

Controllo ufficiale degli OGM nel settore agroalimentare

Ugo Marchesi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana
Centro di Referenza Nazionale per la ricerca di OGM

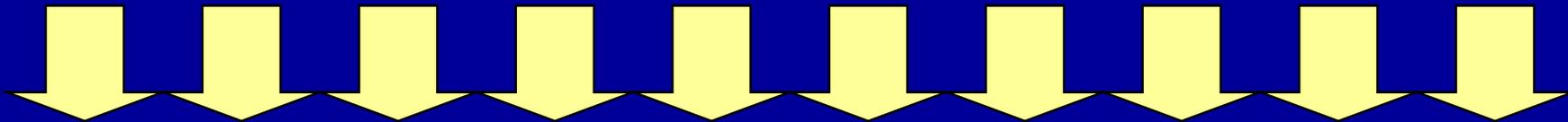
ugo.marchesi@izslt.it



ORGANISMI COINVOLTI NEL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI OGM

MINISTERO DELLA SALUTE

REGIONI



UFFICI SANITA' MARITTIMA

Monitoraggio flussi di soia e mais GM nei porti italiani

NAS, ASL-SIAN

Controllo ottemperanza normativa OGM alimentazione umana

ASL -Servizi Veterinari

Controllo ottemperanza normativa OGM alimentazione animale

IIZZSS

Controllo analitico

Centro di Referenza Nazionale per la ricerca di OGM

IZS Lazio e Toscana

ISS

Revisione di analisi



Alimenti geneticamente modificati autorizzati nell'Unione Europea

GENETICALLY MODIFIED (GM) FOODS AUTHORISED IN THE EUROPEAN UNION

	EVENT	CROP	APPLICANT	TRAIT	POTENTIAL FOOD USES	DATE	LEGAL BASIS
1	GTS 40/3/2	Soybean	Monsanto	Insect protection and herbicide tolerance	Soy foods. Soy foods include soy beverages, tofu, soy oil, soy flour, lecithin.	03.04.1996	Dir. 90/220/EEC Art. 13
2	Bt 176	Maize	Ciba-Geigy	Insect protection and herbicide tolerance	Maize foods. Maize foods include kernels, oil, maize flour, sugar, syrup.	23.01.1997	Dir. 90/220/EEC Art. 13
3	TOPAS 19/2	Oilseed rape	AgrEvo	Herbicide tolerance	Rapeseed oil. Products made with rapeseed oil may include fried foods, baked products and snack foods.	24.06.1997	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
4	MS1 / RF2	Oilseed rape	Plant Genetic Systems	Herbicide tolerance		24.06.1997	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
5	MS1 / RF1	Oilseed rape	Plant Genetic Systems	Herbicide tolerance		24.06.1997	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
6	GT 73	Oilseed rape	Monsanto	Herbicide tolerance		21.11.1997	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
7	MON 810	Maize	Monsanto	Insect protection	Maize derivatives. These may include maize oil, maize flour, sugar and syrup. Products made with maize derivatives may include snack foods, baked foods, fried foods, confectionary and soft drinks.	06.02.1998	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
8	T 25	Maize	AgrEvo	Herbicide tolerance		06.02.1998	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
9	Bt 11	Maize	Novartis	Insect protection		06.02.1998	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
10	MON 809	Maize	Pioneer	Insect protection		23.10.1998	Reg. (EC) 258/97 Art. 5

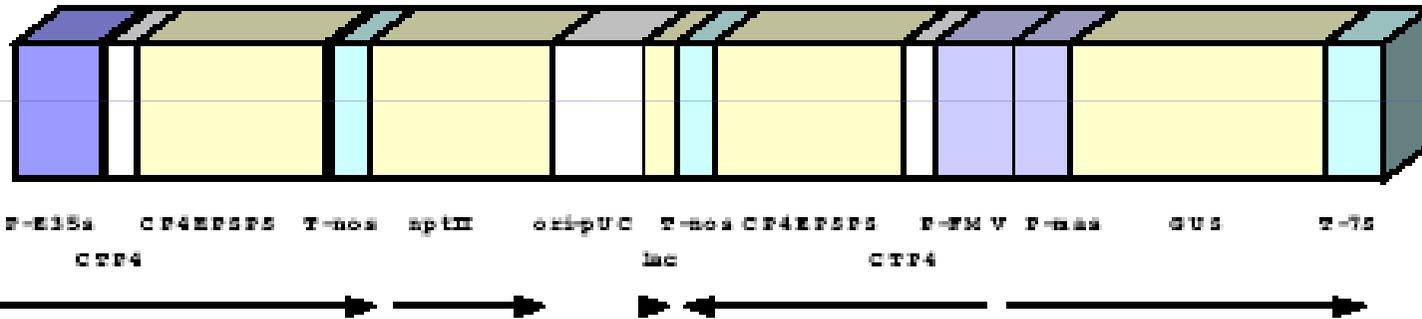
Alimenti geneticamente modificati autorizzati nell'Unione Europea

GENETICALLY MODIFIED (GM) FOODS AUTHORISED IN THE EUROPEAN UNION

	EVENT	CROP	APPLICANT	TRAIT	POTENTIAL FOOD USES	DATE	LEGAL BASIS
11	Falcon GS 40/90	Oilseed rape	Hoechst / AgrEvo	Herbicide tolerance	Rapeseed oil. Products made with rapeseed oil may include fried foods, baked foods and snack foods.	08.11.1999	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
12	Liberator L62	Oilseed rape	Hoechst / AgrEvo	Herbicide tolerance		08.11.1999	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
13	MS8/RF3	Oilseed rape	Plant Genetic Systems	Herbicide tolerance		26.04.2000	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
14	1445	Cotton	Monsanto	Herbicide tolerance	Cottonseed oil. Products made with cottonseed oil may include fried foods, baked foods and snack foods.	19.12.2002	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
15	531	Cotton	Monsanto	Insect protection		19.12.2002	Reg. (EC) 258/97 Art. 5
16	pRF69/pRF93	Bacillus subtilis	F. Hoffmann - La Roche	Riboflavin	Vitamin B2	23.03.2000	Reg. (EC) 258/97 - Art. 5
17	Bt11	Maize	Syngenta	Insect resistance	Bt11 Sweet maize	19.05.2004	Reg. (EC) No. 258/97 Art. 7
18	NK603	Maize	Monsanto	Herbicide tolerance	Food and food ingredients derived from NK603 maize	26.10.2004	Reg. (EC) No. 258/97 Art. 7

Costrutto utilizzato nella soia Roundup Ready

Costrutto PV-GMGT04

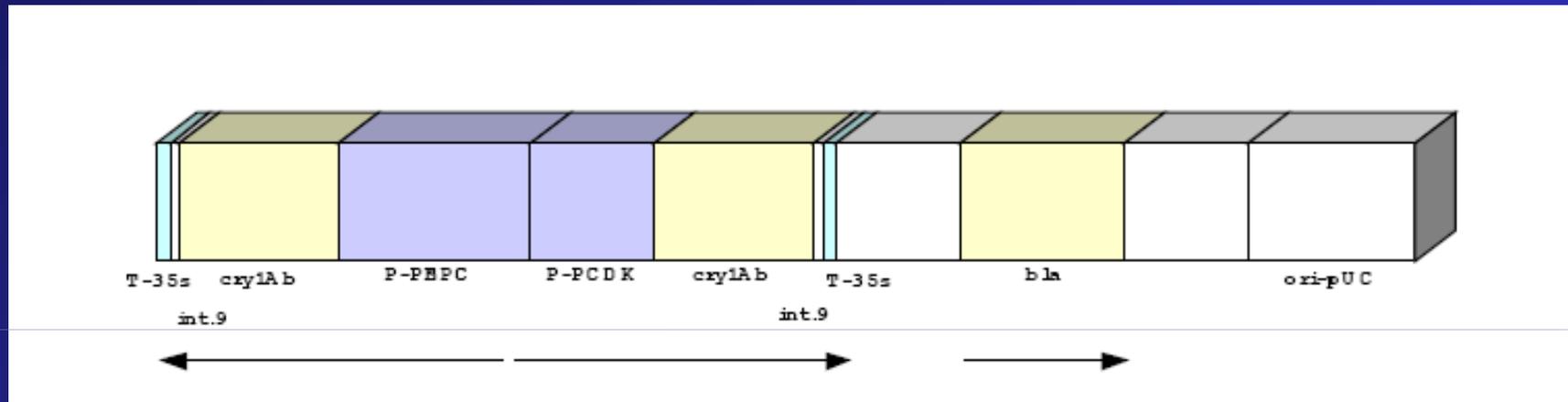


Soia Roundup Ready

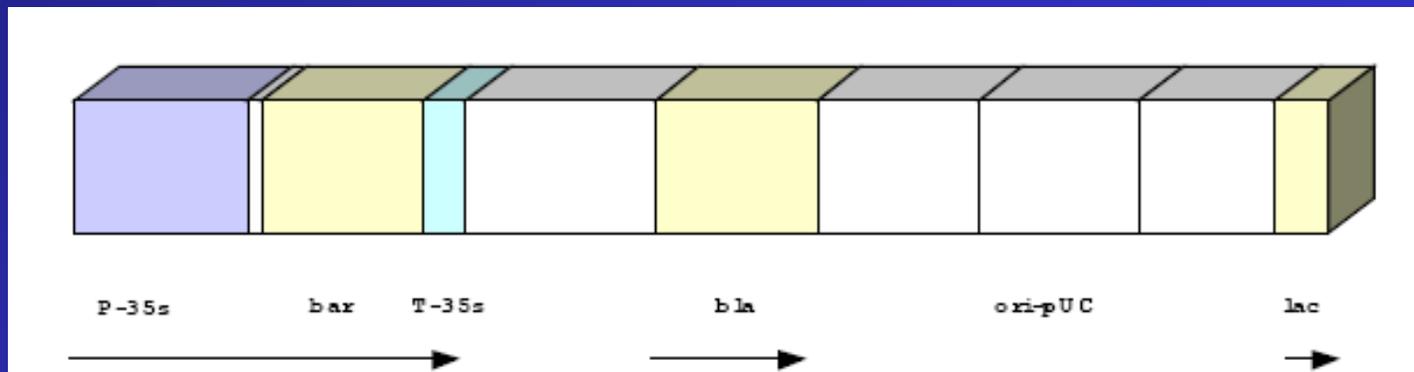
- Nel genoma della pianta risultano inserite almeno 2 copie del gene CP4EPSPS (tolleranza al glifosato)

Costrutti utilizzati nel mais Bt176

Costrutto pCIB4431 (derivato di pUC)



Costrutto pCIB3064 (derivato di pUC)

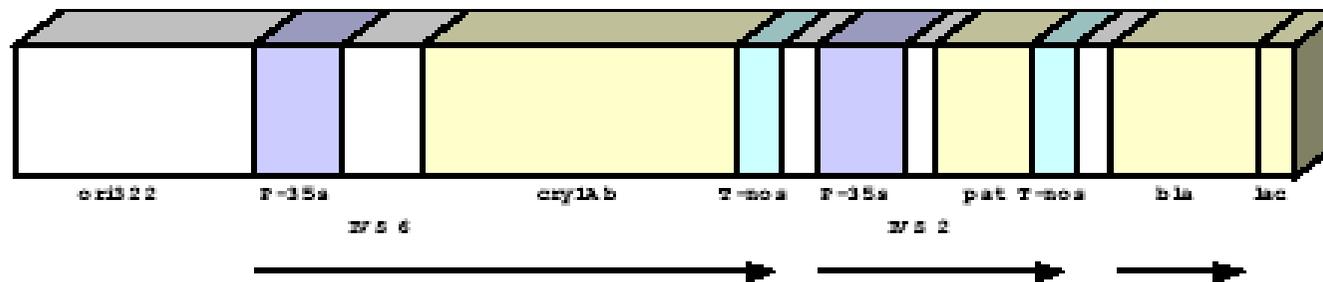


Mais Bt176 geneticamente modificato

- La pianta produce la proteina tossica per la piralide
- Nel genoma della pianta sono state inserite 6 copie del gene *CryIAb* e del gene *bla* (resistenza alle penicilline) ed almeno due copie del gene *bar* (tolleranza al glufosinato)

Costrutto utilizzato nei mais Bt11 e Bt10

Costrutto pZO1502 (derivato di pUC)

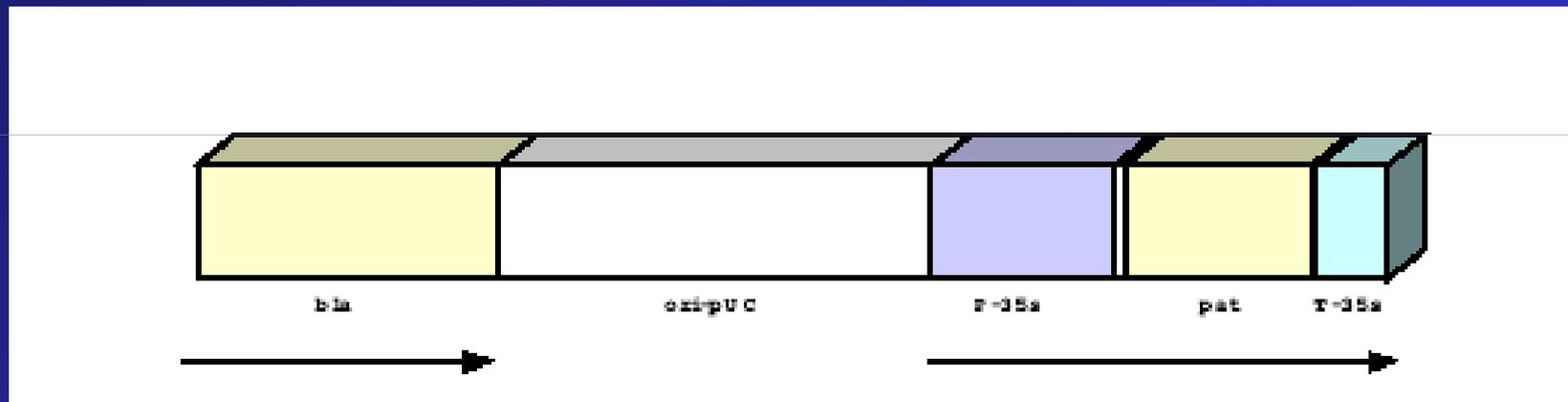


Mais Bt11 geneticamente modificato

- La pianta produce la proteina tossica per la piralide
- Nel genoma della pianta sono state inserite 1 copia del gene *CryIAb* e del gene *pat* (tolleranza al glufosinato)
- Non risulta integrato il gene *bla* (resistenza alle penicilline), presente invece in Bt10

Costrutto utilizzato nel mais T25

Costrutto p35S/Ac (derivato di pUC)

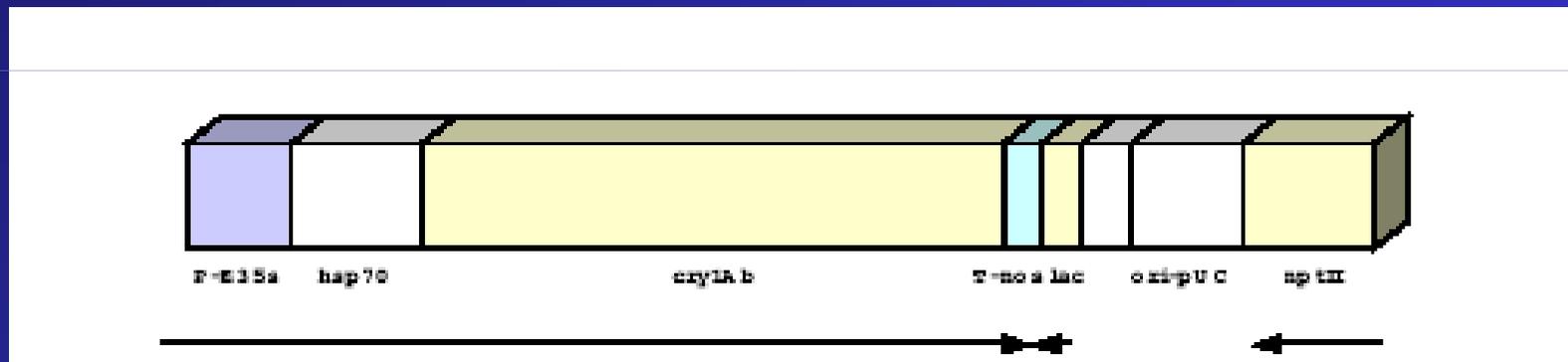


Mais T25 geneticamente modificato

- Nel genoma della pianta risulta inserita 1 copia intera del gene *pat* (tolleranza al glufosinato) ed 1 copia parziale del gene *bla* (resistenza alle penicilline)

Costrutto utilizzato nel mais MON810

Costrutto PV-ZMBK07 (derivato di pUC)

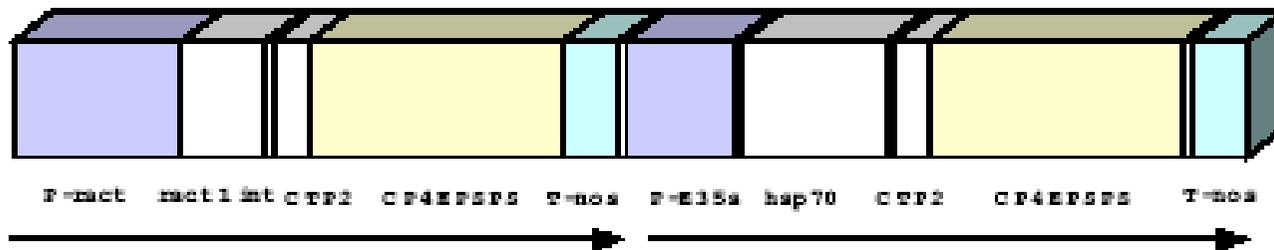


Mais MON810 geneticamente modificato

- La pianta produce la proteina tossica per la piralide
- Nel genoma della pianta è stata inserita 1 copia del gene CryIAb
- Non risulta integrato il t-NOS presente nel costrutto

Costrutto utilizzato nel mais NK 603

Costrutto PV-ZMGT32L



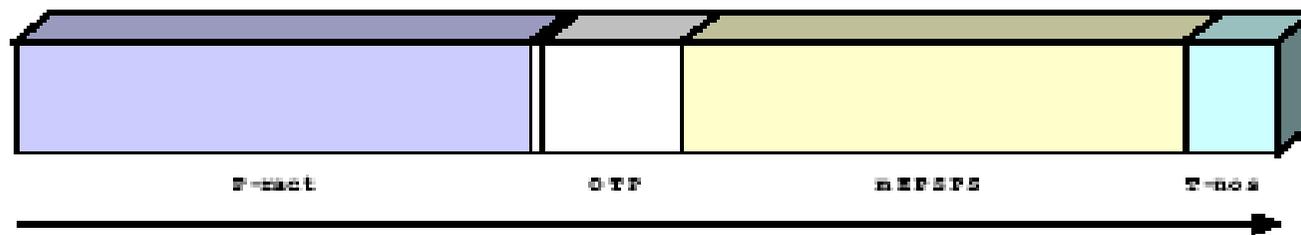
Mais NK603 geneticamente modificato

- Nel genoma della pianta risultano inserite 2 copie del gene CP4EPSPS (tolleranza al glifosato)

Costrutto utilizzato nel mais GA21

NON AUTORIZZATO (parere favorevole EFSA)

Frammento del costrutto pDPG434



Mais GA21 geneticamente modificato

- Nel genoma della pianta risultano inserite 4 copie del gene mEPSPS (tolleranza al glifosato)

Metodi analitici per la ricerca di OGM

- Analisi delle proteine modificate mediante tecniche Elisa
- Analisi del DNA modificato mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) per il rilevamento qualitativo e quantitativo



Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

Analisi delle proteine

- tipo ELISA
- facile esecuzione
- rapidi
- poco costosi
- quantitativi
- sensibilità non elevata
- raramente applicabili su prodotti finiti

Analisi del DNA

- PCR
- elevate sensibilità e specificità
- applicabili ad alimenti finiti
- quantitativi
- costosi
- richiedono strutture di laboratorio adeguate

Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti (2)

Fasi di una metodica PCR:

- estrazione del DNA
 - massa del campione da omogeneizzare ($\approx 30 \text{ g} - 30 \text{ kg}$)
 - massa del campione da analizzare ($\approx 100 \text{ mg} - 10 \text{ g}$)
 - selezione del metodo di estrazione in funzione dell'alimento:
 - buona resa
 - elevata purezza
 - ridotta degradazione
- verifica della qualità e della quantità del DNA estratto:
 - determinazione spettrofotometrica
 - Elettroforesi
 - PCR real time

Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti (3)

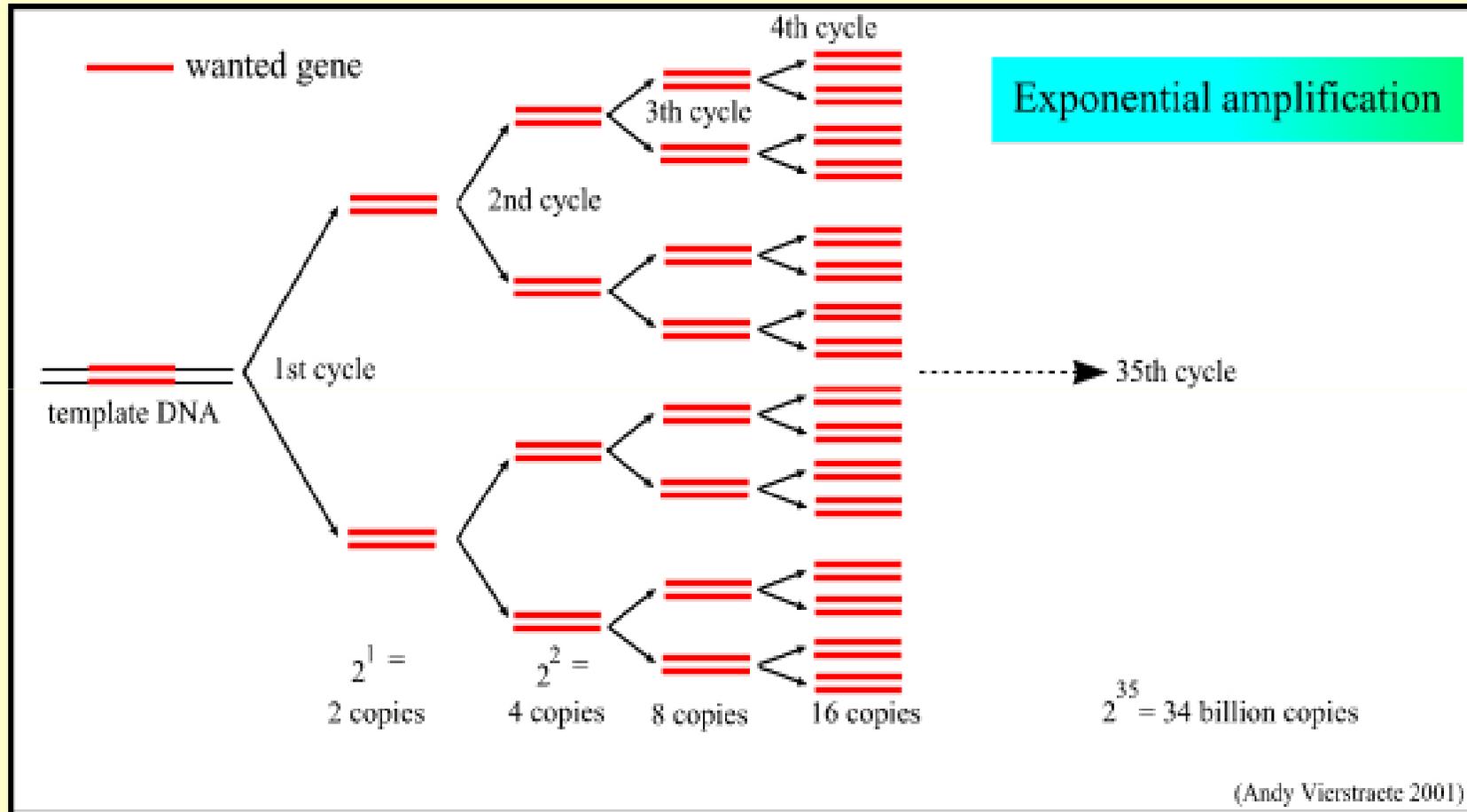
- **amplificazione del DNA bersaglio**
 - PCR controllo efficienza estrazione DNA vegetale:
 - bersaglio: sequenze specifiche della specie oggetto di analisi
 - PCR screening (es. PCR p35S e terminatore NOS)
 - PCR specifica
 - PCR quantitativa

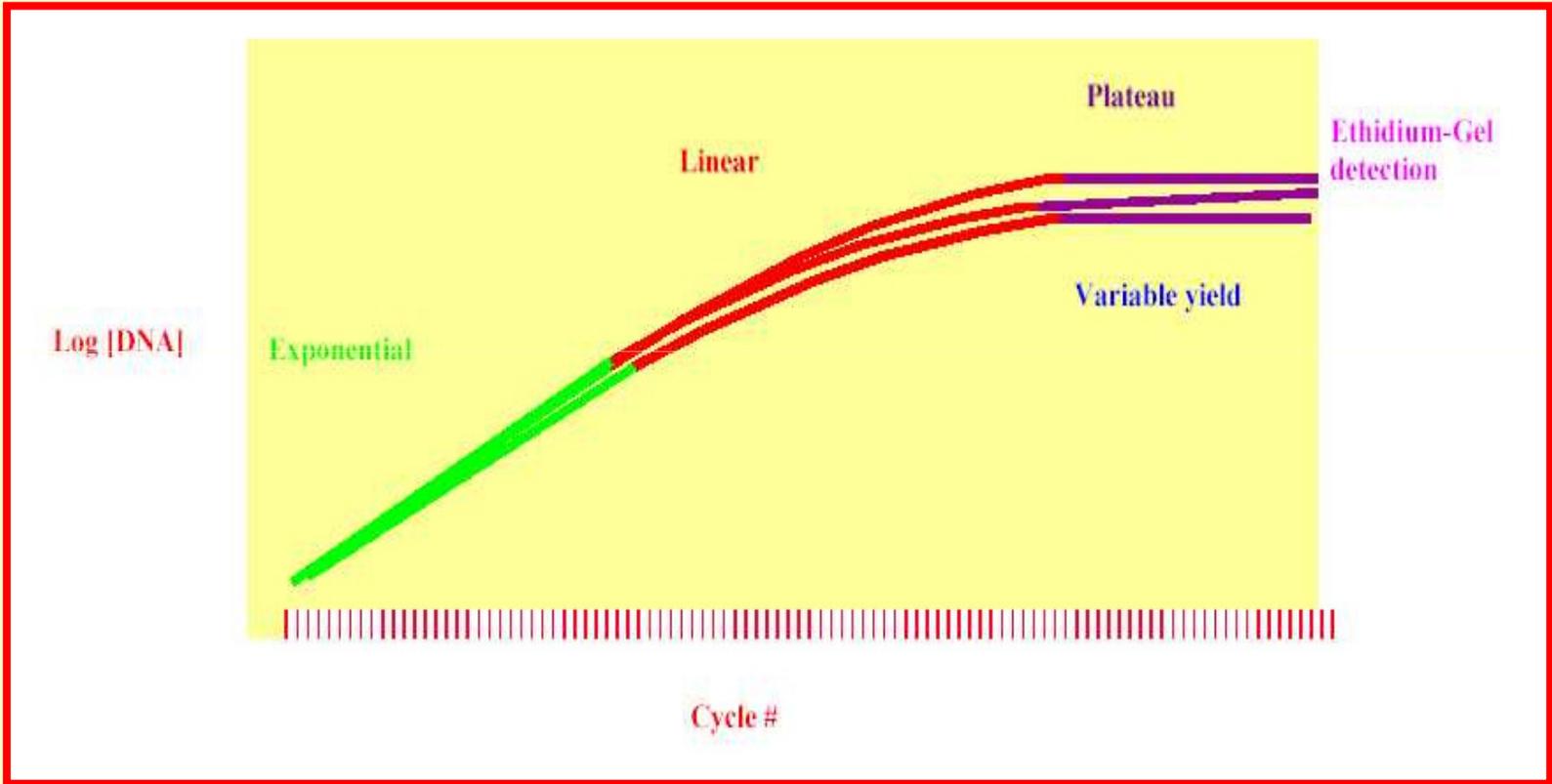
Polymerase Chain Reaction (PCR))

[Animazione PCR](#)



Polymerase Chain Reaction (PCR)

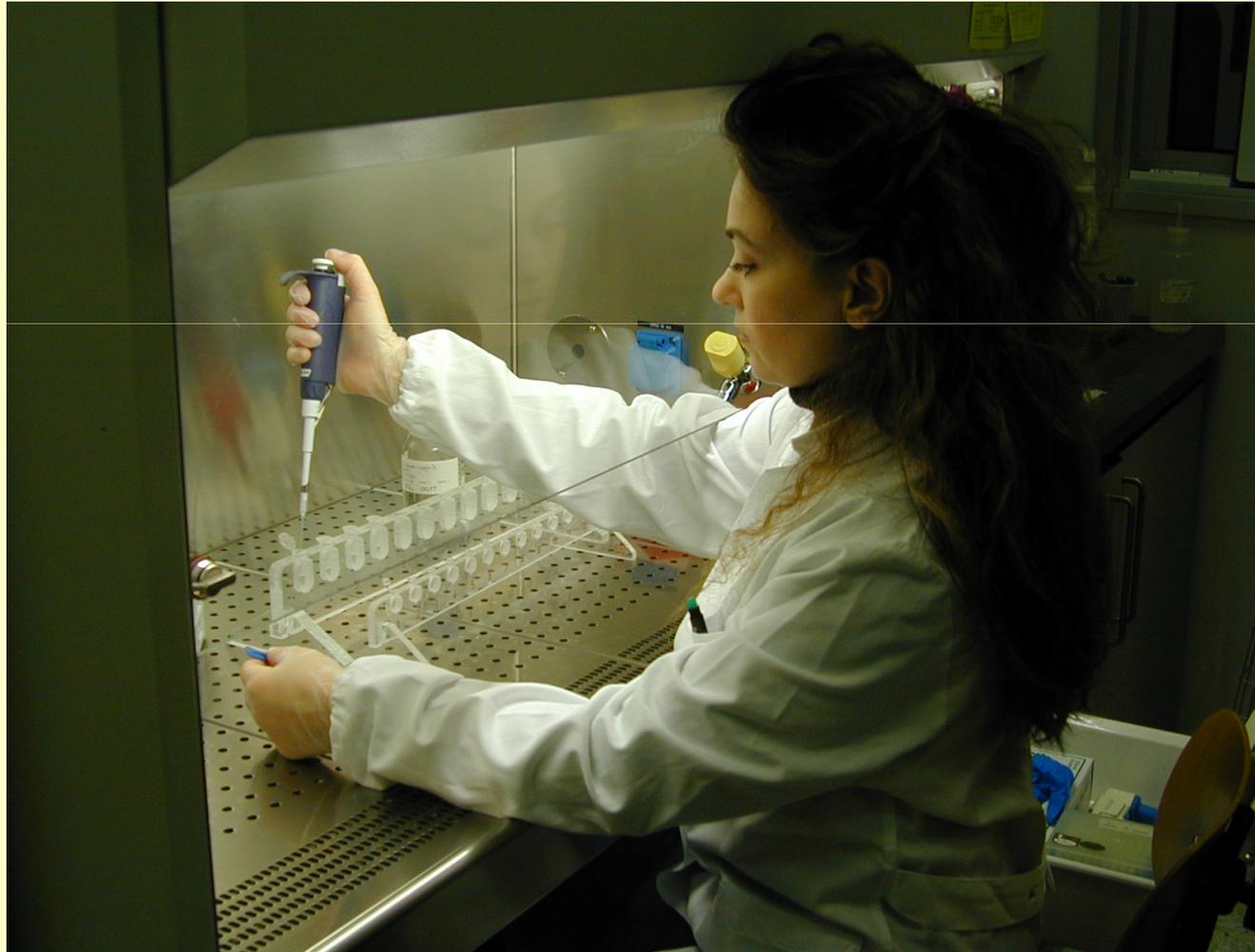




Tipologie di PCR

- PCR "end point"
- PCR real-time

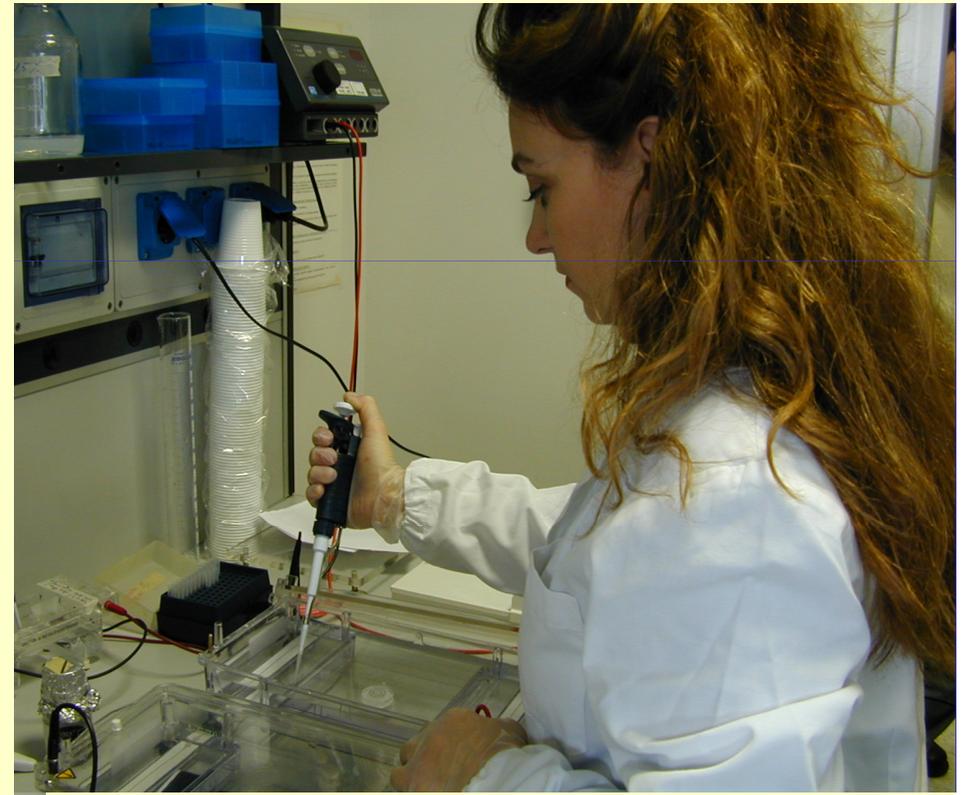
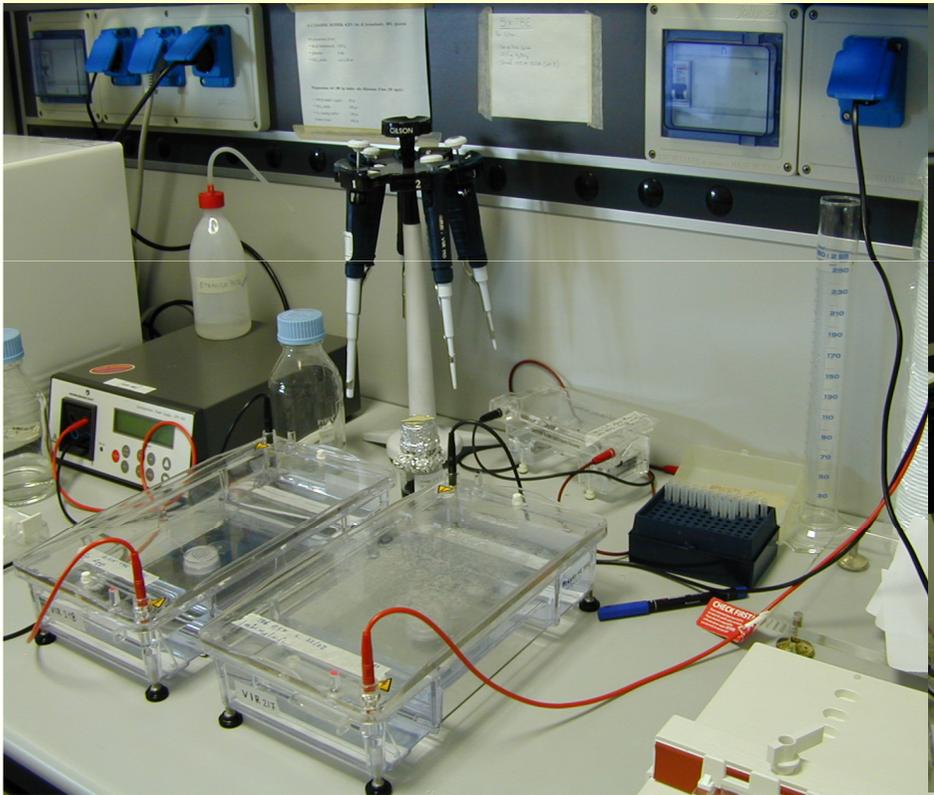
Allestimento PCR



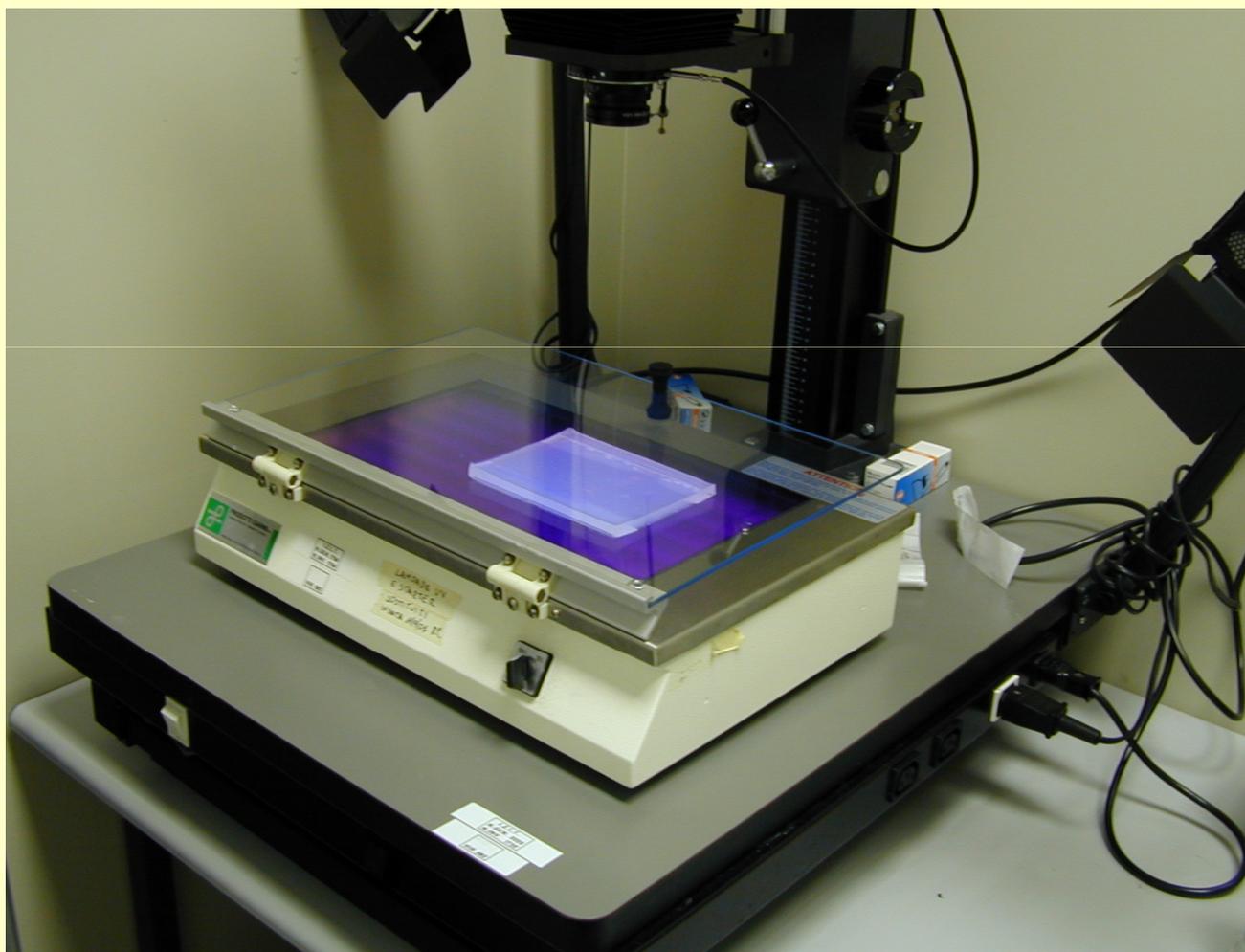
Amplificazione DNA



Elettroforesi dell'amplificato

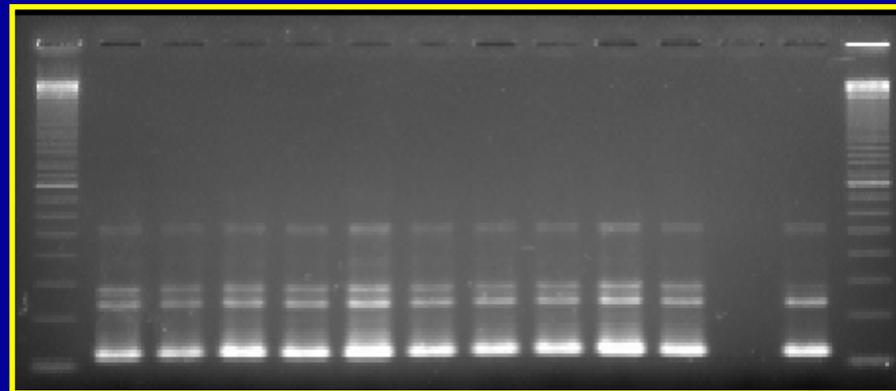
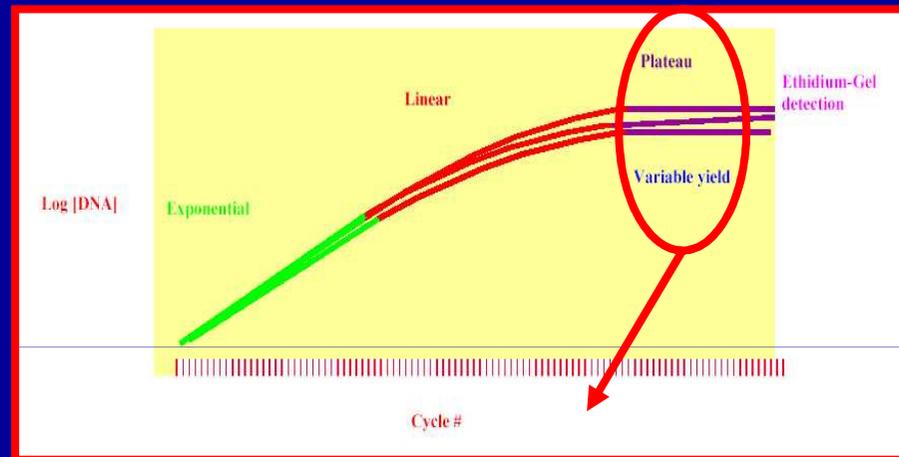


Rivelazione dell'amplificato

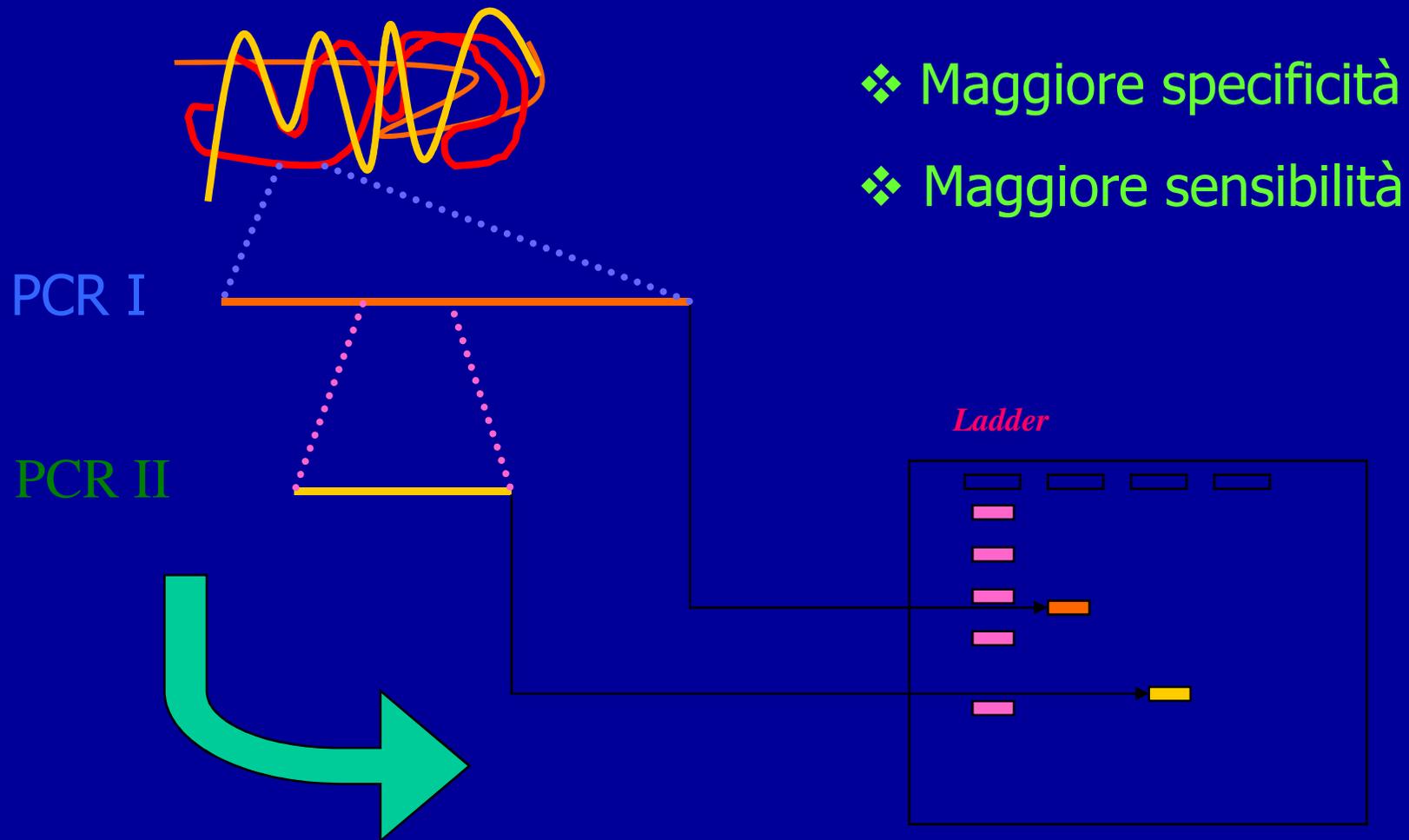


PCR : l'analisi dei risultati

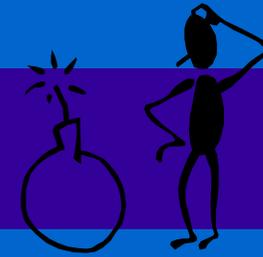
- PCR \Rightarrow "end point": analizza gli amplificati nella fase di plateau:
- Fornisce poche informazioni su quantità e qualità del DNA



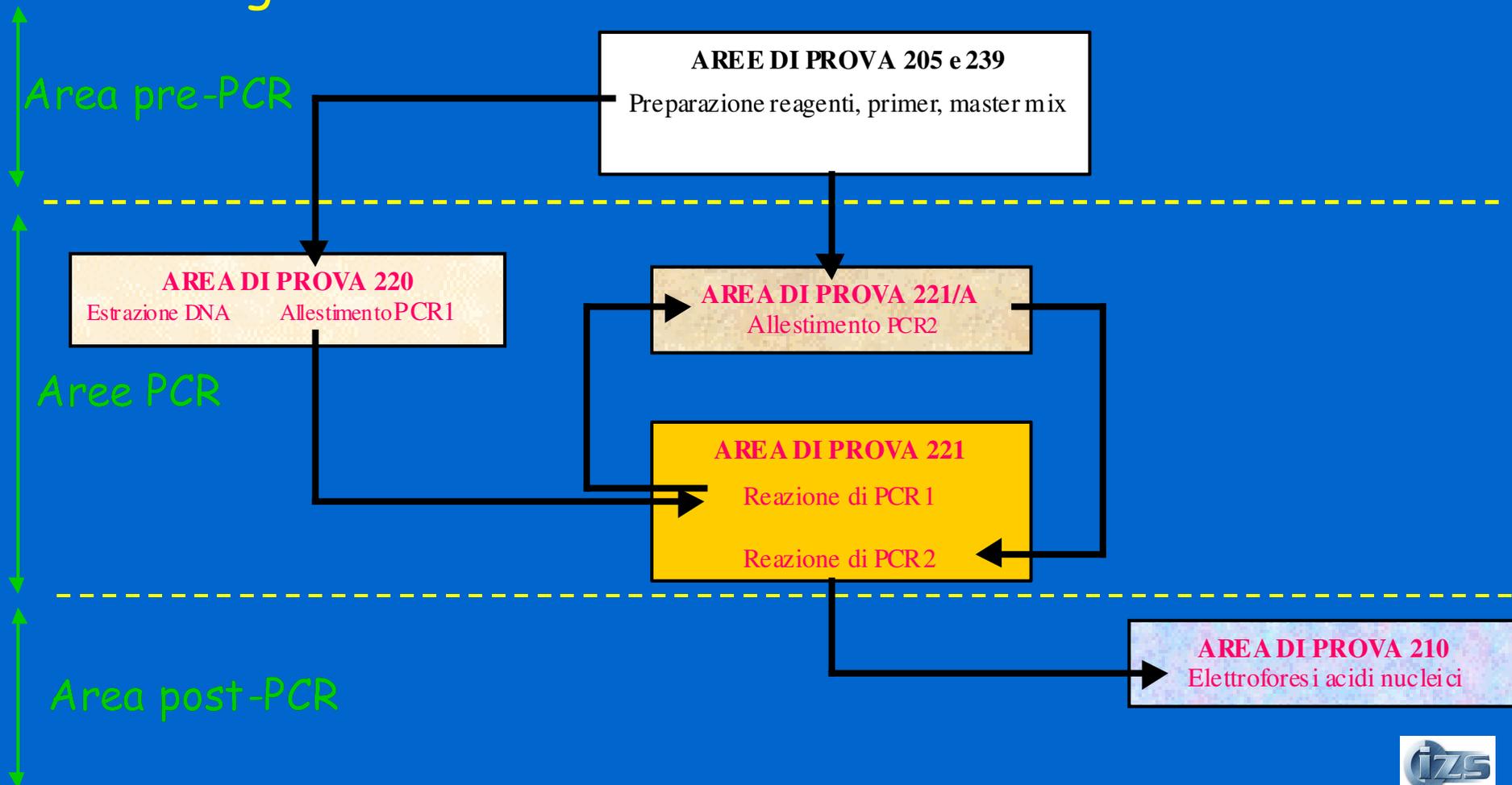
Nested PCR



I punti critici



- Organizzazione dei laboratori



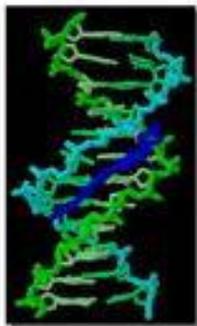
Tipologie di PCR

- PCR "end point"

- PCR real-time

Rivelazione aspecifica

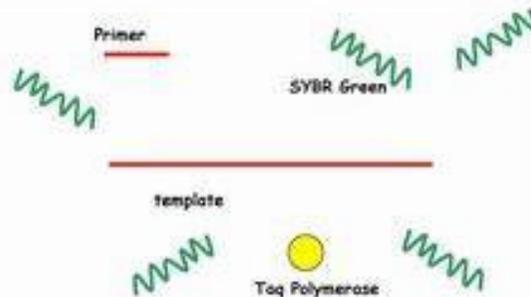
SYBR® green Dye



Double stranded DNA
Binding Dye

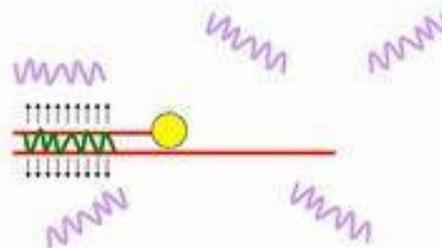
SYBR Green detection 1

Denaturation. When the DNA is denatured, the SYBR Green 1 dye is released and fluorescence is drastically reduced.



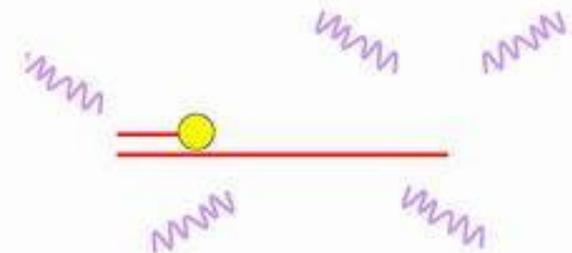
SYBR Green detection 3

Polymerization. During extension, primers anneal and PCR product is generated.



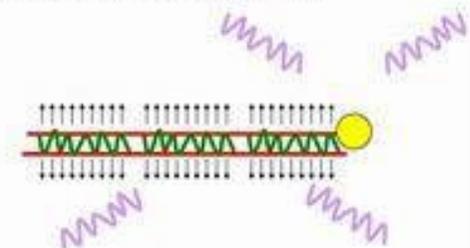
SYBR Green detection 2

Polymerization. During extension, primers anneal and PCR product is generated.



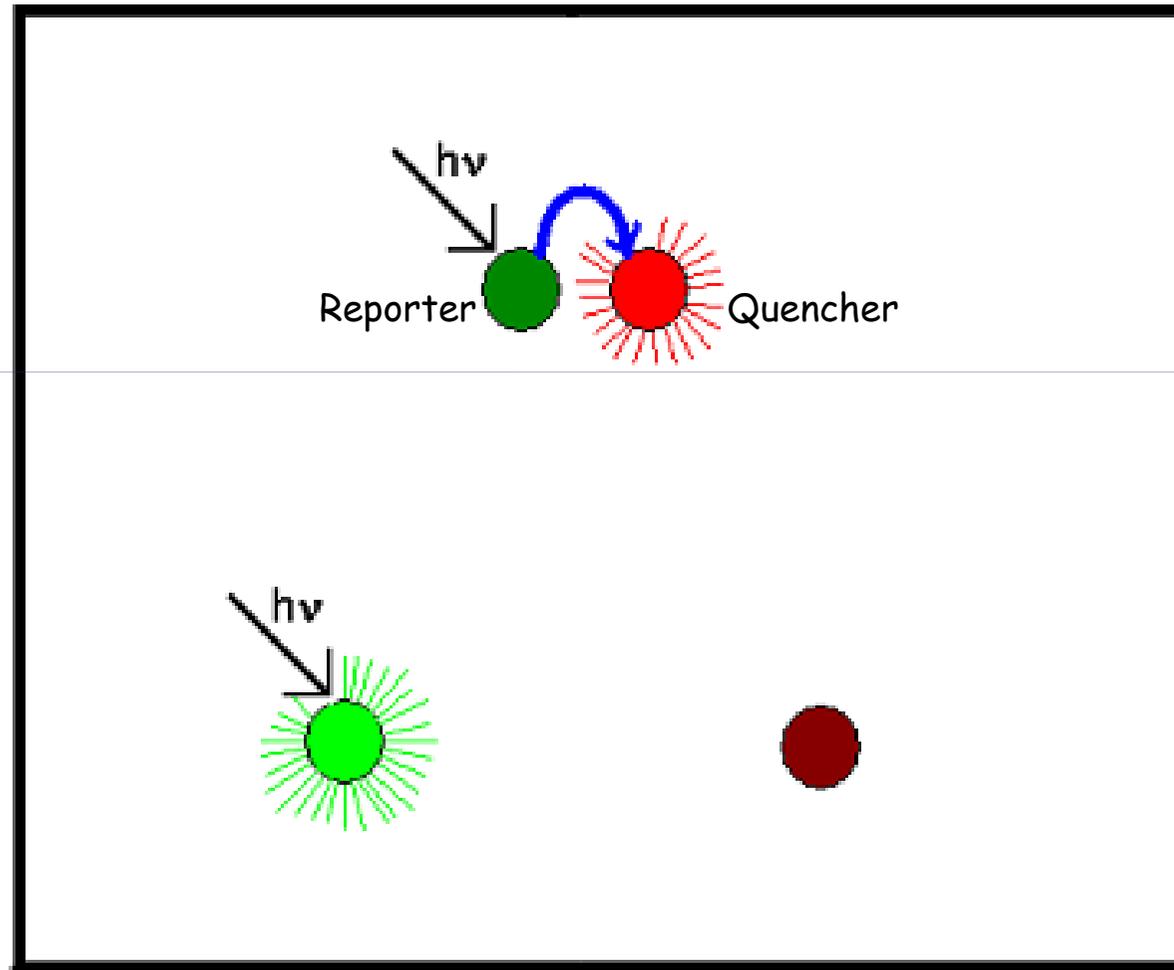
SYBR Green detection 4

Polymerization completed. When polymerization is complete SYBR Green 1 dye binds to the double stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected.

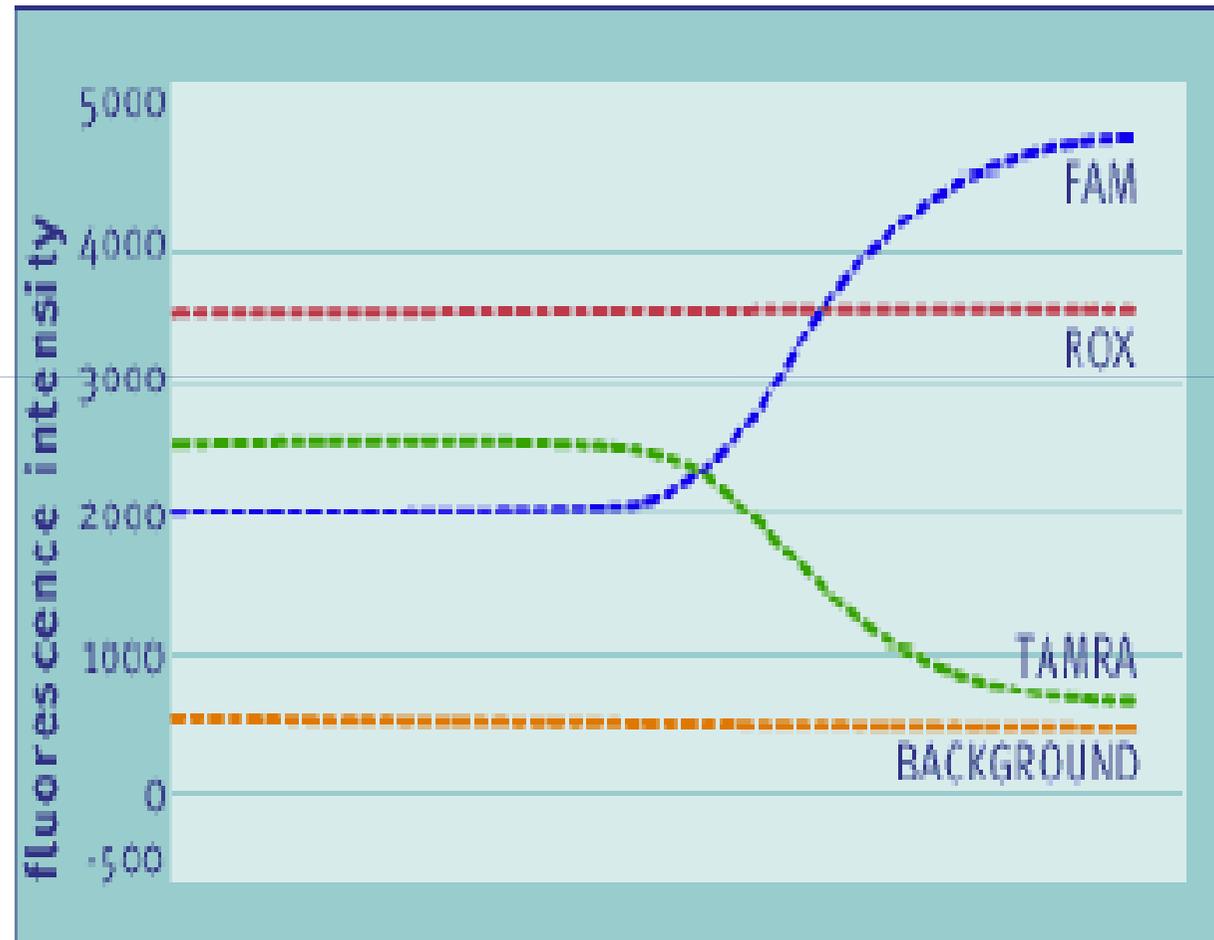


Rivelazione specifica in fluorescenza

FRET - Frequency Transfer



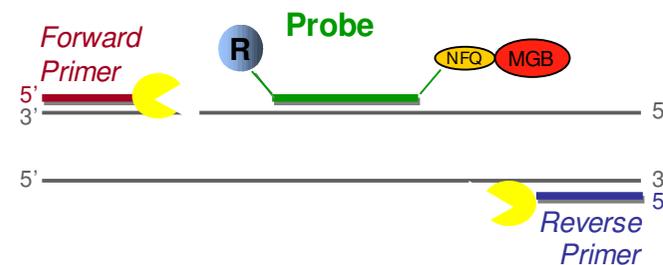
Analisi multicomponente



Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

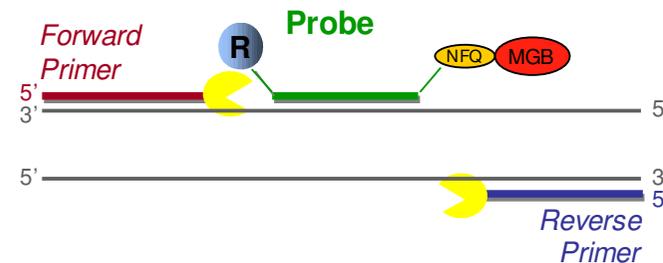
Saggio 5'-3' esonucleasico



Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

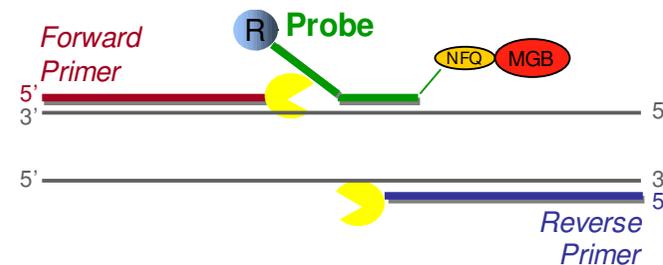
Saggio 5'-3' esonucleasico



Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

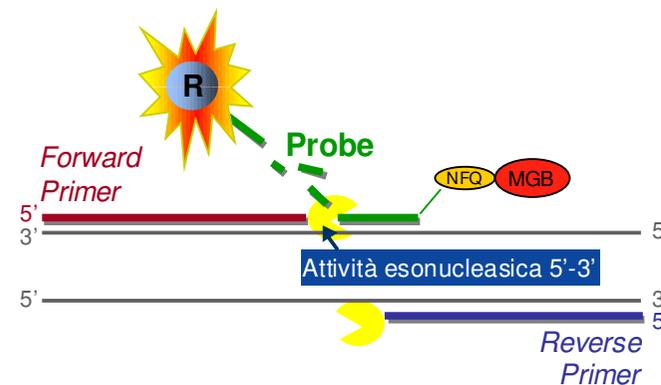
Saggio 5'-3' esonucleasico



Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

Saggio 5'-3' esonucleasico

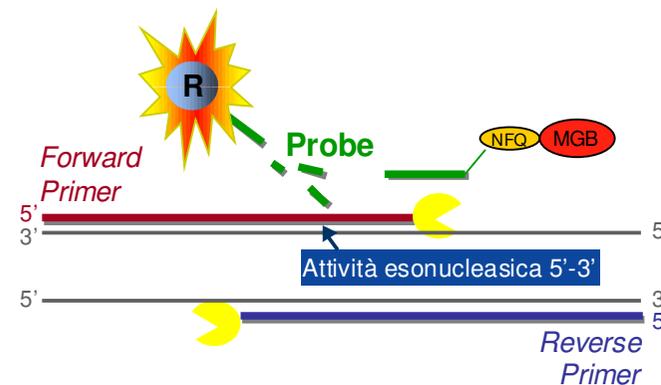


Spostamento e Taglio

Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

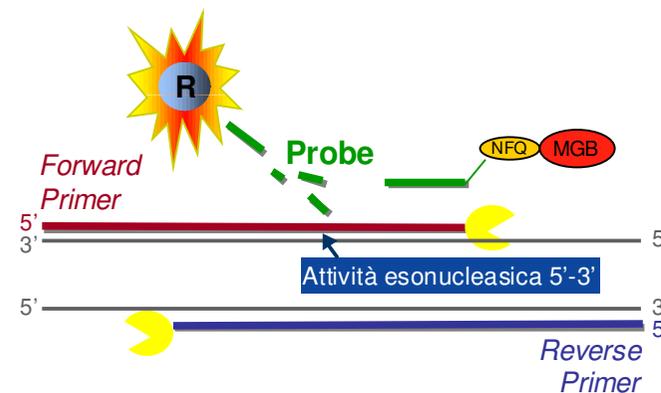
Saggio 5'-3' esonucleasico



Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

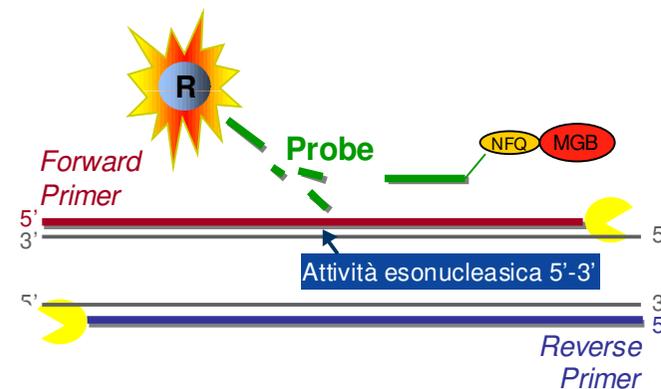
Saggio 5'-3' esonucleasico



Real Time: TaqMan

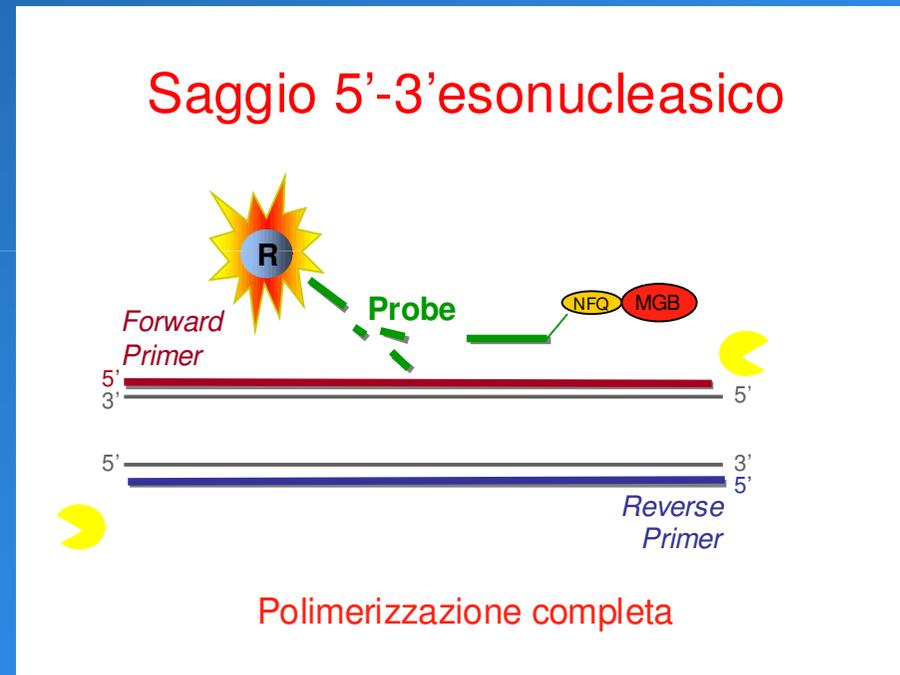
- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.

Saggio 5'-3' esonucleasico



Real Time: TaqMan

- Sviluppato dalla Applied Biosystems - principio della 5' esonucleasi.
- Prevede un probe che ha due fluorocromi: un reporter ed un quencher.
- Sfrutta la capacità esonucleasica in posizione 5' della polimerasi per liberare il fluorocromo reporter.
- Il fluorocromo reporter liberato emette fluorescenza.



PCR Real Time



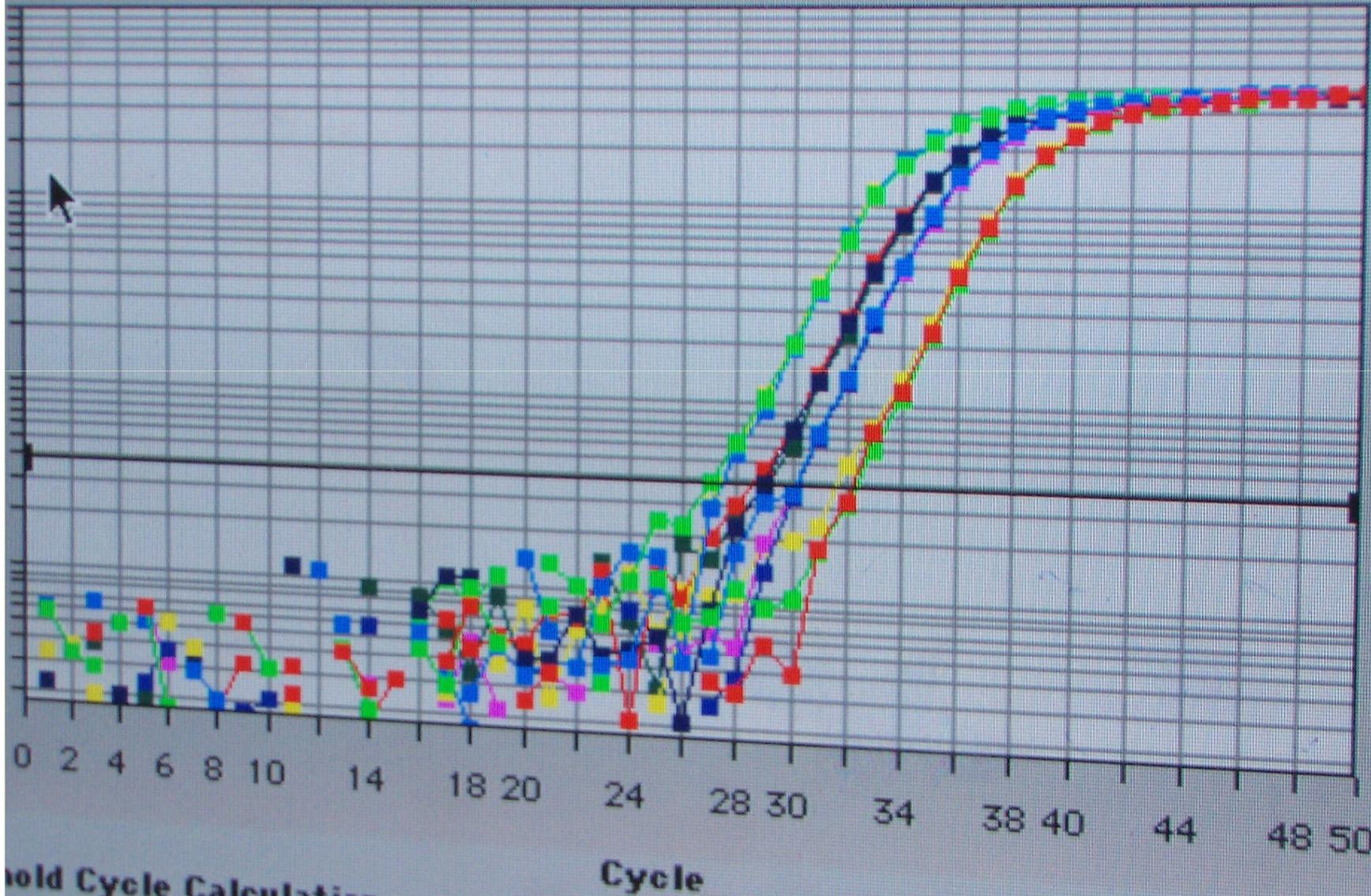
DIN

Status: Idle

7700 Single Run

Amplification Plot

Amplification - 14/11/03

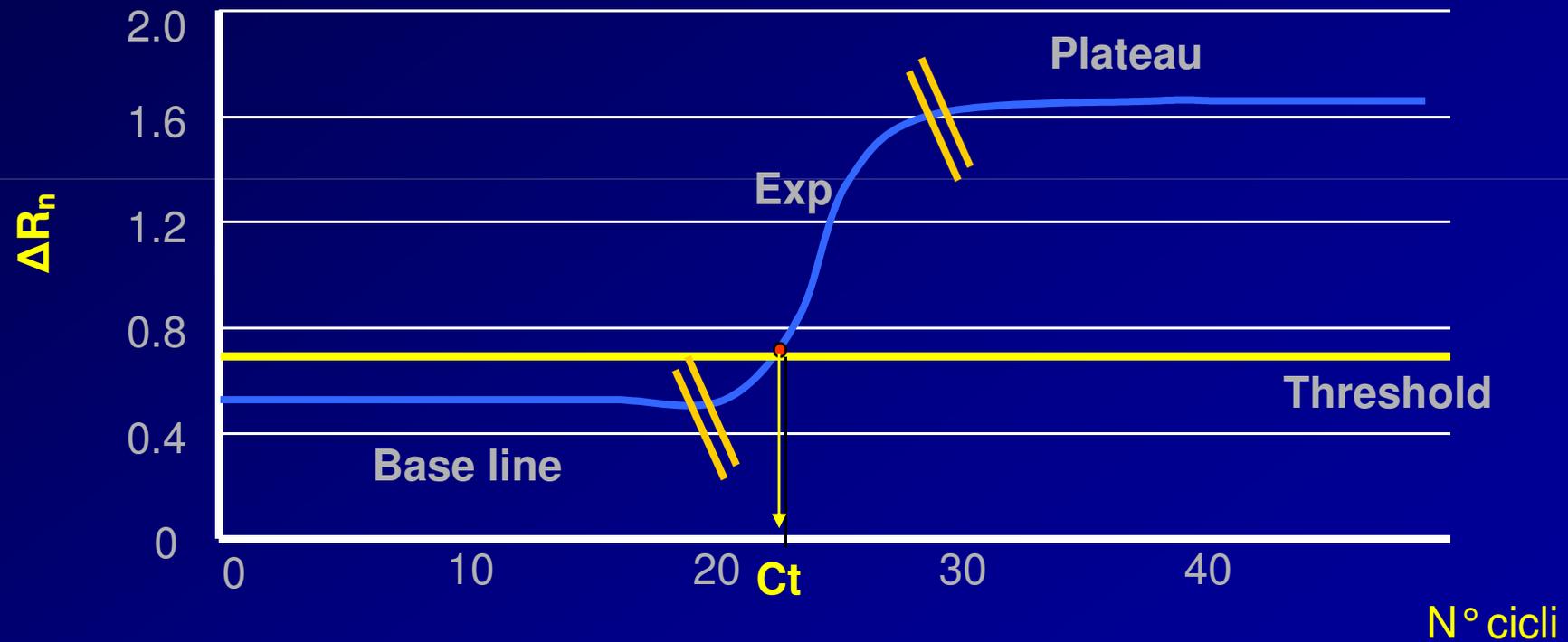


Legend panel with 10 checkboxes, all of which are checked. The labels for these checkboxes are partially visible on the right edge of the plot area.

Threshold Cycle Calculation
Threshold

Rep

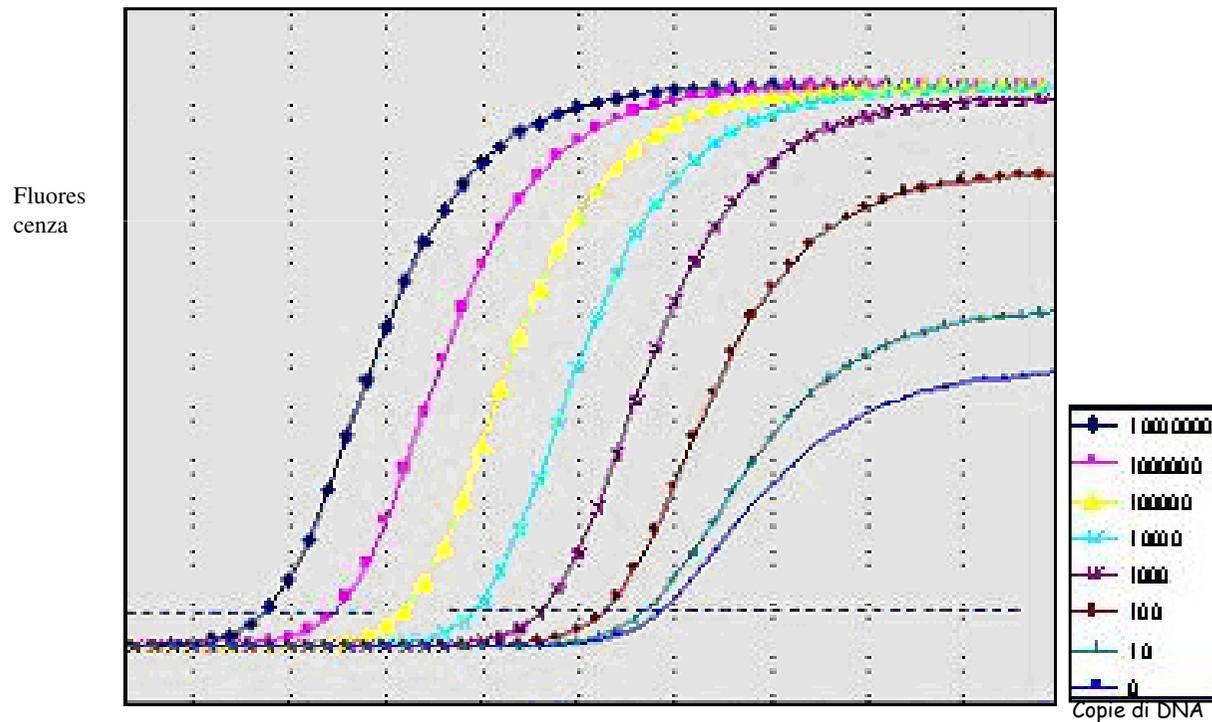
Curva di amplificazione



PCR real time: analisi quantitativa

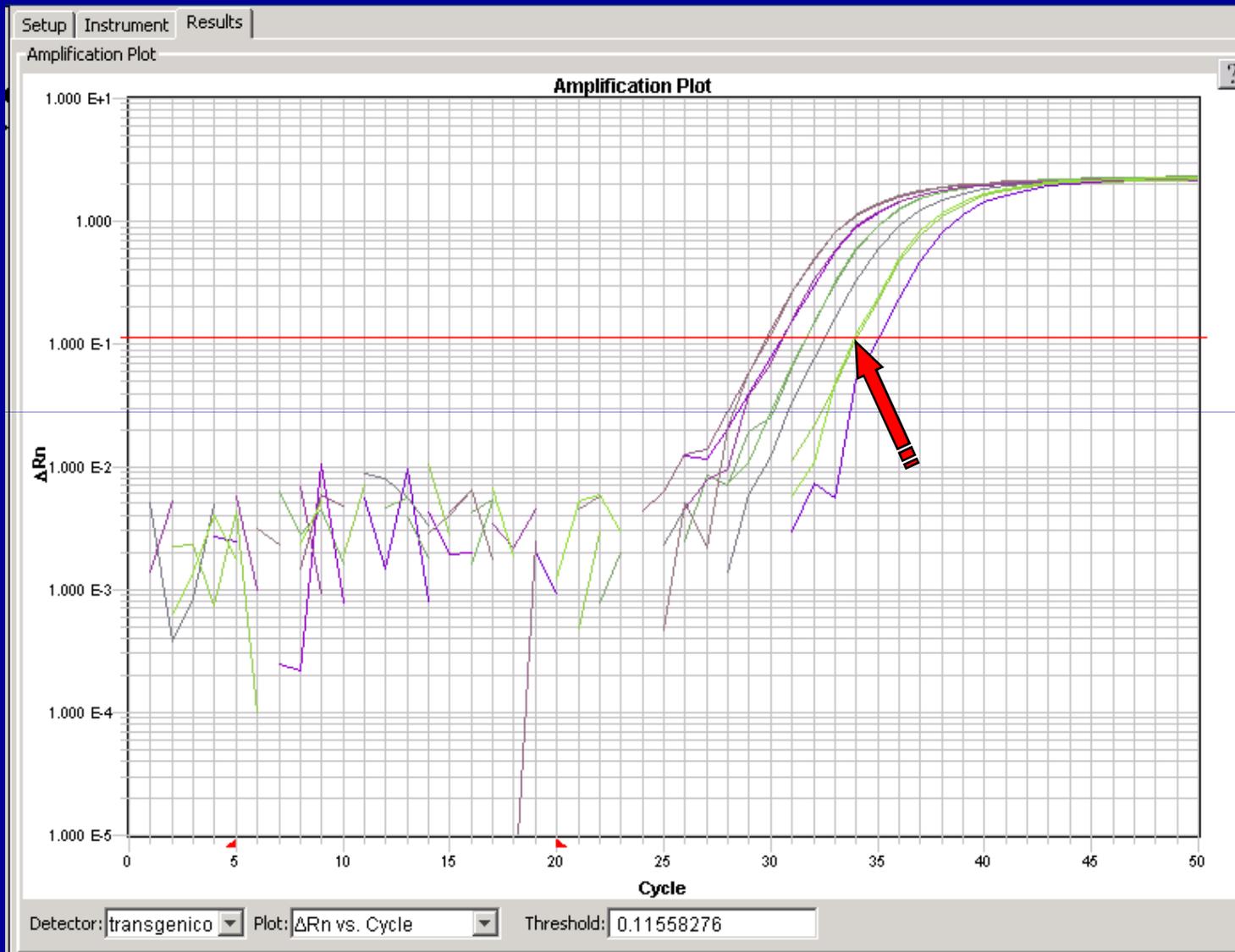
Relazione tra ciclo soglia e quantità di DNA bersaglio

$$Ct = a \log (\text{n}^\circ \text{ copie DNA bersaglio}) + b \quad \text{con } a < 0$$

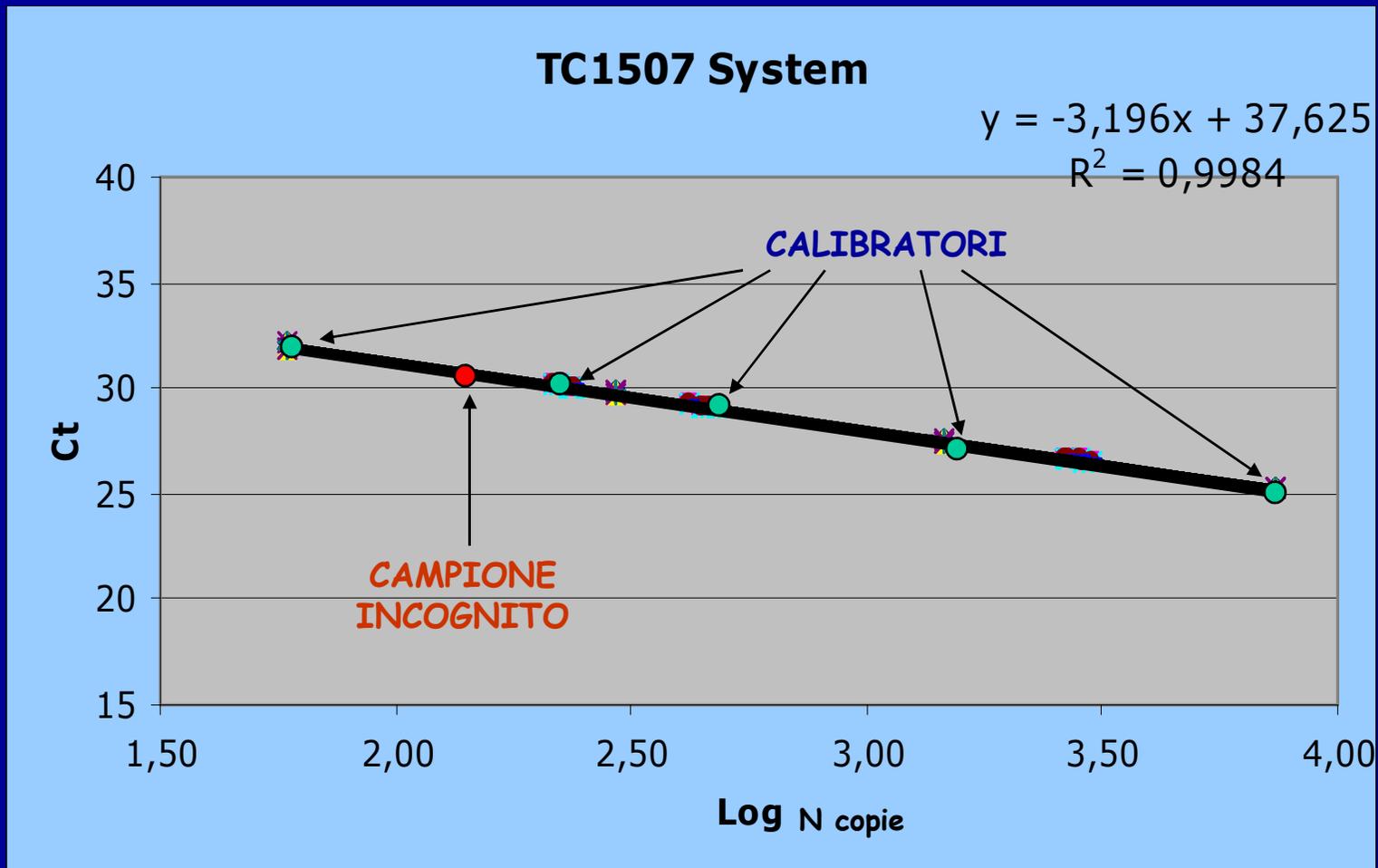


Cicli di amplificazione

PCR Real Time



PCR Real Time



Fasi della ricerca di OGM

1. Ricerca ingrediente (specie vegetale)
2. Screening GM
3. Identificazione OGM
4. Quantificazione OGM



1) Ricerca ingrediente (specie vegetale)

Mais



- Nested PCR Zeina
- PCR adh, hmg, ssIIb, invertasi

Soia

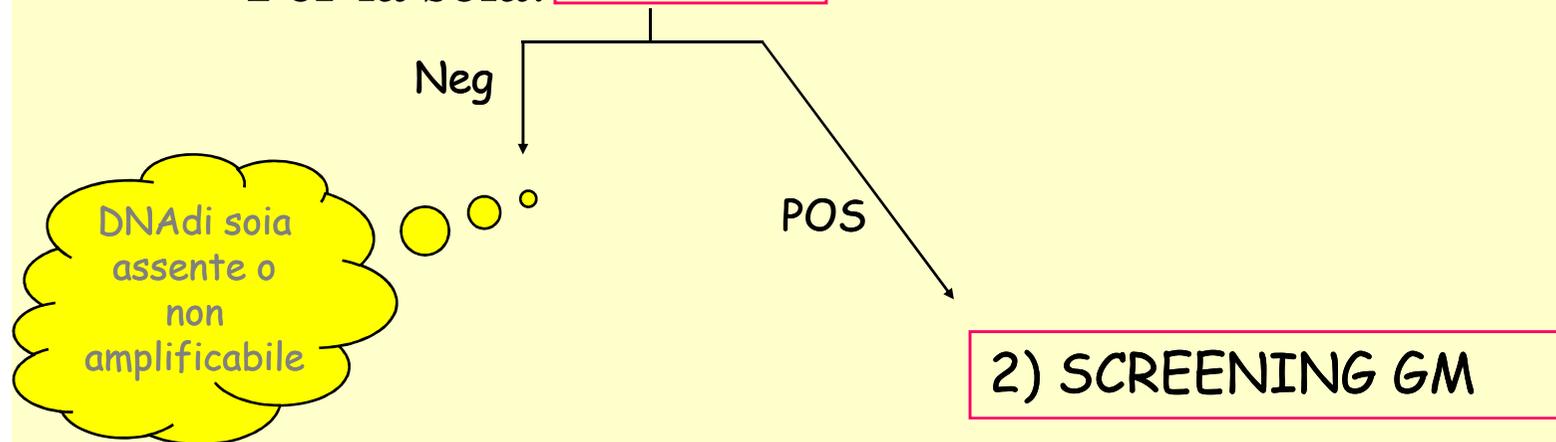


Nested PCR Lectina

Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

1) Ricerca ingrediente (specie vegetale)

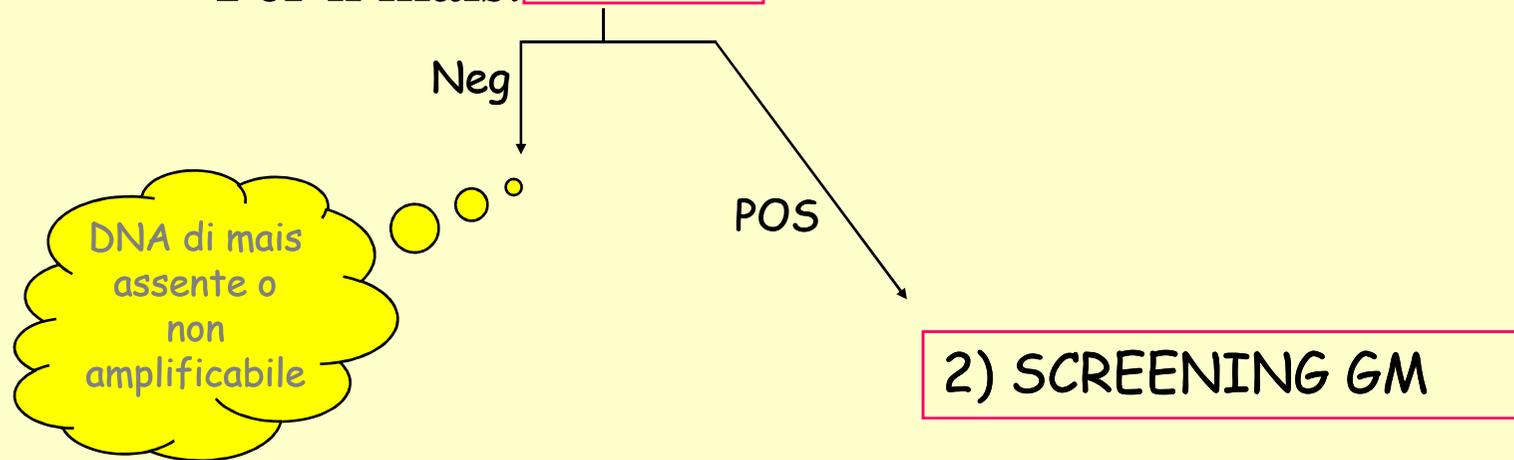
- Per la soia: PCR lectina



Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

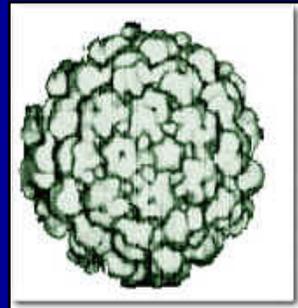
1) Ricerca ingrediente (specie vegetale)

- Per il mais: PCR zeina

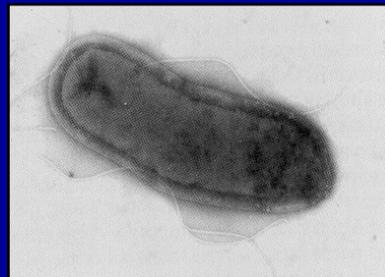


2) Screening GM

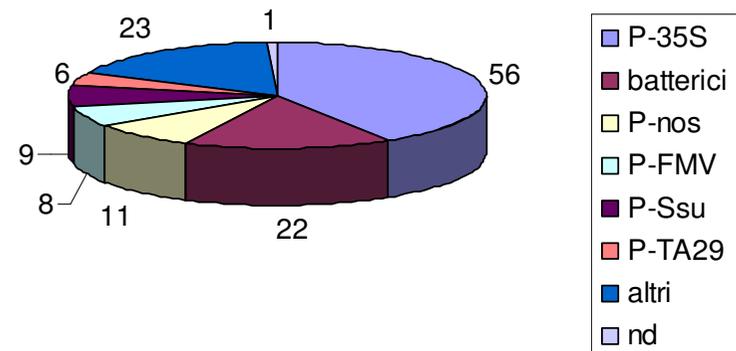
Promotore 35S



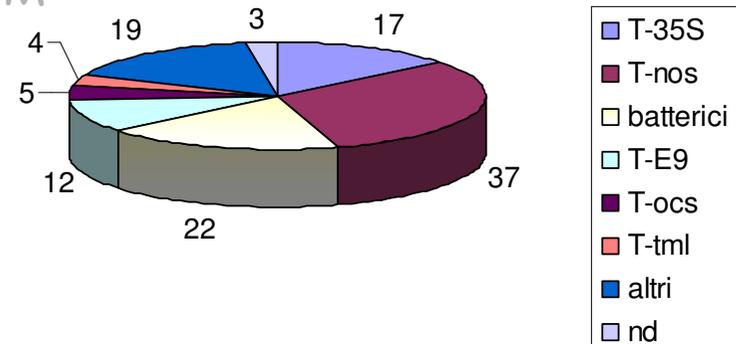
Terminatore NOS



Promotori presenti nelle piante GM



Terminatori presenti nelle piante GM



Costrutti genici di alcuni eventi di trasformazione

RoundupReady (different CTP in different GMO)



Bt11 maize geneconstrukt 1



Bt11 maize geneconstrukt 2



T25 Liberty link maize



Bt176 maize geneconstrukt 1



Bt176 maize geneconstrukt 2



Bt176 maize geneconstrukt 3



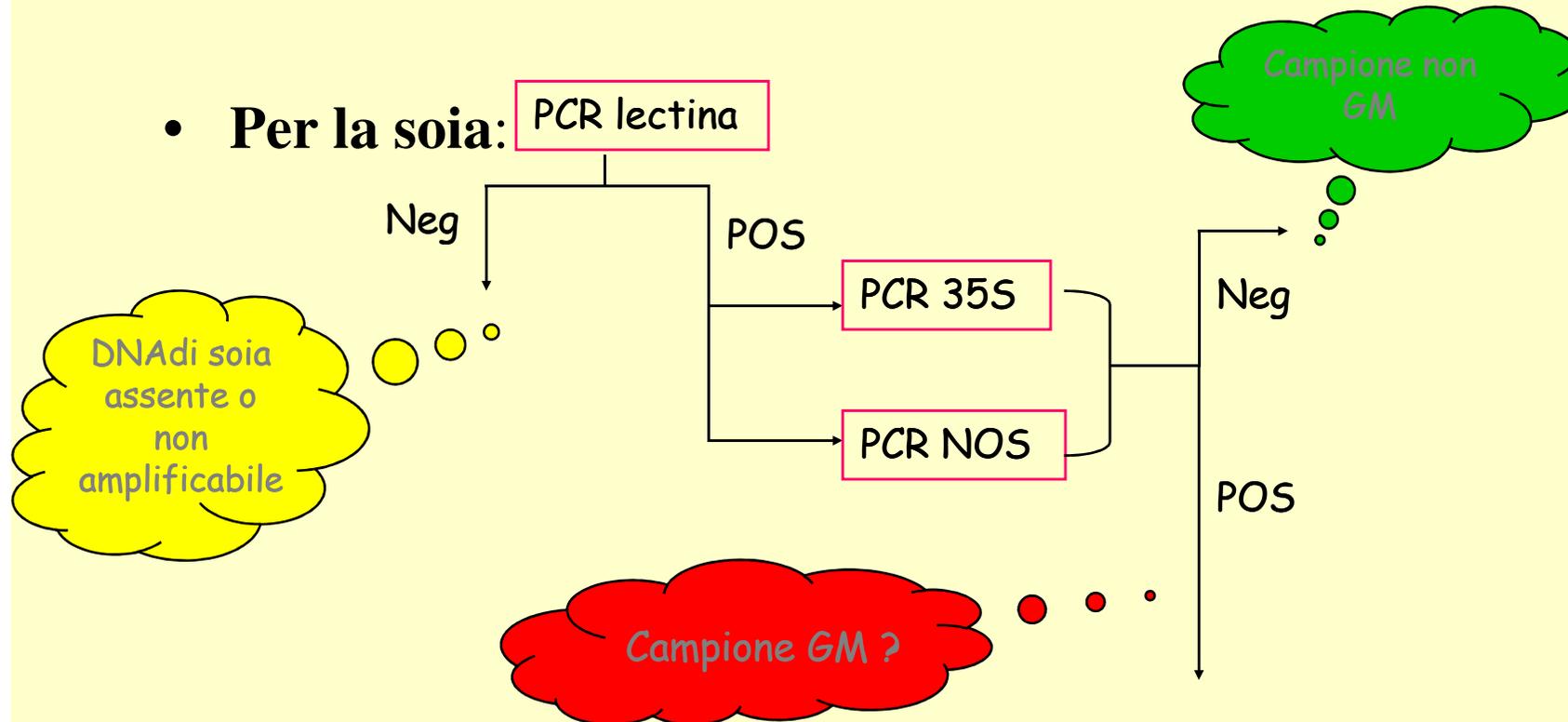
Mon810 MaisGard



Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

2) Screening GM

- Per la soia: PCR lectina

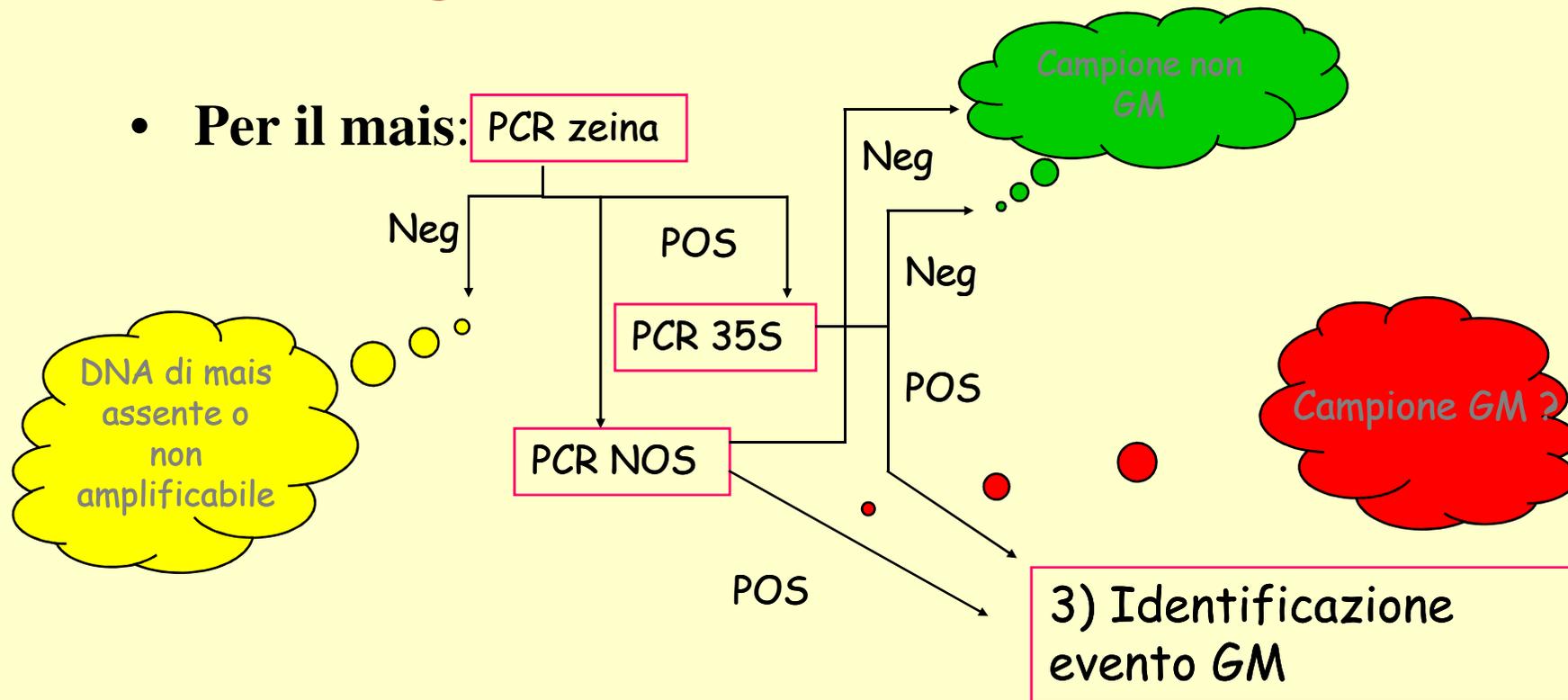


3) Identificazione evento GM

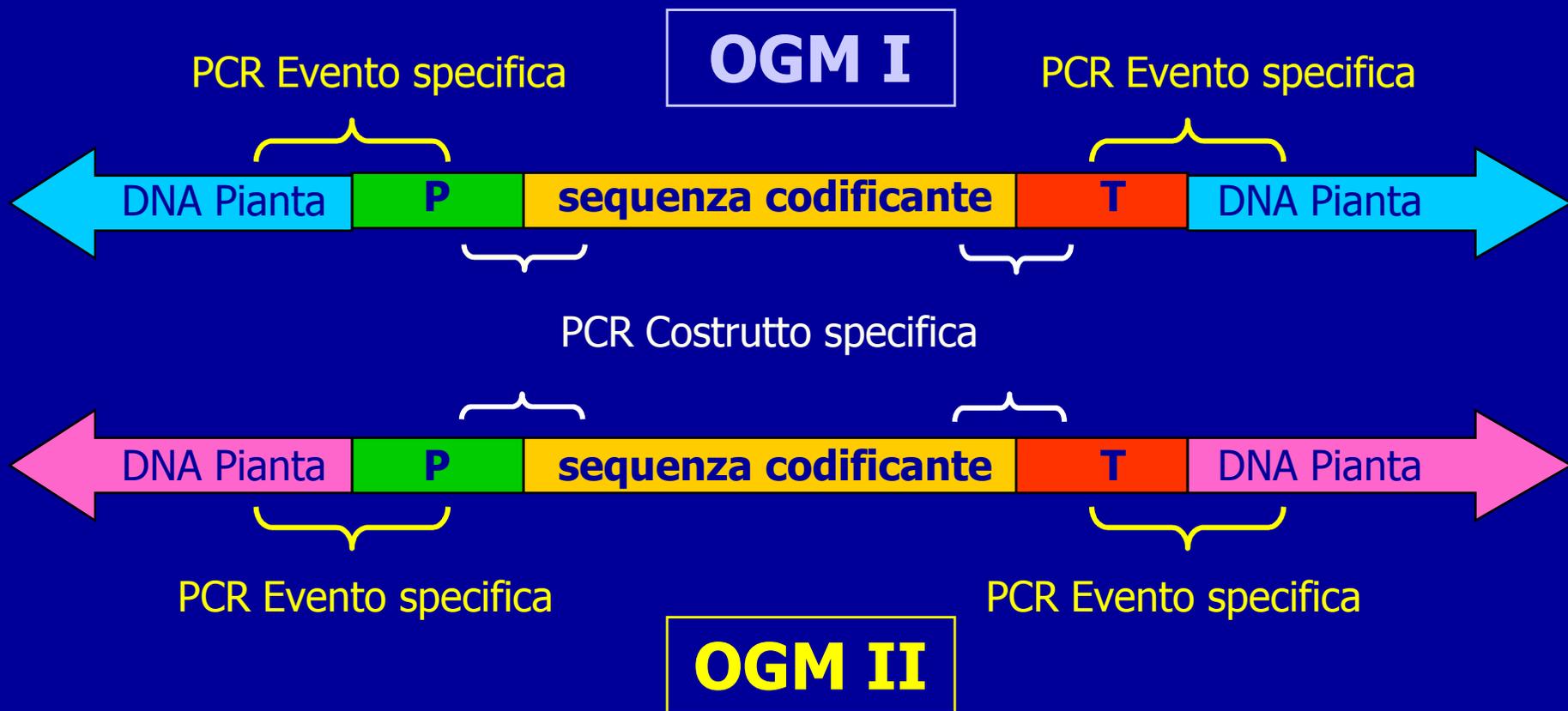
Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

2) Screening GM

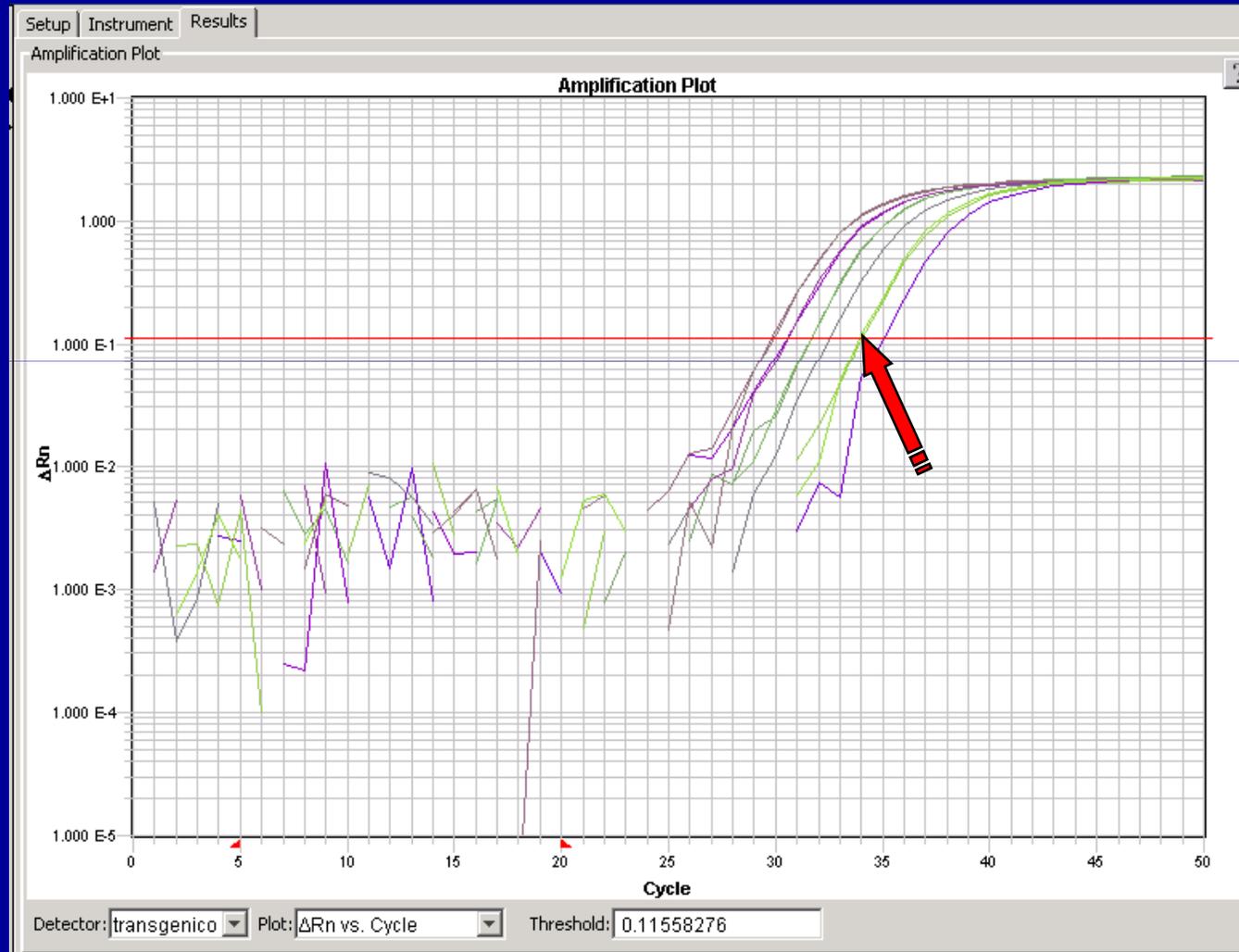
- Per il mais: PCR zeina



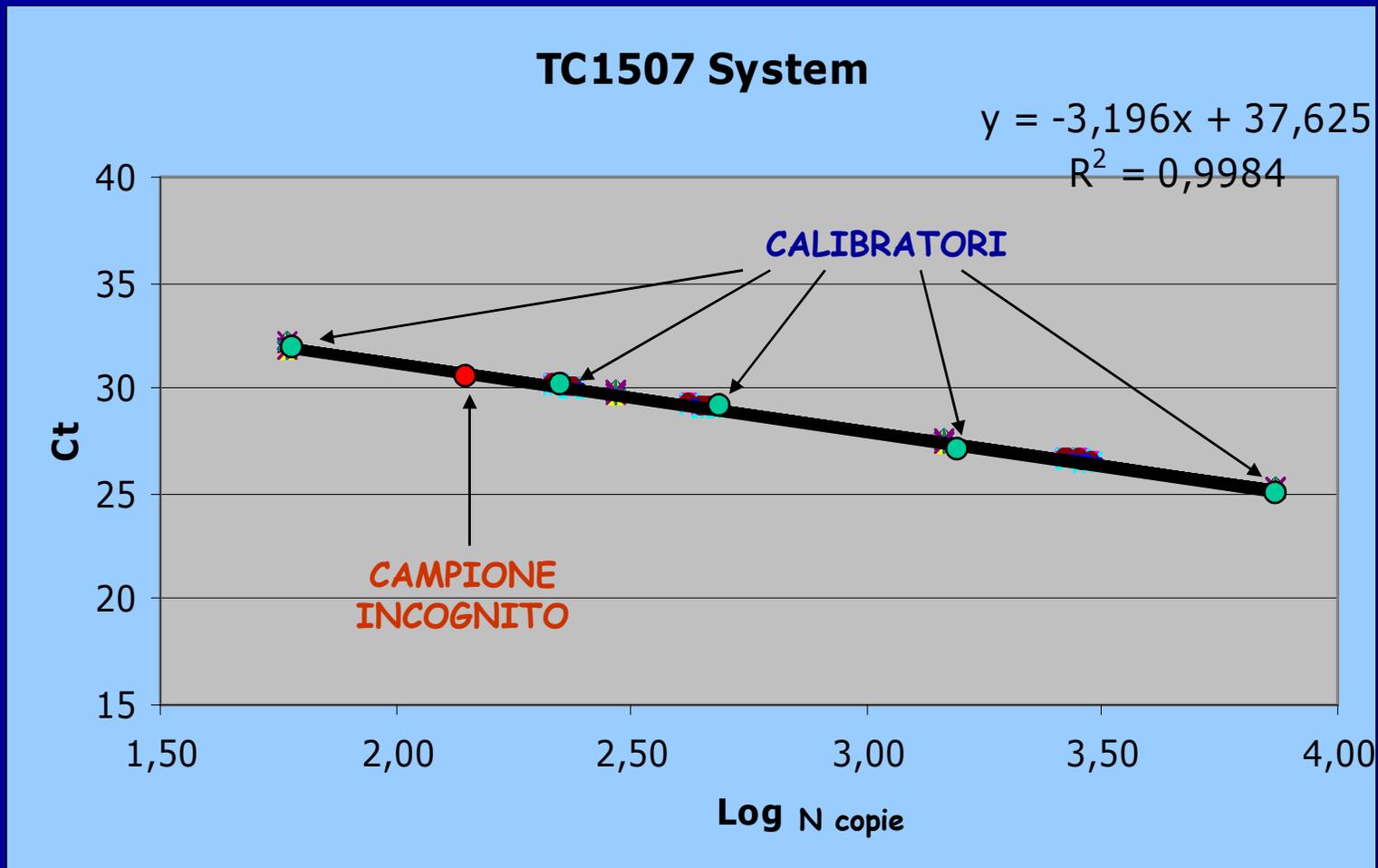
3) Identificazione evento GM



4) Quantificazione evento GM



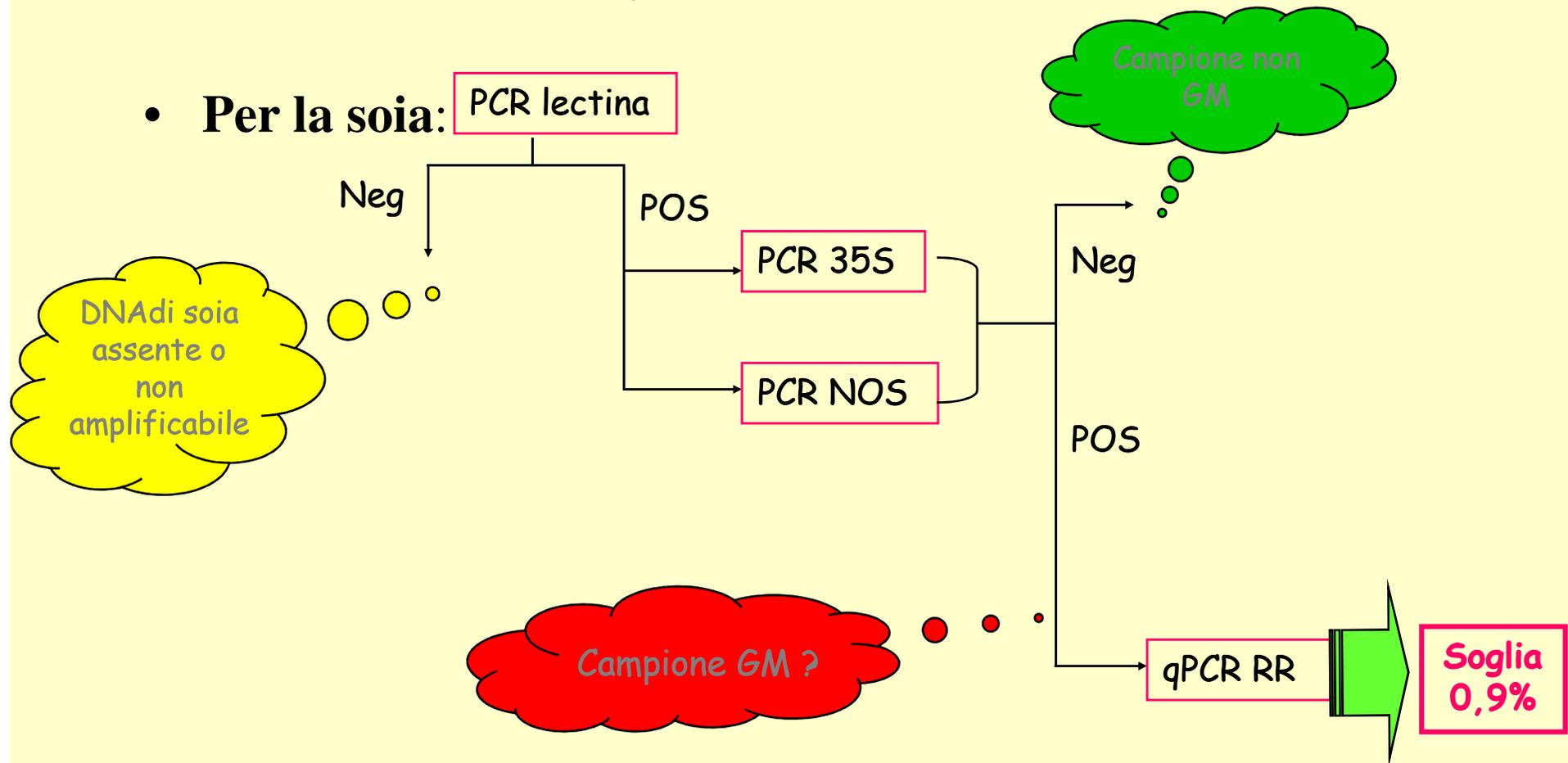
4) Quantificazione evento GM



Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

3-4) Identificazione e quantificazione OGM

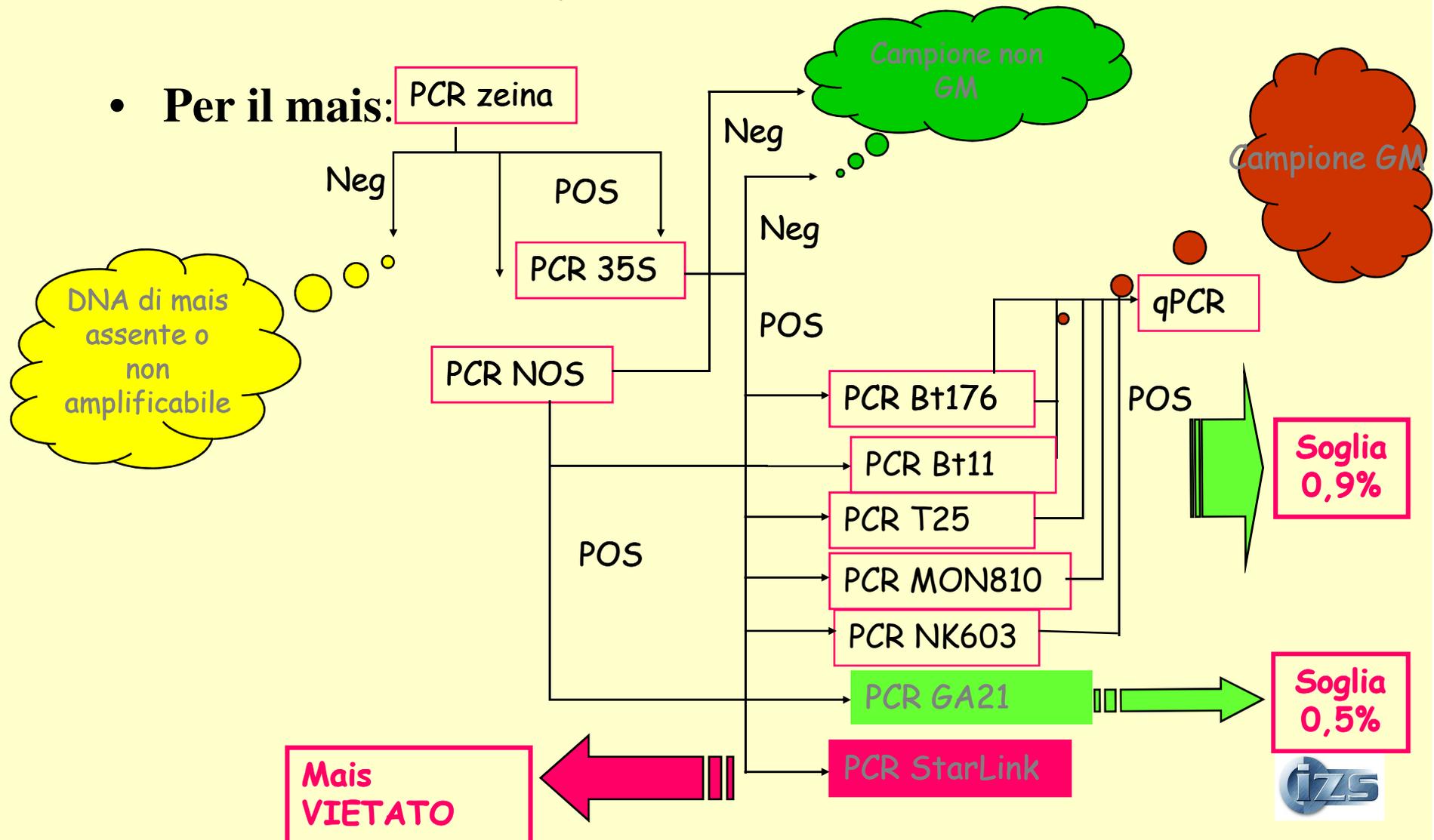
- Per la soia: PCR lectina



Metodologie analitiche per il rilevamento di OGM negli alimenti

3-4) Identificazione e quantificazione OGM

- Per il mais:



Stato di avanzamento dei dossier di validazione del CRL

<http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>

