

Wykrywanie, identyfikacja i ilościowe  
oznaczanie GMO w materiale siewnym –  
wyzwania analityczne i interpretacja wyników.

Magdalena Żurawska-Zajfert  
Laboratorium Kontroli GMO  
IHAR-PIB

# Testowanie partii nasion na niezamierzoną obecność nasion GM

---

- ▶ Próbkobranie zgodne z wytycznymi ISTA
- ▶ Plan testowania w oparciu o arkusz wyliczeniowy Seedcalc
- ▶ Wydzielenie próbki roboczej z próbki laboratoryjnej zgodnie z planem testowania (liczba nasion policzona lub określona wagowo)
- ▶ Zapobieganie fałszywie pozytywnym wynikom – usuwanie pyłów - mycie i suszenie nasion



# Testowanie partii nasion na niezamierzoną obecność nasion GM

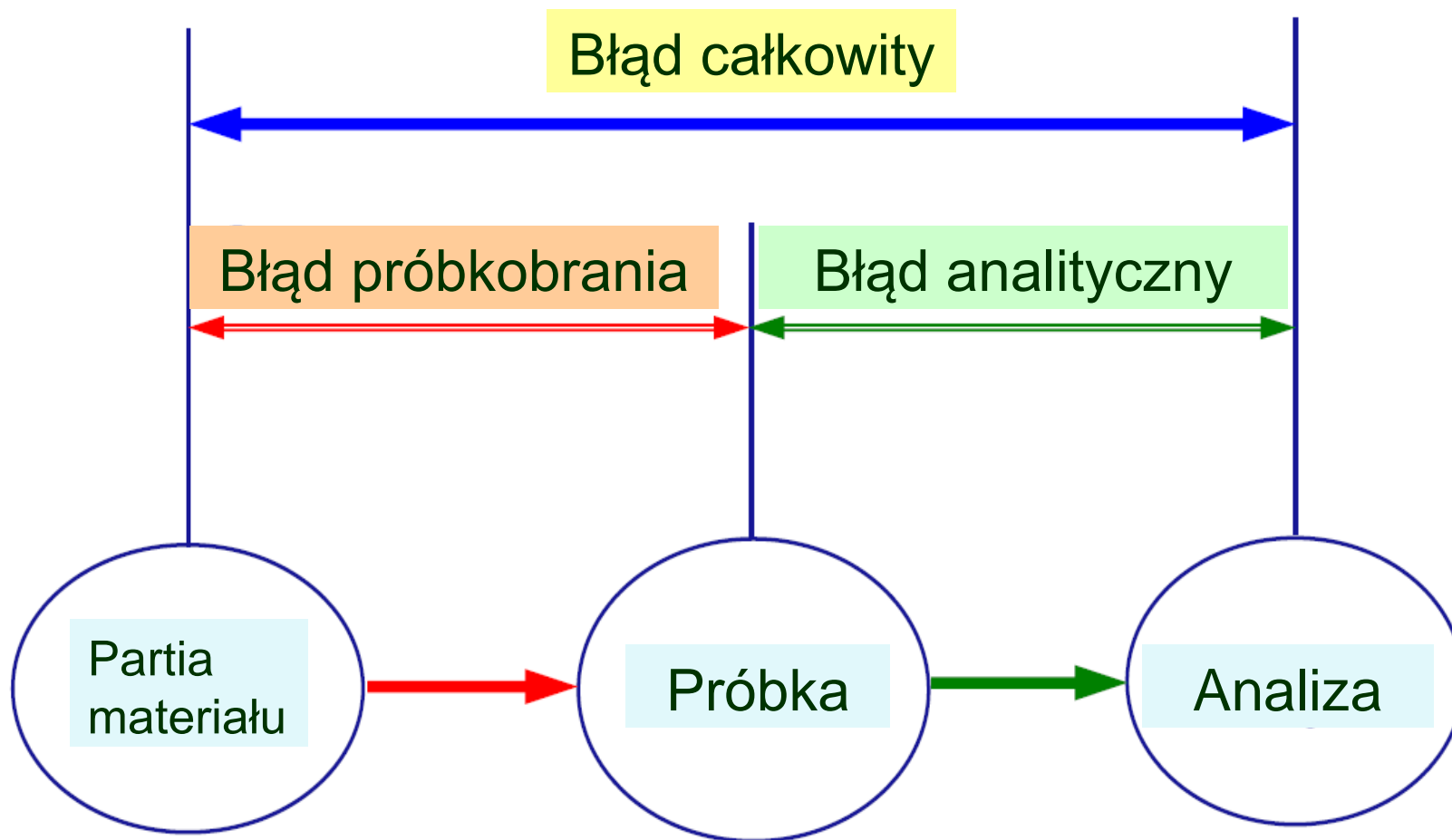
---

- ▶ Homogenizacja próbek, podpróbki traktowane jako oddzielne próbki
- ▶ Ekstrakcja DNA z każdej podpróbki, możliwość połączenia porcji mączek z podpróbek w jedną zbiorczą próbkę (możliwości metody)
- ▶ Jakościowy PCR przy użyciu Real Time PCR z wyizolowanego DNA na obecność sekwencji GM. Wynik jakościowy: tak/nie, określanie ilościowe przy użyciu arkusza Seedcalc
- ▶ Plan testowania i koszty z nim związane (Seedcalc)



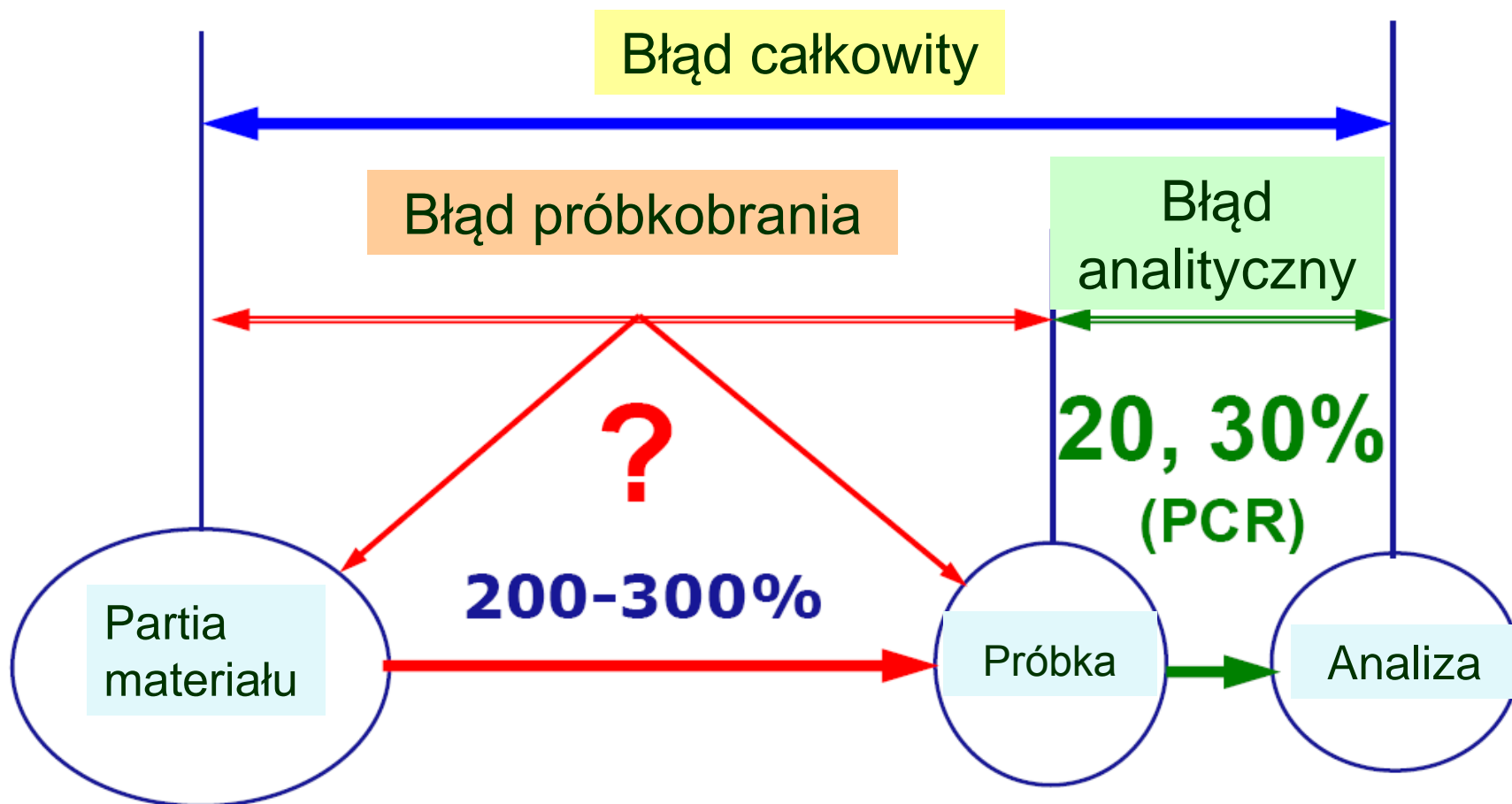
# Źródła błędów

---



# Źródła błędów

---



# Pobieranie próbek do analizy GMO

---

- ▶ **Rodzaje materiałów:**
  - ▶ „surowe” materiały np. nasiona
  - ▶ półprodukty, dodatki do żywności np. skrobia kukurydziana, lecytyna sojowa
  - ▶ żywność i pasze
- ▶ **Duże partie materiału - mały rozmiar próbki poddawanej analizie**



# Procedury pobierania próbek do analizy GMO określają:

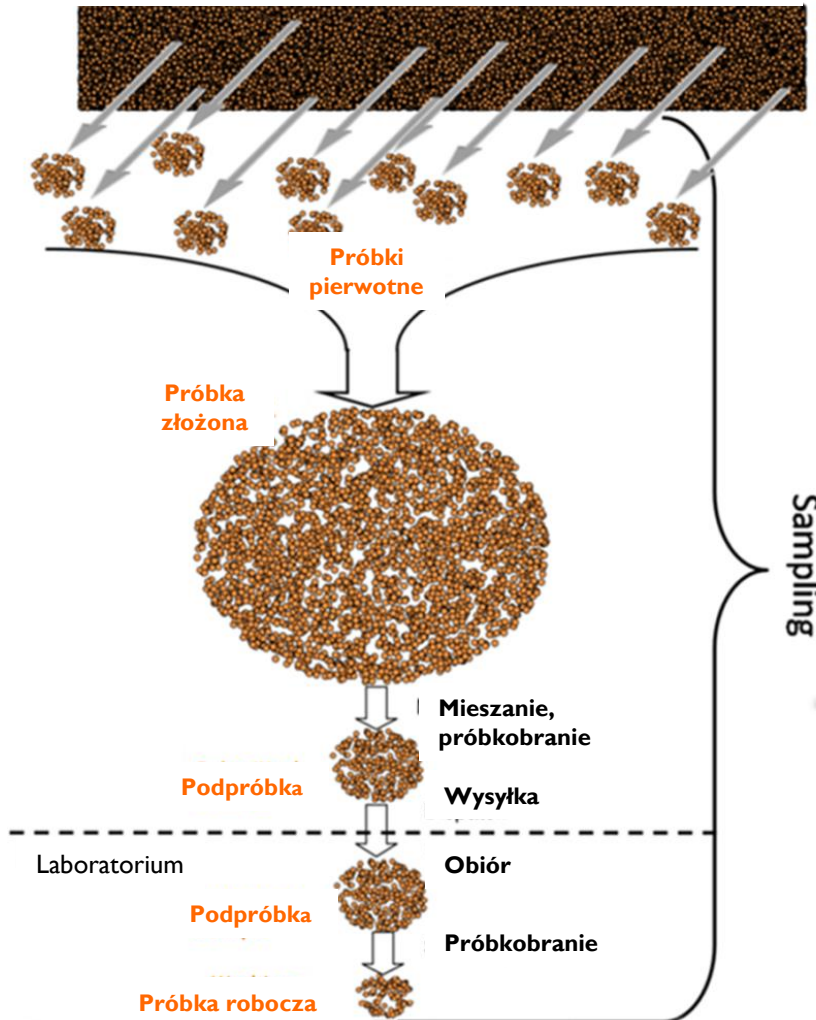
---

- ▶ Maksymalną wielkość partii materiału
- ▶ Wielkość i liczbę podpróbek z partii
- ▶ Wielkość próbki zbiorczej z partii
- ▶ Sposób utworzenia próbki laboratoryjnej
- ▶ Wielkość próbki laboratoryjnej
- ▶ Sposób postępowania z próbką laboratoryjną



# Schemat poboru próbek nasion do analiz GMO wg zasad ISTA

Partia materiału



Zasady poboru próbek:

1. Każda próbka pierwotna powinna być reprezentatywna dla miejsca partii materiału z którego została pobrana.
2. Miejsca poboru próbek z partii nie są ściśle przypadkowe i związane z wysoką lub małą dostępnością części partii.
3. Proces poboru i utworzenia próbki złożonej, podpróbki i próbki roboczej nie może powodować zmiany ich składu.



Zmiennymi wpływającymi na plan testowania i sposób jego przygotowania są:

---

- ▶ Liczba próbek pierwotnych
- ▶ Wielkość próbki roboczej
- ▶ Współczynnik fałszywie negatywnych wyników, związany z metodą detekcji czy identyfikacji, zależny od reprezentatywności wyizolowanego DNA użytego do reakcji PCR oraz granicy wykrywalności metody.



# Pobieranie prób nasion

---

- ▶ Próba z partii materiału (bulk sample)- odpowiednia ilość podpróbek i ich wielkość (im większa heterogeniczność w partii tym więcej podpróbek)
- ▶ Pobranie próbki laboratoryjnej- losowe (założenie- homogeniczność próby z partii)
- ▶ Próbką laboratoryjna- reprezentatywna dla próby z partii (założenie- homogeniczność próby z partii)
- ▶ Rozkład dwumianowy- używany do określenia wielkości próbki laboratoryjnej (odniesienie do bulk sample)
- ▶ Błąd próbkobrania – związany ze stopniem heterogeniczności (rozwarstwienia) w partii materiału



# Wyznaczenie wielkości próbki laboratoryjnej nasion

---

## ► Górna granica zawartości GMO, jaką można wykryć

Przedział ufności (rozkład dwumianowy)

Liczba nasion

	90%	95%	99%
100	2,28%	2,95%	4,50%
200	1,14%	1,49%	2,28%
300	0,76%	0,99%	1,52%
400	0,57%	0,75%	1,14%
800	0,29%	0,37%	0,57%
1200	0,19%	0,25%	0,38%
2000	0,12%	0,15%	0,23%
2500	0,09%	0,12%	0,18%
3000	0,08%	<b>0,10%</b>	0,15%
6000	0,04%	0,05%	0,08%
10000	0,02%	0,03%	0,05%

Analiza na poziomie 0,1% GMO wymaga próbki zawierającej przynajmniej 3000 nasion

---

# Wyznaczanie wielkości próbki laboratoryjnej nasion

---

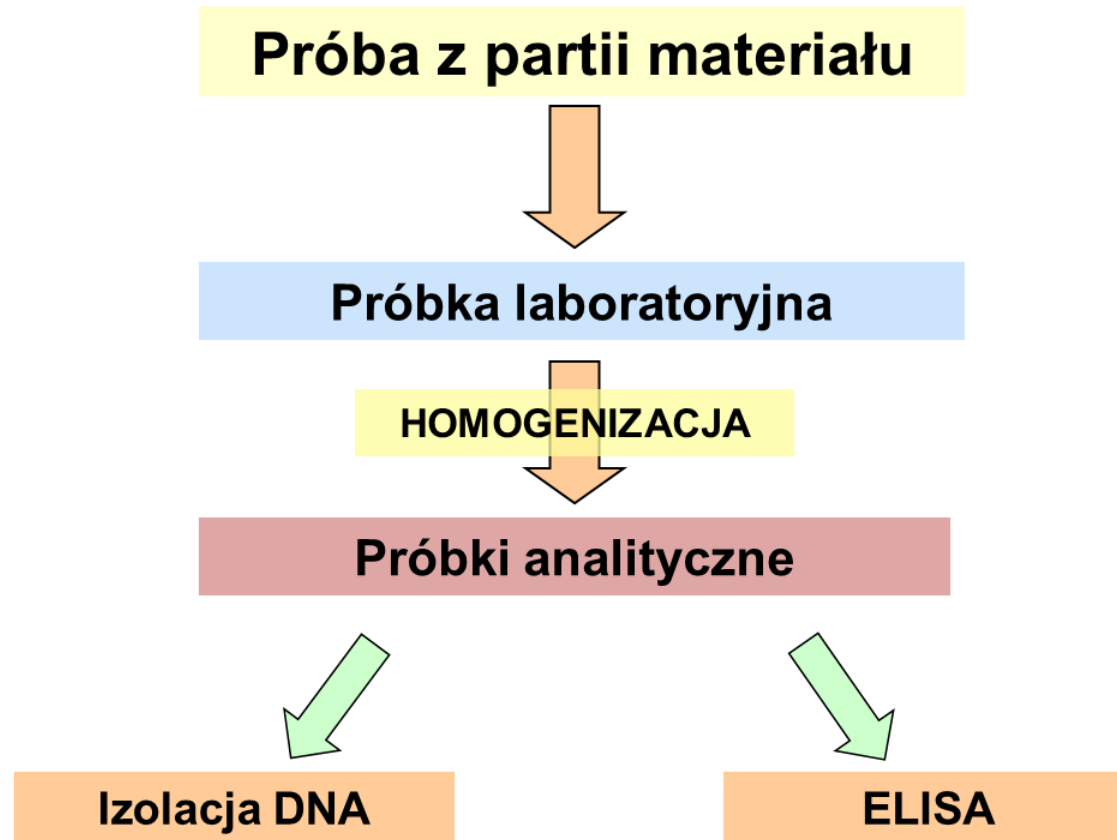
<b>Gatunek</b>	<b>Masa ziarna (mg)</b>	<b>Masa próbki 3500 nasion (g)</b>
Kukurydza	285	1000
Rzepak	4	14
Ryż	27	95
Soja	200	700
Pszenica	37	140



# Pobieranie próbek

---

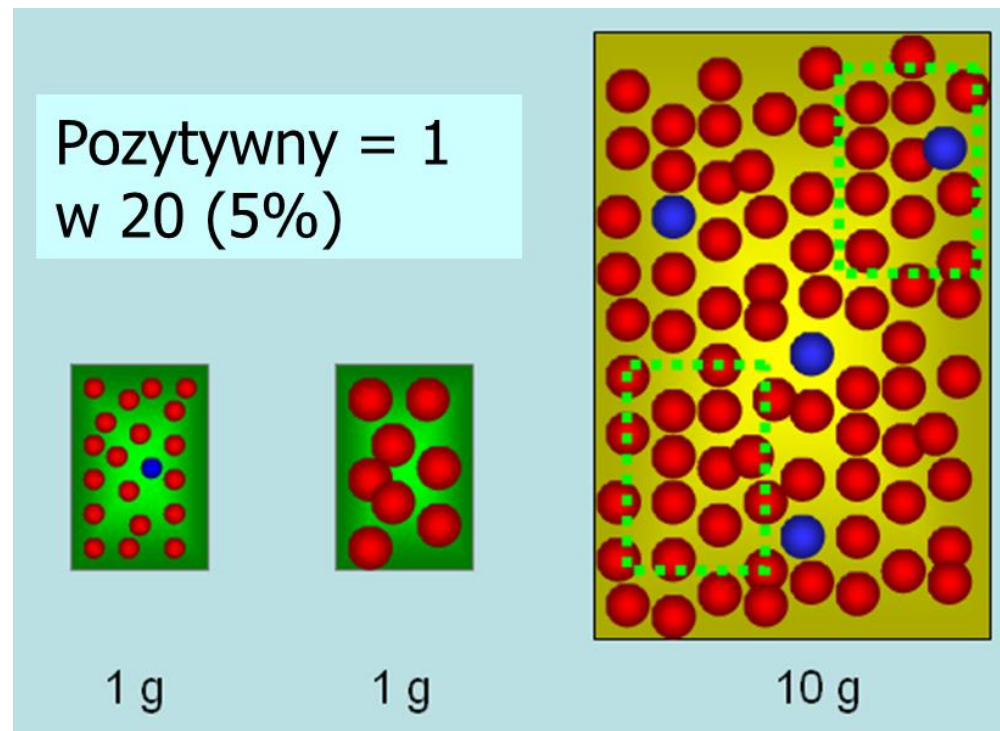
- ▶ Ważna homogeniczność próbki



# Wpływ wielkości cząstek na dokładność oznaczenia

---

- ▶ Rozmiar cząstek określa ich ilość w próbce analitycznej o określonej masie



I nasiono w 1000 = 0,1 %

---



# Zawartość frakcji różnych rozmiarów cząstek wpływa na dokładność wyniku analizy

---

- ▶ Prawidłowe oznaczenie zawartości GMO - możliwe tylko dla próbek o złożonych z takich samych frakcji
  - ▶ Mieszanki frakcji:
  - ▶ mączka GMO - zawyżony wynik
  - ▶ kaszka GMO - zaniżony wynik
- ▶ Różnice wielkości cząstek w próbkach mogą wpływać na wyniki analiz (np. w próbkach żywności)
- ▶ Idealny rozmiar cząstek - CRM  $40\mu\text{m} = 2,9 \times 10^6$  cząstek/g



# Próbkobranie

---

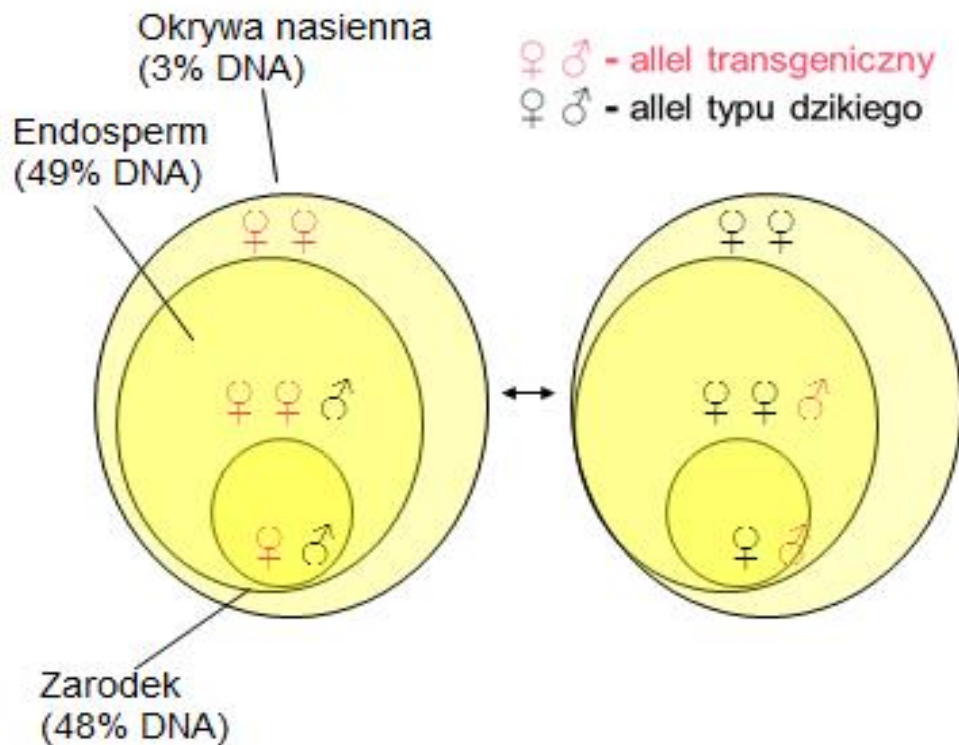
- ▶ Pobieranie próbek i błąd związany z tym procesem - istotny wpływ na wynik analizy
- ▶ Zapewnienie reprezentatywności na każdym etapie pobierania próbek
- ▶ Metoda pobierania próbek z pola - wpływ na dokładność wyniku
- ▶ Homogenizacja próbki, wielkość i liczba cząstek poddawanych analizie - istotne dla dokładności wyniku



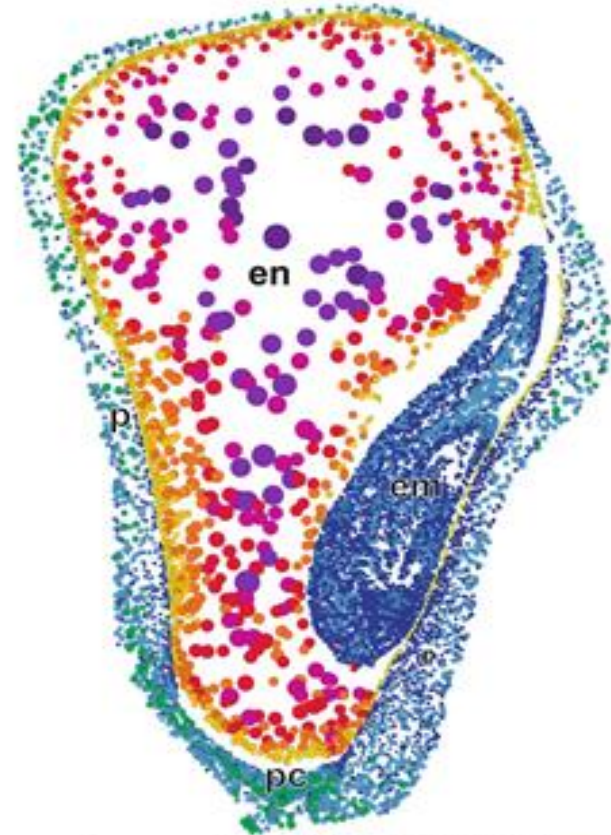


# Ploidalność GM kukurydzy

Zarodek i endosperm 97% DNA, w zależności od pochodzenia allelu transgenicznego mamy 3/5 lub 2/5 liczby kopii transgenu w ziarniaku kukurydzy.



Endoreduplikacja w tkankach ziarniaka



1 mm



J. Žel et al., 2012

# Wpływ wielkości genomu na liczbę kopii DNA

---

Gatunek	Masa 1000 nasion [g]	Gęstość partii materiału [kg/m <sup>3</sup> ]	Objętość nasiona [ml]	Ilość kopii w 200 ng DNA
papaja	15	500	0,0300	262903
ryż	25	560,65	0,0446	221769
burak cukrowy	5	500	0,0100	129024
pomidor	3,5	500	0,0070	102569
soja	150	760,9	0,1971	87713
rzepak	4	669	0,0060	82741
bawełna	120	560,6	0,2141	43544
kukurydza	380	720,8	0,5272	39058
pszenica	40	744,8	0,0537	6126

---



# ISTA

<https://www.seedtest.org/en/home.html>



## ISTA Online



[HOME](#)

search

### International Seed Testing Association - ISTA

[contact](#) [sitemap](#)

[HOME](#) | [ABOUT ISTA](#) | [MEMBERSHIP](#) | [TECHNICAL COMMITTEES](#) | [ACCREDITATION](#) | [PUBLICATIONS](#) | [SEED TESTING LINKS](#)

#### Rules 2016 now online



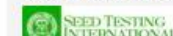
#### news

Rules 2016 now available online



[More info »](#)

Latest issue of Seed Testing International



[View the new ISTA video: "ISTA's vision of UNIFORMITY IN SEED TESTING"](#)

# [http://www.seedtest.org/en/stats-tool-box-\\_content---1--1143.html](http://www.seedtest.org/en/stats-tool-box-_content---1--1143.html)

TCOMs / STA / Stats Tool Box


## Statistical Tools for Seed Testing

[Activity Report](#) | [Stats Tool Box](#) | [Stats Links](#) | [Workshops](#) | [Documents](#)

### SeedcalcStack9 [Jean-Louis Laffont \(FR\)](#), [Kirk Remund \(US\)](#), [Kevin Wright \(US\)](#)

SeedcalcStack9 contains an implementation of the maximum-likelihood method for the estimation of the proportion of GM seeds with up to three stacked events in a conventional seed lot. SeedcalcStack9 was created in Microsoft® Excel, R and the package RExcel. See the document "SeedcalcStack9 installation.doc" for guidelines on how to install all the components of SeedcalcStack9.

Please report any application issues or suggestions for improvements to [Jean-Louis Laffont](#), [Kirk Remund](#) or [Kevin Wright](#) via email.

 [Download SeedcalcStack9 V0.1 \(2245 KB\)](#)

**Seedcalc8** [Kirk Remund \(US\)](#), [Robert Simpson \(US\)](#), [Jean-Louis Laffont \(FR\)](#), [Deanne Wright \(US\)](#), [Sylvain Gregoire \(FR\)](#)

Seedcalc8 is a Microsoft Excel® application that is written for Windows 2000 and XP. It can be used to design seed testing plans for purity/impurity characteristics including testing for adventitious presence levels of biotech traits in conventional seed lots. This application can also be used to estimate purity/impurity in a lot or sample when results are available. All of the capabilities of previous versions of Seedcalc (i.e., Seedcalc3, Seedcalc5 and Seedcalc7) are still available in Seedcalc8. They are described in two articles published in Seed Science Research from the June 2001 issue of Seed Science Research entitled "Testing for transgenic traits" (June 2001 issue) and "Testing for adventitious presence levels in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods" (September 2005 issue). Seedcalc8 is also capable of designing testing plans using a Bayesian approach. This new capability was introduced in 2007 under the title "A Bayesian approach for adventitious presence levels in conventional seed lots".

For that are necessary for the full implementation of the application, the computer is set at the "high" level, the macros will automatically be enabled so that the user can realize the full benefit of this

As such, Seedcalc3, Seedcalc5 and Seedcalc7 are also available but may not have as many features as Seedcalc8, they may run better

under older MS Windows versions such as Windows 95.

By using both Seedcalc and Qualstat applications, testing plans can be designed for the majority of seed testing situations.

Please report any application issues or suggestions for improvements to [Kirk Remund](#), [Jean-Louis Laffont](#) or [Sylvain Gregoire](#) via e-mail.

 [Download Seedcalc8 \(2839 KB\)](#)

 [Download Seedcalc7 \(1240 KB\)](#)

 [Download Seedcalc5 \(221 KB\)](#)

 [Download Seedcalc3 \(26 KB\)](#)



# Seedcalc

**SAMPLING TYPE**

SINGLE  
 DOUBLE

Find Plan Analyze

# Seeds per Pool 221

1 Stage

# of Pools (N1) 11  
= 2431 seeds

Accept Lot if # deviants does not exceed 7 C1

% impurity 1,00% LQL 1,00% AQL 0,25%

Consumer (beta) Risk 2,44% Producer (alpha) Risk 4,28%

Confidence Level (%) 97,56% 95,72%

Target Consumer Confidence Level 95,00%

Target Producer Confidence Level 95,00%

Max # Seeds Tested 100 000

Expected Testing Costs

1st Stage Fixed costs \$1,00

1st Stage per assay costs \$1,00

Expected Cost @ AQL \$12,00

Probability of Accepting Lot (%)

Actual % Impurity in Lot

Legend: Retest (blue dashed line), Acceptance (red solid line)

Transfer

Next Plan # 3  
Plan Name Qual Test Plan 3

Clear All Plans

# Seedcalc

# Seeds per Pool (m)

# Flour Sub-samples

# Measurements per Sample

# Pools

Measurement CV (%)   
Flour Std. Dev.

Confidence Level (%)

b-Factor

Total Seeds Tested

**Variation Components**

Component	% of Total Variation
Sampling	58,4%
Flour	40,1%
Measurement	1,5%

**Flour Sub-sample #**

	#1	#2
Measurement #	0,2500%	0,1700%
	0,3100%	0,1500%
	0,3400%	0,1400%
	0,3000%	0,1533%

**Estimated % Impurity**

**Upper Bound of True Lot % Impurity**   
*(95% confident that the lot impurity is below 0,41%.)*

**2-sided CI for True Lot % Impurity**  to

**Upper Bound of True Sample % Impurity**   
*(without sampling variability)*  
*(95% confident that the sample impurity is below 0,35%.)*

**2-sided CI for True Sample % Impurity**  to   
*(without sampling variability)*

Display confidence intervals without sample variability



# Seedcalc

---

## Testing Plan Design when No Deviant Seeds are Acceptable

Calculate Sample Size (N) given P and b			
N	# Seed in Sample		29
P	Confidence Level	95	
b	Upper Limit on Impurity	10	
g	Lower Limit on Purity		90

Calculate Confidence Level (P) given N and b			
N	# Seed in Sample	3000	
P	Confidence Level		95,0
b	Upper Limit on Impurity	0,1	
g	Lower Limit on Purity		99,9

Calculate Upper limit (b) given N and P			
N	# Seed in Sample	600	
P	Confidence Level	95	
b	Upper Limit on Impurity		0,50
g	Lower Limit on Purity		99,50

This worksheet allows the user to change the values in the two yellow cells in any of the three green tables and then Seedcalc calculates the third value for a zero deviant test plan. For example, if the Confidence Level (P) and Upper Bound on Impurity (b) are entered in the yellow cells for the top left table then Seedcalc will calculate the number of seeds required (i.e., sample size) to achieve upper bound at the desired confidence level if zero seeds are deviant.



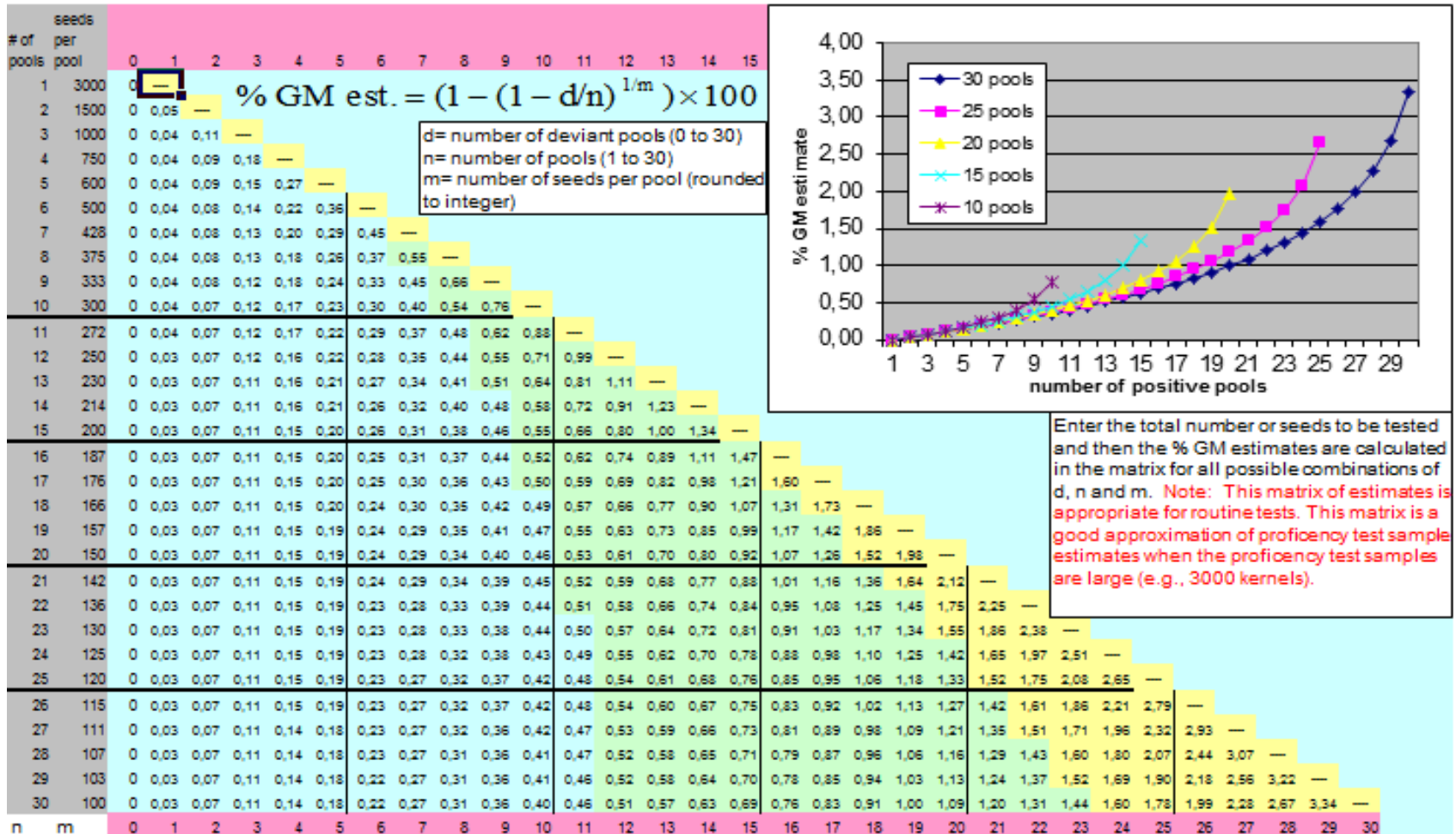


# Seedcalc

# seeds tested  
3000

## % GM Estimates Matrix

[A useful tool to help practitioners choose pool sizes that give the desired % GM





---

Dziękuję za uwagę

---

