



Ampliamento ed evoluzione della filiera analitica relativa agli OGM. Messa a punto e validazione di prove in fast PCR real-time per la rilevazione e quantificazione di organismi transgenici non ancora, o recentemente, approvati in Europa - Expansion and evolution of analytics chain relating to GMOs: Development and validation of "fast real-time PCR" tests, for the detection and quantification of not yet approved (or that have been recently approved) transgenic organisms, in Europe.

Curcio L., Pierboni E., Tovo G., Rondini C.

Abstract. The objective of testing and inspection laboratories on Genetically Modified organisms, is expanding the analytical chain, to be able to identify and quantify the largest number of events, in the shortest time. This should be done using validated and accredited methods. This paper highlights the Real-time PCR in Fast mode, as a valuable analytical tool. The method allows a saving of time, compared to the standard mode, reducing costs as well as response times. Another strength is the reliability, as required for testing used for identification and quantification of GMOs.

Riassunto. L'obiettivo dei laboratori che si interessano di analisi e controllo sugli Organismi GM, è ampliare la filiera analitica, per essere in grado di identificare e quantificare il maggior numero di eventi nel minor tempo possibile. Ciò deve essere fatto, utilizzando metodiche validate e accreditate. Il presente studio mette in rilievo come la PCR Real-time in modalità Fast, risulta un valido strumento analitico. Il metodo consente un significativo risparmio di tempo, rispetto alle modalità standard, una riduzione dei costi e dei tempi di risposta. Altro punto di forza è l'affidabilità, come richiesto per le prove per identificazione e quantificazione degli OGM.

Introduzione

Il continuo incremento di OGM autorizzati a livello mondiale, porta a contarne attualmente più di 300, tra eventi singoli e stacked (nuovi prodotti con più di un evento di trasformazione), interessando 28 specie vegetali (ISAABA, 2014).

In Europa, dove sono previste procedure di autorizzazione particolari, sono approvati per la commercializzazione più di 40 eventi GM, relativi a 6 specie vegetali (EU Register, 2014). Gli scambi commerciali aumentano il rischio di contaminazione da parte di prodotti biotecnologici non autorizzati nell'Unione Europea, aumentando quindi la presenza di UGM, organismi geneticamente modificati non autorizzati (Unauthorised GMOs).

Rilevare la presenza di OGM autorizzati e non nell'ambiente, come pure nella catena alimentare è quindi un'esigenza che trova riscontro in un rigoroso sistema di controllo che in Italia è svolto dal NILO (Network Italiano Laboratori OGM), di cui fa parte anche il Laboratorio OGM dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

L'obiettivo del Laboratorio è ampliare la filiera analitica, per essere in grado di identificare e quantificare il maggior numero di eventi nel minor tempo possibile con metodiche validate e accreditate. Lo scopo è raggiunto tramite metodiche di PCR Real-time in modalità Fast, apportando innovazione tecnologica e riduzione dei costi.

Nell'ambito del progetto di ricerca IZSUM n°13/10, finanziato dal Ministero della Salute (MINSAL IZSUM 2010) è stato possibile mettere a punto e validare la tipizzazione e quantificazione di 5 eventi GM autorizzati in Europa, il mais T25, MIR604 e DAS59122 e la soia A2704-12 e MON89788 in Fast PCR Real-time.

Inoltre è stata applicata con successo, un'innovativa strategia utile all'individuazione di OGM e UGM, definita "approccio matrice", ovvero uno screening combinato di diversi elementi genetici (multi-screening), comuni nei costrutti di molti OGM, per 6 elementi genetici di screening in Fast PCR Real-time (Promotore 35S, Terminatore NOS, gene CP4-EPSPS, costruito CTP2-CP4EPSPS, gene NPTII, gene PAT).

Materiali e metodi

Le caratteristiche della metodologia di laboratorio seguita, sono state così sintetizzate e riportate nell'elenco di seguito.

Materiali di riferimento certificati (MRC): farine di soia contenenti diverse percentuali di soia GM MON40-3-2 (ERM) e MON89788 (AOCS), DNA di soia GM A2704-12 (AOCS); farine di mais contenenti varie percentuali di MON810, Bt11, Bt176, GA21, MON863, DAS1507, NK603, MIR604, DAS59122 (ERM) e DNA di mais GM T25 (AOCS).

Estrazione del DNA: il DNA è stato estratto da mais e soia mediante metodica CTAB (ISO 21571:2005, Annex A.3), risospeso in 200 µL di acqua demineralizzata sterile è stato purificato tramite QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) secondo il manuale del produttore, tranne per la fase di eluizione finale avvenuta in 150 µL di Buffer AE.

Quantificazione del DNA: il DNA estratto è stato quantificato al fotometro (Eppendorf). (ISO 21571:2005, Annex B.1).

Amplificabilità e assenza inibitori: l'amplificabilità è stata testata mediante rilevazione in Fast PCR Real-time del target pianta specifico lectina (LE) per soia (ISO 21570:2006 Annex B.1), alcool deidrogenasi 1 (ADH1) per mais (ISO 21570:2006 Annex A.1). La verifica per l'assenza di inibitori si è ottenuta testando il DNA estratto e il suo diluito 1:4.

Fast PCR Real-time: tutte le prove, tranne quelle per verificare la robustezza, sono state eseguite su piattaforma 7900HT Fast Real-time PCR Systems (Life Technologies). Le prove di robustezza sono state condotte su piattaforma StepOne Plus Real-time PCR System (Life Technologies). Profilo termico per il metodo multi-screening: 95°C 30" x 1 ciclo [95°C 5", 60°C 20"] x 50 cicli; per i restanti metodi qualitativi e quantitativi si è impostato il profilo termico: 95°C 20" x 1 ciclo [95°C 1", 60°C 20"] x 40 cicli. La PCR è condotta in un volume finale di 20 µL con utilizzo di Fast PCR Master Mix (Life Technologies) alla concentrazione finale di 1X.

Ottimizzazione dei primer e delle probe: sono state testate 3 concentrazioni di primer forward e reverse combinate tra loro per un totale di 9 combinazioni ognuna verificata in quadruplica copia. Sono state testate 5 concentrazioni di sonda (100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM) testate in quadruplica copia. Validazione metodi qualitativi: è stato verificato il limite di rilevazione (LOD), per cui sono state allestite 8 diluizioni a numero di copie genomiche decrescenti.

Per ciascuna diluizione sono stati saggiati 10 replicati e l'esperimento è stato ripetuto due volte per un totale di 20 dati sperimentali. La verifica della sensibilità e specificità è stata eseguita testando almeno 10 MRC contenenti il DNA target e 10 non contenenti il DNA target. La verifica di robustezza è avvenuta ripetendo gli esperimenti di sensibilità e specificità su altra piattaforma strumentale.

Validazione metodi quantitativi: è avvenuta mediante la valutazione dei parametri di esattezza, precisione, robustezza, efficienza di amplificazione e linearità, allestendo quattro PCR quantitative (qPCR) 2 per operatore, la qPCR 2 caratterizzata da una variazione di volume, la qPCR 4 da una variazione strumentale.

In ogni qPCR sono stati testati in triplicato 5 DNA contenenti il target da quantificare allo 0.1% e 5 DNA all'1%. E' stato ricavato anche il limite di quantificazione (LOQ) con la stessa metodologia usata per la determinazione del LOD.

Risultati

Dall'estrazione sono ottenuti DNA amplificabili e privi di inibitori con un ΔCt compreso tra 1.5 e 2.5. Prima di passare alla validazione dei singoli metodi è utile ottimizzare il sistema, ovvero verificare a quale concentrazione di primer e sonda il metodo risulta più efficiente. Si è proceduto testando DNA con target presente all'1%, vicino ai limiti di legge, dove non disponibile come tale è stato ottenuto tramite opportuna diluizione.

Per ogni esperimento è stato inserito un controllo negativo di amplificazione (CA), costituito da acqua demineralizzata sterile al posto di DNA. Dopo individuazione della migliore combinazione di concentrazioni di primer si è passati a verificare la concentrazione della sonda. La scelta della combinazione di concentrazioni dei primer e della concentrazione di sonda, partendo da una quantità uguale di DNA target, è ricaduta su quella che presentava il Ct più basso, indice di migliore efficienza e scarto tipo più basso, indici di maggiore ripetibilità. Per la scelta della concentrazione della sonda si è considerato anche il fattore economico. I risultati sono mostrati nella tabella 1 e 2.

Tabella 1. Concentrazioni di primer e probe per la rilevazione di elementi genetici di screening, dopo ottimizzazione e riferimento per la sequenza dei primer e delle probe				
Fast Multi-screening	Primer-F	Primer-R	Sonda (probe)	Riferimento
P35S	150 nM	900 nM	250 nM	1
TNOS	900 nM	900 nM	200 nM	2
CP4-EPSPS	900 nM	300 nM	200 nM	3
CTP2-CP4EPSPS	300 nM	150 nM	200 nM	4
PAT	300 nM	300 nM	200 nM	5
NPTII	150 nM	900 nM	200 nM	6
1= UNI EN ISO 21570:2006 (Annex B.1). 2= Pierboni et al., 2013. 3= Vaitilingom et al., 1999. 4= JRC Reference Reports (2011). 5= Weighardt et al. 2004. 6= Cheng et al., 2008.				

Table 1. Concentrations of primers and probe for the detection of genetic elements of screening, after optimization and as a reference for the sequence of the primers and probes

Fast Tipizzazione/ Fast Quantificazione	Primer-F	Primer-R	Sonda (probe)	Riferimento* pagg.
T25	400 nM	900 nM	200 nM	72-74
MIR604	600 nM	300 nM	150 nM	48-50
DAS59122	600 nM	600 nM	200 nM	33-35
A2704-12	900 nM	900 nM	200 nM	81-83
MON89788	900 nM	900 nM	250 nM	105-107

*= JRC Reference Reports (2011).

Table 2. Concentrations of primers and probe for the typing of specific GM events, after optimization and reference for the sequence of the primers and probes

Ottenute le condizioni del sistema si è proceduto alla validazione delle prove qualitative. Per ogni metodo testato si è ottenuto il 100% di sensibilità e specificità. La robustezza, utile parametro per verificare la capacità di un metodo a non essere influenzato da piccole ma deliberate variazioni, è stata eseguita allestendo la stessa prova della sensibilità e specificità su diversa piattaforma strumentale e ha riportato il 100% di concordanza dei risultati con il relativo esperimento di sensibilità e specificità. Il LOD è stato considerato corrispondente alla più bassa diluizione (in numero di copie genomiche) alla quale si aveva il 100% di amplificazione, i risultati per singolo metodo sono mostrati nella tabella 3 (European Network of GMO Laboratories [13/10/2008]).

Fast Monitor Run			Fast MULTI-screening						FAST qualitativa e quantitativa			
ENDOGENI	LOD C.G.	LOQ C.G.	P35S LOD 10 C.G.	T-NOS LOD 10 C.G.	NPTII LOD 10 C.G.	PAT LOD 10 C.G.	CP4- EPSPS LOD 10 C.G.	CTP2- CP4EPSPS LOD 10 C.G.	EVENTI OGM	LOD C.G.	LOQ C.G.	
MAIS: ADHI	10	20	+	-	-	-	-	-	MON810	10	20	
			+	+	-	+	-	-	Bt11	10	20	
			+	-	-	-	-	-	-	Bt176	5	10
			-	+	-	-	-	-	-	GA21	10	20
			+	-	-	+	-	-	-	DAS1507	10	20
			+	+	-	-	-	+	+	NK603	10	20
			+	+	+	-	-	-	-	MON863	10	20
			+	-	-	+	-	-	-	T25	5	20
			-	+	-	-	-	-	-	MIR604	10	20
+	-	-	+	-	-	-	DAS59122	10	20			
SOIA: LE	10	20	+	+	-	-	+	-	MON40-3-2	10	20	
			+	-	-	+	-	-	A2704-12	5	10	
			-	-	-	-	+	+	MON89788	5	20	

Table 3. In blue are shown genetic elements in the analytic chain at the GMO Laboratory IZS UM Perugia, Italy

I metodi per il mais GM T25, DAS59122, MIR604 e per la soia GM A2704-12 e MON89788 sono stati validati anche in Fast PCR quantitativa, con il corrispondente gene taxon-specifico (gene endogeno) LE per soia e ADH1 per mais (European Network of GMO Laboratories [22/07/2011]). La linearità delle reazioni dei sistemi transgenico ed endogeno è stata valutata calcolando il valore medio degli indici R^2 delle rette di regressione. Criterio di accettabilità per la linearità (range dinamico) è espresso dall' R^2 che deve essere ≥ 0.98 . L'efficienza di amplificazione è stata misurata per ciascun sistema di amplificazione sfruttando la seguente relazione funzionale: $E(\%) = [(10^{-1/\text{slope}}) - 1] \times 100$. Il criterio di accettabilità per l'efficienza di reazione (o amplificazione), prevede un valore medio dello slope (pendenza) della curva di calibrazione compreso nel range $-3.6 \leq \text{slope} \leq -3.1$, corrispondente ad un'efficienza di amplificazione tra il 90 e 110%. L'esattezza prevede uno scostamento del $\pm 25\%$ dal valore di riferimento accettato: $\text{BIAS} \leq 25\%$ per tutto l'intervallo di quantificazione.

La precisione in condizioni intermedie di ripetibilità, è pari a un $\text{RSDr}\% \leq 35\%$.

Dai dati delle qPCR 1, 2, 3 si sono ricavate l'esattezza e la precisione, delle qPCR 1, 3, 4 si sono ricavate l'efficienza di reazione e la linearità, e dai dati della qPCR 1 e 2 (parametro volume) e qPCR 3 e 4 (parametro strumento) è stata valutata la robustezza. I parametri valutati, per tutti e cinque i metodi quantitativi, soddisfano i criteri di accettabilità.

Il LOQ è stato ricavato dall'esperimento eseguito per il LOD ed è stato definito come il numero di copie corrispondente allo scarto tipo relativo di ripetibilità ($\text{RSDr} \leq 25\%$), i risultati sono riportati nella tabella 3 (European Network of GMO Laboratories [13/10/2008]).

Discussione e Conclusioni

I metodi qualitativi e quantitativi oggetto del progetto di ricerca si sono mostrati validi allo scopo, sono stati pertanto portati in estensione e accreditati. Il progetto ha permesso di integrare la filiera analitica del Laboratorio, con altri 5 eventi GM tutti in modalità Fast, ampliando le competenze tecniche e quindi migliorando le proprie performance in risposta alla continua domanda derivata da un incessante autorizzazione e introduzione di OGM nel nostro Paese.

L'adozione di PCR Real-time in modalità Fast, risulta un valido strumento di miglioramento, in quanto consente di svolgere le analisi in tempi molto più brevi rispetto alla modalità standard, consentendo una riduzione dei costi e dei tempi di risposta, con il rigore necessario all'esecuzione delle prove per identificazione e quantificare gli OGM.

Bibliografia

Cheng X. Y., Jun Z., Ka M. C., Xiao K. L., Yan H. (2008). Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*). Analytical Biochemistry, Volume 375, Issue 1, 1 April, Pages 150-152.

EU Register of authorised GMOs. [tested link: 20 May 2014].
http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm

European Network of GMO Laboratories [13/10/2008]. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing - (ENGL). [tested link: 20 May 2014] http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf

European Network of GMO Laboratories [22/07/2011]. Verification of analytical methods for GMO testing when complementing interlaboratory validated methods, ENGL 2011 (ISBN 978-92-79-19925-7). [tested link:

20 May 2014] <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20MV%20WG%20Report%20July%202011.pdf>

EUR24526EN. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL). [tested link: 20 May 2014]

http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_2010_11_gmo_analysis_compendium.pdf

European Network of GMO Laboratories [13/10/2008]. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing - European Network of GMO Laboratories (ENGL). [tested link: 20 May 2014] http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf

ISAABA - International Service for the Acquisition of Agri-Biotech applications [tested link: 20 May 2014] <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>

ISO 21571:2005, Annex A.3

ISO 21571:2005, Annex B.1)

ISO 21570:2006 Annex B.1

ISO 21570:2006 Annex A.1

UNI EN ISO 21570:2006 (Annex B.1)

JCR - Joint Research Centre JRC, Reference Reports - Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, 2011.

Pierboni E., Curcio L., Tovo R. G., Rondini C. (2013). Studio di un nuovo metodo T-NOS per lo screening di OGM e UGM in Fast PCR Real-time. Atti XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Monreale 2013, pagg. 34-35.

Vaïtilingom M., Pijnenburg H., Gendre F., Brignon P. (1999). Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in Some Representative Foods Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47 (12), pp 5261-5266.

Weighardt F., Barbati C., Paoletti C., Querci M., Kay S., De Beuckeleer M., Van Den Ede G. (2004). Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 *Zea mays* event. Journal of AOAC International, 87 (6): 1342-1355.



This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy	
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it	
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it	
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it	