

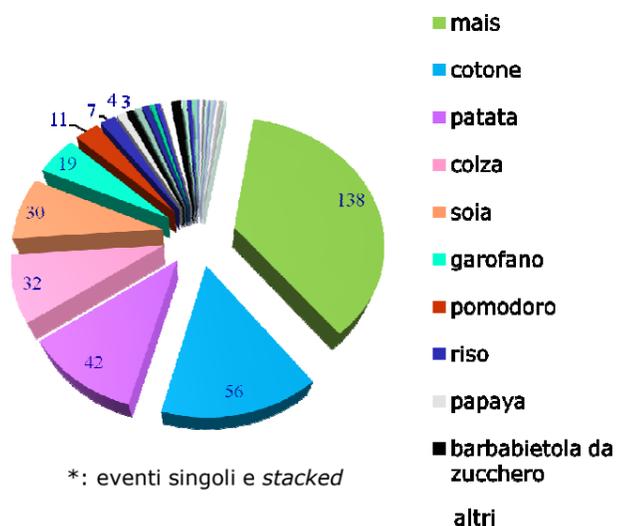
Validazione di quattro eventi GM per completare il controllo dei mais geneticamente modificati autorizzati in UE

Pierboni E., Torricelli M.*, Tovo G.R., Rondini C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, *Università degli Studi di Perugia – Dipartimento di Medicina Veterinaria, Perugia, Italia

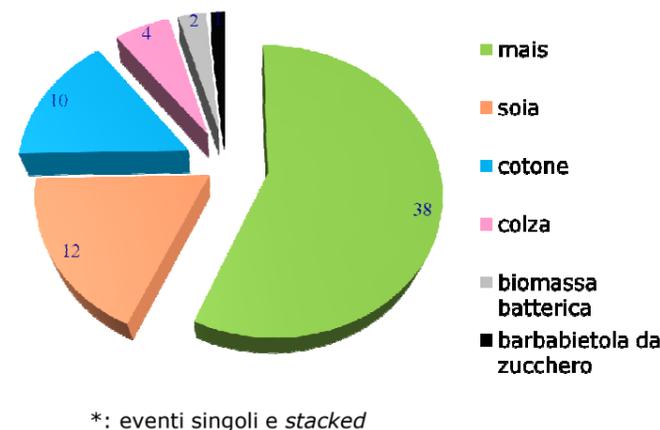
INTRODUZIONE

377* OGM autorizzati nel Mondo



Il numero di eventi geneticamente modificati (GM) commercializzati e autorizzati nel mondo (1) è in continuo incremento e molti di questi non sono autorizzati nell'Unione Europea, dove il controllo degli OGM è altamente regolamentato (2-6). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di implementare il numero degli eventi di mais GM per completare il controllo di tutti i mais transgenici attualmente autorizzati in Europa.

67* OGM autorizzati in UE



MATERIALI E METODI

Per la validazione sono stati utilizzati i seguenti materiali di riferimento certificati (MRC): farine di mais GM puro eterozigote di MIR162, MON87460, MON89034 e 100% di MON88017, (AOCS).

Il DNA è stato estratto con metodo basato su CTAB (7) e purificato tramite NucleoSpin gDNA Clean-up (Macherey-Nagel).

Dopo la fase di estrazione, la validazione ha previsto l'ottimizzazione dei primer e delle sonde degli eventi transgenici MIR162, MON88017, MON87460, MON89034 (8), la verifica della specificità, della robustezza e la determinazione del LOD (*limit of detection*) di ciascun metodo (9).

I DNA estratti sono stati valutati qualitativamente e quantitativamente al biofotometro e mediante test d'inibizione in Fast PCR Real-time per il gene endogeno del mais, ADH1 (*alcohol dehydrogenase 1*) testando il DNA tal quale e la sua diluizione 1:4 (10; 11).

Tutte le PCR sono state eseguite con il seguente profilo termico, 1 ciclo a 95°C per 20 s, 40 cicli a 95°C per 3 s e 60°C per 30 s, sullo strumento 7900HT Fast Real-Time PCR System, tranne la prova relativa alla robustezza, in cui si è impiegato lo strumento 7500 Fast Real-time PCR System.

Preparazione del campione

Estrazione e purificazione

Fast PCR Real-time per 7 geni endogeni

Fast PCR Real-time per 7 target di screening

Fast PCR Real-time tipizzazione per

MON810	BT11
GA21	MON863
MIR604	BT176 _{P/E}
NK603	MIR162
T25	MON87460
DAS1507	MON88017
DAS59122	MON89034
MON40-3-2	MON1445
MON89788	Ms8
A2704-12	H7-1
LL62 _{P/E}	EH92-527-1 _{n.a.}

Fast PCR Real-time quantitativa (qPCR)

P: pending; E: expired; n.a.: non autorizzati

RISULTATI

Le concentrazioni scelte dall'ottimizzazione dei primer e delle sonde sono state le seguenti:

Mais GM	Primer F (nM)	Primer R (nM)	Sonda (nM)
MIR162	150	900	200
MON87460	900	900	250
MON88017	300	900	200
MON89034	450	900	250

La specificità di tutti i metodi è risultata essere del 100%. Il LOD è stato stimato essere di circa 10 *haploid genome equivalents* (HGE) per MON87460, MON88017 e MON89034, mentre di circa 20 HGE per MIR162.

Tutti i sistemi si sono dimostrati robusti, registrando il 100% di concordanza dei dati ottenuti dalla determinazione del LOD, mediante i due differenti strumenti di PCR Real-time.

DISCUSSIONE

Questo lavoro ha dimostrato che i metodi in Fast PCR Real-time sono validi allo scopo e permettono di ottenere buoni risultati in circa la metà del tempo rispetto a una PCR in modalità standard: questo approccio è molto utile per i laboratori deputati al controllo ufficiale degli organismi geneticamente modificati (OGM) su alimenti ad uso umano e zootecnico anche per la riduzione dei tempi e dei costi. Ciò ha permesso al laboratorio di aggiornare e di implementare il diagramma di flusso dei metodi OGM, completando l'analisi dei 38 mais GM autorizzati in Europa, compresi sia gli eventi singoli sia gli eventi *stacked*. In conclusione, questo lavoro ha consentito al laboratorio di integrare il controllo da 27 a 44 OGM autorizzati e da 3 a 10 di quelli non autorizzati, *pending* e *expired* (eventi singoli e *stacked*).

Bibliografia: 1. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>; 2. Regolamento (CE) N. 1829/2003. G.U. (UE) L 268, 1-23; 3. Regolamento (CE) N. 1830/2003. G.U. (UE) L 268, 24-28; 4. Regolamento (CE) N. 834/2007 del Consiglio del 28 giugno 2007; 5. Regolamento (UE) N. 619/2011 della Commissione del 24 giugno 2011; 6. Regolamento (CE) N. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004; 7. ISO 21571:2013; 8. <http://gm-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>; 9. ENGL (2015). Definition of MPR for Analytical Methods of GMO Testing. 20 October 2015; 10. UNI EN ISO 21570:2013; 11. Waiblinger H.U. & Grohmann L. (2014). Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. doi: 10.1007/s00003-014-0862-3