

Metodi di analisi di OGM

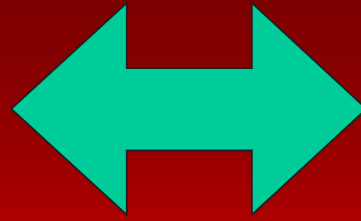
Roberta Onori

Istituto Superiore di Sanità

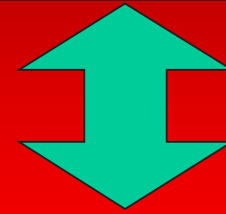
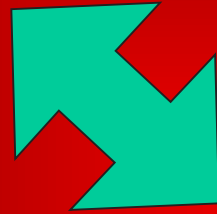
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per
i Rischi Alimentari



**Quadro
normativo**

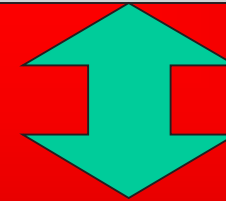


**Attività
Pre-marketing**



metodi di analisi

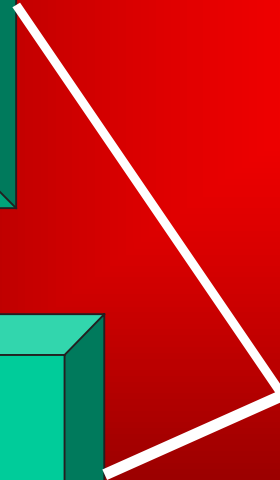
**Indagini
sulla
esposizione**



**Controllo
ufficiale**

**Attività
Post-
marketing**

Autocontrollo



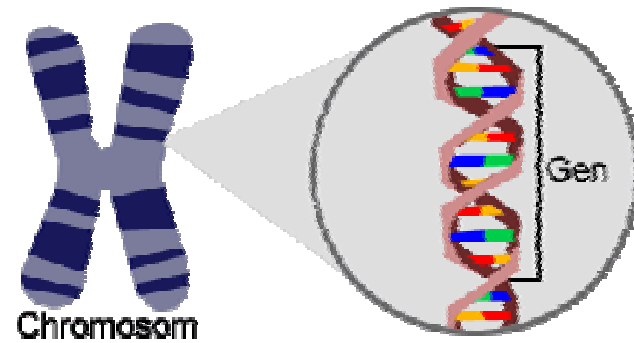
Metodi di analisi degli OGM

- Ditte produttrici
 - Per verificare le caratteristiche molecolari e la segregazione dell'OGM
 - Per monitorare la modificazione genetica nella produzione di ibridi
- Industrie alimentari, mangimistiche e sementiere
 - Per garantire la tracciabilità dei prodotti
 - Per garantire il rispetto delle normative vigenti
- Autorità Competenti
 - Per l'attuazione del controllo ufficiale da parte dei laboratori competenti
- Laboratori privati
 - Per fornire servizio analitico ai richiedenti



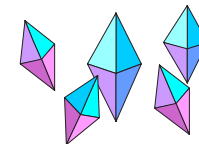
Elementi che permettono di individuare la presenza di OGM

Presenza del
“transgene”



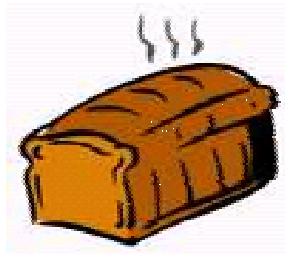
Presenza della
proteina espressione
del transgene
inserito

Bt toxin crystals



METODI ANALITICI

per la DIAGNOSTICA degli OGM



DNA



PCR

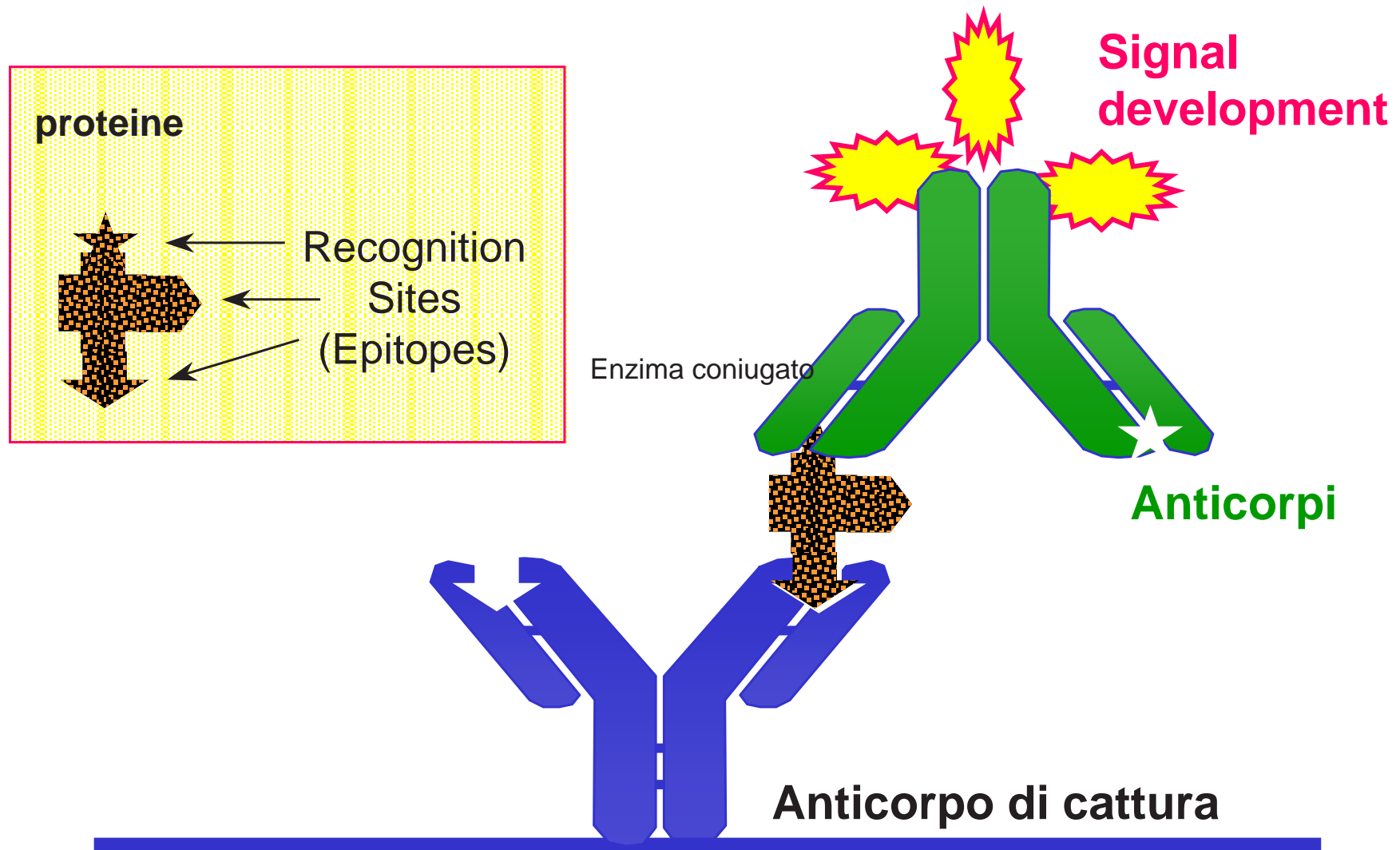


PROTEINE



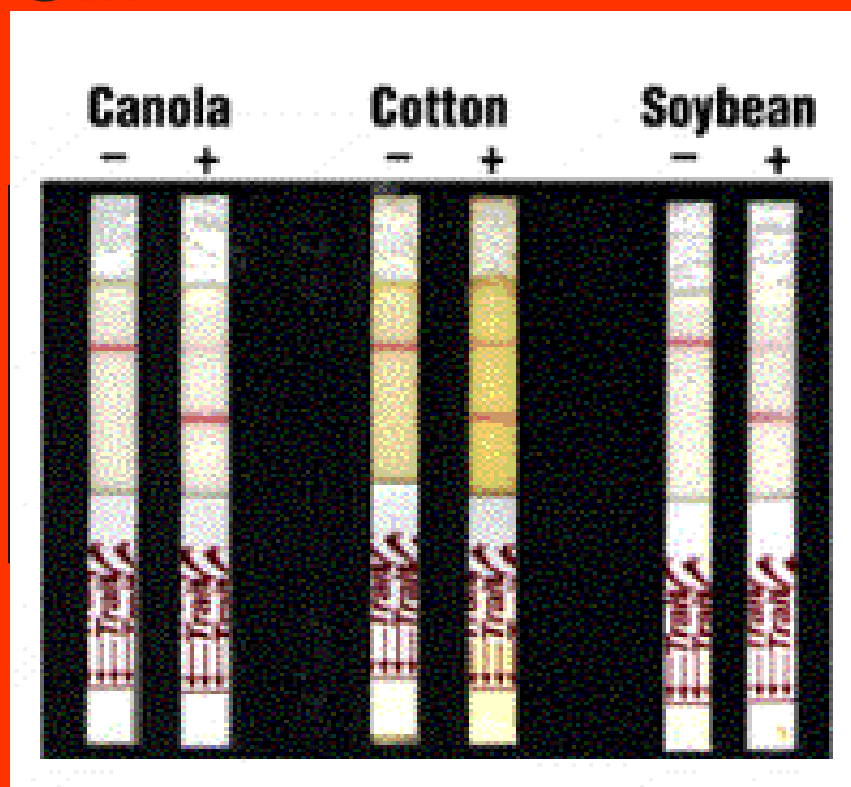
Tecniche
IMMUNOENZIMATICHE
(ELISA)

Metodi ELISA per la determinazione delle proteine



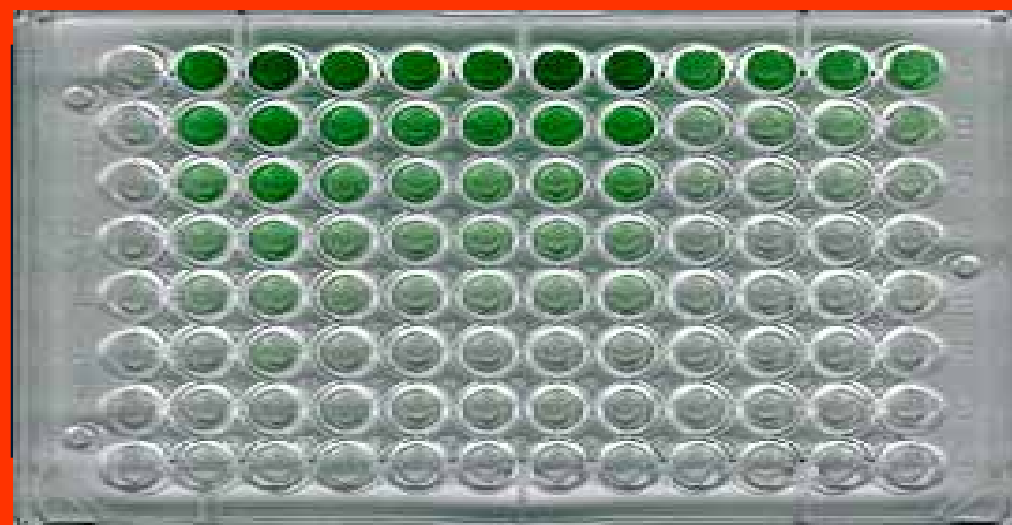


Applicazione di metodi immunologici agli OGM

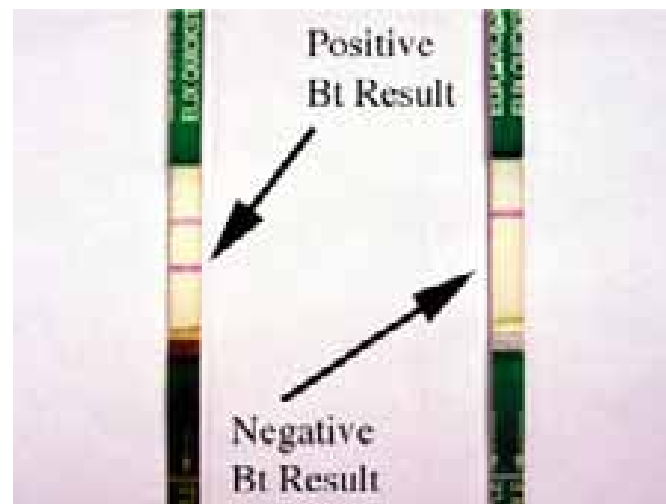
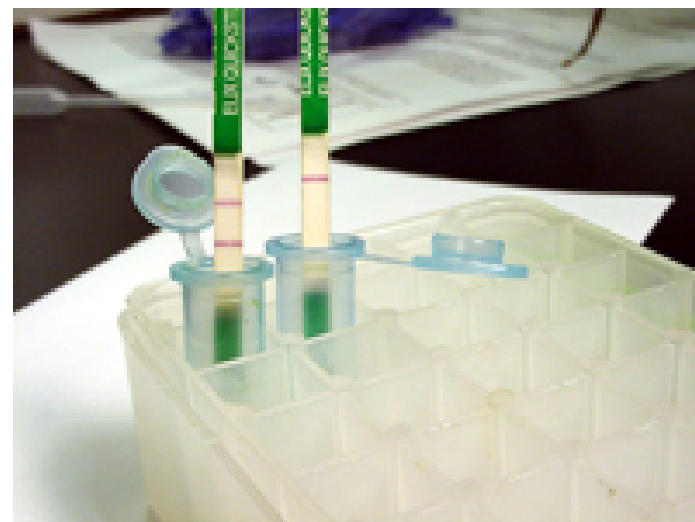
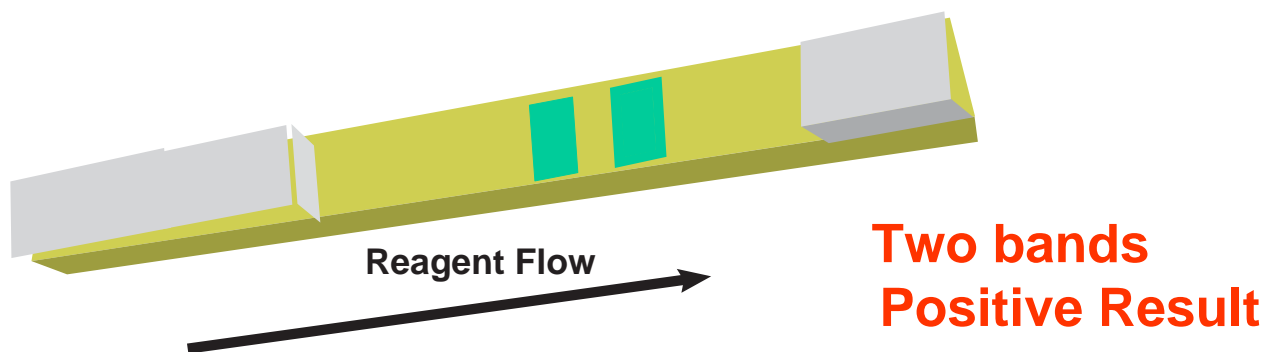
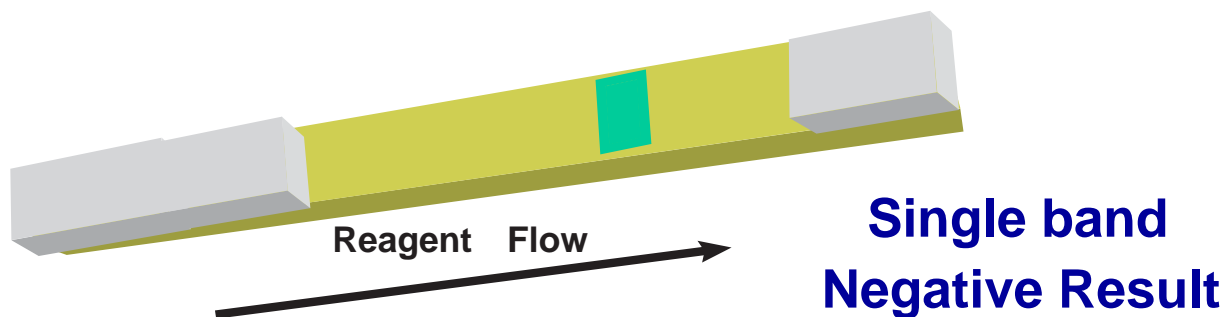
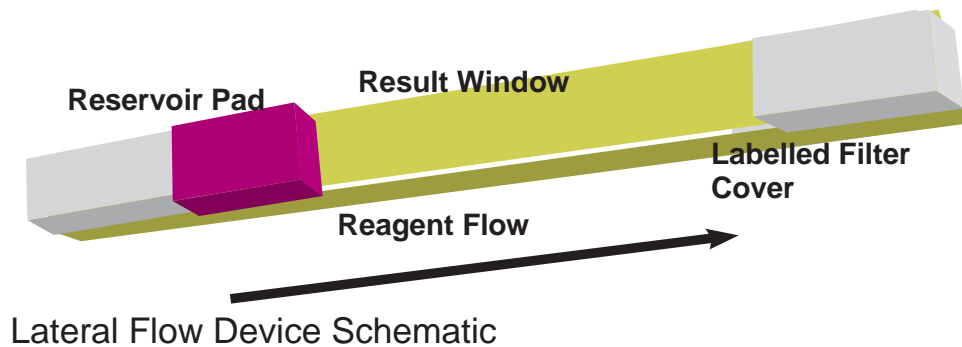


Ω Metodi rapidi qualitativi

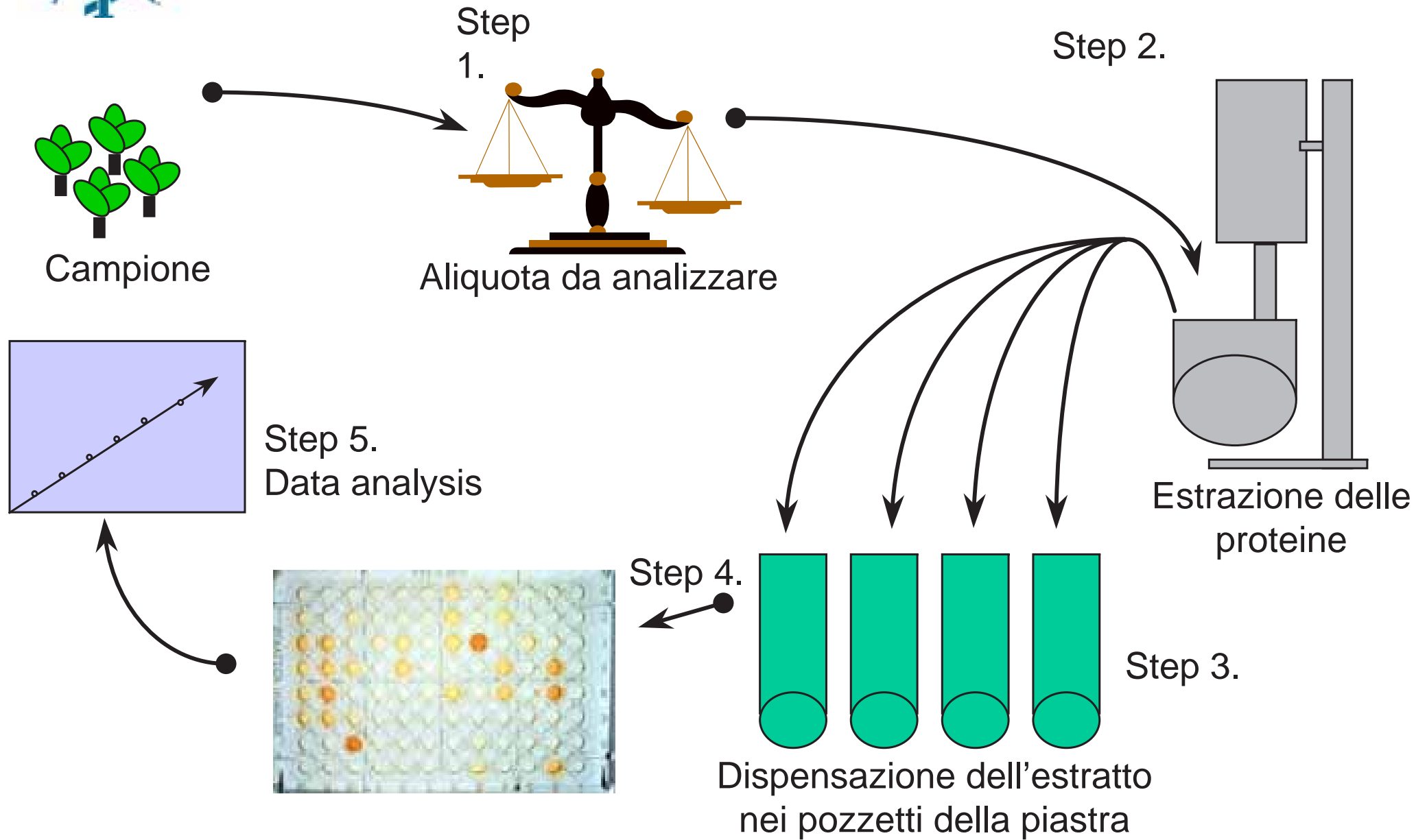
Ω Metodi quantitativi

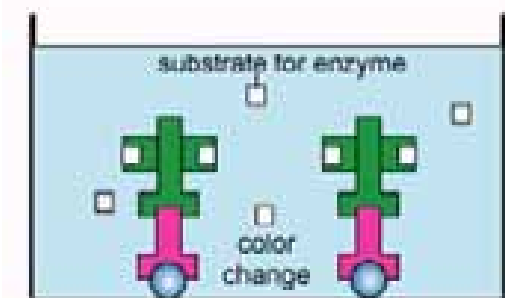
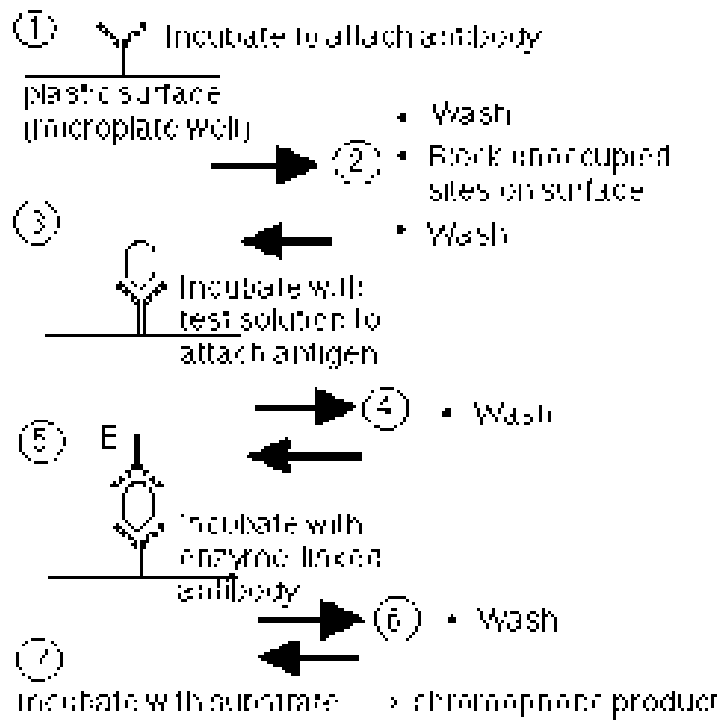
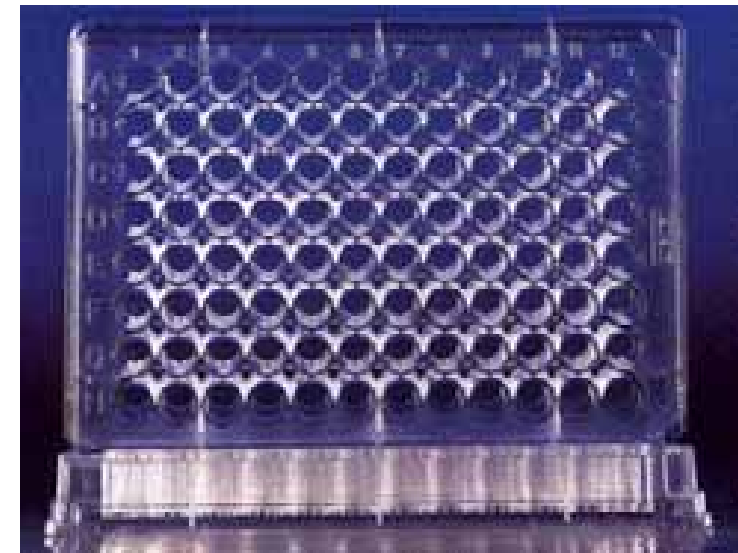
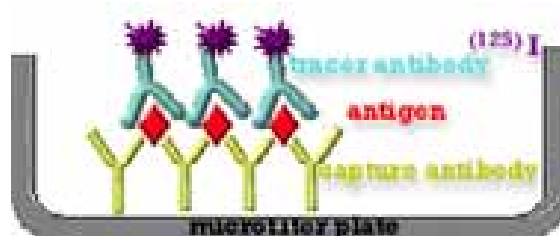


Metodi rapidi



Metodi quantitativi ELISA

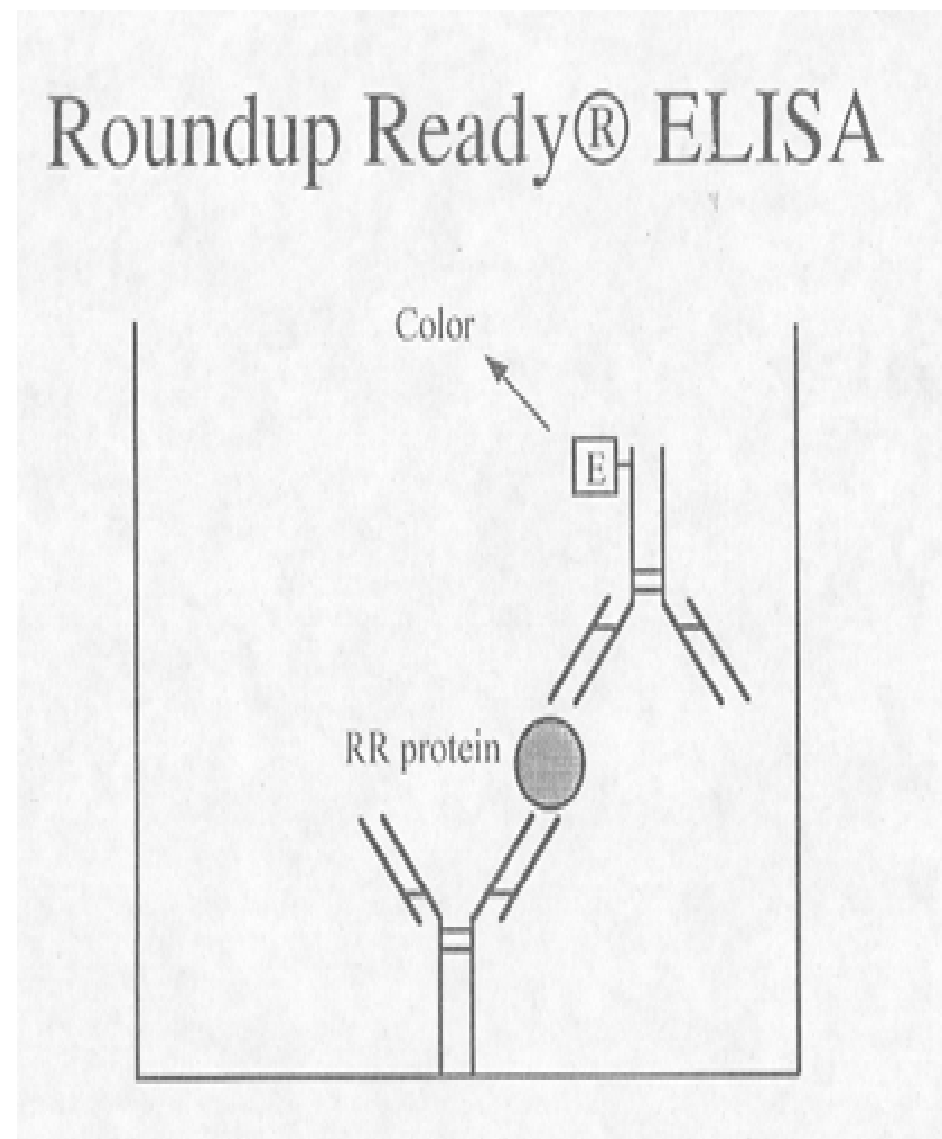
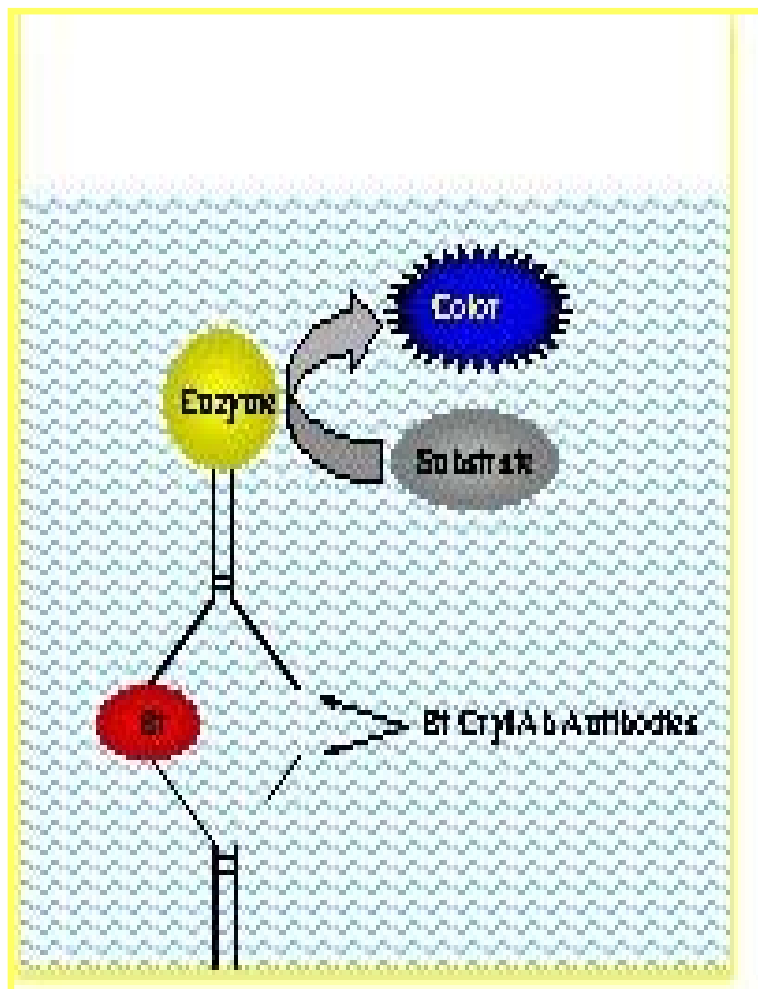




Kit commerciali per l'analisi di OGM



BT *Cry* 1A(b)





Metodi ELISA

SVANTAGGI

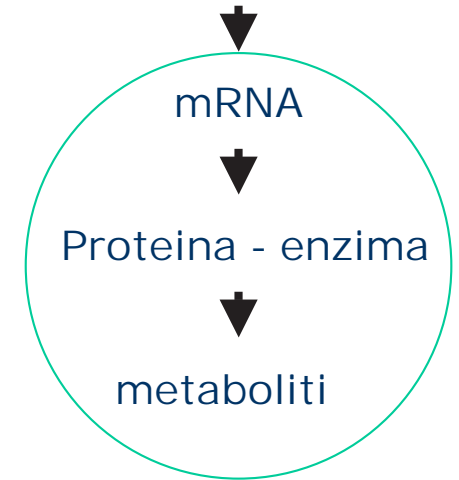
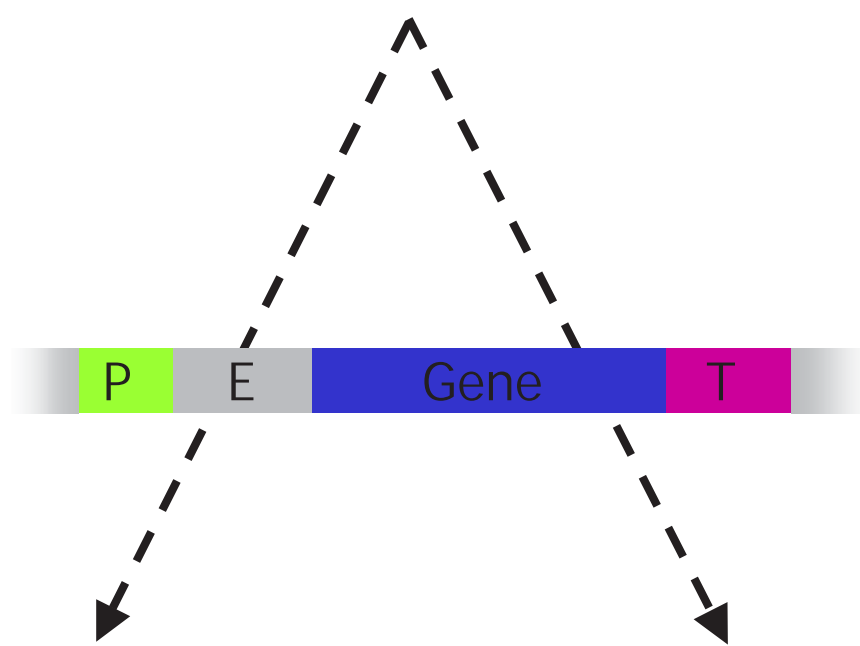
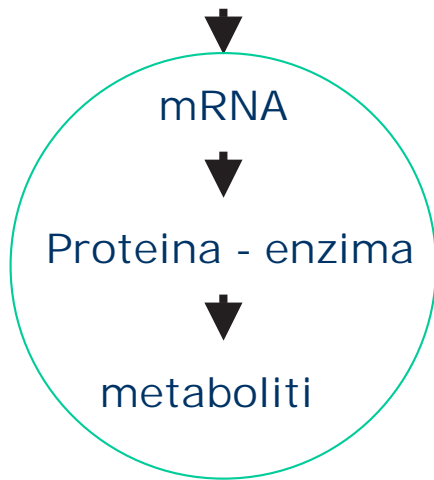
- Materie prime o prodotti non sottoposti a procedimenti tecnologici in grado di denaturare le proteine
- Impossibilità di discriminare OGM diversi che esprimono la stessa proteina
- Non esiste perfetta correlazione fra proteina espressa e % di materiale OGM

VANTAGGI

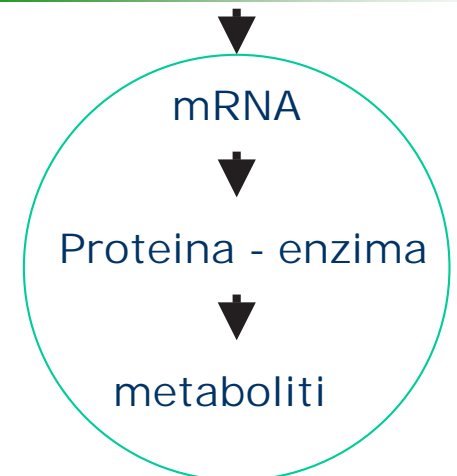
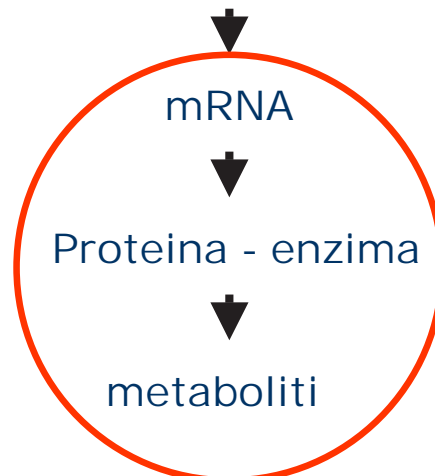
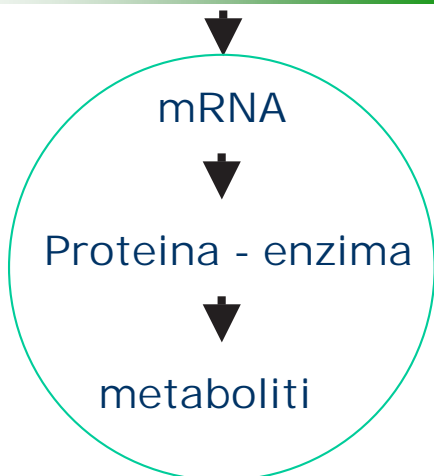
- Bassi costi rispetto PCR
- Velocità del saggio
- Semplicità delle operazioni (effettuabili anche su campo TEST STRIP)

Metodi basati sul DNA

WT



OGM



Fasi analitiche di un metodo diagnostico basato sulla PCR

Preparazione del campione

Estrazione del DNA

Valutazione quali-quantitativa del DNA

Preparazione dei reattivi della PCR

PCR

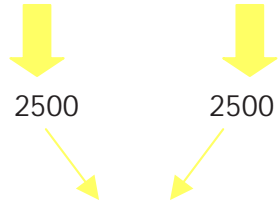
Amplificato



Preparazione Campione

Materie prime

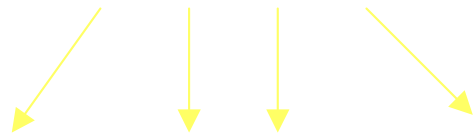
10.000 semi (CEN)



2500

2500

Omogeneizzazione/Macinazione



Aliquota 1 Aliquota 2 Aliquota 3 Aliquota 4



Conservare a -20 °C

"Laboratory Sample"

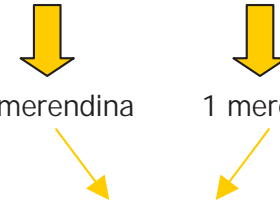
O
m
o
g
e
n
e
i
t
à



R
a
p
p
r
e
s
e
n
t
a
t
i
v
i
t
à

Alimenti processati

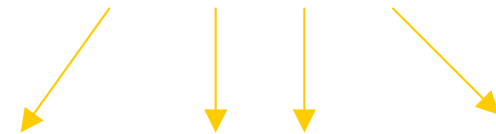
2 pacchetti



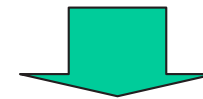
1 merendina

1 merendina

Omogeneizzazione/Macinazione



Aliquota 1 Aliquota 2 Aliquota 3 Aliquota 4



Conservare a -20 °C

200-300 mg

1-2 g

"Test Portion"

Estrazione DNA



Estrazione del DNA

 (ambiente dedicato)



Strumentazione

- ❖ Bagno termostato
- ❖ Vortex mixer
- ❖ Centrifuga



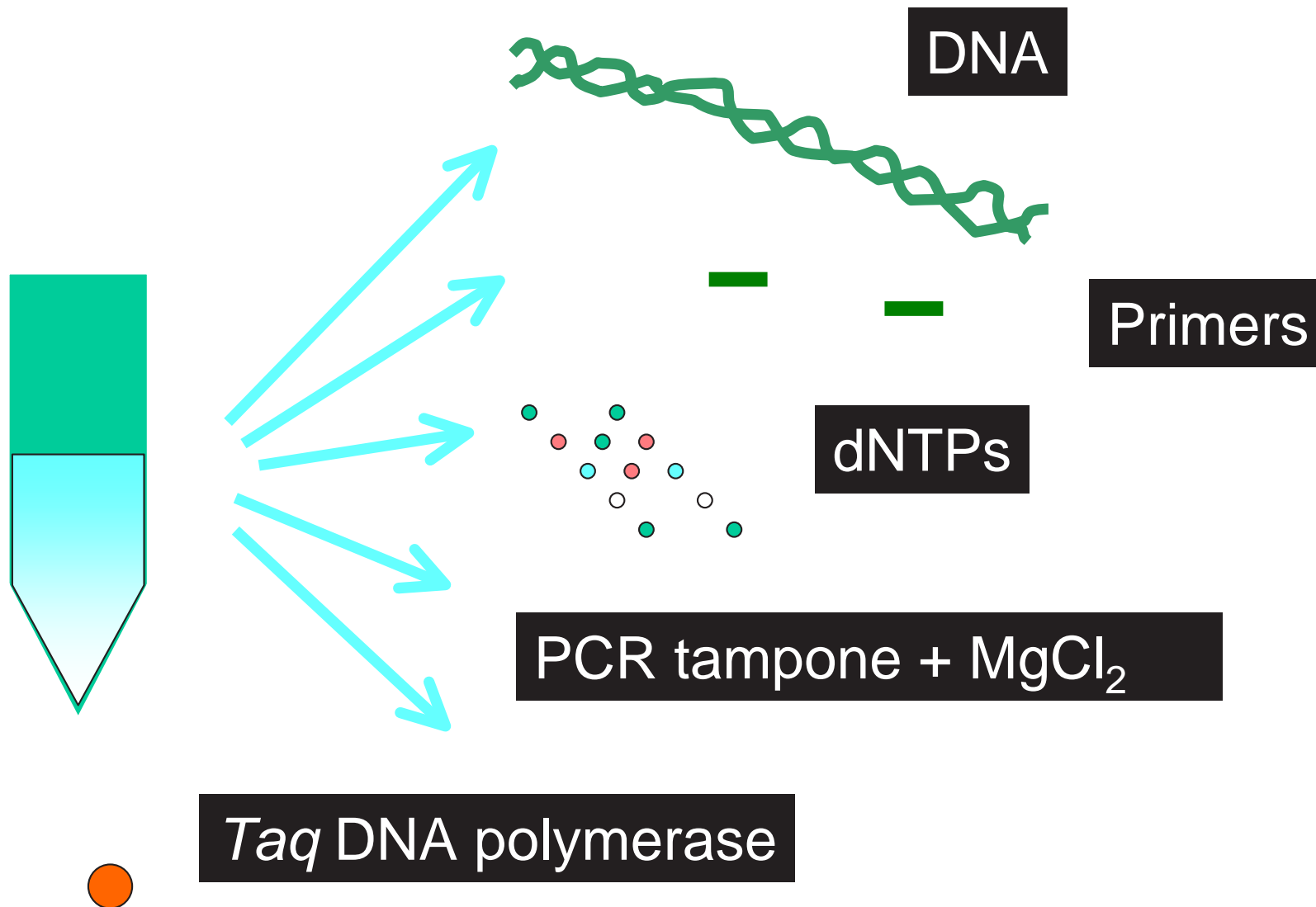
Reagenti e materiali monouso

- ❖ Provette tipo eppendorf da 2 e 1,5 ml
- ❖ Rack
- ❖ Reattivi per l'estrazione (prodotti per biologia molecolare)
- ❖ Kit di purificazione
- ❖ Acqua sterile
- ❖ Puntali sterili con filtro
- ❖ Pipette automatiche dedicate





La PCR Reazione a Catena della Polimerasi



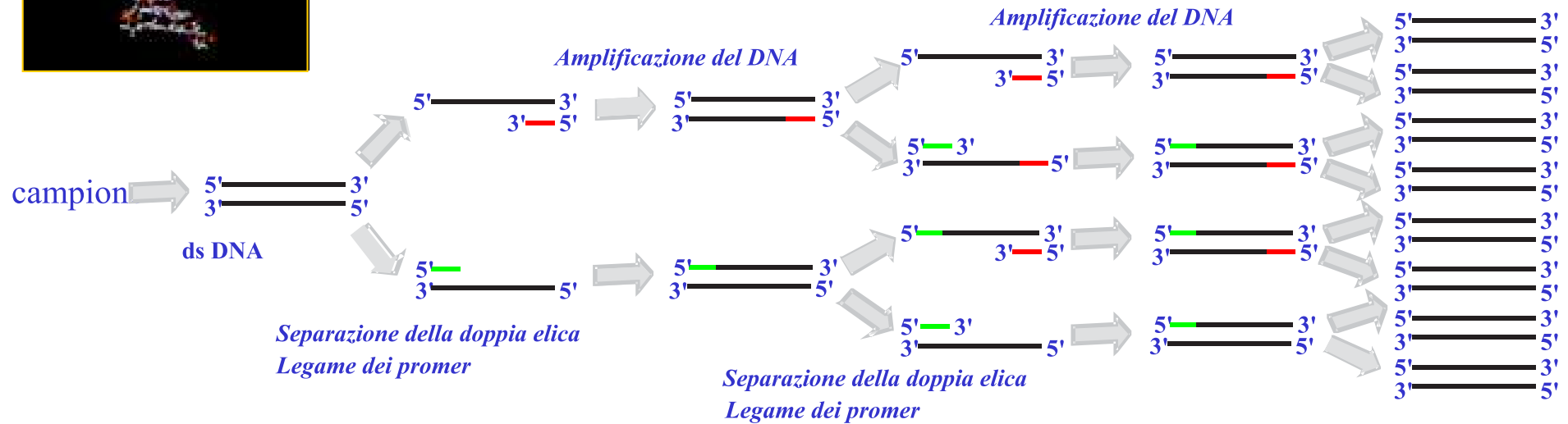
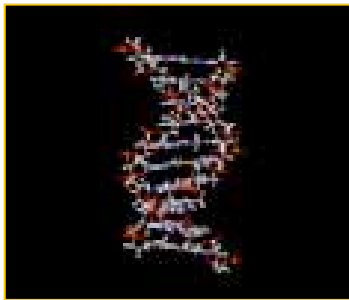
Steps in a PCR Cycle

- **Denaturation (90-95 ° C)**
- **Primer Annealing (40-70 ° C)**
- **Extension (72 ° C)**

La PCR Reazione a Catena della Polimerasi



1021	cottaacott	ggtactggtg	ctactgaca	gcaaggcaaa	ctcagoggaa	actgtttett
1001	tcagctggaa	caagttogt	ggggggaac	caaacatgat	ctccaagga	gacgotattg
1141	tgacotctct	gggaaagtt	GMO3 caactcaata	aggttgacga	aaacggcacc	ccaaaacct
1201	ogtctcttgg	togcgcctc	tactcaacc	ccatccacat	ttgggacaaa	gaaacgggta
1261	gogttgocag	cttcgcogct	tccttcaact	tcacctctta	tgccctgac	acaaaaaggc
1321	ttcaagatcg	acttgcotte	ttctctgac	caattgacac	taagccacaa	acacatgcag
1381	gttatcttgg	tcttttcaac	gaaaacagct	ctggtgatca	agtgctogct	GMO4 gaaacttgg
1441	acccttctcg	gaaotcttgg	gatccacaaa	ctccacacat	oggaattaac	gtcaattota
1501	tcagatccat	caaacgcagc	tcttgggatt	tgcccaacaa	taaagtagcc	aaggttctca



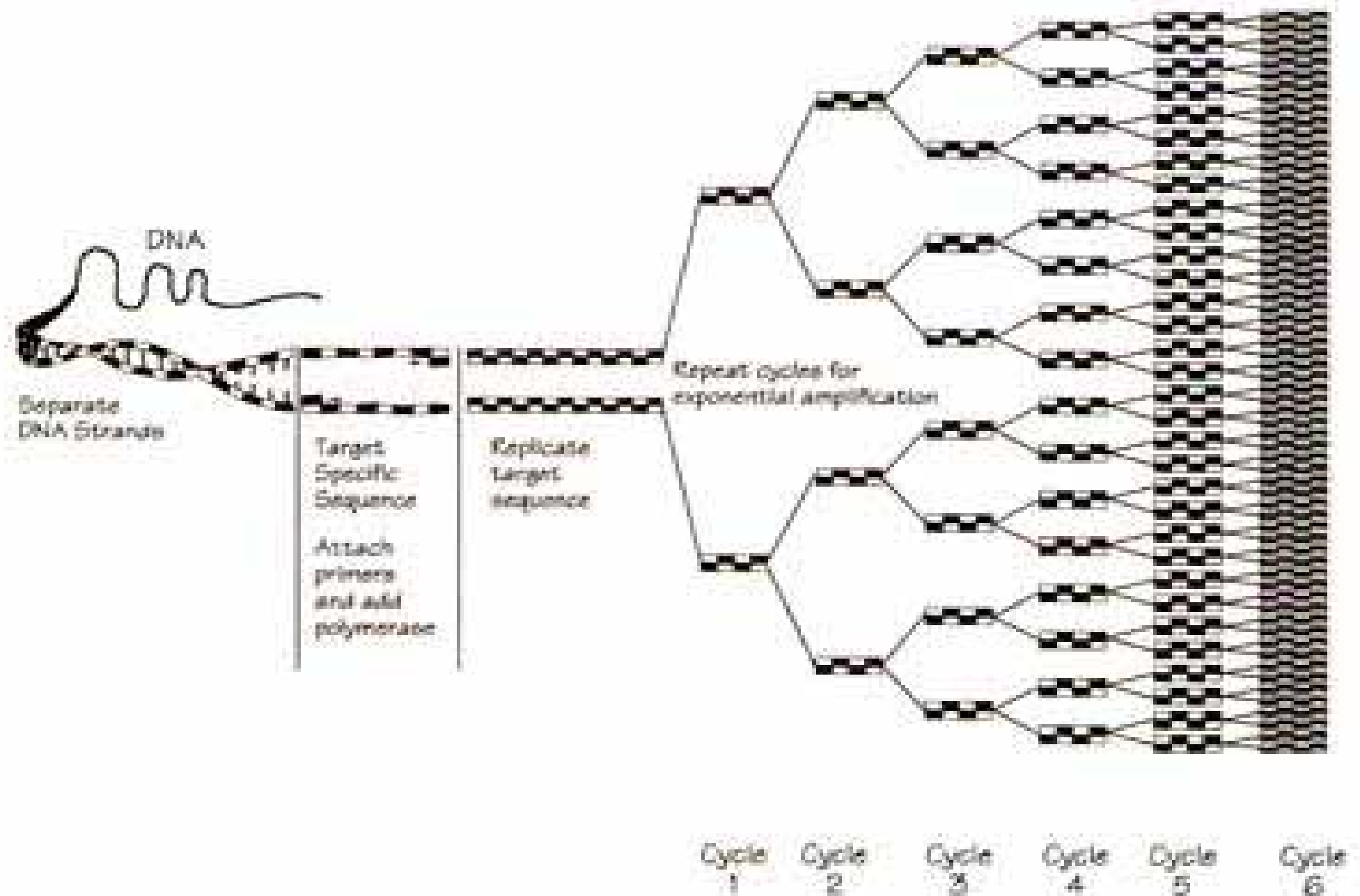


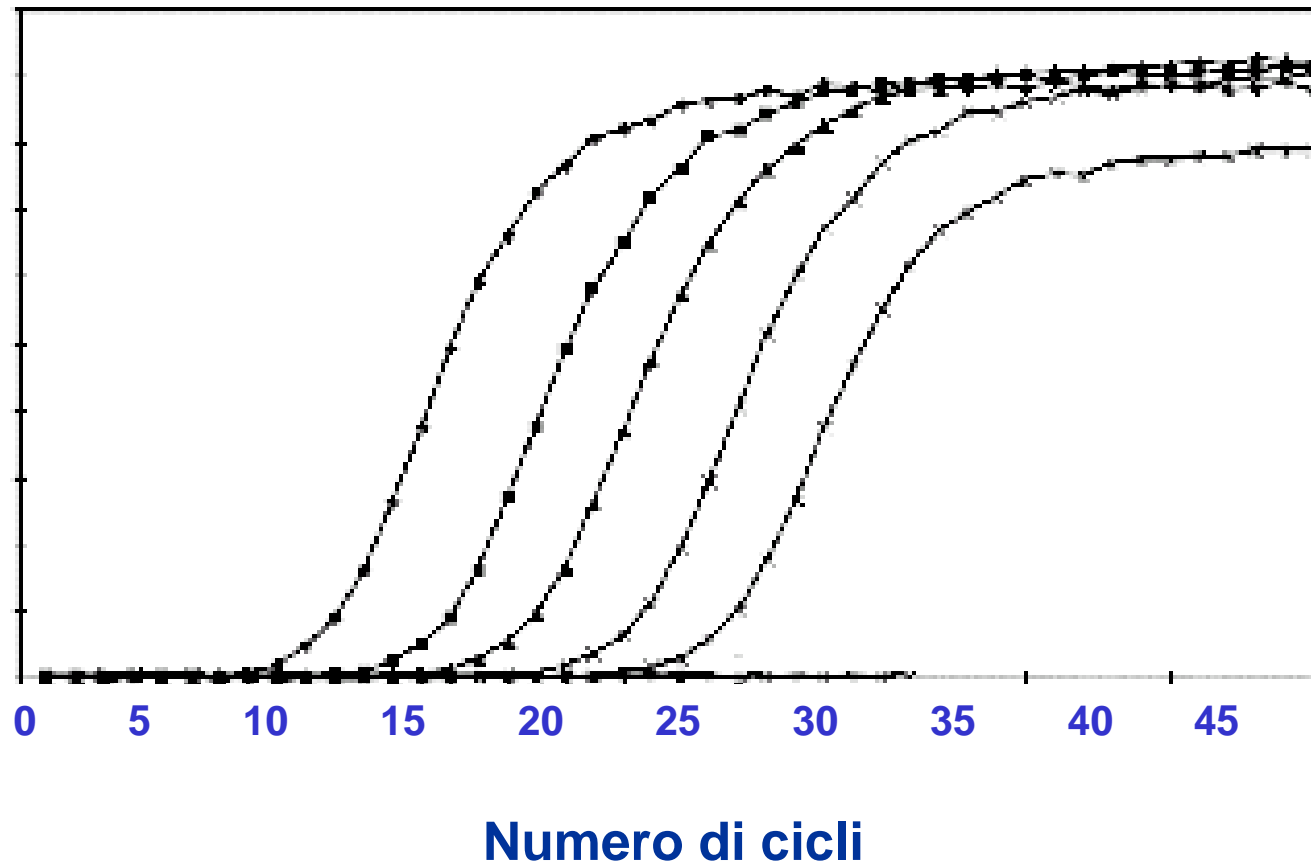
FIGURE 1. Polymerase Chain Reaction



La PCR Reazione a Catena della Polimerasi

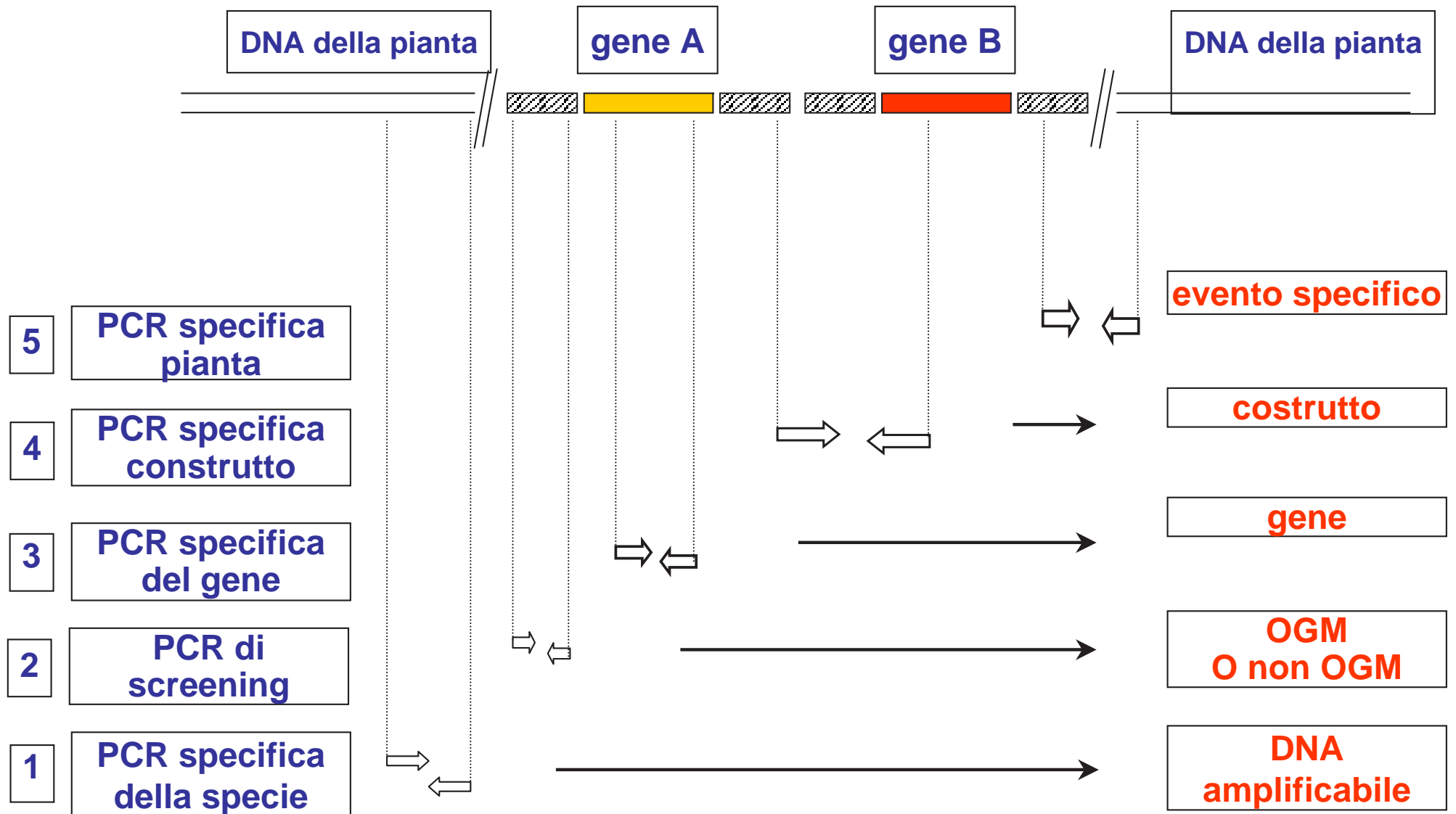
Curve di amplificazione

Numero di
molecole di
DNA





Metodi PCR per l'analisi di OGM



RoundupReady (different CTP in different GMO)



Bt11 maize genekonstrukt 1



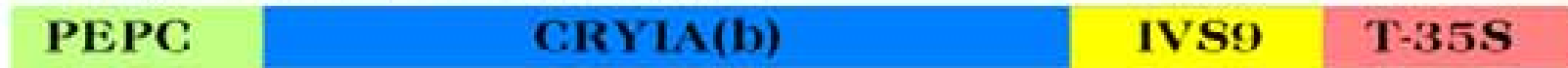
Bt11 maize genekonstrukt 2



T25 Liberty link maize



Bt176 maize genekonstrukt 1



Bt176 maize genekonstrukt 2

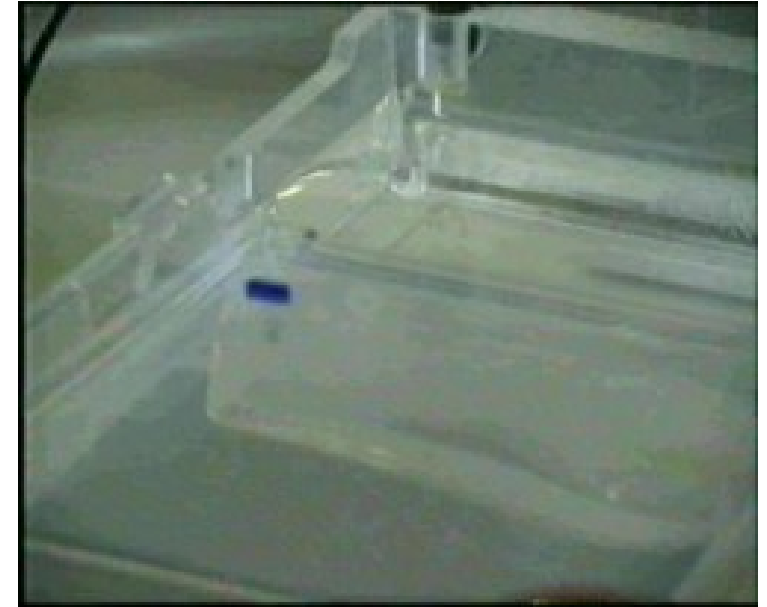
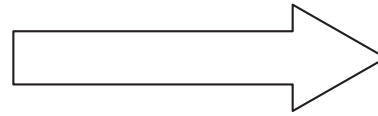


Bt176 maize genekonstrukt 3



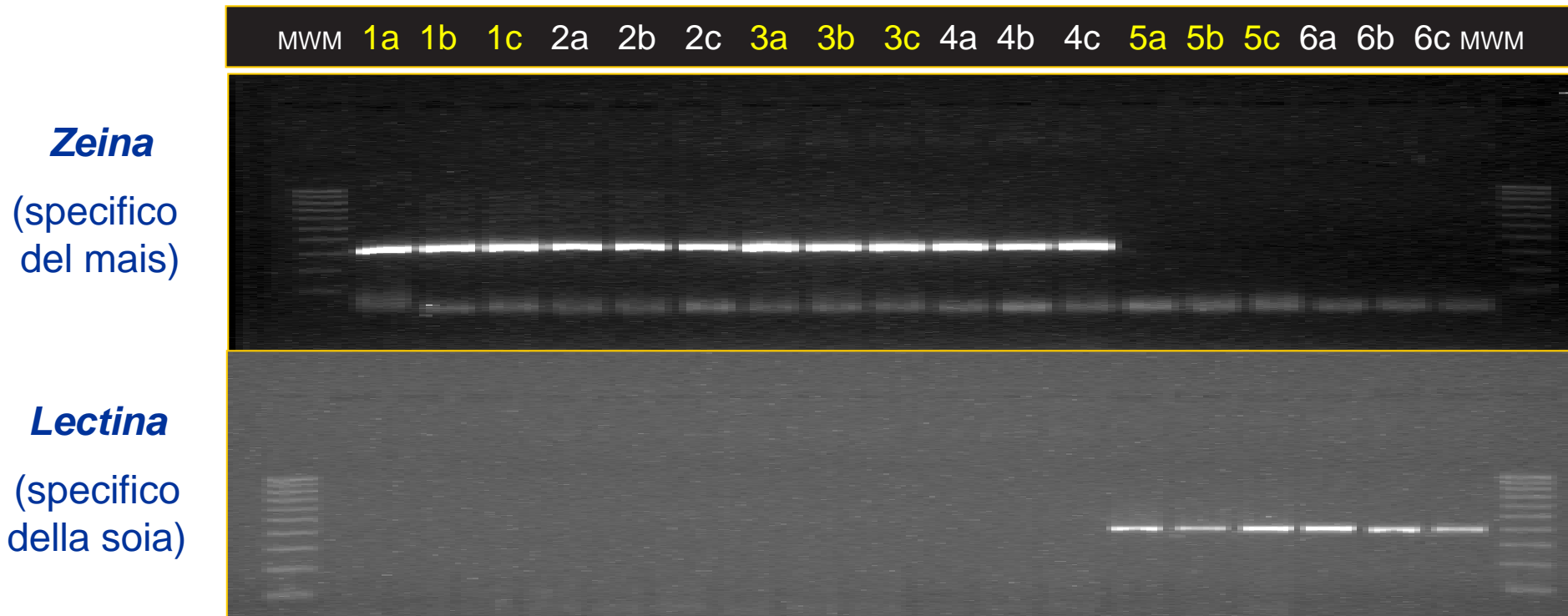
Mon810 MaisGard

Al DNA si aggiunge una soluzione colorata contenente un addensante che ne facilita il caricamento su un gel di agarosio.





Analisi dell'amplificato



MWM = Marker

1 = Mais 0% OGM

2 = Mais Bt-11 100% OGM

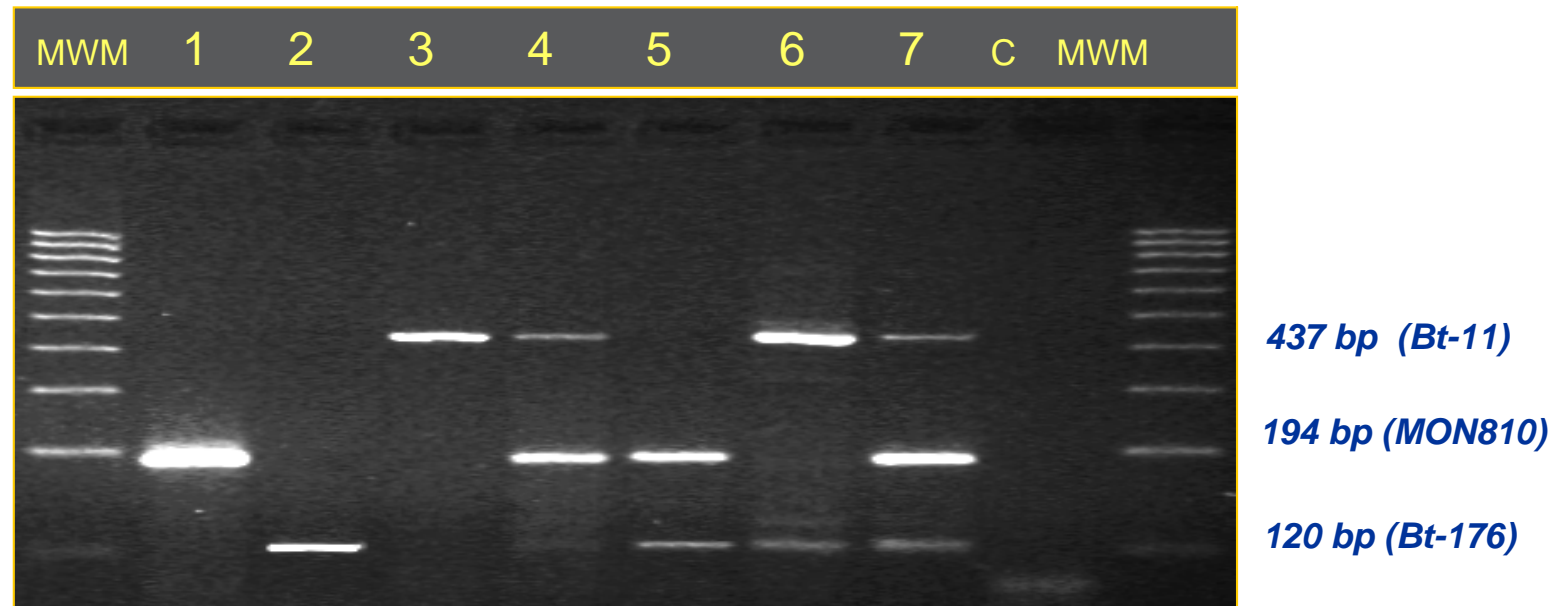
3 = Mais Bt-176 100% OGM

Triplicati

4 = Mais MON810 100% OGM

5 = Soia 0% OGM

6 = SoiaRR 100% GMO



MWM = Marker (Low Ladder 100 bp)

1 = *MON810* 0.5% OGM

2 = *Bt-176* 0.5% OGM

3 = *Bt-11* 0.5% OGM

4 = *MON810* + *Bt-11* 0.25% OGM

C = No Template Control

5 = *MON810* + *Bt-176* 0.25% OGM

6 = *Bt-176* + *Bt-11* 0.25% OGM *each*

7 = *MON810* + *Bt-11* + *Bt-176* 0.16% OGM *each*



GMO detection

GMO ?
Yes/No



GMO identification

0.5% tolerance

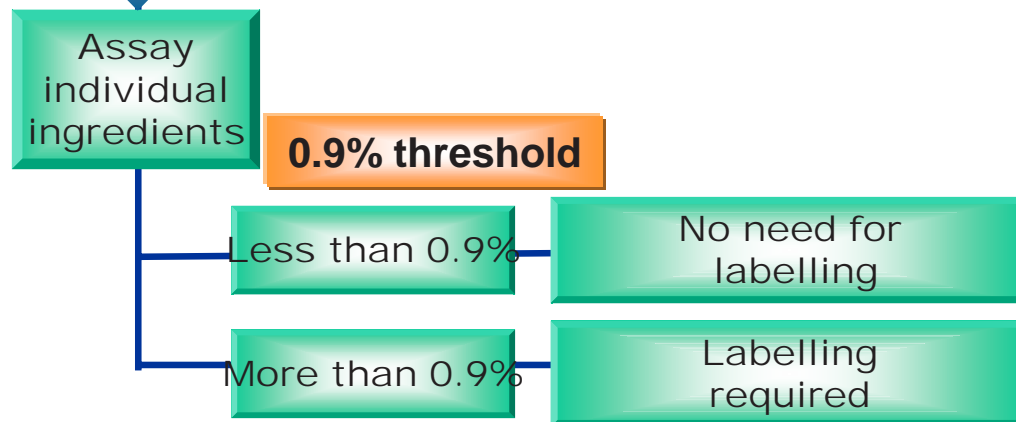
Are they
Authorised ?
Yes/No



GMO quantification

0.9% threshold

Must be
Labelled ?
Yes/No





Metodi quantitativi per l'analisi di OGM

DNA

Analisi strumentale:
REAL TIME PCR

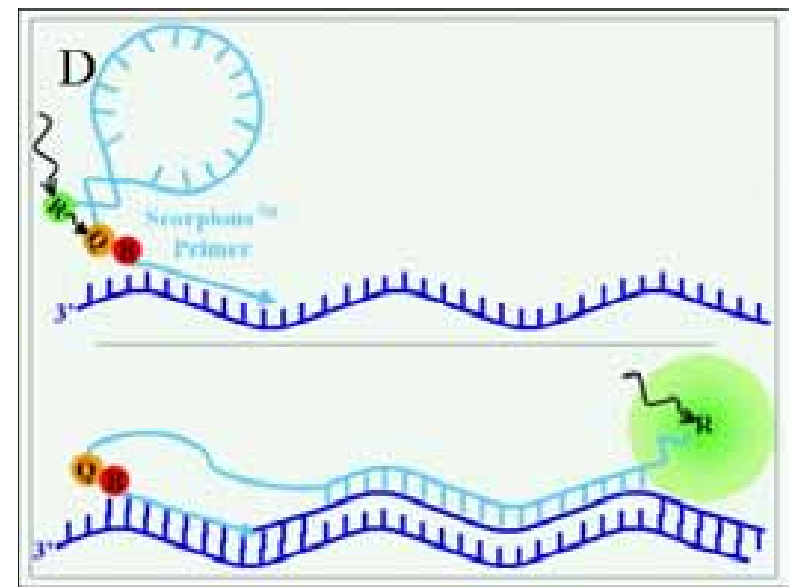
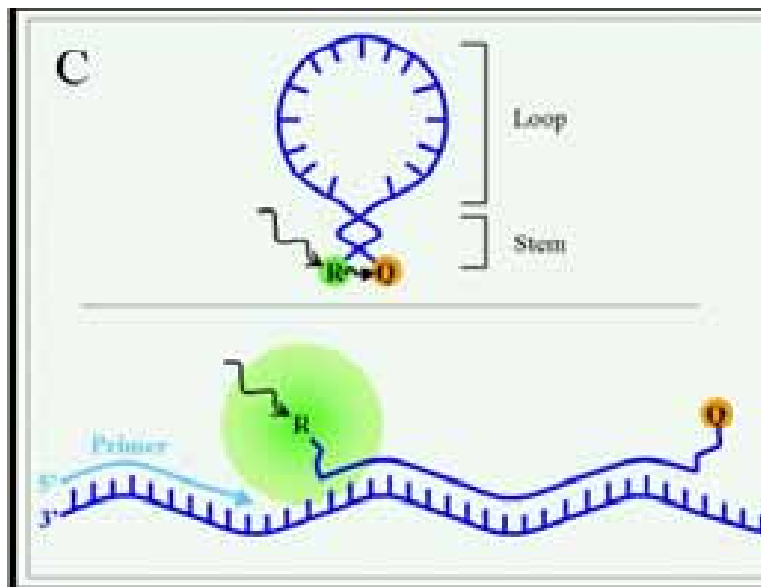
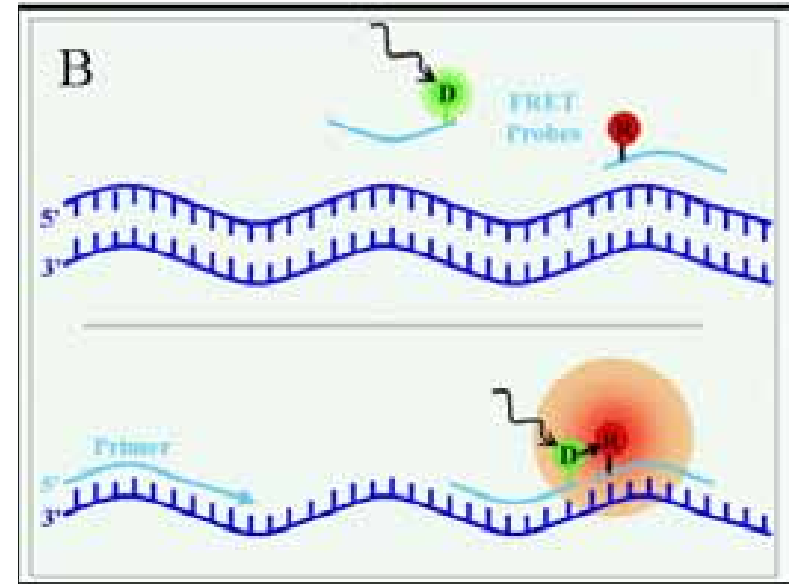
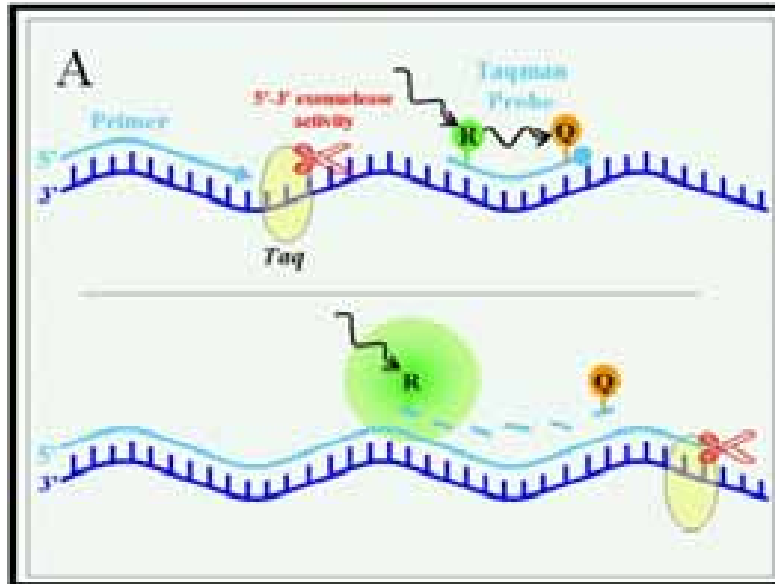
Monitoraggio in TEMPO REALE
dell'andamento della PCR

Proteine

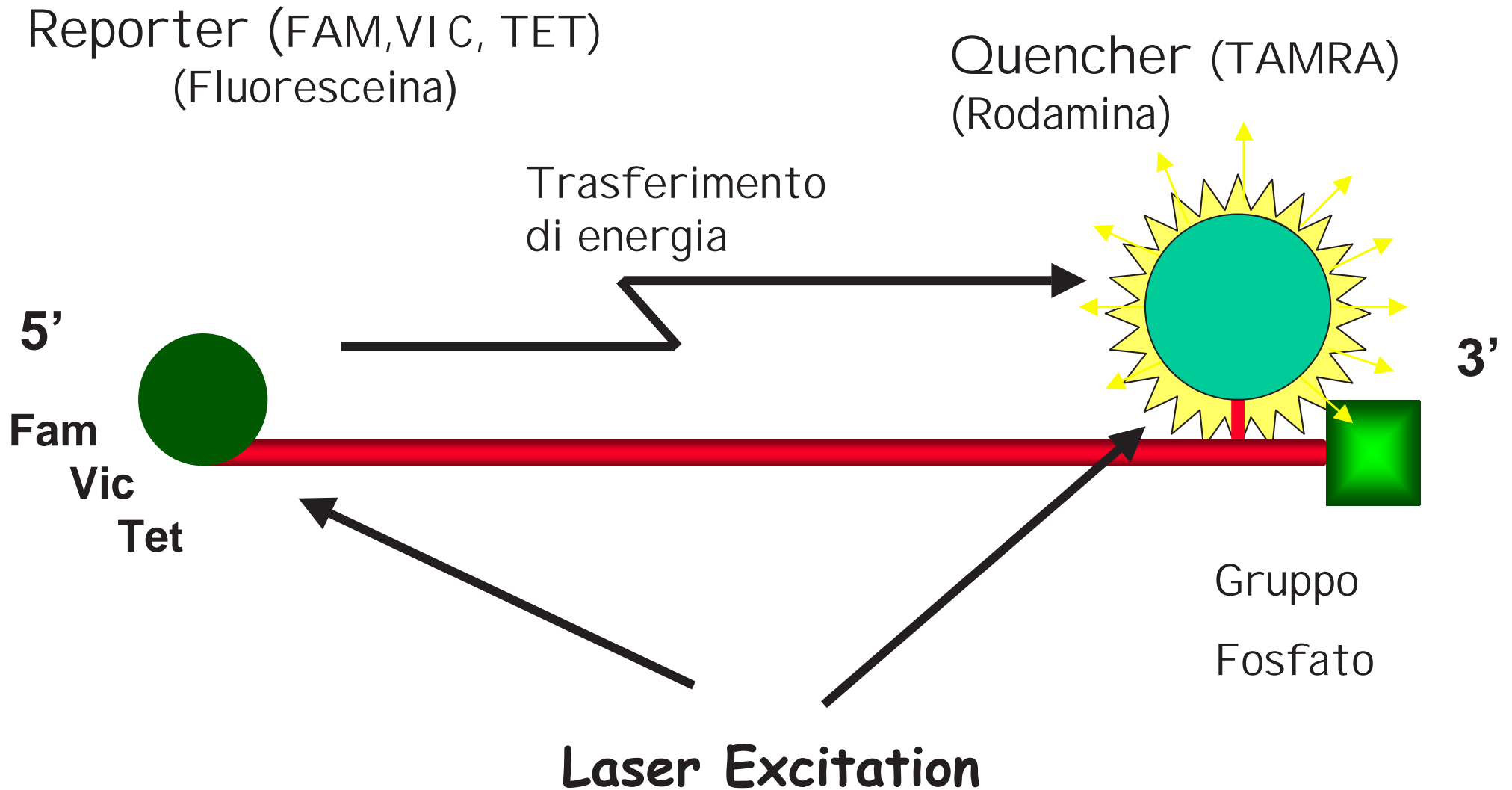
Metodi
immunoenzimatici
ELISA

Raccomandazione EU 787/04 Percentuale di DNA geneticamente modificato: percentuale delle copie di DNA geneticamente modificato rispetto alle copie di DNA specifico del taxon bersaglio, calcolata in termini di genomi aploidi

Sonde di ibridizzazione



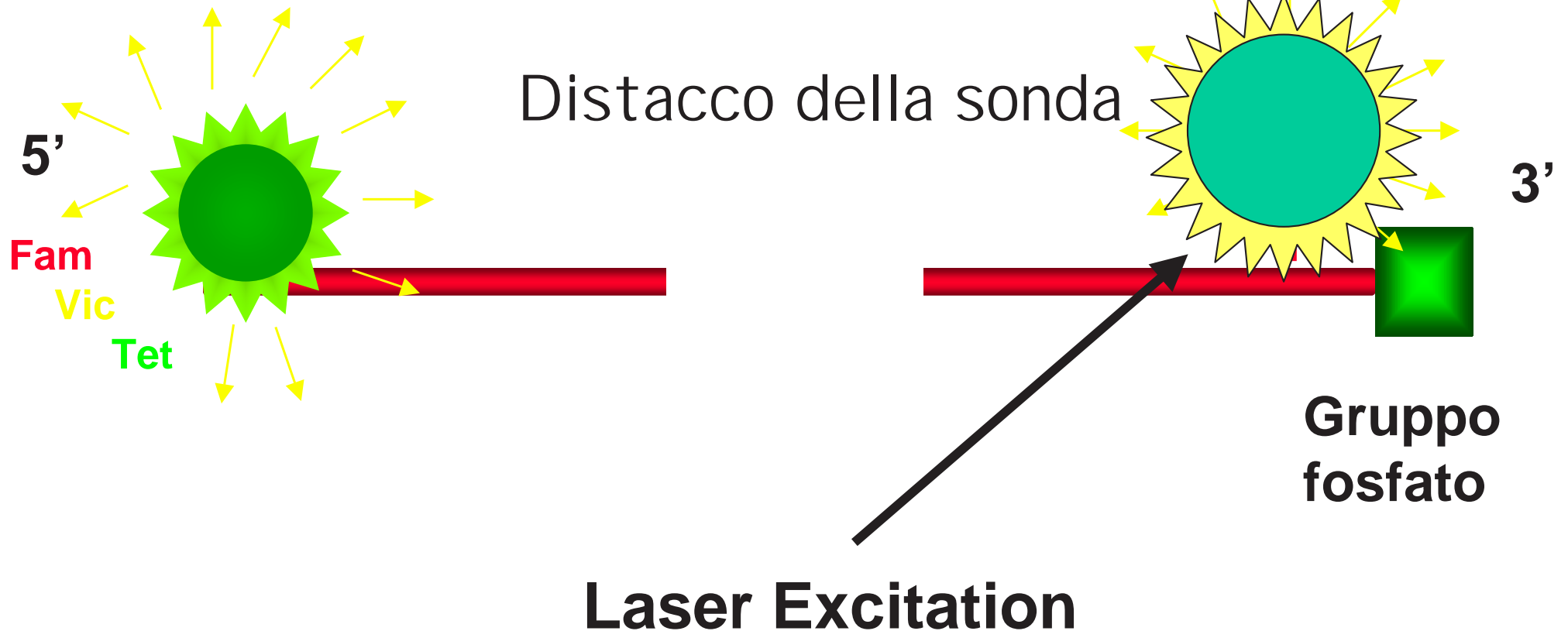
SONDA ad IDROLISI TaqMan



TaqMan™ Fluorogenic Probe

Reporter (FAM, VIC, TET)
(Fluoresceina)

Quencher (TAMRA)
(Rodamina)

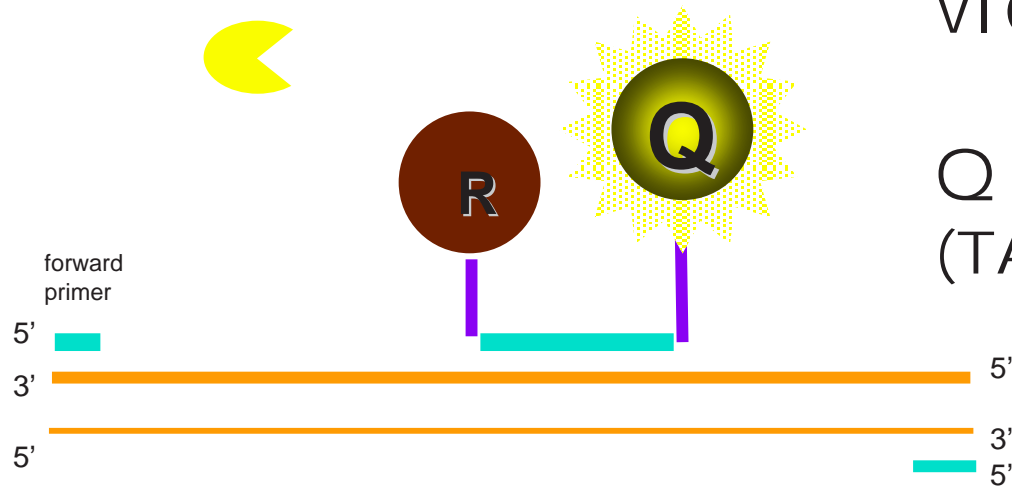


CHIMICA TaqMan

Denaturazione  Annealing



• Polimerizzazione



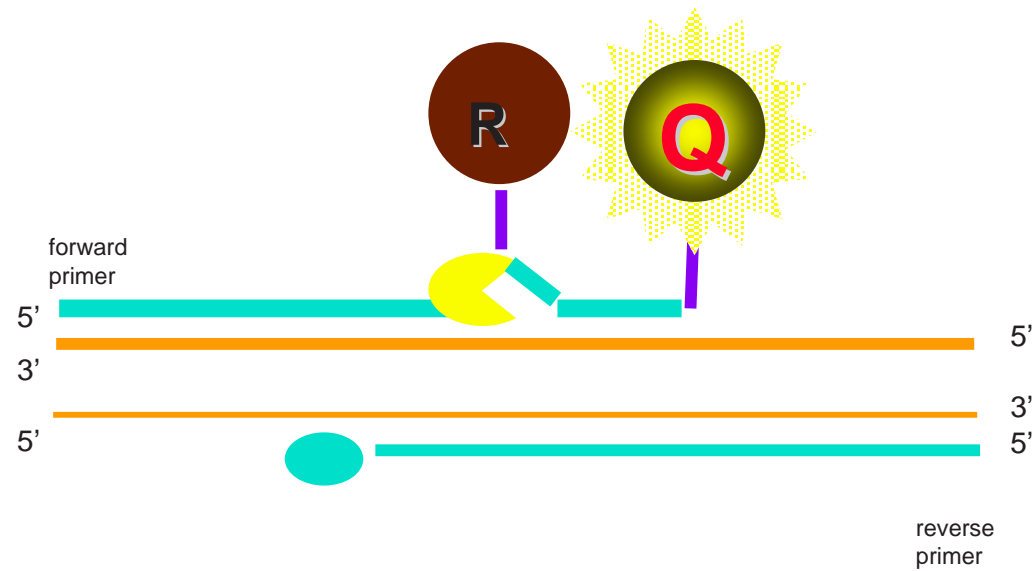
R = Reporter (FAM, VIC)

Q = Quencher (TAMRA)

Taqman PCR Chemistry

R = Reporter

Q = Quencher



Taqman PCR Chemistry

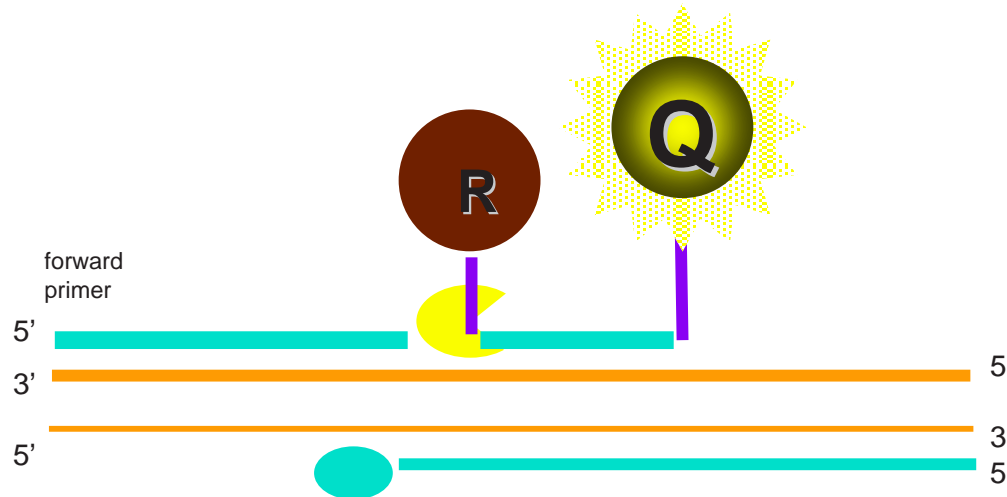
Denaturation → Annealing



• **Polymerization**

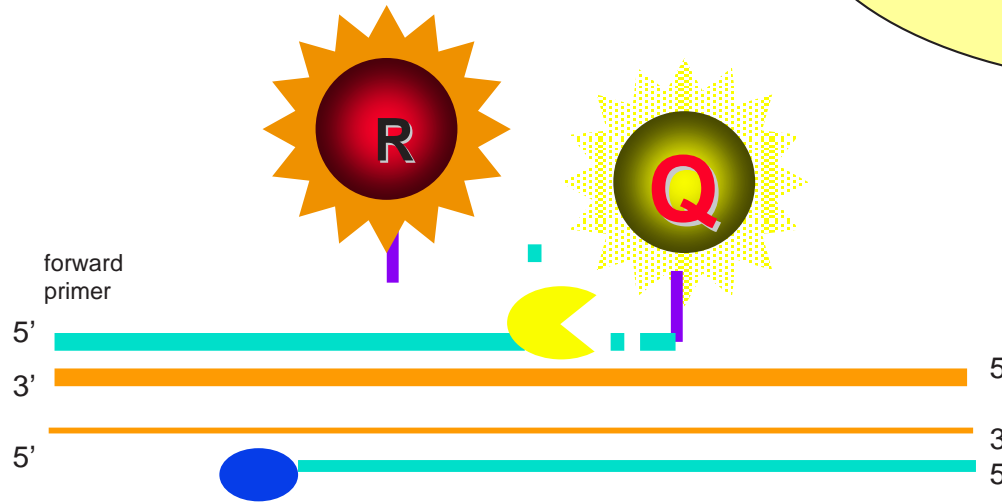
R = Reporter

Q = Quencher



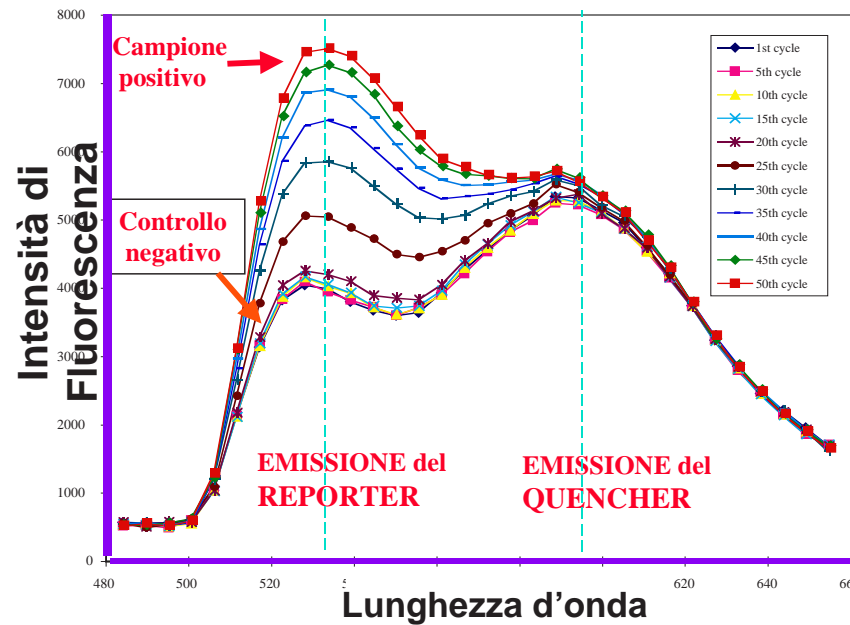
■ Taglio della sonda

Emissione di fluorescenza



R = Reporter

Q = Quencher



REAL-TIME PCR

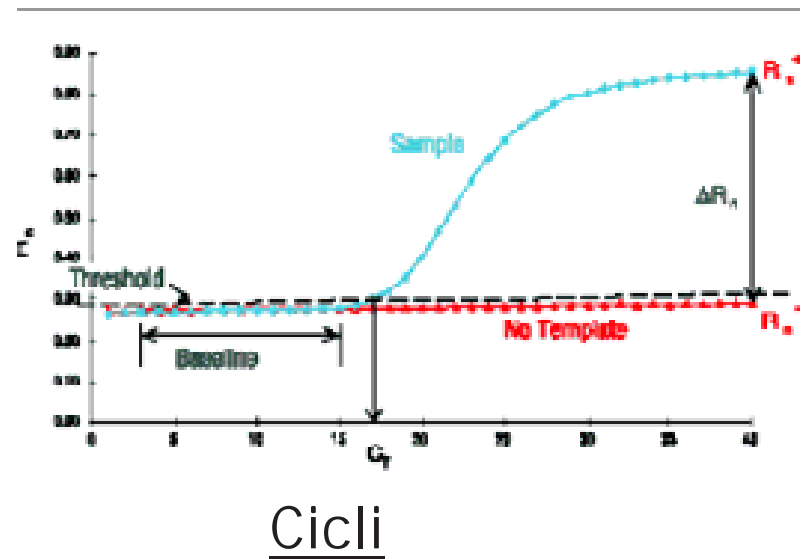
- ❖ Permette di seguire la cinetica della PCR mentre è in atto: DURANTE LA FASE ESPONENZIALE

• Campioni vengono irradiati da una sorgente luminosa

FLUORESCENZA

• viene rivelata da una CCD camera sotto il controllo del computer

Fluorescenza



VANTAGGI

- ❖ Riduzione dei tempi di esecuzione dell'analisi
- ❖ Elimina manipolazioni successive all'amplificazione (minore possibilità di contaminazione tra campioni)
- ❖ Elimina l'impiego di reagenti radioattivi o tossici (EtBr)

SISTEMA DI QUANTIFICAZIONE

Linea di base della curva

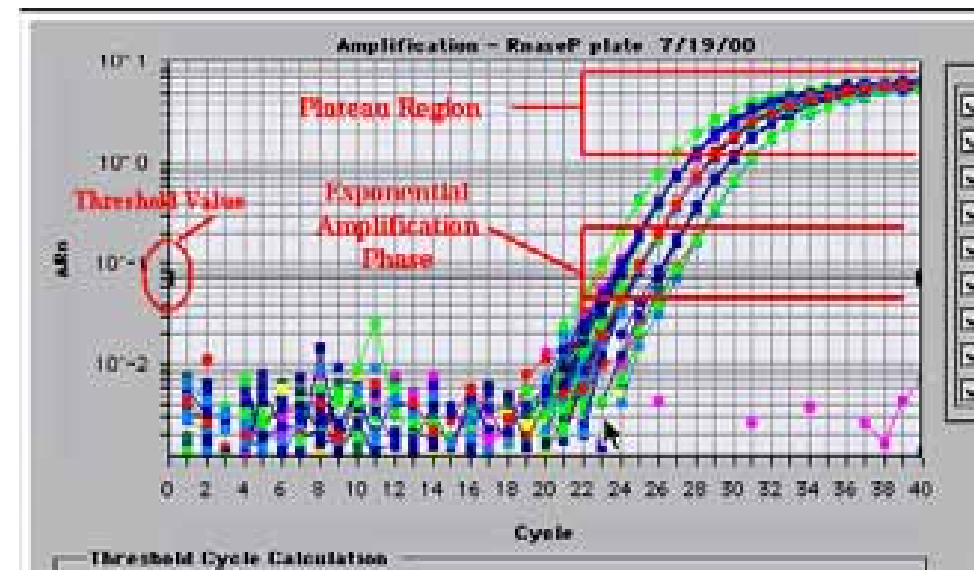
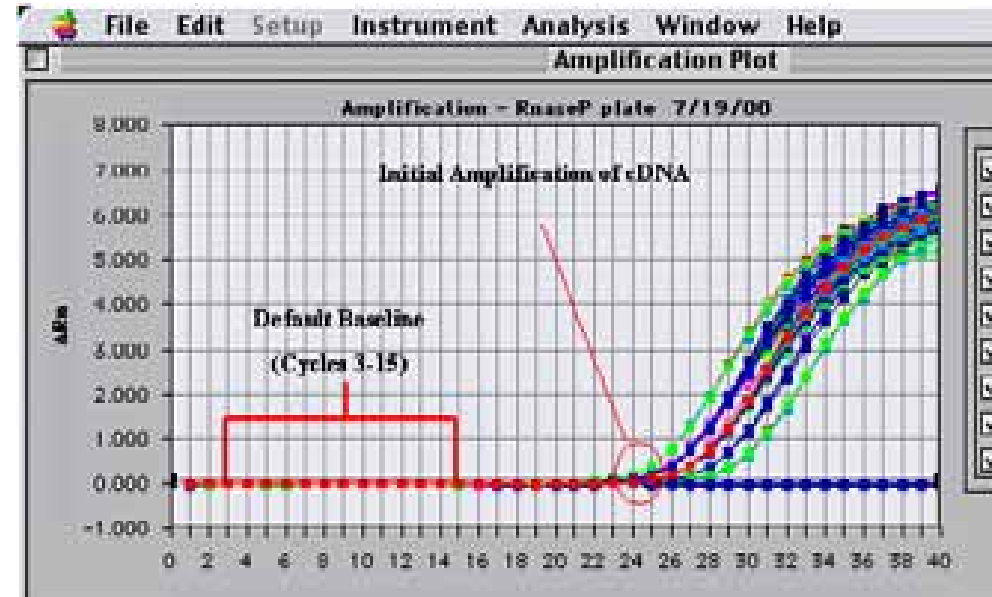
Non è ancora misurabile ΔR_n

Linea soglia

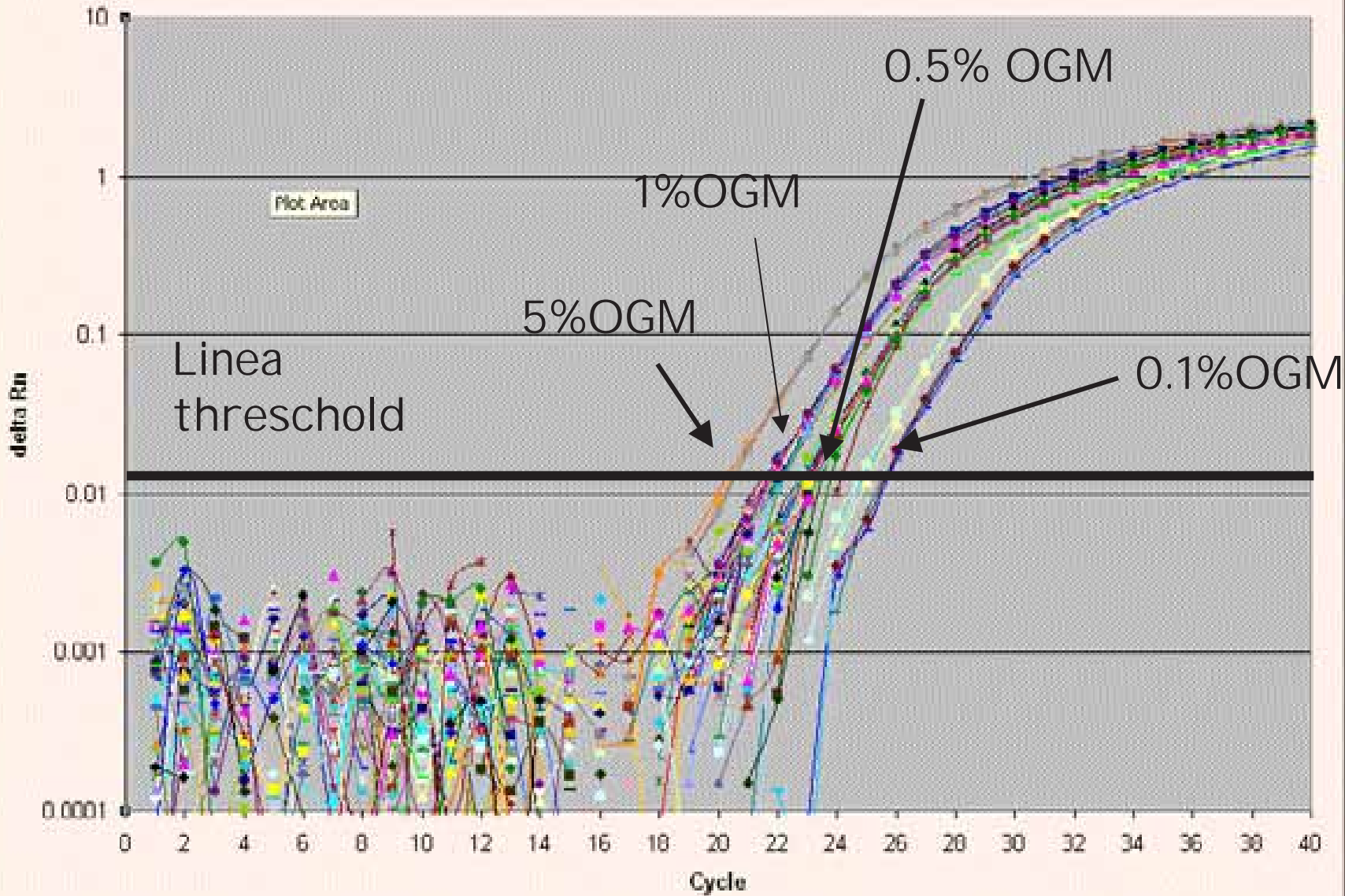
Taglia la curva del campione in fase di crescita esponenziale

Ciclo soglia (Ct)

Ciclo in cui la curva di amplificazione del campione in fase esponenziale taglia la linea soglia



Amplification Plot



- 2.FAM
- 3.FAM
- 4.FAM
- 5.FAM
- 6.FAM
- 7.FAM
- 8.FAM
- 9.FAM
- 10.FAM
- 11.FAM
- 12.FAM
- 13.FAM
- 14.FAM
- 15.FAM
- 16.FAM
- 17.FAM
- 18.FAM
- 19.FAM
- 20.FAM
- 21.FAM
- 22.FAM
- 23.FAM
- 24.FAM
- 25.FAM
- 26.FAM
- 27.FAM
- 28.FAM
- 29.FAM

Layout della piastra

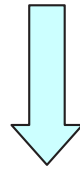
S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	EN DO GE NO
A	A	A	A 1:10	A 1:10	A 1:10	B	B	B	B 1:10	B 1:10	B 1:10	
C+	C+	C+	C-	C-	C-	NTC	NTC	NTC				
S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	O G M
A	A	A	A 1:10	A 1:10	A 1:10	B	B	B	B 1:10	B 1:10	B 1:10	
C+	C+	C+	C1	C1	C1	NTC	NTC	NTC				

C+ controllo positivo

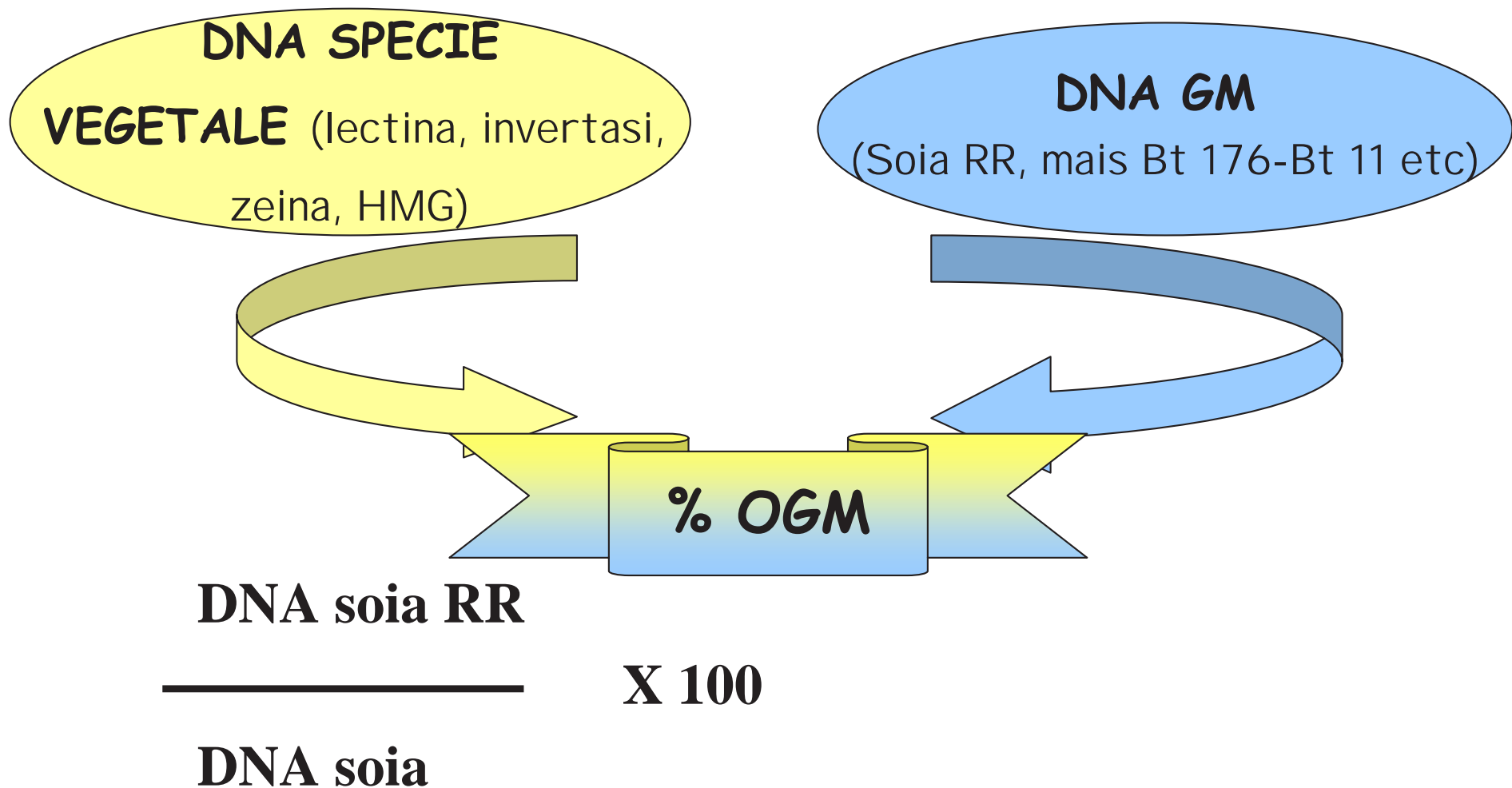
C- controllo negativo

NTC Amplification reagent control

ANALISI QUANTITATIVA OGM



QUANTIFICAZIONE RELATIVA



ANALISI QUANTITATIVA OGM

Quantificazione relativa

Calcolata sull'
INGREDIENTE

DNA della SPECIE
VEGETALE SOIA (lectina)

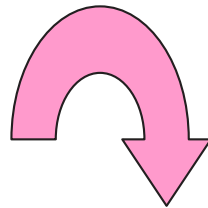
DNA GM della Soia RR
(EPSPS)

$$\%OGM = \frac{\text{DNA GM}}{\text{DNA specie}}$$

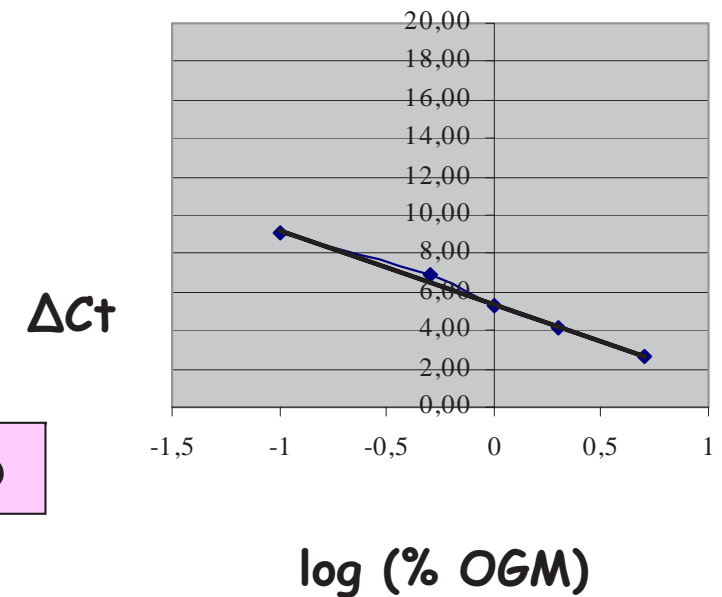
CALCOLO DEL CONTENUTO IN OGM

Curva di calibrazione costruita con CRM (soia RR Fluka 0,1-0,5-1-2-5% RR)

1 Curva : mette in relazione la differenza in cicli soglia tra *target* e *riferimento* in funzione del log %OGM



$$Ct (OGM) - Ct(Lectina) = a \log (\% OGM) + b$$

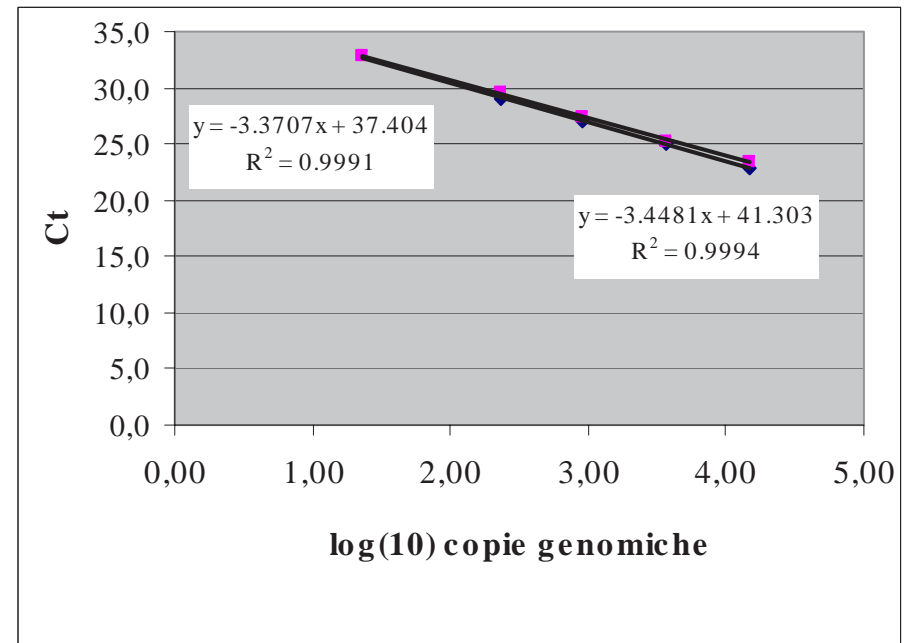


Metodo della “curva standard” copie genomiche

2 curve di calibrazione (transgene + gene di riferimento) basate sul numero di copie genomiche

Raccomandazione EU 787/04
Percentuale di DNA geneticamente modificato: percentuale delle copie di DNA geneticamente modificato rispetto alle copie di DNA specifico del taxon bersaglio, calcolata in termini di genomi aploidi

$$\frac{\text{Copie genomiche soia RR}}{\text{Copie genomiche soia}} \times 100$$



• **LOD** valore al di sotto del quale il metodo non consente di determinare la presenza del parametro analizzato

1 copia

20 copie

%OGM

0.001% (teorico)

0.01% (pratico)

• **LOQ** indica il limite al di sotto del quale il metodo non consente di determinare l'esatta concentrazione del parametro analizzato

%OGM

0.01% (teorico)

0.1% (pratico)

Principi di Base

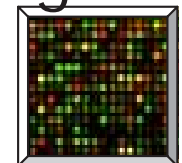
Miniaturizzazione e automazione di saggi biologici

centinaia di migliaia di geni usati come sonde su una superficie di 2-3 cm

Le sonde vengono attaccate su un supporto solido

Con l'aiuto della "Robotica"

L'informatica è una componente centrale in tutti gli "step"

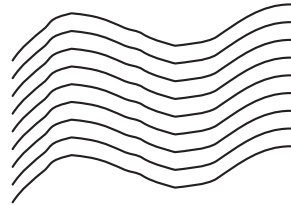


Tecniche Innovative

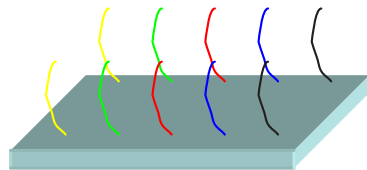


Food sample

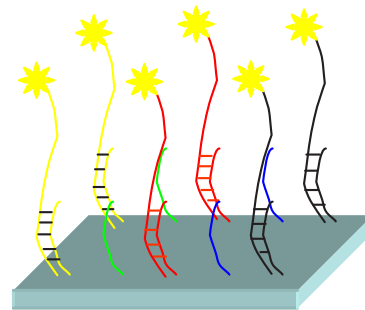
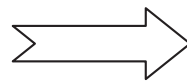
Extraction of DNA



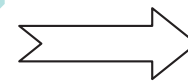
Selective amplification (marker sequences) and labelling



Activated surface with specific probes
glass with fixed capture



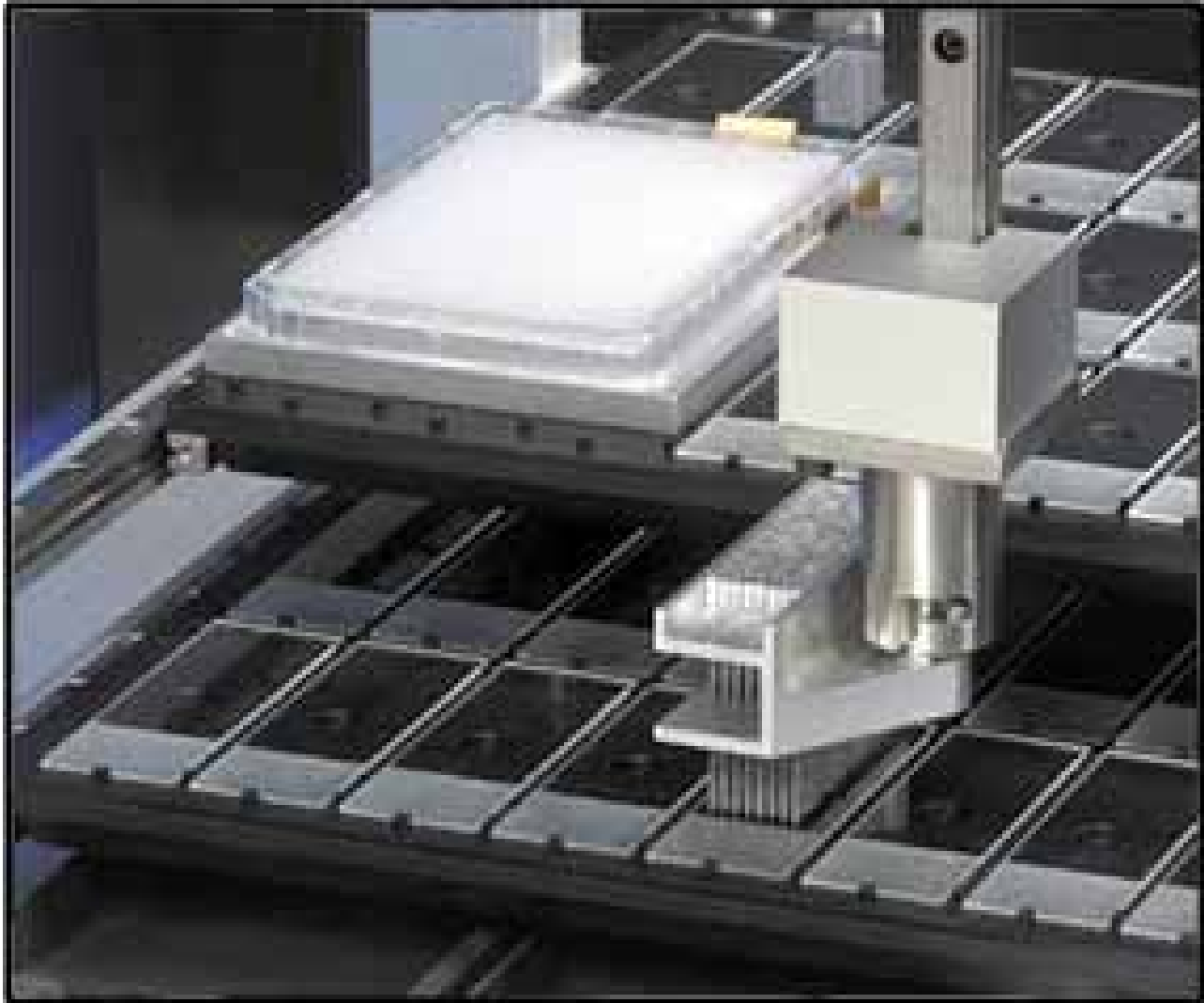
Hybridisation of PCR products



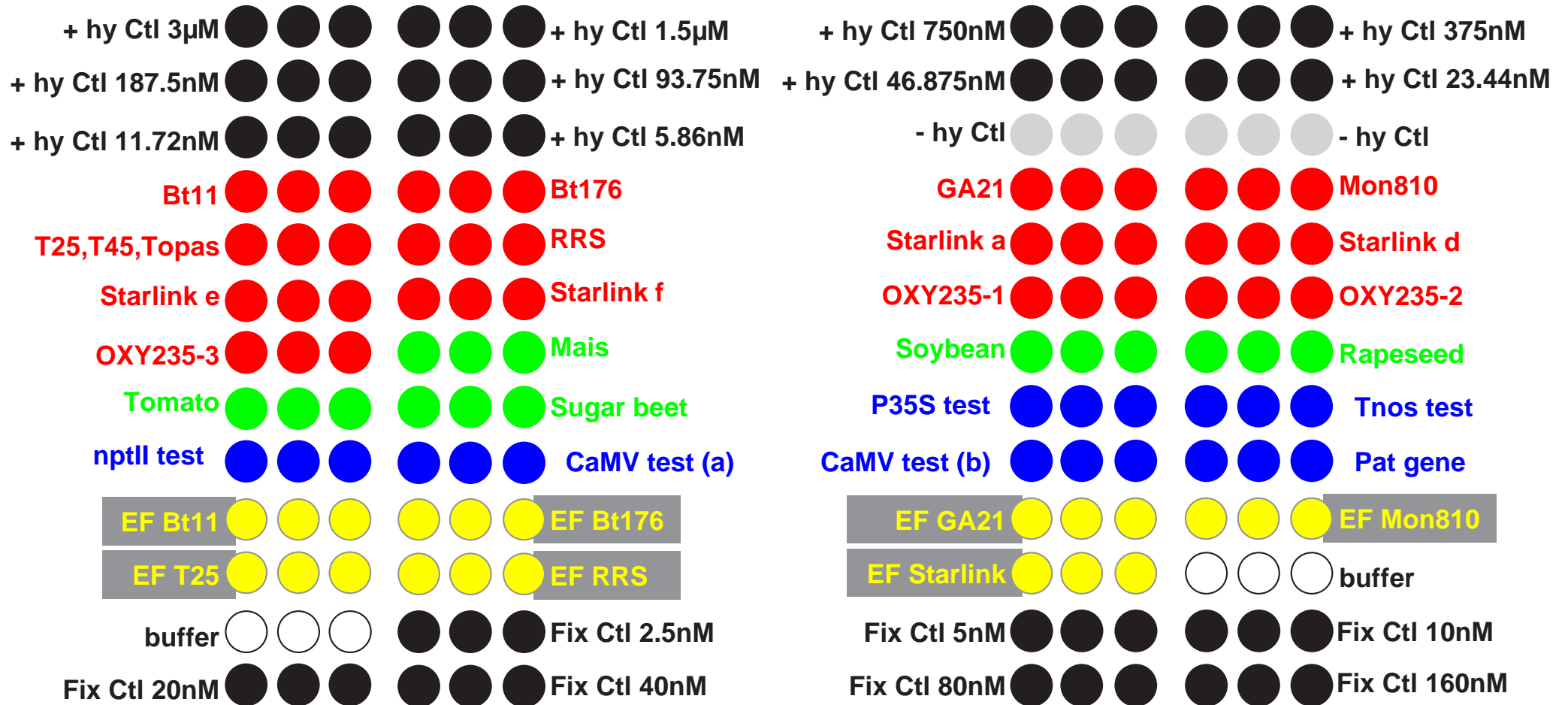
Diagnosis : presence of sequences specific to the GMO

DNA ARRAY GRIDDER





Latest GMOchips design



GMOchips

T25 Mais

