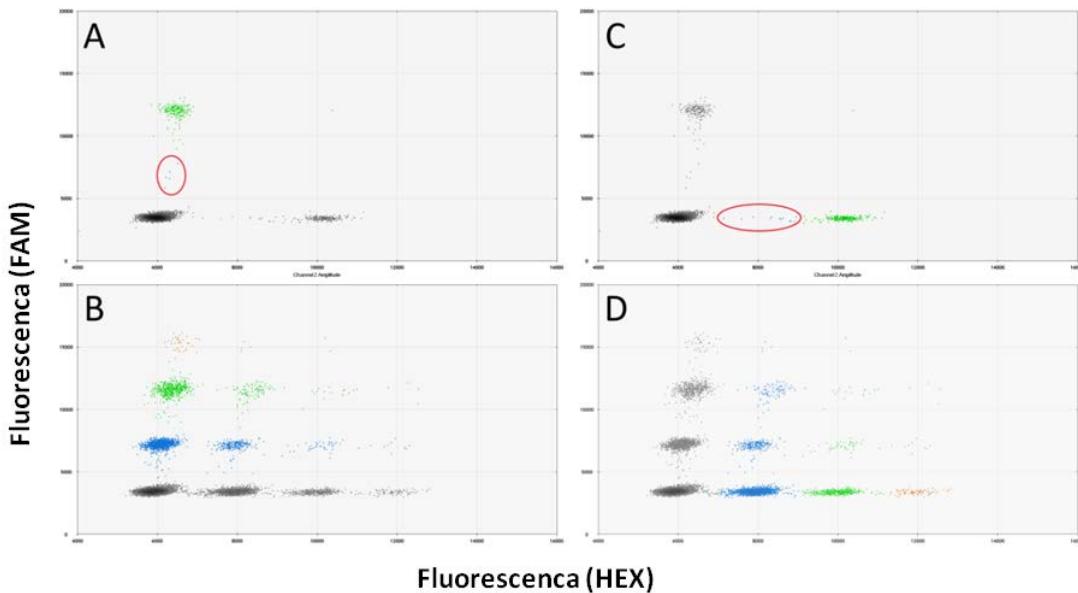
Preglednica 37: Izmerjeno št. kopij v reakcijah brez ali z nizko količino posameznega tarčnega zaporedja.
 Table 37: Measured copy number per reaction in reaction without measured amplicon or with low copy number of particular amplicon.

		Št. kopij na reakcijo		
		0 cp	20 cp	40 cp
MEQ1	MON863	0	14	31
	DP98140	2a	30	39
	MON810	0	22	36
MEQ2	MON89034	11	22	42
	MIR604	0	12	19
	MIR162	28	43	129
	GA21	0	7	26

a – ena reakcija je bila negativna, v eni smo namerili 4 kopije na reakcijo.

Pri tarčnih zaporedjih iz klastrov z nizko fluorescenco (DP98140 v MEQ1, MON89034 in MIR162 v MEQ2) se pojavljajo lažno pozitivni rezultati v višini približno 1% pozitivnih kapljic klastra z višjo fluorescenco. Ko je št. kopij tarčnega zaporedja z močnejšo fluorescenco manj kot 300 kopij na reakcijo, lažno pozitivni rezultati izginejo. To se dogaja zaradi manjšega števila kapljic, ki so sicer pozitivne za tarčno zaporedje z višjo fluorescenco, vendar pomnoževanje DNA ni bilo optimalno in je njihova fluorescanca na nivoju skupine kapljic, ki so pozitivne za tarčno zaporedje z nižjo fluorescenco. Na Sliki 17 (A in B) tako lahko na primeru FAM kanala MEQ2 vidimo, kako kapljice, pozitivne za

MIR604, padejo v območje kapljic, pozitivnih za MON89034 oz. kako v HEX kanalu kapljice, pozitivne za GA21 padejo v območje kapljic, pozitivnih za MIR162 (Slika 17, C in D). Lažno pozitivnih rezultatov za MON863 v MEQ1 ni mogoče videti, ker je tarčno zaporedje HmgA zmeraj prisotno.



Slika 17: Primer lažno pozitivnih rezultatov za MEQ2. A) Oznaka prikazuje kapljice tarčnega zaporedja z visoko fluorescenco FAM, v katerih pomnoževanje ni bilo ustrezeno, zato imajo nižjo fluorescenco in padejo v območje kapljic tarčnega zaporedja z nizko fluorescenco FAM (B). C) Oznaka prikazuje kapljice tarčnega zaporedja z visoko fluorescenco HEX, v katerih pomnoževanje ni bilo ustrezeno, zato imajo nižjo fluorescenco in padejo v območje kapljic tarčnega zaporedja z nizko fluorescenco HEX (D).

Figure 17: Example of false positive signal in the case of MTQ2 assay. A) Ellipse marks droplets with high FAM fluorescence amplicons and low amplification efficiency resulting in a fluorescence intensity that is characteristic for droplets with low FAM fluorescence amplicons (B). C) Ellipse marks droplets with high HEX fluorescence amplicons and low amplification efficiency resulting in a fluorescence intensity that is characteristic for droplets with low HEX fluorescence amplicons (D).

4.2.7 Asimetrična meja detekcije (LODasym) več tarčne metode ddPCR

V več tarčnih analizah lahko visoka vsebnost ene tarče zamaskira prisotnost druge tarče, ki je prisotna v nizki količini. Zato smo delovanje več tarčne analize preverili na mešanicah DNA, kjer smo št. kopij enega tarčnega zaporedja zmanjšali na 20 oz. 40 kopij na reakcijo, povprečno število ostalih posameznih pa je bilo med 13000 in 56000. V vseh primerih smo zaznali prisotnost tarčnega zaporedja z nizko vsebnostjo (Preglednica 37 (20 cp, 40 cp)). LODasym je tako med 1,5/1000 in 3,6/10000.

4.2.8 Uporabnost več tarčne metode ddPCR

Vzorca moke iz medlaboratorijskih primerjav in dva vzorca iz rutinskih analiz, ki sta vsebovala GS koruzi MON810 in MON89034 (Preglednica 10), smo analizirali z več tarčno metodo ddPCR. Podatke smo uporabili tudi za preverjanje resničnosti (Preglednica 35 in Preglednica 36).

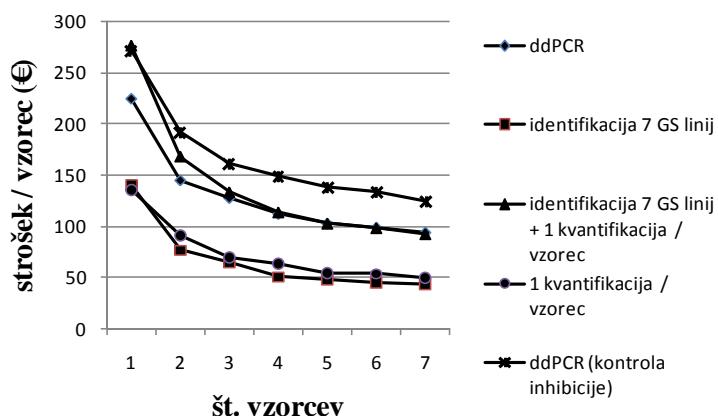
4.2.9 Praktičnost več tarčne metode ddPCR

Primerjali smo strošek analize s qPCR in ddPCR. V izračunu smo vključili potreben čas, kemikalije in potrošni material. Primerjali smo strošek analize 1 - 7 vzorcev z več tarčno ddPCR metodo in sicer brez redčine za kontrolo inhibicije in z njo, s stroškom identifikacije 7 linij GS koruz s qPCR, s kvantifikacijo ene GS koruze s qPCR in z identifikacijo ter nato kvantifikacijo ene linije GS koruze (Preglednica 38).

Preglednica 38: Stroški analize 1 - 7 vzorcev z ddPCR in qPCR (€)
Table 38: Cost of analysis of 1 - 7 samples with multitarget ddPCR and qPCR (€)

Vrsta analize	Št. vzorcev						
	1	2	3	4	5	6	7
ddPCR	225	146	128	113	103	99	95
ddPCR (s kontrolo inhibicije)	271	192	161	149	139	135	125
identifikacija 7 GS linij	141	77	64	51	49	46	44
1 kvantifikacija / vzorec	135	91	69	64	55	53	50
identifikacija 7 GS linij + 1 kvantifikacija / vzorec	276	169	134	114	103	99	93

Pri vseh metodah strošek hitro pada z večanjem števila hkrati analiziranih vzorcev (Slika 18).



Slika 18: Nižanje stroška analize na vzorec z večanjem števila hkrati analiziranih vzorcev.
Figure 18: Reduction of cost per sample when analysing more samples in parallel.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Najbolj razširjena metoda za določanje GSO je qPCR. Laboratoriji za uradno kontrolo uporabljajo metode, ki jih EURL-GMFF pred odobritvijo GSO za trženje validira in preveri njihovo praktičnost, uporabnost, specifičnost, dinamični razpon metode, resničnost meritev, natančnost metode, mejo detekcije, mejo kvantifikacije, robustnost, obnovljivost, stopnjo lažno pozitivnih rezultatov, stopnjo lažno negativnih rezultatov ter verjetnost detekcije. dPCR se za določanje GSO ni uporabljal zaradi visokih stroškov analize ter ne dovolj širokega dinamičnega območja. Najnovejša izvedba dPCR, kapljična digitalna PCR, je določanje GSO postavila pred izziv, saj teoretično obeta rešitev večih težav, s katerimi se srečujemo pri uporabi metode qPCR. Tako ima sistem QX100TM večji dinamičen razpon, omogoča vzporedno analizo večjega števila vzorcev, je cenovno ugodnejši od prejšnjih izvedb dPCR in tudi cena analiz je nižja. EURL-GMFF sicer med pogoji za sprejem metode v validacijo preveri tudi ali je za uvedbo metode potrebno v laboratoriju izvesti nabavo nove opreme. V primeru metode ddPCR je res tako, da je potreben nakup opreme, kar predstavlja precejšen strošek. Metoda ddPCR je kljub temu zelo vabljiva za laboratorije, saj predstavlja le novo izvedbo že poznane in uporabljane tehnologije PCR. Metoda ddPCR še ni bila preizkušena na vzorcih hrane ali krme, zato smo se odločili na primeru določanja GS koruze MON810 razviti to možnost uporabe ddPCR za analize.

V nalogi smo razvili metodo ddPCR za določanje gensko spremenjene koruze MON810. Preverili smo parametre, ki jih EURL-GMFF predлага za validacijo metod in so splošno sprejeti (Definition ..., 2015). Primerjali smo jo z trenutno najbolj uporabljanou metodo za določanje GSO qPCR.

Metodo ddPCR smo nato še dodatno nadgradili in razvili več tarčno metodo za določanje 7 gensko spremenjenih linij koruze v dveh štiri tarčnih reakcijah ddPCR.

5.1.1 Razvoj dvo tarčne metode ddPCR za določanje GS koruze MON810

Za razvoj dvo tarčne metode ddPCR smo izbrali GS koruzo MON810. Za MON810 smo se odločili, ker je edina GS rastlina, ki se jo goji v Evropi, ker je na voljo referenčni material v obliki moke, ki je certificiran za delež GSO v obeh uporabljenih merskih enotah, to je m/m in cp/cp, ker je bil že analiziran z dPCR ter je na voljo plazmidni RM (Preglednica 1).

Vzorce rutinskih analiz smo ponovno analizirali s qPCR z metodo QT-EVE-ZM-020, da preverimo primerljivost rezultatov oz. metod. Rezultati analize vzorcev (Preglednica 12) so bili primerljivi in nadaljevali smo s preverjanjem metode ddPCR.

Več RM smo analizirali v eni analizi qPCR, pri tem smo kot referenčne vrednosti uporabili tako mersko enoto m/m, za katero so certificirani vsi RM v obliki moke, pri dveh smo pa

uporabili tudi referenčno vrednost v cp/cp. Iz rezultatov (Preglednica 13) je razvidno, da se izmerjene vrednosti za RM in vzorce v enotah m/m močno razlikujejo, in sicer skoraj za 2x, če kot kalibratorja uporabimo ERM-BF413gk oz. ERM-BF413ek ali pa če uporabimo ERM-BF413f oz. ERM-BF413d. Razlika nastane zaradi drugačnega razmerja med kopijami MON810 in kopijami referečnega gena ob sicer enakem oz. primerljivem masnem deležu (Preglednica 1, Holst-Jensen in sod., 2006). Uporabljeni RM pripadajo dvema serijama RM, od katerih je donor genske spremembe v primeru ERM-BF413gk oz. ERM-BF413ek ženska rastlina, v primeru ERM-BF413f oz. ERM-BF413d pa moška rastlina. Za isti vzorec lahko torej z uporabo različnih RM dobimo različne rezultate. Če iste RM uporabimo kot kalibratorje z njihovimi referenčnimi vrednostmi v cp/cp, so razlike precej manjše, prav tako so rezultati podobnih vrednosti, če kot kalibrant uporabimo plazmidni referenčni material ERM-AD413. Ti rezultati pritrjujejo ugotovitvam Trapmann in sod. (2010), da imajo rezultati v merski enoti cp/cp večjo meroslovno vrednost, kar meritvam z ddPCR dviguje vrednost, saj so pridobljeni rezultati v enoti cp/cp.

Več tarčni način analize je izboljšava zaradi manjše porabe kemikalij in časa in QX100 sistem omogoča izvedbo dvo tarčnega načina analize z različno označenimi sondami. Preverili smo, ali uporabljeni seta kemikalij za referenčni gen in MON810 lahko v dvo tarčnem načinu uporabimo tudi z qPCR. Ugotovili smo, da več tarčen način močno vpliva na MON810 (Preglednica 14, Slika 5), ne pa na referenčni gen HmgA in kljub spremjanju koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond dvo tarčen način s qPCR ni deloval (Preglednica 15).

Delovanje ddPCR metode smo v skladu z navodili proizvajalca sistema QX100TM preverili v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu, in sicer smo analizirali RM ERM-BF413ek, ki je certificiran za cp/cp, in sicer je razmerje MON810:HmgA $0,77\% \pm 0,08\%$. Rezultati eno tarčnega načina (0,68 %) so se bolj razlikovali od certificirane vrednosti kot rezultati dvo tarčnega načina (0,72 %). Razlika je morda nastala zaradi ločene priprave reakcij v eno tarčnem načinu. Pri dvo tarčnem načinu zaradi ene reakcije ni razlik zaradi pipetiranja. Koeficient variabilnosti št. kopij za eno tarčen in dvo tarčen način je prav tako zelo podoben za HmgA in MON810 (Preglednica 16). Tudi v jakosti fluorescence ni bilo bistvenih razlik (Slika 6, Slika 7). Izvedba dvo tarčne analize z ddPCR se je izkazala za uspešno, saj ni bilo razlike ne v absolutnem številu izmerjenih kopij, ne v izmerjenem deležu MON810. Köppel in Bucher (2015) sta primerjala eno tarčen in dvo tarčen način analize ter potrdila naše ugotovitve o ustreznom delovanju dvo tarčne metode ddPCR. Vse nadaljnje analize smo nato izvajali v dvo tarčnem načinu.

Proizvajalec sistema za pripravo in analizo ddPCR priporoča restrikcijo genomske DNA z endorestriktazami, vendar smo tako za genomsko DNA kot za plazmid ugotovili, da uporaba restrikcije ni bila nujna, saj so bili rezultati primerljivi (Preglednica 18, Preglednica 19, Slika 9). Število kopij po restrikciji je sicer nekoliko nižje za HmgA in MON810, delež MON810 je pa primerljiv. Razlog so verjetno dodatni koraki v pripravi

restrikcijske mešanice pred in po restrikciji. Tudi Köppel in Bucher (2015) ter Köppel in sod. (2015) so analizirali nerazrezano DNA soje in koruze z ustreznimi rezultati. Pri plazmidni DNA se pojavlja veliko kapljic z neustreznim pomnoževanjem, in sicer pred in po restrikciji (Slika 10). Neustrezeno pomnoževanje plazmidne DNA brez restrikcije so pri uporabi obeh platform ddPCR opazili tudi Dong in sod. (2015), medtem ko pri cdPCR ni bilo razlik.

Metodo smo brez restrikcije preverjali tudi na pravih vzorcih s sprejemljivimi rezultati, če bi se začele pojavljati kapljice z neoptimalnim pomnoževanjem, bi pa morda bilo analizo kakšnega vzorca bolje narediti z restrikcijo.

Specifičnost metode oz. začetnih oligonukleotidov za določanje MON810 so preverili že pri prijavitelju GS koruze MON810 in v EURL-GMFF (Mazzara in sod., 2009). Ker nismo spreminali koncentracij začetnih oligonukleotidov in temperaturnega programa PCR, smatramo, da je metoda enako specifična kot ko se uporablja v qPCR. Z analizo vzorca koruze, ki ne vsebuje MON810, smo preverili, da kemikalije MON810 slučajno ne reagirajo z DNA koruze, z analizo vzorca mleka, pa smo pokazali, da metoda nima lažno pozitivnih rezultatov za nesorodno DNA. V več primerih se je sicer pojavila ena pozitivna kapljica na reakcijo, vendar pa kot pozitivno reakcijo upoštevamo reakcijo šele, ko ima vsaj dve pozitivni kapljici (Preglednica 20).

Za določitev dinamičnega območja metode, določitve LOD in LOQ smo analizirali redčitveno vrsto DNA referenčnega materiala ERM-BF413gk (9,9 % MON810 m/m) v petih ponovitvah. Kot pozitivne reakcije smo upoštevali tiste reakcije, ki so imele vsaj dve pozitivni kapljici. Iz rezultatov analize redčitvene vrste (Preglednica 21) smo določili dinamično območje za HmgA med 5 in 117000 kopijami na reakcijo, za MON810 pa med 18 in 4340 kopijami na reakcijo. Metoda je linear na obe tarči čez celotno območje, R^2 je za obe tarči 0,999 (Slika 11, Slika 12). Predvidevamo, da bi v primeru analize vzorca s 100 % vsebnostjo MON810, linearost za MON810 bila podobna kot za HmgA, vendar takšnega RM ni na voljo. Delež MON810 je ustrezan čez celotno dinamično območje metode, cv je manjši od 25 % dokler je tudi cv določanja št. kopij tarčnih zaporedij ustrezan, to je 18 kopij na reakcijo za MON810.

LOD smo določili 5 kopij na reakcijo za HmgA in 6 kopij na reakcijo za MON810. qPCR metode, ki jih uporabljamo za analize, imajo LOD 2 kopiji na reakcijo, torej je ddPCR nekoliko manj občutljiv. To lahko razložimo z manjšim volumnom dejansko analizirane reakcije, prav tako je kakšna reakcija z eno pozitivno kapljico morda resnično pozitivna in vsebuje tarčno zaporedje. Podobno LOD so določili Pavšič in sod (2016), ko so za qPCR določili LOD 2,8 kopije tarčnega zaporedja, značilnega za citomegalovirus, na reakcijo, za QX100™ sistem ddPCR pa 5,7 kopij na reakcijo. Kljub temu je LOD pod mejo 25 kopij, kar je kot sprejemljivo določeno tudi v dokumentu o minimalnih zahtevah za metode določanja GSO (Definition ..., 2015).

LOQ metode za HmgA je bila določena pri 5 kopijah HmgA in pri 18 kopijah MON810, kar je v skladu z Definition ... (2015), ki kot mejo sprejemljivosti metode določa LOQ pri 50 tarčnih zaporedjih na reakcijo. Čeprav so Pavšič in sod. (2016) kot teoretičen LOQ za ddPCR sistem QX100™ izračunali 28 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo, za metodo določanja citomegalovirusa pa določili LOQ 55 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo, so bili naši rezultati ustrezní že pri manjšem številu kopij tarčnega zaporedja na reakcijo.

Za preverjanje resničnosti meritev z metodo ddPCR smo analizirali štiri RM. Dva sta certificirana za cp/cp, za dva smo pa razmerje preračunali glede na razmerje cp/cp CRM iz iste serije. Rezultati ddPCR metode so bili največ 9% drugačni od certificirane vrednosti, kar je znotraj sprejemljivih 25 % (Preglednica 22). Köppel in Bucher (2015) sta za referenčni material ERM-BF413f (2,85 % MON810 cp/cp) s sistemom za ddPCR QX200™ izmerila podobno vrednost (3,0 %) kot mi (2,9 %). Corbisier in sod. (2010) so za referenčni material ERM-BF413d s certificirano vrednostjo 0,57 % cp/cp izmerili 0,39 % cp/cp, kar je večji odmik (-32 %) od prave vrednosti, kot rezultat metode ddPCR, s katero smo izmerili 8 % višji delež MON810 cp/cp (0,62 % cp/cp). Prav tako so bili ustrezní rezultati vzorcev, razen za vzorec G147/08, kjer je bila razlika -26,7 %, je pa z ddPCR izmerjena vrednost še zmeraj znotraj meritve s qPCR.

Za preverjanje ponovljivosti metode smo analizirali RM ERM-BF413eg s 5 kartušami oz. 35 reakcijami (Preglednica 23). Cv št. kopij HmgA je bil največ 2,1 % za eno kartušo, skupni pa 1,9 %. Za MON810 so bile vrednosti cv višje in sicer največ 8,2 % znotraj ene kartuše, skupni cv pa je bil 7,7 %. Podobno je bilo z izračunom deleža MON810, za katerega je bil največji cv znotraj kartuše 8,0 %, skupni cv pa je bil 7,3 %, kar je vse pod 25 %.

Uporabnost metode ddPCR smo preverili na različnih tipih vzorcev. Največ je bilo koruznih mok, analizirali smo pa tudi pšenično moko s sledovi koruze MON810, koruzne kosmiče in krmo, ki je vsebovala tudi GS korizo MON810. Razen za vzorec pšenične moke s sledovi koruze MON810 (vzorec G147/08), ki je malenkost čez mejo 25 %, so bili rezultati ustrezní (Preglednica 24). Rezultati ddPCR za RM so manj odstopali od pravih vrednosti kot rezultati qPCR.

Vzorca G147/08 in G254/11 smo izbrali, ker sta bila v analizah s qPCR močno inhibirana in smo z redčenjem DNA inhibitorje toliko razredčili, da je bilo pomnoževanje ustrezeno. Rezultati iz dveh redčin se za oba vzorca močno razlikujejo (Preglednica 25). Ko smo obe redčini analizirali z ddPCR, so bili rezultati primerljivi pri obeh redčinah, kar pomeni, da inhibicija ni imela vpliva na rezultat. To je pomembno, saj pogosto zaradi nizke količine GSO v vzorcu, DNA vzorca ne moremo preveč redčiti, ker s tem tudi količino tarčnih zaporedij razredčimo pod LOQ. Večja odpornost na inhibitorje PCR je pomembna prednost ddPCR pred qPCR.

V skladu z zahtevami za praktičnost v Definition ... (2015) mora biti metoda po stroških primerljiva z ostalimi metodami za podoben namen, prav tako ne sme zahtevati nakupa dodatne drage opreme za izvajanje analiz. Za izvedbo ddPCR je sicer potreben nakup sistema, kar predstavlja precejšen strošek, vendar je oprema uporabna tudi za analize drugih analitov oz. za drugačne analize.

Za laboratorije so stroški izvajanja analiz pogosto pomembnejši od stroška nakupa opreme. Zato smo primerjali ceno analize ddPCR s ceno analize qPCR (Preglednica 26). Pri primerjavi nismo upoštevali osamitve DNA ter morebitnih predhodnih analiz. Izračunali smo strošek analize za 1-7 vzorcev, ki jih analiziramo hkrati. Strošek analize ddPCR, kjer ne uporabljamo kontrole inhibicije je, razen pri analizi enega vzorca, primerljiva s stroškom za qPCR analizo. Takšen pristop bi lahko uporabljal za vzorce, za katere vemo, da z uporabljenim metodo dobimo DNA brez inhibitorjev. S qPCR metodo je kljub temu potrebno uporabljati kontrole inhibicije, saj je potrebno primerjati podobnost učinkovitosti med RM in vzorcem. Za neznane tipe vzorcev bi bilo pa tudi za analizo z ddPCR potrebno uporabiti vsaj eno redčino osamljene DNA vzorca, kar nekoliko podraži analizo ddPCR, ki pa se pri večjem številu analiziranih vzorcev kljub temu približa ceni za qPCR (Slika 18). Ker je ddPCR manj občutljiv na inhibitorje, predvidevamo, da bi bilo potrebnih manj ponovitev analize zaradi neustreznega pomnoževanja DNA, kar bi strošek analize z ddPCR znižalo pod strošek za qPCR. Zaenkrat ddPCR še ni uporabljan v rutinskih analizah, zato o tem le sklepamo. qPCR je precej uporabljana metoda, zato so stroški že zaradi množičnosti proizvodnje kemikalij in potrošnega materiala lahko nižji, s širjenjem uporabe ddPCR pa lahko pričakujemo tudi manjše cene kemikalij in potrošnega materiala za ddPCR. Zaključimo lahko, podobno kot Köppel in sod. (2015) in Demeke in sod. (2014), da je ddPCR stroškovno nekoliko slabši kot qPCR.

5.1.2 Razvoj novega pristopa za hkratno določanje 7 GS linij koruze z ddPCR

Pri razvoju metode za hkratno določanje 7 GS linij koruze smo uporabili pristop določanja večih tarčnih zaporedij DNA z ločevanjem na osnovi različne jakosti fluorescence za posamezno tarčo v plato fazni PCR, in sicer z zaznavanjem v dveh delih svetlobnega spektra. Za vsak del uporabimo kemikalije za določanje dveh tarčnih zaporedij v različnih koncentracijah, z enako označeno sondijo. Zaradi različne koncentracije kemikalij je jakost fluorescence odvisna od vrste tarče v kapljici. Ker uporabimo dve barvili za označevanje sond, lahko v eni reakciji določamo 4 tarčna zaporedja. Takšna uporaba sistema za ddPCR še ni bila opisana v literaturi. Metodo smo preverili za določanje GS linij koruze.

Ker je za določanje deleža GSO potrebna primerjava količine GS zaporedja in referenčnega gena, je eno od tarčnih zaporedij referenčni gen (HmgA), druga tarčna zaporedja pa so GS zaporedja. Izbor tarč je temeljil na vsebnosti presejalnih elementov. Vse GS linije, ki jih zaznava več tarčna metoda vsebujejo promoter 35S iz mozaičnega virusa cvetače (CaMV) in/ali terminator NOS iz bakterije *A. tumefaciens*. Za tak izbor smo se odločili zaradi pogosto pozitivnega rezultata presejalne analize na p35S in tNOS, ki je

posledica nenamerne prisotnosti GS soje MON-Ø4Ø32-6 (MON40-3-2), ki vsebuje oba presejalna elementa. S to metodo bi tako v v enem koraku izvedli identifikacijo in določili delež GS koruz, če bi bile prisotne v vzorcu. Tekom razvoja metode je prijavitelj GS linije koruze DP98140 umaknil prijavo, tako da ta linija GS koruze ni več v postopku odobritve.

RM za posamezne GS linije smo analizirali z ddPCR v eno tarčnem načinu, pri čemer smo uporabili različne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond (Preglednica 27). Nato smo glede na jakost fluorescence za posamezno tarčno zaporedje sestavili več tarčni reakciji tako, da lahko ločujemo kapljice, ki vsebujejo različna tarčna zaporedja oz. kombinacije tarčnih zaporedij. Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond, uporabljenih za več tarčno metodo, so navedene v Preglednici 28. Reakcijam smo tarče oz. začetne oligonukleotide dodajali postopoma, da smo sproti preverjali delovanje več tarčnega načina (Slika 14). Slika 15 na primeru MEQ1 prikazuje razpored skupin kapljic s podobno fluorescenco in katera tarčna zaporedja vsebujejo te skupine in potrjuje, da je mogoče določati 4 tarčna zaporedja z uporabo dveh reporterskih barvil.

Programska oprema instrumenta omogoča le en izvoz podatkov za oba kanala naenkrat, zato smo morali spremnjati mejno vrednost za skupine kapljic z enako fluorescenco in trikrat izvoziti podatke (Slika 4) ter nato v Microsoft Excelu izračunati količino posameznega tarčnega zaporedja v reakciji po enačbah ... (3), ... (4) in ... (5). Število posameznega tarčnega zaporedja v reakciji smo v skladu z ugotovitvami Corbisier in sod. (2015) glede neustrezne vrednosti za volumen kapljic v programski opremi računali sami iz števila pozitivnih in negativnih kapljic.

RM smo najprej analizirali z eno tarčnim načinom ddPCR, nato pa na osnovi teh rezultatov pripravili skupno pozitivno kontrolo, ki je vsebovala vse GS linije v koncentracijah okrog 1%. Skupno pozitivno kontrolo smo nato analizirali z ddPCR v eno tarčnem načinu in v več tarčnem načinu. Rezultate eno tarčnega načina smo upoštevali kot prave vrednosti in jih primerjali z rezultati več tarčne analize. Primerjava rezultatov izmerjenega št. tarčnih zaporedij na reakcijo je pokazala ustrezno delovanje več tarčne metode, saj je bila največja razlika v številu tarčnih zaporedij 19,4 %. Rezultati deležev posamezne GS linije so se razlikovali za največ 12,2 %. Razliko med 19,4 % in 12,2 % lahko razložimo z napako pri pipetiranju.

Dinamično območje metode smo določali z analizo redčin skupne pozitivne kontrole. Za vsa tarčna zaporedja je metoda linearna (R^2 za vsa tarčna zaporedja je $> 0,98$) v preverjanem območju do LOQ, to je med približno 755 do 1119 kopijami posameznih GS tarčnih zaporedij oz. 62000 kopijami referenčnega gena in med LOQ za posamezna tarčna zaporedja (Preglednica 30, Preglednica 31, Slika 16).

LOQ je sicer zelo blizu meje sprejemljivosti (50 kopij na reakcijo) za tarčni zaporedji MON863 in MIR162, 44 kopij oz. 49 kopij tarčnega zaporedja na reakcijo (Preglednica 33). LOD metode je prav tako ustrezen za vsa tarčna zaporedja, saj je najvišji 23 kopij na

reakcijo za MON810, ostali so pa nižji (Preglednica 33). LOD in LOQ sta sicer še v mejah sprejemljivosti, vendar je razlika med dvo tarčno metodo ddPCR kar precejšnja, saj sta bili LOD in LOQ za MON810 6 oz. 18 kopij, za HmgA pa 5 kopij. Tako LOD kot LOQ več tarčne metode se skladajo z izračuni Pavšiča in sod. (2016), po katerih je LOD ddPCR sistema QX100™ 5,3 kopije tarčnega zaporedja, LOQ pa 28 kopij tarčnega zaporedja. Ponovljivost metode smo prav tako ocenjevali iz analize redčin skupne pozitivne kontrole. Metoda je bila za vsa tarčna zaporedja ponovljiva za 1x, 3x in 9x redčino z cv < 25 % tako za izmerjeno št. kopij posameznega tarčnega zaporedja kot tudi za določen delež posamezne GS linije koruze, kar potrjuje ustrezno ponovljivost metode.

Resničnost meritev z več tarčno metodo smo preverili z analizo skupne kontrole, vzorcev medlaboratorijskih primerjav in rutinskih vzorcev, kjer smo določali delež nekaterih GS linij koruze, z metodami qPCR in več tarčno metodo ddPCR. Rezultati primerjave analize skupne pozitivne kontrole so ustrezni, saj so razlike manjše od 25 %. Največja razlika je bila 19,7 % za MIR604.

Pri vzorcih iz medlaboratorijskih primerjav so bili rezultati ustrezni za dva vzorca, za vzorec G181/08 pa so bili neustrezni za MON810 in GA21 in sicer je bila razlika za MON810 -68,3 % za GA21 pa -37%. Kljub veliki razliki pa bi tudi ti rezultati bili ustrezni v okviru medlaboratorijske primerjave. Razlog je morda tudi v uporabi prve serije referenčnega materiala, ki ga proizvaja IRMM, saj je druga serija, ki smo jo uporabili za razvoj več tarčne metode, prišla v uporabo leta 2009, vzorec G181/08 pa je bil analiziran v letu 2008.

Pri vzorcih iz rutinskih analiz smo rezultate meritev z ddPCR v m/m pretvorili z uporabo faktorja 0,5 v skladu z navodili ES Technical ... (2011) ter z faktorjem cp/cp, pridobljenim z meritvami RM z ddPCR. Rezultati so bili ustrezni, razen v enem primeru za MON89034, ko smo uporabili faktor 0,5. Z uporabo prave vrednosti cp/cp za RM so bili rezultati zmeraj znotraj meje 25 %.

Pri analizah teh vzorcev smo opazili tudi lažno pozitivne rezultate za DP98140. Le ti so posledica manjše učinkovitosti pomnoževanja za tarčno zaporedje MON810 v nekaterih kapljicah, kar so opazili že Corbisier in sod. (2010). Fluorescenza teh kapljic zato doseže le nivo, ki je nivo skupine kapljic, pozitivnih za DP98140 (Slika 17).

Specifičnost smo preverili na mešanicah DNA RM, kjer so manjkala posamezna tarčna zaporedja (Preglednica 37). Kot smo ugotovili že pri preverjanju resničnosti meritev, je neustreza učinkovitost pomnoževanja v manjšem deležu kapljic tarčnega zaporedja z višjo fluorescenco povzročila t.i. učinek dežja in lažno pozitivne rezultate za tarčna zaporedja z nizko fluorescenco - DP98140, MON89034 in MIR162. Kljub spremnjanju temperature pomnoževanja, kot priporoča proizvajalec, težave nismo uspeli odstraniti (rezultati niso prikazani). Težava tudi ni odvisna od tarčnega zaporedja, saj smo poskusno zamenjali MON810 in DP98140, vendar je nato visoka vsebnost DP98140 povzročala

lažno pozitivne rezultate za MON810 (rezultati niso prikazani). Pri številu kopij tarčnega zaporedja z višjo fluorescenco pod 300 na reakcijo, se lažno pozitivni rezultati nehajo. Delež lažno pozitivnih kapljic je znašal ~1 %.

Ker je meja označevanja GSO v EU 0,9 %, lažno pozitivni rezultati ne bi predstavljalii težave, saj mora biti delež tarčnega zaporedja z visoko fluorescenco precej nad 0,9 %, ko se začno pojavljati lažno pozitivni rezultati za tarčno zaporedje z nižjo fluorescenco in bi analiziran vzorec v vsakem primeru moral biti označen, da vsebuje GS koruzo. Lahko pa predstavlja težavo, če katera od analiziranih GS koruz ni odobrena za uporabo. To se je zgodilo v primeru koruze DP98140, ki je bila ob pričetku razvoja več tarčne metode ddPCR v postopku odobritve oz. odobrena za uporabo v krmi do deleža 0,1 % m/m, med razvojem metode pa je prijavitelj umaknil vlogo za odobritev in je GS linija koruze DP98140 postala nedovoljena. V tem primeru bi težavo lahko rešili s takšno sestavo več tarčne reakcije, da bi bile kapljice za nedovoljeno linijo DP98140 tiste z visoko fluorescenco, zmeraj pa takšna rešitev ni mogoča. Predlagane rešitve za zmanjšanje "dežja" so še fragmentacija DNA z restrikcijo ali na kakšen drug način, npr. ultrazvokom (Demeke in sod., 2014) in povečanje št. ciklov pomnoževanja, vendar jih zaenkrat še nismo uspeli izvesti.

V več tarčnih analizah lahko visoka vsebnost enega tarčnega zaporedja zamaskira prisotnost drugega, ki je prisotno v nizki količini. Zato smo pripravili takšne mešanice DNA, da je bilo posameznih tarčnih zaporedij 20 oz. 40 kopij na reakcijo, ostalih je bilo pa med 13000 in 56000. V vseh analizah smo zaznali prisotnost tarčnega zaporedja v nizkem številu kopij in določili LODasym.

Z analizo vzorcev iz medlaboratorijskih primerjav in vzorcev iz rutinskih analiz smo preverili uporabnost razvite metode za uporabo v rutinskih laboratorijih. Rezultati resničnosti meritev so bili ustrezni, razen za en vzorec za dve tarčni zaporedji. Analizirani vzorci so bili sicer le moke oz. zmleta zrna, ne pa bolj kompleksni tipi vzorcev kot npr. krma. Ob predpostavki, da je osamljena DNA ustrezne kvalitete, pa pričakujemo ustrezno delovanje tudi za druge tipe vzorcev, kot je npr. krma. Težavo lahko v določenih primerih predstavljajo lažno pozitivni rezultati za tarčna zaporedja z nižjo fluorescenco, vendar pa v primerih analiz, kjer so zmeraj prisotna vsa tarčna zaporedja, to pomeni le 1% napako pri določitvi deleža, kar pa je sprejemljivo.

Meritev količine referenčnega gena v le eni reakciji se je izkazala za ustrezno in omogoča enostavno nadgradnjo metode z dodajanjem dodatnih reakcij, kjer bi lahko v vsaki določali dodatne štiri GS linije.

Pri uvajanju metod v laboratorij je pomemben faktor tudi ekonomika novih metod. qPCR je trenutno metoda za določanje GSO, zato smo primerjali stroške analize vzorcev s qPCR in več tarčno analizo ddPCR. Iz Slike 18 je razvidno, da v obeh primerih cena pada z večanjem števila vzorcev, ki jih analiziramo hkrati. Pri qpCR je tako, ker uporabimo eno

umeritveno krivuljo za več vzorcev, pri ddPCR pa predvsem zaradi manjše porabe časa. Kemikalije za ddPCR so dražje od kemikalij za qPCR, poleg tega so potrebna dodatna olja za pripravo in detekcijo kapljic. Ob tem ceno ddPCR dvigajo še kartuše za pripravo kapljic. Kljub temu je cena za identifikacijo in kvantifikacijo ene linije primerljiva z več tarčno metodo, če ne analiziramo še dodatne redčine, kar bi bilo izvedljivo v primeru, da smo vzorce že pri predhodnih analizah preverili na prisotnost inhibitorjev. Če bi v vzorcih s qPCR analizirali še dodatne linije GS koruz, bi bila metoda ddPCR bolj cenovno učinkovita. Glede na izkušnje je potrebno pogosto ponoviti kvantitativno analizo s qPCR zaradi prevelike razlike v učinkovitosti pomnoževanja med kalibrantom in vzorcem, kar pa v primeru ddPCR metod verjetno ne bi bilo potrebno. Celokupni strošek več analiz bi se tako za qPCR povečal. Če bi želeli določiti delež vseh 7 GS koruz, bi bil pa strošek analize s qPCR precej večji. Zaključimo lahko, da je ob večjem številu pozitivnih vzorcev, ki jih je potrebno kvantificirati, metoda za hkratno določanje 7 GS linij koruze bolj učinkovita kot metoda qPCR.

Več tarčna metoda ddPCR je nadgradljiva, saj lahko z dodatno reakcijo določamo skupaj 11 linij GS koruze, z dodatnima dvema pa 15 linij.

Razvili smo dvo tarčno metodo ddPCR za določanje GS koruze MON810 in več tarčno metodo za določanje 7 linij GS koruze ter potrdili zastavljeni hipotezi.

Dvo tarčna metoda ddPCR za določanje GS koruze MON810 je natančnejša in manj občutljiva na inhibitorje reakcije PCR kot metoda qPCR, priprava analize pa je primerljiva s pripravo analize qPCR, ker za kvantitativno analizo z metodo ddPCR ni potrebna uporaba referenčnega materiala. Je pa metoda ddPCR nekoliko zahtevnejša zaradi koraka priprave kapljic. Metoda ddPCR v skladu z zastavljeno hipotezo omogoča več tarčno analizo ter določanje GSO brez uporabe referenčnega materiala v enotah razmerja kopij transgena in referenčnega gena.

Z več tarčnim pristopom smo uspešno hkrati določili prisotnost in količino 7 linij GS koruz z metodo ddPCR. Večtarčni pristop je enostavnnejši in cenovno ugodnejši od metode qPCR, kadar določamo prisotnost in količino več kot ene linije GS koruze.

Metodi ustrezata parametrom, ki jih za uradne metode določanja GSO predpisuje ES. Obe metodi sta primerni za uporabo v laboratorijih za določanje GSO in sta primerljivi trenutno najbolj uporabljeni metodi qPCR.

5.2 SKLEPI

Razvili smo dvo tarčno metodo ddPCR za določanje GS koruze MON810. Določanje deleža MON810 je ustrezeno brez uporabe kalibranta, rezultati so izraženi v razmerju cp/cp, ki je merslovno ustrenejša merska enota kot m/m. Metoda ima ustrezeno dinamično območje in je manj občutljiva na inhibitorje reakcije PCR kot metoda qPCR. Metoda ddPCR ima višjo mejo detekcije in mejo kvantifikacije kot metoda qPCR. Izvedba metode ddPCR je bolj zapletena kot qPCR, saj je potrebno pripraviti emulzijo kapljic reakcijske mešanice v olju, vendar je potrebno manjše število reakcij, prav tako ni potrebna uporaba kalibranta. Stroškovno je metoda ddPCR primerljiva z qPCR kadar vzporedno analiziramo več vzorcev.

Razvili smo več tarčno metodo ddPCR za določanje 7 linij GS koruze v dveh reakcijah. Z metodo smo uspešno določali in kvantificirali 7 linij GS koruze hkrati. Rezultati so izraženi v merski enoti cp/cp, metoda je linearna v preizkušanem območju, z ustrezeno mejo detekcije in kvantifikacije. Stroškovno je več tarčna metoda primerljiva s qPCR, kadar je ob določanju 7 GS linij potrebna tudi kvantitativna analiza vsaj ene linije. Pojavljanje lažno pozitivnih rezultatov nekoliko zmanjša uporabnost metode za določene vrste analiz.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Uporaba GSO v svetu se povečuje in zaradi zahtev po sledenju in označevanju živil in krme, ki vsebujejo GSO, se povečujejo tudi potrebe laboratorijev za določanje GSO po bolj učinkovitih metodah za analizo prisotnosti GSO. Trenutno najbolj uporabljana metoda za določanje GSO, qPCR, ima nekaj pomanjkljivosti, kot so npr. obvezna uporaba referenčnih materialov v kvantitativnih analizah, občutljivost na inhibitorje reakcije PCR, omejene možnosti več tarčne kvantitativne analize in visoki stroški analize. Razvoj ddPCR ponuja možnost uporabe tehnologije PCR, ki bi odpravila te pomanjkljivosti.

Razvili smo metodo ddPCR za določanje GS koruze MON810, ki je edina GS rastlina, ki se jo goji v Evropi. Metodo smo preverili v eno tarčnem in dvo tarčnem načinu, kjer smo v eni reakciji določali tarčni zaporedji MON810 in referenčnega gena HmgA, značilnega za koruzzo. Ugotovili smo, da lahko metodo uporabljamo v dvo tarčnem načinu, kar z metodo qPCR ni delovalo. Metodo smo validirali v laboratoriju po mednarodnih navodilih. Dvo tarčna metoda se je izkazala za natančno in ponovljivo, rezultati analize RM in znanih vzorcev so bili ustrezni tudi kadar DNA vzorcev nismo predhodno fragmentirali z restrikcijskimi encimi. Za CRM ERM-BF413ek z deležem MON810 $0,77\% \pm 0,08\%$ cp/cp je bil izmerjen delež $0,72\%$ cp/cp, za CRM ERM-BF413d z deležem MON810 $0,57\% \pm 0,17\%$ cp/cp pa je bil izmerjen delež $0,62\%$ cp/cp. LOD dvo tarčne metode ddPCR je bila 5 kopij tarčnega zaporedja HmgA na reakcijo ter 6 kopij MON810, LOQ metode za tarčno zaporedje HmgA je bila 5 kopij na reakcijo in 18 kopij za MON810, kar je pod priporočeno mejo 25 kopij za LOD oz. 50 kopij za LOQ. Dinamično območje metode je bilo med 5 in 117000 tarčnih zaporedij HmgA na reakcijo, za MON810 pa med 18 in 4340 tarčnimi zaporedji. Metoda ddPCR se je izkazala kot manj občutljiva na inhibitorje reakcije PCR, saj smo izmerili ustrezni delež MON810 tudi v vzorcih, kjer kvantitativna analiza s qPCR ni bila mogoča zaradi prisotnosti inhibitorjev reakcije PCR v vzorcu. Rezultati metode ddPCR so v merski enoti cp/cp, ki je iz meroslovnega vidika ustreznejša kot m/m. Stroški analize GSO z metodo ddPCR so primerljivi metodi qPCR, če hkrati analiziramo več vzorcev. Dvo tarčna metoda ddPCR za določanje GS koruze MON810 je primerljiva metodi qPCR in tako primerna za uporabo v laboratorijih za določanje GSO.

Za boljšo učinkovitost analiz smo razvili nov pristop več tarčne metode ddPCR za določanje 7 linij GS koruze (MON863, DP98140, MON810, MON89034, MIR604, MIR162 in GA21) v dveh reakcijah ddPCR. Uporabljen pristop več tarčne analize temelji na uporabi različnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond, ki so enako označene, v eni reakciji ddPCR, kar omogoča določanje štirih tarčnih zaporedij naenkrat v eni reakciji. Z več tarčno metodo smo uspešno določili delež 7 GS linij koruze v pripravljenem vzorcu ter v vzorcih z znanim deležem GS linij koruze. Delež GS koruz v pripravljenem vzorcu, določen z več tarčno metodo, se je za največ $12,2\%$ razlikoval od deležev, določenih z eno tarčnimi metodami ddPCR. Za vsa tarčna zaporedja je LOD med 11 in 23

kopijami, LOQ pa med 11 in 49 kopijami tarčnega zaporedja na reakcijo, kar je v skladu s priporočili. Tudi ponovljivost znotraj dinamičnih območij je ustrezna za vsa tarčna zaporedja (< 25 %). Pomanjkljivost predstavlja lažno pozitivni rezultati za nekatera tarčna zaporedja v primerih analize, ko vsa tarčna zaporedja niso prisotna v vzorcu. Zaradi neustreznega pomnoževanja določenega tarčnega zaporedja v manjšem deležu kapljic (~ 1 %), lahko le-te določimo kot pozitivne za drugo tarčno zaporedje. Kadar analiziramo vzorce z vsemi prisotnimi tarčnimi zaporedji, je pojavljanje takšnih kapljic sprejemljivo. Tudi več tarčna metoda ddPCR je po stroških primerljiva metodi qPCR v primeru analize več vzorcev hkrati oz. v primeru določanja več linij GS koruze v vzorcih.

Razvita več tarčna metoda ddPCR je primerna za določanje GSO, uporabljen pristop več tarčne analize pa je uporaben tudi na drugih področjih, kjer je potreba po natančnem in zanesljivem kvantitativnem določanju tarčnih zaporedij DNA.

Razviti metodi ddPCR za kvantitativno analizo ne potrebujeta uporabe RM, rezultati pa so v merski enoti v cp/cp, ki je iz meroslovnega vidika ustreznejša od enote m/m. Metoda ddPCR je manj občutljiva na inhibitorje PCR kot qPCR. Dvo tarčna metoda ddPCR za določanje GS koruze MON810 in več tarčna metoda ddPCR za določanje 7 linij GS koruz ustrezata kriterijem, ki jih za uradne metode določanja GSO predpisuje ES in sta stroškovno primerljivi s trenutno najbolj uporabljenim metodo qPCR.

6.2 SUMMARY

Use of GMO is increasing due to the demand for traceability and labelling of food and feed that contain GMO, also laboratories for GMO need more efficient methods for detection and quantification of GMOs. Currently most used method for GMO detection, qPCR, has some drawbacks like obligatory use of reference materials in quantitative analysis, sensitivity to inhibitors of PCR reaction, limited use of multiplex quantitative analyses and high cost of analysis. Development of ddPCR offers a possibility to overcome some of the drawbacks of qPCR.

We have developed ddPCR method for determination of GM maize MON810, the only GMO, grown in Europe. ddPCR method was assessed in singleplex and duplex ddPCR, where MON810 and reference gene HmgA were analysed in one reaction. ddPCR method can be used in duplex, what was not possible with qPCR. Duplex ddPCR was in-house validated according to international guidelines. Duplex ddPCR method has shown to be precise and repeatable, results of tested RM and known samples were in accordance with set criteria, although DNA of the sample was not fragmented with restriction enzymes. We have measured 0,72 % cp/cp of MON810 for CRM ERM-BF413ek with certified MON810 percentage $0,77\% \pm 0,08\%$ in cp/cp and 0,62 % cp/cp MON810 for CRM CRM ERM-BF413d with certified value $0,57\% \pm 0,17\%$ cp/cp. LOD and LOQ of the duplex ddPCR method were determined at 5 copies of HmgA per reaction and for MON810 LOD was determined at 6 copies and LOQ 18 copies, what is below acceptance limits of 25 copies for LOD and 50 copies for LOQ. Dynamic range is between 5 and 117000 copies for HmgA and between 18 and 4340 copies of MON810. ddPCR method was less sensitive to inhibitors of PCR than qPCR method and we were able to quantify MON810 in the samples, that were not quantifiable with qPCR because of PCR inhibitors in the sample. Results obtained with ddPCR are in cp/cp unit of measurement that has higher metrological value than m/m. When more samples are analysed in parallel, cost of ddPCR analysis is comparable to the cost of qPCR. Duplex ddPCR method for detection of MON810 GM maize is comparable to qPCR method and therefore appropriate for use in GMO laboratories.

We have developed a new approach for multi target method ddPCR for determination of 7 GM maize lines (MON863, DP98140, MON810, MON89034, MIR604, MIR162 in GA21) in two reactions ddPCR. Multitargeting approach used is based on the use of different concentrations of primers and probes, labelled with same dye, what enables detection of four amplicons in one reaction. We have successfully determined 7 GM maize lines in prepared sample and in samples with known content of GMOs. Highest difference of measured GM percentage in prepared sample with multi target method ddPCR and single target ddPCR methods was 12,2 %. LODs were between 11 and 23 copies and LOQs were between 11 and 49 copies, what is in accordance with guidelines. Also repeatability within dynamic range was appropriate ($< 25\%$). A drawback of the used approach are false positive signals in some cases, when not all amplicons are present in the sample. Because of

low efficiency of PCR in some droplets ($\sim 1\%$), they can be determined as positive for another target amplicon. When all target amplicons are present in the sample, that does not represent a problem and can be accepted. Also multi target ddPCR method is comparable to qPCR in the terms of cost, when more samples are analysed in parallel or when more GM lines need to be quantified.

Multi target ddPCR method is appropriate for GMO detection, approach used for multiplexing can be applied in any other field with a need for accurate and reliable quantification of DNA targets in multiplex fashion.

Developed ddPCR methods do not require use of RM for quantitative analyses, results are in cp/cp unit of measurement that is of higher metrological value than unit m/m. ddPCR method is less sensitive to PCR inhibitors than qPCR. Duplex ddPCR method for detection of GM maize MON810 and multi target ddPCR method for detection of 7 GM maize lines fulfill criteria for official methods for GMO detection set by EU and are comparable in terms of cost of analysis with currently most used qPCR method.

7 VIRI

- Ahmed, F. E. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20, 5: 215–223
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., & Van Den Eede, G. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214, 1: 3–26
- Bahrdt C., Krech A. B., Wurz, A., Wulff D. 2010. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 6: 2103–2112
- Baker M. 2012. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 9, 6: 541–544
- Berdal K. G., Bøydler C., Tengs T., Holst-Jensen A. 2008. A statistical approach for evaluation of PCR results to improve the practical limit of quantification (LOQ) of GMO analyses (SIMQUANT). *European Food Research and Technology*, 227, 4: 1149–1157
- Bhat S., Herrmann J., Armishaw P., Corbisier P., Emslie K. R. 2009. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 2: 457–67
- BIO-RAD, 2015.
http://www.bio-rad.com/en-si/category/digital-pcr?pcp_loc=lnav. (2. december 2015)
- Bonfini L., Heinze P., Simon K., Van Den Eede G. 2002. Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Ispra. EU-NA-20-384-ENC: 67 str.
- Broeders S., Huber I., Grohmann L., Berben G., Taverniers I., Mazzara M., Roosens N., Morisset D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37, 2: 115–126
- Buh Gašparič M., Tengs T., La Paz J. L., Holst-Jensen A., Pla M., Esteve T., Žel J., Gruden K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 2023–2029
- Burns M., Corbisier P., Wiseman G., Valdivia H., McDonald P., Bowler P., Ohara K., Schimmel H., Charels D., Damant A., Harris N. 2006. Comparison of plasmid and genomic DNA calibrants for the quantification of genetically modified ingredients. *European Food Research and Technology*, 224: 249–258
- Burns M. J., Burrell A. M., Foy C. A. 2010. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *European Food Research and Technology*, 231, 3: 353–362
- Bustin S. A. 2005. Real-Time PCR. V Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics Vol 2. Fuchs J., Podda M. (eds.) New York. Marcel Dekker: 1117–11125
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. 2009. The

MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 4: 611–622

Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J., Gruden K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*, 6, 37. doi:10.1186/1472-6750-6-37: 15 str.

Caprioara-Buda M., Meyer W., Jeynov B., Corbisier P., Trapmann S., Emons H. 2012. Evaluation of plasmid and genomic DNA calibrants used for the quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 1: 29–42

Chabert M., Dorfman K. D., De Cremoux P., Roeraade J., Viovy J. L. 2006. Automated microdroplet platform for sample manipulation and polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 78, 22: 7722–7728

Charels D., Broeders S., Corbisier P., Trapmann S., Schimmel H., Emons H. 2007. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 3. Suitability of DNA calibrants studied with a MON 810 corn model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3268–3274

Chen L. L., Guo J. C., Wang Q. D., Kai G. Y., Yang L. T. 2011. Development of the Visual Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Seven Genetically Modified Maize Events and Their Application in Practical Samples Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11: 5914–5918

Commission Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. 2001. Official Journal of the European Union, L 106: 1-38

Commission Regulation 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. 2003. Official Journal of the European Union, L 268: 1-23

Commission Regulation 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. 2003. Official Journal of the European Union, L 268: 24-28

Commission Regulation 641/2004 of 6 April 2004 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the application for the authorisation of new genetically modified food and feed, the notification of existing products and adventitious or technically unavoidable presence of genetically modified material which has benefited from a favourable risk evaluation. 2004. Official Journal of the European Union, L 102: 14-25

Commission Recommendation 2004/787/EC of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. 2004. Official Journal of the European Union, L 348: 18-26

Commission Regulation 619/2011 of 24 June 2011 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorisation procedure is pending or the authorisation of which has expired. 2011. Official Journal of the European Union, L 166: 9-15

Corbisier P., Bhat S., Partis L., Rui Dan Xie V., Emslie K. R. 2010. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays L.*) by digital polymerase chain reaction. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396, 6: 2143–2150

Corbisier P., Pinheiro L., Mazoua S., Kortekaas A.-M., Chung P. Y. J., Gerganova T., Roebben G., Emons H., Emslie K. 2015. DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407, 7: 1831–1840

Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. JRC Technical Report. 2015. European Commission: 24 str.

http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%202020_10_2015.pdf (2. december 2015)

Demeke T., Gräfenhan T., Holigroski M., Fernando U., Bamforth J., Lee S. J. 2014. Assessment of droplet digital PCR for absolute quantification of genetically engineered OXY235 canola and DP305423 soybean samples. Food Control, 46: 470–474

Demeke T., Jenkins G. R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396, 6: 1977–1990

Dobnik D., Morisset D., Gruden K. 2010. NAIMA as a solution for future GMO diagnostics challenges. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396, 6: 2229–2233

Dobnik D., Spilsberg B., Bogožalec Košir A., Holst-Jensen A., Žel, J. 2015. Multiplex Quantification of 12 European Union Authorized Genetically Modified Maize Lines with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. Analytical Chemistry, 87, 16: 8218–8226

Dong L., Meng Y., Sui Z., Wang J., Wu L., Fu B. 2015. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. Science Reports, 5, 13174; doi: 10.1038/srep13174: 11 str.

Dreo T., Pirc M., Ramšak Ž., Pavšič J., Milavec M., Zel J., Gruden K. 2014. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 26: 6513–28

EU register, 2015.

http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm (2. december 2015)

EURL-GMFF, 2015.

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/> (2. december 2015)

Fantozzi A., Ermolli M., Marini M., Balla B., Querci M., Van den Eede G. 2008. Innovative Application of Fluorescent Microsphere Based Assay for Multiple GMO

Detection. Food Analytical Methods, 1, 1: 10-17

Feng J., Tang S., Liu L., Kuang X., Wang X., Hu S., You S. 2015. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and specific detection of common genetically modified organisms (GMOs). International Journal of Food Sciences and Nutrition, 66, 2: 186–196

Fluidigm, 2015a.

<https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system>. (2. december 2015)

Fluidigm, 2015b.

<https://www.fluidigm.com/about/aboutfluidigm> (2. december 2015)

Fraiture M.A., Herman P., Taverniers I., De Loose M., Deforce D., Roosens N. H. 2015. Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions. BioMed Research International, 2005, doi:10.1155/2015/392872: 22 str.

García-Cañas V., González R., Cifuentes A. 2002. Ultrasensitive Detection of Genetically Modified Maize DNA by Capillary Gel Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Using Different Fluorescent Intercalating Dyes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 16: 4497–4502

Genuity, 2015.

www.genuity.com/corn/Pages/Genuity-SmartStax-RIB-Complete.aspx (2. december 2015)

Ginzinger D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology, 30, 6: 503–512

Gruère G. P., Rao S. R. 2007. A Review of International Labeling Policies of Genetically Modified Food to Evaluate India's Proposed Rule. AgBioforum, 10, 1: 51–64

Hernandez M., Esteve T., Prat S., Pla M. 2004. Development of real-time PCR systems based on SYBR^(R) Green I, Amplifluor^(TM) and TaqMan^(R) technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. Journal of Cereal Science, 39, 1: 99–107

Hernandez M., Rodriguez-Lazaro D., Ferrando A. 2005. Current methodology for detection, identification and quantification of genetically modified organisms. Current Analytical Chemistry, 1: 203-221

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/technology, 11: 1026-1030

Hindson B. J., Ness K. D., Masquelier D. A., Belgrader P., Heredia N. J., Makarewicz A. J., Bright I. J., Lucero M. Y., Hiddessen A. L., Legler T. C., Kitano T. K., Hodel M. R., Petersen J. F., Wyatt P. W., Steenblock E. R., Shah P. H., Bousse L. J., Troup C. B., Mellen J. C., Wittmann D. K., Erndt N. G., Cauley T. H., Koehler R. T., So A. P., Dube S., Rose K. A., Montesclaros L., Wang S., Stumbo D. P., Hodges S. P., Romine S., Milanovich F. P., White H. E., Regan J. F., Karlin-Neumann G. A., Hindson C. M., Saxonov S., Colston B. W. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Analytical Chemistry, 83, 22: 8604–8610

Holck A., Pedersen B. O., Heir E. 2010. Detection of five novel GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. European

- Food Research and Technology, 231, 123: 475–483
- Holck A., Vaitilingom M., Didierjean L., Rudi K. 2002. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. European Food Research and Technology, 215, 2: 182–182
- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 16: 7276–7280
- Holst-Jensen A., Berdal K. G. 2004. The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. Journal of AOAC International, 87, 4: 927–936
- Holst-Jensen A., De Loose M., Van Den Eede G. 2006. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 8: 2799–2809
- Holst-Jensen A., Rønning S. B., Løvseth A., Berdal K. G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375, 8: 985–993
- Huber I., Block A., Sebah D., Morisset D., Grohmann L., Berben G., Stebih D., Milavec M., Žel, J., Busch U. 2013. Development and Validation of Duplex, Triplex, and Pentaplex Real-Time PCR Screening Assays for the Detection of Genetically Modified Organisms in Food and Feed. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 10293–10301
- Hübner P., Waiblinger H. U., Pietsch K., Brodmann P. 2001. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. Journal of AOAC International, 84, 6: 1855–1864
- ISO 21571. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction. 2005: 43 str.
- ISO 9000. Quality management systems - fundamentals and vocabulary. 2015: 15 str.
- ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005: 28 str.
- James C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GMO Crops: 2014, ISAAA Brief No. 49. Ithaca, ISAAA: 32 str.
- Jones M., Williams J., Gärtner K., Phillips R., Hurst J., Frater J. 2014. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain”. Journal of Virological Methods, 202: 46–53
- Köppel R., Bucher T. 2015. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis. European Food Research and Technology, 241, 3: 427–439
- Köppel R., Bucher T., Frei A., Waiblinger H.-U. 2015. Droplet digital PCR versus multiplex real-time PCR method for the detection and quantification of DNA from the four transgenic soy traits MON87769, MON87708, MON87705 and FG72, and lectin.

European Food Research and Technology, 241, 4: 521–527

Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med, 27, 2-3: 95–125

Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A. 2002. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. Journal of AOAC International, 85: 1077–1089

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., Hedgpeth J. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Research, 28, 2: 655–661

La Mura M., Allnutt T. R., Greenland A., Mackay I., Lee D. 2011. Application of QUIZ for GM quantification in food. Food Chemistry, 125, 4: 1340–1344

Lee D., La Mura M., Greenland A., Mackay I. 2010. Quantitation using informative zeros (QUIZ): Application for GMO detection and quantification without recourse to certified reference material. Food Chemistry, 118, 4: 974–978

Life Technologies, 2015.

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/pcr/digital-pcr.html> (2. december 2015)

Lin C. H., Chen Y. C., Pan T. M. 2011. Quantification Bias Caused by Plasmid DNA Conformation in Quantitative Real-Time PCR Assay. PLoS ONE, 6, 12, e29101. doi:10.1371/journal.pone.0029101: 10 str.

Mazzara M., Grazioli E., Savini C., Van den Eede G. 2009. Report on the Verification of the Performance of a MON810 Event-specific Method on Maize Line MON810 Using Real-time PCR. European Commission. EUR 24237 EN-2009. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC56609>. doi: 10.2788/59036: 28 str.

Mcdermott G. P., Do D., Litterst C. M., Maar D., Hindson C. M., Steenblock E. R., Legler T. C., Jouvenot Y., Marrs S. H., Bemis A., Shah P., Wong J., Wang S., Sally D., Javier L., Dinio T. A., Brackbill T. P., Hodges S. P., Ling Y., Klitgord N., Carman G. J., Berman J. R., Koehler R. T., Hiddessen A. L., Walse P., Bousse L. J., Hefner E., Hindson B. J., Cauly T. H., Hamby K., Patel V. P., Regan J. F., Wyatt P. W., Karlin-Neumann G. A., Stumbo D. P., Lowe A. J. 2013. Multiplexed target detection using DNA- binding dye chemistry in droplet digital PCR. Analytical Chemistry, 85, 23: 11619-11627

Miotke L., Lau B. T., Rumma R. T., Ji H. P. 2014. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. Analytical Chemistry, 86, 5: 2618–2624

Morisset D., Štebih D., Milavec M., Gruden K., Žel J. 2013. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. PLoS ONE, 8, 5, e62583.

doi:10.1371/journal.pone.0062583: 9 str.

- Morrison T., Hurley J., Garcia J., Yoder K., Katz A., Roberts D., Cho J., Kanigan T., Ilyin S. E., Horowitz D., Dixon J. M., Brenan C. J. H. 2006. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 34, 18, e123. doi:10.1093/nar/gkl639: 9 str.
- Nazarenko I. A., Bhatnagar S. K., Hohman, R. J. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 25, 12: 2516–2521
- Nazarenko I. A., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. 2002. Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Research*, 30, 9: 2089–2195
- Ottesen E. A., Hong J. W., Quake S. R., Leadbetter J. R. 2006. Microfluidic Digital PCR Enables Multigene Analysis of Individual Environmental Bacteria. *Science*, 314, 5804: 1464–1467
- Pavšič J., Žel J., Milavec M. 2016. Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 1: 107-121
- Pinheiro L. B., Coleman V. A., Hindson C. M., Herrmann J., Hindson B. J., Bhat S., Emslie K. R. 2012. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*, 84, 2: 1003–1011
- Pérez Urquiza M., Acatzi Silva A. I. 2014. Copy number ratios determined by two digital polymerase chain reaction systems in genetically modified grains. *Metrologia*, 51, 1: 61-66.
- Pla M., Nadal A., Baeten V., Bahrdt C., Berben G., Bertheau Y., Coll A., van Dijk J. P., Dobnik D., Fernandez Pierna J. A., Gruden K., Hamels S., Holck A., Holst-Jensen A., Janssen E., Kok E. J., La Paz J. L., Laval V., Leimanis S., Malcevschi A., Marmiroli N., Morisset D., Prins T. W., Remacle J., Ujhelyi G., Wulff D. 2013. New multiplexing tools for reliable GMO detection. V Genetically modified and non-genetically modified food supply chains: co-existence and traceability. Berthau Y. (ed.) Chichester, Willey-Blackwell: 333–366
- Pretto D., Maar D., Yrigollen C. M., Regan J., Tassone F. 2015. Screening Newborn Blood Spots for 22q11.2 Deletion Syndrome Using Multiplex Droplet Digital PCR. *Clinical Chemistry*, 61, 1: 182-190
- Rački N., Dreо T., Gutierrez-Aguirre I., Blejec A., Ravnikar, M. 2014. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, 10:42. doi:10.1186/s13007-014-0042-6: 10 str.
- Raindance, 2015.
<http://raindancetech.com/digital-pcr-tech/> (2. december 2015)
- Schneeberger C., Speiser P., Kury F., Zeillinger R. 1993. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *Genome Research*, 4, 4: 234–238

- Sedlak R. H., Kuypers J., Jerome K. R. 2014. A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80, 4: 285–6
- Sherrill C. B., Marshall D. J., Moser M. J., Larsen C. A., Daudé-Snow L., Prudent J. R. 2004. Nucleic Acid Analysis Using an Expanded Genetic Alphabet to Quench Fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 9: 4550–4556
- Shindo Y., Kuribara H., Matsuoka T., Futo S., Sawada C., Shono J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A. 2002. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. *Journal of AOAC International*, 85, 5: 1119–1126
- Stave J. W. 2002. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *Journal of AOAC International*, 85, 3: 780–786
- Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A. A. 1992. Limiting dilution PCR. *BioTechniques*, 13, 3: 444-449
- Taverniers I., Van Bockstaele E., De Loose M. 2004. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 5: 1198–1207
- Taverniers I., Windels P., Van Bockstaele E., De Loose M. 2001. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *European Food Research and Technology*, 213, 6: 417–424
- Technical guidance document from the European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed on the implementation of Commission Regulation (EU) NO 619/2011. 2011. European Commission: 6 str. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Technical%20Guidance%20from%20EU%20on%20LLP.pdf> (2. december 2015)
- Terry C. F., Harris N. 2001. Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries. *European Food Research and Technology*, 213, 6: 425–431
- Terry C. F., Shanahan D. J., Ballam L. D., Harris N., McDowell D. G., Parkes, H. C. 2002. Real-time detection of genetically modified soya using Lightcycler and ABI 7700 platforms with TaqMan, scorpion, and SYBR Green I chemistries. *Journal of AOAC International*, 85: 938–944
- Trapmann S., Corbisier P., Schimmel H., Emons H. 2010. Towards future reference systems for GM analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 6: 1969–1975
- Trapmann S., Schimmel H., Kramer G. N., Van den Eede G., Pauwels J. 2002. Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms. *Journal of Aoac International*, 85: 775–779
- Trifa Y., Zhang, D. 2004. DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5: 1044–1048

- Ukaz o razglasitvi zakona o ratifikaciji Kartagenskega protokola o biološki varnosti h Konvenciji o biološki raznovrstnosti (MKPBV). 2002. Ur. l. RS, št. 89/02
- Vogelstein B., Kinzler K. W. 1999. Digital PCR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 16: 9236–9241
- Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotechnology, 17, 8: 804–807
- Wittwer C. T., Herrmann M. G., Gundry C. N., Elenitoba-Johnson K. S. J. 2001. Real-Time Multiplex PCR Assays, 442: 430–442
- Zakon o ravnjanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO-UPB1). 2005. Ur. l. RS, št. 23/05
- Zakon o spremembah in dopolnitvah zakona o ravnjanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO). 2010. Ur. l. RS, št. 21/10
- Zhong Q., Bhattacharya S., Kotsopoulos S., Olson J., Taly V., Griffiths A. D., Link D. R., Larson J. W. 2011. Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. Lab on a Chip, 11, 13: 2167–2174
- Žel J., Mazzara M., Savini C., Cordeil S., Camloh M., Stebih D., Cankar K., Gruden K., Morisset D., Van den Eede G. 2008. Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: an example of laboratories testing for genetically modified organisms. Food Analytical Methods, 1: 61–72
- Žel J., Milavec M., Morisset D., Plan D., Van den Eede G., Gruden K. 2012. How to reliably test for GMOs. New York, Springer: 100 str.

ZAHVALA

Najprej se želim zahvaliti svoji mentorici prof. dr. Jani Žel za spodbudo, strokovno pomoč, naklonjenost, vodenje pri delu in potrpežljivost.

Zahvaljujem se članom komisije za oceno in zagovor magistrskega dela, prof. dr. Borutu Bohancu, prof. dr. Poloni Jamnik in prof. dr. Kristini Gruden za natančen pregled magistrske naloge ter vse komentarje in predloge.

Hvala sodelavcem in prijateljem dr. Danyju Morissetu in dr. Davidu Dobniku za sodelovanje pri izdelavi magistrskega dela.

Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije se zahvaljujem za sofinanciranje raziskovalnega dela (pogodba št. P4-0165). Hvala tudi Evropski komisiji za sofinanciranje preko projekta DECATHLON ter podjetju Bio-Rad za kemikalije in potrošni material. Zahvala gre tudi Uradu za meroslovje Republike Slovenije, ki je omogočilo uporabo opreme za kapljično digitalno PCR.

Zahvalil bi se vsem FITOfcem, še posebej skupini GSO, Tini Demšar, Mojci Milavec in Klavdiji Mohorič za pomoč, dobro vzdušje in spodbudo.

DŠIWSO se zahvaljujem za objeme in dobro štimungo.

Zahvaljujem se Milani Karajić in njeni družini.

Maši in Lani se zahvaljujem za potrpežljivost v času pisanja naloge.

Velika zahvala gre seveda tudi staršem in sestri za podporo in spodbudo.