



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA
CURRICULUM TECNOLOGIE BIOLOGICHE

**Ottimizzazione dei metodi di rilevamento degli OGM:
Validazione dei limiti LoD e LoQ**

*Optimization of GMO detection methods:
Validation of LoD and LoQ limits*

Tesi di Laurea Magistrale di:

Ilaria Bramucci

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Anna La Teana

Correlatore:

Dott.ssa Caterina Trozzi

Sessione Straordinaria (Febbraio 2020)
Anno Accademico 2018/2019

*“Alla mia famiglia,
Grazie per avermi sempre incoraggiata
e sostenuta in ogni momento.”*

INDICE	Pagina
Capitolo primo: INTRODUZIONE	
<i>1.1 Premessa</i>	1
<i>1.2 Finalità</i>	5
Capitolo secondo: OGM	
<i>2.1 Generalità</i>	8
<i>2.2 Metodi di produzione</i>	9
<i>2.2.1 Tecniche in uso</i>	12
<i>2.3 Piante geneticamente modificate</i>	21
<i>2.3.1 Vantaggi</i>	30
<i>2.3.2 Rischi</i>	31
<i>2.3.2.1 Rischi ecologici</i>	34
<i>2.3.2.2 Rischi sanitari</i>	36
<i>2.4 Paesi Produttori</i>	38
Capitolo terzo: NORMATIVE	
<i>3.1 Normative in vigore</i>	44
<i>3.2 Normativa vigente nella provincia di Ancona</i>	56
Capitolo quarto: SCOPO DELLA TESI	58

Capitolo quinto: TECNICHE ANALITICHE PER LA RINTRACCIABILITA' DEGLI OGM	60
Capitolo sesto: FLUSSO ANALITICO PER LA RICERCA DEGLI OGM AUTORIZZATI NELL'UE	66
Capitolo settimo: VALIDAZIONE DEI METODI DI PROVA	
<i>7.1 Procedura di validazione</i>	70
<i>7.2 Analisi statistica di base: LoD e LoQ</i>	81
Capitolo ottavo: MATERIALI E METODI	
<i>8.1 Materiali</i>	84
<i>8.2 Metodiche Analitiche per l'individuazione degli OGM</i>	88
<i>8.2.1 Estrazione e Purificazione del DNA</i>	89
<i>8.2.2 Real-time PCR</i>	94
<i>8.2.3 Analisi qualitativa</i>	108
<i>8.2.3.1 Screening 35S / tNOS</i>	109
<i>8.2.3.2 Screening dei geni endogeni: Zeina per il mais e GmaxLec per la soia</i>	114
<i>8.2.3.3 Rilevamento eventi specifici</i>	119
<i>8.2.4 Analisi quantitativa</i>	132
Capitolo nono: RISULTATI	150
<i>9.1 Risultati analisi qualitativa</i>	151

9.2 Risultati analisi quantitativa	169
9.2.1 Risultati validazione LoQ quantitative mais	170
9.2.2 Risultati validazione LoQ quantitative soia	172
9.2.3 Verifica della riproducibilità della metodica: Analisi dei campioni positivi per gli eventi mais MON810 e soia RR	174
9.2.3.1 Quantificazione MON810	175
9.2.3.2 Quantificazione RR	178
Capitolo decimo: CONCLUSIONI	182
BIBLIOGRAFIA	185
RINGRAZIAMENTI	192.

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Lo sviluppo delle nuove tecnologie di Ingegneria Genetica ha consentito di migliorare la produzione dei prodotti agroalimentari con conseguente sviluppo, nell'ultimo ventennio, di colture geneticamente modificate (GM) su una vasta area del globo. Queste colture prevedono principalmente la coltivazione di soia GM e a seguire le coltivazioni GM di mais, cotone e colza.¹

L'ingegneria genetica permette di fatto di modificare il genoma mediante il trasferimento di geni da un essere vivente ad un altro anche se di specie differenti. Per tale motivo vengono definiti OGM organismi geneticamente modificati detti anche organismi transgenici.

Tali organismi possono essere non solo piante ma anche batteri, funghi, virus e animali nei quali gli effetti della manipolazione comportano la sintesi di nuove proteine o enzimi che esprimono le caratteristiche ricercate.

Queste modificazioni genetiche, se da una parte portano ad una serie di vantaggi, come migliorare le caratteristiche nutrizionali o conferire alla pianta

la resistenza ai parassiti, dall'altra portano a dei potenziali rischi per la salute umana ed animale che ancora sono oggetto di studio e di ricerca.

Le normative vigenti in Italia riguardanti gli OGM limita o vieta la coltivazione di sementi e delle piante GM (D.Lgs n.227/2016).²

Pertanto, il rispetto delle indicazioni fornite da apposite linee guida nelle diverse fasi di produzione di prodotti sementieri "NO-OGM" diminuisce fortemente il rischio di "contaminazioni" indesiderate da parte di sementi transgeniche in lotti appartenenti a varietà di tipo convenzionale.³

Purtroppo però gli organismi geneticamente modificati (OGM) possono essere potenzialmente presenti negli alimenti, nei mangimi e in tutte le matrici di utilizzo nella catena agroalimentare.⁴

In questo contesto, le caratteristiche del seme impiegato nelle coltivazioni rappresentano un fattore fondamentale: la presenza di sementi OGM all'interno del lotto di seme utilizzato per l'istituzione della coltura, anche se solo in tracce, con ogni probabilità porta all'ottenimento di un prodotto che a sua volta contiene le impurità indesiderate. Quando poi il prodotto ottenuto è rappresentato da sementi riproducibili, in condizioni normali di coltivazione si realizza una moltiplicazione di generazione in generazione di tutte le componenti presenti nel lotto utilizzato in origine.³

Perciò per garantire la rispondenza a standard di qualità prefissati dagli enti preposti ai controlli e alla certificazione, e soprattutto per tutelare il consumatore finale, il mercato richiede di garantire che il prodotto destinato al consumo non provenga da materie prime GM.

Questo implica, di conseguenza, la definizione di metodologie specifiche che soddisfino soprattutto criteri di praticabilità e di attendibilità, nell'accertamento diagnostico della presenza degli OGM nelle matrici considerate.¹

In modo particolare accanto ad altri accorgimenti, quindi, le analisi di laboratorio effettuate sul seme destinato alle semine rappresentano un elemento di grande importanza e forniscono uno strumento immediatamente utile perché portano all'esclusione dalla filiera dei lotti in cui è riscontrata la presenza di OGM.³

Per verificare l'efficacia degli accorgimenti messi in atto in tutte le fasi di produzione, è opportuno predisporre analoghi controlli anche sulla semente prodotta che dovrà risultare esente da OGM. In caso contrario, sarà necessario individuare la possibile origine della "contaminazione" per predisporre adeguate azioni correttive, oltre che destinare ad altro uso la partita di seme.¹

Le metodiche di analisi utilizzate per verificare l'assenza di OGM nelle sementi possono trovare applicazione anche nei controlli su altre matrici, per

esempio quando il prodotto della coltivazione è rappresentato dallo stesso organo vegetale (es. la cariosside di mais o il seme di soia), pur destinato ad altro uso (es. consumo alimentare, industria mangimistica). In quest'ultimo caso, tuttavia, il prelievo dei campioni dovrà essere affrontato in modo adeguato; non potendo adottare nella loro interezza le metodiche di campionamento previste per le sementi, sarà ad esempio necessario adottare un sistema di identificazione certa della partita campionata.

Le analisi di detection OGM sono attualmente oggetto di grande interesse a livello internazionale e le specie vegetali particolarmente interessate dalla problematica sono proprio mais e soia. Esse assumono grande rilevanza in diversi ambiti.

Ricordiamo ad esempio il meccanismo previsto dalle norme comunitarie per il rilascio delle autorizzazioni per prodotti OGM su richiesta dei notificanti (validazione dei metodi di detection) e i piani di controllo a livello dei singoli stati membri dell'UE (in Italia regolamentati dal DM 23/11/2003).

Queste ed altre realtà hanno comportato e comportano continui ed approfonditi studi, ricerche, prove di verifica, cicli di validazione, test di proficiency che, di fatto, comportano un continuo aggiornamento di questa materia, in continua evoluzione.³

Vedremo nei capitoli successivi le metodiche di biologia molecolare in uso presso il laboratorio agroalimentare Bioaesis, sede di svolgimento della tesi, basate sulla tecnica della Real-Time PCR e studi statistici per la validazione finale delle metodiche di rintracciabilità degli OGM, oggetto di tesi, eseguita al fine di garantire l'ottenimento di un risultato affidabile in termini di precisione e riproducibilità del dato.

1.2 Finalità

La finalità e lo scopo di questa tesi è validare una nuova metodica di analisi da utilizzare per verificare l'assenza di OGM in varietà convenzionali delle specie *Zea mays* (mais) e *Glycine max* (soia), con particolare riferimento alla produzione di sementi.³

La presente tesi riporta, il lavoro di ricerca e di sviluppo svolto presso il laboratorio analisi Bioaesis, sito a Jesi in provincia di AN, il quale dal 2005, è il laboratorio agroalimentare di riferimento su territorio marchigiano per la rintracciabilità degli OGM nella filiera agroalimentare in materie prime/ semilavorati/ prodotti finiti a base di mais e soia.

Le prove analitiche riguardano sia analisi qualitative svolte per la ricerca della presenza/assenza degli OGM sia analisi quantitative per la quantificazione di un evento transgenico del mais o della soia, rilevato nelle qualitative.

Inoltre per far questo tipo di analisi la normativa prevede l'accreditamento delle metodiche in uso nel laboratorio, difatti il laboratorio Bioaesis nel 2005 ha ottenuto l'accreditamento da parte di ACCREDIA (ente italiano di accreditamento) per l'analisi qualitativa di ricerca del promotore del 35S e del terminatore NOS, il quale costruito genico risulta comune a differenti eventi transgenici sia del mais sia della soia.

Contemporaneamente sono state accreditate due prove di quantificazione per eventi specifici della soia e del mais, quantitativa MAIS BT176 non oggetto di tesi e quantitativa SOIA MON40-3-2 arrivando, ad oggi, ad un totale di 15 eventi OGM specifici rilevabili accreditati.⁵

La necessità di quantificare nasce dalle disposizioni del Reg. CE 1830/2003, che detta le norme per l'etichettatura e la tracciabilità degli OGM.⁶

Questo introduce l'obbligo di etichettare come “prodotto da OGM” anche gli alimenti nei quali non è possibile reperire materiale genetico (come gli oli).

Per i prodotti “*Ogm-free*” viene stabilito nello stesso regolamento che il limite massimo ammissibile di rilevamento per presenza accidentale di OGM (purché autorizzati) è dello 0,9%.⁶

Pertanto l'argomento principale della tesi dal titolo "OTTIMIZZAZIONE DEI METODI DI RILEVAMENTO DEGLI OGM: VALIDAZIONE DEI LIMITI LOD E LOQ" è una validazione dei metodi di prova per la ricerca di OGM, ovvero confermare attraverso una serie di prove e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti previsti per l'utilizzo del metodo stesso siano soddisfatti⁷. In modo particolare si eseguirà un'attività di ricerca e sviluppo per valutare l'impatto di modifiche apportate alle metodiche già in uso dal laboratorio per ridurre i tempi di realizzazione delle procedure stesse e che nello stesso tempo possano migliorare le performance.

Capitolo secondo

OGM

2.1 Generalità

Gli Organismi Geneticamente Modificati (OGM) sono definiti dalla legislazione europea come “organismi, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto si verifica in natura mediante accoppiamento o incrocio o con la ricombinazione genetica naturale” (Direttiva 2001/18/CE)⁸. Tale definizione sottolinea la modalità tecnica con cui questi organismi sono prodotti nei laboratori.

Gli elementi fondanti dell'attuale normativa europea in materia di OGM sono entrati in vigore nel 2004 (Reg.(CE) 1829/2003, Reg (CE) 1830/2003) con il duplice obiettivo di:

- proteggere la salute umana ed animale nonché l'ambiente in quanto un OGM può essere immesso sul mercato solo se autorizzato a seguito di un'accurata valutazione del rischio;
- assicurare la libera circolazione di beni all'interno dell'Unione Europea.¹

La maggior parte delle piante GM oggi coltivate (principalmente soia, mais, cotone, colza) sono state sviluppate per due scopi: ottenere resistenza a malattie o insetti e ottenere tolleranza ad erbicidi selettivi⁴. Queste piante

(soia e mais), essendo quelle attualmente impiegate nel settore agroalimentare, sono oggetto delle analisi per la rintracciabilità. Per questo, saranno prese in considerazione nei capitoli successivi.

2.2 Metodi di produzione

Ai fini della definizione di OGM data dalla Direttiva 2001/18/CE⁶, le tecniche di ingegneria genetica tramite le quali si ottiene un organismo geneticamente modificato sono le seguenti⁴:

- 1- Tecniche di ricombinazione del materiale genetico che comportano la formazione di nuove combinazioni mediante l'utilizzo di un vettore di molecole di DNA, RNA o loro derivati, nonché l'inserimento in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;
- 2- Tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, per esempio la microiniezione e il microincapsulamento;
- 3- Fusione cellulare o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.

Tali tecniche sono state sviluppate grazie all'uso combinato di enzimi di restrizioni, i quali permettono di individuare, tagliare e legare il DNA mescolando i patrimoni genetici di esseri viventi di specie diverse portando alla creazione di una molecola di DNA ricombinante (1970-1973) con la quale sarà possibile eseguire il trasferimento genetico orizzontale tra specie che normalmente non si incrociano. Ciò porta all'espressione di caratteri fenotipici nuovi.

Tra le tecniche indicate in linea generale, la principale in uso nell'ingegneria genetica è basata sull'uso dei vettori ricombinanti. Infatti essa permette di preparare vettori difettivi in cui si elimina la sequenza non necessaria per il trasferimento del transgene che si vuole far acquisire all'organismo ospite, mantenendo invece la sequenza genica per far esprimere quel transgene. In questo modo eliminando i geni "superflui" è possibile inserire il transgene nel vettore, il quale dovrà integrarsi nel genoma dell'ospite in questo caso della pianta nella quale si osserverà la caratteristica introdotta espressa dal transgene inserito.

Il **transgene** è così strutturato:

- *Gene marker*: marcatore di selezione, contiene gene che codificano per una determinata caratteristica, es.: resistenza antibiotica.

- *Promotore*: struttura di regolazione dell'espressione del gene;
- *Transgene*: gene esogeno da trasferire;
- *Terminatore*: segnale di stop della sequenza genica.

La formazione del vettore ricombinante avviene grazie all'uso di particolari enzimi di restrizione e ligasi introdotti nel paragrafo precedente.

Per esempio il primo OGM fu ottenuto dalla clonazione di un gene di rana all'interno del batterio *E. coli* dimostrando che era possibile trasferire il materiale genetico da un organismo all'altro tramite l'uso di vettori plasmidici in grado di auto replicarsi, abbattendo di fatto le barriere specie-specifiche. Da qui, si arrivò tramite successivi studi al primo prodotto ad uso commerciale derivato da un OGM (1976): somatostatina (1977) e insulina (1978) commercializzato nel 1981, proteine umane ricombinanti prodotte a partire da *E. coli* dalla Genentech, fondata da Herbert Boyer.

Negli anni a venire, le multinazionali iniziarono ad investire notevoli capitali nelle biotecnologie in quanto consideravano gli OGM "l'oro del futuro".

Alla fine degli anni '80, queste tecniche furono applicate nell'ambito agroalimentare. Negli Stati Uniti vengono prodotte sementi e piante geneticamente modificate di soia, mais, cotone e riso per ottenere due

caratteristiche principali: aumentare la loro resistenza agli erbicidi e ai parassiti.

2.2.1 Tecniche in uso

Di seguito vengono descritte le tecniche più in uso nella creazione di un OGM:

1. Elettroporazione:

Consiste nel sottoporre le cellule vegetali a brevi impulsi elettrici i quali provocano l'apertura dei pori della membrana che riveste la cellula, permettendo così l'ingresso del DNA da trasferire⁹;

2. GENE GUN o tecnica biolistica:

Il metodo di trasformazione Biolistico, detto anche "Bombardamento con microproiettili" o GENE GUN, si basa sull'uso di una particolare "pistola" che spara proiettili contenenti il DNA da inserire nelle cellule e nei tessuti vegetali⁹.

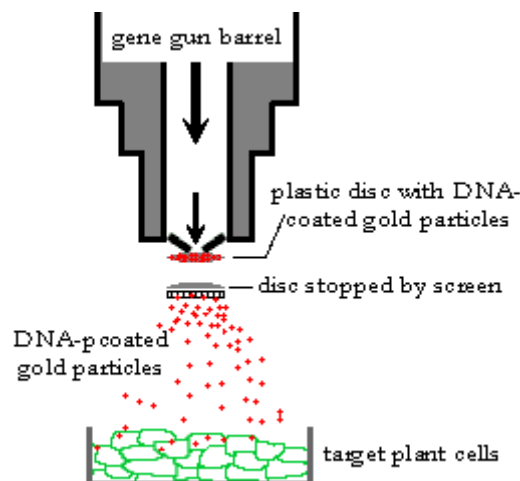


Figura n° 1: Bombardamento della cellula vegetale con microproiettili di tungsteno o oro rivestiti con il DNA da trasferire¹⁰.

Questa pistola è formata da un dispositivo, detto anche “Cannone a particelle”, che utilizza la polvere da sparo, l’aria compressa o l’elio per accelerare proiettili speciali. Tali proiettili sono microparticelle, 0,4-1,2 μm , di oro o tungsteno sulla cui superficie sono state attaccate molte copie della sequenza di DNA (costruito) che si vuole introdurre nel genoma cellulare. I bersagli possono essere diversi: cellule vegetali in sospensione, colture di callo, tessuti meristemati, embrioni immaturi, protocormi, polline, ecc.

Alla velocità di circa 300-600 m/s le microparticelle rivestite con il DNA attraversano la parete e la membrana cellulare senza danneggiare significativamente le cellule. Nel genoma di alcune di esse, il DNA legato precedentemente ai microproiettili (*Figura n° 5*) si inserisce stabilmente secondo meccanismi non ancora ben conosciuti.

Grazie all’espressione dei geni marker introdotti con il transgene sarà possibile selezionare la pianta geneticamente modificata, osservando la presenza della nuova caratteristica introdotta. L’eliminazione delle sequenze non necessarie nel vettore per la sostituzione del transgene avviene tramite l’uso degli enzimi di restrizione, normalmente presenti nei batteri, essi infatti sono in grado di tagliare il DNA estraneo eventualmente infettante (batteriofago).

3. Metodo di trasformazione con l' *Agrobacterium Tumefaciens*:

Tale metodo consiste nell'isolare da una cellula animale o vegetale il gene desiderato ed inserirlo nel DNA di un batterio chiamato *Agrobacterium Tumefaciens*, che trasferisce parte del patrimonio genetico alle cellule che infetta¹¹ (Figura n° 2).

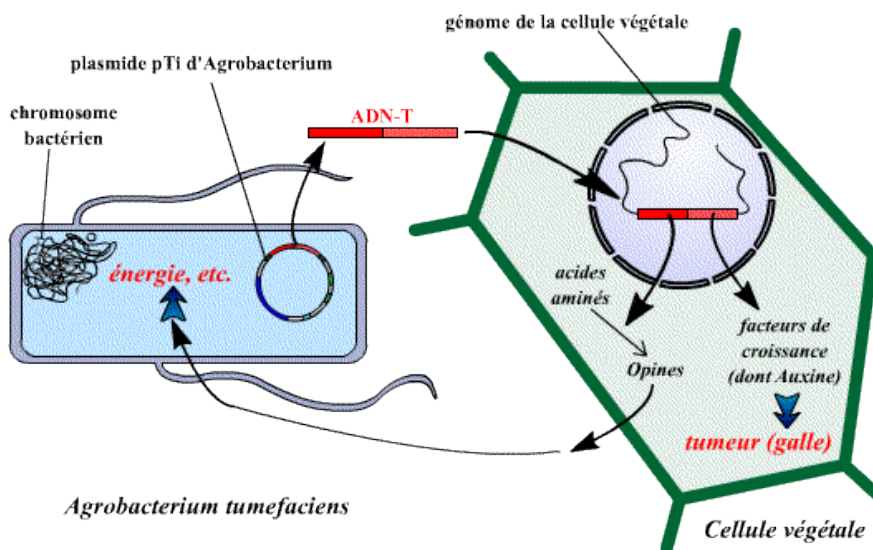


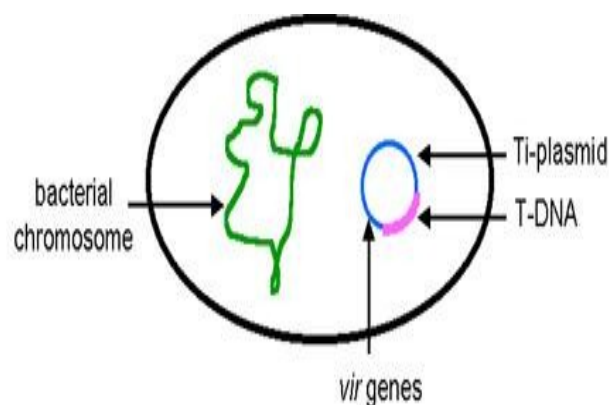
Figura n°2: Processo di infezione delle cellule vegetali da parte dell' *Agrobacterium Tumefaciens*.

L' *Agrobacterium tumefaciens* è un comune batterio Gram-negativo del suolo. Essendo un fitopatogeno causa il cosiddetto “tumore del colletto” nelle dicotiledoni (tra cui la vite, alberi da frutto, rose, ecc). La formazione del tumore (escrescenze antiestetiche che colpiscono piante ornamentali e da frutto) deriva dal trasferimento, integrazione ed espressione di alcuni geni

contenuti nel plasmidio **Ti** (*tumor inducing*), presente nel batterio, nei cromosomi delle cellule vegetali infettate dal batterio stesso.

Questa capacità dell'*A. tumefaciens* è stata sfruttata per inserire nel patrimonio genetico di alcune cellule precisi geni e altre sequenze di DNA¹¹.

Il protocollo classico prevede la coltivazione di cellule (ma anche tessuti o altri espianti) in piastre contenenti ceppi di *A. tumefaciens* con plasmidi Ti artificiali (opportunamente trasformati per fungere così da vettori del gene che si vuole introdurre nella pianta) trasportando il costrutto con i geni da trasferire (*Figura n° 3*).



*Figura n° 2: Coltivazione di cellule in terreni contenenti ceppi di *A. tumefaciens* i cui plasmidi Ti artificiali opportunamente trasformati veicolano il costrutto con i geni da trasferire¹¹.*

Perciò quello che bisogna fare per creare un OGM è prendere una copia del transgene da un organismo es: patata e trasferirlo in un altro, esempio pomodoro tramite l'*Agrobacterium tumefaciens*.

Questo processo non è possibile farlo in tutte le varietà vegetali commestibili come banana mais e frumento, in quanto in esse non è possibile l'infezione da parte del batterio, per questo motivo in tali piante si ricorre ad altre tecniche per la creazione di un OGM.

Infine grazie all'espressione dei geni marcatori presenti nel costrutto le cellule vegetali trasformate vengono successivamente selezionate, e trattate per indurre lo sviluppo di una intera pianta geneticamente modificata (PGM) (Figura n°4).

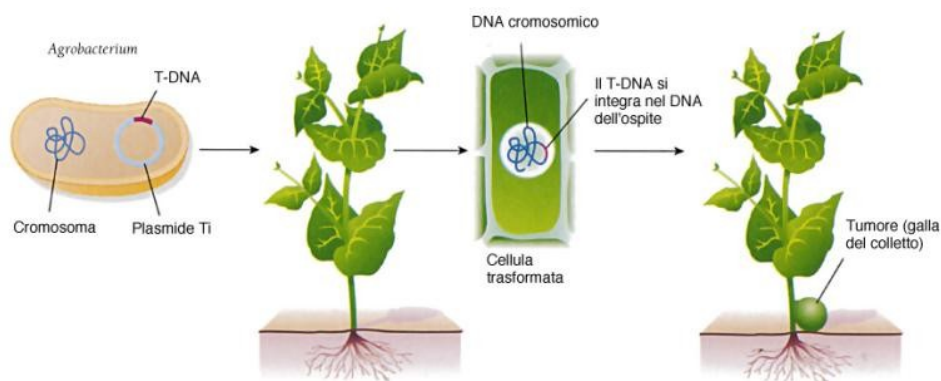


Figura n° 3: Trasformazione da *Agrobacterium*. La formazione del tumore deriva dal trasferimento, integrazione ed espressione di alcuni geni situati sul plasmidio Ti (tumor inducing), presente nel batterio, nelle cellule vegetali infettate dal batterio stesso¹¹.

L'unica accortezza è che prima della trasformazione della pianta, è importante verificare se il gene d'interesse è stato integrato con successo e in modo corretto nel plasmide. Considerando che il gene marcatore conferisce resistenza ad un antibiotico, è possibile selezionare i vegetali resistenti a

quell'antibiotico, i quali risulteranno in questo modo, geneticamente modificati.

Generalmente, il metodo appena descritto funziona bene con le dicotiledoni e recentemente sono stati messi a punto dei protocolli di trasformazione mediante *A. tumefaciens* anche per alcune monocotiledoni tra cui i principali cereali (riso, mais, grano, orzo) (*Figura n°5*).

Esempio:

- Il pomodoro è stata la prima pianta messa sul mercato, le caratteristiche ottenute grazie alle modificazioni sono state: dimensioni maggiori e conservazione più lunga.
- mais: Il più noto alimento transgenico è il mais Bt (Bt: *Bacillus thuringiensis*), molto più produttivo rispetto al mais non modificato, perché gli permette di uccidere le larve di lepidotteri e di resistere agli erbicidi.
- Soia trasgenica arricchita di acidi grassi per risolvere molte patologie cardiovascolari (trombosi, arteriosclerosi). Mentre la soia RR (Roundup ready) resistente agli erbicidi è stata spesso incriminata ma risulta comunque essere molto diffusa.

Una volta che nel genoma della cellula ospite si è integrato il DNA veicolato dal plasmide Ti, vengono selezionate le cellule modificate grazie

all'espressione di geni marcatori per produrre in seguito piante GM complete che esprimono il nuovo fenotipo desiderato.

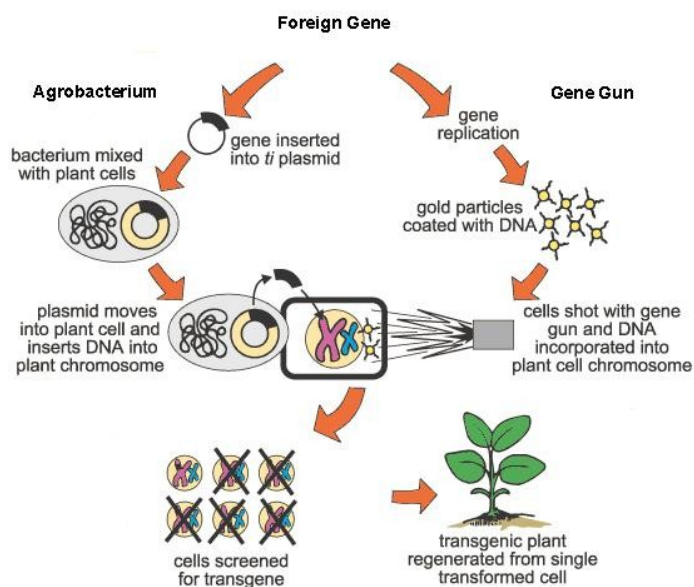


Figura n° 5: Confronto tra le due trasformazioni geniche con gene gun e *Agrobacterium*¹².

Infine sono state sviluppate nuove tecniche per il trasferimento dei geni endogeni nelle piante. La recente attenzione al rispetto dell'ambiente e alla riduzione dei rischi biologici, conseguente anche alla volontà di instaurare un dialogo rispettoso e costruttivo con la società da parte di alcuni ricercatori, ha prodotto una linea di ricerca che rappresenta una svolta significativa nelle biotecnologie vegetali: la messa a punto e l'impiego di costrutti diversi da quelli tradizionali per trasferire i geni nelle piante¹³. Infatti, il problema dei geni marcatori – da associare al gene di interesse da inserire – è un aspetto

cruciale di tutta la strategia, poiché consente di discriminare i tessuti che hanno inserito il gene esogeno da quelli che non lo hanno assunto. Generalmente sono impiegati, come marcatori, geni per la resistenza ad antibiotici: questo punto è uno degli aspetti più controversi e meno accettati dall'opinione pubblica, tanto che a breve essi saranno banditi (Direttiva 2001/18/CE).⁸

I nuovi costrutti sono stati ideati per trasferire ai tessuti vegetali geni marcatori a basso impatto ambientale¹⁴ o addirittura solamente il gene di interesse eliminando il marcatore, mediante cotrasformazione¹⁵, elementi transponibili, ricombinazione sito specifica¹⁶. Per sottolineare la loro caratteristica di maggior rispetto della costituzione “naturale” della pianta in cui inserire i geni, questi costrutti vengono definiti in vari modi, quali “ecocompatibili”, “eco-sostenibili”, “puliti”.

In conclusione, accanto agli aspetti puramente scientifici, per quanto riguarda l'impiego della tecnologia basata sul trasferimento genico per la produzione di piante geneticamente migliorate, la comunità scientifica ritiene che, curando gli aspetti di una corretta valutazione e gestione del rischio, evidenziando i vantaggi per il consumatore, valutando puntualmente il rapporto rischio/beneficio (biosicurezza) e perseguendo politiche di

condivisione del trasferimento tecnologico, a partire dallo studio di piante GM si potrebbe trovare lo spunto per mettere a fuoco approcci metodologici innovativi e per l'approfondimento della conoscenza degli aspetti biologici e molecolari, che sono considerati strumenti necessari per l'affermazione delle biotecnologie avanzate. In generale, le tecniche di ingegneria genetica non sono precise (non si può prevedere il sito di inserzione, il numero di copie del gene inserito, i livelli di espressione del gene), né pulite, in quanto producono una serie di cambiamenti non prevedibili (inserzione di frammenti di DNA extra, riarrangiamenti e delezioni) soprattutto a livello del sito di inserzione del costrutto nel genoma delle cellule modificate.

Infine, è molto importante l'attenzione che deve essere esercitata sulla gestione della commistione accidentale tra colture GM e non, dovuta alla presenza di impurezze nelle sementi, all'impollinazione incrociata, a piante spontanee (provenienti soprattutto da precedenti colturali), o anche da pratiche seguite per la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto e delle conseguenze economiche che ne possono derivare. Recenti studi evidenziano che è possibile la coesistenza tra coltura GM e non rispettando i criteri indicati dalla Raccomandazione Europea 556/2003¹⁷: trasparenza,

scientificità, proporzionalità e specificità e promuovendo azioni di monitoraggio e gestione delle pratiche di coesistenza adottate¹⁸.

2.3 Piante geneticamente modificate

Come precedentemente visto, un OGM è un organismo nel quale il materiale genetico è stato modificato con le varie tecniche di ingegneria genetica viste nel paragrafo precedente, dalle multinazionali Biotech con lo scopo di arricchire il loro fatturato, facendo credere la modifica introdotta nella pianta sia “innoqua” per l’intero ecosistema, anche se molti studi scientifici dimostrano il contrario.

Nello specifico, le modificazioni genetiche sono ottenute nel genoma dell’organismo da modificare mediante l’inserzione di un tratto sintetico di DNA, costituito da diversi frammenti provenienti da varie fonti.

Un inserto tipico è composto da 3 elementi (*Figura n°6*):

- 1- Il promotore, che funziona come un interruttore per la trascrizione del gene modificato e inserto (es: p35S);
- 2- Il gene o i geni modificati che codificano per i caratteri specificamente selezionati (es: Cry 1Ab);

3- Il terminatore che funziona come segnale di stop nella trascrizione del gene (es: tNOS). Inoltre in un costrutto genico possono essere presenti altri elementi il cui scopo è quello di controllare e stabilizzare la funzione del gene, di dimostrare la presenza del costrutto nell'OGM o di facilitare la combinazione dei vari elementi nel costrutto.

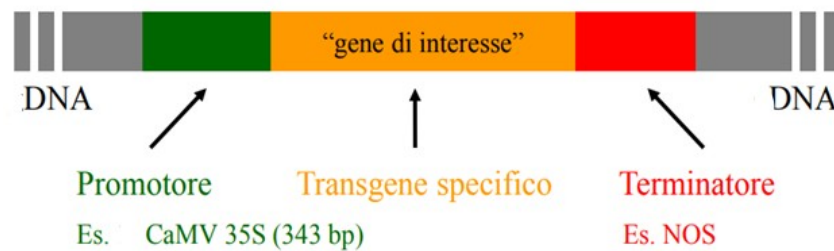


Figura n°6: figura generale di un inserto di DNA in grado di indurre modificazioni genetiche nel genoma della pianta.

Questo costrutto in base al transgene introdotto, codifica per nuove caratteristiche della pianta, ottenendo così PGM (Piante Geneticamente Modificate) che si possono raggruppare nelle seguenti categorie:

1. Piante tolleranti agli erbicidi:

Colture di mais, soia e bietola sono state modificate introducendo il **gene pat** il quale conferisce tolleranza agli erbicidi. Questa resistenza può esprimersi in diversi modi, attraverso il blocco dell'effetto tossico del diserbante sul metabolismo della pianta o attraverso la degradazione o la neutralizzazione del diserbante. Questo però ha come conseguenza che l'erbicida, usato in quantità maggiori, viene assorbito dalla pianta,

mentre gli effetti dell'erbicida integro sull'uomo sono noti, non si conoscono gli effetti che possono causare le molecole derivate dalla degradazione del diserbante, in quanto tali molecole potrebbero risultare più cancerogene, mutagene o tossiche del prodotto intatto.

Per esempio le colture GM con tale caratteristica sono Bt11, T25, DAS59122 per il mais, mentre per la soia è A2704-12.

2. Piante autoimmuni:

Sono piante transgeniche in grado di ottenere specie capaci di difendersi da sole dalle malattie o dai parassiti senza l'uso dei prodotti fitosanitari. Ad esempio in alcune piante è stato inserito il **gene Bt** (dal nome del *Bacillus thuringiensis*), che sviluppa una proteina tossica per alcuni parassiti litofagi ma non per i vertebrati. È il caso del mais Bt11 o del mais MON810 entrambi resistenti agli insetti e lepidotteri, ma troviamo anche piante di patata e pomodoro. Inoltre sono state create piante di patata, melone, tabacco e riso che resistono a virus specifici o piante resistenti ai funghi (tabacco).

3. Piante resistenti agli stress ambientali:

Sono piante modificate in modo che risultino resistenti e produttive anche a temperature vicine o inferiori ai zero gradi centigradi. Ad

esempio nella fragola è stato inserito un gene di un pesce artico cosicché si possano produrre fragole anche al gelo.

In Italia, la coltivazione di PGM è vietata, mentre è consentita l'importazione di tali prodotti, soprattutto per quanto riguarda il mais (*Tabella n°1*) e la soia (*Tabella n°2*)¹⁹. Ciò rappresenta una vera e propria contaminazione di molti prodotti alimentari.

Per esempio la soia e i suoi derivati, come la lecitina, sono presenti in centinaia di alimenti di uso comune e che spesso il consumatore acquista e utilizza senza sapere che questo ingrediente è presente. Tra gli usi più tipici della soia ci sono l'olio di soia per condire alimenti o utilizzato per la produzione della margarina o per cucinare, ma l'ingrediente più diffuso è la lecitina di soia che è addirittura uno degli ingredienti alimentari trasformati di più larga diffusione. Si trovano infatti in centinaia di alimenti come barrette di cioccolato, biscotti, cereali per la colazione, dolci, barrette dietetiche, oltre che in vari tipi di farmaci.

La soia ha tantissime proprietà benefiche, ma oggi si sta sempre più diffondendo la soia GM proprio per la maggior resistenza ai pesticidi. Ciò comporta una coltivazione molto meno costosa, garantisce un maggiore

raccolto e il diserbante viene distribuito spesso tramite un velivolo riducendo le spese per la manodopera, a favore di un maggiore guadagno finale.

Tabella 1 - Eventi Mais GM (gmo-crl.jrc.it)				
Nome Evento (identificatore unico UE)	Costrutto genico	Caratteristiche	Funzione	Proprietà e Autorizzazione UE
Bt11 (SYN-BTØ11-1)	p35S	promotore costitutivo del gene 35S di CaMV		Sygenta 19/05/2004
	tNos	terminatore nopalina sintasi derivato dal batterio Agrobacterium tumefaciens		
	Cry1Ab	sequenza codificante per l'endotossina Bt di Bacillus Thuringensis	conferisce resistenza agli insetti	
	pat	gene fosfino- tricino-acetil- trasferasi derivato da Streptomices higroscopicus	conferisce tolleranza agli erbicidi	
	Adh1	sequenza accessoria intronica 6 del gene dell'alcool deidrogenasi 1 di mais		

MON810 (MON- ØØ810Ø-6)	p35S	promotore costitutivo del gene 35S di CaMV		Monsanto 04/07/2017
	tNos	terminatore nopalina sintasi derivato dal batterio Agrobacterium tumefaciens		
	Cry1Ab	sequenza codificante per l'endotossina Bt di Bacillus Thuringensis	conferisce resistenza agli insetti	
	HSP70	sequenza accessoria heat shock protein		
T25 (ACS-ZMØØ3- 2)	p35S	promotore costitutivo del gene 35S di CaMV		Bayer 24/04/2015
	t35S	terminatore 35S dal CaMV		
	pat	gene fosfino- tricino-acetil- trasferasi derivato da Streptomices higroscopicus	conferisce tolleranza agli erbicidi (glufosinato ammonio)	
GA21 (MON-ØØØ21- 9)	p r-act	promotore derivato dall'actina di riso		Monsanto 13/01/2006
	tNos	terminatore nopalina sintasi derivato dal		

		batterio Agrobacterium tumefaciens		
	m-EPSPS	gene del mais	conferisce tolleranza agli erbicidi (glifosate)	
NK603 (MON- 00603- 6)	p35S	promotore costitutivo del gene 35S di CaMV		Monsanto 26/10/2004
	p r-act	promotore derivato dall'actina di riso		
	tNos	terminatore nopalina sintasi derivato dal batterio Agrobacterium tumefaciens		
	CP4- EPSPS	gene derivato da Agrobacterium tumefaciens	conferisce tolleranza agli erbicidi	
MON863 (MON- 00863- 5)	p35S	promotore costitutivo del gene 35S di CaMV		Monsanto 13/01/2006
	tNos	terminatore nopalina sintasi derivato dal batterio Agrobacterium tumefaciens		
	Cry3Bb1	deriva dalla tossina	conferisce	

		cry del Bacillus thuringensis subsp. Kumamotoensis	resistenza agli insetti	
--	--	--	-------------------------	--

Tabella n°2 - Eventi SOIA GM (gmo-crl.jrc.it)

Nome Evento (identificatore unico UE)	Costrutto genico	Funzione	Caratteristiche	Proprietà e Autorizzazione UE
Round up Ready (MON 40-3-2) (MON-Ø4Ø32-6)	p35S	promotore costitutivo del gene 35S di CaMV		Monsanto 10/02/2012
	tNos	terminatore nopalina sintasi derivato dal batterio Agrobacterium tumefaciens		
	CTP	sequenza segnale		
	CP4-EPSPS	gene d'interesse	tolleranza a erbicidi (glifosate)	

Il settore delle biotecnologie vegetali cerca di svilupparsi anche nel campo della biofarmaceutica, puntando a migliorare aspetti nutritivi negli alimenti o terapeutico. Vediamo per esempio i “nutraceutici”, cioè piante modificate con particolari caratteristiche nutrizionali aggiuntive, è il caso del “*Golden Rice*”, una varietà transgenica di riso arricchita del precursore della vitamina A⁴.

La produzione di biofarmaceutica, utilizzando piante GM studiate per produrre molecole ad alto valore aggiunto che oggi derivano da sintesi di diverso tipo (biologica e/o chimica). Da queste piante è possibile ottenere veri e propri farmaci⁴:

- **Vaccini:** possono essere conservati e distribuiti sotto forma di semi, tuberi o frutti, semplificando notevolmente i programmi di immunizzazione. Per esempio, si sta valutando l'efficacia, nell'indurre una risposta immunitaria protettiva, di piante di patata capaci di produrre un vaccino contro l'epatite B e contro l'enterotossina di *E.coli*, che causa dissenterie molto gravi²⁰. Un altro esempio sono i vaccini contro varie forme di allergia, dalla comune febbre da fieno e asma allergica, particolarmente diffuse nei paesi industrializzati, alla ben più grave celiachia.
- **Anticorpi** destinati a diagnosi o terapia, con rese e qualità superiori all'espressione basata su altri sistemi eterologhi.

Per esempio, una immunoglobulina complessa, espressa in piante di tabacco, in grado di arrestare l'attività dello *Streptococcus mutans*, il principale responsabile della carie dentaria o un anticorpo, espresso in piante di soia, contro l' Herpes Simplex Virus²¹.

2.3.1 Vantaggi

Gli alimenti costituiti o derivati da OGM e le piante geneticamente modificate (PGM) possono costituire per gli uomini, gli animali e l'ambiente sia un'importante risorsa sia un grave problema.

Ogni effetto sia ambientale che sanitario dovuto agli OGM deve essere considerato singolarmente. E' importante sottolineare che mentre le persone favorevoli alle agrobiotecnologie tendono ad evidenziarne i benefici, gli sfavorevoli sostengono con forza i possibili rischi per l'ambiente e per la salute umana e animale.

Le multinazionali infatti, sottolineano il grosso vantaggio, in termini di risparmio di risorse economiche e tempo, che le piante GM potrebbero offrire, consentendo un minor uso di pesticidi o di erbicidi, ed un aumento della produttività dei vegetali grazie all'introduzione in esse di un gene in grado di regolarne la crescita. Sostengono inoltre di fornire coltivazioni più resistenti e prodotti più nutrienti necessari per i Paesi meno sviluppati. Infine affermano

che tali prodotti GM, sono del tutto uguali a quelli naturali e non comportano nessun rischio per la salute umana ed animale, affermazione smentita da molti studiosi.

2.3.2 Rischi

Le maggiori preoccupazioni sull'uso di sementi GM sono date dalla sicurezza degli alimenti geneticamente modificati per la salute umana ed animale. Ciò è dovuto alla possibilità che gli alimenti GM possano provocare allergie o intolleranze alimentari poiché sono alimenti con nuove componenti per le quali non sono stati fatti studi sulle possibili reazioni allergiche ad essi correlate. Inoltre, effetti sub-acuti e di lungo periodo sono molto più difficilmente accertabili e controllabili degli effetti tossici di tipo acuto che invece possono essere generalmente previsti e prevenuti⁹.

Di seguito sono riportati alcuni esempi dei Rischi (occultati) associati all'uso e consumo degli OGM nel corso della storia:

- **1994:** Vengono commercializzati negli Stati Uniti i primi prodotti agroalimentari modificati geneticamente. Il pomodoro Flavr Savr prodotto dalla multinazionale Calgene è il primo ortaggio modificato geneticamente immesso sul mercato. La modifica del DNA ha lo scopo di bloccare il processo di maturazione e decomposizione del pomodoro

per prolungare la durata del prodotto dopo la raccolta. L'FDA dichiara ufficialmente che nei test effettuati non sono state trovate differenze fra i topi nutriti con pomodori OGM e i topi nutriti con pomodori non OGM, tenendo nascosta un'informazione molto importante, resa pubblica solo nel 1998: in alcune femmine dei topi usati nei test di laboratorio effettuati dalla Calgene, le analisi istologiche dello stomaco hanno evidenziato la presenza di necrosi nello stomaco.

- **1998:** Il Prof. Arpad Pusztai, microbiologo, ricercatore del “Rowett Research Institute” (Scozia) dichiara in un'intervista rilasciata alla Granada Television che i test effettuati su topi da laboratorio nutriti con patate transgeniche, da lui effettuati, hanno evidenziato un abbassamento delle difese immunitarie, alterazioni nello sviluppo degli organi vitali e la parziale atrofia del fegato, sviluppata in appena dieci giorni della nuova dieta.
- **1999:** La rivista Nature pubblica una ricerca sugli effetti nocivi del polline del mais transgenico sullo sviluppo delle farfalle monarca: dopo quattro giorni di dieta transgenica, il 44% delle larve (di 3-5 giorni) di farfalle Monarca muore. Le sopravvissute perdono l'appetito e si sviluppano poco.

- Nel **2010**, l'EFSA²² sottolinea la presenza di rischi ambientali associati alla coltivazione del mais Bt 11. Questa linea è un Mais modificato per essere in grado di produrre tossine derivate da un batterio del suolo, il *Bacillus thuringiensis* (Bt), così come il mais MON810, entrambi in grado di combattere la perdita di raccolto causata dagli insetti. Per questo motivo vengono coltivati su larga scala in tutto il mondo.

Le tossine Bt (Delta-endotosina) prodotte dalle linee di *zea mays* GM (Bt11 e MON810) sono potenzialmente in grado di danneggiare non solo i parassiti del mais (azione specifica contro la membrana cellulare dei Lepidotteri, tra cui la Piralide del mais europa- *Ostrinia nubilalis*-), ma anche altri insetti non bersaglio, tra cui farfalle, coccinelle e, se i residui raggiungono corsi d'acqua, anche organismi acquatici.

Nei paesi in cui piante Bt vengono coltivate, i parassiti sono diventati a loro volta resistenti alle tossine Bt, con conseguenti “perdite economiche sostanziali per gli agricoltori” (secondo un'analisi delle coltivazioni di OGM da parte della National Academies of Science Usa) a seguito della resistenza acquisita per il rilascio della tossina nell'ambiente circostante al campo OGM la quale crea un “alone” con dosi crescenti di tossina.

Il mais Bt è stato approvato per l'utilizzo in alimenti e mangimi dal precedente comitato scientifico della commissione europea, unicamente sulla base di uno studio su un pomodoro Bt e su alcuni esperimenti sui topi durati poche settimane: niente dimostrò la nocività del mais Bt ma niente dimostrò il contrario; le analisi invece condotte da diversi ricercatori dimostrano un aumento del contenuto di lignina nel mais Bt e cosa comporta questo per l'uomo nessuno lo sa, si sa comunque che per noi è impossibile digerirla.

Inoltre il mais Bt11 con tutte le sotto combinazioni (bt11x59122xmir604x1507xga21) risulta essere resistente a determinati agro farmaci contenenti sostanze come il glifosate.

Di seguito vengono elencati i principali rischi rappresentati dagli OGM .

2.3.2.1 Rischi Ecologici

- ***Inquinamento genetico:*** Possibile diffusione dei geni degli OGM attraverso il polline, ed essere trasferiti spontaneamente alle varietà non GM appartenenti alla medesima specie, provocando un inquinamento genetico spesso indesiderato. Così facendo si ha la perdita di diversità varietale e la semplificazione dei sistemi rurali, attribuibile alla diffusione delle colture geneticamente omogenee, di pochissime specie

GM, renderebbero gli agroecosistemi ulteriormente instabili e vulnerabili a nuovi patogeni o altri fattori di stress, mettendo a rischio la sicurezza alimentare di intere regioni.

- **Comportamento invasivo:** L'aumento della capacità adattativa e riproduttiva (fitness) di una pianta, è implicabile alle modificazioni del genoma di una pianta, tramite inserimento di geni estranei, trasformandola in un potenziale infestante nei campi coltivati o addirittura essere invasiva negli ambienti naturali. La stessa cosa potrebbe valere anche per gli ibridi derivanti dall'incrocio spontaneo tra colture GM e altre varietà non GM o specie selvatiche sessualmente compatibili. Questi ibridi potrebbero, ad esempio, evadere più facilmente i meccanismi di controllo naturali (attacchi di patogeni e fitofagi, stress idrici e termici, ecc.) e antropici (uso di erbicidi) grazie ai caratteri acquisiti per introgressione di particolari transgeni (cry, bar, epsps, ecc.) che conferiscono resistenza e/o tolleranza, molto comuni nelle piante GM maggiormente commercializzate. Alcune colture GM potrebbero acquistare un comportamento invasivo, per l'assenza di efficaci meccanismi di controllo naturali coevolutisi con le stesse piante GM, come le piante esotiche, determinando modifiche più o meno

importanti nella struttura e funzione degli ecosistemi naturali interessati.

- ***Possibile pericolosità delle piante transgeniche*** verso altri esseri viventi in quanto non vi è nessuna informazione scientifica sui prodotti di degradazione degli OGM. I loro derivati possono avere o meno un'elevata probabilità di essere maggiormente mutageni rispetto al prodotto non degradato.
- ***Acquisizione di resistenza agli antibiotici*** da parte di altri microrganismi patogeni o organismi conferita a causa dell'uso dei marcatori selettivi.
- ***Creazione di specie virali ibride*** con caratteristiche di virus resistenza in aree coltivate a piante transgeniche.

2.3.2.2 Rischi Sanitari

- ***Resistenze agli antibiotici trasmesse all'uomo:***

Grazie al Trasferimento genetico orizzontale, utilizzando alimenti contenenti geni per la resistenza agli antibiotici potrebbe determinare lo sviluppo di ceppi resistenti nella popolazione batterica residente nel tubo digerente degli animali, uomo compreso. Risulta, quindi, evidente il pericolo che anche

batteri patogeni per l'uomo o gli animali possano diventare dei "superbatteri" insensibili a specifiche classi di antibiotici.

- ***Aumento delle allergie:***

Il trasferimento di geni tra organismi viventi molto diversi tra loro può portare ad introdurre nella dieta geni e proteine mai consumate come alimenti in maniera significativa. Inoltre, potrebbero crearsi trasformazioni diverse da quelle che ci si aspettava dell'assetto genico, tali da causare la presenza di proteine modificate, che potrebbero risultare allergeniche. Per esempio, sono stati eseguiti dei Test effettuati su persone allergiche alla noce brasiliana che hanno dimostrato la sensibilità anche alla soia GM ricca di metionina prodotta dal transgene della noce (Nordlee et al., 1996).

- ***Eventuali effetti tossici di prodotti alimentari derivati da OGM:***

Il pericolo di tossicità potrebbe essere dovuto al fatto che, in seguito alla modificazione genetica, venga attivata e/o incrementata la produzione di altre proteine o sostanze nell'alimento intero. Un esempio molto noto è quello del mais MON863: gli studi tossicologici e nutrizionali effettuati dall'azienda produttrice, rilevavano differenze statisticamente significative in diversi parametri del sangue (globuli bianchi, glicemia, numero di granulociti ecc.) e delle urine degli animali usati come cavie. Inoltre, gli animali alimentati con il

mais geneticamente modificato mostravano evidenti lesioni al fegato, allo stomaco e al retto.

In conclusione, le PGM oltre ai possibili vantaggi e ai possibili rischi per la salute e per l'ambiente appena illustrati, e i fenomeni di resistenza che rendono le colture inefficaci, rimangono una minaccia reale per il nostro sistema agricolo che trova la sua ricchezza proprio nella straordinaria agro biodiversità del Paese e nella sapienza dei contadini che ben sanno come valorizzare semi e colture.

2.4 Paesi produttori

La coltivazione dei semi OGM di soia, mais, colza e cotone iniziò negli USA (69%), Argentina (15%), Messico, Australia e Cina (9%), grazie all'industria biotecnologica che riuscì a convincere alcuni dei governi più potenti al mondo che la biotecnologia in agricoltura può portare benefici; quali aumento della produzione, maggiori guadagni e un minor impiego di prodotti chimici. Soia, mais e colza OGM vengono utilizzati per il consumo umano e animale mentre gli oli derivati da OGM, l'amido di mais e la lectina di soia vengono usati in moltissimi alimenti lavorati.

Secondo il rapporto *dell'International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA), nei primi dieci anni di commercializzazione dei prodotti GM (1996-2005), l'area mondiale complessivamente destinata alla loro coltivazione nel 2005 raggiunse una crescita di circa 9 milioni rispetto all'anno 2000, arrivando ad occupare una superficie di circa 90 milioni di ettari²³.

In Europa le multinazionali chimico-farmaceutiche-biotecnologiche esercitando le più forti pressioni mai registrate nella storia del Parlamento Europeo, riescono a far approvare la legge che riconosce la brevettabilità degli organismi geneticamente modificati (Direttiva Europea 98/44), ma solo sei paesi la approvano a livello di legislazione nazionale, quali Danimarca, Finlandia, Irlanda, Regno Unito, Spagna e Grecia.

Dall'ottobre 98 al 2004, in applicazione del principio di precauzione, viene sospesa in Europa l'autorizzazione di nuovi prodotti transgenici, finchè non saranno definite nuove norme per l'autorizzazione e l'etichettatura di alimenti e mangimi OGM.

A livello globale, come illustrato in Figura n°7, il territorio degli Stati Uniti ospita l'area maggiormente coltivata a scopi commerciali (69%), mentre è

ancora molto limitata sul territorio dell'Unione Europea (1%). Ad oggi sono la Spagna e la Romania a detenere il primato come Paesi UE con la maggiore superficie destinata, rispettivamente, a colture di mais e soia GM. Anche in altri Paesi dell'Unione si possono trovare aree di coltivazioni GM, ad esempio in Francia, in Germania, in Portogallo e nella Repubblica Ceca²⁴.

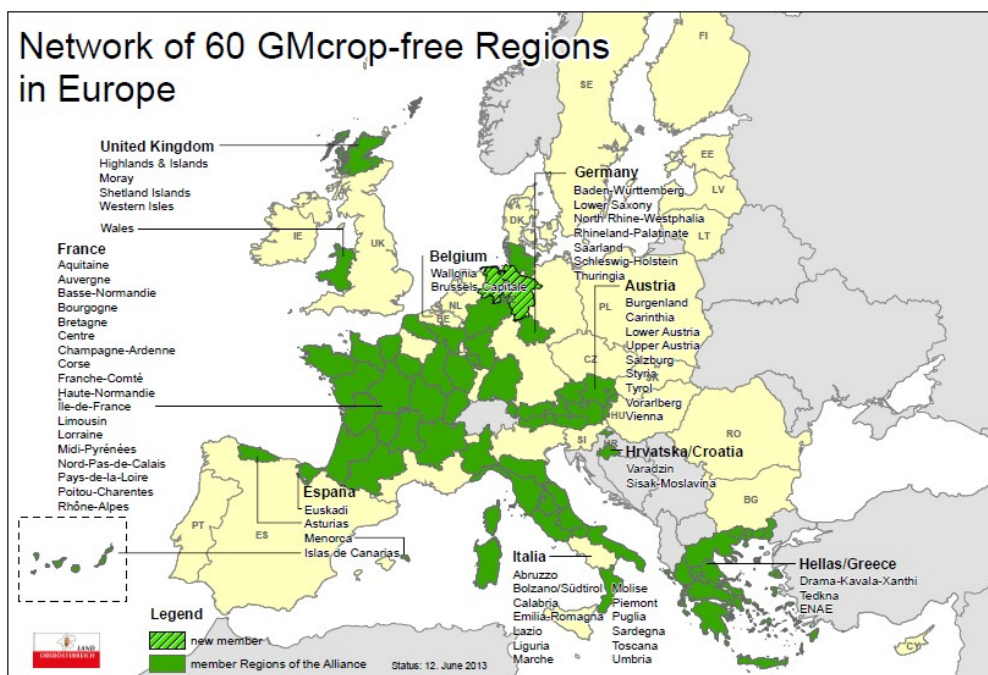


Figura n° 7: Mappa di 60 regioni OGM-free dell'EU evidenziate in verde, mentre il resto del territorio evidenziato in giallo mostra la coltivazione degli OGM.

In forza degli orientamenti di tipo precauzionale accolti all'interno dell'Unione Europea, il rilascio di OGM nell'ambiente e il loro accesso al mercato comunitario sono disciplinati da specifiche procedure autorizzative preliminari che devono garantire la sicurezza per i cittadini e per l'ambiente²⁵.

In particolar modo negli stati membri dell'UE è stata autorizzata l'immissione sul mercato di cinque vegetali geneticamente modificati:

- Mais: coltivazione e commercializzazione autorizzata in Francia e Spagna;
- Soia;
- Colza;
- Cicoria;
- Tabacco;

In Italia l'importazione della soia e del mais modificato geneticamente è permessa solo se immediatamente trasformati in alimenti e mangimi e non utilizzati per la coltivazione.

La Regione Marche non si presta alla coltivazione di Organismi Geneticamente Modificati (OGM) poiché le peculiari condizioni geografiche e morfologiche del nostro territorio, rendono difficile l'attuazione delle misure che permettano la coesistenza tra agricoltura biologica, convenzionale e agricoltura che si avvale degli OGM. Gli OGM non rientrano infatti nel modello di agricoltura regionale, che si caratterizza per una propria identità alimentare e che per rimanere competitivo produce diversità, con numerose eccellenze puntiformi²⁴.

Gli OGM ad oggi disponibili sul mercato riguardano principalmente mais in Europa e soia, cotone e colza nel resto del mondo, di conseguenza l'introduzione nel contesto europeo, ed italiano/marchigiano, non produrrebbe significativi effetti economici, trattandosi di materiale modificato oltre trent'anni fa per resistere agli erbicidi e creerebbe, per di più, un conflitto con il mondo produttivo biologico.

Il Nucleo operativo per la prevenzione e l'intervento in materia di organismi geneticamente modificati, con la collaborazione dei carabinieri forestali, ogni anno effettua delle verifiche in campo, su tutto il territorio regionale.

Nel 2018 sono stati campionati 79 siti, tutti risultati nella norma. Pertanto, la campagna 2018 non ha rilevato la presenza di mais OGM nelle Marche²⁴.

La ricerca riguarda lotti di sementi significativi sotto l'aspetto commerciale, non campionati a livello nazionale. L'analisi incrociata dei dati permette di valutare preventivamente la tipologia dei lotti, la loro conformità, la corrispondenza della documentazione alla normativa vigente.

L'obiettivo del Nucleo, "è quello di far convivere la prevenzione con la repressione per salvaguardare il valore aggiunto del paesaggio agroalimentare marchigiano, ricco di produzioni agricole tradizionali di elevata qualità, importanti sia dal punto di vista ambientale che economico e che rappresentano il Made in Italy a livello internazionale". Dal 2014 le Marche

sono Regione capofila in materia di OGM, indicate dalla Commissione politiche agricole della Conferenza delle Regioni e delle province autonome. A livello europeo, la Regione Marche è alla vicepresidenza della Rete delle 64 Regioni europee Ogm Free, dopo averla presieduta²⁴.

Capitolo terzo

NORMATIVE

3.1 Normative in vigore

L'immissione in commercio di un OGM destinato all'alimentazione umana e animale è possibile solo previa autorizzazione che si consegue al termine di un procedimento complesso, dove l'Autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA European Food Authority) svolge un ruolo cardine per la valutazione del rischio in riferimento agli effetti sull'ambiente, sulla salute umana ed animale. L'EFSA è chiamata infatti ad esprimere un parere scientifico entro sei mesi dalla presentazione della domanda di autorizzazione da parte del notificante e se l'OGM in esame viene autorizzato, l'autorizzazione ha validità 10 anni.

Il parere scientifico dell'EFSA viene inoltrato alla commissione europea e agli stati membri e sulla base di questi dati, la Commissione stessa può approvare o meno l'autorizzazione.

La validazione del metodo di rilevazione viene effettuata dal Laboratorio Comunitario di Riferimento (CRL), che ha sede presso il Joint Research Centre della commissione europea²⁶.

La direttiva principale a cui fa riferimento l' EFSA, è la 2001/18/CE ⁸ relativa al rilascio deliberato degli OGM nell'ambiente (coltivazione, biorisamento, ecc..) la quale è stata recentemente modificata dalla Direttiva (UE) 2015/412 (D.L. 14 Nov 2016 n.227), permettendo agli Stati membri di limitare o vietare la coltivazione di OGM sul proprio territorio.

Tale normativa contiene attualmente le principali norme che definiscono i processi di autorizzazione sia a scopo sperimentale che commerciale.

Vediamo infatti, che la normativa UE prevede i seguenti Regolamenti CE:

- n. 1829/2003, per gli usi nell'alimentazione umana e/o animale.
- n.1830/2003.

Questi regolamenti sono entrati in vigore nel 2004, ed hanno il duplice obiettivo di:

- proteggere la salute umana, animale e l'ambiente → un OGM può essere immesso sul mercato solo se autorizzato a seguito di un'accurata valutazione del rischio;
- assicurare la libera circolazione dei beni all'interno dell'Unione Europea.

I Regolamenti comunitari n. 1829/2003 e n. 1830/2003 gestiscono i requisiti di etichettatura e tracciabilità dei prodotti contenenti OGM, sia alimenti che

mangimi fornendo informazioni ai consumatori e utilizzatori di tali prodotti, permettendo loro di effettuare una scelta consapevole.

Il **Regolamento (CE) n. 1829/2003** ²⁷ stabilisce requisiti specifici in materia di etichettatura e fissa le soglie di tolleranza della presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di OGM. Per cui, anche gli alimenti derivati da OGM, destinati al consumatore finale o ai fornitori di alimenti per la collettività, devono riportare in etichetta la dicitura relativa alla presenza di OGM. Tale obbligo non si applica tuttavia agli alimenti che contengono OGM autorizzati, oppure sono costituiti o prodotti a partire da OGM autorizzati in proporzione non superiore allo 0,9% degli ingredienti alimentari, purché tale presenza sia accidentale o tecnicamente inevitabile (art. 12, comma 2 del Regolamento). La definizione della soglia di tolleranza sopra indicata scaturisce dalla impossibilità nell'Unione europea, come nei Paesi terzi, di impedire la presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di OGM nei prodotti convenzionali durante le fasi di coltivazione, manipolazione, stoccaggio, trasporto.

Con il **Regolamento (CE) n. 1831/2003** ⁶ per gli alimenti OGM devono essere rispettati anche i requisiti di tracciabilità che è definita, in modo specifico per questo settore, "come la capacità di rintracciare OGM e prodotti ottenuti da OGM in tutte le fasi dell'immissione in commercio attraverso la

catena di produzione e di distribuzione"⁸. Per garantire la tracciabilità gli operatori che trattano prodotti contenenti, costituiti o ottenuti da OGM hanno l'obbligo di fornire al successivo operatore della filiera, in tutte le fasi di produzione e distribuzione, una specifica informazione a riguardo.

Altre normative in vigore²⁷:

- Il regolamento (CE) n. 882/2004 sui controlli ufficiali effettuati per garantire la conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti, norme sulla salute e sul benessere degli animali, definisce i compiti della RL UE in relazione all'armonizzazione del controllo degli OGM in tutti gli Stati Membri dell'UE.
- Il regolamento (CE) n.1981/2006 per quanto riguarda il laboratorio comunitario di riferimento per gli organismi geneticamente modificati, istituisce una rete di laboratori nazionali di riferimento che sostengono l'EU-RL per quanto riguarda la convalida del metodo.
- Il regolamento (CE) n.834/2007, relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n.2092/91, stabilisce che gli OGM e i prodotti derivati o ottenuti da OGM non vanno usati come alimenti, mangimi, prodotti fitosanitari, concimi, sementi, in produzione biologica.

- Il regolamento (UE) n.691/2011, che stabilisce i metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale dei mangimi per quanto riguarda la presenza di materiale geneticamente modificato per il quale è pendente una procedura di autorizzazione o la cui autorizzazione è scaduta, rende un metodo di rilevazione convalidato una pre-condizione per la presenza a basso livello di altri OGM autorizzati nei mangimi.
- D.Lgs. n.227/2016, in vigore dall'11 Dicembre 2016, che recepisce la direttiva europea 2015/412, dà la possibilità all'Italia di limitare o vietare la coltivazione di organismi geneticamente modificati sul proprio territorio.

La Commissione Europea nel 2013 ha condotto uno studio sulla etichettatura "OGM-free" (indica sia un prodotto privo di OGM, sia un processo privo di OGM) con l'obiettivo di armonizzare tale dicitura a livello europeo, ciò ha fatto emergere che la situazione nei diversi Stati Membri è estremamente variegata. Infatti, in alcuni Stati Membri, quali Germania, Austria, Francia e Olanda, sono presenti linee guida e in alcuni casi anche un supporto per facilitare l'uso di etichettatura che attesti l'assenza di OGM, mentre in altri come la Svezia la legislazione vieta questa etichettatura.

In Italia l'uso dell'etichetta "OGM-free" è superflua in quanto il non uso di OGM è uno dei requisiti previsti da specifici disciplinari di produzione, ad esempio biologico, DOP o IGP. Ciononostante, i diversi operatori, per motivi di marketing e per l'esistenza di una attività di certificazione non-OGM, i cui requisiti minimi sono codificati da un Regolamento tecnico di ACCREDIA (Ente Italiano di Accreditamento), preferiscono rendere esplicita l'indicazione "OGM-free" al consumatore, sia in ambito mangimistico sia nell'alimentazione umana.

Gli OGM, una volta superata la procedura di autorizzazione, vengono inseriti nel "registro comunitario degli alimenti e dei mangimi geneticamente modificati". Al momento attuale sono autorizzati (OGM<0.9%) all'immissione in commercio diversi OGM (*Tabella n° 3*) e molti altri sono ancora in fase di valutazione scientifica e di autorizzazione (*Tabella n° 4*) (OGM non autorizzati, il regolamento stabilisce una soglia di tolleranza dello 0.5% purchè la loro presenza sia accidentale o tecnicamente inevitabile).²⁸

Tabella n°3: eventi OGM autorizzati dalla Commissione europea all'immissione in commercio ed iscritti nel registro degli OGM dell'UE (regolamento CE 1829/2003).

Registro degli OGM dell'UE (regolamento CE 1829/2003)				
Coltura	Evento di trasformazione genetica	Azienda produttrice	Geni introdotti/ caratteristiche	Autorizzazione
MAIS	Bt 11	Syngenta	gene cry1A (b): conferisce resistenza agli insetti; gene pat: conferisce tolleranza all'erbicida glufosinate-ammonio.	28/07/2010 Rinnovo in corso
	DAS59122	Pioneer e Dow AgroSciences	i geni cry34Ab1 e cry35Ab1: conferiscono protezione contro alcuni parassiti del coleottero; gene pat del rootworm del mais occidentale: conferisce tolleranza all'erbicida glufosinato-ammonio.	08/03/2018
	DAS1507	Pioneer e Dow AgroSciences	gene cry1F: conferisce resistenza alla trivellatrice europea e alcuni altri batteri lepidotteri; gene pat pat: conferisce tolleranza all'erbicida glufosinato-ammonio.	21/12/2017
	GA21	Syngenta	gene mepsps: conferisce tolleranza al diserbante glifosato.	08/03/2018

	MON810	Monsanto	gene cry1A (b): conferisce resistenza ai parassiti lepidotteri.	03/08/1998: semi per coltivazione; 06/11/2013: polline prodotto dal mais MON810; 04/07/2017: alimenti e ingredienti alimentari prodotti da MON810; mangimi contenenti o costituiti da mais MON810.
	NK603	Monsanto	cp4 epsps: conferisce tolleranza agli erbicidi glifosati.	24/04/2015
	T25	Bayer	gene pat: conferisce tolleranza all'erbicida glufosinate-ammonio.	24/04/2015
	MON88017	Monsanto	gene cry3Bb1 modificato: conferisce protezione a determinati parassiti del coleottero; gene cp4 epsps: conferisce tolleranza agli erbicidi glifosati.	30/10/2009 Rinnovo in corso
	MON89034	Monsanto	geni cry1A.105 e cry2 Ab2: conferiscono protezione a determinati parassiti lepidotteri.	30/10/2009
	MIR604	Syngenta	gene cry3A modificato: conferisce protezione contro alcuni parassiti del	30/11/2009

			coleottero; gene pmi inserito come marcatore di selezione.	
	MON 87427	Monsanto	gene cp4 epsps: conferisce tolleranza selettiva dei tessuti agli erbicidi glifosati.	12/04/2015
	MON 87460	Monsanto	gene cspB: conferisce una riduzione della perdita di resa causata dallo stress siccità; gene nptII inserito come marcatore di selezione.	24/04/2015
	MIR162	Syngenta	gene vip3Aa20: conferisce resistenza agli insetti.	18/10/2012

SOIA	A2704-12	Bayer	gene pat: conferisce tolleranza all'erbicida glufosinato-ammonio.	08/09/2008 Rinnovo in corso
	MON89788	Monsanto	gene cp4 epsps: conferisce tolleranza al diserbante glifosato.	04/12/2008
	MON40-3-2	Monsanto	gene cp4 epsps: conferisce tolleranza al diserbante glifosato.	10/02/2012
	MON87701	Monsanto	gene cry1Ac: conferisce protezione contro alcuni parassiti lepidotteri.	10/02/2012
	356043	Pioneer	gene gat: conferisce tolleranza all'erbicida glifosato;	10/02/2012

			gene gm-hra: conferisce tolleranza all'erbicida che inibisce la SLA.	
--	--	--	---	--

COTONE	T304-40	Bayer	gene pat: conferisce tolleranza agli erbicidi glufosinato- ammonio; gene cry1Ab: conferisce protezione contro alcuni parassiti lepidotteri.	24/04/2015
	GHB119	Bayer CropScience	gene pat: conferisce tolleranza agli erbicidi glufosinato- ammonio; gene cry2Ae: conferisce protezione contro alcuni parassiti lepidotteri.	07/04/2017
COLZA	T45	Bayer	gene pat: conferisce tolleranza agli erbicidi glufosinato- ammonio.	20/03/2009 Rinnovo in corso
	MON 88302	Monsanto	gene cp4 epsps conferisce tolleranza agli erbicidi glifosati.	24/04/2015

Tabella n° 4: le tabelle sotto riportate, elencano il materiale GM, che attualmente soddisfa i requisiti del regolamento (CE) n. 619/2011 che stabilisce i metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale dei mangimi per quanto riguarda la presenza di materiale geneticamente modificato per il quale è in corso una procedura di autorizzazione o l'autorizzazione è scaduta.

Tabella OGM, che attualmente soddisfano i requisiti del regolamento (CE) n. 619/2011	
OGM in attesa di Autorizzazione	
Evento transegico	Gene introdotto/ caratteristica
Mais 3272 geneticamente modificato con una alfa-amilasi termotollerante, per usi alimentari e mangimi, importazione e trasformazione ai sensi del regolamento (CE) n. 1829 / 2003 da Syngenta Crop Protection AG.	Introduzione del gene amy797E di <i>Thermococcales</i> (batterio termostabile). Il gene pmi esprime la proteina PMI, che consente alle piante trasformate di utilizzare il mannosio come fonte di energia e viene utilizzato come marcatore selezionabile.
Soia DAS-81419-2 resistente agli insetti geneticamente modificata per usi alimentari e mangimi, importazione e trasformazione ai sensi del regolamento (CE) N. 1829/2003.	Introduzione del gene Cry1F e Cry1Ac per conferire resistenza agli insetti lepidotteri nonché l'inserzione del gene pat che provoca la sintesi della fosfinotricina N-acetiltransferasi offrendo così tolleranza agli erbicidi al glufosinato.
Cotone MON 88701 tollerante agli erbicidi per usi alimentari e mangimi, importazione e trasformazione ai sensi del regolamento (CE) n. 1829 / 2003.	Cotone modificato con l'inserimento della cassetta di trasformazione contenente il gene Dicamba monoossigenasi (DMO) e il gene della resistenza al Bialaphos (BAR) per conferire resistenza rispettivamente agli erbicidi Dicamba e Glufosinate.

OGM Ritirati	
Evento transegico	Motivazione
ritiro dal mercato del granturco Bt176 (SYN-EV176-9) e dei suoi prodotti derivati [notificata con il numero C (2007) 1804].	Il notificante ha dichiarato di aver sospeso la vendita di sementi del granturco SYN-EV176-9 nella Comunità dopo la stagione di semina del 2005.
ritiro dal mercato di prodotti esistenti derivati da MON 863 (MON-ØØ863-5) [notificato sotto il documento C (2016) 204].	La Monsanto Europe SA ha dichiarato di non commercializzare più questi prodotti nell'UE.

L'utilizzo di OGM autorizzati alla semina pone però il problema di gestire la presenza accidentale di prodotti agricoli transgenici, dovuta per esempio a impollinazione incrociata, o alle pratiche eseguite dopo la raccolta, durante i trasporti o lavorazioni nella filiera produttiva.

La commissione ha espresso dei principi in base ai quali l'agricoltore può scegliere quale tipo di coltura praticare, se tradizionale, biologica o transgenica; tali principi precisano le linee guida per l'elaborazione da parte degli Stati membri di strategie nazionali che consentano la coesistenza di colture GM con colture tradizionali e dell'agricoltura biologica.²⁸

L'autorizzazione istituita dalle autorità europee ha lo scopo di garantire da un lato la sicurezza della salute e dell'ambiente, e dall'altro la libertà di scelta del consumatore.

Inoltre per tener sotto controllo la produzione di un nuovo organismo GM ed il suo utilizzo, si utilizza la valutazione dei rischi (ERA Environmental Risk Assessment) che deve accompagnare la notifica di ogni nuovo organismo e/o prodotto GM, l'etichettatura obbligatoria e la tracciabilità dei prodotti contenenti materiale GM sopra certe soglie prestabilite.²⁹

3.2 Normativa vigente nella provincia di Ancona²⁴

La Regione Marche dal 2003 intraprende attività necessarie per la prevenzione e l'intervento di contrasto in materia di OGM. Grazie al D.G.R. 1265 del 22 settembre 2003 è stato istituito un "Nucleo operativo per la prevenzione e l'intervento in materia di OGM" il quale, dal 2004 esegue, annualmente, dei Piani complessivi delle attività necessarie per la prevenzione e l'intervento di contrasto in materia di OGM preventivi alle campagne di semina di mais e soia, che prevedono il controllo delle sementi di mais e soia per la presenza di OGM, il controllo annuale sugli alimenti animali, nonché attività di informazione e comunicazione verso gli agricoltori ed i consumatori.

Dal 2010, la Regione Marche ha assunto la Presidenza della Rete delle Regioni e Autonomie locali libere da OGM. La Rete, che conta attualmente 64 regioni europee per oltre 150 milioni di abitanti su 9 Stati, vuole ribadire la libertà di scelta dei governi europei di vietare le coltivazioni geneticamente modificate nei propri territori al fine di tutelare la biodiversità, le produzioni di qualità biologiche, tradizionali e tipiche, l'immagine di un territorio - anche in chiave turistica - per un'agricoltura sostenibile dal punto di vista ambientale, sociale ed economico.

Pertanto, il Piano nazionale di controllo ufficiale sulla presenza di organismi geneticamente modificati negli alimenti - ANNO 2018- eseguito sul territorio marchigiano, ha mostrato che tutte le positività, per la maggior parte dei campioni mostrano una presenza di OGM autorizzati molto bassa, tutte inferiori al LOQ tranne una, senza riscontro di non conformità. Mentre all'importazione 2 campioni sono risultati non conformi per il riscontro di riso GM non autorizzato in prodotti provenienti dalla Cina.

Per quanto riguarda la Provincia di Ancona, è da considerare OGM-free.

Capitolo quarto

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della Tesi è validare una nuova metodica nel rilevamento degli OGM apportando una modifica nella metodica già in uso. Per questo, ogni modifica che si vuole apportare alle procedure analitiche di laboratorio richiede un'attività di ricerca e sviluppo per valutare l'impatto che la modifica stessa reca sulle performance della procedura analitica al fine di garantire l'ottenimento di un risultato affidabile in termini di precisione e riproducibilità del dato.

Le metodiche di Biologia Molecolare in uso presso il laboratorio Agroalimentare Bioaesis, si basano sulla tecnica della Real-Time PCR e prevedono nella fase di preparazione della miscela di reazione l'utilizzo di reagenti separati: Buffer della taq senza magnesio cloruro, magnesio cloruro, nucleotidi e taq polimerasi.

La modifica da apportare per ridurre i costi e i tempi di preparazione della reazione di analisi è di sostituire i reagenti separati con il prodotto del fornitore Euroclone "Wonder Taq polymerase" che contiene oltre alla Taq polymerase anche il Buffer di reazione contenente il tampone di reazione della taq, il magnesio cloruro e i nucleotidi.

La fase sperimentale della Tesi ha così previsto l'esecuzione di test per la sostituzione dei reagenti in uso (mix separata) con il Buffer 5X nelle seguenti metodiche analitiche:

- **Qualitativa promotore 35s e terminatore NOS**
- **Qualitativa mais (Bt11, MON810, MON863, NK603, GA21, DAS1507, DAS59122, MIR604, T25, MON89034, MON88017)**
- **Qualitativa soia (MON40-3-2, A2704-12, MON89788)**
- **Quantitativa mais Bt11, MON810, MON863, NK603, GA21, DAS1507, DAS59122, MIR604, T25, MON88017**
- **uantitativa soia MON40-3-2, A2704-12, MON89788**

I campioni utilizzati per eseguire la validazione dei nuovi metodi sono rappresentati da DNA estratti da materiali di riferimento certificato e da campioni di diversa matrice (soia, mais o mangime) provenienti da aziende produttrici esterne.

Pertanto, l'obbiettivo ultimo della validazione delle nuove metodichea è di ridefinire i limiti LoD e il LoQ che approfondiremo nei capitoli successivi.

Capitolo quinto

TECNICHE ANALITICHE PER LA RINTRACCIABILITA' DEGLI OGM

Come già discusso, i Regolamenti Europei stabiliscono l'obbligo di etichettatura per tutti i prodotti che contengono OGM, con una soglia di tolleranza fissata allo 0,9% per gli OGM autorizzati e allo 0,5% per gli OGM in via di autorizzazione, già approvati dal comitato scientifico europeo. Pertanto, risulta di cruciale importanza la disponibilità di tecniche che consentano di identificare e quantificare in modo accurato e preciso la presenza di OGM negli alimenti e nei mangimi, al fine di controllare la corretta applicazione della legislazione comunitaria.

Le due principali tecniche analitiche attualmente in uso che consentono di identificare e quantificare in modo accurato e preciso la presenza di OGM in alimenti e mangimi, sono:

- a) tecniche basate sull'analisi del DNA ricombinante introdotto nell'organismo ospite, definite PCR "*Polymerase Chain Reaction*".
- b) tecniche immunoenzimatiche basate sull'analisi delle proteine espresse dal gene introdotto, per esempio la tecnica ELISA.

Entrambe le tecniche possiedono vantaggi e svantaggi: le prime (a) sono molto sensibili e consentono di raggiungere la massima specificità, mentre le seconde (b) sono poco specifici e sensibili ma, più economiche, semplici e veloci.

Inoltre i metodi basati sulle proteine sono ampiamente usati per rapidi screening dei materiali vegetali direttamente dal campo o dal raccolto e solitamente non sono adatti al rilevamento di OGM nei prodotti trasformati a causa del degrado delle molecole. Per quanto riguarda i metodi basati sul DNA richiedono più tempo ma offrono potenzialmente tutti i livelli richiesti di specificità e capacità di quantificare l'obiettivo.

La scelta di quale tecnica applicare ad un'analisi dipende dalla tipologia del campione: tessuti vegetali, semi, sfarinati o alimenti processati e composti, infatti, sono matrici decisamente differenti non solo in termini di complessità, ma principalmente per quanto riguarda la degradazione degli acidi nucleici e della componente proteica.³⁰

Vediamo nello specifico le seguenti tecniche:

- **Tecniche immunoenzimatiche:**

Le tecniche immunoenzimatiche sono economiche, semplici e veloci però poco specifiche e sensibili. Infatti è noto che la modificazione genica non è

sempre specificamente indirizzata alla produzione di una nuova proteina e non sempre promuove sufficienti livelli di espressione proteici al fine di essere rilevata. In aggiunta, certe proteine possono essere solo espresse in parti specifiche della pianta o espresse a livelli differenti in parti distinte o durante fasi differenti dello sviluppo fisiologico. I livelli di espressione del transgene prodotti in piante sono stati riferiti in un range tra 0 e 2% sul totale delle proteine solubili, anche quando forti promotori costitutivi vennero usati per forzare l'espressione. In molti casi, tuttavia, i livelli di espressione riportata sono stati più bassi del limite massimo del 2%. Inoltre esistono problemi quali la possibilità che le proteine vengano degradate durante i procedimenti di lavorazione (ad esempio durante la cottura), che limitano l'utilizzo di tale tecnica solo a materie prime non lavorate. Tra l'altro queste tecniche hanno una bassa sensibilità ed una elevata specificità: è necessario infatti un test specifico per ogni singolo OGM. Inoltre non sempre una modificazione genetica dà origine ad una proteina¹⁹.

In generale, i saggi immunologici sono diretti ad evidenziare le proteine transgeniche codificate dal gene esogeno, mediante una reazione antigene-anticorpo.

Le tecniche più usate in questo campo sono l'ELISA e il Western blot. Tali metodologie semi-quantitative, tuttavia, necessitano di disporre di estratti

proteici non degradati, requisito non ottenibile per matrici molto processate; inoltre, l'accumulo differenziale della proteina transgenica nei differenti tessuti vegetali potrebbe generare risultati fittizi.

La principale tecnica immunoenzimatica utilizzata nell'analisi degli OGM è la tecnica ELISA: analisi immunoassorbente di legami enzimatici.

In breve, la tecnica ELISA è un saggio immunologico basato su un legame specifico dell'anticorpo e dell'antigene. Gli anticorpi sono creati iniettando la sostanza da rilevare (ad esempio CP4 EPSPS, la proteina che conferisce resistenza all'erbicida Roundup) su animali quali conigli e topi, dove cellule del corpo riconoscono la sostanza come estranea e rispondono producendo anticorpi contro di essa. Gli anticorpi poi sono purificati e usati come reagenti per rivelare la sostanza di interesse.

-Analisi del DNA:

L'analisi del DNA si basa principalmente sulla tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (reazione a catena della polimerasi) che consente l'amplificazione di specifiche sequenze di DNA. Nel caso degli OGM, queste sono le sequenze esogene trasferite alla pianta da cui deriva il campione in esame.

Questa tecnica può essere di tipo qualitativa (end-point) o quantitativa, la quale quest'ultima impiega la Real-time PCR, o PCR in tempo reale, reazione che consente di risalire alla percentuale di OGM presente in un campione grazie all'uso della curva standard. Nello specifico di questa tesi, verrà eseguita la Real-time PCR anche per le analisi qualitative senza utilizzare la curva standard.

Accanto a queste tecniche per la rintracciabilità degli OGM più largamente utilizzate, sono in corso di studi, nuove applicazioni avanzate quali: elettroforesi 2-D, elettroforesi capillare, separazioni multidimensionali in cromatografia di affinità, *protein chips*, *microarrays* a DNA e PNA, tecniche di spettrometria di massa MALDI-TOF-MS ed *electrospray*³¹.

Qualunque sia la tecnica utilizzata, per garantire risultati affidabili è necessario ottimizzarne vari aspetti legati alla qualità: procedure, reagenti, strumentazione ed operatori. Risulta pertanto di cruciale importanza la “*validazione*” dei metodi.

L'analisi Real-time PCR, per essere validata secondo la normativa europea deve rispettare diversi parametri statistici (precisione, riproducibilità, accuratezza) ma è anche caratterizzata da altri aspetti come: calibratori, geni

di riferimento, metodi di quantificazione metodi di rilevazione l'unità di misura e analisi statistica di base.

Capitolo sesto

FLUSSO ANALITICO PER LA RICERCA DEGLI OGM AUTORIZZATI NELL'UNIONE EUROPEA

Durante il processo di autorizzazione di un nuovo evento GM il richiedente è tenuto a fornire il metodo analitico per il rilevamento e la quantificazione dell'evento di trasformazione sottoposto ad autorizzazione, insieme a materiali di riferimento e controlli. Il metodo di rilevazione (qPCR) viene poi validato dal laboratorio europeo di riferimento³² assistito dalla rete europea di laboratori OGM (ENGL – European Network of GMO Laboratories). I materiali di riferimento e i metodi validati sono resi pubblici e sono disponibili per i laboratori che svolgono analisi OGM.

Nella definizione del flusso analitico, prima di arrivare all'eventuale quantificazione dell'evento, è tuttavia opportuno prevedere dei passaggi preliminari che consentono di ottimizzare i costi.

Il flusso analitico inizia con la verifica della presenza della specie vegetale del campione di analisi (soia, mais, cotone etc), mediante la ricerca del relativo sistema di riferimento specie specifico (sistema endogeno).

Una volta riscontrata la presenza della specie vegetale nel campione si procede con ulteriori indagini a diverso grado di specificità, che conducono all'identificazione di eventuali OGM:

- Identificazione di elementi genetici (codificanti o regolativi) presenti in diversi OGM, sono generalmente utilizzati per effettuare lo screening per la presenza/assenza di OGM nel campione, in quanto sono spesso inseriti in molte piante transgeniche attualmente commercializzate. Quelli maggiormente utilizzati sono ad esempio il promotore 35S, il terminatore Nos, il gene cp4-epsps, il gene nptII, il gene pat, il gene bar ed altri ancora. Il rilevamento di queste sequenze non è comunque sufficiente a dimostrare la presenza di un OGM e a questo livello di specificità non è possibile identificare l'OGM responsabile di eventuali positività³³. Per questo motivo è sempre necessario procedere con test a specificità maggiore.
- Identificazione di singoli eventi GM (*Figura n°8*): ciascun costrutto genico si inserisce in un punto del DNA della pianta che è unico e che caratterizza l'evento GM. I metodi evento specifici hanno come bersaglio la regione di giunzione unica tra il DNA transgenico e il DNA della pianta. Tale livello di specificità è quello richiesto dalla normativa europea⁸.

- Quantificazione dei singoli eventi GM precedentemente identificati.

I metodi quantitativi adottati nell'UE consistono di due sistemi di amplificazione in Real-time PCR, uno specifico per l'evento geneticamente modificato, l'altro specifico per la specie di appartenenza dell'evento geneticamente modificato (ad es. soia, mais, cotone etc). Dalla combinazione dei risultati ottenuti dalle due reazioni, è possibile effettuare una quantificazione relativa dell'evento geneticamente modificato in oggetto rispetto alla specie di appartenenza. In questo modo è possibile confrontare la percentuale riscontrata nel campione con il limite legale dello 0,9%, oltre il quale è obbligatorio specificare in etichetta la presenza di tale ingrediente geneticamente modificato nel prodotto alimentare.

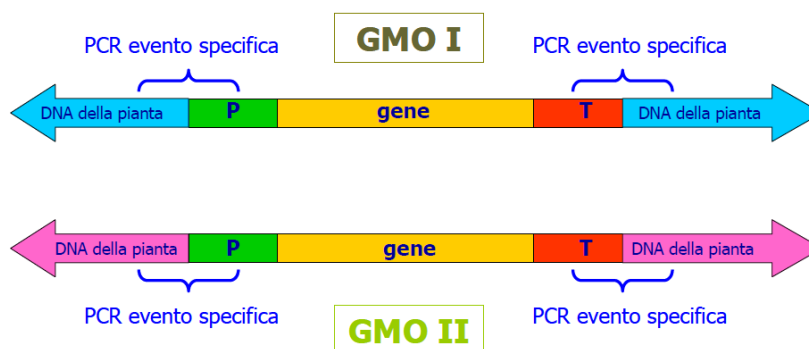


Figura n°8: mostra due eventi GMO diversi (GMO I e II) che presentano lo stesso costrutto (P: promotore, sequenza codificante e T: terminatore). Per esempio il mais Bt10 e il mais Bt11 sono 2 eventi con lo stesso costrutto, ma mentre il secondo risulta autorizzato, per il primo non ha mai stata inoltrata richiesta di autorizzazione.

I laboratori che eseguono le analisi di rintracciabilità degli OGM, devono soddisfare i requisiti della norma ISO 17025 e usare metodi d'analisi quantitativi convalidati dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea in collaborazione con la rete europea dei laboratori OGM (European Network of GMO Laboratories). Considerando l'intero metodo analitico a partire dal trattamento del campione di laboratorio del mangime, essi devono garantire di essere in grado di effettuare le analisi con adeguata precisione a livello dello 0,1 % riferito alla frazione di massa del materiale GM nel mangime (deviazione standard relativa di ripetibilità pari o inferiore al 25 %). Tale limite dello 0,1% è definito come limite minimo di rendimento richiesto (LMRR). La decisione sulla non conformità di un campione per esempio il mangime, può essere presa solo quando il materiale GM, che rientri nel campo di applicazione di questo regolamento, è presente a livelli pari o superiori all'LMRR, tenuto conto dell'incertezza di misurazione.

Capitolo settimo

VALIDAZIONE DEI METODI DI PROVA

7.1 Procedura di validazione

La Real-time PCR e tutti i metodi analitici utilizzati per l'analisi di alimenti per la nutrizione umana ed animale, in accordo al Regolamento 882/2004/CE, per essere accettati dall'Autorità Comunitaria competente, devono essere validati dal *Community Reference Laboratory* (CRL) e dall' *European Network of GMO Laboratories* (ENGL).

Affinchè un metodo possa essere ammesso al processo di validazione deve avere determinate caratteristiche, in accordo al documento stilato dall'ENGL

34

La validazione di un metodo di prova è la conferma attraverso una serie di prove che i requisiti previsti per l'utilizzo del metodo stesso siano soddisfatti.

In particolar modo, prima di passare alla validazione finale, un metodo deve essere progettato, sviluppato ed eseguita in contemporanea una validazione preliminare allo scopo di ottimizzare le varie fasi analitiche.

Se i risultati non sono soddisfacenti è necessario eseguire modifiche alla fase di progettazione del metodo e ritornare alla fase di sviluppo e verifica fino a quando le prestazioni ottenute non soddisfano gli scopi del metodo. A questo

punto viene realizzata la validazione finale del metodo che permette di assicurarne le prestazioni⁷.

Per esempio, quando vengono effettuati cambiamenti del metodo di prova come nel nostro caso in cui si sostituisce il 10X Reaction Buffer con il Buffer 5x, o viene introdotta della nuova apparecchiatura, vengono eseguite delle prove per verificare se ci sono influenze nelle risposte. Nel caso in cui si abbiano scostamenti nella risposta del metodo verrà eseguita una nuova validazione, al termine della quale verrà redatta la “dichiarazione di validazione del metodo”.

Gli studi di validazione si basano sulla determinazione di parametri indicativi delle prestazioni globali del metodo di prova, che comprendono:

- Specificità → capacità di un metodo di identificare campioni negativi:

Viene valutata determinando la % di risultati negativi ottenuti analizzando campioni che non presentano l'analita in esame. La determinazione della specificità fornisce anche, indirettamente, la % di campioni falsi positivi, che sarà pari a: $100 - \text{specificità}$ (= % dei veri negativi). Il criterio di accettabilità deve essere $\geq 95\%$.⁷

Affinchè sia rispettato questo criterio, il metodo deve essere evento specifico e deve essere peculiare per l'OGM per cui è stato sviluppato.

Ciò deve essere dimostrato con risultati empirici su altri eventi transgenici e su altre specie non transgeniche correlate.

- Sensibilità → capacità di un metodo di identificare i campioni positivi:

Viene valutata determinando la % di risultati positivi ottenuti analizzando campioni che presentano l'analita in esame. La determinazione della specificità fornisce anche, indirettamente, la % di campioni falsi negativi, che sarà pari a: $100 - \text{sensibilità}$ (= % dei veri positivi). Il criterio di accettabilità deve essere $\geq 95\%$.⁷

- Precisione → grado di accordo tra i risultati indipendenti ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specificate.⁷

La precisione può essere calcolata sia su standard di riferimento sia su campioni reali. Sulle misure ottenute si calcola la media, la deviazione standard e la “*Repeatability standard deviation*” (o coefficiente di variazione, *RSDr*), che in base ai requisiti citati inizialmente dovrebbe essere al di sotto del 25% su tutto il “*range dinamico*”.

In funzione delle diverse modalità di replica si possono definire 2 tipi di precisione:

- Ripetibilità:

Indica la variabilità osservata all'interno del laboratorio, di prove eseguite in un breve periodo di tempo (1 settimana) con lo stesso operatore e lo stesso

strumento. Per il calcolo della ripetibilità, secondo le linee guida ENGL, vengono eseguite almeno 10 ripetizioni. Per metodi qualitativi vengono analizzati almeno 10 campioni ed il risultato deve essere concorde in tutte le ripetizioni. Per metodi quantitativi nel settore della biologia molecolare vengono analizzati tutti i livelli di concentrazione della curva di calibrazione utilizzata nel metodo.

Dai risultati ottenuti verranno calcolati⁷:

media	$x_m = \sum x_i/n$
Scarto tipo della ripetibilità	$s_r = \sqrt{\sum(x_i - x_m)^2/n-1}$
Scarto tipo della ripetibilità della media	$s_{r/\sqrt{n}}$
Deviazione standard relativa della media	$RSDr = ((s_{r/\sqrt{n}})/x_m) \times 100$
Limite di ripetibilità	$r = t * \sqrt{2} * (s_{r/\sqrt{n}})$

$t = t$ di Student, valore tabulato in funzione di gradi di libertà(n-1) e del livello di probabilità α scelto pari a 0,05 per un test bilaterale . Nella tabella seguente n°5 sono elencati i valori del t di Student⁷.

Tabella n°5: Valore del t di Student corrispondente a diversi numeri di gradi di libertà

Livello di fiducia (espresso in %)

(v)	68,27	90	95	95,45	99	99,73
1	1,84	6,31	12,71	13,97	63,66	235,80
2	1,32	2,92	4,30	4,53	9,92	19,21
3	1,20	2,35	3,18	3,31	5,84	9,22
4	1,14	2,13	2,78	2,87	4,60	6,62
5	1,11	2,02	2,57	2,65	4,03	5,51
6	1,09	1,94	2,45	2,52	3,71	4,90
7	1,08	1,89	2,36	2,43	3,50	4,53
8	1,07	1,86	2,31	2,37	3,36	4,28
9	1,06	1,83	2,26	2,32	3,25	4,09
10	1,05	1,81	2,23	2,28	3,17	3,96
15	1,03	1,75	2,13	2,18	2,95	3,59
20	1,03	1,72	2,09	2,13	2,85	3,42
30	1,02	1,70	2,04	2,09	2,75	3,27
40	1,01	1,68	2,02	2,06	2,70	3,20
50	1,01	1,68	2,01	2,05	2,68	3,16
∞	1,00	1,64	1,96	2,00	2,58	3,00

La ripetibilità di un metodo di prova viene considerata accettabile se è rispettata l'equazione: $A \leq s_r / \sigma \leq B$ dove:

A e B sono dei valori tabulati

s_r : scarto tipo calcolato in fase di validazione del metodo

σ : scarto tipo indicato da una norma di riferimento o nel caso di metodi interamente sviluppati dal laboratorio definito dal laboratorio stesso. Per i metodi normati, nel caso in cui nella norma non sia riportato il valore di σ verrà considerato il valore dello scarto tipo di riproducibilità ottenuto dal laboratorio a seguito di partecipazione a circuiti interlaboratorio.⁷

$\nu = n - 1$	A	B
1	0,031	2,241
2	0,160	1,921
3	0,268	1,765
4	0,348	1,669
5	0,408	1,662
6	0,454	1,551
7	0,491	1,512
8	0,522	1,480
9	0,548	1,454
10	0,570	1,431
15	0,646	1,354

(Livello di confidenza $p = 0,95$)

Dopo aver eseguito le ripetizioni (almeno 10) ed aver verificato l'attendibilità dei dati ed eliminato i risultati anomali, viene calcolato lo scarto tipo di ripetibilità e verificata la rispondenza all'equazione sopra riportata, in corrispondenza del numero dei gradi di libertà, $\nu=(n-1)$.

Se l'equazione viene rispettata il metodo di prova, sia esso normato o sviluppato dal laboratorio, si potrà considerare preciso.

- Riproducibilità:

Indica la variabilità osservata all'interno del laboratorio. Si eseguono 10 ripetizioni variando uno o più dei seguenti parametri: giorno di esecuzione delle prove, operatore, apparecchiatura.⁷

- Accuratezza → grado di accordo tra il risultato di una misurazione e il valore vero del Misurando (vicinanza del valore osservato al valore

atteso). Il criterio di accettabilità deve essere $\pm 25\%$ rispetto al valore del materiale di riferimento certificato.⁷

L'accuratezza si può calcolare secondo due modalità: una più semplice ed una più elaborata ma statisticamente robusta.

Per quanto riguarda la prima, è sufficiente calcolare la differenza tra valore osservato (misura di quantificazione in percentuale) e il valore atteso (percentuale nota), dividerla per il valore atteso e moltiplicarla per 100. Il valore ottenuto indica in quale "intorno" cade il valore osservato rispetto al valore atteso.

La seconda modalità di calcolo utilizza il test "t" di *Student*, test statistico che indica se un valore osservato è significativamente differente dal valore atteso. Per questo calcolo è necessario conoscere il valore di incertezza relativo alla preparazione del campione a percentuale nota di OGM. Questo valore risulta dalla somma di diversi fattori inerenti all'errore sistematico della misura di peso, al grado di umidità, all'omogeneità e alla purezza delle matrici. Come spiegato nel paragrafo relativo ai calibratori, il documento di certificazione allegato ai materiali di riferimento certificati, riporta espressamente tale valore di incertezza sotto il nome di "*expanded uncertainty*".

La formula del “*t*” di *Student* e la seguente:

$$t = \frac{X_{\text{obs}} - X_{\text{exp}}}{\sqrt{(\text{errore standard}_{\text{obs}})^2 + (\text{errore standard}_{\text{exp}})^2}}$$

dove:

- X_{obs} = media dei risultati di quantificazione
- X_{exp} = valore atteso
- **errore standard_{obs}** = deviazione standard_{obs}/radice quadrata del numero di misure effettuate
- **errore standard_{exp}** = valore di “*expanded uncertainty*” presente nel foglio allegato al CRM.

Un buon metodo analitico per la rivelazione degli OGM basato sulla PCR real-time per poter essere validato, oltre ad essere specifico ed accurato deve soddisfare i seguenti requisiti minimi “*Minimum Performance Requirements*”:

- Applicabilità:

Per rispettare questo criterio, devono essere fornite informazioni sullo scopo del metodo, sulle matrici e gli analiti impiegati e sulle possibili problematiche che possono sorgere con alcuni tipi di matrici;⁷

- Praticabilità:

Per rispettare questo criterio, devono essere fornite informazioni sugli strumenti e sui reagenti richiesti per l'analisi e per la preparazione del campione, sui costi dell'analisi (e.g. euro/campione), i tempi e le eventuali problematiche tecniche;⁷

- Efficienza di amplificazione:

Per rispettare questo criterio, il coefficiente angolare (*slope*) della retta di taratura, proporzionale all'efficienza di amplificazione (efficienza= $[10(-1/slope)]-1$), deve essere compreso nel seguente intervallo di valori: $-3,1 > slope > -3,6$; l'efficienza del 100% si ottiene con un valore di *slope* pari a $-3,32$;⁷

- Coefficiente di correlazione (R^2):

Per rispettare questo criterio, il valore di R^2 dovrebbe essere $> 0,98$;

- Coefficiente di variazione (*Repeteability Standard Deviation*, RSDr):

Per rispettare questo criterio, il valore di RSDr di una serie di misure ottenute in condizioni di ripetibilità strette (stesso metodo, stesso protocollo, stesso laboratorio, stesso operatore, utilizzando lo stesso strumento in brevi intervalli di tempo), dovrebbe essere al di sotto del 25% su tutto il *range* dinamico,⁷

- Limite di quantificazione (*Limit Of Quantification, LOQ*):

Per rispettare questo criterio, il LOQ (il più basso livello di analita quantificabile in maniera affidabile) dovrebbe essere inferiore ad un decimo dei valori soglia indicati dalla legge (i.e. 0,9% per gli OGM autorizzati e 0,5% per gli OGM non ancora autorizzati ma già oggetto di un parere scientifico favorevole da parte dell'Autorità) con un RSDr < 25%; Ogni concentrazione testata viene analizzata in 6 replicati e poi calcolata la deviazione standard relativa (RSDr).⁷

- Limite di rivelazione (*Limit Of Detection, LOD*):

Per rispettare questo criterio, il LOD (il più basso livello di analita rilevabile in maniera affidabile) dovrebbe essere inferiore ad un ventesimo dei valori soglia indicati dalla legge (i.e. 0,9% per gli OGM autorizzati e 0,5% per gli OGM non ancora autorizzati ma già oggetto di un parere scientifico favorevole da parte dell'Autorità) ed essere rilevato almeno 95 volte su 100 prove;⁴ Nel caso dei metodi basati sulla PCR viene definito come la concentrazione dell'analita alla quale il 95% dei risultati sono positivi. Per il calcolo del LoD vengono eseguite 6 determinazioni per ogni livello di concentrazione analizzato.⁷

- Robustezza:

Per rispettare questo criterio, i risultati di un test non dovrebbero presentare

scostamenti maggiori del 30%, anche in presenza di piccole ma deliberate variazioni delle condizioni sperimentali descritte nella procedura ed introdotte nelle sue fasi di realizzazione.⁴

Se l'effetto è significativo si esegue uno studio più approfondito per determinarne l'entità e di conseguenza scegliere l'intervallo operativo permesso.⁷

Non sempre è necessario valutare tutti questi parametri contemporaneamente.

La scelta sarà funzione della tipologia del metodo in esame, allo scopo di minimizzare l'impegno necessario alla validazione⁷.

Nello specifico un metodo si considera validato quando:

- è adeguato all'uso a cui è destinato;
- fornisce dati analitici utili in determinate situazioni;
- risponde alle richieste poste dal problema analitico considerato;
- assicura il livello di prestazioni prestabilito;
- permette di ottenere ciò che ci si aspetta di ottenere.

Per esempio, nel caso specifico di questa tesi, la fase sperimentale prevede l'esecuzione delle metodiche analitiche per la rilevazione degli OGM, basate sulla sostituzione dei reagenti in uso con il Buffer 5x.

Attualmente le metodiche in uso dal laboratorio agroalimentare si basano sulla tecnica della Real-Time PCR e prevedono nella fase di preparazione della miscela di reazione l'utilizzo di reagenti separati:

Buffer della taq senza magnesio e cloruro, magnesio cloruro, nucleotidi e taq polimerasi.

Al fine di ridurre i costi e i tempi di realizzazione dell'analisi e allo stesso tempo di migliorare il risultato finale, è stato necessario sostituire il buffer in uso con un buffer di reazione già pronto all'uso, contenente il tampone di reazione della taq, il magnesio, il cloruro e i nucleotidi, ovvero il Buffer 5x "Wonder Taq polymerase" di Euroclone.

Pertanto, i parametri da valutare per validare l'uso di questo buffer sono principalmente:

- Limite di rilevabilità, LoD
- Limite di quantificazione, LoQ

7.2 Analisi statistica di base: LoD e LoQ

Un buon metodo analitico deve essere accurato e preciso e deve avere valori di LOD e LOQ più bassi possibile, come sotto discusso.

I limiti LOD e LOQ rappresentano la più piccola quantità di analita che può essere rispettivamente rilevata e quantificata in funzione del metodo analitico

impiegato. Solitamente questi parametri sono espressi in valore assoluto, ossia come il numero più basso di copie che possono essere rispettivamente rilevate o quantificate 95 volte su 100. Essi possono anche essere espressi come valori relativi o pratici, come segue:

- Valore relativo: rappresenta la percentuale più bassa di OGM che può essere rispettivamente rilevata o quantificata. Il calcolo di questa percentuale deriva dal rapporto tra il valore assoluto e il massimo numero di copie di gene endogeno rilevabili o quantificabili;
- Valore pratico: rappresenta la percentuale più bassa di OGM che può essere rilevata o quantificata in relazione ad uno specifico campione. Il calcolo di questa percentuale deriva dal rapporto tra il valore assoluto e il massimo numero di copie di gene endogeno rilevabili o quantificabili in quello specifico campione.

In base alle linee guida proposte dall'ENGL, per il calcolo dei valori di LOD e LOQ assoluti, è necessario diluire il DNA che si intende analizzare a concentrazioni decrescenti fino a che il gene target sia presente in pochissime copie (per esempio tra 3 e 10). Ogni diluizione deve essere quantificata in 5 o 6 replicati in modo da poter calcolare il rispettivo valore di RSDr: i numeri di copie quantificati con valori di RSDr pari a 33% e a 25% corrispondono rispettivamente ai valori di LOD e LOQ.

La Raccomandazione 787/2004/CE suggerisce di adottare il numero di copie di genoma aploide, quale unita di misura per esprimere il quantitativo di analita rilevato nelle analisi di Real-time PCR e di conseguenza le misure di LOD (*Limit Of Detection*) e LOQ (*Limit Of Quantification*).

Capitolo ottavo

MATERIALI E METODI PER LA RILEVAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEGLI OGM:

8.1 Materiali

- Strumentazione utilizzata:

APPARECCHIATURA	REQUISITI TECNICI
CENTRIFUGA/VORTEX	velocità costante (2400 RPM)
FRULLATORE	sminuzzamento del campione
BILANCIA	PESO: 0,01 - 200 gr
RISCALDATORE A SECCO	65°C
MICROCENTRIFUGA	RPM: 12000-13000
MX3000P QPCR System – STRATAGENE	LIMITE INFERIORE DI RILEVAMENTO: 0,01 %
PIPETTA P10	0,5-10 µl
PIPETTA P100 µL	10-100 µl
PIPETTA P200 µL	20-200 µl
CAPPA A FLUSSO LAMINARE	Flusso laminare; grado di protezione I

- Reagenti utilizzati:

REAGENTI
NUCLEOSPIN FOOD MACHERY-NAGEL
ETHANOL ANHYDROUS
OLIGO MIX DEI TRANSGENI
WATER
10X REACTION BUFFER
5X REACTION BUFFER
MgCl ₂
DNTP
PCR HENANCER
SYBR REACTION BUFFER
ROX (different dye)

- Campioni da analizzare:

CAMPIONI DI ANALISI
CRM (calibratori) a percentuali note di transgene: standard Fluka per il mais e per la soia (Farina/DNA certificati), e le diluizioni seriali 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% preparate a partire dalla CRM madre.
Campioni incogniti di matrici mais e soia reperibili dalle aziende del territorio.

In Europa, il rilevamento degli OGM viene ottenuto principalmente con la reazione a catena della polimerasi (PCR). Tali metodi mirano alle sequenze del DNA del sito di inserimento e del costrutto transgenico.

L'aumento del numero e della divergenza degli OGM ha gradualmente costretto i laboratori di rilevazione degli OGM, a razionalizzare le procedure analitiche e la maggior parte di essi, ora applica proiezioni basate su PCR iniziali seguite da identificazione e quantificazione più specifiche basate sulla PCR Qualitativa e Quantitativa.

Il rilevamento di qualsiasi OGM dipende dalla disponibilità dei metodi di rilevazione adeguati e dai materiali di controllo (CRM) per verificare le prestazioni dei metodi.

Il materiale di controllo “CRM o calibratore”, nell’analisi di Real-time PCR degli OGM può essere definito come una qualsiasi matrice da cui si ottiene un

DNA a percentuale nota di transgene con cui si costruisce la curva di taratura necessaria per quantificare l'evento GM. Esso, viene di norma utilizzato come Materiale di Riferimento Certificato (CRM) a percentuale nota di OGM (w/w). Tali CRM, possono essere nella maggior parte dei casi farine a granulometria finissima e controllata preparate da *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), Belgio e commercializzate dalla ditta Fluka (*Figura n° 9*), oppure DNA genomico 100% GM.



Figura n° 9: Materiali di riferimento certificati (CRM) di mais e soia.

Sono disponibili in commercio per l'analisi quantitativa farine standard a contenuto di OGM pari a 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% per i principali eventi transgenici, quali Soia RR, Mais Mon-810, Mais Bt- 11 (*Tabella n° 6*).

Tabella n°6: Elenco dei materiali di riferimento (CRM) usati in tesi.

Nome	Confezione	Azienda fornitrice	LOTTO	CONCENTRAZIONE
Soya Bean Powder, (ERM) 10%	1 g	SIGMA- ALDRICH	458	10,00%
Maize GMO Standard-, 5% Bt- 11 (ERM)	1 g	SIGMA- ALDRICH	1548	1,96%
Maize GMO Standard ERM- BF413, 10% Mon 810	1 g	SIGMA- ALDRICH	872	9,90%
Maize GMO Standard ERM- BF414f, 4,3% GA21	1 g	SIGMA- ALDRICH	1145	4,29%
Maize GMO Standard, 4,9% NK603 (ERM)	1 g	SIGMA- ALDRICH	1167	4,91%
Maize GMO Standard 9,9% MON863	1 g	SIGMA- ALDRICH	949	9,85%
Maize GMO Standard 9,9% MIR604 (ERM)	1 g	SIGMA- ALDRICH	374	9,85%
Maize GMO Standard 9,9% DAS1507 (ERM)	1 g	SIGMA- ALDRICH	674	9,86%
Maize GMO Standard 9,9% DAS59122 (ERM)	1 g	SIGMA- ALDRICH	349	9,87%
DNA T25 100%	10 ug	AOCS	15/103	100,00%
DNA A2704-12 100% (AOCS)	10 ug	AOCS	148/208	100,00%
AOCS 0406D (MAIS MON88017)	10 G	AOCS	166	99,10%
AOCS 0906E (MAIS MON89034)	10 G	AOCS	175	100,00%
AOCS 0906B (SOIA MON89788)	10 G	AOCS	213	100,00%

Questi materiali di riferimento presentano tuttavia dei limiti, quali la limitazione del *range* di percentuali (0,1-5%) e degli eventi GM disponibili. Il primo legato ai limiti di legge compresi tra lo 0,5% e lo 0,9%, mentre il secondo, è legato alla non disponibilità di tutti gli eventi GM presenti sul mercato europeo e per quelli che verranno presto autorizzati con la nuova normativa (Regolamento EC 1829/2003). Ciò riduce il campo di analisi e di controllo.

Inoltre, ad ogni standard è associata una misura di incertezza “*expanded uncertainty*” che stima i possibili errori sistematici e altri fattori di variabilità influenti sul processo preparativo, quali l’errore di misurazione della misura di peso, il grado di umidità, la non omogeneità e la non purezza delle matrici.

8.2 Metodiche analitiche per l’individuazione degli OGM

La metodica per il rilevamento di OGM validati dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per gli OGM (ISO 21570:2005/Amd.1:2013) è basata sull’analisi del DNA, ovvero sulla PCR, come già indicato precedentemente.

Prevede una prima fase di estrazione e purificazione del materiale genetico.

Successivamente si procede al cosiddetto *screening*, cioè un’analisi di PCR di tipo qualitativo per verificare la presenza o assenza di componenti GM nel campione in esame. Nel caso in cui venga riscontrata la presenza di un OGM

si procede alla sua identificazione ed infine verrà eseguita un'analisi quantitativa per ottenere la percentuale di quel particolare OGM presente nel campione in esame.

La metodica analitica è pertanto suddivisa nelle seguenti 2 fasi:

- Estrazione e purificazione del DNA dei campioni di analisi
- Analisi Real time-PCR: Qualitativa e Quantitativa.

8.2.1 Estrazione e purificazione del DNA

L'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici sono le prime fasi analitiche utilizzate per rilevare e determinare la presenza degli OGM. Il DNA estratto deve essere rappresentativo del campione in esame, e l'obiettivo primario dei metodi di estrazione è quello di ottenere DNA con il più basso livello di degradazione possibile, "puro", da poter essere impiegato efficacemente nelle successive analisi qualitative e quantitative basate sulla PCR tenendo conto che una purificazione ottimale dovrebbe garantire una buona qualità e omogeneità del DNA estratto oltre che l'assenza di RNA, proteine o altri composti inibitori.

L'efficienza del metodo di estrazione dipende dalle caratteristiche del campione (materia prima, matrice alimentare o mangime). Ad esempio,

estrarre DNA da farina di mais, soia o da un mangime a composizione complessa è molto diverso. Più semplice (in termini di varietà di ingredienti) e meno processato sarà il campione, migliore sarà il DNA estratto in termini di qualità e resa.

Pertanto, prima di procedere con la fase di estrazione del DNA dal campione di analisi, è molto importante ottenere un campione di analisi idoneo sul quale effettuare l'analisi OGM.

Il campione di analisi dovrà garantire le seguenti condizioni:

- dimensioni adeguate e determinate sulla base del protocollo di analisi che si intende applicare;
- sufficiente grado di finezza della farina;
- sufficiente grado di omogeneizzazione della farina: fattore essenziale per assicurare un risultato attendibile dell'analisi;
- assenza di “contaminazioni” da laboratorio.

Molto spesso i campioni da trattare sono materie prime in granella (mais o soia), pertanto per garantire i punti precedenti sarà necessario eseguire la macinazione del campione con apposita strumentazione da banco.

In questo modo è possibile ottenere una migliore attendibilità dei risultati di laboratorio in quanto aumenta la rappresentatività ed omogeneità dei campioni di analisi.

Una volta ottenuto il campione di analisi idoneo si prosegue con il campionamento seguendo la procedura riportata nella direttiva 98/53.

Spesso, in un campione il materiale OGM non ha una distribuzione omogenea, per cui la variabilità associata alla fase di campionamento rappresenta il maggior contributo alla variabilità totale. Per questo motivo è molto importante eseguire un campionamento in modo accurato. In particolare, si raccomanda che il campionamento di prodotti sfusi (granelle, semi oleosi) avvenga secondo i principi generali e metodi di campionamento descritti nelle norme ISO 6644 e 13690.

In generale, le strategie di campionamento devono tenere conto di molti parametri quali *in primis*, la natura dell'analita, la sua distribuzione, grandezza e uniformità del lotto la tolleranza o rischio accettato.

A questo punto si prosegue con la fase di estrazione e purificazione del DNA. Il metodo usato in tesi per l'estrazione e purificazione del DNA, è un metodo semplice, veloce ed economico basato sull'uso di un kit commerciale

Nucleospin food della MACHEREY-NAGEL (Germany and International, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Neumann Neander Str. 6-8 D-52355 Düren) con reagenti pronti all'uso basato sulla lisi cellulare³⁵.

In breve, l'estrazione del DNA avviene utilizzando un buffer di lisi contenente sali caotropici, agenti denaturanti e detergenti; in questa fase di lisi si utilizza anche la proteinasi K. La miscela di lisi, attraverso centrifugazioni, verrà separata dalle restanti componenti corpuscolari e sarà miscelata con buffer di legame e etanolo creando le condizioni ottimali di legame del DNA alla membrana di silice NucleoSpin. Successivamente vengono rimossi contaminanti inibitori e residui cellulari lavando il DNA con due differenti buffer; mentre l'eluizione del DNA dalla membrana di silice avviene tramite un buffer a bassa salinità.

- Protocollo:

I campioni di analisi (farine CRM standard o sementi di mais e soia opportunamente macinate) si preparano pesando 0.20g del Campione in due volte successive $0,10 \pm 0,01$ g, campionando in punti differenti.

Ad ogni campione si aggiungono 2 x 550µl di buffer CF (NucleoSpin® Food) preriscaldato a 65°C e 10 µl di proteinase K avendo cura di mescolare accuratamente il buffer con il campione così che tutto il campione sia stato dissolto; si prosegue con l'incubazione dei campioni a 65°C per 30 minuti.

Al termine dell'incubazione, i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti in modo da sedimentare i detriti cellulari ed i contaminanti.

Si trasferiscono 300 μ l del surnatante in un nuovo tubo sterile da 2.0 ml in cui verranno aggiunti anche 300 μ l di buffer C4 (NucleoSpin® Food; cloridrato di guanidina 36-50% e detergenti) e 200 μ l di etanolo (96-100%); i campioni dovranno essere miscelati al vortex vigorosamente per 30 secondi per omogeneizzare il tutto e trasferire così 750 μ l sulla colonna contenente la membrana di silice (Nucleospin); si procede con la centrifugazione a 12.300 rpm per 1 minuto.

A questo punto si eseguono i lavaggi con i seguenti reagenti:

- 400 μ l di buffer CQW (NucleoSpin® Food; cloridrato di guanidina 24- 36 %, etanolo 35-55 % e detergenti) e centrifugazione a 12.300 rpm per 1 minuto;
- 700 μ l di buffer C5 (NucleoSpin® Food) e centrifugazione a 12.300 rpm per 1 minuto;
- 200 μ l di buffer C5 e centrifugazione a 12.300 rpm per 2 minuti, in modo da eliminare completamente il buffer C5.

Infine, si trasferiscono le colonne contenente il DNA legato alla membrana di silice, in una provetta da 2,0 ml DNase-RNase free, e si aggiungono 100 μ l di

buffer CE (NucleoSpin® Food; 5 mM Tris/HCl, pH 8.5) preriscaldato a 70°C nella membrana di silice. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, le colonne vengono sottoposte all'ultima centrifugazione a 12.300 rpm per 1 minuto per eluire completamente il DNA, ottenendo il DNA del campione di analisi purificato ed idoneo per proseguire con l'Analisi PCR.

8.2.2 Real time PCR

- Considerazioni generali:

La reazione a catena della polimerasi (PCR) qualitativa e quantitativa è attualmente la miglior analisi per la rilevazione di OGM nelle matrici agroalimentari.

La Real Time PCR, permette di ricercare, identificare e quantificare il/i transgene/i presenti nei campioni di mais e soia, attraverso l'applicazione di metodiche validate, sia qualitative che quantitative in tempo reale.

Nello specifico la PCR è in grado di generare in modo efficiente, milioni di copie identiche di una singola sequenza di DNA in pochi minuti o ore.

In particolar modo consiste nell'amplificazione di specifici frammenti di DNA aggiunto ad una miscela di reazione che riproduce le condizioni ottimali in cui l'enzima (*Taq polimerasi*) catalizza la reazione. L'amplificazione avviene quando la miscela di reazione viene posta all'interno di uno

strumento in grado di effettuare cicli termici (termociclatore, MX3000P Stratagen, *Figura n°10*). All'interno di questo strumento, vengono ripetute un certo numero di volte tre distinte fasi, costituenti un ciclo di amplificazione, fino a produrre un incremento esponenziale del numero di copie del frammento amplificato. Per esempio, 32 cicli producono un miliardo di copie di DNA.³⁶



Figura n° 10 Stratagene: Strumento per la Real-time PCR sia qualitativa sia quantitativa.

Le tre fasi possono essere descritte come segue.

- **Fase I, Denaturazione:** Il DNA genomico viene denaturato, con separazione delle due eliche;
- **Fase II, Annealing:** I primers, corte sequenze nucleotidiche, si legano a specifiche sequenze poste sulle eliche del DNA denaturato. La temperatura e il tempo di *annealing* dipendono dalla composizione in basi, dalla lunghezza e dalla concentrazione dei primer. È questo il passaggio più delicato per l'efficacia della PCR, perché il suo andamento determina la

specificità dell'appaiamento. Anche la temperatura gioca un ruolo fondamentale. Più ci si avvicina alla temperatura di *melting*, temperatura alla quale la metà dei primer è dissociata dal template, più l'amplificazione è specifica. Temperature troppo elevate diminuiscono l'efficienza di reazione, perché i primer si legano poco al template. Temperature troppo basse permettono ai primer di legarsi in modo aspecifico con conseguente amplificazione di frammenti con interesse nullo;

- **Fase III, *Extension*:** Polimerizzazione del frammento di DNA compreso tra i due primers fino ad avere un numero molto elevato di molecole. La DNA polimerasi si lega al complesso primer- primer seguendo come stampo il template.³⁷

Le strategie da adottare nella diagnostica OGM devono rispettare diverse esigenze. Innanzitutto, bisogna considerare a che scopo viene effettuata l'analisi: quando la finalità perseguita è esclusivamente la verifica dell'assenza di OGM nel campione, si può ricorrere ad un approccio di tipo qualitativo. Quando invece ci si prefigge di verificare i risultati che si ottengono in riferimento ad un valore soglia, è necessario realizzare analisi quantitative. Queste ultime vengono di norma preferite alle prime anche in

assenza di prefissati valori soglia, per le maggiori garanzie che offrono. Infatti, l'analisi quantitativa consente di ottenere una maggior quantità di informazioni sul campione analizzato.

In linea generale, qualsiasi sia l'approccio cui si ricorre per le analisi, nel caso delle sementi occorre tenere in considerazione che il campione da analizzare ha caratteristiche ignote.

La presenza di OGM nelle sementi di mais o soia, se accertata, è limitata con ogni probabilità entro livelli molto contenuti, motivo che conferisce al livello di sensibilità del metodo prescelto una notevole importanza.

Nel caso della PCR qualitativa in tempo reale (Real Time PCR), l'amplificazione del DNA viene monitorata dallo Strategene nell'ultima fase della PCR in cui lo strumento rileva la fluorescenza dell'amplicone nell'ultimo step della PCR. La quantificazione è invece eseguita durante la fase esponenziale della sintesi di DNA a doppio filamento, in cui lo strumento acquisisce la fluorescenza emessa dall'amplicone ad ogni incremento della temperatura.

La fluorescenza che acquisisce lo strumento deriva dai metodi di rilevazione basati sull'impiego di sonde ad ibridazione di varie tipologie, legate a

molecole fluorescenti “*reporter*” e “*quencher*” per un approccio sequenza-specifico, oppure dall’utilizzo di coloranti intercalanti nel DNA (Sybrgreen) in grado di emettere fluorescenza quando opportunamente eccitati. Il vantaggio delle sonde ad ibridazione, rispetto all’uso dei coloranti intercalanti, risiede nel fatto che solo l’ibridazione specifica tra il DNA target e la sonda genera il segnale fluorescente, mentre le amplificazioni non specifiche, come il “*mis-priming*” o la dimerizzazione dei primer, non generano segnale. Viene pertanto ridotto il rischio di falsi positivi.

Le molecole come il *Sybr green* sono altamente fluorescenti solo quando sono intercalate nella doppia elica di DNA, come mostrato in Figura n°11. Quando il DNA è in stato di singolo filamento le molecole di *Sybr green* non si legano alle basi del DNA e la fluorescenza emessa è molto bassa. A seguito della polimerizzazione da parte della Taq polimerasi le molecole di *Sybr green* si trovano intercalate nel DNA a doppia elica.

Maggiore è il numero di molecole di fluoroforo intercalate, maggiore è il segnale di fluorescenza. I vantaggi dell’utilizzo del *Sybr green* sono l’estrema versatilità (può essere utilizzato con qualunque coppia di primer e dunque per qualunque sequenza), l’economicità e l’intenso segnale di fluorescenza.³⁶

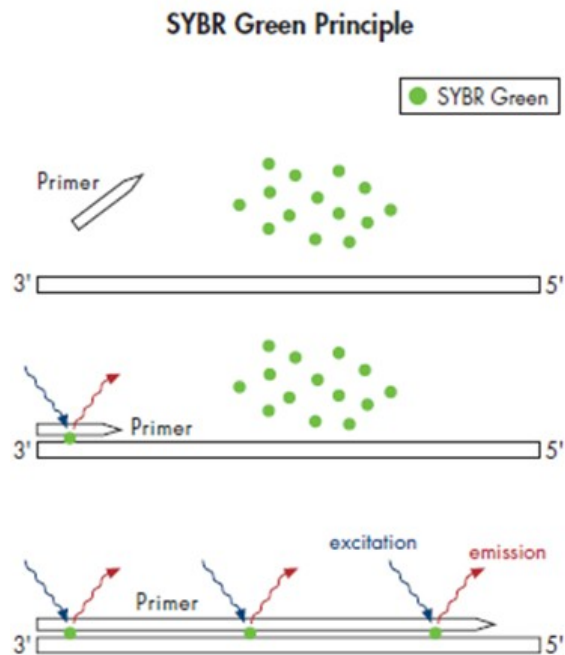


Figura n°11: Principio del rilevamento della Real-time PCR basato su SYBR Green.

Il metodo basato su *Sybr green* possiede tuttavia lo svantaggio di produrre un segnale non specifico poichè la molecola può legarsi anche a sequenze di DNA aspecifico, generando falsi positivi. L'ostacolo può essere parzialmente superato effettuando una curva di dissociazione (*melting curve*) al termine della corsa di PCR.

La curva di *melting* consiste in un aumento graduale della temperatura da 50 °C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 94 °C, temperatura alla quale tutto il DNA è in forma dissociata e la fluorescenza è minima.

Ogni frammento di DNA a doppia elica si dissocia ad una caratteristica temperatura, chiamata temperatura di *melting* (T_m), che è definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento.

Alla temperatura corrispondente alla T_m dei prodotti di PCR si noterà un flesso nella curva di *melting* e quindi si potrà valutare se durante la PCR si sono formati prodotti aspecifici o secondari. Se i flessi di fluorescenza sono più di uno, si evince che nella reazione di PCR si sono formati amplificati aspecifici.

I flessi di fluorescenza, per comodità, vengono trasformati in picchi eseguendo la derivata prima della curva.

Esistono in commercio diversi *mix* di PCR contenenti *Sybr green* o in alternativa si può acquistare la soluzione pura di *Sybr green* e mettere a punto nel proprio laboratorio i saggi di PCR Real-time.

Nel nostro caso, il *Sybr green* sarà utilizzato solo in una metodica, per il resto si prediligono le sonde sequenza-specifiche.

Le sonde sequenza-specifiche marcate con fluorofori assicurano invece la massima specificità di reazione, essendo complementari ad un tratto di DNA contenuto all'interno delle sequenze dei *primer*, ma di contro sono piuttosto costose.

Esistono diverse tipologie di sonde fluorescenti: le sonde *Taqman* e le sonde di ibridazione (di utilizzo più diffuso), le sonde *Molecular Beacon* e le *QuantiProbe*.

La tipologia di sonda utilizzata nelle analisi OGM della presente tesi è il tipo Taqman.

La sonda di tipo Taqman è un oligonucleotide a singolo filamento di circa 20-25 bp che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del transgene da amplificare. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo “*reporter*” ed all'estremità 3' una molecola “*quencher*”. In una configurazione di questo tipo la molecola “*quencher*” impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del “*reporter*” (Figura n°12).³⁶

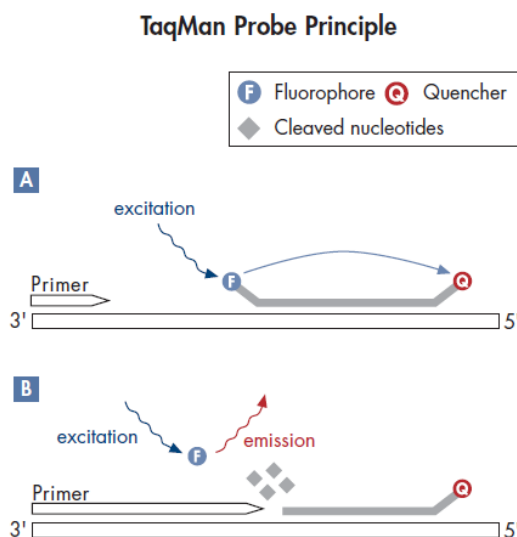


Figura n°12: Principio delle sonde TaqMan nella PCR quantitativa in tempo reale.

A) Sia la sonda TaqMan che i primer per PCR si legano sulla sequenza target durante la fase di annealing della PCR. La vicinanza del reporter fluorescente al quencher impedisce al reporter di fluire.

B) Durante la fase di estensione della PCR, la Taq DNA polimerasi estende il primer. Quando l'enzima raggiunge la sonda, la sua attività esonucleasica 5' → 3' divide il reporter fluorescente dalla sonda, così facendo è possibile misurare il segnale fluorescente dal reporter libero.

Nella fase di denaturazione a 94 °C, quando il DNA è a singolo filamento, il *quencher* assorbe la fluorescenza emessa dal *reporter*.

Nella fase di appaiamento, i *primer* e la sonda si legano al tratto di DNA complementare. Quindi, nella fase di estensione, la Taq polimerasi a partire dal *primer* trascrive l'elica complementare fino a che, giunta alla sonda, inizia a digerirla, un nucleotide alla volta, mediante attività esonucleasica.

Il *reporter*, legato al 5' del primo nucleotide viene così allontanato dal *quencher* ed il segnale di fluorescenza, non più schermato dal *quencher*, viene rilevato dallo strumento. Nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, quando l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda effettua il distacco del "Reporter". In questo modo il fluoroforo va in soluzione, non subisce più l'inibizione del "*quencher*" ed emette fluorescenza. In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione, ciò si traduce in curve di fluorescenza.³⁶

Quindi la Real-time PCR permette di monitorare in tempo reale il segnale di fluorescenza emesso da un colorante fluorescente, proporzionale alla quantità di DNA *target* presente in un campione. Confrontando le curve di fluorescenza di un campione incognito con quelle di un controllo, è possibile risalire alla quantità di DNA bersaglio presente nel campione. A differenza di ciò che avviene in una PCR qualitativa, in cui l'amplificato viene apprezzato nella fase finale della reazione (quando l'amplificazione ha raggiunto il *plateau* dovuto all'esaurimento dei nucleotidi e alla diminuita efficienza della Taq polimerasi), nella Real-time PCR la quantificazione avviene durante la fase esponenziale dell'amplificazione, rendendo il risultato della quantificazione più preciso ed affidabile.

I parametri che caratterizzano il grafico delle curve di amplificazione di un'analisi di Real-time PCR (*Figura n° 13*) sono:

- linea di base (***baseline***): linea orizzontale che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di fluorescenza; a livello teorico è la fluorescenza basale del campione visualizzata come linea retta;
- linea di soglia (***threshold line***): linea parallela alla linea di base, che interpola le curve di amplificazione nella fase esponenziale (può essere

posizionata automaticamente dal software o autonomamente dall'operatore);

- ciclo di soglia (*Ct-threshold cycle*): ciclo di PCR misurato per ciascun campione, in cui la curva di amplificazione interseca la linea di soglia; il campione più concentrato (con quantitativo maggiore di DNA GM ricercato) avrà un Ct più basso e sarà rilevato per primo dal sistema.

Il ciclo soglia (Ct= Cycle treshold) è un indice preciso perché definisce una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA. Più alta è la quantità iniziale di DNA genomico, più rapidamente il prodotto accumulato è rilevato nel processo PCR REAL-TIME e più basso è il valore del Ct.

- Delta Ct (ΔCt): differenza tra il valore di Ct ottenuto con la curva di amplificazione del transgene ed il Ct ottenuto con la curva di amplificazione del gene endogeno misurata per ciascun campione.

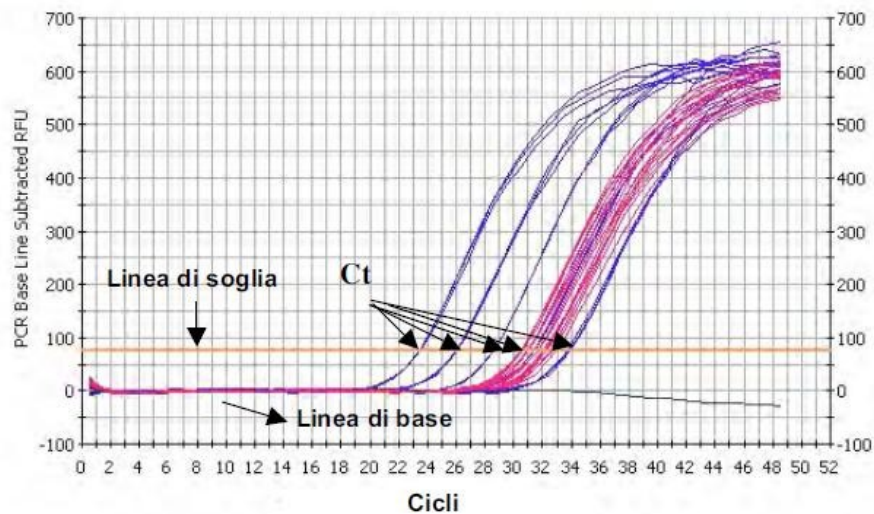


Figura n°13 Curve di amplificazione ottenute mediante Real-time PCR

Nell'asse delle ascisse è riportato il numero di cicli di PCR e in quello delle ordinate le "Relative Fluorescence Units" (RFU) rilevate dallo strumento³⁷.

In generale il protocollo di PCR sia qualitativo che quantitativo prevede di amplificare i DNA estratti dal campione, in un volume totale di 25 μl della miscela di reazione (22.5 μl di AMP-mix specifica per ogni evento + 2.5 μl di DNA estratto).

Nel nostro caso, si confronteranno i risultati ottenuti con la mix di reazione fin ad ora usata dal laboratorio, Mix a reagenti separati (*Tabella n°7a*), con quelli ottenuti usando la mix unica Buffer 5x (*Tabella n°7b*) oggetto di validazione dei nuovi metodi di analisi.

Tabella n°7a: Mix di reazione a reagenti separati

REAGENTI SEPARATI
WATER
PCR ENHANCER (Glicerolo 50%) dove richiesto
10X reaction buffer
MgCl ₂ 50 mM
dNTP 10mM
Oligo mix costituita da primers e sonda Taqman specifici per il rilevamento della sequenza target.
WonderTaq

Tabella n°7 b: Mix di reazione a reagenti unici

REAGENTI SEPARATI
WATER
PCR ENHANCER (Glicerolo 50%) dove richiesto
5X Reaction Buffer
Oligo mix costituita da primers e sonda Taqman specifici per il rilevamento della sequenza target.
WonderTaq

In ogni seduta analitica oltre ai campioni si testano:

- un controllo positivo (DNA estratto da materiale di riferimento certificato);
- un controllo negativo (al posto del DNA viene utilizzata acqua per biologia molecolare).

Il controllo positivo serve per verificare che la reazione di amplificazione e tutti i reattivi funzionino in maniera adeguata, mentre il controllo negativo per

verificare che la mix è specifica per la sequenza da ricercare e che non ci siano contaminazioni.

Se un campione non ha associato un valore di Ct significa che non presenta tale sequenza pertanto sarà considerato negativo; viceversa se il campione ha associato un valore di Ct sarà considerato positivo. Però prima di interpretare il dato ottenuto, è molto importante eseguire una serie di modifiche al risultato riportato dallo strumento. Infatti le linee guida per la ricerca degli OGM indicano di dover:

- posizionare la ***threshold line*** nella fase esponenziale delle curve, cioè nel punto esatto in cui le curve iniziano a salire;
- correggere il valore di stop cycle o ***baseline*** 3 cicli prima dell'intersezione tra la ***threshold line*** e l'amplificazione.

Queste operazioni, pertanto dovranno essere eseguite sia per il gene endogeno sia per il transgene.

Infine nell'analisi quantitativa, come vedremo nei capitoli successivi, sarà necessario esportare i dati ottenuti in file excel per calcolare la % di OGM sulla base della curva di calibrazione ottenuta dagli standard.

Vedremo che la % di OGM del Campione è ottenuta dal rapporto tra quantità di transgene presente e la quantità del gene endogeno di riferimento

moltiplicato per 100. Tale % è attendibile quando il valore del coefficiente di variazione (Cv) delle repliche ottenute (almeno 3 per ogni DNA estratto) è < del 25% .

8.2.3 Analisi Qualitativa

L'analisi qualitativa in Real Time PCR, prevede una fase iniziale di screening dei Campioni di analisi appena estratti, ricercando gli elementi genetici caratteristici di più eventi GM. I metodi di screening OGM più comunemente applicati prendono di mira il promotore 35S del Virus del cavolfiore (CaMV), il terminatore 35S e il terminatore t-NOS dell'*Agrobacterium tumefaciens* nopalina sintasi (nn). Altri prendono di mira geni marcatori dal vettore di clonazione (nptII, bla).

Nel nostro caso, il laboratorio Bioaesis ha sviluppato un metodo di screening per la ricerca del 35S e t-NOS, presenti in quasi tutti gli eventi GM testati.³⁸

Se risultano positivi si prosegue con la ricerca della sequenza target specifica per gli OGM nelle rispettive matrici, mais e soia. Una volta identificati/o i/ il transgeni/e, si prosegue con la/loro quantificazione in Real time-PCR quantitativa.

-Protocollo:

Per ogni campione da analizzare con la specifica oligo-mix, si prepara una miscela di reazione, di seguito indicata come AMP- mix; inoltre per ogni AMP-mix da preparare, oltre ai campioni da analizzare, si considera sempre:

- un controllo positivo per le analisi qualitative e la curva degli standard costituita da 4 punti per le analisi quantitative
- un controllo negativo (water al posto del DNA).

8.2.3.1 Screening 35S/tNOS

Lo scopo della tesi è la validazione del nuovo metodo di analisi in cui si sostituisce la mix a reagenti separati “10X reaction buffer”, con la mix unica “5X reaction buffer”. Pertanto, si preparano le AMP-MIX secondo gli schemi di seguito riportati.

AMP-MIX 35S

REAGENTI	VOLUME (μl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μl) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix 35S	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonde della oligo-mix 35S:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer 35S for:	5'-TgCCTCTgCCgACAgTggTC-3'
Primer 35S rev:	5' AAg ACg Tgg TTg gAA CgT CTT C 3'
Sonda 35S:	5' FAM-CAA AgA Tgg ACC CCC ACC CAC g-TAMRA 3'

AMP-MIX tNOS

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 µl	14,35 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix TNOS	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonde della oligo-mix tNOS:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer tNOS rev	5' gTC TTg CgA TgA TTA TCA TAT AAT TTC Tg 3'
Primer tNOS rev	5' CgC TAT ATT TTg TTT TCT ATC gCg T 3'
Sonda tNOS	5'ROX-AgA Tgg gTT TTT ATg ATT AgA gTC CCg CAA-BHQ2 3'

Per ogni AMP-MIX si considera:

- 2 controlli positivi:

-DNA identificato come “POSITIVO 35S/TNOS”, che può essere estratto da Maize GMO Standard ERM-BF412e (mais BT11 1,96%),

Maize GMO Standard ERM-BF416d (mais MON863 9,85%), Maize GMO Standard ERM-BF415f (mais NK603 4,91%), Soya Bean Powder, certified Reference Material ERM-BF410gh (soia MON40-3-2 10%), DNA MAIS MON88017 AOCS 0406-D (mais MON88017 99,05% diluito con WATER al 10%), DNA MAIS MON89034 AOCS 0906-E (mais MON89034 99,43% diluito con WATER al 10%);
-DNA identificato come “POSITIVO 35S/TNOS 0,01%”, che viene diluito dal DNA POSITIVO 35S/TNOS con WATER.

- 1 controllo negativo: acqua al posto del DNA.

Generalmente il promotore 35S CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) e il terminatore NOS dell'*Agrobacterium tumefaciens* sono i tratti genetici che vengono utilizzati come bersaglio. La presenza di questi elementi, nel caso di risultato positivo, non dà alcuna informazione sull'identità dell'evento inserito. Per il p35S, inoltre, la metodica non consente di discriminare tra elementi presenti naturalmente in piante infette dal virus e in costrutti genici di OGM. Tuttavia, questo rischio riguarda solo alcuni casi, per esempio quello delle sementi appartenenti alla famiglia delle Brassicacee, sensibili al CaMV. Per queste specie, la dimostrata positività al p35S potrebbe non essere dovuta alla presenza di OGM, ma all'infezione virale (falso positivo).³⁹

Inoltre, per verificare che il DNA estratto contenga la specie vegetale in esame viene eseguita anche una PCR (che può essere concomitante alla precedente) per il cosiddetto gene endogeno, cioè una porzione di un gene presente nel genoma della specie vegetale esaminata.

Le caratteristiche del gene di riferimento sono:

- essere presente in singola copia (comunque bassa e nota);
- essere stabile attraverso le varietà di una stessa specie;
- essere specifico della specie di interesse;
- non dovrebbe essere target di trasformazione genica.

Di seguito sono riportati i “campioni di analisi testati per lo screening 35S/ tNOS e geni endogeni” (*Tabella n°8*).

Tabella n°8: campioni di analisi testati per lo screening 35S/ tNOS e geni endogeni.

EVENTO	CRM materiale di riferimento	35S	TNOS
MAIS Bt11	ERM BF412 e (Maize GMO Standard, 1,96%)	SI	SI
MAIS MON810	ERM BF413 gk (Maize GMO Standard, 9,9%)	SI	NO
MAIS MON863	ERM BF416 d (Maize GMO Standard, 9,85%)	SI	SI
MAIS NK603	ERM BF415 f (Maize GMO Standard, 4,91%)	SI	SI
MAIS GA21	ERM BF414 f (Maize GMO Standard, 4,29%)	NO	SI
MAIS DAS1507	ERM BF418 d (Maize GMO Standard, 9,86%)	SI	NO
MAIS DAS59122	ERM BF424 d (Maize GMO Standard, 9,87%)	SI	NO
MAIS MIR604	ERM BF423 d (Maize GMO Standard, 9,85%)	NO	SI
MAIS T25	AOCS 0306H (100% DNA)	SI	NO

MAIS MON89034	AOCS 0906E (100%)	SI	SI
MAIS MON88017	AOCS 0406D (100%)	SI	SI
SOIA MON40-3-2	ERM BF410 (Soya Bean Powder, 10%)	SI	SI
SOIA A2704-12	AOCS 0707B (100% DNA)	SI	NO
SOIA MON89788	AOCS 0906B	NO	NO

La validazione del LoD, per le mix 35S e tNOS consiste nel testare 18 repliche per ogni STD GM (0.1% 0.05% e 0.01%) preparato con le diluizioni seriali come precedentemente visto. Come si evince dalla tabella dei CRM in esame, l'evento soia MON89788 non presenta tali target per tanto non potrà essere eseguito questo screening preliminare.

Le linee guida Europee prevedono che la validazione della metodica in studio è accettata solo quando 10 repliche su 10 risultano positive. Solo in questo modo è possibile poter validare la modifica apportata alla metodica.

In questo caso si eseguono 18 repliche in modo da avere un eccesso di repliche per poter eliminare dati eventualmente anomali ed ottenere comunque 10 repliche positive valide. La validazione consiste nel verificare se con le nuove condizioni di reazione il LoD (limite di rilevabilità) è mantenuto allo 0,01 %, come definito nei metodi di analisi in uso nel laboratorio BIOAESIS.

8.2.3.2 Screening dei geni endogeni: Zeina per il mais, e Gmaxlec per la soia

Un affidabile metodo di Real-time PCR dipende dall'utilizzo di geni endogeni di riferimento appropriati. Un gene di riferimento ottimale dovrebbe possedere alcune caratteristiche fondamentali, quali: specie-specificità, presenza in numero di copie per genoma aploide basso, meglio se pari a 1, elevata stabilità genica e bassa eterogeneità tra *cultivar*.

Nelle analisi di matrici a base di soia il gene endogeno più utilizzato è quello per la lectina (*lectin 1*, acc. Number = K00821). Nelle analisi di matrici a base di mais invece, sono vari i geni endogeni candidati. I più utilizzati sono quelli per la zeina (*zein*, acc. number = M23537), l'alcool deidrogenasi (*adh 1*, acc. number = X04050), l'invertasi (*inr*, acc. number = U16123), la *high mobility group protein* (*hmg*, acc. number = AJ131373). Questi geni sono stati vagliati nell'ambito del programma di ricerca QPCRGMOFOOD (Hernandez *et al.* 2004) e validati dal *Community Reference Laboratory* (CRL). Inoltre questi geni sono stati di recente valutati in uno studio sulle contaminazioni di soia GM nella farina di mais (Dalla Costa e Martinelli, 2007).

Protocollo:

Nei metodi di analisi attualmente in uso presso il laboratorio Bioaesis è previsto di testare il DNA di ogni campione di analisi in singolo per la verifica dell'amplificabilità dell'estratto utilizzando i seguenti geni endogeni:

- ZEINA per la materia prima mais;
- LECTINA per la materia prima soia.

Nello specifico, le mix di amplificazione (AMP-mix) per i geni endogeni sono allestite nel seguente modo:

AMP-MIX ZEINA

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE unico
WATER	10,85 µl	10,35 µl
PCR ENHANCER (Glicerolo 50%)	4 µl	4 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix ZEINA	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,2 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per la oligo-mix ZEINA:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer ZEINA for :	5' TCA TgT TAg gCg TCA TCA TCT gT 3'
Primer ZEINA rev :	5' TgC AgC AAC TgT Tgg CCT TA 3'
Sonda ZEINA :	5' JOE-CAT CAC Tgg CAT CgT CTg AAg Cgg-TAMRA 3'

AMP-MIX GMAXLec:

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	11,55 µl	11,55 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix GMAXLEC	5,75 µl	5,75 µl
WonderTaq	0,2 µl	0,2 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per l' oligo-mix GMAXLec:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer GMAXLec for :	5' CTT TCT CgC ACC AAT TgA CA 3'
Primer GMAXLec rev :	5' TCA AAC TCA ACA gCg ACg AC 3'
Sonda GMAXLec :	5'JOE-CCACAAACACATGCAGGTTATCTTGG - TAMRA3'

Per queste oligo-mix sono stati utilizzati i seguenti controlli:

- POSITIVO per la lectina (DNA estratto da Soya Bean Powder, certified Reference Material ERM-BF410gh (soia MON40-3-2 10%);
- POSITIVO per la zeina (DNA che può essere estratto da Maize GMO Standard ERM-BF412e (BT11 1,96%), Maize GMO Standard ERM-BF416d (MON863 9,85%), Maize GMO Standard ERM-BF415f (NK603 4,91%), DNA MAIS MON88017 AOCS 0406-D (MON88017 99,05%), DNA MAIS MON89034 AOCS 0906-E (mais MON89034 99,43%).

-controllo negativo (acqua al posto del DNA).

Il volume della reazione finale di ogni AMP-mix è pari a 22,5 μ l da dispensare sui pozzetti, corrispondenti alla mix da testare, della piastra dello Stratagene (*Figura n°14*) posta sul supporto refrigerato mantenuto ad una temperatura di 4°C.

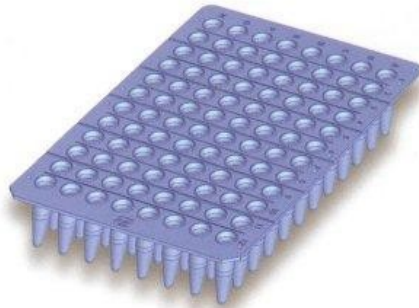


Figura n°14: Piastra Stratagene⁴⁰. Su ogni pozzetto vanno inseriti 22,5 μ l di ogni AMP-mix e 2,5 μ l di campione.

Una volta dispensata la mix si aggiunge nei rispettivi pozzetti precedentemente nominati i seguenti DNA:

- Dispensare 2,5 μ l di WATER nei pozzetti identificati come controllo negativo.
- Dispensare 2,5 μ l di DNA di ogni campione di analisi nei corrispondenti pozzetti.

-Dispensare 2,5 µl di DNA dei controlli positivi nei pozzetti corrispondenti.

Al termine, si inserisce la piastra per PCR nella piattaforma del MX3000P QPCR System – STRATAGENE per far partire la reazione impostando il seguente profilo termico (*Figura n°15*) valido per tutte le analisi qualitative:

Hold	95°C – 10 minuti
40 cicli	95°C – 15 secondi
	60°C – 60 secondi (acquisizione FAM, ROX e JOE)

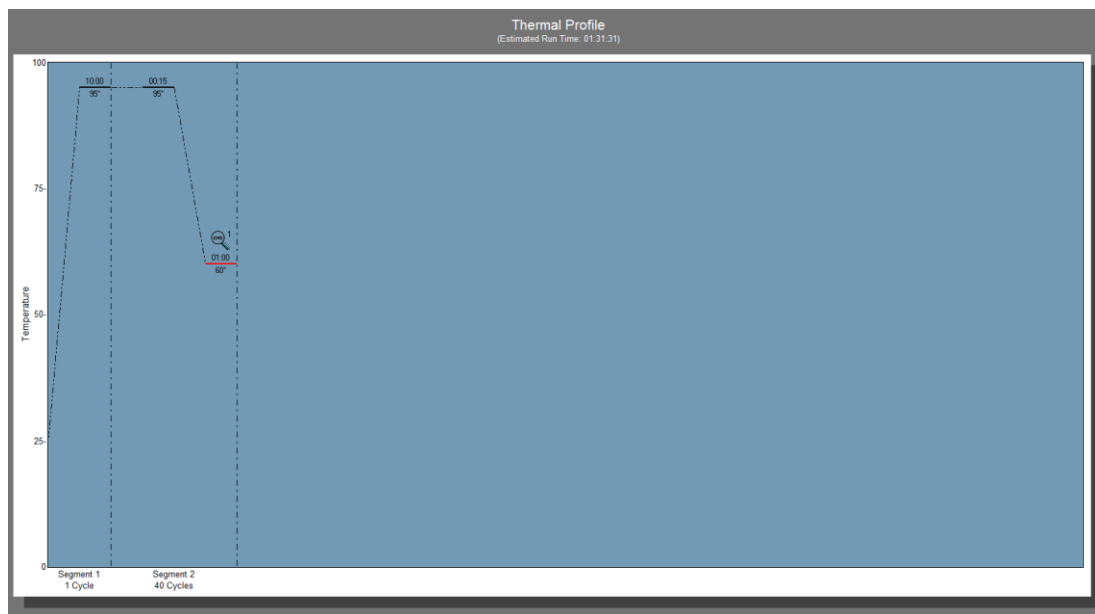


Figura n°15: profilo termico analisi qualitative per la ricerca degli OGM, ottenuto direttamente dallo strumento Stratagene.

Nello strumento, è molto importante identificare i campioni con i rispettivi fuorofori:

- identificare con il fluoroforo FAM i campioni che contengono la Amp-mix 35S;
- identificare con ROX i campioni che contengono la Amp-mix tNOS;
- identificare con JOE i campioni che contengono la Amp-mix ZEINA e/o GMAXLec.

8.2.3.3 Rilevamento eventi specifici

Una volta stabilita la presenza di OGM nel campione in esame, si procede alla identificazione e quantificazione dell'evento GM utilizzando primers che consentano di eseguire:

- una Real-time PCR evento specifica nel caso in cui i primers sono disegnati per rilevare una regione a cavallo tra il DNA della pianta ed il DNA transgenico inserito nel genoma della pianta;
- una Real-time PCR costruito specifica se i primers sono disegnati per rilevare porzioni del DNA transgenico inserito nel genoma della pianta (*Figura n°16*).

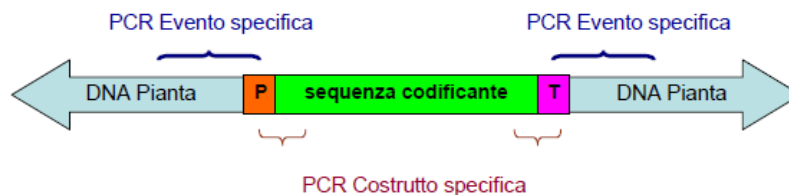


Figura 16: Rappresentazione di target nell'analisi quantitativa in PCR.

Nel nostro caso l'analisi qualitativa prosegue con il rilevamento degli eventi specifici del mais⁴¹ e della soia⁴² (Tabella n°9) da analizzare con la nuova metodica in studio che prevede il Buffer 5X.

Tabella n°9 eventi specifici del mais e della soia:

EVENTI SPECIFICI MAIS	EVENTI SPECIFICI SOIA
Bt 11	MON40-3-2
MON810	A2704-12
MON863	MON89788
NK603	
GA21	
DAS1507	
DAS59122	
MIR604	
T25	
MON88017	
MON89034	

Le mix di amplificazione specifiche per i singoli eventi, sono le seguenti:

- *Eventi mais:*

AMP-MIX Bt11

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 µl	14,35 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix BT11	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per l'oligo-mix BT11:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer BT11 for :	5' AAA AgA CCA CAA CAA gCC gC 3'
Primer BT11 rev :	5' CAA TgC gTT CTC CAC CAA gTA CT 3'
Sonda BT11 :	5'FAM-CgA CCA Tgg ACA ACA ACC CAA ACA TCA-TAMRA 3'

AMP-MIX MON810:

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	13,6 µl	14,35 µl
PCR ENHANCER (Glicerolo 50%)	1,25 µl	/
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix MON810	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per l'oligo-mix MON810:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer MO810 for:	5' gAT gCC TTC TCC CTA gTg TTg A 3'
Primer MON810 rev :	5' ggA TgC ACT CgT TgA TgT TTg 3'
Sonda MON810:	5'FAM-AgATACCAAgCggCCATggACAACAA-TAMRA 3'

AMP-MIX MON863

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 µl	14,35 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix MON863	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per l'oligo-mix MON863:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer MON863 for :	5' gTA ggA TCg gAA AgC TTg gTA C 3'
Primer MON863 rev :	5' TgT TAC ggC CTA AAT gCT gAA CT 3'
Sonda MON863:	5'JOE- TgAACACCCATCCgAACAAgTAgggTCA-TAMRA 3'

AMP-MIX NK603 :

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix NK603	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per l'oligo-mix NK603:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer NK603 for :	5' ATg AAT gAC CTC gAg TAA gCT TgT TAA 3'
Primer NK603 rev :	5' AAg AgA TAA CAg gAT CCA CTC AAA CAC T 3'
Sonda NK603 :	5' FAM- Tgg TAC CAC gCg ACA CAC TTC CAC TC-TAMRA 3'

AMP-MIX GA21 :

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix GA21	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per l' oligo-mix GA21:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer GA21 for :	5' CTT ATC gTT ATg CTA TTT gCA ACT TTA gA 3'
Primer GA21 rev :	5' Tgg CTC gCg ATC CTC CT 3'
Sonda GA21 :	5'FAM-CATATACTAACTCATATCTCTTTCTCAACAGcaggTggg - TAMRA 3'

AMP-MIX DAS1507 :

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 µl	14,35 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix DAS1507	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per l' oligo-mix DAS1507:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer DAS1507 for :	5' TAg TCT TCg gCC AgA ATg g 3'
Primer DAS1507 rev :	5' CTT TgC CAA gAT CAA gCg 3'
Sonda DAS1507 :	5' FAM- TAA CTC AAG GCC CTC ACT CCG-TAMRA 3'

AMP-MIX DAS59122 :

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	13,4 μ l	14,35 μ l
PCR ENHANCER (Glicerolo 50%)	0,4 μ l	/
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	2,5 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix DAS59122	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,2 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per l' oligo-mix DAS59122:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer DAS59122 for :	5' ggg ATA AgC AAg TAA AAg CgC TC 3'
Primer DAS59122 rev :	5' CCT TAA TTC TCC gCT CAT gAT CAg 3'
Sonda DAS59122 :	5' JOE-TTTAAACTgAAggCgggAAACgACAA-TAMRA 3'

AMP-MIX MIR604 :

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	13,6 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	2,75 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix MIR604	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per l'oligo-mix MIR604 :

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer MIR604 for :	5' gCg CAC gCA ATT CAA CAg 3'
Primer MIR604 rev :	5' ggT CAT AAC gTg ACT CCC TTA ATT CT 3'
Sonda MIR604 :	5' ROX-Agg Cgg gAA ACg ACA ATC TgA TCA Tg-BHQ2 3'

AMP-MIX T25

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	15,6 µl	14,35 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix T25	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per l'oligo-mix T25:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer T25 for :	5' gCC AgT TAg gCC AgT TAC CCA 3'
Primer T25 rev :	5' TgA gCg AAA CCC TAT AAg AAC CCT 3'
Sonda T25 :	5' Cy5-TgC Agg CAT gCC CgC TgA AAT C-BHQ2 3'

AMP-MIX MON88017:

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix MON88017	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per l'oligo-mix MAIS MON88017:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
MON88017 for:	5' GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT 3'
MON88017 rev:	5' TCC GGA GTT GAC CAT CCA 3'
MON88017 probe:	5' FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT-TAMRA 3'

AMP-MIX MON89034 :

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE
WATER	7,45 μ l
Brilliant II Syber Green QPCR Master Mix (2X)	12,5 μ l
Reference dye 0,75 uM	0,05 μ l
Oligo mix MON89034	2,5 μ l
Volume totale	22,5 μ l

Primer per la oligo-mix MAIS MON89034 :

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
MON89034 for:	5' TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT 3'
MON89034 rev:	5' CGG TAT CTA TAA TAC CGT GGT TTT TAA A 3'

Per quanto riguarda l'evento MON89034 si utilizza una miscela di reazione che prevede l'utilizzo Sybergreen per l'identificazione dell'evento e non la sonda Taqman. Percui non è possibile sostituirla con il 5X Reaction Buffer, l'unica modifica che apporteremo alla metodica è il cambiamento del profilo termico normalmente in uso, per standardizzarlo al resto degli eventi.

Hold	95°C – 10 minuti
35 cicli	95°C – 15 secondi
	60°C – 60 secondi (acquisizione Sybr e reference ROX)

Portato a :

Hold	95°C – 10 minuti
40 cicli	95°C – 15 secondi
	60°C – 60 secondi (acquisizione FAM, JOE, ROX, Cy5, Sybr e reference ROX)

- *Eventi soia:*

AMP-MIX SOIA RR (MON40-3-2):

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ l	/
dNTP	0,5 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix SOIA RR	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per la oligo-mix SOIA RR:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer SOIA RR for :	5' CATTCCCGGCGACAAGTC 3'
Primer SOIA RR rev :	5' TTGATGACGTCCTCGCCTTC 3'
Sonda SOIA RR :	5' FAM-CCTTCATGTTCCGGCGGTCTCGC-TAMRA3'

AMP-MIX A2704-12:

REAGENTI	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (μ l) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,10 μ l	14,35 μ l
10X reaction buffer	2,5 μ l	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 μ l	/
dNTP	1,25 μ l	/
5X reaction buffer	/	5 μ l
Oligo mix A2704-12	3 μ l	3 μ l
WonderTaq	0,15 μ l	0,15 μ l
Volume totale	22,5 μ l	22,5 μ l

Primer e sonda per l' oligo-mix SOIA A2704-12 :

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
Primer SOIA A2704-12 for :	5' gCA AAA AAg Cgg TTA gCT CCT 3'
Primer SOIA A2704-12 rev :	5' ATT CAg gCT gCg CAA CTg TT 3'
Sonda SOIA A2704-12 :	5' ROX- Cgg TCC TCC gAT CgC CCT TCC-BHQ2 3'

AMP-MIX MON89788:

REAGENTI	VOLUME (µl) / REAZIONE reagenti separati	VOLUME (µl) / REAZIONE reagente unico
WATER	14,85 µl	14,35 µl
10X reaction buffer	2,5 µl	/
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	/
dNTP	0,5 µl	/
5X reaction buffer	/	5 µl
Oligo mix MON89788	3 µl	3 µl
WonderTaq	0,15 µl	0,15 µl
Volume totale	22,5 µl	22,5 µl

Primer e sonda per la oligo-mix SOIA MON89788:

Nome Oligonucleotidi	DNA target 5'-3'
MON89788 for:	5' TCC CGC TCT AGC GCT TCA AT 3'
MON89788 rev:	5' TCG AGC AGG ACC TGC AGA A 3'
MON89788 probe:	5' FAM -CTG AAG GCG GGA AAC GAC AAT CTG – TAMRA 3'

Il profilo termico per entrambe le qualitative mais e soia viene mantenuto sempre lo stesso visto nella precedente analisi di screening (*Figura n°15*).

Per quanto riguarda i campioni analizzati, sono stati testati tutti gli eventi sopra indicati usando come “campioni (intermedi di analisi)” le diluizioni 1% (controllo positivo), 0.1%, 0.05% e lo 0.01% a partire dal CRM specifico di ogni evento.

Mentre come controllo negativo si usa acqua. Sia il positivo che il negativo saranno testati in singolo, mentre i campioni di analisi in 18 repliche.

Il LoD definito nelle metodiche in uso che prevede la preparazione della mix utilizzando reagenti separati è pari a 0.01%. L’obbiettivo della sostituzione della mix con reagente unico è quello di mantenere tale LoD, con il vantaggio che la procedura analitica possa risultare più veloce.

Per ridefinire il LoD sarà necessario calcolare la positività di ogni evento con la formula :

$$(N \text{ ripetizioni positive} / N \text{ ripetizioni testate}) * 100$$

La concentrazione STD più bassa risultata positiva nel 95% delle ripetizioni viene definita come LoD della metodica. I risultati saranno esposti nel capitolo successivo.

8.2.4 Analisi quantitativa

Nell'analisi quantitativa, misurando l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, è possibile ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point". Selezionando la soglia all'interno log-lineare di fase per tutti i campioni, è possibile calcolare la quantità effettiva di molecole iniziali di partenza dato che l'intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR in fase esponenziale. L'intensità di fluorescenza aumenta proporzionalmente ogni ciclo di amplificazione in risposta all'aumento della concentrazione dell'amplicone.

Il primo ciclo, come già anticipato, in cui lo strumento è in grado di distinguere l'amplificazione generando fluorescenza al di sopra del segnale di fondo è chiamato il "Ct" o Ciclo soglia. Questo valore Ct può essere direttamente correlata alla concentrazione iniziale del campione utilizzato.

Maggiore è la quantità di DNA stampo iniziale nel campione, precedente sarà il valore Ct del campione.

Se viene creata una curva standard con una serie di diluizioni, il software confronterà i valori Ct dei campioni sconosciuti alla curva standard per determinare la concentrazione iniziale di ogni campione.

La quantificazione degli acidi nucleici può essere assoluta o relativa.

- ASSOLUTA: i campioni sono quantificati in modo assoluto, necessita di standard di cui si conosce la concentrazione assoluta (utilizzo di una “curva standard”). Per tutti gli *unknowns* (campioni incogniti) devono essere saggiate identiche quantità di campioni.
- RELATIVA: effettuata comparando i valori di Ct per determinare il cambiamento di espressione di un gene target in un campione rispetto ad un altro campione scelto come calibratore. Gli *unknowns* vengono “quantificati” paragonando il loro “ ΔCt ” con quello del controllo endogeno. Questo valore normalizzato può quindi essere utilizzato per confrontare, per esempio, l’espressione genica differenziale in campioni diversi.

Nel rilevamento di OGM, la quantificazione che si ottiene non è assoluta, ma è di tipo relativo. Infatti, la procedura analitica richiede la presenza di un controllo interno che, amplificato, darà la possibilità di normalizzare i dati ottenuti mediante un confronto di tipo relativo. Ad esempio, la percentuale di DNA transgenico può essere quantificata usando una curva di calibrazione generata con 5 punti standard di DNA transgenico da 0,1 a 5%; basando il

metodo di calcolo sul rapporto tra DNA transgenico e quantità di DNA totale è possibile stimare la percentuale OGM all'interno del campione da testare.

In generale la quantità di OGM in un campione viene espressa come il quantitativo del materiale geneticamente modificato rispetto al quantitativo totale del materiale. Per determinare questo valore in un sistema basato su Real-Time PCR è necessario misurare il numero di sequenze di DNA del gene di riferimento (da utilizzare per la normalizzazione) ed il numero di sequenze di DNA OGM target specifico. Un problema relativo alla quantificazione riguarda l'interpretazione della percentuale di OGM che non è specificata dalla legislazione; difatti la percentuale di OGM può essere considerata come il peso dell'ingrediente modificato rispetto al peso totale dell'ingrediente puro (es: peso del mais GM sul peso totale del mais contenuto nel campione). Per calcolare la percentuale di OGM nei metodi validati viene utilizzata una curva di calibrazione ottenuta con 4 punti STD di DNA da materiali di riferimento certificati (CRMs), i quali sono certificati unicamente sulla base del loro rapporto massa/massa. Attualmente il JRC (Joint Research Centre) ed i laboratori che fanno parte dell'ENGL (European Network of GMO laboratories) stanno lavorando alla validazione di metodi di quantificazione basati sul numero di copie genomiche. È in effetti stata emanata la

Raccomandazione EU 787/04, in cui la percentuale di DNA geneticamente modificato debba essere espressa come percentuale del numero di copie GM relativo alle copie di DNA taxon-specifiche calcolate in termini di genomi aploidi.

Nello specifico tra i metodi di quantificazione maggiormente utilizzati nell'analisi degli OGM in Real-time PCR ci sono:

- il metodo basato sul " ΔCt ";
- il metodo basato sulla "Curva standard".

Il **metodo del " ΔCt "** prevede l'utilizzo di DNA estratto da materiali di riferimento certificati Fluka a differenti percentuali di DNA transgenico, quali 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% (w/w) (figura 6). Per ciascuno dei CRM impiegati si ricava il valore del " ΔCt " calcolando la differenza tra il Ct della curva di amplificazione del transgene ed il Ct della curva di amplificazione del gene endogeno. I valori di ΔCt e le relative percentuali di OGM (più precisamente il Log della %) costituiscono le coordinate (rispettivamente ordinata e ascissa) dei punti la cui retta interpolante costituisce la retta di calibrazione. Mediante la retta di calibrazione, dal valore di " ΔCt " di un campione incognito si risale alla relativa % di OGM, attraverso una funzione di tendenza³⁶.

Il **metodo della “*Curva standard*”** prevede l’utilizzo di DNA estratto da un determinato calibratore, sia esso standard Fluka o plasmide, diluito serialmente in 4 o 5 punti a concentrazione scalare aventi quantità di gene endogeno e transgene noti all’operatore. Le diluizioni più utilizzate sono 1:3; 1:4; 1:5. I *Ct* dei punti di diluizione del calibratore e i logaritmi decimali dei rispettivi numeri di copie geniche costituiscono le coordinate (rispettivamente ordinate e ascisse) dei punti la cui retta interpolante costituisce la retta di calibrazione. La stessa procedura viene impiegata per l’analisi del gene endogeno ed il transgene, per cui si ottengono 2 distinte rette di taratura, rispettivamente una per il gene endogeno ed una per il transgene.

Vengono utilizzate due curve standard, basate su differenti quantità di DNA: una costituita da un sistema di quantificazione specifico per il gene di riferimento; l’altra costituita da un sistema di quantificazione specifico per il target GM. Nel campione in esame il quantitativo di target specifico e quello del gene di riferimento sono determinati attraverso l’interpolazione dei valori di fluorescenza con le corrispondenti curve standard. La percentuale di OGM è calcolata come rapporto tra la quantità di target GM e la quantità di gene di riferimento $(\text{target GM}/\text{gene riferimento} \times 100)^{36}$.

Per quantificare infine la percentuale della componente transgenica in un campione incognito, innanzitutto si ricava il numero di copie geniche relative

al gene endogeno e al transgene mediante interpolazione del Ct del campione incognito con la rispettiva retta di taratura. Quindi, viene calcolato il rapporto tra il numero di copie del transgene e il numero di copie del gene endogeno; il risultato viene moltiplicato per 100, ottenendo la percentuale della componente transgenica nel campione in esame.

In ogni analisi effettuata, accanto ai campioni incogniti si quantificano standard Fluka a percentuale nota di transgene (es. 1%; 0,5%, 1%, 2%, 5%), allo scopo di verificare su materiale certificato a composizione nota la correttezza della quantificazione e quindi la bontà dell'analisi.

Per ottenere una buona quantificazione, è opportuno che il *range* dinamico (il *range* di Ct compreso tra il Ct del punto più concentrato ed il Ct di quello meno concentrato), sia per la retta di taratura del gene endogeno sia del transgene, comprenda al suo interno i Ct dei campioni incogniti e degli standard di riferimento utilizzati.

Le variabili della curva di riferimento da considerare per giudicare l'attendibilità dei risultati sono due, riportate nella Figura n°17:

- il coefficiente di correlazione, **R_{sq}** , indica quanto l'interpolazione con i punti standard è buona; valori prossimi a 1 indicano che i punti si trovano su una linea retta e la linearità è la migliore possibile; è una misura

descrittiva, indicativa di eventuali errori sistematici e può andare da 0 (nessuna correlazione tra i punti costituenti la retta) a 1 (massima correlazione);

-la pendenza (*slope*) della curva standard, correlata all'efficienza della PCR, raggiunge il valore ideale quando è pari a $-3,3$; infatti, ogni $3,3$ cicli per ogni molecola di DNA se ne ottengono 10. L'efficienza di amplificazione (E): $= [10 \ (-1/slope)]^{-1}$, risulta inversamente proporzionale alla pendenza della retta di regressione (o *slope*) ed è influenzata dal corretto disegno e dalla buona qualità del sistema di *primer* e sonda, dall'opportuna preparazione dei calibratori per la costruzione della curva standard (DNA puro e corretta diluizione) e dall'utilizzo dei corretti parametri di reazione quali T° di appaiamento e concentrazione di *primer* e sonda.

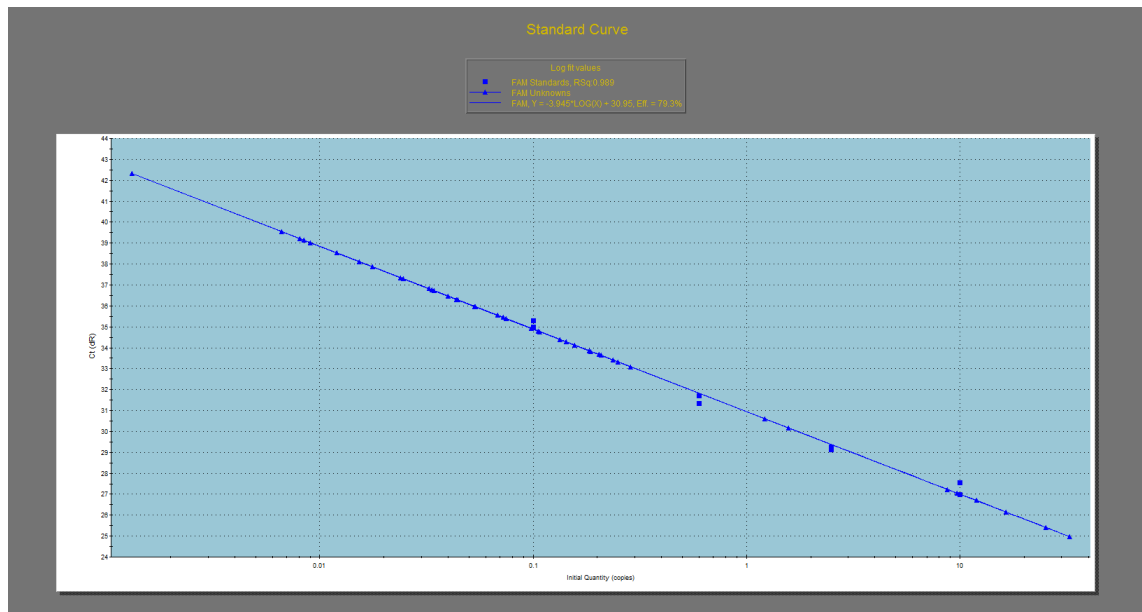


Figura n°17: Curva standard o retta di taratura in una reazione di Real-time PCR, ottenuta con il metodo dello “standard curve”. Nell’asse delle ascisse è riportato il numero di copie e in quello delle ordinate il numero di cicli.

Terminata la corsa, è necessario posizionare la threshold nella fase esponenziale, appena le curve cominciano a salire. Conseguentemente, occorre correggere il valore di stop cycle (tre cicli prima dell’intersezione tra threshold ed amplificazione). Questa operazione va eseguita sia per il gene endogeno che per il transgene.

A questo punto, si prosegue con l’interpretazione del dato, esportare i dati ottenuti, inserirli in appositi fogli di calcolo, atti a calcolare la percentuale di OGM, sulla base della curva degli standard della corsa.

Protocollo:

Una volta validate le metodiche qualitative in tutti gli eventi GM (mais e soia) in cui si conferma il LoD pari a 0,01% con la mix a reagenti unici, si passa all'analisi quantitativa di tali eventi.

Questa procedura permette di verificare se anche il LoQ viene confermato o migliorato con la nuova mix in uso. Se ciò accade è possibile sostituire la mix a reagenti separati con la mix a reagenti unici, validando e confermando la nuova modifica apportata alle metodiche in esame; così facendo, sarà possibile usare tali metodiche nella normale routine lavorativa del laboratorio agroalimentare Bioaesis, velocizzando il tempo di esecuzione dell'analisi.

Attualmente la metodica in uso con la mix a reagenti separati presenta un LoQ pari a 0.1%, pertanto in questo caso verranno analizzati come intermedi di analisi le diluizioni 0.1% e 0.05% degli eventi Gm mais e soia, in 12 repliche, con l'uso della mix a reagenti unici. Insieme ad esse, si analizza anche una curva di calibrazione formata dalle diluizioni STD1 10%, STD2 2.5%, STD3 0.6%, STD4 0.1% ottenute dai materiali di riferimento certificati, ed inoltre si allestisce anche la reazione a reagenti unici per il gene endogeno (zeina per il mais e gmaxlec per la soia) per quantificare la % dell'evento GM presente nell'intermedio di analisi.

Pertanto come vedremo dai risultati esposti nel capitolo successivo, l'analisi quantitativa sarà eseguita solo su alcuni eventi validati per il LoD con la mix a reagenti unici, indicati negli schemi successivi.

Una volta eseguita la Real-Time PCR quantitativa con il metodo del $\Delta\Delta C_t$, si analizza il risultato finale come precedentemente indicato e tramite un apposito foglio di calcolo Excel, sarà possibile quantificare l'evento GM presente nel campione di analisi.

Per quanto riguarda la validazione del metodo quantitativo, è necessario stabilire il LoQ, ovvero il limite minimo di quantificazione rilevabile, e si calcola tramite la media e il range di variabilità, la deviazione standard (RSDr) il quale deve essere pari o inferiore al 25% per far sì che il metodo sia ripetibile, un parametro importante nella validazione del nuovo metodo.

Di seguito sono riportati gli schemi da seguire per le rispettive quantitative.

-Quantitativa mais MON810:

Per tale metodica⁴³ è stato usato il materiale di riferimento “Maize GMO Standard ERM-BF413 gk (10% MON810)”, dal cui DNA estratto è stata preparata la seguente curva di calibrazione:

STD1 – DNA MAIS MON810 10%	DNA estratto dal materiale di riferimento certificato ERM-BF413gk
STD2 – DNA MAIS MON810 2,50%	16,4 µl STD1 + 48,6 µl H ₂ O
STD3 – DNA MAIS MON810 0,60%	14,4 µl STD2 + 45,6 µl H ₂ O
STD4 – DNA MAIS MON810 0,1%	8,3 µl STD3 + 41,67 µl H ₂ O

In associazione ad essa, per validare il metodo sono stati analizzati come campioni incogniti le diluizioni derivate dal CRM ERM-BF413gk, MON810 0,1% e MON810 0,05%, le quali saranno analizzate per determinare il nuovo LoQ della metodica con l’uso del Buffer 5X.

Di seguito saranno riportati i risultati.

Inoltre si è eseguita un analisi quantitativa utilizzando dei campioni di analisi precedentemente risultati positivi. Tali campioni sono DNA estratti da matrici di mais giunti al laboratorio analisi Bioaesis da aziende del territorio. Eseguendo una nuova quantificazione di questi campioni utilizzando le nuove condizioni di reazione che prevedono l’uso del Buffer 5X è possibile verificare se si ottiene un risultato conforme al precedente.

In questo caso, si preparano due AMP-MIX, una specifica per l'evento MON810 in cui si considerano i punti della curva STD e i campioni in doppio e il controllo negativo in singolo, mentre l'altra AMP-MIX sarà specifica il gene endogeno zeina, in quanto l'evento testato è di matrice mais. Una volta ottenuti i risultati dallo strumento Stratagene, quali RSq e il valore di slope, si passa alla quantificazione del evento MON810 introducendo i dati ottenuti in un apposito foglio di calcolo Excel.

Di seguito saranno riportati i risultati.

-Quantitativa mais MIR604:

Per tale metodica analitica ⁴⁴, è stato usato il materiale di riferimento “Maize GMO Standard ERM-BF423 d (10% MIR604)”, dal cui DNA estratto è stata preparata la seguente curva di calibrazione:

STD1 – DNA MAIS MIR604 10%	DNA estratto dal materiale di riferimento certificato ERM-BF423d
STD2 – DNA MAIS MIR604 2,50%	2,5 µl STD1 + 7,5 µl H ₂ O
STD3 – DNA MAIS MIR604 0,60%	1,68 µl STD2 + 5,32 µl H ₂ O
STD4 – DNA MAIS MIR604 0,1%	1,00 µl STD3 + 5,0 µl H ₂ O

In associazione ad essa, per validare il metodo sono stati analizzati come campioni incogniti le diluizioni derivate dal CRM ERMBF423d, MIR604 0,1% e MIR604 0,05%, le quali saranno analizzate per determinare il nuovo LoQ della metodica con l'uso del Buffer 5X, come indicato per l'evento precedente. Di seguito saranno riportati i risultati.

-Quantitativa mais T25:

Per tale metodica⁴⁵ è stato usato il materiale di riferimento “DNA T25 AOCS 0306H (100% T25)”, dal cui DNA estratto è stata preparata la seguente curva di calibrazione:

	DNA materiale di riferimento certificato AOCS 0306-H4 99,99%	DNA estratto da MAIS negativo per T25
STD1 – DNA MAIS T25 10,00%	10 µl	90 µl
STD2 – DNA MAIS T25 2,50%	2,50 µl STD1 + 7,5 µl H ₂ O	
STD3 – DNA MAIS T25 0,60%	1,68 µl STD2 + 5,32 µl H ₂ O	
STD4 – DNA MAIS T25 0,1%	1,00 µl STD3 + 5,00 µl H ₂ O	

In associazione ad essa, per validare il metodo sono stati analizzati come campioni incogniti le diluizioni derivate dal CRM ERMAOCS 0306-H4 , T25 0,1% e T25 0,05%, le quali saranno analizzate per determinare il nuovo LoQ della metodica con l’uso del Buffer 5X, come indicato per gli eventi precedente.

Di seguito saranno riportati i risultati.

-Quantitativa soia MON40-3-2 (RR):

Per tale metodica ⁴⁶è stato usato il materiale di riferimento “Soya Bean Powder ERM-BF410 gn (10% RR)”, dal cui DNA estratto è stata preparata la seguente curva di calibrazione:

STD1 – DNA SOIA MON40-3-2 10,00%	DNA estratto dal materiale di riferimento certificato ERM-BF410gh
STD2 – DNA SOIA MON40-3-2 2,50%	16,0 µl STD1 + 48,0 µl H ₂ O
STD3 – DNA SOIA MON40-3-2 0,60%	14,4 µl STD2 + 45,6 µl H ₂ O
STD4 – DNA SOIA MON40-3-2 0,1%	8,3µl STD3 + 41,67 µl H ₂ O

In associazione ad essa, per validare il metodo sono stati analizzati come campioni incogniti le diluizioni derivate dal CRM ERM- BF410 gn, RR 0,1% e RR 0,05%, le quali saranno analizzate per determinare il nuovo LoQ della metodica con l’uso del Buffer 5X.

Di seguito saranno riportati i risultati.

Inoltre si è eseguita un analisi quantitativa utilizzando dei campioni di analisi precedentemente risultati positivi. Tali campioni sono DNA estratti da matrici di mais giunti al laboratorio analisi Bioaesis da aziende del territorio. Eseguendo una nuova quantificazione di questi campioni utilizzando le nuove condizioni di reazione che prevedono l’uso del Buffer 5X è possibile verificare se si ottiene un risultato conforme al precedente.

In questo caso, si preparano due AMP-MIX, una specifica per l'evento soia RR in cui si considerano i punti della curva STD e i campioni in doppio e il controllo negativo in singolo, mentre l'altra AMP-MIX sarà specifica per il gene endogeno Gmax-Lec, in quanto l'evento testato è di matrice soia.

Una volta ottenuti i risultati dallo strumento Stratagene, quali RSq e il valore di slope, si passa alla quantificazione del evento RR introducendo i dati ottenuti in un apposito foglio di calcolo Excel.

Di seguito saranno riportati i risultati.

-Quantitativa soia A2074:

Per tale metodica⁴⁷ è stato usato il materiale di riferimento “DNA A2704 AOCS 0707-B (100% A2704)”, dal cui DNA estratto è stata preparata la seguente curva di calibrazione:

	DNA materiale di riferimento certificato AOCS 0707-B4 99,9%	DNA estratto da SOIA negativo per A2704-12
STD1 – DNA SOIA A2704-12 10,00%	10 µl	90 µl
STD2 – DNA SOIA A2704-12 2,50%	2,50 µl STD1 + 7,5 µl H ₂ O	
STD3 – DNA SOIA A2704-12 0,60%	1,68 µl STD2 + 5,32 µl H ₂ O	
STD4 – DNA SOIA A2704-12 0,1%	1,00 µl STD3 + 5,00 µl H ₂ O	

In associazione ad essa, per validare il metodo sono stati analizzati come campioni incogniti le diluizioni derivate dal CRM ERM-AOCS 0707-B4,

A2704-12 0,1% e A2704-12 0,05%, le quali saranno analizzate per determinare il nuovo LoQ della metodica con l'uso del Buffer 5X.

Di seguito saranno riportati i risultati.

In tutte le metodiche quantitative eseguite, è necessario ottenere una retta con almeno 3 punti STD validi in modo da poter essere usata per quantificare i campioni.

Il volume di reazione finale è sempre 22.5 µl posti nei rispettivi pozzetti, nei quali si aggiunge sempre 2.5 µl del DNA degli intermedi di analisi, di STD e controllo negativo nei rispettivi pozzetti. Ottenendo un volume finale di 25 µl.

In questo caso, il profilo termico in uso è differente per il numero di cicli rispetto al profilo termico della qualitativa.

Vediamo infatti che il profilo termico è il seguente (*Figura n°18*):

Hold	95°C – 10 minuti
45 cicli	95°C – 15 secondi
	60°C – 60 secondi (acquisizione fluorofori)

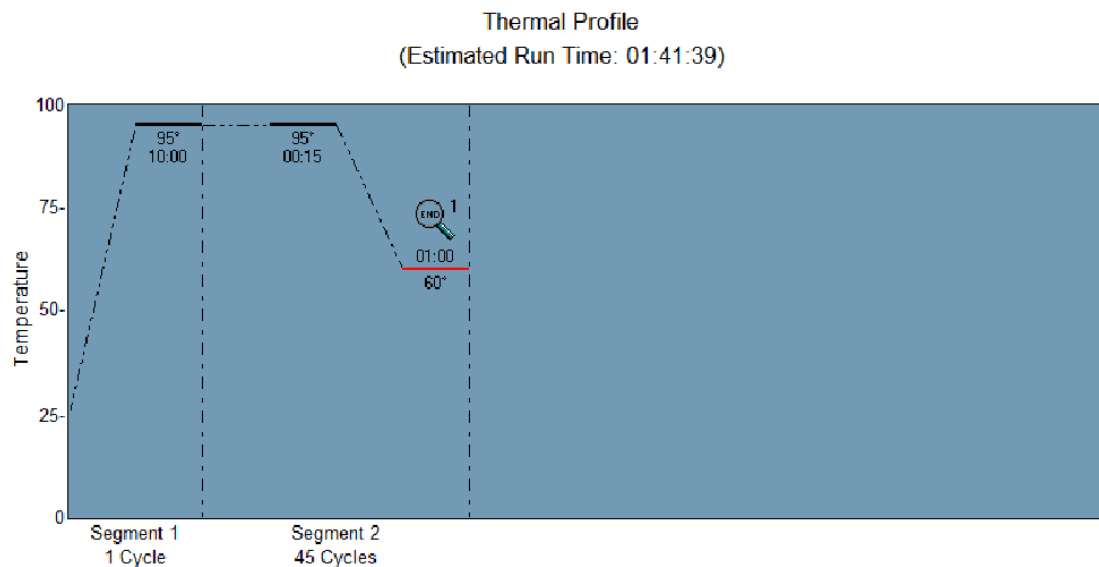


Figura n°18: Profilo termico nell' analisi in Real-time PCR quantitativa.

L'interpretazione del dato relativo all'analisi quantitativa mediante PCR Real Time del transgene prevede il calcolo della percentuale del DNA transgenico in rapporto al DNA del gene di controllo endogeno attraverso il calcolo del “ ΔC_t ”.

In particolar modo il campione viene considerato POSITIVO per ogni transgene quando 2 repliche delle 2 testate hanno associato un valore di C_t .

L'analisi quantitativa può essere considerata valida qualora la curva standard abbia un valore di $RSq \geq 0,98$ e di $slope -3,1 \geq slope \geq -3,6$.

Nel caso in cui il valore di RSq della curva standard sia $< 0,98$ e/o i valori di slope sono al di fuori del range di accettabilità i risultati non sono considerati validi.

La fase di calcolo eseguita nelle metodiche MON810 e RR, viene eseguita in una cartella di lavoro di Excel in cui viene calcolata la media dei valori Ct tra le 2 repliche di ogni intermedio di analisi e le 2 repliche di ogni DNA della curva di taratura; il valore ottenuto è denominato Ct media. Per ogni campione viene calcolata in automatico la % del DNA transgenico in rapporto al DNA del gene di controllo zeina attraverso la formula di tendenza impostata nel foglio di lavoro del file Excel.

I campioni testati risultati positivi con la metodica precedente in uso presso il laboratorio Bioasis, per gli eventi mais MON810 e soia RR sono i seguenti:

CAMPIONI POSITIVI	MATRICE	RISULTATO EVENTO MAIS MON810	RISULTATO EVENTO SOIA RR
18P0781	MANGIME	>10	/
18P0787	MANGIME	/	>10
18P0789	MANGIME	>10	>10
19P0844	MANGIME	/	<LoQ (0,01)
18P0847	MANGIME	/	0,76
18P0880	SOIA	/	>10
18P0937	MANGIME	/	0,62
18P1096	MANGIME	/	0,17
18P1097	MANGIME	/	0,29
18P1151	MANGIME	/	0,16
18P1152	MANGIME	/	<LoQ (0,02)

I risultati relativi alla nuova quantificazione con l'uso del Buffer 5x, di tali eventi sono riportati nel capitolo successivo.

Capitolo nono

RISULTATI

La fase sperimentale della tesi ha previsto la validazione del LoD e del LoQ nell'analisi di rintracciabilità degli OGM da matrici utilizzate nell'alimentazione umana e zootecnica con l'uso di un nuovo Buffer a reagenti unici, il Buffer 5x, sia in analisi qualitativa che quantitativa.

Gli eventi presi in considerazione del mais e della soia sono i seguenti:

- 35S
- Tnos
- Geni endogeni : Zeina per il mais e Gmax-Lec per la soia.
- eventi specifici per il mais: Bt11, MON810, MON863, NK603, GA21, DAS1507, DAS59122, MIR604, T25, MON89034, MON88017.
- eventi specifici per la soia: MON40-3-2 (RR), A2704-12, MON89788.

Pertanto di seguito sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi qualitativa e quantitativa in Real-Time PCR seguendo i protocolli sopra descritti.

9.1 Risultati analisi qualitativa

-Screening del promotore 35S del CaMv e/o del terminatore NOS:

Questo saggio sul DNA estratto dai CRM “considerati come campioni incogniti” del mais e della soia, ha lo scopo di verificare la presenza del promotore 35s e del terminatore NOS comuni entrambi o singolarmente in tutti gli eventi GM considerati.

Tale metodo è stato eseguito con l’uso di due mix di reazione differenti (reagenti separati e Buffer 5X) e i risultati ottenuti, sono stati utilizzati per la validazione del LoD del nuovo metodo di screening che prevede l’uso della mix di reazione contenente il buffer 5X.

Si usano campioni di OGM all’1% in quanto presentano una concentrazione di 35s-tnos maggiore del LOD (>0.01%) e LOQ (0.05%) considerati attualmente nell’analisi già testati dalla validazione precedente.

Confrontando i Ct (risultato espresso tramite la Real-time PCR) ottenuti per ogni campione con le rispettive oligo mix preparate con reagenti separati e con buffer 5x è possibile osservare 2 condizioni:

- 1- Se la differenza di Ct (ΔCt) calcolata attraverso i valori di Ct di ogni evento ottenuti sperimentalmente con entrambe le mix, in PCR, non è

elevata (cioè presenta una variazione di Ct molto stretta quasi nulla) è possibile sostituire la mix a reagenti separati con il buffer 5x, in modo da velocizzare la metodica di analisi.

- 2- se si ottiene un valore di ΔCt ampio, allora bisogna mantenere la mix a reagenti separati, altrimenti perdiamo l'efficienza della metodica, ottenendo un LoD più alto rispetto a quello già stabilito da precedenti validazioni delle metodiche.

Tabella n°10 Risultati screening del 35S:

35S	Threshold:200	POS Ct <= 36,84	ΔCt
	Ct mix separata	Ct Buffer 5x	
MON810 1%	31,65	34,89	3,24
DAS1507 1%	31,64	35,15	3,51
DAS59122 1%	31,93	35,55	3,62
A2704-12 1%	23,92	27,1	3,18
T25 1%	28,54	31,92	3,38
RR 1%	29,7	32,38	2,68
BT11 1%	30,98	33,28	2,3
MON863 1%	32,02	35,76	3,74
NK603 1%	30,31	32,49	2,18
MON89034 1%	30,22	33,45	3,23
MON88017 1%	29,46	32,01	2,55

Nella tabella n°10 osserviamo il singolo valore di Ct riportato per ogni evento all'1% testato prima con mix separata e poi con il buffer5x.

Il Ct è stato ottenuto in PCR real time, ponendo il threshold a 200 e considerando il valore di Ct positivo quando è <= di 36,84. (stabilito dalla precedente validazione).

Il ΔCt è stato calcolato sui rispettivi Ct delle due mix per ogni evento transgenico contenete il 35S, e in questo caso, possiamo osservare che si ha un variazione di Ct pari a 3,3 per ogni evento OGM testato pari a 1log della concentrazione.

Ciò indica che se usassimo il Buffer 5x al posto della mix con reagenti separati, andremo a perdere le concentrazioni minime rilevabili, perdendo di efficienza nella nuova validazione del LoD.

In conclusione per i suddetti motivi, per lo screening del 35s si continuerà ad usare la metodica precedente, in cui è richiesto l'uso del 10X Reaction Buffer a reagenti separati.

Tabella n°11 Risultati screening tNOS:

TNOS	Threshold:1000	POS Ct <= 37,48	ΔCt
	Ct mix separata	Ct Buffer 5x	
GA21 1%	31,79	32,07	0,28
MIR604 1%	32,74	33,01	0,27
RR 1%	32,63	31,86	0,77
BT11 1%	31,92	32,74	0,82
MON863 1%	33,58	33,69	0,11
NK603 1%	32,39	32,11	0,28
MON89034 1%	31,73	32,61	0,88
MON88017 1%	31,85	32,44	0,59

Nel caso del tNOS (*Tabella n°11*), la metodica in uso già validata (mix a reagenti separati), prevede di porre il threshold pari a 1000 e considerare

positivi i campioni di OGM al 1% degli eventi testati quelli che presentano un $Ct \leq 37,48$.

Dalla tabella n°11, si osserva che il ΔCt tra le due metodiche non è elevato, in quanto sempre inferiore a 1, però si osserva una certa eterogeneità tra i diversi eventi GM, perciò non si procede con la sostituzione della mix a reagenti separati con il Buffer 5X.

In accordo con entrambe le tabelle dello screening 35s e Tnos, vediamo che i campioni all'1% testati sono risultati tutti positivi, ciò indica la presenza in essi rispettivamente del promotore 35s e del terminatore Tnos, negli eventi testati e che il sistema eseguito è in grado di rilevarli. Per confermare il sistema in esame, è opportuno la validazione; di seguito sono riportati i risultati di tale validazione.

- *Validazione 35S-Tnos:*

Per determinare il LoD della metodica in esame, sono stati testati 18 ripetizioni delle diluizioni 0.1%, 0.05%, 0.01% del DNA estratto da Materiali di riferimento certificati, con mix separata (riconfermata dallo screening precedente).

Per ogni concentrazione sono state calcolate le ripetizioni risultate positive, cioè per le quali si è ottenuto un valore di Ct dallo strumento Stratagene, secondo la formula:

$$(N \text{ ripetizioni positive} / N \text{ ripetizioni testate}) \times 100$$

dove:

N indica il numero delle rispettive ripetizioni.

La concentrazione STD per la quale è stato ottenuto un valore pari o superiore al 95% di positività è stato definito pari al LoD del metodo.

Nelle figure n°19 e n°20 sottostanti, è riportato il grafico generato dallo strumento in Real-time a seguito dell'analisi di screening eseguita per il gene 35S/Tnos.

Ogni campione di analisi è rappresentato da una curva di colore diversa.

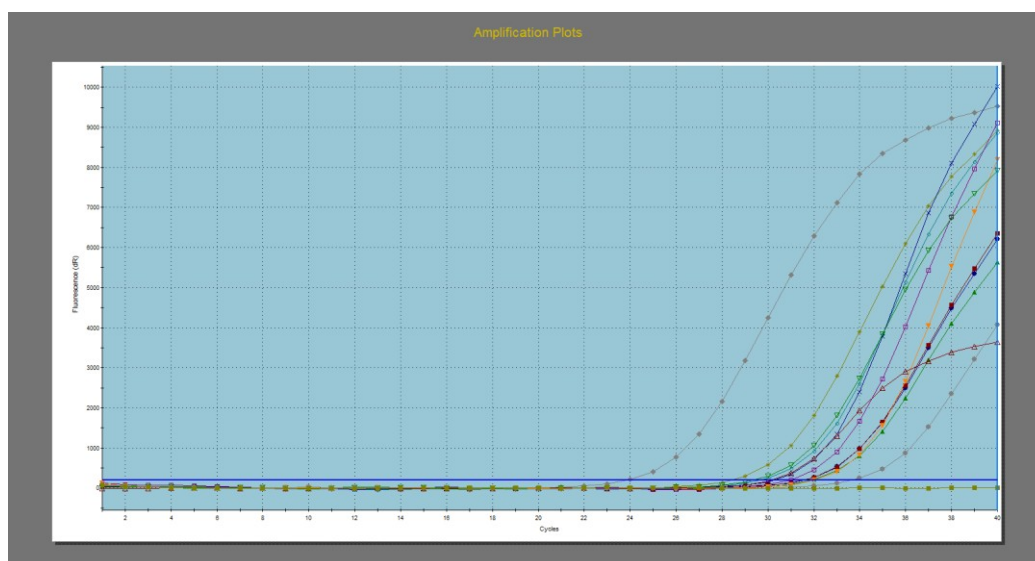


Figura n°19 curve Ct 35S.

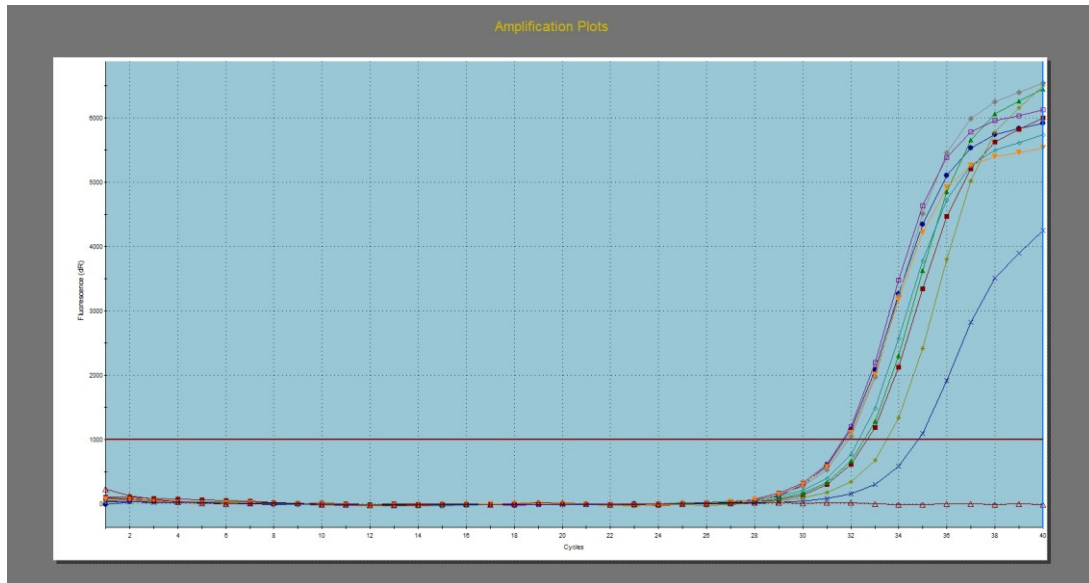


Figura n°20: curve Ct tNOS.

Lo strumento fornisce per ogni campione, la cui curva abbia superato il threshold, il valore di Ct.

La positività dei campioni analizzati è stata ottenuta posizionando la threshold per il 35S non appena sale l'amplificazione, lo stesso è stato eseguito per il tNOS. Questo ha permesso di ottenere un valore medio di threshold per entrambi gli eventi, considerando 18 ripetizioni.

Pertanto la validazione ha permesso di abbassare il threshold per il 35S da 200 (stabilita dalla validazione precedente) a 60, considerando positivi $Ct \leq 34,72$; mentre per il tNOS da 1000 a 100 considerando positivi $Ct \leq 35,17$.

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati ottenuti per la validazione del LoD della mix 35S e della mix tNOS.

Tabella n°12 del LoD di ogni ovento GM testato con la mix 35S:

a) 7 eventi confermano il LoD= 0.01% con 10 repliche su 10:

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
Bt11 0,1%	10	10	100
Bt11 0,05%	10	10	100
Bt11 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
NK603 0,1%	10	10	100
NK603 0,05%	10	10	100
NK603 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON88017 0,1%	10	10	100
MON88017 0,05%	10	10	100
MON88017 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
RR 0,1%	10	10	100
RR 0,05%	10	10	100
RR 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
A2704-12 0,1%	10	10	100
A2704-12 0,05%	10	10	100
A2704-12 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
T25 0,1%	10	10	100
T25 0,05%	10	10	100
T25 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON89034 0,1%	10	10	100
MON89034 0,05%	10	10	100
MON89034 0,01%	10	10	100

b) 4 eventi testati non confermano il LoD= 0.01%

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON810 0,1%	10	10	100
MON810 0,05%	10	10	100
MON810 0,01%	6	10	60

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
DAS1507 0,1%	10	10	100
DAS1507 0,05%	10	10	100
DAS1507 0,01%	8	10	80

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON863 0,1%	10	10	100
MON863 0,05%	10	10	100
MON863 0,01%	8	10	80

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
DAS59122 0,1%	10	10	100
DAS59122 0,05%	10	10	100
DAS59122 0,01%	3	10	30

In accordo con la tabella n°12, per il 35s non tutti gli eventi testati hanno riconfermato il LoD = 0.01%, alcuni infatti presentano un LoD diverso da

0,01%, di fatto per questi eventi saranno da rivalutare in futuro cambiando le condizioni di analisi es:

- concentrazione dei primers for e rev;
- concentrazione del MgCl₂;
- concentrazione degli oligo, dei nucleotidi;
- aggiunta di eventuali enancer.

Tabella n°13 del LoD di ogni ovento GM testato con la mix tNOS:

-tutti gli eventi confermano il LoD=0.01%:

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
Bt11 0,1%	10	10	100
Bt11 0,05%	10	10	100
Bt11 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
NK603 0,1%	10	10	100
NK603 0,05%	10	10	100
NK603 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
GA21 0,1%	10	10	100
GA21 0,05%	10	10	100
GA21 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON88017 0,1%	10	10	100
MON88017 0,05%	10	10	100
MON88017 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
RR 0,1%	10	10	100
RR 0,05%	10	10	100
RR 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MIR604 0,1%	10	10	100
MIR604 0,05%	10	10	100
MIR604 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON863 0,1%	10	10	100
MON863 0,05%	10	10	100
MON863 0,01%	10	10	100

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON89034 0,1%	10	10	100
MON89034 0,05%	10	10	100
MON89034 0,01%	10	10	100

Le tabelle n°13 sopra riportate, oltre ad indicare i risultati ottenuti di ogni evento per le 10 ripetizioni testate di ogni STD, riportano la % di positività ottenuta tramite la formula:

$$(OTTENUTI / ATTESI) \times 100$$

Soltanto lo STD a concentrazione più bassa per il quale è stato ottenuto un valore pari o maggiore al 95% di positività si considera il LoD del metodo.

Riepilogo dei LoD (Limite di determinazione) risultati dallo screening 35S/tNOS:

- Bt11: LoD 35S e tNOS = 0.01%
- MON810: LoD 35S = 0.05%
- MON863: LoD 35S= 0.05%, LoD tNOS = 0.01%
- NK603: LoD 35S e tNOS = 0.01%
- GA21: LoD tNOS = 0.01%
- DAS1507: LoD 35S = 0.05%
- DAS59122: LoD 35S = 0.05%
- MIR604: LoD tNOS = 0.01%
- T25: LoD 35S= 0.01%
- MON89034: LoD 35S e tNOS = 0.01%
- MON88017: LoD 35S e tNOS = 0.01%
- MON40-3-2: LoD 35S e tNOS = 0.01%
- A2704-12: LoD 35S= 0.01%

-Screening geni endogeni:

Questo screening è fondamentale per testare l' idoneità dell' intermedio di analisi, verificata tramite l' amplificabilità del gene endogeno Zeina per la matrice mais e gene endogeno GmaxLec per la matrice soia. Essi risultano

positivi sempre in presenza del valore di Ct ottenuto dallo strumento Real-time PCR.

In questo caso sono stati analizzati le diluizioni 0.1%, 0.05% e 0.01% ottenute dal DNA estratto dai CRM.

In particolar modo, per gli eventi della zeina sono stati analizzati 39 ripetizioni, mentre per il Gmax-lec 12.

Dalle tabelle n°14 sottostanti, vediamo che eseguendo l'analisi qualitativa dei geni endogeni Zeina e Gmax-lec dei rispettivi eventi di OGM, diluiti opportunamente, e testati con il buffer 5x, è stato riscontrato che l'uso del buffer 5x è fattibile solo per valutare la presenza del gene endogeno Gmax-Lec in quanto tutti gli eventi testati (12) sono risultati positivi al 100% fino alla diluizione 0,01%.

Per quanto riguarda il gene endogeno zeina, non è possibile sostituire la mix separata con il buffer 5x, in quanto vediamo dalla tabella successiva, che nei 39 eventi testati solo la diluizione 0.1% ha riportato il 100% di positività, mentre nella metodica che prevede l'uso della mix separata il LoD è pari a 0,01%. Per questo motivo, sostituire la mix con il Buffer 5x è sinonimo di perdita in efficienza della metodica di analisi, perciò non va sostituito.

Tabella n°14 del LoD dei geni endogeni :

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
ZEINA 0,1%	39	39	100
ZEINA 0,05%	37	39	95
ZEINA 0,01%	17	39	44

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
GMAX-LEC 0,1%	12	12	100
GMAX-LEC 0,05%	12	12	100
GMAX-LEC 0,01%	12	12	100

-Analisi eventi specifici:

L'analisi qualitativa degli eventi specifici delle matrici mais e soia, è stata eseguita considerando 10 repliche positive su 18 ripetizioni testate, come indicato dalle linee guida europee, con lo scopo finale di rivalidare il LoD di ogni evento, con l'uso di un Buffer5x al posto della mix separata, per poter velocizzare la metodica di analisi e di conseguenza il flusso di lavoro in laboratorio.

Secondo la validazione precedente con l'uso della mix a reagenti separati il

LoD stabilito di ogni evento è il seguente:

- Bt11: LoD = 0.1%
- MON810: LoD = 0.05%
- MON863: LoD = 0.05%

- NK603: LoD = 0.01 %
- GA21: LoD = 0.1%
- DAS1507: LoD= 0.05%
- DAS59122: LoD = 0.1%
- MIR604: LoD = 0.05%
- T25: LoD =0.01 %
- MON89034: LoD = 0.1%
- MON88017: LoD = 0.01%
- MON40-3-2: LoD > 0.01%
- A2704-12: LoD > 0.01%
- MON89788: LoD >0.01%

In questo caso, la validazione del LoD è stata eseguita con l'uso del nuovo Buffer 5x a reagente unico per tutti gli eventi presi in esame. Però soltanto per 5 eventi GM, come vedremo dalle tabelle sottostanti è stato possibile proseguire con la validazione del nuovo metodo.

In modo particolare per l'evento MON89034, non è stato possibile usare il Buffer 5x, in quanto viene ricercato con l'uso della mix contenente il Sybergreen.

Di conseguenza per questa metodica si è valutato un cambiamento nel numero di cicli di amplificazione in modo da uniformare tutte le metodiche. La metodica in uso prevedeva 35 cicli di amplificazione, ma in realtà è stato possibile ripristinare il tutto a 40 cicli, mantenendo sempre il LoD a 0,01%, senza aver problemi di comparsa di segnali aspecifici.

Nella tabella n°15 sono riportati i risultati ottenuti per i vari eventi della soia in cui 10 ripetizioni su 10 sono risultate positive alle varie diluizioni testate, perciò è possibile sostituire la mix separata con il buffer 5x.

Anche in questo caso, l'analisi qualitativa prevede di calcolare il LoD come precedentemente visto.

Tabella n°15 risultati eventi soia:

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
RR 0,1%	10	10	100,00
RR 0,05%	10	10	100,00
RR 0,01%	10	10	100,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
A2704-12 0,1%	10	10	100,00
A2704-12 0,05%	10	10	100,00
A2704-12 0,01%	10	10	100,00

Mentre per l'altro evento soia si mantiene la mix separata:

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON89788 0,1%	10	10	100,00
MON89788 0,05%	10	10	100,00
MON89788 0,01%	1	10	10,00

Dai risultati ottenuti per gli eventi del mais, notiamo che non tutti gli eventi hanno dimostrato il 100% alla concentrazione di 0,01%, perciò vediamo che per gli eventi MON810, MIR604 e T25 è possibile sostituire la mix separata con il buffer 5x, in quanto si è ottenuto un risultato pari a 10/10 positivi con 0.01%. come riportato dalla tabella n°16 a seguire.

Tabella n°16 risultati eventi mais :

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON810 0,1%	10	10	100,00
MON810 0,05%	10	10	100,00
MON810 0,01%	10	10	100,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MIR604 0,1%	10	10	100,00
MIR604 0,05%	10	10	100,00
MIR604 0,01%	10	10	100,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
T25 0,1%	10	10	100,00
T25 0,05%	10	10	100,00
T25 0,01%	10	10	100,00

Mentre per i seguenti eventi ciò non è stato possibile:

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
Bt11 0,1%	9	10	90,00
Bt11 0,05%	5	10	50,00
Bt11 0,01%	3	10	30,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
DAS1507 0,1%	10	10	100,00
DAS1507 0,05%	10	10	100,00
DAS1507 0,01%	2	10	20,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
NK603 0,1%	2	10	20,00
NK603 0,05%	0	10	0,00
NK603 0,01%	0	10	0,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
GA21 0,1%	10	10	100,00
GA21 0,05%	7	10	70,00
GA21 0,01%	1	10	10,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON88017 0,1%	10	10	100,00
MON88017 0,05%	10	10	100,00
MON88017 0,01%	4	10	40,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON863 0,1%	10	10	100,00
MON863 0,05%	10	10	100,00
MON863 0,01%	7	10	70,00

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
DAS59122 0,1%	10	10	100,00
DAS59122 0,05%	10	10	100,00
DAS59122 0,01%	4	10	40,00

Per l'evento MON89034, è stato verificato il LoD con il Sybrgreen:

QUANTITA'	OTTENUTI	ATTESI	OTTENUTI/ATTESI * 100
MON89034 0,1%	10	10	100,00
MON89034 0,05%	10	10	100,00
MON89034 0,01%	10	10	100,00

Confronto del LoD ottenuto con le metodiche precedentemente validate e le nuove metodiche in validazione:

LoD delle metodiche precedentemente validate	LoD delle metodiche in fase di validazione	NOTE:
Bt11= 0,1%	Bt11= 0,1%	Mantenuto
MON810 = 0,05%	MON810 = 0,01%	Migliorato
MON863 = 0,05%	MON863 = 0,05%	Mantenuto
NK603 = 0,01%	NK603 = 0,1%	Peggiorato
GA21= 0,1%	GA21=0,1%	Mantenuto
DAS1507= 0,05%	DAS1507=0,05%	Mantenuto
DAS59122 = 0,1%	DAS59122=0,05%	Migliorato
MIR604= 0,05%	MIR604=0,01%	Migliorato
T25= 0,01%	T25= 0,01%	Mantenuto
MON89034=0,1%	MON89034=0,01%	Migliorato
MON88017=0,01%	MON88017=0,05%	Peggiorato
MON40-3-2 > 0,01%	MON40-3-2 = 0,01%	Migliorato
A2704-12 > 0,01%	A2704-12= 0,01%	Migliorato
MON89788 > 0,01%	MON89788= 0,05%	Peggiorato

9.2 Risultati analisi quantitativa

Per gli eventi GM di mais e soia in cui con la nuova procedura analitica che prevede l'uso del buffer unico si è mantenuto il valore del LoD pari a 0.01%, è stato verificato anche il valore del LoQ del metodo, ovvero il Limite minimo di Quantificazione.

Nello specifico si tratta dei seguenti eventi GM:

- Soia MON40-3-2 (RR)
- Soia A2704-12

-Mais MON810

-Mais MIR604

-Mais T25

Ogni quantitativa è stata eseguita secondo gli schemi riportati nel capitolo precedente relativo al protocollo dell'analisi PCR quantitativa.

Per i 5 eventi, 2 della soia (MON40-3-2, A2704-12), e 3 del mais (MON810, MIR604, T25) son state testate 12 repliche delle diluizioni 0.1% e 0.05%, con le quali si calcola la deviazione standard (RSDr), ottenuta dalla media e il range di variabilità. Essa deve essere inferiore o pari al 25%.

9.2.1 Risultati validazione del LoQ nelle quantitative mais

Per gli eventi del mais MON810, T25 e MIR604 sono stati ottenuti i seguenti valori RSDr (Tabelle n°17).

Tabelle n°17: valori RSDr quantitative mais.

QUANTITA'	MEDIA	SR	n	\sqrt{n}	sr/\sqrt{n}	RSDr
MON810 0,10 %	0,11	0,04	12	3,46	0,01	10
MON810 0,05 %	0,06	0,02	12	3,46	0,01	10

QUANTITA'	MEDIA	SR	n	\sqrt{n}	sr/ \sqrt{n}	RSDr
MIR604 0,10 %	0,11	0,02	12	3,46	0,01	5
MIR604 0,05 %	0,04	0,03	12	3,46	0,01	22

QUANTITA'	MEDIA	SR	n	\sqrt{n}	sr/ \sqrt{n}	RSDr
T25 0,10 %	0,11	0,03	9	3	0,01	9
T25 0,05 %	0,05	0,02	9	3	0,01	13

Dalle tabelle n°17 sopra riportate, è possibile evidenziare che il valore RSDr per le diluizioni allo 0.05% di tutti gli eventi testati del mais è < 25%, pertanto, sarà possibile utilizzare tale diluizione nella curva di calibrazione al posto della diluizione 0.1%.

Perciò tale diluizione sarà considerata come LoQ del metodo, ovvero il limite minimo di quantificazione dell'evento GM che la nuova metodica validata è in grado di quantificare.

La nuova curva di calibrazione dei singoli eventi sarà pertanto la seguente:

- **Curva STD nuova validazione del MON810:**

STD1 – DNA MAIS MON810 10%
STD2 – DNA MAIS MON810 2,50%
STD3 – DNA MAIS MON810 0,60%
STD4 – DNA MAIS MON810 0,05%

- **Curva STD nuova validazione del MIR604:**

STD1 – DNA MAIS MIR604 10%
STD2 – DNA MAIS MIR604 2,50%
STD3 – DNA MAIS MIR604 0,60%
STD4 – DNA MAIS MIR604 0,05%

- **Curva STD nuova validazione del T25:**

STD1 – DNA MAIS T25 10,00%
STD2 – DNA MAIS T25 2,50%
STD3 – DNA MAIS T25 0,60%
STD4 – DNA MAIS T25 0,05%

9.2.2. Risultati della validazione del LoQ nelle quantitative soia

Per gli eventi della soia, quali MON40-3-2, A2704-12 sono stati ottenuti i seguenti valori RSDr (Tabelle n°18).

Tabelle n°18: Valori RSDr quantitative soia.

QUANTITA'	MEDIA	SR	n	\sqrt{n}	sr/ \sqrt{n}	RSDr
SOIA MON40-3-2 0,10%	0,26	0,09	12	3,46	0,03	10
SOIA MON40-3-2 0,05%	0,07	0,06	12	3,46	0,02	25

QUANTITA'	MEDIA	SR	n	\sqrt{n}	sr/ \sqrt{n}	RSDr
SOIA A2704-12 0,10 %	0,08	0,01	12	3,46	0	4
SOIA A2704-12 0,05 %	0,05	0,01	9	3	0	7

Dalle tabelle n°18, è possibile evidenziare che il valore RSDr per le diluizioni allo 0.05% di tutti gli eventi testati della soia è < o pari al 25% pertanto sarà

possibile utilizzare tale diluizione nella curva di calibrazione al posto della diluizione 0.1%.

Perciò tale diluizione sarà considerata come LoQ del metodo, ovvero il limite minimo di quantificazione dell'evento GM che la nuova metodica validata è in grado di quantificare.

La nuova curva di calibrazione dei singoli eventi sarà pertanto la seguente:

- **Curva STD della nuova validazione soia RR:**

STD1 – DNA SOIA MON40-3-2	10,00%
STD2 – DNA SOIA MON40-3-2	2,50%
STD3 – DNA SOIA MON40-3-2	0,60%
STD4 – DNA SOIA MON40-3-2	0,05%

- **Curva STD della nuova validazione soia A2704-12:**

STD1 – DNA SOIA A2704-12	10,00%
STD2 – DNA SOIA A2704-12	2,50%
STD3 – DNA SOIA A2704-12	0,60%
STD4 – DNA SOIA A2704-12	0,05%

In accordo con i dati riportati in tabella il nuovo LoQ validato è pari allo 0.05% per tutti e 5 gli eventi testati, a differenza della metodica precedente in cui il LoQ era pari allo 0.1%. Ciò significa che la modifica apportata alla metodica in uso dal laboratorio Bioasis, ovvero la sostituzione del 10X Reaction Buffer con il Buffer 5X ha portato non solo ad una velocità

nell'eseguire l'analisi ma anche ad un miglioramento nella quantificazione degli eventi mais e soia geneticamente modificati.

9.2.3 Verifica della riproducibilità della metodica: analisi dei campioni positivi per gli eventi mais MON810 e soia RR

Per verificare se il metodo validato con la mix di reazione a reagenti unici, Buffer 5X, porta a dei dati riproducibili mantenendo il LoD e il LoQ rispettivamente di 0.01% e di 0.05%, si esegue un'analisi quantitativa su campioni di analisi pervenuti al laboratorio Bioaesis da aziende del territorio, già testati per gli eventi quantitativi soia RR e mais MON810 e risultati positivi eseguendo la metodica in uso con il 10X Reaction Buffer.

Pertanto, tali campioni sono stati testati per la quantificazione di tali eventi utilizzando la nuova metodica con Buffer5X, per verificare se a distanza di tempo, con una metodica differente ed un operatore differente, i campioni risultassero ancora positivi, ma soprattutto per verificare se la quantità calcolata dopo la nuova validazione risultasse analoga a quella determinata la prima volta.

In totale sono stati analizzati 2 campioni risultati positivi per il mais MON810, e 10 campioni risultati positivi per la soia RR, ogni campione è stato analizzato in duplicato.

Sono stati considerati positivi solo i campioni che presentavano un valore di Ct superiore a quello del LoD, analizzato nella stessa seduta analitica (*Tabella n°19*).

Tabella n°19: Analisi quantitativa dei campioni precedentemente positivi. Eventi mais MON810 e soia RR:

CAMPIONI POSITIVI	MATRICE	RISULTATO EVENTO MAIS MON810	RISULTATO EVENTO SOIA RR
18P0781	MANGIME	>10	/
18P0787	MANGIME	/	>10
18P0789	MANGIME	>10	>10
19P0844	MANGIME	/	<LoQ (0,01)
18P0880	SOIA	/	>10
18P1096	MANGIME	/	0,17
18P1097	MANGIME	/	0,29
18P1151	MANGIME	/	0,16
18P1152	MANGIME	/	<LoQ (0,02)

9.2.3.1 Quantificazione MON810

Di seguito è riportato il grafico della curva STD (figura n°21) accettata con i relativi valori RSq e slope, necessari, insieme ai valori di Ct per calcolare la % di OGM MON810 rilevata nei campioni di analisi.

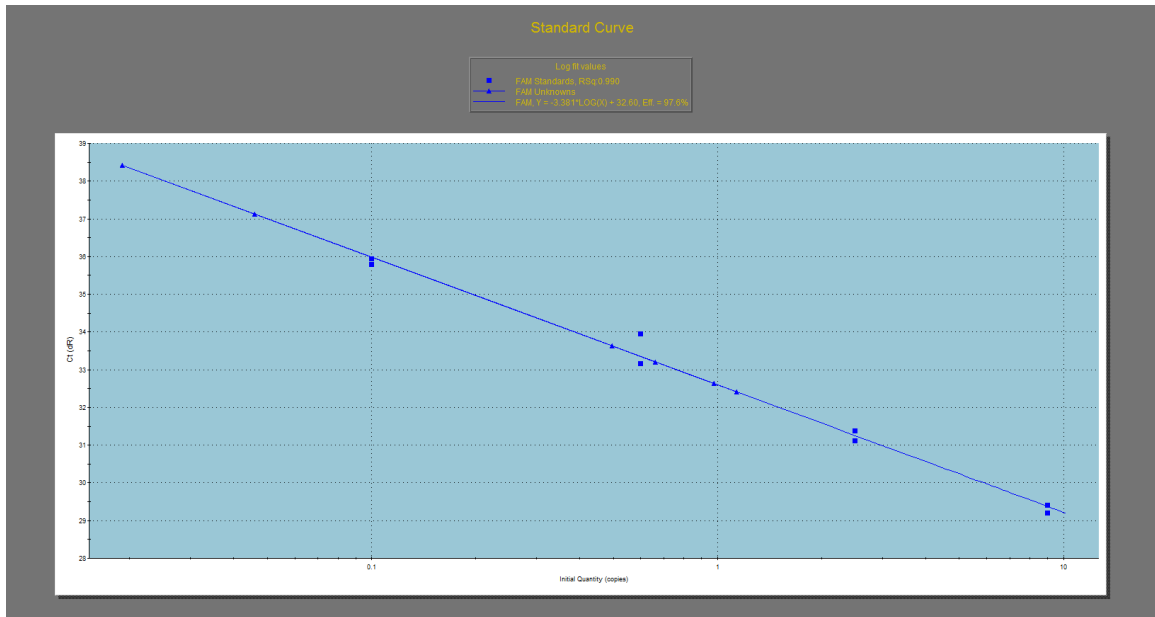


Figura n° 21 Curva STD MON810 amplificazione dell'analisi quantitativa dei campioni positivi per l'evento MON810, con inseriti anche i campioni testati per poter calcolare la quantità dell'evento transgenico MON810.

Per creare la retta di taratura, gli standard sono analizzati in doppio e per ottenere una retta che poi possa essere utilizzata per quantificare i campioni è necessario avere almeno 3 punti validi.

Lo strumento Stratagene è in grado di fornire una quantificazione del campione analizzato ma questa quantificazione non è normalizzata per il gene endogeno (la zeina); di conseguenza il valore ottenuto dallo strumento, deve essere normalizzato con l'efficienza di estrazione, ciò si ottiene attraverso il calcolo del "ΔCt" che viene effettuato attraverso un foglio di calcolo.

La normalizzazione è eseguita sottraendo al valore medio di Ct gene specifico il valore di Ct ottenuto con il gene endogeno (ΔCt).

Questi valori vengono poi usati nella FORMULA DI TENDENZA che confronta il " ΔCt " del campione con il " ΔCt " degli standard rapportandolo poi al valore logaritmico della percentuale in modo da dare il risultato finale.

Dopo la normalizzazione, quindi, la quantità percentuale di MON 810 nei campioni è di:

18P0781 = 5.63% MON810

18P0789 >10 % MON810

Dei 2 campioni positivi per mais MON810 a seguito della nuova analisi entrambi sono risultati positivi, in particolar modo, confrontando i risultati con la quantificazione precedente, notiamo che per il campione 18P0789 il risultato di MON810 quantificato in esso è per entrambe le metodiche >10%, perciò il dato è riproducibile ed indica che il quantitativo di mais GM presente nel campione è molto elevato.

Nel caso del campione 18P0781 con la precedente metodica si è ottenuto una quantificazione >10% a differenza della nuova quantificazione pari a 5.63%.

Il risultato >10% indica che il campione presenta un quantitativo di mais transgenico MON810 al di sopra dello STD1 MON810, non quantificabile in

maniera accurata. Con la nuova procedura analitica si ottiene un dato più accurato e quindi quantificabile.

9.2.3.2 Quantificazione RR

Di seguito è riportato il grafico della curva STD accettata con i relativi valori RSq e slope (Figura n°22), necessari insieme ai valori di Ct per calcolare la % di OGM RR rilevata nei campioni di analisi.

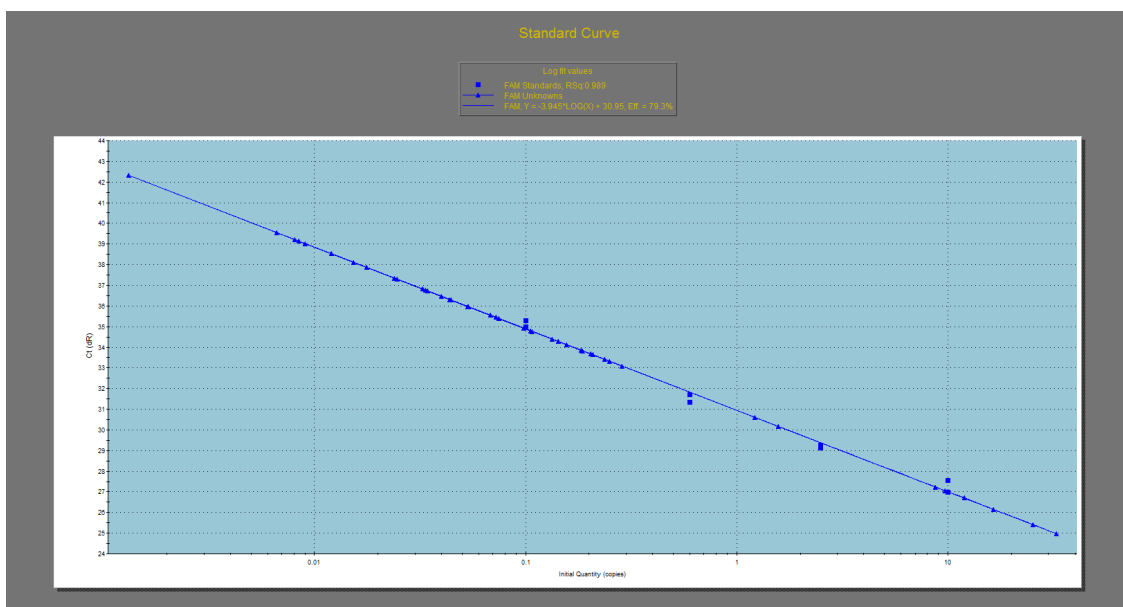


Figura n°22: Curva STD RR amplificazione dell'analisi quantitativa dei campioni positivi per l'evento RR con inseriti anche i campioni testati per poter calcolare la quantità dell'evento transgenico RR.

Anche per la soia RR lo strumento fornisce una quantificazione del campione analizzato ma questa quantificazione non è normalizzata per il gene endogeno Gmax-lec. Pertanto il valore ottenuto dallo strumento deve essere

normalizzato con l'efficienza di estrazione, attraverso il calcolo del “ ΔC_t ” che viene effettuato attraverso un foglio di calcolo.

Dopo la normalizzazione, quindi, la quantità percentuale di RR nei campioni è la seguente:

18P0787 >10%

18P0789 >10%

18P0844 N.R.

18P0880 >10%

18P1096 N.R.

18P1097 N.R.

18P1151 N.R.

18P1152 N.R.

Di 8 campioni positivi per la soia in 3 campioni si è riscontrato un quantitativo di soia >10%, dato ottenuto anche con la precedente metodica per gli stessi campioni. Mentre i restanti 5 campioni sono risultati non rilevabili (N.R.) e non quantificabili, a differenza della metodica precedente in cui il quantitativo era davvero minimo (< LoQ o compreso tra un range di 0,16-0,29%).

Il risultato espresso come <LoQ indica che il quantitativo di soia transgenica RR è presente nel campione testato nel range compreso tra il LoD e il LoQ; mentre il risultato riportato come N.R. indica che il quantitativo di soia RR riscontrato è inferiore al LoD (0,01%).

Tabella n°20 : Risultati a confronto tra quantificazione dell'evento GM con mix a reagenti unici e mix a reagenti separati, prima e dopo la validazione.

CAMPIONI	RISULTATI ANALISI BIOAESIS CON MIX DI REAZIONE A REAGENTI SEPARATI	RISULTATI ANALISI NUOVA VALIDAZIONE CON MIX DI REAZIONE A REAGENTE UNICO
18P0781	MAIS MON810: >10	MAIS MON810: 5,63
18P0787	SOIA RR: >10	SOIA RR: >10
18P0789	MAIS MON810: >10 SOIA RR: >10	MAIS MON810: >10 SOIA RR: >10
19P0844	SOIA RR: <LoQ (0,01)	SOIA RR: N.R.
18P0880	SOIA RR: >10	SOIA RR: >10
18P1096	SOIA RR: 0,17	SOIA RR: N.R.
18P1097	SOIA RR: 0,29	SOIA RR: N.R.
18P1151	SOIA RR: 0,16	SOIA RR: N.R.
18P1152	SOIA RR: <LoQ (0,02)	SOIA RR: N.R.

Dalla tabella n°20 è possibile dedurre che utilizzando il Buffer 5x della nuova metodica validata, si è ottenuto un risultato riproducibile in 3 campioni per entrambe le mix (18P0787, 18P0789, 19P0880) nonstate sia stati eseguiti in tempi differenti e da operatori differenti.

In altri campioni vediamo che il risultato con il Buffer 5X risulta leggermente diverso rispetto alla metodica con i reagenti separati. Ciò può dipendere dal fatto che il quantitativo di contaminante GM rilevato precedentemente è

molto basso e di conseguenza in seguito a ripetute fasi di scongelamento è possibile che il poco DNA rilevato nella prima seduta, si sia in parte degradato fornendo quindi dei valori più bassi.

Capitolo decimo

CONCLUSIONI

L'iter laboristico eseguito durante il percorso di questa tesi sperimentale basata sulla rivalidazione dei limiti LoD e LoQ nelle analisi di rintracciabilità degli OGM, ha permesso di sostituire nelle metodiche in uso del laboratorio Bioasis, il 10X Reaction Buffer e altri reagenti con il nuovo reagente unico Buffer 5X. Lo scopo della sostituzione è quello di velocizzare a livello pratico le metodiche analitiche e nello stesso tempo di ottenere LoD e LoQ migliori rispetto a quanto calcolato dalle precedenti metodiche.

In effetti per alcune procedure analitiche la sostituzione dei reagenti ha portato il vantaggio di migliorare il LoQ della metodica da 0,1% a 0,05%, rendendo la metodica stessa più sensibile.

Inoltre l'impiego di un Buffer unico contenente già dNTPs, MgCl₂ e tutti gli additivi necessari all'esecuzione della reazione permette di velocizzare i tempi di esecuzione e consente di rendere più robusta la procedura analitica venendo meno gli errori dovuti al fatto di dover prelevare quantitativi differenti di ogni singolo reagente.

Delle 21 procedure analitiche prese in considerazione, solo in 6 (GmaxLec,

RR, A2704-12, MON810, MIR604, T25) è stato possibile eseguire la sostituzione dei reagenti. Mentre per i geni endogeni 35s/tNOS, la sostituzione del 10x Reaction Buffer con il Buffer 5x, non è stata possibile eseguirla; tuttavia la validazione della metodica di screening, riconfermando il 10x Reaction Buffer, ha permesso di abbassare il threshold per entrambi i geni endogeni ottenendo valori di Ct inferiori rispetto alla precedente validazione. Per quanto riguarda l'evento MON89034 la modifica apportata alla metodica, non si basa sulla sostituzione della mix di reazione ma ben si sul profilo termico, in quanto tale evento, per essere ricercato necessita della mix SybrGreen. La modifica eseguita riguarda il n° di cicli di amplificazione, in quanto nella metodica in uso erano previsti 35 cicli che sono stati aumentati a 40 in modo da standardizzare la procedura con tutte le altre metodiche qualitative.

In conclusione, è importante la validazione del metodo analitico ogni volta che si apportano modifiche ad esso, in quanto permette di confermare che i requisiti previsti per l'utilizzo del metodo stesso siano soddisfatti.

In questa Tesi, la modifica apportata ai metodi analitici per la rintracciabilità degli OGM riguarda la sostituzione di alcuni reattivi nell'esecuzione della procedura analitica, di conseguenza è stato necessario rivalidare alcuni

parametri richiesti nel processo di validazione del metodo, quali il LoD ed il LoQ.

Infine, considerando che il campo del rilevamento degli OGM si evolve rapidamente, ci si aspetta che nel prossimo futuro saranno necessari considerevoli adeguamenti delle strategie proposte. Di conseguenza le metodiche già validate e in uso presso i laboratori accreditati, richiedono un aggiornamento periodico, con necessità proprio di rivalidare i vari parametri a seguito dell'incremento o della sostituzione dei reagenti in uso. Lo scopo ultimo è sempre di migliorare la capacità di rintracciabilità degli OGM in modo da fornire ai consumatori informazioni più chiare possibili sull'acquisto del prodotto finale.

BIBLIOGRAFIA

1. **Clive James.** Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA brief 49-2014
2. <http://www.agrinews.info/news/agroalimentare/ogm-in-vigore-la-nuova-normativa-italiana/>
3. **S. Garavelloni, M. Losi, V. Losi, E. Perri, D. Villa, R. Zecchinelli,** Definizione di protocolli e metodi di analisi per verificare l'assenza di sementi ogm in mais e soia, Allegato 1 ENSE – Laboratorio Analisi Tavazzano.
4. Manuale di laboratorio per l'anaisi di OGM in matrici agroalimentari. ENEA
5. www.bioaesis.net
6. Regolamento (CE) n. 1830/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea n.268 del 18-10-2003 <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/legalbasis.htm>
7. “PROCEDURA VALIDAZIONE METODI DI PROVA” P0032 – Rev.4 del 08/05/2015 Bioaesis

8. Direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 marzo 2001. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee n.106 del 17-4-3
9. <http://www.fondazioneirittigenetici.org/agrobiotech/>
10. <http://nptel.ac.in/courses/102103016/module3/lec24/2.html>
11. **Daley M. et al. (1998)**, 'Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants' *Plant Cell Rep.* 17:489-496.
12. <http://mmg-233-2014>
geneticsgenomics.wikia.com/wiki/Genetically_Modified_Bt_Corn
13. **Bailey M.A. & Kaeppeler H. F. (2001)**, 'Workshop presentations from the 2000 World Congress on In Vitro biology' *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:101-102.
14. Holmberg N. et al. (1997), 'Transgenic tobacco expressing *Vitroescilla haemoglobin* exhibits enhanced growth and altered metabolite production' *Nature Biotech.* 15:244-247.
15. Komari T. et al. (1996), 'Vectors carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers' *The Plant J.* 10:165-174.

16. Sugita K. et al. (1999), 'Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing' *Plant Cell Rep.* 18:941-947.
17. 2001 Raccomandazione 2003/556/CE, GUCE L 189 del 29/7/2003, pag. 36
18. Consensus Document (2006), 'Coesistenza tra colture tradizionali, biologiche e geneticamente modificate' 15 marzo 2006
19. <http://gmo-crl.jrc.it>
20. Richter L.J. et al. (2000), 'Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization' *Nature Biotechnol.* 18: 1167–1171.
21. Fischer R. et al. (2003), 'Production of antibodies in plants and their use for global health' *Vaccine* 21: 820-825.
22. http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_en.html sito informativo dell' "Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare". L'EFSA fornisce consulenza scientifica obiettiva su tutte le questioni che abbiano un impatto diretto o indiretto sulla sicurezza di alimenti e mangimi.

23. ISAAA International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (2005), 'Global Status of Biotech/GM crops in 2005' ISAAA Briefs 34/2005
24. <http://gmofree-euroregions.regione.marche.it>
25. European Parliament and Council, 2002; European Commission, 2006.
26. Kay S. & Paoletti C. (2002), 'Sampling Strategies for GMO Detection and/or Quantification' (Rev. 4.2) EUR 20239 EN. Joint Research Centre, European Commission, Ispra
27. Regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati. Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea n. 268 del 18-10-2003
- <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/legalbasis.htm>
28. https://webgate.ec.europa.eu/dyna/gm_register/index_en.cfm
29. Rigby D. et al. (2004), 'Consumer willingness to pay to reduce GMOs in food and increase the robustness of GM labelling' Report to Department of the Environment, Food and Rural Affairs, University of Manchester.

30. Van Dujin G. *et al.* (2002), 'Detection of GMO in foods by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods' *J. AOAC Int.* 85:787-791.
31. Tonge R. *et al.* (2001), 'Validation and development of fluorescence twodimensional differential gel electrophoresis proteomics technology' *Proteomics* 1: 377–396.
32. EURL – European Union Reference Laboratory - <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>
33. M. Aleandri, LINEE GUIDA PER LA GESTIONE DELLE PRODUZIONI MANGIMISTICHE NELLA FILIERA NON-OGM, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.
34. Paoletti C. & Mazzara M. (2005), 'Definition of minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing' European Network of GMO Laboratories (ENGL).
35. ALLEGATO ESTRAZIONE OGM - rev.7 Bioaesis
36. Integrated Solutions — Real-Time PCR Applications- www.qiagen.com
37. Introduction to Quantitative PCR Methods and Application Guide - Stratagene-mx3005p-9pcr-system

38. Organismi geneticamente modificati-OGM (qualitativa): promotore 35S e terminatore NOS- ST3.1 – MIP 001 rev. 14
39. Holst-Jensen A. et al. “PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs).” *Anal Bioanal Chem.* 2003, 375 (8):985-93
40. <http://www.steroglass.it/scheda.cfm?lang=ita&indice=PIASTRE%20PCR&voce=11&scheda=4322&fsa%20ction=c3>
41. Organismi geneticamente modificati-OGM (qualitativa mais): BT11, MON810, MON863, NK603, GA21, DAS1507, DAS59122, MIR604, T25, MON89034, MON88017- ST3.1 – MIP 016 rev. 9
42. Organismi geneticamente modificati-OGM (qualitativa soia): MON40-3-2, A2704-12, MON89788- ST3.1 – MIP 024 rev. 7
43. Organismi geneticamente modificati-OGM (quantitativa): Mais MON810” - ST3.1 – MIP 014 rev.10;
44. Organismi geneticamente modificati-OGM (quantitativa): Mais MIR604- ST3.1 – MIP 022 rev. 8
45. Organismi geneticamente modificati-OGM (quantitativa): Mais T25- ST3.1 – MIP 023 rev. 8
46. Organismi geneticamente modificati-OGM (quantitativa): Soia MON40-3-2- ST3.1 – MIP 003 rev. 13

47. Organismi geneticamente modificati-OGM (quantitativa): Soia

A2704-12- ST3.1 – MIP 025 rev. 8

RINGRAZIAMENTI

Siamo giunti qui, al capitolo finale della mia Tesi Magistrale.

Il capitolo “Ringraziamenti”. Il più difficile da scrivere ma al termine del quale potrò scrivere a caratteri cubitali la parola FINE! Eh si! Perché questo capitolo chiude un percorso della mia vita importantissimo; un percorso che mi ha aiutato a combattere le mie paure facendomi crescere come persona, e come donna. Potrei chiamarlo, un percorso da “Studentessa Universitaria”, come canta Simone Cristicchi;

«...Studentessa universitaria, triste e solitaria

Nella tua stanzetta umida ripassi bene la lezione di filosofia

E la mattina sei già china sulla scrivania

E la sera ti ritrovi a fissare il soffitto...»

Si esatto, ero proprio io quella studentessa universitaria, triste e solitaria, che nella cameretta ripassavo bene, non la lezione di filosofia, ma ben sì la lezione di Biologia.

E la mattina china sulla scrivania e la sera a fissare il soffitto: quel soffitto se potesse parlare...nè direbbe di cotte e di crude!!

Nessun rumore, nessuna distrazione intorno a me; nessuno doveva aprire bocca quando stavo lì, a testa bassa e concentrata presa dall'ansia pre-esame a leggere per la decima volta la stessa frase che non riuscivo a capire.

Prima dei ringraziamenti, però, vorrei ricordare con voi alcuni istanti di questo lungo percorso; per esempio alla Triennale, quando per raggiungere l'università dovevo prendere l'autobus delle 7:05 diretto, Ostra-Ancona, e poi diventare una sardina nel 46 da Piazza Cavour a Montedago. Poi via di corsa per le discese del polo universitario che in inverno diventano piste da scii e d'estate le torride dune del Sarah. Finalmente arrivi in aula. Un minuto dall'inizio della lezione, o a lezione già iniziata pura normalità con il traffico di Ancona.

«Sotto braccio libri, fotocopie, appunti sottolineati ed un libretto dove collezioni i voti degli esami...»

Quegli esami, tanto sudati e tanto studiati, che pensi di riuscire a prendere un voto modesto 25/30 o 26/30, mentre ottieni un banale 18/30, che tanto banale non è, perché se pensi a tutti gli esami da dare per arrivare alla fine, accetti e porti a casa! Peggio è esser bocciati, perché allora lì inizi a dire:

“Ecco adesso mi laureo il 30 Febbraio dell’anno del mai!”

Nonostante però tutto questo, sono uscita dalla Trinnale a testa alta, portandomi a casa un bel 93/110, tutto meritato!

Ho provato un’emozione fortissima il giorno della proclamazione e allo stesso tempo una sensazione di malinconia per questo mondo universitario; Ed ecco che ho ripreso a studiare iscrivendomi alla Magistrale, convinta di poter fare molto di più.

Una vita fatta di lezioni, tirocinii, esami e laboratori. Solita routine.

Poi, quando meno te lo aspetti, ecco il primo 30 con Lode tanto sognato!

Mi sento felice, ma sola senza i miei pazzi amici sparzi qua e là per il mondo:

Fatma e Patrizia, entrambe infermiere modello una Marchigiana, l’altra Abruzzese. Virginia, un economista e instancabile viaggiatrice. Saida, futura dentista e futura mamma, ma oltre oceano (Piccolino...la zia dall’Italia ti sta aspettando!!). Baa amante degli scatoloni e dell’arco. Andrea, un imprenditore nato. Infine Simone, il mio Amore grande, tornitore del mio cuore, sempre presente in ogni istante, sempre a sostenermi e spronarmi per superare ogni salita ed ogni ostacolo presentatomi davanti...perciò il primo grazie va a te. GRAZIE INFINITE! Metà Laurea è anche tua!

Ma nonostante loro, i miei amici di sempre, non fossero con me fisicamente, sono stati con me con il cuore, con un pensiero o un messaggio, e li ringrazio per la loro amicizia che durerà in eterno, perché è grazie al loro incoraggiamento, se non ho mollato questo lungo percorso tutto in salita.

GRAZIE DI CUORE AMICI!

Poi però la vita ti sorprende e se ho iniziato questo percorso da sola, l'ho concluso con delle colleghe speciali, che tra lezioni, risate e lo spaccio degli appunti, siamo riuscite a concludere insieme questo lungo percorso fatto di ansie, stress ma anche parecchie soddisfazioni. Perciò Grazie Dott.ssa Cristina Baldini, Dotto.ssa Elisa Rocconi e Dott.ssa Gioia Pichilli, per avermi accompagnato nelle gioie e nei dolori in tutti questi anni universitari. Vi voglio bene con tutto il cuore, mie dolci "Emarginate"!

Ora è giunto il momento dei ringraziamenti seri.

Innanzitutto ringrazio il Bioaesis e tutto il suo staff, a partire dalle Titolari, la Dott.ssa Bianchi Daniela e la Dott.ssa Trozzi Caterina, correlatore di questa Tesi. Grazie per la vostra disponibilità nel perseguire insieme questo percorso di Tesi, ma grazie soprattutto per avermi insegnato ad amare ancor di più il lavoro di Biologa.

Ringrazio Lei Prof.ssa Anna La Teana, per la sua cordialità, disponibilità e per aver creduto in me in questo percorso di tesi. Grazie anche per il suo amore nell'insegnamento che viene percepito ad ogni lezione da tutti i suoi studenti.

Infine, ringrazio con tutto il mio cuore la mia splendida famiglia: mia madre Ivana, mio padre Onelio, mio fratello Simone, mia futura cognata Erika e il mio More grande, Simone. Grazie di cuore a voi tutti perché nonostante tutti gli alti e bassi causati dallo stress dei “giorni no!” mi avete sempre incoraggiata a credere in me stessa per ottenere un risultato sempre più alto giorno dopo giorno, esame dopo esame. Infatti eccolo lì, quel traguardo finale, che mai e poi mai potevo immaginare.

Ringrazio tutti i miei parenti, zii, cugini e nipoti che non vedono l'ora di festeggiare questa Laurea, perché con questa ho davvero finito di rompere le scatole a tutti dicendo: “No, non posso, devo studiare; no, non posso ho gli esami!..Ora verrò davvero a sciare con voi a capodanno!”

Per ultimo ma non meno importante, un Grazie speciale va ai miei cari Nonni, Guido e Chiara, Antonio e Tardina, ai miei zii, Luigi e Oliviana, e alla mia sorellina che si trovano tutti insieme in un posto magico e mi proteggono da

lassù. Sento la loro presenza sempre e ovunque, sono gli angeli custodi di tutta la famiglia!

Manca un solo ringraziamento, e lo vorrei fare a me stessa e alla mia testardaggine. Grazie! Per aver lottato fino alla fine, per non essermi arresa mai e per aver creduto in me stessa anche quando stavo per perdere la speranza.

Grazie, Grazie di cuore a tutti voi. Spero di avervi reso orgogliosi e fieri di me. Vi amo.

Ilaria.

FINE