

Bachelorproef

Validatie van event-specifieke methode voor
absolute en relatieve kwantificering van GGO's -
transfereerbaarheid van real-time PCR-formaat
naar ddPCR-formaat

Sciensano

Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Elsene
Promotor: Dr. Nina Papazova

Joke De Greve

Departement GDT

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en Biologische
Laboratoriumtechnologie

2020-2021

Voorwoord

In de eerste plaats wil ik graag mijn promotor, Dr. Nina Papazova bedanken. Ze heeft me de kans geboden mijn bachelorproefstage bij haar op de dienst te voltooien. Ze heeft me gedurende het hele proces (van stage tot het schrijven van het proefwerk) bijgestaan met raad en daad. Ze organiseerde regelmatig overleg en voor elke vraag kon ik bij haar terecht. Ook was ze steeds bereid om mijn proefschrift na te lezen en tips en/of aanvullingen te geven.

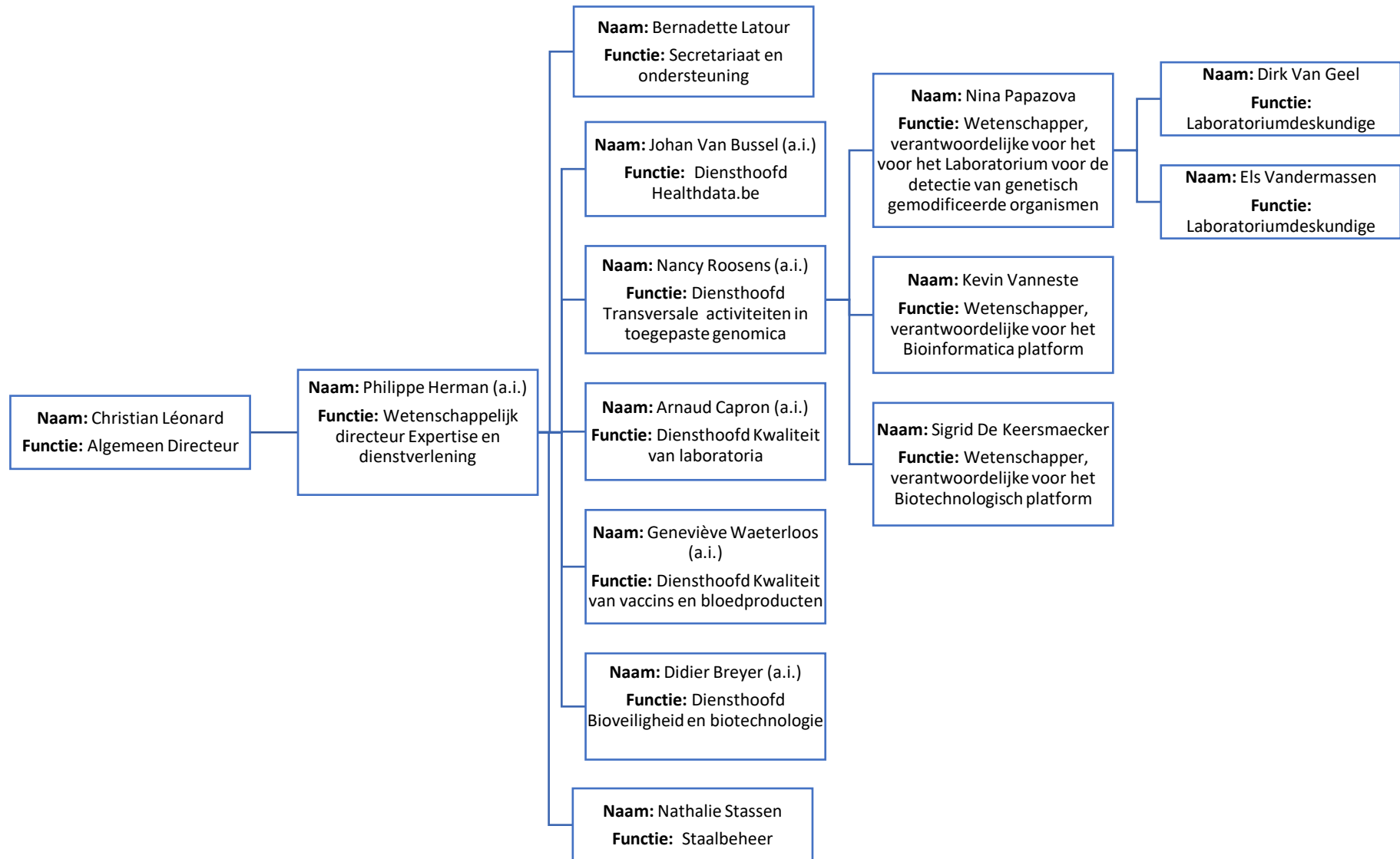
Mijn dank gaat ook uit naar Dirk Van Geel en Els Vandermassen, mijn persoonlijke begeleiders op de stageplaats. Samen met het gehele laborantenteam maakten ze de goede sfeer op de werkvloer. Ik kwam elke dag met plezier naar mijn stage. Ze hebben me met open armen opgenomen in het team. Ik kijk er alvast naar uit om met hen opnieuw samen te werken in de toekomst.

Ik dank mevrouw Mot, met wiens hulp ik deze stage heb gevonden. Dank ook aan alle andere docenten van de opleiding Biomedische laboratoriumtechnologie, die me gedurende de opleiding begeleid hebben. Door het delen van hun kennis en vaardigheden ben ik geworden tot de laborant die ik vandaag de dag ben.

Een bijzondere dankjewel aan mijn mama voor de steun die ze dag in en dag uit biedt. Voor het duwtje in de rug die ze me geeft wanneer ik dreig op te geven. Zonder haar zou ik niet staan waar ik nu sta.

Tot slot wil ik mevrouw Merckx bedanken om mijn contactpersoon te zijn tijdens de volledige bachelorproefstage.

Organigram



Inhoudstafel

Voorwoord	3
Organigram.....	4
Lijst van gebruikte afkortingen	6
1. Inleiding en probleemstelling	12
2. Theoretisch gedeelte.....	13
2.1 Genetisch gemodificeerde organismen (GGO's).....	13
2.2 Het wettelijk kader rond GGO's	14
2.3 Analysemethodes om GGO's op te sporen	16
2.4 De rol van rtPCR bij kwantificatie van GGO's.....	18
2.4.1 Hoe wordt het gebruikt?	18
2.5 Validatie en accreditatie van rtPCR	19
2.5.1 Validatie van de methode: Hoe gebeurt het in het labo?.....	19
2.5.2 Validatieparameters	20
2.5.3 Accreditatie	20
2.6 Nieuwe methode: ddPCR.....	20
2.6.2 rtPCR vs ddPCR	22
2.6.3 Voordelen van d(d)PCR	23
2.6.4 Digital MIQE.....	24
2.7 Validatie van ddPCR.....	24
2.7.1 Aanvaardingscriteria voor PCR-methoden.....	25
3. Experimenteel gedeelte	27
3.1 Materialen en methoden.....	27
3.1.1 Materialen	27
3.1.2 Methoden.....	30
3.2 Resultaten	46
3.2.1 DNA-extractie	46
3.2.2 ddPCR.....	47
3.3 Discussie.....	58
3.3.1 DNA-extractie	58
3.3.2 ddPCR.....	58
Besluit	61
Referenties	63
Bijlagen.....	70

Lijst van gebruikte afkortingen

abs	Absoluut (absolute)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
BO	Blanco open
cp	copy
CRM	<i>Certified reference material</i>
CTAB	C-hexadecyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide
DEAE	Diëthylaminoëthyl
ddPCR	Digital droplet PCR
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
EURL	<i>European Union Reference Laboratories</i>
EURL GMFF	<i>European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed</i>
EPSPS	5-enolpyruvylshikimaat-3-fosfaat synthase
FAVV	Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen
GCO	Gemeenschappelijk Centrum voor onderzoek
GM%	Percentage genetisch gemodificeerd materiaal
GGO	Genetisch gemodificeerde organismen
GGOlab	Laboratorium voor de detectie van genetisch gemodificeerde organismen
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
LFS	<i>Lateral flow strips</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
MS	<i>Mean square</i>
NC	Negatieve controle
NRL	<i>National Reference Laboratory</i>
NTC	<i>No template control</i>
OCL	<i>Official Control Laboratory</i>

PC	Positieve controle
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POD	<i>Probability of Detection</i>
rel	Relatief (relatieve)
ROD	<i>Rate of Detection</i>
RRS	<i>Roundup Ready® soybean</i>
RSDr%	Relatieve standaardafwijking van de herhaalbaarheid
Rt PCR of qPCR	Real-time PCR
SD	Standaarddeviatie/ standaardafwijking
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
UGM	<i>Unauthorised GMO's of niet-geautoriseerde GGO's</i>
WWB	warmwaterbad

Samenvatting van

Validatie van event-specifieke methode voor absolute en relatieve kwantificering van GGO's - transfereerbaarheid van real-time PCR-formaat naar ddPCR-formaat

De Greve Joke

Promotor: Dr. Papazova Nina

Contactpersoon hogeschool: Merckx Ellen

Achtergrond

De aanwezigheid van genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) komt steeds vaker voor bij voedingsmiddelen en diervoeders. Alvorens deze producten op de Europese markt kunnen gebracht worden, dienen ze volgens de Europese wetgeving geautoriseerd te worden. Daartoe moeten GGO's a.d.h.v. hun DNA aangetoond kunnen worden in de betreffende producten. Real-time PCR (rt-PCR) is de officiële methode die hiervoor gebruikt wordt.

Een zeer recente PCR-gebaseerde techniek, de zogenaamde digital PCR (dPCR), kan eveneens toegepast worden voor de kwantificatie van GGO-events. Deze techniek biedt verschillende voordelen t.o.v. rt-PCR.

Doel

Het doel van deze validatie is nagaan of GGO's ook met digital droplet PCR (ddPCR) betrouwbaar gekwantificeerd kunnen worden, net zoals met real-time PCR. Er zal onderzocht worden of de real-time PCR-methoden in digital droplet PCR-formaat kunnen toegepast worden.

Methode

Het is belangrijk om de betrouwbaarheid van de bestaande rtPCR-methode te verifiëren wanneer deze uitgevoerd wordt met ddPCR. De kwantificatiemethode zal geoptimaliseerd worden door het testen van verschillende condities, aangezien de ddPCR werkt met verschillende buffers en een andere workflow heeft. Veranderingen in de PCR-condities zoals bijvoorbeeld de annealingstemperatuur, verschillende primer-/ probeconcentraties, PCR-programma, ... zullen worden onderzocht. Er zal hiervoor gebruik

gemaakt worden van certified reference material (CRM) dat het soja GM-event GTS40-3-2 (Roundup Ready soy) bevat. Na optimalisatie zal de methode gevalideerd worden. Dit gebeurt door verschillende parameters, zoals o.a. dynamische range, limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), ... te testen. Deze parameters zullen binnen de criteria voor PCR-methoden voor de GGO-kwantificatie moeten vallen. Na het doorlopen van de hele procedure, zal de methode gevalideerd zijn voor relatieve en absolute kwantificatie van het GGO soja event GTS40-3-2 met ddPCR en zal gebruikt kunnen worden voor routine analyses onder ISO17025 accreditatie.

Resultaten

De PCR-condities voor de methode werden geoptimaliseerd door het bepalen van de optimale annealingstemperatuur, optimale primer-/probeconcentraties en het optimale PCR-programma. De annealingstemperatuur werd gebracht op 52°C. Primer-/probeconcentraties van 150/150/50 nM voor lectine en 600/600/300 nM voor RRS werden weerhouden. Dan werden twee PCR-programma's met een verschillend aantal cycli getest. Uit onderzoek bleek het tweede PCR-programma van 45 cycli de beste resultaten op te leveren. Deze PCR-condities gaven de beste scheiding van de positieve en negatieve clusters in de ddPCR, een lage intermediaire fluorescentie ('rain') en een exact aantal kopijen.

De twee DNA-extractiemethodes (CTAB en NucleoSpin®) werden vergeleken om na te gaan of deze van invloed zouden zijn op de ddPCR. De resultaten van deze kwantificatie tonen dat de kwantificatie in de NucleoSpin® extracten minder precies was in vergelijking met CTAB. Tijdens de validatie van de absolute en relatieve kwantificatie, werd de dynamische range bepaald voor lectine (1cp op 50000cp) en voor RRS (1 op 5000cp). Uit het bereik werden 10 cp of minder voor LOD₆ en 100 cp of minder voor LOQ₆ afgeleid. Nadien volgde een nauwkeurigere bepaling van de absolute LOD en LOQ. LOD_{95%} werd voor lectine bij 4 cp en voor RRS bij 3 cp vastgesteld. De absolute LOQ werd vastgelegd bij 40 cp/20 µl. De validatie werd afgerond met de bepaling van de relatieve LOQ. De LOQ_{rel} werd vastgesteld op 0,1%. Om de toepasbaarheid van de methode bij routine analyses aan te tonen, werd er getest op real-life stalen. 3 verschillende stalen werden met de ddPCR-methode gekwantificeerd en de resultaten werden vergeleken met de eerder bekomen resultaten van de rtPCR. Uit de resultaten bleek dat het verkregen GM% met de ddPCR de real-time PCR resultaten dichter benaderde en bovendien vielen ze binnen het acceptatie-interval van de PT-testresultaten.

Conclusie

De validatie van de ddPCR-kwantificatiemethode voor GGO's is succesvol verlopen. Er kan dus besloten worden dat de gevalideerde ddPCR-methode, bestaande uit de getransfereerde rtPCR-methode, voor deze toepassing gebruikt kan worden i.p.v. de rtPCR-methode. Een workflow, die in de toekomst zal toegepast worden bij de validatie van andere real-time PCR-methoden in ddPCR formaat, werd uitgewerkt.

Abstract of

Validation of event-specific method for absolute and relative quantification of GMOs - transferability from real-time PCR format to ddPCR format

De Greve Joke

Supervisor: Dr. Papazova Nina

Contact person at the University of Applied Sciences: Merckx Ellen

Background

Genetically modified organisms (GMOs) are more and more widespread in food and feed products. Before products derived from GM plants can be commercialised in Europe, they must be authorised under the European legislation. Therefore it is required that GMO's are detected in the respective products. Real-time PCR (rt-PCR) is the official method used for this purpose.

A novel PCR-based technique, the so-called digital PCR (dPCR), can also be used for the quantification of GMO's for it has some advantages over rt-PCR.

Aim

The aim of this bachelor's thesis is to test whether the GMO can be reliably quantified by means of ddPCR compared to real-time PCR. It will be investigated if the real-time PCR methods can be applied in digital droplet PCR format.

Method

It is important to verify if the rtPCR method can perform satisfactory when transferred to ddPCR. The quantification method will be optimised by testing different conditions, as the ddPCR requires different buffers and has different workflow. Changes in the PCR conditions e.g. annealing temperature, different primer/probe concentrations, PCR programme, ... will be examined. For this we will use certified reference material (CRM), containing soy GM event GTS40-3-2 (RoundUp Ready soy). After optimisation, the method will be validated. This is done by testing different parameters, such as dynamic range, limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), These parameters must fall within the acceptance criteria for PCR methods used for GMO quantification. After going through the whole

procedure, the method will be validated for relative and absolute quantification of the GMO soybean event GTS40-3-2 with ddPCR in order to be used for routine analyses under ISO17025 accreditation.

Results

The PCR conditions of the method were optimised by determining the optimal annealing temperature, the optimal primer/probe concentrations and PCR programme. The annealing temperature was set at 52°C. Primer/probe concentrations of 150/150/50 nM for lectin and 600/600/300 nM for RRS were selected. Two PCR programmes with a different number of cycles were then tested. From examination, the second PCR programme with 45 cycles showed better results. These PCR conditions provided best separation of the positive and negative clusters in ddPCR, low intermediate fluorescence (“rain”) and precise copy number quantification. The two DNA extraction methods (CTAB and NucleoSpin®) were compared in order to evaluate if there is influence on the ddPCR. The results of this quantification showed that the quantification in the NucleoSpin® extracts was less precise, compared to CTAB. During the validation of the absolute and relative quantification, the dynamic range was determined for lectin (1 cp to 50000 cp) and for RRS (1 cp to 5000 cp). From this range, 10 cp or less for LOD₆ and 100 cp or less for LOQ₆ were derived. A more accurate determination of absolute LOD and LOQ followed. LOD_{95%} was determined for lectin at 4 cp and for RRS at 3 cp. The absolute LOQ was established at 40 cp. The validation was completed with the determination of the relative LOQ. The LOQ_{rel} was set at 0.1%. In order to check the applicability of the method for routine analyses, it was tested on Proficiency test (PT) samples. Three different samples were quantified by means of ddPCR and the results were compared to the previously obtained results from rtPCR. The results showed that the obtained GM% by using ddPCR was closer to the real-time PCR result and within acceptance interval of the PT results.

Conclusion

The validation of the ddPCR quantification method for GM event GTS40-3-2 was successful. It can be concluded that the validated ddPCR method, consisting of the transferred rtPCR method, can be used for this application replacing rtPCR. A workflow, which can be applied in the future for the validation of other real-time PCR methods in ddPCR format, was developed.

1. Inleiding en probleemstelling

PROBLEEMSTELLING:

De Europese wetgeving verplicht de autorisatie van genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) in diervoeders en levensmiddelen in producten op de Europese markt. De aanwezigheid van GGO's in voedingsmiddelen en diervoeders wordt nagegaan op basis van DNA mbv real-time PCR. Real-time PCR (rtPCR) is niet alleen een veel gebruikte methode voor de kwantificatie van GGO's, maar is tevens de officiële gestandaardiseerde methode voor deze toepassing.

Digital PCR (dPCR) is een nieuwe techniek die ook PCR-gebaseerd is. Het is een interessant alternatief voor real-time PCR voor kwantificatie van GGO-events omwille van:

- de precieze kwantificering van nucleïnezuren, waardoor het bepalen van kleine procentuele verschillen en kwantificering van zeldzame varianten mogelijk wordt ([Holst-Jensen, Testing for genetically modified organisms \(GMOs\): Past, present and future perspectives, 2009](#))
- een betere reproduceerbaarheid en een kleinere gevoeligheid voor inhibitoren dan kwantitatieve real-time PCR (qPCR) ([Holst-Jensen, Testing for genetically modified organisms \(GMOs\): Past, present and future perspectives, 2009](#))
- de afwezigheid van een kalibratiecurve, waardoor er minder stalen gelopen moeten worden en absolute kwantificatie van GGO's mogelijk wordt ([Pecoraro, et al., 2019](#))

Kunnen GGO's gekwantificeerd worden m.b.v. digital droplet PCR (ddPCR) i.p.v. real-time PCR? Zullen de real-time PCR-methoden efficiënt werken in digital droplet PCR-formaat?

Bij aanvang wordt er nagegaan of de bestaande rtPCR-methode betrouwbaar is wanneer deze uitgevoerd wordt met ddPCR. Er zal een optimalisatie van de kwantificatiemethode rtPCR worden nagestreefd. Hiervoor worden verschillende condities getest zoals o.a. het gebruik van een andere buffer, aanpassingen van annealingtemperatuur, gebruik van verschillende primer-/probeconcentraties, bepalen van optimale PCR-programma, ... Het DNA dat hiervoor gebruikt wordt, is afkomstig van certified reference material (CRM). CRM bevat genetisch gemodificeerd materiaal met een gecertificeerde GGO-gehalte. Dit materiaal wordt door twee producenten (Joint Research Centre (JRC) en American Oil Chemists' Society (AOCS)) op de markt gebracht als officiële controles op de naleving van de wetgeving inzake diervoeders en levensmiddelen en de voorschriften inzake diergezondheid en dierenwelzijn ([Joint Research Centre: European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, sd](#)).

Het referentiemateriaal dient vervolgens geëxtraheerd te worden. Daarvoor worden er twee verschillende extractiemethoden gehanteerd. De NucleoSpin® Food extractiemethode is een methode die toegepast wordt in routinelabo's. Het is een techniek waarbij op een zeer snelle wijze opgezuiverd DNA wordt verkregen. Naast de NucleoSpin® Food extractiemethode wordt er gebruik gemaakt van de CTAB Tip20 methode. In tegenstelling tot de NucleoSpin® Food extractiemethode vraagt deze procedure meer tijd, maar ze levert een groter rendement aan opgezuiverd DNA op en er zijn minder inhibitoren aanwezig in het eindproduct.

Voor routine applicaties is het nodig om te weten of de DNA-extractie methode invloed zal hebben op de kwantificatie.

Het opgezuiverde DNA zal vervolgens gebruikt worden voor kwantificatie van GGO's. Dit zal gebeuren met behulp van ddPCR.

Ondanks de verschillen in de bereiding zowel als in de workflow, wordt er verwacht dat de resultaten voor ddPCR vergelijkbaar zijn met deze die bekomen worden met rtPCR.

Tot slot vindt de validatie van de methode plaats. Tijdens deze fase zal aangetoond worden of de methode voldoet aan de criteria voor PCR-methoden, meer bepaald voor de kwantificatie van GGO's. Verschillende parameters (dynamische range, limit of quantification (LOQ), limit of detection (LOD), ...) zullen getest worden aan hand van verschillende experimenten. Deze zullen leiden tot de validatie van de relatieve en absolute kwantificatie van de ddPCR methode voor GGO soja event GTS40-3-2. Indien de methode aan de acceptatie criteria voldoet wordt het gebruikt voor routine analyses onder ISO17025 accreditatie.

2. Theoretisch gedeelte

2.1 Genetisch gemodificeerde organismen (GGO's)

GGO's zijn organismen waarvan het genetisch materiaal gewijzigd is, op een manier die niet van nature door geslachtsgemeenschap en/of natuurlijke recombinitie voorkomt (de mens vormt hierop een uitzondering). Deze wijzigingen kunnen plaatsvinden door recombinante nucleïnezuurtechnieken (m.a.w. kloneringstechnieken), technieken met betrekking tot micro-, macro-injectie en micro-inkapseling of technieken o.b.v. cellfusie of –hybridisatie ([Het Europees Parlement en de raad van de Europese Unie, 2001](#)).

GGO soja-event GTS40-3-2 (UI: MON-04032-6) of Roundup Ready™ soybean (RRS) is een voorbeeld van een GGO. Deze sojalin werd ontwikkeld omwille van zijn resistentie voor het actieve bestanddeel glyfosaat, dat ingezet wordt als herbicide ter bestrijding van onkruid. De genetisch gemodificeerde sojalin bevat een vorm van het plantenenzym 5-enolpyruvylshikimaat-3-fosfaat synthase (EPSPS) dat het in staat stelt de dodelijke werking van glyfosaat te weerstaan. Het EPSPS-gen dat in GTS 40-3-2 wordt ingebracht, wordt geïsoleerd uit een stam van de bodembacterie *Agrobacterium tumefaciens*, CP4 genaamd. Het is de vorm van het EPSPS-enzym die door het gen geproduceerd wordt, die tolerant is voor glyfosaat ([Mclean & Abdelhakim, 2014](#)).

2.2 Het wettelijk kader rond GGO's

In het EU is de wetgeving inzake genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) ingevoerd om de traceerbaarheid van levensmiddelen/diervoeders die op de markt gebracht worden te garanderen en de keuzevrijheid van de consument (the consumer freedom of choice) te beschermen ([Fraiture, et al., 2015](#)).

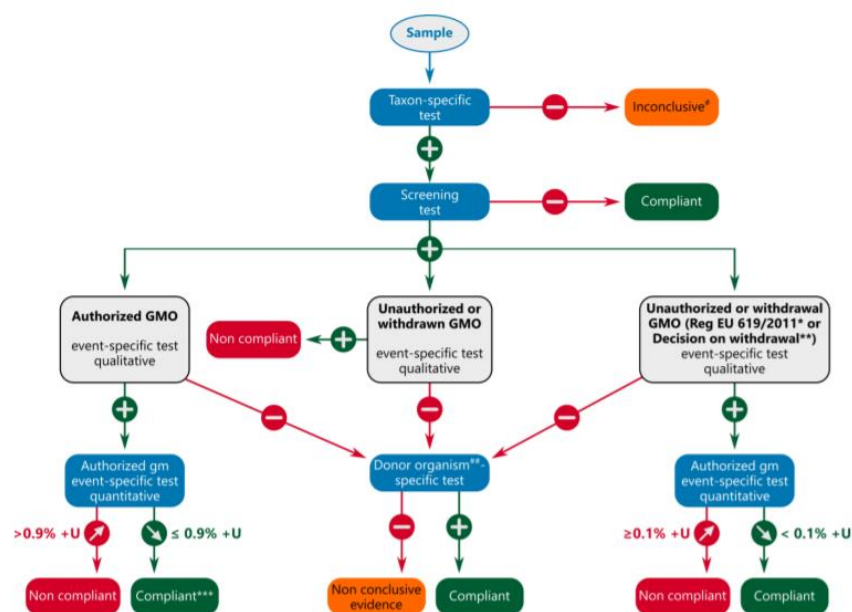
Op grond van Verordening (EG) nr. 1829/2003 werd het Gemeenschappelijk Centrum voor onderzoek (GCO) van de Europese Commissie aangesteld als referentielaboratorium van de Europese Unie voor genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders (EURL GMFF). Het GCO wordt bijgestaan door de gemeenschap van de nationale referentielaboratoria (NRL's) (wordt ook wel het "Europees netwerk van GGO-laboratoria" (ENGL) genoemd) ([Joint Research Centre: European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, s.d.](#)).

GGO's moeten geautoriseerd worden na een risico-evaluatie door de European Food Safety Authority (EFSA). Bij de autorisatie wordt verplicht een methode ontwikkeld voor de kwantificatie van GGO's. De ontwikkelde methode is de event-specifieke real-time PCR. De methode werd ontwikkeld door de firma die de GGO's op de markt bracht en werd gevalideerd op Europees niveau door de European Union Reference Laboratories (EURL). De toepassing van de methode gebeurt door de controlelaboratoria i.f.v. officiële controles.

Alle geautoriseerde GGO's zijn toegelaten op de markt, maar het is verplicht om deze producten, afkomstig van GGO-planten, te etiketteren. Een drempelwaarde (threshold) werd vastgelegd op 0.9% GGO, d.w.z. dat als het staal > 0.9% van geautoriseerde GGO's bevat, het product waarin het verwerkt zit, geëtiketteerd moet worden als bv. "bevat GGO-soja" of "bevat GGO-mais". De officiële controles worden uitgevoerd door de controleautoriteiten; voor België is dit het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV)). Stalen van diervoeder en levensmiddelen worden genomen op de voedingsmarkt en gecontroleerd op de aanwezigheid van GGO's. De hoeveelheid

aan GGO's wordt nagegaan om te controleren of de labeling van het staal conform is. Aan de andere kant zijn er ook GGO's die nog niet geautoriseerd zijn en dus ook niet toegelaten zijn op de Europese markt. Voor niet-geautoriseerde GGO's (UGM) geldt zero tolerance. Er zijn wel enkele uitzonderingen op deze maatregel voor events met referentiemateriaal en gevalideerde methoden die ingediend zijn om goedgekeurd te worden (pending authorisation). Die vallen onder EC/619/2011 (Low level presence): ze zijn niet toegelaten in levensmiddelen (hiervoor geldt zero tolerance), maar wel in diervoeders met een maximaal GGO-gehalte van 0,1%. Dus om te kunnen evalueren of de stalen voldoen aan de normen, moeten de laboratoria nauwkeurig genoeg kunnen kwantificeren op basis van de gevalideerde methoden ([VERORDENING \(EG\) Nr. 1829/2003 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 22 september 2003 inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders, 2003](#)) ([VERORDENING \(EG\) Nr. 1830/2003 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 22 september 2003, 2003](#)).

De beslissingsboom in figuur 1 helpt laboratoria om o.b.v. de verkregen resultaten en de voorschriften van de EU-wetgeving, inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders, de juiste beslissingen te nemen over de naleving van de voorschriften ([Pecoraro, et al., 2019](#)).



Figuur 1: Beslissingsboom voor GMO-analyse (Figuur is gebaseerd op [Ciabatti, et al., 2017](#)).

Voor RRS en alle andere GMO's die op de Europese markt worden uitgebracht, dienen een vergunning te hebben. De Commission Implementing Decision is een wettelijk document

waarin vermeld staat waaraan GGO-producten moeten voldoen naar aanloop van de verlenging van de handelsvergunning.

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:040:0014:0017:EN:PDF>

2.3 Analysemethodes om GGO's op te sporen

In de Europese Unie is de rtPCR-methode verplicht, maar er zijn nog andere methoden om GGO's op te sporen.

Voor het testen van GGO's worden er hoofdzakelijk bioassays, testen o.b.v. eiwitten (bv. immunologische testen) en PCR-testen gebruikt. Voor het testen van één enkel GGO-event is wellicht slechts één eenvoudige analysemethode vereist. Het testen voor identificatie en kwantificering op de aanwezigheid van meerdere events, vraagt een combinatie van verschillende analysemethoden (Christianson, McPherson, Topinka, Hall, & Good, 2008) (Holst-Jensen, Sampling, detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs), 2006) (James, Schmidt, Wall, Green, & Masri, 2003) (Waiblinger, Boernsen, & Pietsch, 2008). Bioassays zijn gebaseerd op het principe van het blootstellen van plantaardig materiaal aan een bepaald reagent (bv. herbicide) waarvoor genetisch gemanipuleerde planten tolerant zijn en niet-GGO's juist gevoelig zijn. Het aantal overlevende en dode planten wordt geteld en met elkaar vergeleken voor de bepaling van het relatieve GGO-gehalte. Deze analysemethode heeft als voordeel dat het een relatieve goedkope methode is. Daarnaast stelt ze weinig eisen aan de deskundigheid van de gebruiker en de gewenste biologische kenmerken van GGO's worden verzekerd. Naast voordelen zijn er ook nadelen verbonden aan de methode. Zo kan de methode slechts op een beperkt aantal biologische eigenschappen toegepast worden. Tevens is de specificiteit beperkt en duurt de uitvoering van de methode langer dan bij tests o.b.v. eiwitten en DNA (Holst-Jensen, Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives, 2009).

Detectie van eiwitten kan m.b.v. immunologische en fysisch-chemische technieken. De meest gebruikte tests o.b.v. proteïnen zijn immunoassays. Bij deze techniek worden de doeleiwitten (de antigenen) gedetecteerd door specifieke antilichamen die aan een colorimetrisch detectiesysteem zijn gekoppeld. Deze toepassing is het minste geëvolueerd (omwille van de ontwikkeling van antilichamen) in vergelijking met DNA-gebaseerde methoden en wordt voornamelijk ingezet als handig en kosteneffectief screeningsinstrument in de industriële landbouw. Belangrijke verbeteringen aan deze methode zijn de verschuiving van het gebruik van polyklonale antilichamen naar specifiekere monoklonale antilichamen en het gebruik van testen die op het werkveld kunnen

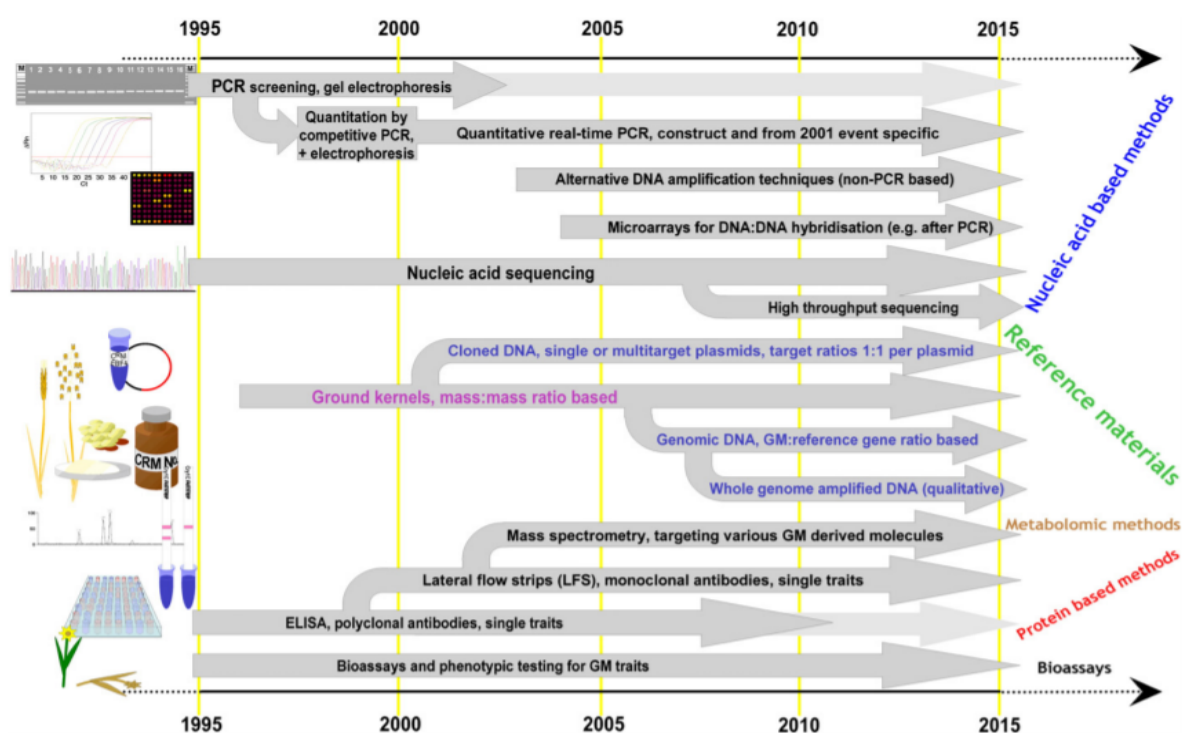
uitgevoerd worden (van Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) naar lateral flow strips (LFS)). De mogelijkheden voor kwantificering zijn ook verbeterd. Multiplexing van immunologische methoden kan bereikt worden m.b.v. microarray-formaten (Ling, Ricks, & Lea, 2007). Het meest veelbelovende initiatief tot op heden, op weg naar multiplexing van immunoassays voor GGO-detectie, is een techniek waarbij gekleurde, met de antilichamen gecoate korrels m.b.v. flowcytometrie worden geanalyseerd (Fantozzi, et al., First application of a microsphere-based immunoassay to the detection of genetically modified organisms (GMOs): quantification of Cry1Ab protein in genetically modified maize, 2007). De gevoeligheidsfactor en de betrouwbaarheid van het kwantificeren zijn vaak een probleem bij immunoassays. Een oplossing hiervoor kan liggen bij het combineren van immunoassays met PCR (Allen, Rogelj, Cordova, & Kieft, 2006). Daarnaast bestaan er ook alternatieve methoden o.b.v. proteïnen, zoals immunomagnetische elektrochemische sensoren (Volpe, Ammid, Moscone, Occhigrossi, & Palleschi, 2006), tweedimensionale gelelektroforese (Kim, Choi, Lee, & Moon, 2006) en massaspectrometrie (Ocaña, Fraser, Patel, Halket, & Bramley, 2007).

RtPCR (behorend tot de DNA-gebaseerde methoden) is in de Europese Unie verplicht voor detectie van GGO's. De voordelen van deze DNA-gebaseerde methoden zijn vooral specificiteit en gevoeligheid. De nadelen zijn hoofdzakelijk de kosten en de vereiste deskundigheid (Christou, 2002) (Kaplinsky, et al., 2002) (Metz & Fütterer, 2002). Aangezien genetische modificaties per definitie modificaties van DNA zijn, is het duidelijk dat op DNA gebaseerde methoden traceerbaar moeten zijn. Het is aanbevolen om uitsluitend gevalideerde methoden voor diagnostische doeleinden toe te passen. Er bestaan een hele reeks aan alternatieve methoden voor conventionele gelelektroforese voor de detectie en identificatie van GGO's: capillaire gelelektroforese (Garcia-Canas, Gonzalez, & Cifuentes, 2004) (Heide, Drømtorp, Rudi, Heir, & Holck, 2008 a) (Heide, Heir, & Holck, 2008 b) (Nadal, Coll, La Paz, Esteve, & Pla, 2006), hybridisatie tot gelabelde en gekleurde korrels en flowcytometrie (Fantozzi, et al., 2008), array hybridisatie (Germini, et al., 2005) (Hamels, et al., 2009) (Leimanis, et al., 2006) (Morisset, Dobnik, Hamels, Žel, & Gruden, 2008 a), immunologische detectie met dipsticks (Kalogianni, Koraki, Christopoulos, & Ioannou, 2006), Hoewel PCR de belangrijkste op DNA gebaseerde technologie is, werden er ondertussen al alternatieven technieken voorgesteld zoals isothermische amplificatie (Fukuta, et al., 2004) (Morisset, Dobnik, Hamels, Žel, & Gruden, 2008 a), directe detectie van genomisch DNA door elektrochemische sensoren (Stobiecka, Ciesla, Janowska, Tudek, & Radecka, 2007), cDNA-analyse door microarrays (Chen, et al., 2004) en directe hybridisatie van genomisch DNA aan microarrays (Nagarajan & De Boer, 2003) (Tengs, et al., 2007). Recent zijn er methoden met een hoge verwerkingscapaciteit ontwikkeld voor routinelaboratoria. Deze

instrumenten worden bijzonder aantrekkelijk als zij gecombineerd kunnen worden met automatiseringstechnologie.

De huidige testmethoden zijn over het algemeen te duur en/of ongeschikt voor toepassingen in het werkveld of zijn onvoldoende specifiek om GGO's te kwantificeren. In de toekomst zullen er technologieën ontwikkeld worden die sneller en goedkoper zijn en zowel multiplexing als kwantificering mogelijk zullen maken. Ze zullen draagbaar zijn en voldoende specifiek/kwantitatief. Toch zal het moeilijk zijn om aan al deze doelstellingen te verwezenlijken. In de tussentijd zullen de laboratoria waarschijnlijk steeds afhankelijker worden van efficiënte screeningstrategieën en semi-kwantitatieve methoden ([Holst-Jensen, Testing for genetically modified organisms \(GMOs\): Past, present and future perspectives, 2009](#)).

Figuur 2 vat de evolutie van de GGO-detectiemethoden samen.



Figuur 2: De evolutie van GGO-detectiemethoden en bijbehorende referentiemateriaal

2.4 De rol van rtPCR bij kwantificatie van GGO's

2.4.1 Hoe wordt het gebruikt?

Kwantitatieve real-time PCR (qPCR) maakt de analyse van de kinetiek van een amplificatiereactie mogelijk door in real-time een fluorescerend signaal te meten. Dit signaal is recht evenredig met de hoeveelheid target-DNA dat tijdens de PCR-amplificatie wordt gegenereerd. Het signaal is afkomstig van fluorescerende probes of van fluorescerende intercalerende reagentia ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

2.4.1.1 Voor detectie

Met het qPCR-systeem, de meest gebruikelijke methode, kunnen GGO's gedetecteerd, geïdentificeerd en gekwantificeerd worden via de SYBR Green- of TaqMan-techniek ([Angers-Loustau, et al., 2014](#)). Door gebruik te maken van een primerpaar dat specifiek is voor de targetsequentie, zijn deze qPCR-chemicaliën beiden in staat om geamplificeerd en gemeten te worden in real time. De gemeten fluorescentie is afkomstig van hetzij de asymmetrische cyaninekleurstof die zich bindt aan dubbelstrengig DNA (SYBR Green), hetzij de fluorogene probe die specifiek is voor de doelsequentie (TaqMan) ([Navarro , Serrano-Heras, Castaño, & Solera, 2015](#)). Deze technologie is geschikt voor zowel onbewerkte als bewerkte voedingsmiddelen/voedermatrices ([Fraiture, et al., 2015](#)).

2.4.1.2 Voor kwantificatie

Kwantificatie is de hoeveelheid die bepaald wordt t.o.v. een specifieke eenheid, bv. het aantal kopieën van de targetsequentie of de massa van genetisch gemodificeerd materiaal. De weergave van een relatieve GGO-concentratie is altijd gebaseerd op de relatieve verhouding tussen twee gemeten hoeveelheden, in geval van GGO's: de hoeveelheid van een taxonspecifiek target en de hoeveelheid van een GGO-specifiek target ([European Network of GMO Laboratories \(ENGL\), 2015](#)).

Kwantificering is mogelijk tijdens de exponentiële groeifase van de amplificatiereactie, mits een geschikte ijkcurve werd opgesteld (o.b.v. standaarden met een gekende analietenconcentratie). Bovendien maakt de extra selectiviteit en specificiteit van de methode (door de aanwezigheid van de probe) qPCR tot één van de meest betrouwbare methoden en tevens de belangrijkste methode voor de identificatie en kwantificering van nucleïnezuren ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

2.5 Validatie en accreditatie van rtPCR

2.5.1 Validatie van de methode: Hoe gebeurt het in het labo?

Validatie van methoden is een noodzakelijke maatregel die een geaccrediteerd laboratorium moet nemen volgens ISO/IEC 17025 om betrouwbare analytische gegevens te kunnen leveren. In sommige sectoren, met name de sectoren die instaan voor de analyses van levensmiddelen en diervoeders, is de eis dat de methoden "volledig gevalideerd" zijn wettelijk bepaald. De "volledige" validatie van een analysemethode bevat o.a. een inter-laboratoriumonderzoek naar de prestaties van de kenmerken (parameters) van de methode. Er werden internationaal aanvaarde protocollen opgesteld voor de "volledige" validatie van een analysemethode d.m.v. een ringonderzoek ("collaborative trial"), met name het International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)-protocol en ISO 5725. Om de analysemethode te kunnen valideren, vereisen voornoemde protocollen dat een minimum aantal

laboratoria en testmaterialen opgenomen worden in het ringonderzoek ([European Network of GMO Laboratories \(ENGL\), 2015](#)).

2.5.2 Validatieparameters

De aanvaardingscriteria en prestatie-eisen (validatieparameters) voor o.a. rtPCR werden vastgesteld door het European Network of GMO Laboratories (ENGL).

Parameters voor aanvaardingscriteria: specificiteit, dynamic range, juistheid, amplificatie-efficiëntie, R^2 coëfficiënt, precisie - herhaalbaarheid, limit of Quantification (LOQ), limit of Detection (LOD) en robuustheid.

Parameters voor prestatie-eisen: precisie- reproduceerbaarheid, juistheid, false positive rate (type I error rate), false negative rate (type II error rate) en probability of Detection (POD)

De meeste van deze parameters zijn ook geldig bij ddPCR. De aanvaardingscriteria zullen besproken worden bij: *2.7 Validatie van ddPCR*.

2.5.3 Accreditatie

[\(ISO/IEC 17025:2017\)](#) is van toepassing op alle laboratoria. Het stelt de laboratoria in staat om testen en/of kalibraties uit te voeren, inclusief staalafname. Hiervoor worden standaardmethoden, niet-standaardmethoden en door het laboratorium ontwikkelde methoden gebruikt. In GGO-detectielaboratoria wordt voor de kwantificatie van GGO's de "eventspecifieke" methode gebruikt. Deze methode werd gevalideerd door het EURL-GMFF i.s.m. het ENGL. De qPCR-gebaseerde GGO-detectiemethoden zijn door interlaboratorisch onderzoek gevalideerd volgens [\(ISO 5725-2:2019\)](#) en/of het IUPAC-protocol [\(Trapmann, et al., 2014\)](#).

ISO 20395:2019 beschrijft de algemene richtlijnen voor het evalueren van de prestaties en het vrijwaren van de kwaliteit van methoden die gebruikt worden voor de kwantificering van specifieke nucleïnezuursequenties (targets). Dit document is van toepassing op de kwantificering van DNA (desoxyribonucleïnezuur) en RNA (ribonucleïnezuur) doelsequenties en doelsequenties in nucleïnezuurmoleculen waarbij digitale (dPCR) of kwantitatieve real-time PCR (qPCR) amplificatietechnologieën aangewend worden [\(ISO, 2019\)](#).

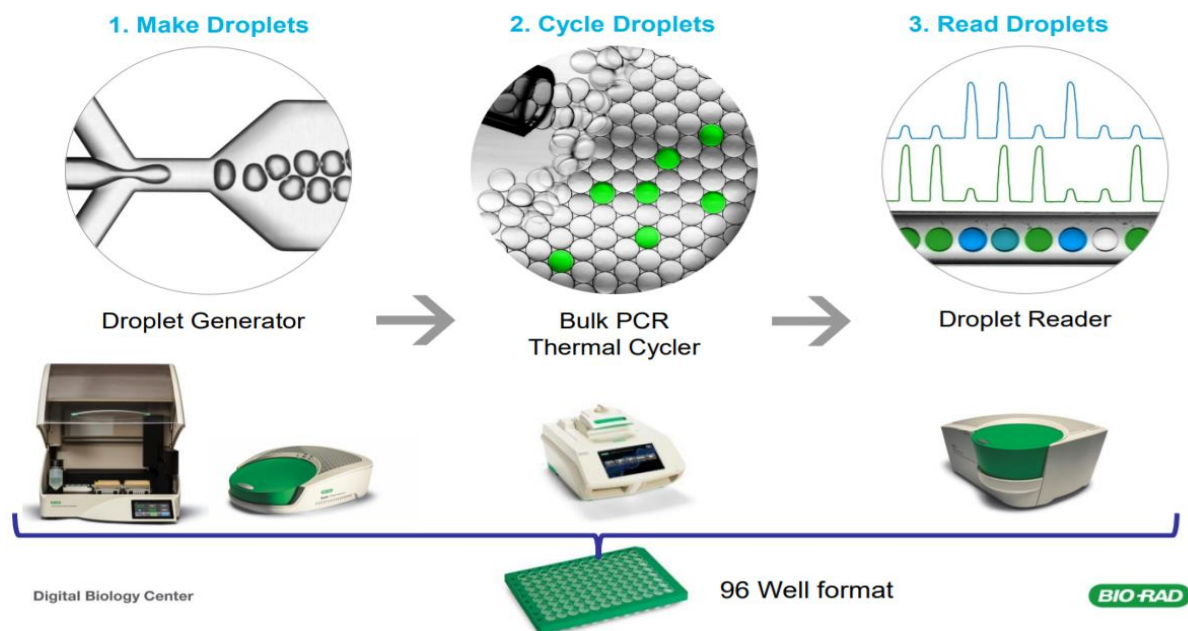
2.6 Nieuwe methode: ddPCR

Digitale PCR is een recent ontwikkelde technologie binnen het domein van DNA-analyse. Ten opzichte van real-time PCR, biedt deze methode verschillende voordelen waaronder een groot aantal metingen per staal (van een paar honderden tot duizenden), het uitvoeren van absolute

kwantificaties zonder standaardcurves en DNA-analyses met een verminderde sensitiviteit voor PCR-inhibitoren.

In 2014 werd de toepassing van dPCR voor GGO-analyse besproken door The European Network of GMO Laboratories (ENGL). Er werd geconcludeerd dat de technologie potentie heeft om toegepast te worden voor DNA-analyse binnen het wettelijk kader.

Concreet is dPCR gebaseerd op PCR, maar in tegenstelling tot qPCR wordt het reactievolume verdeeld over een groot aantal kleine compartimenten met een bijzonder klein volume (enkele nanoliters of zelfs picoliters). Na amplificatie wordt elk compartiment beoordeeld als positief of negatief d.m.v. een binaire of digitale uitlezing. De hoeveelheid target-DNA in een staal wordt middels een statistische analyse van de resultaten bepaald. In figuur 3 wordt de workflow van de digital droplet PCR weergegeven.



Figuur 3: Droplet Digital PCR Workflow

De verdeling van het DNA-target over de compartimenten berust op de Poisson distributie. Op basis van het totale aantal positieve en negatieve compartimenten en Poissonstatistieken kan, naast het absolute aantal DNA-kopieën in ieder compartiment, ook het aantal DNA-kopieën in het oorspronkelijke staal bepaald worden. Om het aantal DNA-targets te kunnen schatten o.b.v. deze verdeling, werden er hypothesen gesteld:

- Target-DNA dient willekeurig verdeeld te zijn over het totale aantal compartimenten die geanalyseerd worden.
- Aanwezigheid van het target-DNA betekent een positieve classificatie van het compartiment.

- Afwezigheid van het target-DNA betekent een negatieve classificatie van het compartiment.
- Alle compartimenten moeten voorzien worden van hetzelfde volume.
- Voor absolute kwantificatie moet het volume van ieder compartiment nauwkeurig gekend zijn (de juistheid van de meting is afhankelijk van de nauwkeurigheid van de volumebepaling) ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

2.6.1 dPCR methoden

Tegenwoordig zijn er twee belangrijke methoden waarmee dPCR kan uitgevoerd worden: de chamber-based methode en de droplet-based methode.

2.6.1.1 De chamber-based methode

Bij deze methode wordt er gebruik gemaakt van kamers waarin de reactiemix wordt geïnjecteerd. Net als bij qPCR 96-well platen zijn de kamers éénmalig te gebruiken. Het aantal en de grootte ervan zijn afhankelijk van het gebruikte toestel en consistent per run. Het aantal compartimenten en reacties zijn kleiner dan bij de droplet-based methode ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

2.6.1.2 De droplet-based methode

Bij digital droplet PCR (ddPCR) gebeurt de verdeling van het reactiemengsel door het maken van een water-in-olie-emulsie. Dit gebeurt voor het genereren van een groot aantal droplets (druppels). Het aantal droplets die gegenereerd kunnen worden is afhankelijk van het type droplet generator en elke afzonderlijke reactie. Nadien wordt het target-DNA in de droplets geamplificeerd. Dit gebeurt in bv. standaard PCR-wells (bv. een 96-well plaat). Tot slot zal de eindpuntfluorescentie van de droplets gemeten worden door een droplet reader ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

2.6.2 rtPCR vs ddPCR

Wanneer een kwantitatieve analyse vereist is, wordt de voorkeur gegeven aan real-time PCR (qPCR) vanwege de nauwkeurigheid en precisie van de methode ([Holst-Jensen, Testing for genetically modified organisms \(GMOs\): Past, present and future perspectives, 2009](#)). Het gebruik ervan voor doelwitkwantificering kan echter beperkt worden door een significante bias wanneer de doelwitsequentie in lage concentratie aanwezig is in een achtergrond van een groot aantal niet-doelwitnucleïnezuren ([Hindson, et al., 2011](#)), ([Pekin, et al., 2011](#)), ([Pohl & Shih, 2004](#)) ([Sanders, et al., 2011](#)). Een andere belangrijke beperking is de gevoeligheid van de methode voor de frequent aanwezige PCR-remmers die mee met het DNA uit complexe matrices geëxtraheerd worden.

Bij qPCR, de gangbare techniek voor GGO-kwantificering, worden standaardcurven voor de hoeveelheden endogeen en transgeen, d.m.v. seriële verdunningen uit referentiemateriaal, afzonderlijk bereid ([Cankar, Štebih, Dreo, Žel, & Gruden, 2006](#)). qPCR-efficiëntie en daarmee ook de

kwantificering van endogeen en transgeen door qPCR, kan door vele factoren (zoals o.a. PCR-inhibitoren) aanwezig in stalen van levensmiddelen en diervoeders, beïnvloed worden. Dit kan leiden tot onder- of overschatting van het GGO-gehalte (Cankar, Štebih, Dreo, Žel, & Gruden, 2006) (Corbisier, Bhat, Partis, Rui Dan Xie, & Emslie, 2009). Er is veel onderzoek gedaan naar het verbeteren van de prestaties van qPCR-kwantificering met betrekking tot inhibitie en matrixeffecten (Cankar, Štebih, Dreo, Žel, & Gruden, 2006) evenals naar de lage concentraties van doelwitsequenties in routinestalen (Berdal, Bøydler, Tengs, & Holst-Jensen, 2008) (Lee, La Mura, Greenland, & Mackay, 2010). Ook het gebrek aan gecertificeerd referentiemateriaal werd vastgesteld (Lee, La Mura, Greenland, & Mackay, 2010). De meeste van de voorgestelde oplossingen zijn niet praktisch waardoor een betrouwbare kwantificering van GGO's in levensmiddelen en diervoeders tot op vandaag een grote uitdaging vormt (Morisset, Štebih, Milavec, Gruden, & Žel, 2013).

De dPCR-technologie zou een belangrijk instrument kunnen worden op het gebied van GGO-detectie, omdat een absolute kwantificatie en niet enkel een relatieve kwantificatie zoals bij qPCR mogelijk is. Voor de metingen is het gebruik van referentiemateriaal niet noodzakelijk, hierdoor worden de problemen met de beschikbaarheid van optimaal referentiemateriaal opgelost. Ook de detectie van niet-geautoriseerde GGO's wordt zo gefaciliteerd. Bovendien wordt de PCR-efficiëntie minder beïnvloed door de aanwezigheid van PCR-inhibitoren door de verdeling van het staal in een kleiner volume en kunnen meetonzekerheden, vnl. bij een laag aantal kopijen, worden verminderd. Gevalideerde qPCR-methoden kunnen daarentegen niet altijd meteen getransfereerd worden naar de dPCR-technologie. Er moet immers enige optimalisatie uitgevoerd worden met betrekking tot het ontwerp en de concentraties van primers en probes. Bovendien is de dPCR-technologie beter geschikt voor de identificatie/kwantificering dan voor de screening, door haar lage verwerkingscapaciteit, omdat er maximaal twee verschillende doelwitten in één welletje geïdentificeerd kunnen worden (Köppel & Bucher, 2015) (Fraiture, et al., 2015).

2.6.3 Voordelen van d(d)PCR

Er worden bij routinematige GGO-analyses verschillende voordelen aangehaald ten gunste van het gebruik van dPCR in plaats van qPCR. In de eerste plaats maakt dPCR de detectie van het absolute aantal kopieën van de targetsequentie mogelijk. Een verkeerde interpretatie van de amplificatie-efficiëntie wordt hierdoor vermeden (Corbisier, Bhat, Partis, Rui Dan Xie, & Emslie, 2009) (Bhat, Herrmann, Armishaw, Corbisier, & Emslie, 2009). Ten tweede is dPCR niet meer afhankelijk van de beschikbaarheid van referentiemateriaal of standaarden (Burns, Burrell, & Foy, 2010). De analysemethode levert gegevens die voldoen aan de hoge precisie en betrouwbaarheidsvereisten noodzakelijk voor de metingen (Corbisier, Bhat, Partis, Rui Dan Xie, & Emslie, 2009) (Bhat, Herrmann, Armishaw, Corbisier, & Emslie, 2009). Ook bij een laag aantal kopijen van de doelsequentie is dPCR

nauwkeuriger dan qPCR. Dit maakt de kwantificatie van lage GGO-gehalten mogelijk (Whale, et al., 2012). Tussen de dPCR-methoden onderling zijn er enkele verschillen die gunstig of nadelig kunnen zijn voor de toepassing ervan. Het gebruik van cdPCR kent twee belangrijke beperkingen: het kleine dynamische bereik van de methode (2-3 logs) en de relatief hoge prijs.

Gezien een groter aantal replicaten met ddPCR geanalyseerd kunnen worden en de lagere prijs per staal, wordt ervan uitgegaan dat de methode preciezer (Baker, 2012) en betrouwbaarder en aldus gemakkelijker kan ingevoerd worden in laboratoria voor dagelijkse analyses (Morisset, Štebih, Milavec, Gruden, & Žel, 2013).

2.6.4 Digital MIQE

Omwille van de voordelen die dPCR biedt t.o.v. qPCR, is er een groeiende belangstelling voor dPCR. Voornoemde methode heeft dan ook een grote impact op wetenschappelijke onderzoek en diagnostische toepassingen. De mogelijkheid om betrouwbare en significante experimenten uit te voeren is, net als bij qPCR, een vereiste. Hiervoor zijn een nauwkeurige opzet en geschikte controles nodig. Om een onafhankelijke evaluatie van de experimentele gegevens te verkrijgen, is het noodzakelijk dat alle relevante experimentele data gepubliceerd worden.

The Digital MIQE Guidelines is een verslag dat de vereisten voor dPCR (vastgesteld in een vroeg stadium van de ontwikkeling en de commerciële toepassing ervan) behandelt. De opvolging van deze richtlijnen door de wetenschappelijke gemeenschap draagt bij tot de standaardisatie van de nog experimentele protocollen, stimuleert een zo efficiënt mogelijk gebruik van middelen en vergroot de impact van deze veelbelovende nieuwe technologie.

De MIQE richtlijnen werden in 2009 voor het eerst gepubliceerd met als doel de qPCR-analyses te verbeteren en de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van gegevens te waarborgen. Ze werden opgesteld om toekomstige updates aan te moedigen en hun relevantie uit te breiden (Bustin, et al., 2009). Er werden overwegingen gemaakt om de richtlijnen op te nemen in een zogenaamde dPCR-specifieke MIQE-checklist, de Minimum Information for the Publication of Digital PCR Experiments (dMIQE). Alle punten van de checklist werden geclassificeerd als essentieel (E) of wenselijk (D) voor dPCR (Huggett, et al., 2020).

2.7 Validatie van ddPCR

Om ddPCR te mogen toepassen als analysemethode binnen een geaccrediteerd labo, dient er een validatie van de methode uitgevoerd te worden. Verschillende parameters, die verband houden met de kwantificatie, zullen hierbij nagegaan worden. Deze parameters, analoog aan qPCR zijn:

specificiteit, juistheid, herhaalbaarheid, robuustheid en LOD/LOQ. De variabiliteit, die samenhangt met de herhaalbaarheid, intermediaire precisie en bias kan gebruikt worden om de meetonzekerheid van een dPCR-resultaat in te schatten.

Deze validatieparameters zijn afkomstig van ISO-normen. Voor qPCR en dPCR is er een nieuwe standaard: ISO 20395 (ISO, 2019). De ISO-normen worden ook verwerkt in richtlijnen specifiek voor GGO-analyse zoals in het document: *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*. Het document wordt op dit ogenblik verder uitgebreid naar dPCR. De richtlijnen geven praktisch advies hoe de verschillende parameters moeten/kunnen getest worden.

2.7.1 Aanvaardingscriteria voor PCR-methoden

2.7.1.1 Specificiteit

Definitie: Eigenschap van een methode om uitsluitend te reageren op het kenmerk of de respectievelijke analyt ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#))

De dPCR-methode verschilt qua concept niet van de qPCR-methode. Het principe van de amplificatie van target-DNA is hetzelfde als bij qPCR. De specificiteit van een PCR-test wordt verkregen door gebruik te maken van high-fidelity polymerase en een geschikt primer/probe-ontwerp. Indien de specificiteit van een qPCR-methode bij qPCR aangetoond werd, moeten zowel de volgorde van de primer-/probesequentie als de reactiecondities in een dPCR-formaat overgenomen worden. Er kunnen eventuele wijzigingen aangebracht worden om de dPCR-methode te optimaliseren (bv. wijziging van de MgCl₂-concentratie in de PCR-reactiebuffer, wijziging van de annealingtemperatuur, de primer- en probeconcentraties of de ramping-instelling). Afhankelijk van de in de methode aangebrachte wijzigingen (bv. mastermix, thermisch programma, enz.) kan het nodig zijn de specificiteit van de methode opnieuw te evalueren ([European Network of GMO Laboratories \(ENGL\), 2015](#)).

2.7.1.2 Dynamic range (Dynamisch bereik)

Definitie: Het bereik van concentraties waarbinnen de module lineair werkt met een aanvaardbaar niveau van juistheid en nauwkeurigheid ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#))

Het dynamische bereik van de methode moet ten minste een tiende en het vijfvoud van de streefconcentratie omvatten. De doelconcentratie wordt als drempelwaarde beschouwd en is relevant voor de wettelijke voorschriften ([Mazzara, et al., 2008](#)).

2.7.1.3 Juistheid

Definitie: De mate waarin een testresultaat overeenstemt met de aanvaarde referentiewaarde ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#))

De juistheid moet binnen de grenzen van $\pm 25\%$ van de aanvaarde referentiewaarde liggen over het gehele dynamische bereik van de PCR-modules ([Mazzara, et al., 2008](#)).

De mate van juistheid wordt gewoonlijk uitgedrukt in termen van bias ([ISO/IEC GUIDE 99:2007](#)). De bias is het verschil tussen de verwachting van de testresultaten en een aanvaarde referentiewaarde ([ISO 5725-1:2018](#)). De afwezigheid van een significante bias moet over het gehele dynamische bereik van de methode worden getest ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

2.7.1.4 Precisie – herhaalbaarheid

Definitie: De relatieve standaardafwijking van de herhaalbaarheid (RSDr) is de relatieve standaardafwijking van testresultaten die onder herhaalbaarheidsomstandigheden worden bekomen. Herhaalbaarheidsomstandigheden zijn omstandigheden waarin testresultaten worden verkregen met dezelfde methode, op identiek testmateriaal, in hetzelfde laboratorium, door dezelfde persoon, met dezelfde apparatuur en met korte tijdsintervallen ([European Network of GMO Laboratories \(ENGL\), 2015](#)).

De relatieve standaardafwijking van de herhaalbaarheid moet, bij internationale ringproeven, over het gehele dynamische bereik van de methode minder dan 25% bedragen ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)).

2.7.1.5 Limit of Quantification (LOQ) (Kwantificeerbaarheidslimiet)

Definitie: De kwantificeerbaarheidslimiet (Limit of quantification (LOQ)) is de laagste hoeveelheid of concentratie analyt in een staal, die op betrouwbare wijze gekwantificeerd kan worden met een aanvaardbaar niveau van precisie en nauwkeurigheid ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)).

De LOQ moet kleiner zijn dan een tiende van de waarde van de doelconcentratie (bv. 0,9%) en een RSDr-waarde $\leq 25\%$ hebben. De doelconcentratie moet beschouwd worden als de drempelwaarde die relevant is voor de wettelijke vereisten ([Mazzara, et al., 2008](#)).

2.7.1.6 Limit of Detection (LOD) (Detectielimiet)

Definitie: De detectielimiet (Limit of detection (LOD)) is de laagste hoeveelheid of concentratie van een analyt in een staal, die op betrouwbare wijze kan worden aangetoond, maar niet noodzakelijk

gekwantificeerd kan worden, zoals blijkt uit de validatie van één laboratorium ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)).

De LOD mag niet meer dan een twintigste van de doelconcentratie bedragen. Experimenteel moet de aanwezigheid van de analyt in ten minste 95% van de gevallen met kwantitatieve methoden aangetoond kunnen worden. Hierbij moet $\leq 5\%$ vals-negatieve resultaten gegarandeerd zijn. De doelconcentratie moet beschouwd worden als de drempelwaarde die relevant is voor de wettelijke voorschriften ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)).

2.7.1.7 Robuustheid

Definitie: De robuustheid van een methode is een maat voor het vermogen om onaangeroerd te blijven door kleine, maar opzettelijke afwijkingen van de in de procedure beschreven experimentele omstandigheden ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)).

De methode moet de verwachte resultaten kunnen opleveren wanneer kleine afwijkingen van de in de procedure beschreven proefomstandigheden worden ingevoerd. Voor kwantitatieve modules mogen, uitgaande van het aanvaardingscriterium van $\leq 25\%$ voor de relatieve herhaalbaarheid standaardafwijking (RSDr) en juistheid, de RSDr en de juistheid (wanneer berekend voor verschillende veranderingen) niet meer dan 30% bedragen ([European Network of GMO Laboratories \(ENGL\), 2015](#)). Experimenten die door een andere operator uitgevoerd werden, verschillende primer- en probeconcentraties, verschillende annealingtemperaturen, verschillende thermische cyclers, verschillende reactievolumes en verschillende leveranciers van mastermixen zijn voorbeelden van factoren die in een robuustheidstest aan bod moeten komen ([European Network of GMO Laboratories \(ENGL\), 2015](#)) ([Hougs, et al., 2017](#)) ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

3. Experimenteel gedeelte

3.1 Materialen en methoden

3.1.1 Materialen

3.1.1.1 Gecertificeerde referentie materialen

Voor het uitvoeren van een validatie wordt er gebruik gemaakt van genetisch materiaal met een gekende DNA-concentratie (certified reference material (CRM)). Voor deze validatie wordt er gebruik gemaakt van GTS40-3-2(tabel 1).

Tabel 1: Toegepast gecertificeerd referentiemateriaal GTS40-3-2 met verschillend GGO%

GTS40-3-2	
Code producent	Inhoud (%GGO)
ERM-BF410bp	0,1%
ERM-BF410dp	1%
ERM-BF410ep	10%

3.1.1.2 Proficiency test stalen

Om de toepasbaarheid van de gevalideerde methode te testen, worden er in totaal 3 stalen van verschillende matrices met de ddPCR-methode geanalyseerd. Deze stalen werden eerder al getest met de rtPCR-methode in het labo in het kader van Proficiency Test. Van elk staal zijn er enkele extracten (tabel 2).

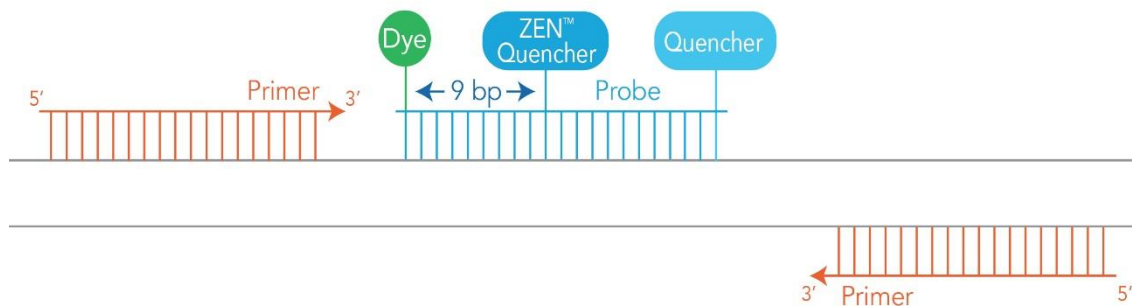
Tabel 2: Overzicht geanalyseerde real-life stalen met toegepaste extractiemethode, aantal extracten en aanwezige GGO-event

	Real-life stalen	Extractiemethode	Extracten	GGO-event
1	Soja en maïs meel (mixed flours)	NucleoSpin®	1	GTS 40-3-2
			2	
2	Verwerkte matrix	CTAB	1 2	GTS 40-3-2
3	Diervoeder	NucleoSpin®	1	GTS 40-3-2
			2	
			3	
			4	

3.1.1.3 Oligonucleotiden

Voor de specifieke detectie van DNA van soja-event 40-3-2 wordt een 84-bp fragment van het recombinatiegebied tussen het donormateriaal en het plantengenoom (gelegen op het 5' planten-DNA-gebied) geamplificeerd met behulp van twee specifieke primers ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)) ([EURL GMFF, 2010](#)).

De fluorescentie van de PCR-producten wordt gemeten met behulp van een specifieke oligonucleotideprobe die aan het 5'-uiteinde gelabeld is met de fluorescerende kleurstof FAM (reporter) en aan het 3'-uiteinde met de niet-fluorescerende quencher Zen-IowaBlackFQ. Traditionele probes hebben ongeveer 20-30 basen tussen de fluorofoor en de quencher. Bij interne ZEN- of TAO-quenchers wordt deze lengte gereduceerd tot slechts 9 basen ([IDT, s.d.](#)).



Figuur 4: Opbouw van een specifieke oligonucleotideprobe die bindt aan een welbepaalde DNA-sequentie

Voor de kwantificering van soja- DNA wordt een 74-bp fragment van het soja-endogene lectinegen (lec) geamplificeerd met behulp van een paar specifieke primers en een lec-gen-specifieke probe (eveneens gelabeld met fluorescerende kleurstof FAM en de niet-fluoresecerende quencher Zen-lowaBlackFQ) ([European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2017](#)).

Tabel 3 geeft de gebruikte primers/probes met hun sequentie en de amplicongrootte van de verkregen PCR-producten weer.

Tabel 3: Overzichtstabel toegepaste primers en probes voor zowel het transgen als het endogen

Naam	Sequentie 5'→3'	Amplicongrootte (bp)
dPCR_TRANS_GTS40-3-2_F	TTC-ATT-CAA-AAT-AAG-ATC-ATA-CAT-ACA-GGT-T	84 bp
dPCR_TRANS_GTS40-3-2_R	GGC-ATT-TGT-AGG-AGC-CAC-CTT	
dPCR_TRANS_GTS40-3-2_P	FAM- CCT-TTT-CCA-TTT-GGG- Zen-lowaBlack FQ	
dPCR_ENDO_LEC_RRS_F	CCA-GCT-TCG-CCG-CTT-CCT-TC	74 bp
dPCR_ENDO_LEC_RRS_R	GAA-GGC-AAG-CCC-ATC-TGC-AAG-CC	
dPCR_ENDO_LEC_RRS_P	FAM- CTT-CAC-CTT-CTA-TGC-CCC-TGA-CAC-Zen-lowaBlack FQ	

3.1.1.4 Algemene materialen

- DNase, RNase Protease vrij water: Acros Organics
- Ethanol: 70%, gedenatureerd, Technisolv®
- DNA-Erase™: MP Biomedicals
- Micropipetten: Gilson, 20 – 200 – 1000 µl
- Serologische pipetten: 5-10 mL
- Filtertips: Biotix uTIP
- Timer
- Vortexer: Velp® Scientifica
- Microcentrifugetubes: 2 mL
- Protein low binding tubes 1,5 mL: Eppendorf®
- Falcontubes 15-50 ml: Falcon® (15 ml), CELLSTAR® (50 ml)

- Balans: Kern ABS 120-4
- Centrifuge: Hettich Mikro 200R, Hettich
- Centrifuge: Sigma 4K15, Sigma
- Heating block: Stuart block heater
- Warmwaterbad: Memmert, WNB 7-45
- Zuurkast Captair®Flex® XLS392: Erlab®,

3.1.2 Methoden

3.1.2.1 DNA extractie, concentratie en zuiverheid van het DNA

3.1.2.1.1 NucleoSpin® Food kit

Materiaal

- NucleoSpin® food extraction kit
- RNase: Sigma
- Proteïnase K: Sigma Aldrich
- Ethanol: absoluut; 0,1% H₂O: EMSURE®

Principe

Met de kit wordt het genomisch DNA uit voedsel van plantaardige of dierlijke oorsprong geïsoleerd. Het te analyseren materiaal wordt afgewogen waarna het staal geëxtraheerd wordt met een lysisbuffer. De lysisbuffer CF bevat chaotrope zouten, denaturingsmiddelen en detergenten die zorgen voor de cellyse en de isolatie van het DNA. Door middel van centrifugatie wordt het lysismengsel geklaard. De gevormde pellet, bevattende verontreinigingen en overgebleven celresten, wordt vervolgens verwijderd. Het heldere supernatant wordt gemengd met bindingsbuffer en ethanol voor een optimale binding met de NucleoSpin®-silicamembraan. Nadien wordt het membraan met CQW- en C5-buffer gewassen voor een efficiënte verwijdering van het potentieel PCR-remmers. Tot slot wordt het DNA van de silicamembraan geëluëerd in een elutiebuffer, in dit geval de CE-buffer, o.b.v. een lage zoutconcentratie of water. Het DNA is nu klaar voor gebruik ([Macherey-Nagel, 2020](#)).

Procedure

Voor elk staal wordt er 200 mg Roundup Ready® soybean (RRS) afgewogen (tabel 4).

Tabel 4: Overzicht van de geëxtraheerde materialen met gebruikte extractiemethoden en de experimenten van toepassing

Materialen				
GTS40-3-2	%GM	CTAB Tip 20	NucleoSpin®	Experiment
ERM-BF410bp	0,1%	2 x 1 g (2 stalen)	4 x 200 mg (poolen tot 2 stalen)	LOQ _{rel} , toepasbaarheid van de methode
ERM-BF410dp	1%	3 x 1 g (poolen tot 1 staal)	4 x 200 mg (poolen tot 2 stalen)	Toepasbaarheid van de methode
ERM-BF410ep	10%	3 x 1 g (poolen tot 1 staal)	3 x 200 mg (poolen tot 1 staal)	Optimalisatie, dynamisch bereik, LOD _{95%} , LOQ _{abs}

Daarnaast wordt er bij elke reeks stalen bij het afwegen van referentiemateriaal een extra open tube voorzien, de blanco open tube of BO-tube, als controlestaal om eventuele contaminatie gedurende de DNA-extractie op te sporen.

De procedure van NucleoSpin® Food extractie wordt weergegeven in figuur 19 (in bijlage). In het labo wordt deze procedure globaal gevolgd, mits enkele aanpassingen voor een betere opzuivering van het DNA.

De lysebuffer CF wordt samen met 20 µl (i.p.v. 10 µl) proteïnase K (10 mg/ml) aan iedere tube toegevoegd. De stalen worden vervolgens d.m.v. vortexing gemengd tot een homogeen mengsel. Daarna volgt een incubatiestap waarbij de stalen in een heatblock worden geïncubeerd. 20 µl RNase A wordt nadien aan elk staal toegevoegd. Alles wordt opnieuw goed gemixt d.m.v. vortexing. De stalen worden vervolgens geïncubeerd bij kamertemperatuur en gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 13.000 x g. Het heldere supernatans (maximaal 650 µl) wordt in 2 ml microcentrifugetubes overgebracht. Afhankelijk van het volume supernatans dat overgebracht wordt in de tubes, wordt éénzelfde volume C4-buffer en ethanol 96-100% aan de tubes toegevoegd. Nadien wordt iedere tube voor 30 seconden gevortext. Voor ieder extract wordt een NucleoSpin® Food kolom in een collectietube voorzien. Van de bereide mix wordt er 650 µl op de kolom overgebracht. De tubes worden nadien gecentrifugeerd. Deze stap wordt herhaald totdat het volledige volume supernatans op de kolom werd gebracht. Bij elk van de volgende centrifugatiestappen dient de membraan van de kolommen volledig droog te zijn. Nadien wordt er wasbuffer (CQW) op elke kolom gebracht. Tussen iedere wasstap worden de stalen gecentrifugeerd waarna de collectietubes met supernatans worden verwijderd. De kolommen worden in nieuwe collectietubes geplaatst. In de tweede wasstap wordt er 650 µl C5 wasbuffer op de kolommen gebracht. Tijdens de laatste wasstap wordt de C5 nogmaals aan de kolommen

toegevoegd. De daaropvolgende centrifugatiestap vindt plaats voor 2 minuten bij 11.000 x g. De collectietubes met supernatans worden nadien weggegooid en de NucleoSpin® Food kolommen worden in 2 ml Eppendorf microcentrifugetubes gebracht. Tot slot wordt het DNA van de kolommen geëluëerd. Dit gebeurt met de voorverwarmde (op 70°C) elutiebuffer (CE) die op de kolommen wordt gebracht. Daarop volgt een incubatiestap van 5 minuten bij kamertemperatuur. De stalen worden nadien een laatste maal gecentrifugeerd zodat de tubes nu het DNA bevatten (Macherey-Nagel, 2020).

3.1.2.1.2 CTAB tip20 methode

Materiaal

- Ethanol (C₂H₅OH): absoluut, minimaal 98%: EMSURE®
- Isopropanol (CH₃CH(OH)CH₃): EMSURE®
- Ribonuclease A (RNase): Sigma
- Proteinase K: Sigma Aldrich
- G2 Buffer: Qiagen
- QBT Buffer: Qiagen
- QC Buffer: Qiagen
- QF Buffer: Qiagen
- CTAB A Buffer (pH = 8.0)
- Buffer TE (1x): Sigma
- Ethanol ((C₂H₅OH)) 70%
- Chloroform(CHCl₃):octaan-1-ol (C₈H₁₇OH) (24:1): EMSURE® (chloroform), EMPLURA® (octaan-1-ol)
- Qiagen Genomic-tip20/G

Principe

De gebruikte CTAB Qiagen Genomic Tip20/G-methode is aangepast zodat het toegepast kan worden voor de extractie van DNA uit gemalen sojaboonmateriaal. Het principe van de methode berust op het vrijmaken van DNA uit een matrix in een waterige oplossing om het vervolgens verder te zuiveren van PCR-inhibitoren. De eerste stap is een lysestap. Onder het verwarmen van de stalen en in aanwezigheid van Tris HCl, EDTA en CTAB zal het DNA uit het materiaal vrijkomen. De onzuiverheden zullen verwijderd worden door het uitvoeren van een extractie met chloroform/octanol. Door het toevoegen van isopropanol wordt er een DNA-precipitaat gevormd. Deze pellet wordt opgelost in TE-buffer. Eventueel aanwezige PCR-inhibitoren, worden nadien verwijderd d.m.v. anionenwisselingschromatografie. Door een laatste isopropanol precipitatiestap

wordt het opgevangen DNA ontzout en geconcentreerd ([QIAGEN Sample and Assay Technologies, 2015](#)).

Procedure

Voor elk staal wordt er 1 g Roundup Ready® soybean (RRS) afgewogen (zie figuur 20 in bijlage). Deze figuur geeft tevens de volledige procedure van de extractiemethode weer.

Daarnaast wordt er bij elke reeks stalen een BO voorzien.

Aan ieder staal wordt er CTAB buffer A, Proteïnase K en RNase in een falcontube van 50 ml toegevoegd, waarna d.m.v. vortexing de stalen gemengd worden tot een homogene oplossing. De stalen worden vervolgens geïncubeerd in een warmwaterbad (WWB) en regelmatig handmatig om en om gedraaid om ze goed te mengen. Deze stap wordt gevolgd door een afkoelingsperiode op de bench. Een chloroform/octanol mix (24/1 verhouding) wordt bereid en toegevoegd aan de tubes. Om deze mix te laten inwerken in het staal, worden de stalen gevortext voor 30 seconden. Nadien worden de tubes twee keer gecentrifugeerd. Door de centrifugale kracht ontstaan er twee fasen: een waterige fase en een organische fase. Het is de bovenste waterige fase die overgebracht wordt in een nieuwe falcontube, waaraan isopropanol werd toegevoegd. Hierna worden de stalen handmatig om en om gemengd.

Tijdens de isopropanolprecipitatie worden de stalen eerst gecentrifugeerd. Vervolgens wordt het supernatans verwijderd en ethanol 70% aan de tubes toegevoegd. Om de ethanol te laten inwerken, worden de tubes enkele malen om en om gedraaid. Nadien volgt opnieuw een centrifugatiestap. Het supernatans (ethanol) wordt voorzichtig verwijderd. De overgebleven pellet wordt vervolgens geresuspendeerd in voorverwarmede (bij 50°C) 1x TE buffer. Om het geheel goed te mengen, worden de stalen gedurende 30 seconden gevortext. Na het toevoegen van de voorbereide G2 buffer worden de stalen geïncubeerd. Voorafgaand aan de opzuivering van het DNA m.b.v. een Tip20 kolom, volgt nog een centrifugatiestap.

Voordat het staal over de kolom wordt gelopen, dient de kolom geëquilibreerd met QBT buffer. Bij het aanbrengen van de volgende buffers, dienen de kolommen volledig leeg te zijn. Het staal (het supernatans) wordt in twee keer over de kolom gelopen. Het opzuiveren van het DNA (gebonden aan de kolom) gebeurt door het wassen van de kolom met QC -buffer. Nu is het DNA klaar om geëlueerd te worden. Dit gebeurt met QF -buffer die aan de kolom wordt toegevoegd. Het eluaat wordt in een 2 ml Eppendorf tube opgevangen.

Tijdens een laatste DNA-precipitatiestap met isopropanol wordt het DNA verder ontzilt en geconcentreerd. Mengen van het staal gebeurt door de tubes tien keer om en om te draaien. De

tubes worden nadien gecentrifugeerd. Het supernatans wordt verwijderd en de achtergebleven pellet gewassen met ethanol 70%. Opnieuw volgt er een centrifugatiestap waarna het supernatans (ethanol) voorzichtig met een pipet wordt verwijderd. Het overige supernatans wordt verdampt bij 28°C d.m.v. een heatblock. Het DNA in de pellet wordt geresuspendeerd in nuclease vrij water. Nadien volgt nog een laatste incubatiestap waarna de tubes met het opgezuiverde DNA onder een constante schudbeweging gedurende één nacht in de koelkast geplaatst worden ([QIAGEN Sample and Assay Technologies, 2015](#)).

3.1.2.1.3 DNA concentratie en zuiverheid

Voor het meten van de DNA-concentratie van het geëxtraheerde DNA, wordt er gebruik gemaakt van de NanoDrop 2000. Het toestel meet de absorbantie op drie verschillende golflengten (230, 260 en 280 nm) d.m.v. spectrofotometrie. Nadien wordt de DNA-concentratie automatisch berekent a.d.h.v. de Beer-Lambert-vergelijking.



Figuur 5: Afbeelding van een NanoDrop 2000

3.1.2.2 ddPCR

Materiaal

- Primers (forward en reverse): IDT
- Probes: IDT
- ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad ref. 168-3024)
- Droplet generation oil for probes: Bio-Rad
- QX200™ droplet system: Bio-Rad, ref. 186-4002
- Droplet Generator cartridges en gaskets (960 reactions): Bio-Rad, ref. 186-4007
- PX1™ PCR Plate Sealer: Bio-Rad, ref. 181-4000
- TM100™ Thermal Cycler: Bio-Rad, ref. 186-1096
- Bio-Rad Foil PCR Plate Seals: Bio-Rad, ref. 181-4040
- Eppendorf Twin Tec semi skirted 96-well plate: VWR, ref. 391-2052
- Rainin automatic pipet E4 XLS: Mettler-Toledo, ref. 17013795
- Rainin 200 µl filter tips: Mettler-Toledo, ref. 17007961

Principe en apparatuur

Het QX200 ddPCR-systeem van Bio-Rad combineert water-olie-emulsiedruppeltechnologie met microfluidica. De QX200 Droplet Generator verdeelt de stalen in ongeveer 20000 druppeltjes met volume 0,85 nL ([Bio-Rad](#)).

Met de PX1 PCR Plate Sealer wordt de PCR-plaat op een efficiënte wijze verzegelt. Deze thermische verzegelingsmethode helpt verdamping van het staal tijdens de PCR- amplificatie te beperken (Bio-Rad, sd).

Nadien wordt PCR-amplificatie in elke druppel uitgevoerd met behulp van een thermische cyclus (bv. TM100™ Thermal Cycler). Na de PCR-amplificatie worden de druppels in één enkel bestand naar een QX200 Droplet Reader getransporteerd. DezeDeze telt de fluorescerende positieve en negatieve druppels om zo de DNA-doelconcentratie te berekenen (Bio-Rad).



Figuur 6: Apparatuur voor de ddPCR-procedure. Links: QX200 ddPCR-systeem van Bio-Rad; midden: PX1 PCR Plate Sealer en rechts: TM100™ Thermal Cycler

Procedure

De procedure start met het bereiden van alle PCR-mixen die eerder berekend werden in het voorziene template. Nadien worden de PCR-mixen over de verschillende tubes verdeeld. Elk staal bestaat uit 17 μ l PCR-mix. Dan wordt er aan elke tube 5 μ l DNA of 5 μ l water toegevoegd. Om de ddPCR-mix goed te mengen worden de tubes driemaal kort gevortex en gecentrifugeerd. De PCR mix is in tabel 5 en 6.

Tabel 5: Template bereiding PCR-mix voor lectine met de beste primer-/probeconcentratie voor deze GGO-kwantificatie

Lectine			
Mix	Stock concentratie (μ M)	Finale concentratie (nM)	Volume 1 reactie (μ l)
Primer-F-ddPCR	20	150	0,165
Primer-R-ddPCR	20	150	0,165
Probe-ddPCR	10	50	0,11
Water			5,56
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	2x	1x	11
Volume			17
DNA			5
Totaal volume			22

Tabel 6: Template bereiding PCR-mix voor RRS met de beste primer-/probeconcentratie voor deze GGO-kwantificatie

RRS				
Mix	Stock concentratie (nM)	Finale concentratie (nM)	Volume 1 reactie (μl)	
Primer-F-ddPCR	20	600	0,66	
Primer-R-ddPCR	200	600	0,66	
Probe-ddPCR	10	300	0,66	
Water			4,02	
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	2x	1x	11	
Volume			17	
DNA			5	
Totaal volume			22	

De ddPCR-mix wordt bereid a.d.h.v. volgende formule:

$$\text{PCR-mix } (\mu\text{l}) (= 17 \mu\text{l} * \text{aantal reacties}) + \text{DNA } (\mu\text{l}) / \text{Water } (\mu\text{l}) \text{ voor NTC } (= 5 \mu\text{l} * \text{aantal reacties})$$

De DG8 cartridge wordt vervolgens geladen. In de middelste kolom wordt telkens 20 μl van het staal gepipetteerd. In de “oil-”kolom wordt in alle acht de welletjes 70 μl droplet generation oil for probes toegevoegd toegevoegd. Alvorens in de QX200™ droplet generator te plaatsen, wordt er over de cartridge rubber pakkingsmateriaal aangebracht om verdamping van het staal te voorkomen. Gedurende een tweetal minuten zullen de droplets gegenereerd worden. Deze bevinden zich in de derde kolom. 40 μl van de dropletsdt wordt vervolgens met een multichannel Rainin pipet (met bijhorende tips) kolom per kolom overgebracht in een op ijs gekoelde low profiel 96-well PCR-plaat. Telkens een kolom wordt geladen, worden deze welletjes afgeplakt met tape om verdamping te voorkomen. De 96-well PCR-plaat wordt afgesloten met een zilveren folie in de PX1™ PCR Plate Sealer en bij een temperatuur van 170°C in 5 seconden verzegeld. De PCR-plaat wordt aansluitend in de TM100™ Thermal Cycler geplaatst. Het toestel wordt ingesteld met één van volgende PCR-programma's (tabel 7):

Tabel 7: PCR-programma 1 en 2 (40/45 cycli)

Stap	Fase	Temperatuur (°C)	Tijd (s)	Cycli
1	Initiële denaturatie	95	600	1
2	Amplificatie	94/95	30/15	40/ 45 cycli
		Annealing en Elongatie	gradiënt 60	
3	Deactivatie	98	600	1
4	Hold	4	∞	1

Na afloop van het amplificatieproces wordt de PCR-plaat in de QX200™ droplet reader geplaatst. Met behulp van 'Quantasoft' kunnen de uitgelezen droplets geanalyseerd worden. Alvorens de uitlezing gestart kan worden, wordt de setup van de plaat manueel in de software ingegeven.

3.1.2.3 Data export en kwaliteitscontrole

De verkregen data wordt in de eerste plaats visueel geïnterpreteerd. Er wordt gekeken naar de gevormde clusters.

- **Positieve en negatieve clusters**

De gegenereerde droplets bevatten al dan niet het target-DNA. De droplets die geen target-DNA hebben, worden als negatief beschouwd en vormen de onderste cluster. De overige droplets worden als positief geclassificeerd en vormen de bovenste cluster. Voor een goede kwaliteit dient er tussen beide clusters een goede scheiding te zijn en moeten zowel de positieve als de negatieve droplets twee mooie lijnen vormen.

Als er twee duidelijke clusters zijn, kan er een threshold geplaatst worden.

- **Threshold**

Dit is de drempelwaarde voor de classificatie van de droplets als positief of negatief. De limiet moet net boven de cluster van negatieve partities worden ingesteld ([Dobnik, Spilsberg, Bogožalec Košir, Holst-Jensen, & Žel, 2015](#)).

Wanneer na het plaatsen van de threshold 1 of 2 droplets bij een vermoedelijk negatieve cluster, door de software als positief beschouwd worden, dient de laborant het resultaat toch als negatief te interpreteren ([Pecoraro, et al., 2019](#)).

De ruwe data, afkomstig van de QX200™ droplet reader, wordt met de QuantaSoft software versie 1.7.4 uitgelezen. Op de weergegeven resultaten wordt een snelle, visuele kwaliteitscontrole uitgevoerd oo.b.v. het aantal verkregen droplets en het aantal positieve/negatieve droplets.

- **Aantal droplets**

Het aantal droplets geeft de kwaliteit van de analyse aan. Wanneer het aantal droplets < 10000 bedraagt, wordt de reactie in kwestie niet aanvaard.

Nadien worden deze data geëxporteerd in een cvs bestand, dat geopend kan worden Excel. Hetzelfde Excelbestand wordt toegepast om het aantal kopijen in een 20 µl ddPCR reactie te berekenen.

Het aantal cp in PCR reactie werd berekend volgens de formule:

$$CCp_{ddPCRmix} = -\ln\left(1 - \frac{N_p}{N_t}\right) \times \frac{10^3}{V_p} \times D$$

met: $CCp_{ddPCRmix}$ = de in de ddPCR-mix gemeten concentratie aan kopijen (inclusief de verdunning in de PCR-mix en de voorverdunning van het monster

D = verdunningsfactor

N_p = aantal positieve droplets

N_t = totaal aantal droplets

V_p = het volume van de verdunningen (Het door Bio-Rad opgegeven volume van 0,85 nL werd gebruikt om het aantal kopieën te berekenen.)

Het totale aantal kopijen in de ddPCR-reactie ($Cp_{ddPCR-mix}$) wordt berekend door de $C_{ddPCR-mix}$ met 20 te vermenigvuldigen (komt overeen met het aantal kopijen in 20 µl ddPCR-mix). Het totale aantal kopieën wordt vervolgens gebruikt om de verschillende parameters te evalueren.

3.1.2.4 Experimentele set up

3.1.2.4.1 *Optimalisatie van de methode*

Voor de optimalisatie van de methoden worden de voorgaanden technieken nl. DNA-extractie en ddPCR, aangewend om nadien de methoden met de meest optimale condities te kunnen valideren.

Procedure

Voor de optimalisatie wordt er gebruik gemaakt van extracten met een concentratie van 1 ng/µl (= 5 ng in de reactie) of 310 cp/20 µl voor RRS en extracten met een concentratie van 0,1 ng/µl (= 0,5 ng in de reactie) of 392 cp/20 µl voor lectine.

▪ **Berekenen van het verwachte aantal cp**

Voor de berekening van het aantal cp/20 µl moet er rekening gehouden worden met een aantal belangrijke factoren: de genoomgrootte, conversiefactor (CF) van het GGO-event, aantal kopijen endogen/transgen en % GGO.

Het aantal cp/20 µl kan voor RRS bepaald worden m.b.v. volgende formules:

*Verwacht aantal kopijen in ddPCR mix (22 µl) = hoeveelheid DNA-template (in ng) in de ddPCR-mix / genoomgrootte van soja * 1000 * (GGO%/100) * conversiefactor voor GGO-soja (GTS-40-3-2) * cp transgen*

Met: genoomgrootte soja = 1,16 (Arumuganathan & Earle, 1991)

GGO% = 10 m/m%

Conversiefactor voor GGO-soja = 0,79 <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/CF-CRM-values-v5.pdf>

En:

*Verwacht aantal kopijen in 20 µl = Verwacht aantal kopijen in ddPCR mix / 22 * 20*

Het aantal cp/20 µl wordt bij lectine (voor het endogen in het algemeen) op een gelijkaardige manier berekend. Voor lectine hoeft er geen rekening gehouden te worden met de factoren die enkel invloed hebben op het transgen (conversiefactor en % GGO).

*Verwacht aantal kopijen in ddPCR mix (22 µl) = hoeveelheid DNA-template (in ng) in de ddPCR-mix / genoomgrootte van soja * 1000 * cp endogen*

Met: genoomgrootte soja = 1,16 (Arumuganathan & Earle, 1991)

En:

*Verwacht aantal kopijen in 20 µl = Verwacht aantal kopijen in ddPCR mix / 22 * 20*

Naast de extracten worden er ook no template controles (NTC) voorzien.

De stalen worden geanalyseerd d.m.v. ddPCR. Dit gebeurt op dezelfde wijze als weergegeven bij de procedure onder 3.1.2.2 ddPCR.

Voor de optimalisatie van de methoden werden er in totaal 16 platen gelopen met telkens 3 replicaten per annealingstemperatuur uit de temperatuursgradiënt (in totaal 24 replicaten). Tijdens deze experimenten wordt er gezocht naar de optimale condities (annealingstemperatuur, het PCR-programma, primer-/probeconcentratie) voor zowel lectine als RRS (fig. 7).

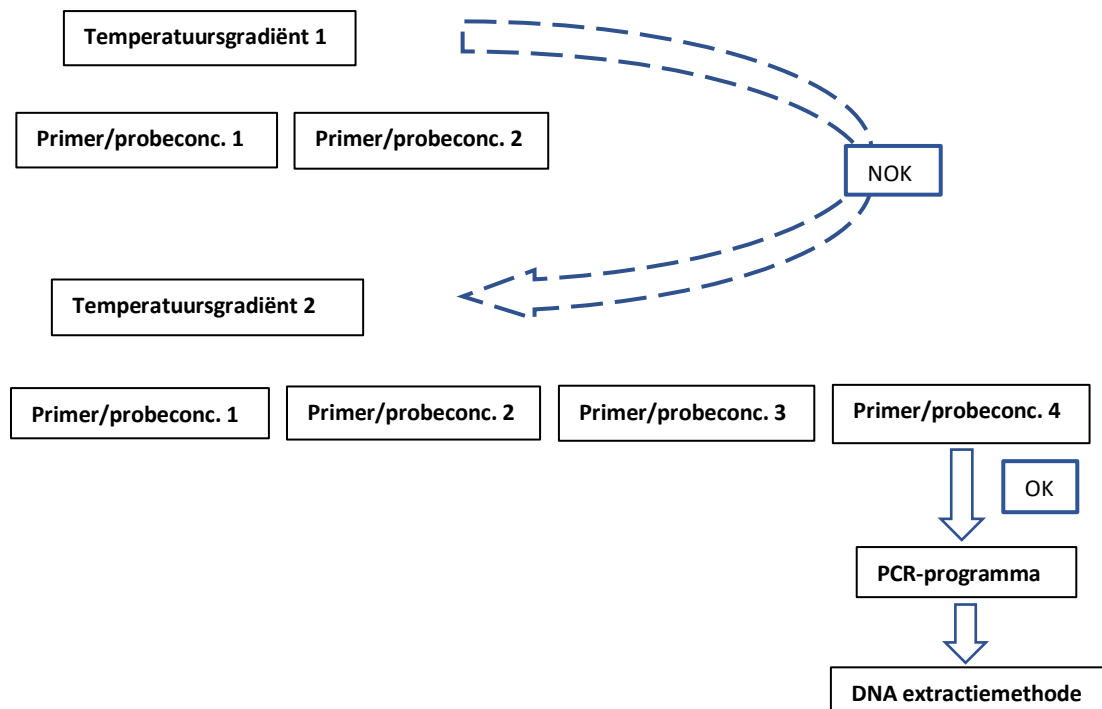
Om de annealingtemperatuur te bepalen werd er een temperatuursgradiënt gelopen. Voor elke methode werd een stemperatuursgradiënt 64,0 - 63,3 - 62,2 - 60,5 - 58,4 - 56,7 - 55,6 - 55,0°C gelopen met 2 verschillende primer-/probeconcentraties . De geteste primer-/probeconcentraties zijn 900/900/250 nM volgens ddPCR-methode (concentratie 1) en 150/150/500 µM (concentratie 2). Concreet werd er telkens één plaat met lectine en één plaat met RRS gelopen voor concentratie 1 en concentratie 2.

Omdat er amper scheiding was tussen de positieve en negatieve cluster voor RRS, werd ervoor gekozen om een tweede temperatuursgradiënt met een lagere temperatuursrange (56,0 - 55,2 - 54,0 - 52,2 - 49,9 - 47,9 - 46,7 - 46,0°C) te testen. Met de tweede temperatuursgradiënt werden de volgende concentraties getest: 300/300/100 nM (concentratie 3) en 600/600/300 µM (concentratie 4). Deze primer-/probeconcentraties werden aangepast aan het te kwantificeren GGO-event¹. Daarnaast werd er ook met de gangbare primer-/probeconcentratie 150/150/50 nM voor kwantificatiemethoden getest.

De primer-/probeconcentratie 4 (600/600/300 nM) bracht de beste resultaten voort. Ter controle van deze condities werd er voor RRS nog een tweede PCR-programma uitgetest. Dit programma bevat 45 cycli i.p.v. 40 cycli.

Dezelfde experimenten werden herhaald voor lectine.

¹ Het GGO-event RRS is in verhouding tot lectine (het endogen) in een zeer kleine hoeveelheid aanwezig in het geëxtraheerde materiaal. Daarom is het logisch dat er voor de detectie (en in een latere fase de kwantificatie) van RRS een hogere primer-/probeconcentratie nodig is.



Figuur 7: Overzicht workflow optimalisatie van de methode voor RRS

Tijdens de data-analyse werden enkele variabelen onderzocht:

- **Percentage rain**

Dit zijn de droplets met een intermediair fluorescentiesignaal. Ze zijn noch positief noch negatief. Het optreden van regen kan bijvoorbeeld toegeschreven worden aan een late amplificatie ten gevolge van een gedeeltelijke remming in een bepaald aantal droplets (Dreo, et al., 2014) (Dingle, Sedlak, Cook, & Jerome, 2013). Het percentage "rain" kan als volgt bepaald worden:

- 1) Er wordt een threshold geplaatst net boven de negatieve cluster.
- 2) Het aantal droplets wordt genoteerd.
- 3) Nadien wordt de threshold net onder de positieve cluster geplaatst.
- 4) Opnieuw wordt het aantal positieve droplets genoteerd
- 5) Het verschil tussen de positieve droplets geeft de "rain of droplets"
- 6) Uiteindelijk kan het percentage rain berekend worden: $\% \text{ rain} = \text{rain of droplets} / \text{totaal aantal droplets}$

Om geaccepteerd te worden, geldt als aanbeveling dat de intermediaire signalen niet meer dan 2,5% van het totale aantal partities mag bedragen (Pecoraro, et al., 2019).

▪ Digital resolution

De resolutie van een digital assay (R_s) is een kwantitatieve maat voor de mate waarin de twee populaties (positief en negatief) in een lineaire scheiding van elkaar kunnen worden onderscheiden. De resolutie kan gedefinieerd worden als het verschil in fluorescentie tussen de twee pieken, gedeeld door de gecombineerde breedten van de pieken: $R_s = (2 * (t_p - t_n)) / (w_p + w_n)$ met: p = de populatie met de hogere fluorescentie (positief)

n = de populatie met de lagere fluorescentie (negatief)

t = de piekfluorescentie

w = de piekbreedte

Net als bij percentage rain, is de grenswaarde slechts een aanbeveling. Zo bedraagt de minimale piekresolutie (R_s) best 2,0 en bij voorkeur meer dan 2,5 (Lievens, Jacchia, Kagkli, Savini, & Querci, 2016).

De optimalisatie werd beëindigd met de vergelijking van de extractiemethoden: NucleoSpin® Food en CTAB Tip20.

De analyse werd 2 keer uitgevoerd. Voor de eerste plaat werden er voor elke extractiemethode twee ddPCR-mixen bereid: één mix voor lectine en één mix voor RRS. Bij de tweede plaat werd er verder nog een onderscheid gemaakt in de concentratie. Zo werden er voor lectine verdunningen bereid met 392 en 78 cp. De verdunningen voor RRS hadden een concentratie van 310 en 62 cp. Elke ddPCR-mix telde 6 replicaten.

3.1.2.4.2 Validatie van de absolute en relatieve kwantificatie

Tijdens de validatie van de absolute kwantificatie wordt het aantal kopijen lectine en RRS in het gecertificeerd referentiemateriaal bepaald. Allereerst dient het dynamisch bereik vastgelegd te worden. Uit deze range kan vervolgens de limit of detection (LOD) en de limit of quantification (LOQ) geschat worden.

Procedure

▪ Dynamisch bereik

Het gebruikte materiaal voor de bepaling van het dynamisch bereik is CRM-10%. Voor lectine werden er in totaal zeven verdunningen bereid tussen 1 en 50000 cp (50000 – 10000 – 5000 – 1000 – 100 – 10 – 1 cp). Ook voor RRS werd er een verdunningsreeks bereid. Er werd gewerkt met CRM-10%. In totaal werden er voor RRS zes verdunningen bereid tussen een interval van 1 en 5000 cp

(5000 – 1000 – 500 – 100 – 10 – 1 cp). Van alle bereide verdunningen werden er zes replicaten (met een willekeurige verspreiding op de plaat) gelopen.

- **Limit Of Detection (LOD_{95%})**

Uit het dynamisch bereik kon afgeleid worden dat het aantal kopijen voor LOD 10 cp of lager bedraagt. De LOD_{95%} geeft de verdunning met het aantal kopijen aan waarvan minstens 95% van de resultaten positief zijn.

Om de LOD te bepalen met waarschijnlijkheid 95%, werd er voor zowel het endogeen (lectine) als het transgeen (RRS) een seriële verdunningsreeks, bestaande uit zes verdunningen tussen 0,1 (theoretical zero of theoretische 0 cp) en 20 cp (20 – 10 – 5 – 2 – 1 – 0,1 cp), bereid. Van elke verdunning werden er twaalf replicaten gelopen.

Daarnaast werden er ook NTC's bereid en meegelopen om de kwaliteit van de analyse te controleren.

De analyse van de LOD_{95%} gebeurt met de online analysis tool: *Validation of qualitative PCR methods within a single laboratory* ([Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit \(BVL\), 2016](#)) ([Uhlig, et al., 2015](#)).

- ❖ **Input data**

Om een Probability of Detection (POD)-curve te bekomen zoals in figuren 16 en 17 (bij *resultaten*), dienen het aantal verwachte kopijen, het aantal positieve replicaten en het aantal PCR-replicaten in de tool ingegeven te worden.

- **Absolute Limit Of Quantification (LOQ_{abs})**

Uit het dynamisch bereik kon afgeleid worden dat het aantal kopijen voor LOQ 100 cp of lager bedraagt.

Om de exacte LOQ te bepalen, werd er van 10%-CRM voor zowel het endogeen (lectine) als het transgeen (RRS) een verdunning bereid met een concentratie van 40 cp. Het berekenen van de DNA-concentratie voor de bereiding van de verdunningen verloopt op eenzelfde manier als beschreven bij het *dynamisch bereik*.

Van elke verdunning werden er zeven replicaten en een NTC's voor voor elke methode (lectine en RRS) gelopen. De analyse werd in totaal zes keer herhaald, telkens in verschillende runs.

LOQ_{abs} werd vastgesteld op het niveau waarbij RSDr% ≤25% en de bias ±25% was.

RSDr% wordt berekend volgens de volgende formule: $RSDr\% = \frac{\sqrt{MS_{withinrun}}}{Cp_{meas}} \times 100$

met: MS_{withinrun} = het gemiddelde van de kwadraten binnen een reeks, berekend met een éénzijdige ANOVA-test

Cp_{meas} = de gemiddelde gemeten concentratie van het aantal kopieën van het monster over alle runs

Bias wordt berekend volgens de volgende formule: $Bias (\%) = \frac{(Cp_{exp} - Cp_{meas})}{Cp_{exp}} \times 100$

met: Cp_{exp} = het verwachte aantal kopijen

Cp_{meas} = het gemeten aantal kopijen in de PCR-reactie

De variatie tussen de runs werd berekend volgens de volgende formule: $S_{run,rel} =$

$$\sqrt{\frac{MS_{betweenrun} - MS_{withinrun}}{av n_{repli}}} \div av Cp_{meas}$$

met: MS_{betweenrun} = het gemiddelde van de kwadraten tussen reeksen, berekend met een éénzijdige ANOVA-test

MS_{withinrun} = het gemiddelde van de kwadraten binnen een reeks, berekend met een éénzijdige ANOVA-test

av Cp_{meas} = de gemiddelde gemeten concentratie van het aantal kopieën van het monster over alle runs

av n_{repli} = het gemiddelde aantal replicaten per reeks

Als MS_{betweenrun} kleiner is dan MS_{withinrun}, kan de variatie tussen de run (S_{run,rel}) met deze vergelijking niet berekend worden. Daarom kan S_{run,rel} als gelijk aan nul beschouwd worden, aangezien het verwaarloosbaar is in vergelijking met RSDr% (Deprez, et al., 2016).

Alle berekeningen werden uitgevoerd in Excel 2016 gebruikmakend van single factor ANOVA test.

▪ Relative Limit Of Quantification (LOQ_{rel})

Tijdens de bepaling van LOQ_{rel} werden de CTAB- en de NucleoSpin® Food extractiemethode met elkaar vergeleken. Voor iedere methoden werden twee extracten van 0,1%-CRM afgevaardigd. De extracten werden voor gebruik verdund naar 50 ng/μl of 15478 cp voor RRS en 5 ng/μl of 19592 cp voor lectine en vallen zo binnen het dynamisch bereik. Er werden telkens drie replicaten voor zowel lectine als RRS gelopen in 5 runs. Om na te gaan of de analyses goed verliepen, werden er twee keer vier no template controles meegenomen.

Na het lopen van de verschillende runs, kon het percentage genetisch gemodificeerd materiaal (GM%) bepaald worden (*zie resultaten*). Vanuit het verkregen GM% kon vervolgens het RSDr% en bias berekend worden volgens de formules:

RSDr% wordt berekend volgens de volgende formule: $RSDr\% = \frac{\sqrt{MS_{withinrun}}}{\%GM_{meas}} \times 100$

met: MS_{withinrun} = het gemiddelde van de kwadraten binnen een reeks, berekend met een éénzijdige ANOVA-test

%GM_{meas} = het gemeten GGO% in de PCR-reactie

Bias wordt berekend volgens de volgende formule: $Bias (\%) = \frac{(\%GM_{exp} - \%GM_{meas})}{\%GM_{exp}} \times 100$

met: %GM_{exp} = het verwachte GGO% van het CRM (0,1% m/m)

%GM_{meas} = het gemeten GGO%

De variatie tussen de runs werd berekend volgens de volgende formule: $S_{run,rel} =$

$$\frac{\sqrt{\frac{MS_{betweenrun} - MS_{withinrun}}{av\ n_{repli}}}}{av\ \%GM_{meas}}$$

met: MS_{betweenrun} = het gemiddelde van de kwadraten tussen reeksen, berekend met een éénzijdige ANOVA-test

MS_{withinrun} = het gemiddelde van de kwadraten binnen een reeks, berekend met een éénzijdige ANOVA-test

av %GM_{meas} = het gemiddelde gemeten GGO% van het monster over alle runs

av n_{repli} = het gemiddelde aantal replicaten per reeks

Opnieuw kan $S_{run,rel}$ als nul beschouwd worden, wanneer $MS_{between}$ run kleiner is dan $MS_{withinrun}$ (Deprez, et al., 2016).

Net als voor LOQ_{abs} werden alle berekeningen uitgevoerd in Excel 2016 gebruikmakend van single factor ANOVA test.

3.1.2.4.3 Toepasbaarheid van de methode

Kwaliteitstesten worden uitgevoerd met als doel de analytische capaciteiten van genomineerde nationale referentielaboratoria (NRL's) en officiële controlelaboratoria (OCL's) bij de bepaling van de massafractie van GM-events in stalen van levensmiddelen, diervoeders en zaden te beoordelen (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, s.d.).

De optimalisatie en validatie gebeurde op gecertificeerd referentiemateriaal in de vorm van gemalen zaden. Dit materiaal leunt dicht aan bij real-life matrices. Door de methode nu te testen op stalen afkomstig van levensmiddelen of diervoeders kan er nagegaan worden of de methode werkbaar is voor verschillende matrices.

Procedure

Het DNA werden verdund naar 30 en 10 ng/μl. De verdunningen kregen voor zowel de positieve controles [(RRS-1%-3 (PC1) en RRS-0,1%-3 (PC2))] als de negatieve controle (DAS68416-1% (NC)) een concentratie van 5 ng/μl.

Net als bij de optimalisatie en validatie van de methode werd er gebruik gemaakt van ddPCR om de stalen te kwantificeren. De gehanteerde procedure is terug te vinden onder rubriek: 3.1.2.2 *ddPCR (procedure)*.

3.2 Resultaten

3.2.1 DNA-extractie

Volgende resultaten werden bekomen door de DNA-concentratie te bepalen met de NanoDrop 2000.

- NucleoSpin Food kit

De concentratie varieert tussen 54 en 81 ng/μl, de A260/280-ratio tussen 1,66 en 1,78 en de A260/230-ratio tussen 0,75 en 1,06 (tabel 8).

Tabel 8: Gemeten DNA-concentraties voor de NucleoSpin® Food extractiemethode met de NanoDrop 2000

Staalnaam	DNA-Conc.	Eenheid	A260/A280	A260/A230
RRS-0,1%-1	80,75	ng/μl	1,72	0,92
RRS-0,1%-2	71,50	ng/μl	1,66	0,75
RRS-1%-1	64,60	ng/μl	1,76	0,92
RRS-1%-2	54,95	ng/μl	1,78	0,99
RRS-10%-1	63,60	ng/μl	1,70	0,80

▪ CTAB Tip20 methode

De concentratie varieert tussen 442 en 556 ng/μl, de A260/280-ratio tussen 1,77 en 1,89 en de A260/230-ratio tussen 1,27 en 2,31 (tabel 9).

Tabel 9: Gemeten DNA-concentraties voor de CTAB Tip20 extractiemethode met de NanoDrop 2000

Staalnaam	DNA-Conc.	Eenheid	A260/A280	A260/A230
RRS-0,1%-3	441,70	ng/μl	1,87	2,19
RRS-0,1%-4	512,15	ng/μl	1,82	1,83
RRS-1%-3	555,85	ng/μl	1,77	1,27
RRS-10%-2	531,05	ng/μl	1,89	2,31

De hoge DNA-concentraties, bekomen met de CTAB- extractiemethode, zijn opvallend. Dit kan verklaard worden door de grotere hoeveelheid materiaal dat voor de CTAB- extractiemethode werd afgewogen. Ook de zuiverheid, gemeten bij A260/230, van het geëxtraheerde DNA is bij de CTAB- extractiemethode beter t.o.v. de NucleoSpin® Food extractiemethode. Of dit invloed heeft op de amplificatie van het DNA kan hieruit niet afgeleid worden.

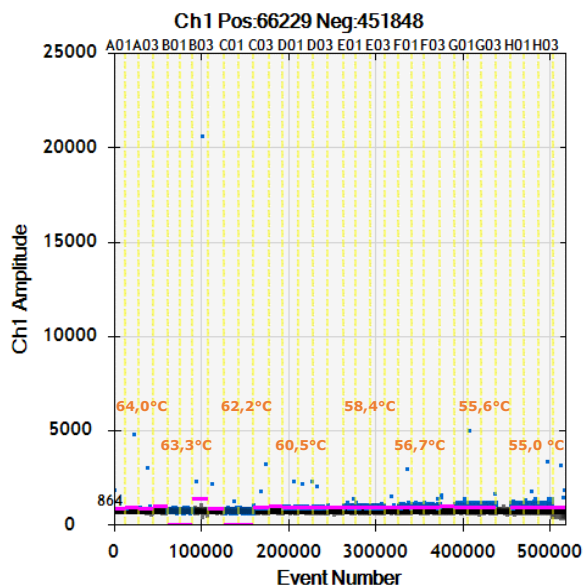
3.2.2 ddPCR

3.2.2.1 Optimalisatie

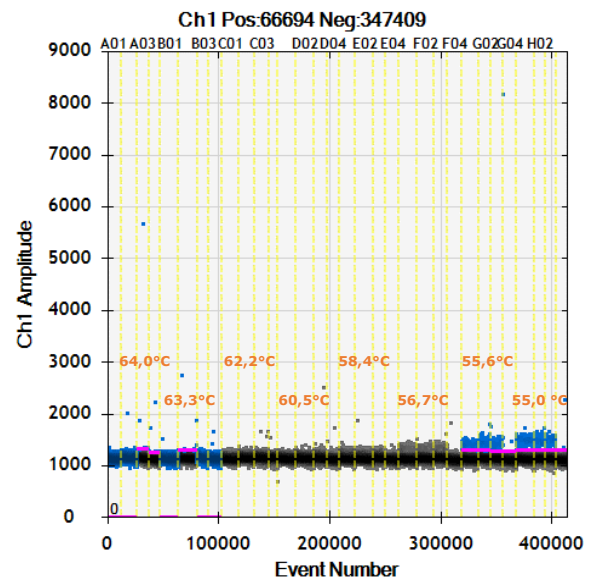
De bekomen data werd eerst onderworpen aan een visuele controle. Daarbij werd er gekeken naar:

- eventuele afwijkingen tussen de replicaten onderling
- het aantal droplets
- de scheiding van de positieve en negatieve cluster
- de aanwezigheid van “rain”

Voor RRS was temperatuursgradiënt 1 niet geschikt. Er kan geen onderscheid gemaakt worden tussen de positieve en negatieve clusters (figuren 8 en 9).



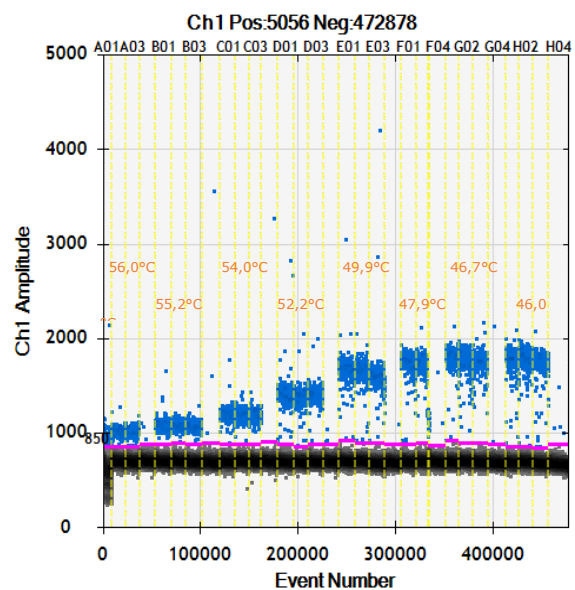
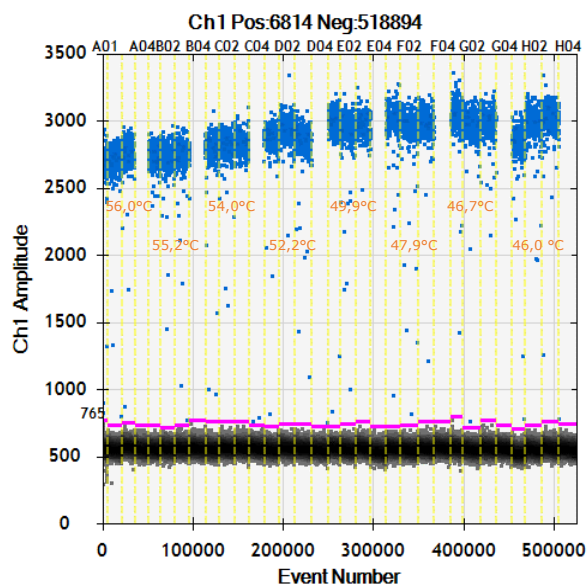
Figuur 8: RRS_concentratie 1_ temperatuursgradiënt 1



Figuur 9: RRS_concentratie 2_ temperatuursgradiënt 1

Derhalve werden analyses uitgevoerd met een tweede temperatuursgradiënt. Deze gradiënt had een lagere temperatuursrange. Met temperatuursgradiënt 2 werden nog bijkomende primer-/probeconcentraties uitgetest. Naar het einde van de optimalisatie toe werd er een tweede PCR-programma uitgetest.

Uiteindelijk werden de **optimale condities** geselecteerd (figuren 10 en 11).



Figuur 10: Optimale condities lectine : concentratie 2
(1)_temperatuursgradiënt 2_PCR-programma 2

Figuur 11: Optimale condities RRS : concentratie
4_temperatuursgradiënt 2_PCR-programma 2

Voor de optimale annealingstemperatuur werd er gekeken naar de hoogste temperatuur waarbij de scheiding van de clusters voldoende was. Dit was voornamelijk van belang bij RRS.

Uit de data werd vervolgens het aantal kopijen voor lectine en RRS in 20 µl bepaald.

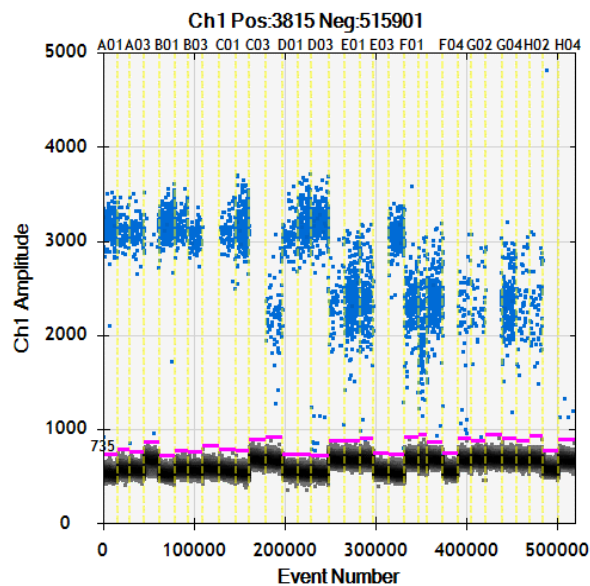
Tabel 10: Overzicht van de belangrijkste parameters voor de manuele bepaling van het aantal cp/20 µl. De outliers (<10000 droplets) werden aangeduid met rood. De outliers worden niet in rekening gebracht bij het bepalen van het gemiddeld aantal gemeten kopijen.

Annealings- temperatuur	Lectine					RRS				
	aantal kopijen in 20 µl	gemiddeld aantal kopijen	SD	Bias	RSDr%	aantal kopijen in 20 µl	gemiddeld aantal kopijen	SD	Bias	RSDr %
56°C	444					290				
	458	450	7,1	14,8	1,6	357	334	33,2	7,6	10,0
	448					310				
55,2°C	436					334				
	380	425	15,6	8,4	3,7	344	342	6,8	10,2	2,0
	414					347				
54°C	410					348				
	427	419	8,5	6,9	2,0	335	342	9,2	10,2	2,7
	420					382				
52,2°C	443					361				
	390	406	21,9	3,4	5,4	353	348	16,7	12,2	4,8
	421					329				
49,9°C	461					365				
	425	428	3,5	9,1	0,8	422	365	0,7	17,6	0,2
	430					364				
47,9°C	368					354				
	395	411	21,9	4,7	5,3	330	348	15,9	12,3	4,6
	426					360				
46,7°C	399					371				
	439	415	21,4	5,8	5,2	383	364	23,9	17,3	6,6
	406					337				
46°C	383					361				
	452	441	15,6	12,5	3,5	370	351	24,9	13,3	7,1
	430					323				
Expected copy number in 20 µl	392					310				

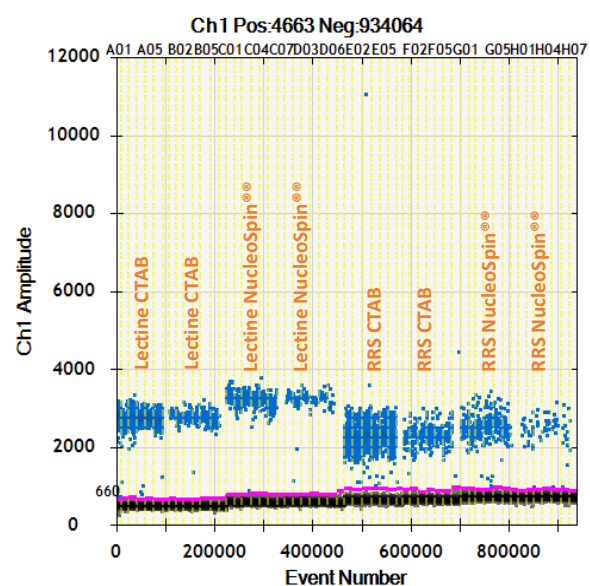
52,2°C werd om verschillende redenen als annealingstemperatuur gekozen. Zo treedt er vanaf deze temperatuur voldoende scheiding (figuren 10 en 11) op tussen de positieve en de negatieve cluster. Ook is de annealingstemperatuur zelf niet te laag. En tot slot vallen de berekende bias en RSDr% binnen de acceptatiecriteria.

▪ **Vergelijking van de extractiemethoden (1 en 2)**

De vergelijking van de extractiemethoden werd tweemaal met de gevonden optimale condities uitgevoerd. De eerste vergelijking van de extractiemethoden werd uitgevoerd met een willekeurige verdeling van de stalen over de plaat (zie figuur 12).



Figuur 12: Vergelijking extractiemethoden 1



Figuur 93: Vergelijking extractiemethoden 2

Het belangrijkste verschil tussen beide extractiemethoden bevindt zich in het verschil in aantal cp/20 µl. Zo werden er voor NucleoSpin® minder kopijen geteld dan voor CTAB.

Tabel 11: Overzicht van de belangrijkste parameters voor de vergelijking van de extractiemethoden 1.

Extractiemethode	Merker	Aantal kopijen in 20 µl	Gemiddeld aantal kopijen in 20 µl	Verwacht aantal kopijen in 20 µl
CTAB	Lectine	399	419	392
		464		
		420		
		422		
		431		
		380		

CTAB	RRS	356	319	310
		299		
		274		
		308		
		340		
		336		
NucleoSpin®	Lectine	118	125	392
		135		
		149		
		125		
		105		
		115		
	RRS	93	78	310
		75		
		80		
		61		
		73		
		83		

Tabel 12: Overzicht van de belangrijkste parameters voor de vergelijking van de extractiemethoden 2. De outliers werden aangeduid met rood.

Extractiemethode	Merker	Aantal kopijen in 20 µl	Gemiddeld aantal kopijen in 20 µl	Verwacht aantal kopijen in 20 µl
CTAB	Lectine 0,5 ng	388	400	392
		340		
		392		
		407		
		414		
		450		
	Lectine 0,1 ng	68	79	78
		54		
		69		
		83		
		90		
		86		
	RRS 5 ng	317	325	310
		326		
		364		
		316		
		336		
		332		
	RRS 1 ng	55	64	62
		61		
		77		
		67		
		63		
		72		
NucleoSpin®	Lectine 0,5 ng	97	104	392
		103		
		111		
		119		
		99		
		93		

NucleoSpin®	Lectine 0,1 ng	16	21	78
		29		
		21		
		15		
		26		
		16		
	RRS 5 ng	75	74	310
		71		
		74		
		83		
		80		
		60		
	RRS 1 ng	14	16	62
		21		
		12		
		13		
		18		
		19		

Wat opvalt in tabel 11 en 12 is het significante verschil tussen het verwachte en het gemeten aantal cp/20 µl voor de NucleoSpin®-extracten. Daarom werden er inhibitietesten uitgevoerd op het gebruikte CRM-10% dat verkregen werd met beide extractiemethoden. Wanneer $\Delta Ct > 0,5$ is er sprake van inhibitie. Uit de inhibitietesten is gebleken dat er bij het materiaal geëxtraheerd met de NucleoSpin Food extractiemethode inhibitie is opgetreden (zie tabel 23 in bijlage). Bij het materiaal geëxtraheerd met de CTAB methode is dit niet het geval (zie tabel 22 in bijlage).

3.2.2.2 Validatie van de absolute en relatieve kwantificatie

▪ Dynamisch bereik

Voor zowel RRS als lectine komt LOD_6 overeen met 10 cp of minder. Dit is de laagste verdunning waarbij het verwacht aantal positieve signalen 6 op 6 is.. LOQ_6 van RRS en lectine komt dan weer over een met 100 cp of minder. Dit is de laagste verdunning waarbij de bias en de RSDr% onder de 25% liggen. Dit kan afgeleid worden uit tabel 13 (voor RRS) en 14 (voor lectine).

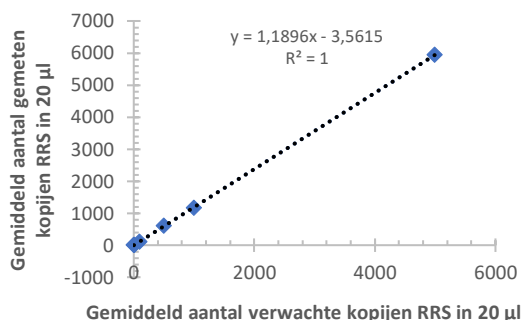
Tabel 13: Parameters voor de regressiecurve verwacht aantal kopijen RRS i.f.v. het gemeten aantal kopijen RRS voor het bereik van 1-5000 cp

Verwacht aantal kopijen	Verwacht aantal positieve signalen van 6	Gemiddeld aantal kopijen in 20 µl	SD	RSDr%	Bias (%)
RRS					
5000	6	5947	114	2	19
1000	6	1169	37	3	17
500	6	603	19	3	21
100	6	113	7	7	13
10	6	10	4	38	-1
1	4	2	2	114	103
<i>Parameters voor de regressiecurve verwacht aantal kopijen RRS i.f.v. het gemeten aantal kopijen RRS voor het bereik van 1-5000 cp</i>					
Richtings-coëfficiënt	1,1896				
R ²	1				

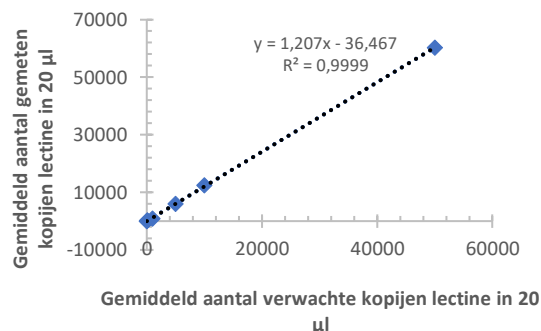
Tabel 14: Parameters voor de regressiecurve verwacht aantal kopijen lectine i.f.v. het gemeten aantal kopijen lectine voor het bereik van 1-50000 cp

Verwacht aantal kopijen	Verwacht aantal positieve signalen van 6	Gemiddeld aantal kopijen in 20 µl	SD	RSDr%	Bias (%)
Lectine					
50000	6	60267	1462	2	21
10000	6	12347	205	2	23
5000	6	5907	90	2	18
1000	6	903	36	4	-10
100	6	105	8	7	5
10	6	15	5	34	45
1	2	0	1	156	-57
<i>Parameters voor de regressiecurve verwacht aantal kopijen lectine i.f.v. het gemeten aantal kopijen lectine voor het bereik van 1-50000 cp</i>					
Richtings-coëfficiënt	1,2061				
R ²	1				

Door het gemiddeld aantal gemeten kopijen i.f.v. het aantal verwachte kopijen uit te drukken, werden onderstaande regressiecurves bepaald



Figuur 14: Curve van het gemiddeld aantal gemeten kopijen RRS i.f.v. het aantal verwachte kopijen RRS voor het bereik van 1-5000 cp, met richtingscoëfficiënt = 1,1896 en $R_2 = 1$



Figuur 15: Curve van het gemiddeld aantal gemeten kopijen lectine i.f.v. het aantal verwachte kopijen lectine voor het bereik van 1-50000 cp, met richtingscoëfficiënt = 1,207 en $R_2 = 0,9999$

Uit de determinatiecoëfficiënt (R^2) kan afgeleid worden dat beide curves een lineair verloop hebben ($\geq 0,98$). De richtingscoëfficiënten bedragen 1,1896 en 1,207 (dus > 1). Dit betekent dat er meer kopijen werden gemeten dan er kopijen verwacht werden en komt overeen met een bias van respectievelijk 18,96% en 20,7%.

▪ LOD

De LOD_{95%} werd berekend met volgende tool:

<https://quodata.de/content/validation-qualitative-pcr-methods-single-laboratory>

De eerste drie kolommen van tabellen 15 en 16 bevatten de gegevens die in de tool opgegeven worden. De tool zal uiteindelijk de POD-curve genereren waarin de 95%-betrouwbaarheidsinterval is verwerkt.

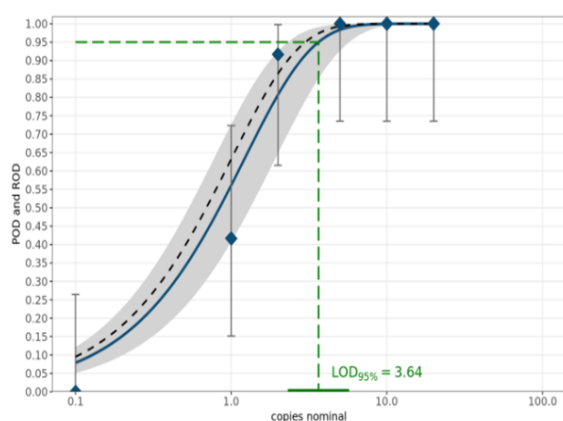
De absolute LOD komt overeen met ongeveer 4 cp (3,64), voor lectine en 3 cp (3,14) voor RRS. Dit wordt weergegeven in figuren 16 en 17.

Tabel 15: Parameters voor de bepaling van de POD-curve en de LOD_{95%} van lectine

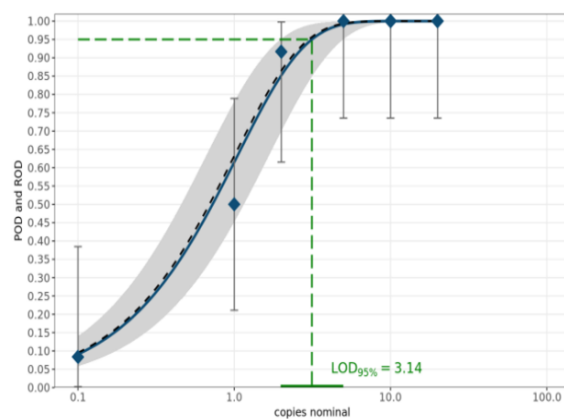
Lectine					
Verwacht aantal kopijen	Positieve replicaten	PCR replicaten	Gemiddeld aantal kopijen	RSDr(%)	Bias (%)
20	12	12	15,49	24,4	-22,5
10	12	12	8,83	24,5	-55,8
5	12	12	4,17	40,7	-79,2
2	11	12	1,92	64,7	-90,4
1	5	12	0,75	151,8	-96,3
0,1	0	12	0,25	180,9	-98,8

Tabel 16: Parameters voor de bepaling van de POD-curve en de LOD_{95%} van RRS

RRS						
Verwacht aantal kopijen	Positieve replicaten	PCR replicaten	Gemiddeld aantal kopijen	RSDr(%)	Bias (%)	
20	12	12	20,17	13,8	0,8	
10	12	12	10,67	40,3	-46,7	
5	12	12	6,42	25,3	-67,9	
2	11	12	3,33	43,1	-83,3	
1	6	12	3,00	77,8	-85,0	
0,1	1	12	1,75	109,3	-91,3	



Figuur 16: Overzicht van de absolute LOD resultaten voor lectine (2). De blauwe diamanten karakteriseren de laboratoriumspecifieke rate of detection (ROD). De blauwe curve geeft de gemiddelde POD-curve aan, samen met het bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsbereik, dat als grijze band is gemarkeerd. De POD-curve onder ideale omstandigheden wordt weergegeven als de zwarte gestippelde curve.



Figuur 17: Overzicht van de absolute LOD resultaten voor RRS. De blauwe diamanten karakteriseren de laboratoriumspecifieke rate of detection (ROD). De blauwe curve geeft de gemiddelde POD-curve aan, samen met het bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsbereik, dat als grijze band is gemarkeerd. De POD-curve onder ideale omstandigheden wordt weergegeven als de zwarte gestippelde curve.

▪ LOQ_{abs}

De absolute LOQ werd bepaald door voor lectine en RRS een verdunning met een concentratie van 40 cp/20 µl te lopen, wat overeenkomt met ongeveer 0,1% RRS in 50 ng soja DNA.

Tabel 16: Overzicht van de resultaten voor de absolute LOQ. De aanwezigheid van technical outliers werd aangeduid met *. Het * staat voor "technical outliers". Het aantal kopijen voor deze replicaten waren niet negatief, maar voldeden niet aan de voorwaarden.

Parameter	Aantal geaccepteerde replicaten / totaal aantal replicaten	Verwacht aantal cp in 20 µl	gemiddeld aantal gemeten cp in 20 µl	SD	RSDr(%)	Bias (%)	Srun (%)
lectine							
LOQ _{abs}	19/21*	40	36	8,6	24,3	-11,2	0
RRS							
LOQ _{abs}	24/28*	40	37	6,2	16,9	-8,2	0

Tabel 16 bevat de resultaten voor de absolute kwantificatielimiet. Voor lectine werden er in totaal 21* replicaten getest. Voor RRS waren dit 28* replicaten. Het gemiddelde aantal gemeten kopijen in 20 µl bedroeg 36 voor lectine en 37 voor RRS. Omdat deze waarden dicht bij het verwachte aantal kopijen in 20 µl liggen, resulteert dit in een RSDr% (respectievelijk 24,3% en 16,9%) en bias (-11,2% en -8,2%) die binnen de acceptatiecriteria vallen.

▪ LOQ_{rel}

Tabel 17: Overzicht van de resultaten voor de relatieve LOQ

Parameter	Totaal aantal replicaten	Verwacht GGO%	Gemiddeld gemeten %RRS	SD	RSDr(%)	Bias (%)	Srun (%)
NucleoSpin®							
LOQ _{rel}	10	0,1	0,09	0,01	11,8	-7,3	0
CTAB							
LOQ _{rel}	10	0,1	0,07	0,01	9,1	-28,2	0

In tabel 19 worden de resultaten voor de relatieve kwantificatielimiet weergegeven. In totaal werd 10x het GM% berekend voor zowel NucleoSpin® als CTAB. De gemiddelde waarde van dit percentage bedraagt 0,09% voor NucleoSpin® en 0,07% voor CTAB, wat in de buurt komt van het verwachte GGO% van 0,1%.

De bias voor CTAB (-28,2%) valt buiten de acceptatiecriteria van ±25%. Bij NucleoSpin® is dit niet het geval (- 7,3%). M.a.w. is er een significant verschil tussen beide methoden. Nochtans is de afwijking in de absolute kwantificatie groter bij NucleoSpin® dan bij CTAB. Op het niveau van relatieve kwantificatie heeft deze afwijking minder invloed.

Daarnaast werd ook het RSDr% en de meetonzekerheid berekend. Het RSDr% bedraagt voor NucleoSpin® 11,8 % en voor CTAB 9,1% en valt dus binnen de acceptatiecriteria van ≤ 25%.

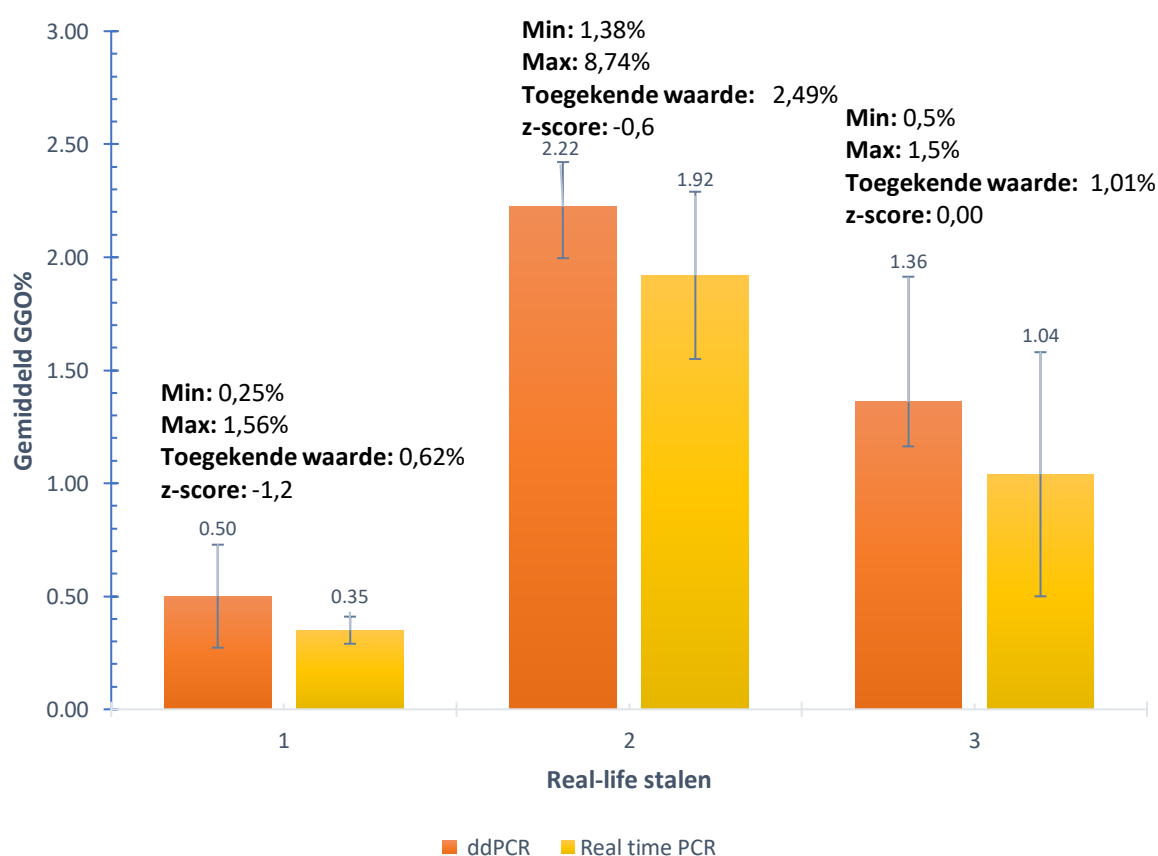
3.2.2.3 Toepasbaarheid van de methode

Tot slot werden met de gevalideerde methode real-life stalen gekwantificeerd. De bekomen resultaten werden vergeleken met die van de real-time PCR-meting.

Hiervoor werd in eerste instantie met volgende formule het GGO% berekend voor de verschillende metingen:

$$((\text{gemiddeld aantal kopijen RRS} / \text{gemiddeld aantal kopijen lectine}) / \text{conversiefactor}) * 100$$

Met: Conversiefactor voor GGO-soja = 0,79 <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/CF-CRM-values-v5.pdf>



Figuur 18: Resultaten na toepassing van de gevalideerde methode op real-life stalen. Bepaling van het GGO% werd zowel voor ddPCR als rtPCR berekend. Per staal wordt de minimale en maximale waarde, de toegekende waarde en de z-score weergegeven. De foutbalken representeren de standaardafwijking per analysemethode voor elk staal.

Van elk extract werd het GGO% berekend en vervolgens werd het gemiddelde ervan genomen. Het gemiddelde GGO% volgens de ddPCR-methode (0,50%, 2,22% en 1,36%) werd dan vergeleken met dit voor de rtPCR-methode (0,35%, 1,92% en 1,04%). De gevonden GGO% voor ddPCR en rtPCR verschillen niet veel van elkaar. Bij staal 1 en staal 2 is het zelfs zo dat het gemiddelde GGO% voor

ddPCR dicht bij de toegekende waarde (0,50% t.o.v. 0,62% en 2,22% t.o.v. 2,49%) ligt. Bij alle drie de stalen vallen de gevonden GGO% binnen het bepaalde bereik, aangegeven met een minimale en maximale waarde (0,25-1,56%; 1,38-8,74% en 0,5-1,5%). De z-score is de afwijking van het resultaat t.o.v. een toegewezen waarde. Voor de kwantificering met rtPCR werd de z-score bepaald (-1,2; -0,6 en 0,00). Voor alle drie de stalen bevindt de z-score zich binnen de opgelegde grenzen. Figuur 18 is een weergave van het bepaalde GGO% met rtPCR (geel) en ddPCR (oranje) voor de drie real-life stalen. De foutbalken representeren de standaardafwijking.

Daarnaast worden ook de inhibitietesten bij de real-life stalen afgenomen. Er werden van ieder extract twee concentraties bereid (30 en 10 ng/μl). Met het bereiden van deze verdunningen wordt het effect van inhibitie bij een lagere concentratie nagegaan. Het aantal gemeten kopijen bij 10 ng/μl vermenigvuldigd met 3 om het theoretisch aantal kopijen te kennen. De bias werd berekend door de verhouding te nemen van het gemiddeld aantal kopijen gemeten in 30 ng/μl en het theoretisch aantal kopijen. In de tabellen 27 t.e.m. 30 (bijlage) zijn de resultaten van deze inhibitietesten voor de drie stalen terug te vinden. Bij staal 1 (tabel 27) en staal 3 (tabel 30) werd de bias voor RRS niet bepaald. Het aantal kopijen in 20 μl is voor RRS zeer laag en valt onder de kwantificatielimiet. Voor lectine in staal 1 werd geen inhibitie vastgesteld. Dit kan uit de bias afgeleid worden (bias van 3,5% en 0,2%). Ook voor lectine en RRS in staal 2 (tabellen 28 en 29) en lectine in staal 3 wordt er geen inhibitie aangetroffen (de bias is steeds $< \pm 25\%$).

3.3 Discussie

3.3.1 DNA-extractie

NucleoSpin® is een snellere extractiemethode dan de CTAB, maar heeft ook zijn nadelen. De CTAB-methode blijft desondanks voor het labo een belangrijke extractiemethode, ondanks de duur van de uitvoering.

3.3.2 ddPCR

3.3.2.1 Optimalisatie

Bij de optimalisatie werd er gezocht naar de optimale condities voor de belangrijkste parameters en deze werden gevonden.

Voor de annealingstemperatuur werd er voor 52°C gekozen. Deze temperatuur voldeed voor zowel lectine als RRS. Bij qPCR wordt de annealingstemperatuur van 55°C toegepast voor de identificatie van RRS bij GGO-analyse. De meest gebruikte annealingstemperatuur bedraagt zelfs 60°C. De

annealingstemperatuur wordt mede bepaald door de gebruikte probe. De probe die bij ddPCR aangewend wordt, is korter dan bij rtPCR.

Er werden verschillende primer-/probeconcentraties uitgetest. Voor lectine bleek de concentratieverhouding 150/150/50 nM de beste keuze te zijn. Voor RRS werd duidelijk dat een hogere probeconcentratie noodzakelijk was voor het bekomen van de gewenste resultaten. Er werd uiteindelijk voor RRS de voorkeur gegeven aan de primer-/probeconcentratie van 600/600/300 nM.

De eerste testen werden uitgevoerd met een PCR-programma van 40 cycli. Eénmaal de primer-/probeconcentratie voor zowel lectine als RRS vaststond, werd er een tweede PCR-programma met 45 cycli uitgetest. Uit deze testen is gebleken dat het PCR-programma met 45 cycli een iets betere scheiding geeft tussen de positieve en negatieve cluster.

De optimalisatie werd besloten met de vergelijking van extractiemethoden. CRM-10% werd met twee extractiemethoden, CTAB en NucleoSpin®, geëxtraheerd en nadien gekwantificeerd met ddPCR. Het aantal kopijen per 20 µl werd vervolgens bepaald. Voor NucleoSpin® waren het aantal kopijen per 20 µl veel lager dan het verwacht aantal kopijen per 20 µl. Bij de CTAB-extracten was dit niet het geval.

Er waren natuurlijk nog meer testen tijdens de optimalisatie mogelijk, zo zouden er nog verschillende quenchers uitgetest kunnen worden. Er werd geopteerd om de optimalisatie bij deze resultaten te beëindigen.

3.3.2.2 Validatie van de absolute en relatieve kwantificatie

Gedurende de validatie van de absolute en relatieve kwantificatie werden er verschillende parameters nagegaan. Voor de absolute kwantificatie waren dit: het dynamisch bereik, de absolute detectie- en kwantificatielimiet.

Tijdens de absolute kwantificatie werden er ook inhibitietesten uitgevoerd. Bij NucleoSpin® werd er inhibitie vastgesteld, bij CTAB niet. Dit verklaard waarom het aantal gemeten kopijen per 20 µl zo laag is bij de NucleoSpin®-extractiemethode en er een significant verschil is tussen beide extractiemethoden.

Door het dynamisch bereik na te gaan, wordt de range waarbinnen het nauwkeurigst gekwantificeerd kan worden, bepaald. Een zelf bepaald bereik wordt getest. Voor ddPCR zijn de te meten concentraties best zo laag mogelijk.

Bij het uitzetten van het gemiddeld aantal verwachte kopijen i.f.v. het gemiddeld aantal gemeten kopijen, wordt er een lineair verband verkregen met een $R^2 > 0,98$. De richtingscoëfficiënten geven

informatie over de bias van de meetresultaten en deze vielen binnen de acceptatiecriteria van $\pm 25\%$ of tussen 0,75 en 1,25. Tijdens het lopen van het dynamisch bereik konden ook de LOD_6 en de LOQ_6 vastgesteld worden.

De gevonden aantal kopijen voor de absolute LOD, zowel voor lectine als voor RRS, voldoen aan de acceptatiecriteria van niet meer dan 20 kopijen boven de bovenste 95 %-betrouwbaarheidslimiet (Uhlig, et al., 2015). De LOD_{abs} moet ook > 3 cp zijn. Ook de inschatting van het aantal kopijen volgens de LOD_6 komt overeen met het berekend aantal kopijen voor lectine en RRS. Bij de absolute kwantificatielimiet wordt er gekeken naar de bias en het $RSDr\%$. De resultaten voor deze twee parameters voldoen aan de acceptatiecriteria van respectievelijk $\pm 25\%$ en $\leq 25\%$ (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015). Uit de bepaling van de LOQ_6 kon al opgemaakt worden dat het aantal kopijen voor de $LOQ_{abs} \leq 100$ cp was.

Voor de relatieve kwantificatie werd de parameter relatieve kwantificatielimiet gevalideerd. Wat meteen opviel bij de CTAB-extractiemethode, was de bias, die buiten de acceptatiecriteria van $\pm 25\%$ viel. Toch kan de CTAB-methode als een betrouwbare methode beschouwd worden vanwege de zuiverheid van het geëxtraheerde DNA en de hoge DNA-concentratie. Bij de NucleoSpin®-extractiemethode liggen zowel de bias als het $RSDr\%$ binnen de opgelegde acceptatiecriteria. Inhibitie heeft dus geen effect bij relatieve kwantificatie en dit omdat er bij relatieve kwantificatie gerekend wordt met de verhouding van het %RRS t.o.v. de totale hoeveelheid DNA.

3.3.2.3 Toepasbaarheid van de methode

De methode werd toegepast op verschillende matrices met een verschillend GGO% voor RRS. De stalen werden geanalyseerd, gekwantificeerd, waarna het GGO% werd berekend. De resultaten bekomen met ddPCR werden vergeleken met de resultaten voor rtPCR. Uit deze resultaten kon afgeleid worden dat de gekwantificeerde GGO% binnen de acceptatiecriteria voor de z-score (tussen -2 en 2) liggen.

De setup van de methode kan nu gebruikt worden voor andere producten (mits eventuele aanpassingen aan de concentraties van de extracten) en kan tot slot toegepast worden voor routineanalyses.

Besluit

Tijdens deze validatie is er bewezen dat het mogelijk is om GGO's te kwantificeren m.b.v. digital droplet PCR i.p.v. rtPCR. Hiervoor werd er gebruik gemaakt van rtPCR-methoden die getransfereerd werden naar ddPCR-formaat.

Bij volgende GGO-kwantificaties met ddPCR zal er als volgt gewerkt worden:

Bestaande Real-time PCR-methode (gevalideerd in internationaal ringonderzoek) moet omgezet worden naar ddPCR-formaat.

- a. De bestaande rtPCR-methode wordt als zodanig met ddPCR getest. Indien voldoende differentiatie tussen de positieve en de negatieve clusters, beperkte hoeveelheid "rain" en een RSDr% /bias binnen de grenzen van de acceptatiecriteria (bij een laag aantal replicaten).
 - Wanneer het RSDr% en de bias binnen de verwachte criteria voor een laag aantal replicaten vallen, kan er overgegaan worden tot de validatie.
- b. Wanneer de positieve en negatieve clusters niet voldoende van elkaar gescheiden zijn, dienen de PCR-condities gewijzigd te worden:
 - 1/ Testen van verschillende annealingstemperaturen
 - 2/ Testen van verschillende primer/probe-concentraties (ook eventueel andere labelling van de probe)
 - Indien er nadien voldoende differentiatie tussen de positieve en de negatieve clusters en het "rainpercentage" beperkt is, moet het RSDr% en de bias in een laag aantal replicaten gecontroleerd worden
 - Als het RSDr% en de bias binnen de criteria vallen, kan er verder gegaan worden met de validatie.
 - In geval van een te hoog rainpercentage kan het aantal cycli van het PCR programma verhoogd worden (liefst worden er PCR-programma's gebruikt die al gevalideerd zijn).
- c. Validatie van absolute kwantificering
 - 1/ Bepalen van de LOD₆, LOQ₆ en het dynamisch bereik. Hierdoor kan het aantal kopijen voor LOD en LOQ geschat worden.
 - 2/ Bepalen van de LOD_{95%}. De verdunningsreeks voor LOD_{95%} kan bepaald worden o.b.v. de resultaten van LOD₆.

3/ Bepalen van de LOQ_{abs} . o.b.v. de resultaten voor LOQ_6 en LOD_6 wordt de verdunning om de LOQ_{abs} te testen, bereidt.

d. Validatie van relatieve kwantificering

1/ De LOQ_{rel} wordt getest met 0,1%-CRM door de geschikte DNA-concentratie te gebruiken die binnen het dynamische bereik valt en boven LOQ_{abs} ligt.

e. Toepasbaarheid van de test

1/ Selecteren van de proficiency teststalen (bij voorkeur) met bekend %GM-event en verschillende matrices.

→ Indien dit niet mogelijk is, kan er ook CRM met verschillend %GM gebruikt worden.

2/ Evalueren van de resultaten door het %GM, de z-score of de uiteindelijke bias, bekomen met de ddPCR-methode, te vergelijken met rtPCR-methode.

Referenties

- Allen, R. C., Rogelj, S., Cordova, S. E., & Kieft, T. (2006, February). An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Journal of Immunological Methods*, 109-15. doi:10.1016/j.jim.2005.10.006
- Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Bonfini, L., Gatto, F., Rosa, S., Patak, A., & Kreysa, J. (2014, December 30). JRC GMO-Matrix: a web application to support Genetically Modified Organisms detection strategies. *BMC Bioinformatics*, 15. doi: 10.1186/s12859-014-0417-8
- Arumuganathan, K., & Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 208-218.
- Baker, M. (2012, May 30). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, pp. 541–544. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nmeth.2027>
- Berdal, K. G., Bøydler, C., Tengs, T., & Holst-Jensen, A. (2008, February 6). 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*, pp. 1149–1157. doi:10.1007/s00217-008-0830-1
- Bhat, S., Herrmann, J., Armishaw, P., Corbisier, P., & Emslie, K. R. (2009, May). Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(2), pp. 457-67. doi:10.1007/s00216-009-2729-5
- Bio-Rad. (n.d.). Droplet Digital™ PCR. *Applications Guide*. Retrieved April 13, 2021, from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf
- Bio-Rad. (n.d.). *PX1 PCR Plate Sealer*. Retrieved April 13, 2021, from Bio-Rad: <https://www.bio-rad.com/en-be/product/px1-pcr-plate-sealer?ID=M9ZR3T15>
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2016). Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods. Retrieved from https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/Guidelines%20for%20the%20single%20laboratory.htm
- Burns, M. J., Burrell, A. M., & Foy, C. (2010). The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *European food research & technology*, 231, pp. 353–362.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., & Kubista, M. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 611–22.
- Cankar, K., Štebih, D., Dreo, T., Žel, J., & Gruden, K. (2006, August 14). 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*. doi:10.1186/1472-6750-6-37
- Chen, T. L., Prasad, V., Lee, C. H., Lin, K. H., Chiueh, L. C., & Chan, M. T. (2004). Extending the cDNA microarray detection system to evaluate genetically modified soybean and traditional soy foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 259–65.

- Christianson, J., McPherson, M., Topinka, D., Hall, L., & Good, A. G. (2008, June 26). Detecting and Quantifying the Adventitious Presence of Transgenic Seeds in Safflower, *Carthamus tinctorius* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), pp. 5506–5513. doi:10.1021/jf800683g
- Christou, P. (2002). No credible scientific evidence is presented to support claims that transgenic DNA was introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Transgenic Research*, 3-5.
- Ciabatti, I., Philipp, P., Berben, G., Boniotti, B., De Loose, M., Garavelloni, S., . . . Žel, J. (2017). Detection, Interpretation and Reporting on the presence of authorised and unauthorised genetically modified materials. *JRC Technical Reports*.
- Corbisier, P., Bhat, S., Partis, L., Rui Dan Xie, V., & Emslie, K. R. (2009, October 9). Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 2143–2150. doi:10.1007/s00216-009-3200-3
- Deprez, L., Corbisier, P., Kortekaas, A.-M., Mazoua, S., Hidalgo, R. B., Trapmann, S., & Emons, H. (2016). Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. *Biomolecular Detection and Quantification*, 29-39.
- Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical Chemistry*, 1670-1672.
- Dobnik, D., Spilsberg, B., Bogožalec Košir, A., Holst-Jensen, A., & Žel, J. (2015, July 13). Multiplex Quantification of 12 European Union Authorized Genetically Modified Maize Lines with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry*, p. 8218–8226. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01208>
- Dreo, T., Pirc, M., Ramšak, Z., Pavšič, J., Milavec, M., Žel, 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*, 6513-6528.
- EURL GMFF. (2010, October 12). GMOMETHODS: EU Database of Reference Methods for GMO Analysis. *QT-EVE-GM-005*. Retrieved from <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&nr=126&q=ac%3aMON-04032-6>
- European Commission - Joint Research Center. (2020). Retrieved from <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/CF-CRM-values-v5.pdf>
- European Network of GMO Laboratories (ENGL). (2015). JRC Technical Report. *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*, 24 pp.
- European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed. (2017). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line 40-3-2 Using Real-time PCR. *Validation Report and Protocol Report on the Validation of a DNA Extraction Method for Soybean Seeds Corrected version 1*. doi:10.2760/720444
- European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. (n.d.). *Proficiency tests*. Retrieved from European Commission: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/Proficiency-tests.html>

- 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*, 10–7.
- Fantozzi, A., Ermolli, M., Marini, M., Scotti, D., Balla, B., Querci, M., . . . Van den Eede, G. (2007, February 21). First application of a microsphere-based immunoassay to the detection of genetically modified organisms (GMOs): quantification of Cry1Ab protein in genetically modified maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1071–6. doi:10.1021/jf061506p
- Fraiture, M. -A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., & Roosens, N. H. (2015, October 15). Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions. *BioMed Research International*, p. 22. doi:10.1155/2015/392872
- Fukuta, S., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Hasegawa, M., & Hayashi, I. (2004). Real-time loopmediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms. *European Food Research and Technology*, 496–500.
- Garcia-Canas, V., Gonzalez, R., & Cifuentes, A. (2004). Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maizes using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *Electrophoresis*, 2219–26.
- Germini, A., Rossi, S., Zanetti, A., Corradini, R., Fogher, C., & Marchelli, R. (2005). Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3958–62.
- Hamels, S., Glouden, T., Gillard, K., Mazzara, M., Debode, F., & Foti, N. (2009). A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. *European Food Research and Technology*, 531–41.
- Heide, B., Drømtorp, S., Rudi, K., Heir, E., & Holck, A. (2008 a). Determination of eight genetically modified maize events by quantitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. *European Food Research and Technology*, 1125–37.
- Heide, B., Heir, E., & Holck, A. (2008 b). Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. *European Food Research and Technology*, 527–35.
- Het Europees Parlement en de raad van de Europese Unie. (2001, april 17). Inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad. *RICHTLIJN 2001/18/EG VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 12 maart 2001*. Retrieved from https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0009.02/DOC_1&format=PDF
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., . . . Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, pp. 8604–8610. doi:10.1021/ac202028g
- Holst-Jensen, A. (2006). Sampling, detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs). In Y. Picó (Ed.), *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments* (1st Edition ed., pp. 231–68). Elsevier Science.

- Holst-Jensen, A. (2009). Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*, 1071-1082. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.025
- Hougs, L., Gatto, F., Goerlich, O., Grohmann, L., Lieske, K., Mazzara, M., . . . Žel, J. (2017). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. Luxembourg: Office of the European Union. doi:10.2760/645114
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., . . . Bustin, S. A. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, 1012–1029. doi:10.1373/clinchem.2013.206375
- IDT. (n.d.). *PrimeTime qPCR Probes*. Retrieved from IDT: <https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/gene-expression/primetime-qpcr-probes>
- ISO. (2019). ISO 20395:2019(en). *Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR*. Online Browsing Platform (OBP).
- ISO 5725-1:2018. (2018). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/11833.html>
- ISO 5725-2:2019. (2019). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/69419.html>
- ISO/IEC 17025:2017. (2017). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/66912.html>
- ISO/IEC GUIDE 99:2007. (2007). *International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/45324.html>
- James, D., Schmidt, A.-M., Wall, E., Green, M., & Masri, S. (2003, September 24). Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), pp. 5829-34. doi:10.1021/jf0341159
- Joint Research Centre: European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. (n.d.). *Legal basis*. Retrieved from European Commission: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/legalbasis.htm>
- Kalogianni, D. P., Koraki, T., Christopoulos, T. K., & Ioannou, P. C. (2006). Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosensors and Bioelectronics*, 1069–76.
- Kaplinsky, N., Braun, D., Lisch, D., Hay, A., Hake, S., & Freeling, M. (2002). Maize transgene results in Mexico are artefacts. *Nature*, 601-602.
- Kim, V. H., Choi, S. J., Lee, A. H., & Moon, T. W. (2006, January 1). Quantitation of CP4 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase in Soybean by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25–31.
- Köppel, R., & Bucher, T. (2015, May 29). Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis. *European Food Research and Technology*, pp. 427–439.

- 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), pp. 974-978.
- Leimanis, S., Hernandez, M., Fernandez, S., Boyer, F., Burns, M., & Bruderer, S. (2006). A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Molecular Biology*, 123–39.
- Lievens, A., Jacchia, S., Kagkli, D.-M., Savini, C., & Querci, M. (2016). Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PLOS ONE*. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153317>
- Ling, M. M., Ricks, C., & Lea, P. (2007, January 7). Multiplexing molecular diagnostics and immunoassays using emerging microarray technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 87-98. doi:10.1586/14737159.7.1.87
- Macherey-Nagel. (2020, December). Genomic DNA from food . *NucleoSpin Food*. Düren, Germany.
- Mazzara, M., Savini, C., Delobel, C., Broll, H., Damant, A., Paoletti, C., & Van den Eede, G. (2008). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. *JRC Scientific and Technical Reports*. doi:10.2788/65827
- McClean, K., & Abdelhakim, D. (2014). *Modified Organism MON-Ø4Ø32-6 - Roundup Ready™ soybean*. Retrieved from Biosafety Clearing-House: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14796>
- Metz, M., & Fütterer, J. (2002). Suspect evidence of transgenic contamination. *Nature*, 600–1.
- Morisset, D., Dobnik, D., Hamels, S., Žel, J., & Gruden, K. (2008 a). NAIMA: target amplification strategy allowing quantitative on-chip detection of GMOs. *Nucleic Acids Research*.
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., & Žel, J. (2013, May 2). Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLoS ONE*, 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0062583
- Nadal, A., Coll, A., La Paz, J. L., Esteve, T., & Pla, M. (2006). A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events. *Electrophoresis*, 3879–88.
- Nagarajan, M. M., & De Boer, S. H. (2003). An oligonucleotide array to detect genetically modified events in potato. *Plant Molecular Biology Reporter*, 259–70.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015, October). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, pp. 231-250. Retrieved from <http://gmo-qpcr-analysis.com/navarro-real-time-PCR-detection-chemistry-2015.pdf>
- Ocaña, M. F., Fraser, P. D., Patel, R. K., Halket, J. M., & Bramley, P. M. (2007). Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 319–28. doi:https://doi.org/10.1002/rcm.2819
- Pecoraro, S., Berben, G., Burns, M., Corbisier, P., De Giacomo, M., De Loose, M., . . . Spilberg, B. (2019). *Overview and recommendations for the application of digital PCR*. Luxembourg: European Network of GMO Laboratories (ENGL) . doi:10.2760/192883

- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C. B., . . . Taly, V. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidic. *Lab on a Chip*, pp. 2156–2166. doi:10.1039/c1lc20128j
- Pohl, G., & Shih, I.-M. (2004, January). Principle and applications of digital PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, pp. 41-47. doi:10.1586/14737159.4.1.41.
- QIAGEN Sample and Assay Technologies. (2015, June). For Blood Cultured cells Tissue Mouse tails Yeast Bacteria (Gram-negative and some Gram-positive). *QIAGEN® Genomic DNA Handbook*. Retrieved from www.qiagen.com
- Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J., & Foy, C. A. (2011, September 1). Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Analytical Chemistry*, pp. 6474-84. doi:10.1021/ac103230c
- Stobiecka, M., Ciesla, J. M., Janowska, B., Tudek, B., & Radecka, H. (2007). Piezoelectric sensor for determination of genetically modified soybean roundup ready((R)) in samples not amplified by PCR. *Sensors*, 1462–79.
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., & Morley, A. A. (1992, September). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 13(3), pp. 444-9.
- Tengs, T., Kristoffersen, A. B., Berdal, K. G., Thorstensen, T., Butenko, M., & Nesvold, H. (2007). Microarray-based method for detection of unknown genetic modifications. *BMC Biotechnology*, 91.
- The dMIQE Group. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, 1012–1029. Retrieved from <https://academic.oup.com/clinchem/article/66/8/1012/5880117>
- Trapmann, S., Delobel, C. C., Corbisier, P., Emons, H., Hougs, L., Philipp, P., . . . Schulze, M. (2014). European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs. *JRC Technical Reports*. doi:10.2787/90706
- Uhlig, S., Frost, K., Colson, B., Simon, K., Mäde, D., Reiting, R., . . . Grohmann, L. (2015). Validation of qualitative PCR methods on the basis of mathematical-statistical modelling of the probability of detection. *Accreditation and Quality Assurance*, 20, 75–83.
- VERORDENING (EG) Nr. 1829/2003 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 22 september 2003 inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders. (2003, oktober 18). *Publicatieblad van de Europese Unie*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1829&from=en>
- VERORDENING (EG) Nr. 1830/2003 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 22 september 2003. (2003, oktober 18). *Publicatieblad van de Europese Unie*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1830&from=en>
- Volpe, G., Ammid, N. H., Moscone, D., Occhigrossi, L., & Palleschi, G. (2006). Development of an Immunomagnetic Electrochemical Sensor for Detection of BT-CRY1AB/CRY1AC Proteins in Genetically Modified Corn Samples. *Analytical Letters*, 1599-1609. doi:10.1080/00032710600713339

- Waiblinger, H., Boernsen, B., & Pietsch, K. (2008). GMO routine analysis — screening table for detection of genetically modified plants in food and feed. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 104(6), pp. 261–4.
- Whale, A. S., Huggett, J. F., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., . . . Scott, D. J. (2012, June). Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gks203

Bijlagen

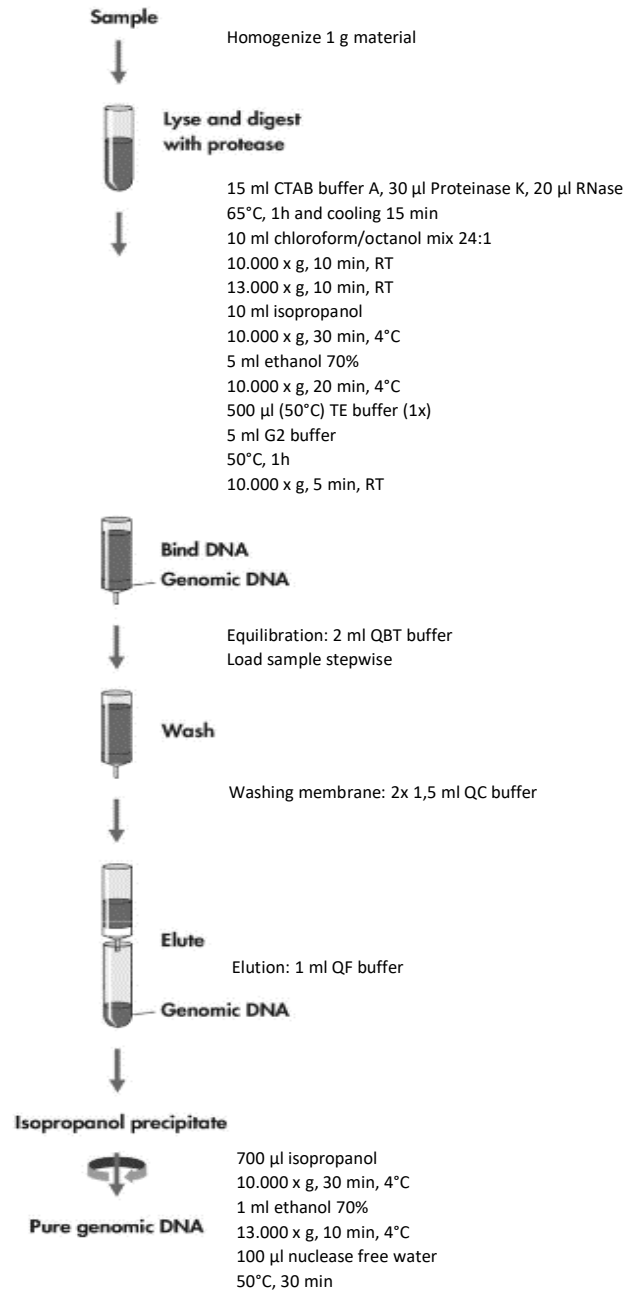
Procedure extractiemethoden

NucleoSpin® Food		
1 Homogenize sample		Homogenize 200 mg material
2 Lyse cells	 	550 µL CF (65 °C) 10 µL Proteinase K 65 °C, 30 min > 10,000 x g, 10 min Take clear supernatant (1 vol) and continue with step 3
3 Adjust DNA binding conditions		1 vol C4 1 vol ethanol
4 Bind DNA	 	Load sample stepwise (maximum loading capacity 700 µL) 11,000 x g, 1 min
5 Wash and dry silica membrane	 	1 st wash 400 µL CQW 11,000 x g, 1 min 2 nd wash 700 µL C5 11,000 x g, 1 min 3 rd wash 200 µL C5 11,000 x g, 2 min
6 Elute DNA	 	100 µL CE (70 °C) RT, 5 min 11,000 x g, 1 min

650 µl C5
gebruikt i.p.v.
700 µl

Figuur 19: Procedure NucleoSpin Food extractie

QIAGEN genomic DNA purification procedure



Figuur 20: Procedure CTAB- extractiemethode

ddPCR

- Bereiding PCR-mixen met andere geteste primer-/probeconcentraties

Tabel 18: Template bereiding PCR-mix voor lectine/RRS met primer-/probeconcentratie 1

Lectine/RRS			
Mix	Stock concentratie (nM)	Finale concentratie (nM)	Volume 1 reactie (μ l)
Primer-F-ddPCR	20000	900	0,99
Primer-R-ddPCR	20000	900	0,99
Probe-ddPCR		250	0,55
Water			3,47
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	2x	1x	11
Volume			17
DNA			5
Totaal volume			22

Tabel 19: Template bereiding PCR-mix voor lectine/RRS met primer-/probeconcentratie 2

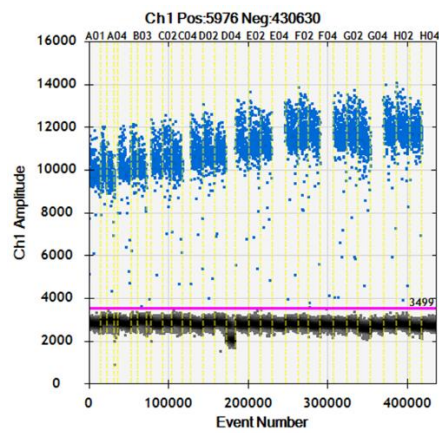
Lectine/RRS			
Mix	Stock concentratie (nM)	Finale concentratie (nM)	Volume 1 reactie (μ l)
Primer-F-ddPCR	20000	150	0,165
Primer-R-ddPCR	20000	150	0,165
Probe-ddPCR		500	1,1
Water			4,57
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	2x	1x	11
Volume			17
DNA			5
Totaal volume			22

Tabel 20: Template bereiding PCR-mix voor lectine/RRS met primer-/probeconcentratie 3

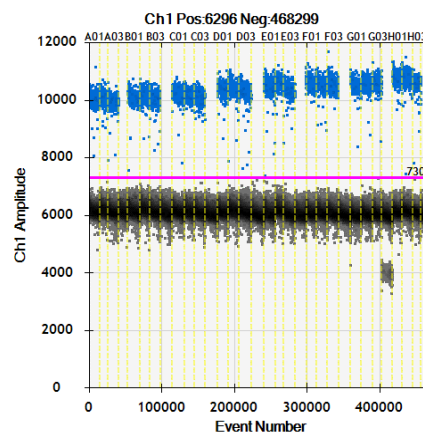
Lectine/RRS			
Mix	Stock concentratie (nM)	Finale concentratie (nM)	Volume 1 reactie (μ l)
Primer-F-ddPCR	20000	300	0,33
Primer-R-ddPCR	20000	300	0,33
Probe-ddPCR		100	0,22
Water			5,12
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	2x	1x	11
Volume			17
DNA			5
Totaal volume			22

Grafieken data-analyse

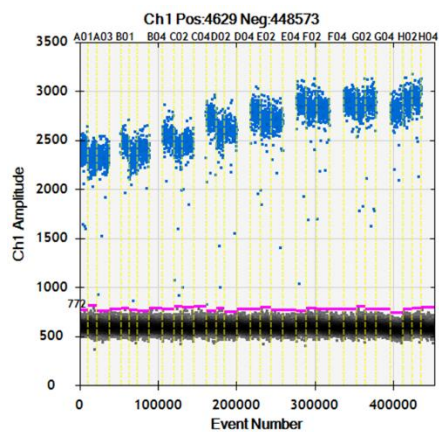
▪ Lecture



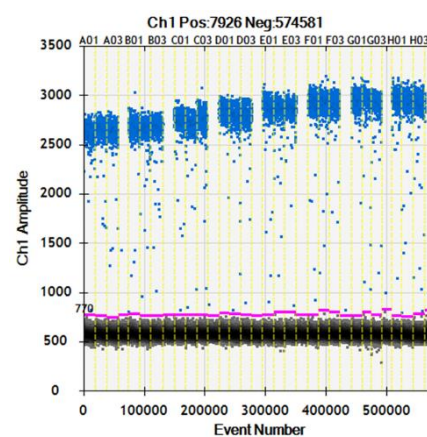
Figuur 21: Lecture_concentratie 1_
temperatuursgradiënt 1



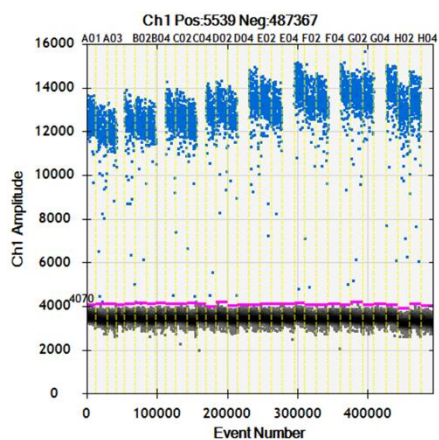
Figuur 22: Lecture_concentratie 2_
temperatuursgradiënt 1



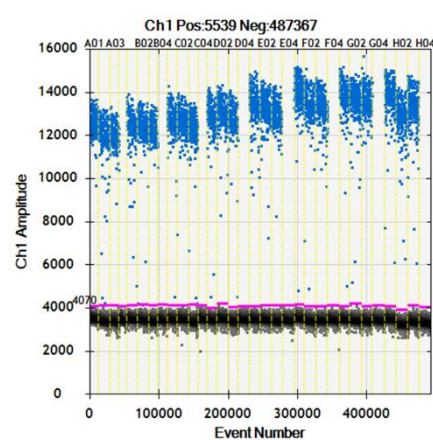
Figuur 23: Lecture_concentratie 2(1)_
temperatuursgradiënt 1



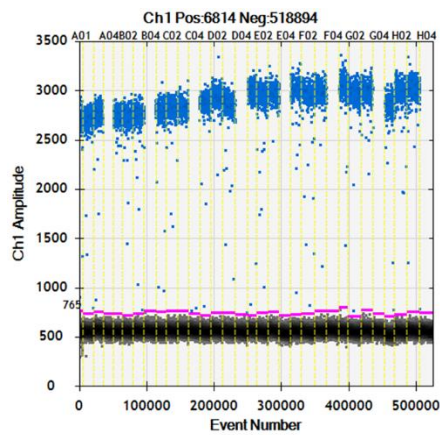
Figuur 24: Lecture_concentratie 2(1)_
temperatuursgradiënt 2



Figuur 25: Lecture_concentratie 4_
temperatuursgradiënt 2

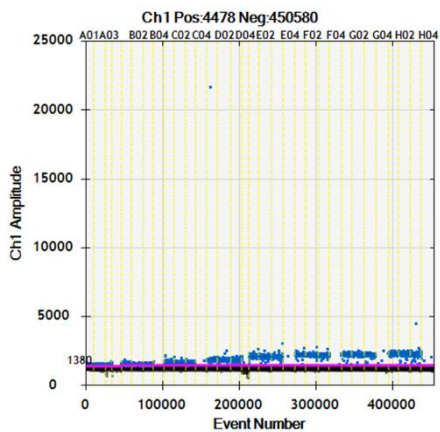


Figuur 26: Lecture_concentratie 4_
temperatuursgradiënt_PCR
programma 2

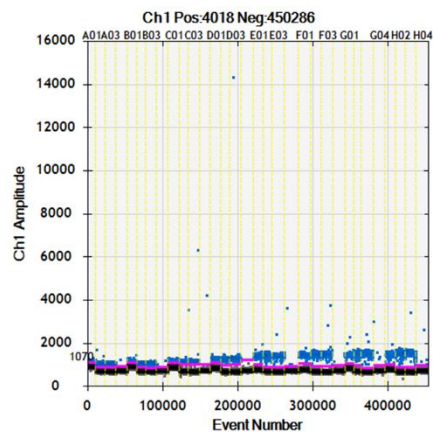


Figuur 27: *Lectine_concentratie 2(1)_temperatuursgradiënt 2_PCR programma 2*

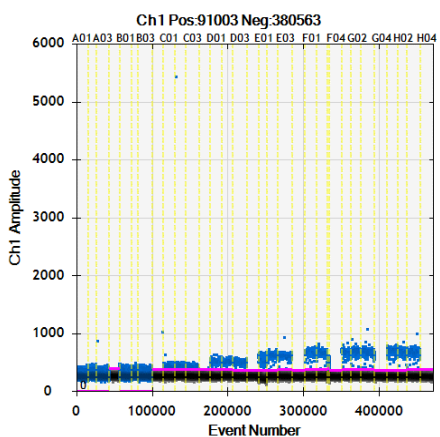
■ RRS



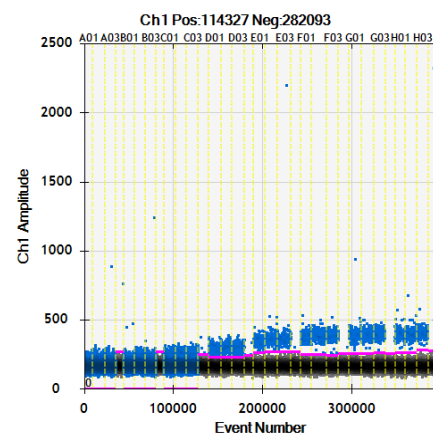
Figuur 28: *RRS_concentratie 2_temperatuursgradiënt 2*



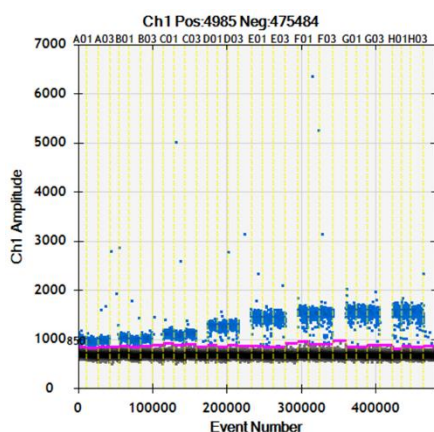
Figuur 29: *RRS_concentratie 1_temperatuursgradiënt 2*



Figuur 30: *RRS_concentratie 3_temperatuursgradiënt 2*



Figuur 31: *RRS_concentratie 2(1)_temperatuursgradiënt 2*



Figuur 32: RRS_concentratie 4_
temperatuursgradiënt 2

ANOVA-testen

- Voor de berekening van LOQ abs

Tabel 21: Single factor ANOVA-test voor de bepaling van LOQ_{abs} lectine

RSDr%: ANOVA Single factor lectine

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	7	296	42,28	31,24
Column 2	6	198	33	56,8
Column 3	6	180,9	30,15	67,86

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	531,55	2	265,77	5,24	0,02	3,63
Within Groups	810,70	16	50,67			
Total	1342,25	18				

	%	absolute
Srepeat, rel	20,0	0,2
Srun, rel	0,0	0,00
bias, rel	-11,2	-0,112

Tabel 22: Single factor ANOVA-test voor de bepaling van LOQ_{abs} RRS

RSDr%: ANOVA Single factor RRS

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	7	249,4	35,63	105,23

Column 2	6	223	37,17	28,57
Column 3	5	179,3	35,86	7,45
Column 4	6	229,8	38,3	10,06

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	28,21	3	9,40	0,22	0,88	3,10
Within Groups	854,32	20	42,72			
Total	882,53	23				

	%	absolute
Srepeat, rel	17,8	0,2
Srun, rel	0,0	0,00
bias, rel	-8,2	2,673

- Voor de berekening van LOQ rel

Tabel 23: Single factor ANOVA-test voor de bepaling van LOQ_{rel}

RSDr%: ANOVA Single factor all

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	4	0,31	0,08	1,90E-05
Column 2	4	0,31	0,08	0,00018
Column 3	4	0,33	0,08	0,00018
Column 4	4	0,35	0,088	0,0004(
Column 5	4	0,34	0,085	0,00036

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,00043	4	0,00011	0,45	0,77	3,06
Within Groups	0,0036	15	0,00024			
Total	0,0040	19				

	%	absolute
Srepeat, rel	18,8	0,2
Srun, rel	0,0	0,00
bias, rel	-17,7	-0,177

Tabel 24: Single factor ANOVA-test voor de vergelijking van de extractiemethoden CTAB en NucleoSpin®

RSDr%: ANOVA Single factor all

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	10	0,72	0,072	2,77E-05
Column 2	10	0,93	0,093	0,00017

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,0022	1	0,0022	21,82	0,00019	4,41
Within Groups	0,0018	18	0,00010			
Total	0,0040	19				

	%	absolute
Srepeat, rel	18,8	0,2
Srun, rel	0,0	0,00
bias, rel	-17,7	-0,177

De p-waarde is significant kleiner dan het significantieniveau van 0,05; dus kan er besloten worden dat de verschillen tussen de twee groepen, d.w.z. CTAB-metingen en NucleoSpin® significant zijn.

Inhibitietesten

- CTAB en NucleoSpin®

Tabel 25: Inhibitietest CTAB. Geteste markers: RRS en lectine

Hoeveelheid DNA (ng)	Verdunnings-factor	RRS			Lectine		
		Gemiddelde Ct-waarde	Theoretische Ct-waarde	Δ	Gemiddelde Ct-waarde	Theoretische Ct-waarde	Δ
150	1,5	29,51	29,98	-0,5	22,4	22,3	0,1
100	2	30,17	30,58	-0,4	22,9	22,9	0,0
50	2,5	31,14	31,58	-0,4	24,0	23,9	0,1
20	2	32,72	32,88	-0,2	25,2	25,2	0,0
10		33,88	33,88		26,2	26,2	
Conclusie		Geen inhibitie			Geen inhibitie		

Tabel 26: Inhibitietest NucleoSpin®. Geteste markers: RRS en lectine

Hoeveelheid DNA (ng)	Verdunnings-factor	RRS			Lectine		
		Gemiddelde Ct-waarde	Theoretische Ct-waarde	Δ	Gemiddelde Ct-waarde	Theoretische Ct-waarde	Δ
150	1,5	32,92	31,94	1,0	24,8	24,1	0,7
100	2	33,92	32,54	1,4	25,8	24,7	1,1
50	2,5	34,98	33,54	1,4	27,0	25,7	1,3

20	2	34,98	34,84	0,1	27,1	27,0	0,0
10		35,84	35,84		28,0	28,0	
Conclusie		Inhibitie			Inhibitie		

- Toepasbaarheid van de methode

Tabel 27: Inhibitietest real-life sample 1. Geteste merkers: RRS en lectine

Staal 1: Soja- en maïsmeel (mixed flours)						
Verdunning	RRS	Lectine	Verdunningsfactor	Gemiddeld aantal cp/20 µl	Theoretisch aantal cp/20 µl	Bias (%)
30 ng/µl	3	2765	3	2796	2897	3,5
	6	2826				
10 ng/µl	9	945		966		
	2	986				
30 ng/µl	13	2680	3	2594	2599,5	0,2
	0	2508				
10 ng/µl	2	858		867		
	4	875				

Tabel 28: Inhibitietest real-life sample 2. Geteste merker: RRS

Staal 2: Verwerkte matrix (RRS)					
Verdunning	RRS	Verdunningsfactor	Gemiddeld aantal cp/20 µl	Theoretisch aantal cp/20 µl	Bias (%)
30 ng/µl	2036	3	1983	1878	-5,6
	1929				
10 ng/µl	632		626		
	620				
30 ng/µl	1833	3	1737	2019	14,0
	1641				
10 ng/µl	626		673		
	720				

Tabel 29: Inhibitietest real-life sample 2. Geteste merker: lectine

Staal 2: Verwerkte matrix (Lectine)					
Verdunning	Lectine	Verdunningsfactor	Gemiddeld aantal cp/20 µl	Theoretisch aantal cp/20 µl	Bias (%)
30 ng/µl	111585	3	111259	110223	-0,9
	110933				
10 ng/µl	36914		36741		
	36568				
30 ng/µl	107518	3	109575	103191	-6,2
	111632				
10 ng/µl	34006		34397		
	34788				

Tabel 30: Inhibitietest real-life sample 3. Geteste merkers: RRS en lectine

Staal 3: Diervoeder						
Verdunning	RRS	Lectine	Verdunningsfactor	Gemiddeld aantal cp/20 µl	Theoretisch aantal cp/20 µl	Bias (%)
30 ng/µl	31	6203	3	6316	6003	-5,2
	59	6428				
10 ng/µl	9	1948		2001		
	12	2054				
30 ng/µl	74	4842	3	4850	4806	-0,9
	69	4857				
10 ng/µl	27	1646		1602		
	28	1558				
30 ng/µl	33	4671	3	4665	4183,5	-11,5
	36	4658				
10 ng/µl	19	1417		1395		
	23	1372				

30 ng/μl	48	5859	3	5824	5844	0,4
	57	5788				
10 ng/μl	32	1949				
	8	1947		1948		

Toepasbaarheid van de methode

Tabel 31: Overzicht van de resultaten voor Staal 1. Uit het gemiddeld aantal gemeten kopijen voor lectine en RRS werd het GGO% berekend.

Staal 1: Soja- en maïsmeel (mixed flours)						
Extract	Staal	Extractiemethode	Aantal kopijen in 20 µl	Gemiddeld aantal kopijen	Berekend GGO% (m/m)	
1	30 ng/µl RRS	NucleoSpin®	3	5	0,2	
			6			
	30 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	2765	2796		
			2826			
	10 ng/µl RRS	NucleoSpin®	9	6	0,7	
			2			
	10 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	945	966		
			986			
2	30 ng/µl RRS	NucleoSpin®	13	13	0,6	
			0			
	30 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	2680	2594		
			2508			
	10 ng/µl RRS	NucleoSpin®	2	3	0,4	
			4			
	10 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	858	867		
			875			
	P1 RRS-1%-14 RRS	CTAB	160	159	1,1	
			157			
	P1 RRS-1%-14 Lectine	CTAB	17486	17638		
			17790			

	P2 RRS-0,1%-13 RRS	CTAB	26			
			37	32		
	P2 RRS-0,1%-13 Lectine	CTAB	30165			0,1
			30038	30102		
	NC DAS68416- 1%-02 RRS	CTAB	2		1	
			0			
	NC DAS68416- 1%-02 Lectine	CTAB	14548			0,0
			14553	14551		

Tabel 32: Overzicht van de resultaten voor Staal 2. Uit het gemiddeld aantal gemeten kopijen voor lectine en RRS werd het GGO% berekend.

Staal 2: Verwerkte matrix					
Extract	Staal	Extrahiemethode	Aantal kopijen in 20 µl	Gemiddeld aantal kopijen	Berekend GGO% (m/m)
1	30 ng/µl RRS	CTAB	2036		
			1929	1983	
	30 ng/µl Lectine	CTAB	111585		2,26
			110933	111259	
2	10 ng/µl RRS	CTAB	632		
			620	626	
	10 ng/µl Lectine	CTAB	36914		2,16
			36568	36741	
	30 ng/µl RRS	CTAB	1833		
			1641	1737	
	30 ng/µl Lectine	CTAB	107518		2,01
			111632	109575	
	10 ng/µl RRS	CTAB	626		
			720	673	
	10 ng/µl Lectine	CTAB	34006		2,48
			34788	34397	

	P1 RRS-1%-14 RRS	CTAB	110	120	0,91
			130		
	P1 RRS-1%-14 Lectine	CTAB	16952	16746	0,09
			16540		
	P2 RRS-0,1%-13 RRS	CTAB	29	21	0,09
			13		
	P2 RRS-0,1%-13 Lectine	CTAB	29724	30050	0,00
			30375		
	NC DAS68416- 1%-02 RRS	CTAB	0	0	0,00
			0		
	NC DAS68416- 1%-02 Lectine	CTAB	13618	13358	0,00
			13098		

Tabel 33: Overzicht van de resultaten voor Staal 3, extract 1 en 2. Uit het gemiddeld aantal gemeten kopijen voor lectine en RRS werd het GGO% berekend.

Staal 3: Diervoeder (1)					
Extract	Staal	Extractiemethode	Aantal kopijen in 20 µl	Gemiddeld aantal kopijen	Berekend GGO% (m/m)
1	30 ng/µl RRS	NucleoSpin®	31	45	0,90
			59		
	30 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	6203	6316	0,66
			6428		
	10 ng/µl RRS	NucleoSpin®	9	11	0,66
			12		
	10 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	1948	2001	0,66
			2054		

2	30 ng/μl RRS	NucleoSpin®	74	72	1,87
			69		
	30 ng/μl Lectine	NucleoSpin®	4842	4850	2,17
			4857		
	10 ng/μl RRS	NucleoSpin®	27	28	0,98
			28		
	EURL PT02/2019-1B_10 ng/μl Lectine	NucleoSpin®	1646	1602	0,06
			1558		
	P1 RRS-1%-14 RRS	CTAB	147	135	0,98
			122		
	P1 RRS-1%-14 Lectine	CTAB	17370	17345	0,02
			17320		
	P2 RRS-0,1%-13 RRS	CTAB	17	14	0,06
			11		
	P2 RRS-0,1%-13 Lectine	CTAB	30131	30312	0,02
			30493		
	NC DAS68416-1%-02 RRS	CTAB	2	2	0,02
			2		
	NC DAS68416-1%-02 Lectine	CTAB	12870	12265	0,02
			11659		

Tabel 34: Overzicht van de resultaten voor Staal 3, extract 3 en 4. Uit het gemiddeld aantal gemeten kopijen voor lectine en RRS werd het GGO% berekend.

Staal 3: Diervoeder (2)					
Extract	Staal	Extractiemethode	Aantal kopijen in 20 µl	Gemiddeld aantal kopijen	Berekend GGO% (m/m)
3	30 ng/µl RRS	NucleoSpin®	33	34,30	0,93
			36		
	30 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	4671	4664	
			4658		
	10 ng/µl RRS	NucleoSpin®	19	21	
			23		
	10 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	1417	1394	
			1372		
4	30 ng/µl RRS	NucleoSpin®	48	52	1,14
			57		
	30 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	5859	5824	
			5788		
	10 ng/µl RRS	NucleoSpin®	32	20	
			8		
	10 ng/µl Lectine	NucleoSpin®	1949	1948	
			1947		
	P1 RRS-1%-14 RRS	CTAB	142	144	0,98
			145		
	P1 RRS-1%-14 Lectine	CTAB	18666	18559	
			18453		

	P2 RRS-0,1%-13 RRS	CTAB	11	15	0,088
			19		
	P2 RRS-0,1%-13 Lectine	CTAB	21855	21686	0,023
			21518		
	NC DAS68416- 1%-02 RRS	CTAB	2	2	0,023
			0		
	NC DAS68416- 1%-02 Lectine	CTAB	11108	11070	
			11033		