

**BIOTECNOLOGIE NELLA DIAGNOSTICA
VETERINARIA E NEL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI**
Firenze, 14-15 Dicembre 2011



Francesco
Gatto

L'analisi di alimenti e mangimi per il controllo di OGM



Centro di Referenza Nazionale per la ricerca di OGM

National Reference Laboratory for GMO analysis, Italy

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e
Toscana



Sommario

- Cosa sono gli OGM?
- Tecniche “classiche” di produzione degli OGM
- La normativa comunitaria
- Tecniche e approccio analitico per la ricerca di OGM in alimenti e mangimi
- Il controllo ufficiale
- Prospettive future



Definizioni: OGM

*“un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato **modificato in modo diverso da quanto avviene in natura** con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale”*

Direttiva 2001/18/CEE

Articolo 2 – paragrafo 1

DIRETTIVA 2001/18/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO
del 12 marzo 2001
sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio



Definizioni: OGM

Tecniche di modificazione genetica di cui all'articolo 2, paragrafo 2, lettera a:

1. tecniche di **ricombinazione dell'acido nucleico** che comportano la formazione di **nuove combinazioni di materiale genetico** mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico **prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo**, nonché la loro **incorporazione 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**, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;
3. **fusione cellulare** (inclusa la fusione di protoplasti) 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.”

Direttiva 2001/18/CEE Allegato 1A – parte 1



Definizioni: NON OGM

ESPLICITAMENTE ESCLUSI DAL CAMPO DI APPLICAZIONE

1. fecondazione *in vitro*;
2. processi naturali, quali la coniugazione, la trasduzione e la trasformazione;
3. induzione della poliploidia.

Direttiva 2001/18/CEE Allegato 1A – parte 2

4. la mutagenesi;
5. la fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali.

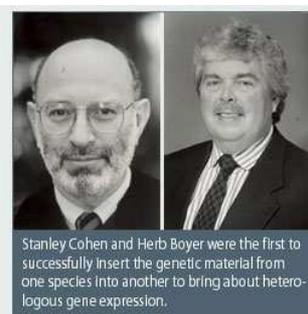
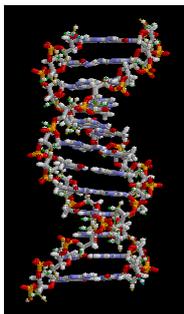
Direttiva 2001/18/CEE Allegato 1B

a condizione che non comportino l'impiego di molecole di acido nucleico ricombinante



Tecniche “classiche” di produzione degli OGM

DNA Ricombinante Ingegneria genetica



1972: clonazione di gene di rana in un batterio

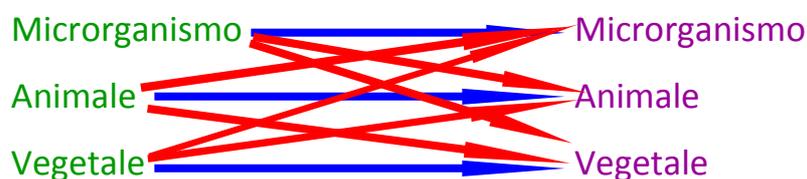
1974: Moratoria sull'utilizzo della ricombinazione genetica (Conferenza di Asilomar)

1976: Linee guida (NIH)



L'INGEGNERIA GENETICA E GLI OGM

Le tecniche di ingegneria genetica consentono il trasferimento orizzontale di materiale genetico da un organismo **donatore** ad un organismo **ricevente** senza vincoli di appartenenza tassonomica



Piante geneticamente modificate



Microrganismo



Animale



Vegetale

Vegetale





Piante transgeniche di prima generazione

Miglioramento delle caratteristiche agronomiche:

- Aumento della resistenza agli insetti
- Tolleranza agli erbicidi
- Aumento della resistenza alle malattie



Piante transgeniche di seconda e terza generazione

Miglioramento delle caratteristiche agronomiche, qualitative, nutrizionali, farmacologiche:

- Resistenza a siccità, appassimento
- Capacità di fissare l'azoto
- Crescita in suoli con elevata salinità, acidità, alte concentrazioni di boro o alluminio
- Ritardata maturazione dei frutti
- Ridotta allergenicità
- Proprietà integrative della dieta
- Valenze nutrizionali o terapeutiche

**MAI
COMMERCIALIZZATE**



L'INGEGNERIA GENETICA E GLI OGM

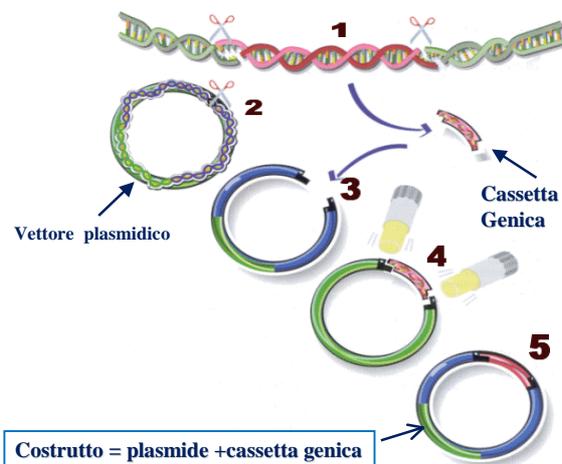


Le tecniche di trasformazione



1° passo: preparazione del costrutto di DNA da impiegare nella trasformazione

- 1) Scelta della/e sequenza/e di DNA e taglio con un enzima di restrizione
- 2) Taglio del plasmide con lo stesso enzima di restrizione per generare estremità compatibili
- 3) Inserimento di una o più "Cassette Geniche"
- 4) Ligazione



 **1° passo: preparazione del costrutto di DNA da impiegare nella trasformazione**



plasmide

Inserimento cassette geniche

nuovo costrutto genico

oltre alla cassetta genica contenente la regione di DNA di interesse agronomico (es. **resistenza ad alcuni insetti**) occorre inserire nel costrutto altre due cassette:

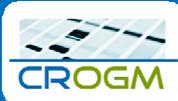
- (1) una contenente DNA che, ad esempio, conferisce resistenza ad un antibiotico attivo sui batteri;
- (2) una contenente DNA che, ad esempio, conferisce **resistenza ad un secondo antibiotico** per la selezione delle cellule vegetali trasformate

TRA POCO VEDREMO A COSA SERVONO.....

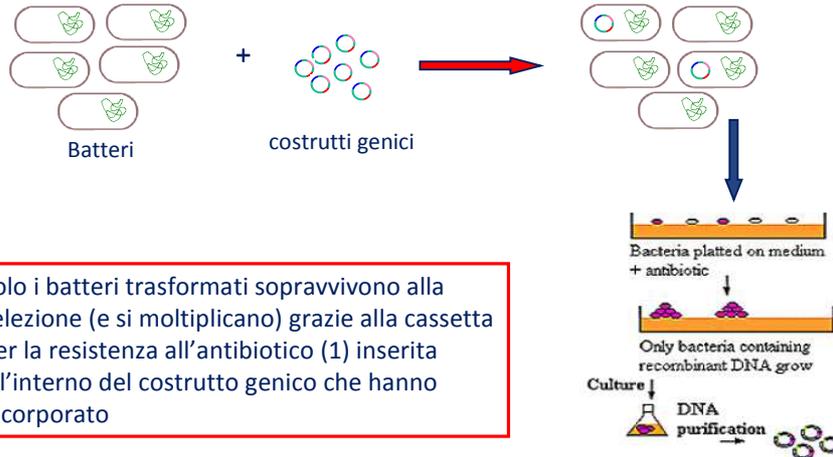
 **2° passo: amplificazione del costrutto**

UNA VOLTA CHE È STATO CREATO IL COSTRUTTO GENICO OCCORRE PRODURNE UN NUMERO ELEVATO DI COPIE INSERENDOLO IN BATTERI CAPACI DI “AMPLIFICARLO”...

Tutto ciò si definisce
CLONAGGIO



CLONAGGIO E SELEZIONE, RISPETTO AL PRIMO ANTIBIOTICO (1), DELLE CELLULE BATTERICHE TRASFORMATE



3° passo: trasferimento nell'organismo ricevente



DOPO AVER PREPARATO IL DNA CON CUI EFFETTUARE LA MODIFICAZIONE GENETICA ED AVERNE OTTENUTO UN GRAN NUMERO DI COPIE OCCORRE TRASFERIRLO NELL'OSPITE

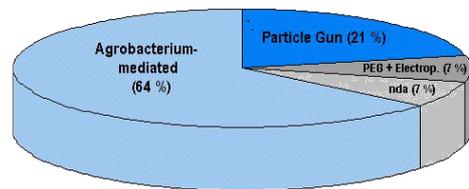




METODICHE DI TRASFORMAZIONE DELLE PIANTE

L'inserzione di un tratto di DNA estraneo (costrutto genico) nel genoma di una pianta può avvenire secondo diverse modalità:

- *Agrobacterium tumefaciens*
- Metodi biolistici
- Elettroporazione



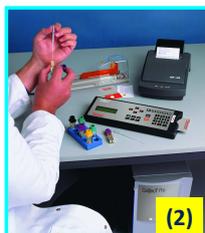
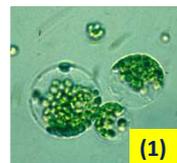
Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability), Switzerland



TRASFERIMENTO DIRETTO DI DNA

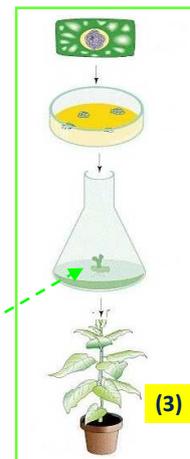
Elettroporazione

(1) È necessario eliminare la parete di cellulosa delle cellule vegetali (cellulasi fungine) per ottenere i protoplasti



(2) I protoplasti in sospensione insieme ai costrutti di DNA vengono sottoposti ad impulsi elettrici ad alto voltaggio

(3) Dopo elettroporazione i protoplasti vengono fatti crescere in colture tissutali con specifici livelli di fitormoni prima di procedere alla selezione della piantina transgenica



Es. mais Bt11, T25, riso LRICE06



TRASFERIMENTO DIRETTO DI DNA

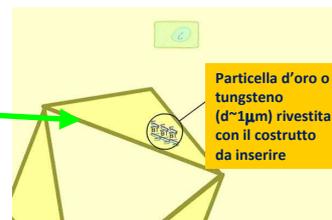
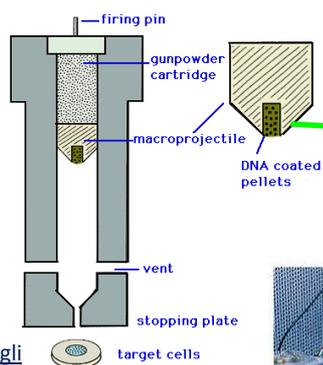
Non è sempre facile rigenerare piante intere da protoplasti...

...è possibile allora ricorrere al bombardamento di cellule con pareti intatte mediante la tecnica **BIOLISTICA**



TRASFERIMENTO DIRETTO DI DNA

bombardamento con microparticelle



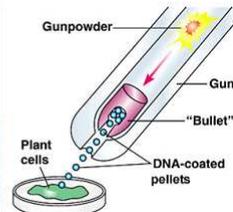
Possibili bersagli

- . Foglie intatte
- . Chicchi
- . Suspensioni di cellule embrionali

Es. mais Bt176 e soia RR



(a)



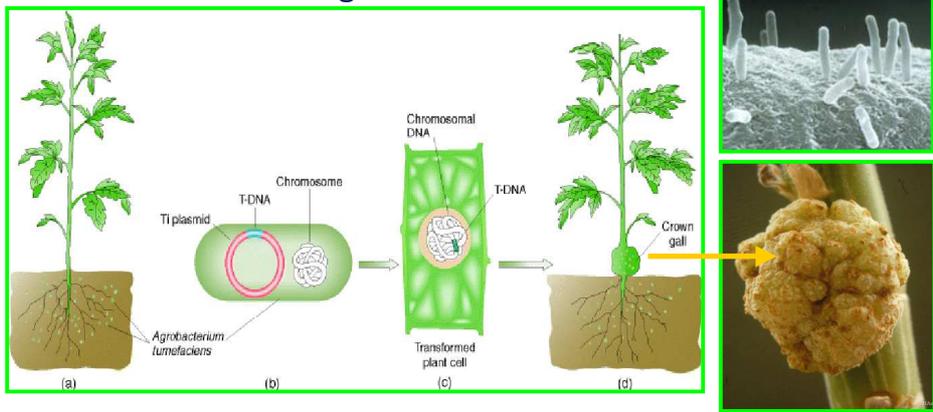
(b)

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



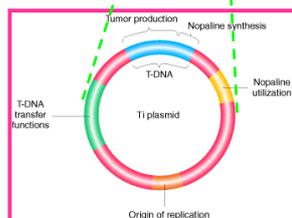
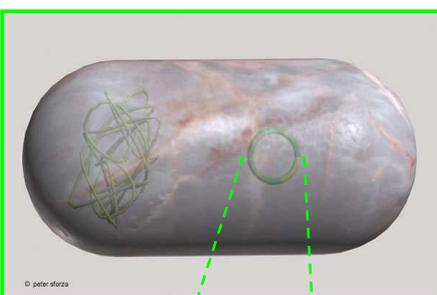
TRASFERIMENTO MEDIATO DA *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens in natura:
i tumori della galla del colletto



TRASFERIMENTO MEDIATO DA *Agrobacterium tumefaciens*

L'*Agrobacterium tumefaciens*,
il "plasmide Ti" ed il "T-DNA"



Tumor Inducing plasmids (200 kb)

- . Nopaline plasmids
- . Octopine plasmids
- . Agropine plasmids
- . Ri plasmids



TRASFERIMENTO MEDIATO DA *Agrobacterium tumefaciens*

- L'induzione dei geni vir induce la formazione di una copia a singolo filamento del T-DNA, T-strand. Il T-strand, complementare al filamento codificante del T-DNA, si forma ad opera di due endonucleasi specifiche per LB e RB: **VirD1** e **VirD2**. Queste rimangono attaccate all'estremità 5' del filamento. In seguito alla ricostituzione del filamento complementare del T-DNA, ad opera del sistema di riparo della cellula batterica, si excide un filamento ss del T-DNA con la proteina **VirD2** attaccata all'estremità 5' che le conferisce una polarità.
- Il T-strand viene immediatamente ricoperto da **ss-binding proteins** codificate da **VirE** che proteggono il T-strand dall'attacco di proteasi e gli conferiscono una forma bastoncellare che ne facilita l'ingresso nella cellula vegetale utilizzando un pilus formato dall'assemblaggio di proteine codificate dal locus **VirB**.



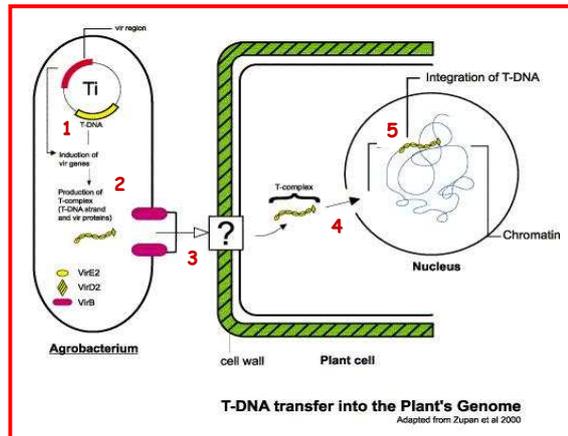
TRASFERIMENTO MEDIATO DA *Agrobacterium tumefaciens*

- L'intero processo di attraversamento del canale richiede energia probabilmente fornita dall'attività ATPasica di **VirB4** e/o **VirB11**.
- La traslocazione del complesso-T al nucleo sembra essere mediato sia da **VirD2** che da **VirE2**. Entrambe le proteine, infatti, presentano Nuclear Localization Signals (NLS) funzionali. Dopo aver raggiunto la membrana nucleare, il complesso-T entra nel nucleo e, una volta dentro il nucleo, il T-strand si integra casualmente nel genoma vegetale con un meccanismo in gran parte sconosciuto, che sicuramente coinvolge numerose proteine vegetali e, forse, **VirD2** e **VirE2**.



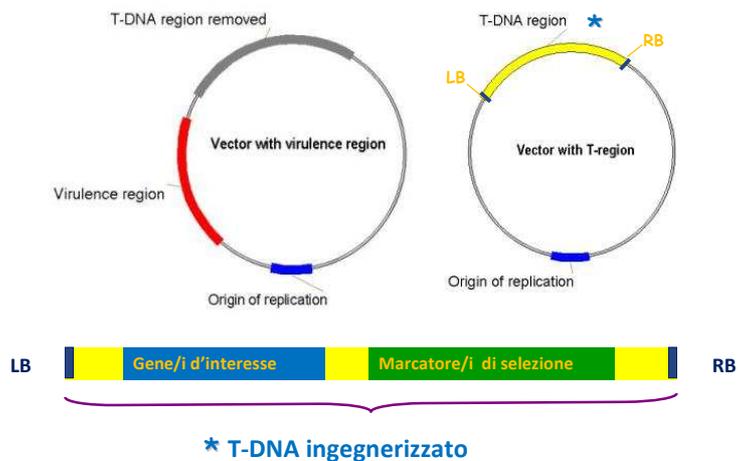
TRASFERIMENTO MEDIATO DA *Agrobacterium tumefaciens*

ipotesi di meccanismo di trasferimento in natura del "T-DNA" del plasmide Ti



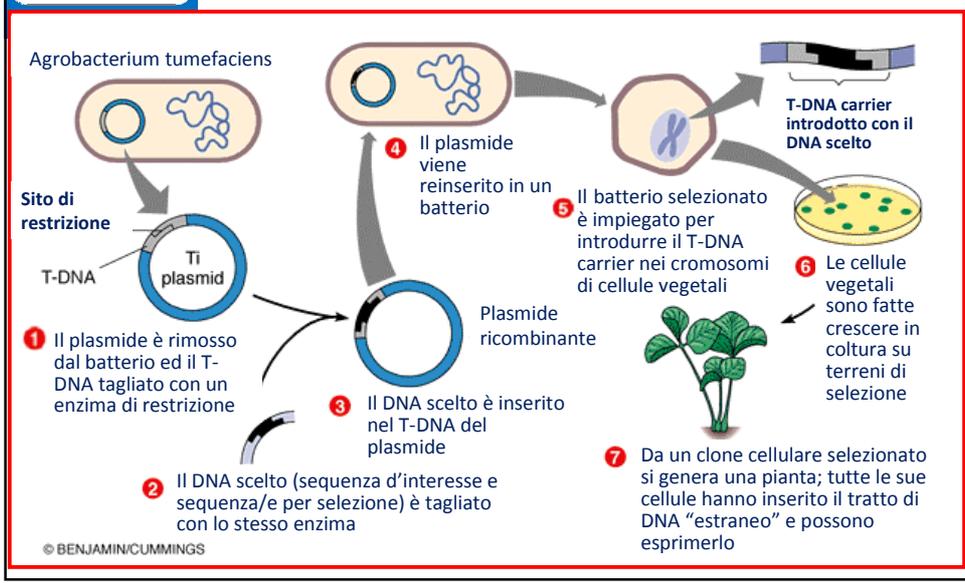
TRASFERIMENTO MEDIATO DA *Agrobacterium tumefaciens*

IL VETTORE BINARIO





Riepilogo trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*



4° passo:



SELEZIONE ASSISTITA DELLE PIANTINE
"EVENTO DI TRASFORMAZIONE"
MEDIANTE APPOSITI MARCATORI





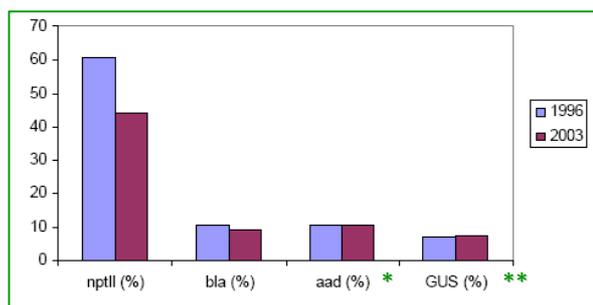
SELEZIONE ASSISTITA SU TERRENI ANTIBIOTICI



Ghimire et al, African Journal of Biotechnology Vol. 10 (13), pp. 2430-2439, 28 March, 2011



PERCENTUALE DI PIANTE GM IN RELAZIONE AI MARCATORI DI SELEZIONE POSSEDUTI



Fonte: BATS (Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability), Switzerland

* aminoglicosil-adenil-transferasi → resistenza a sulfamidici

** b-glucuronidasi → gene reporter



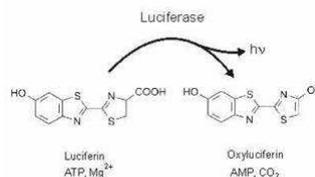
ALTRI MARCATORI DI SELEZIONE PER PIANTE GM

Sistema GUS *



* b-glucuronidasi

Sistema Luciferina-Luciferasi

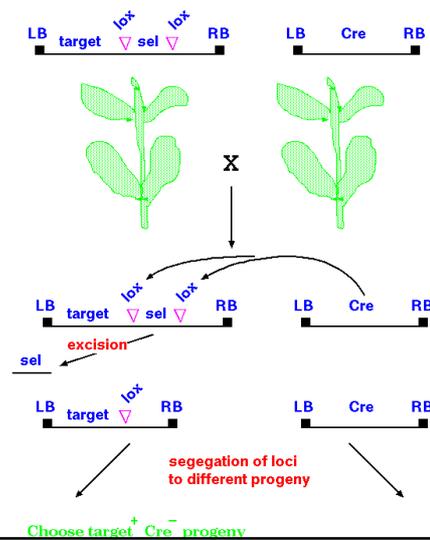


UN SISTEMA PER ELIMINARE IL MARCATORE DI SELEZIONE

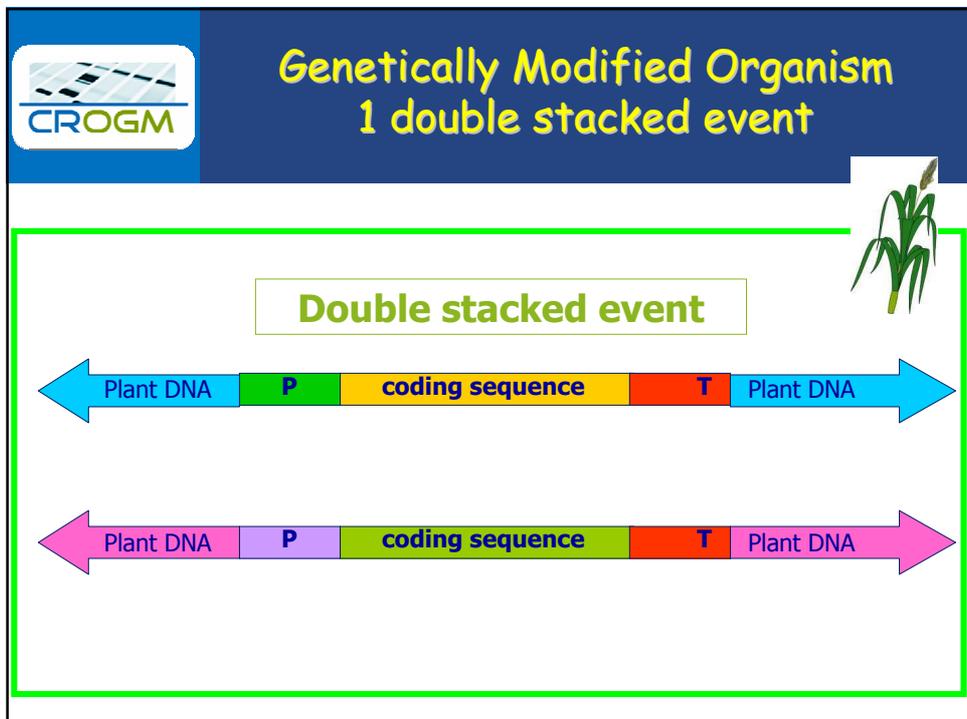
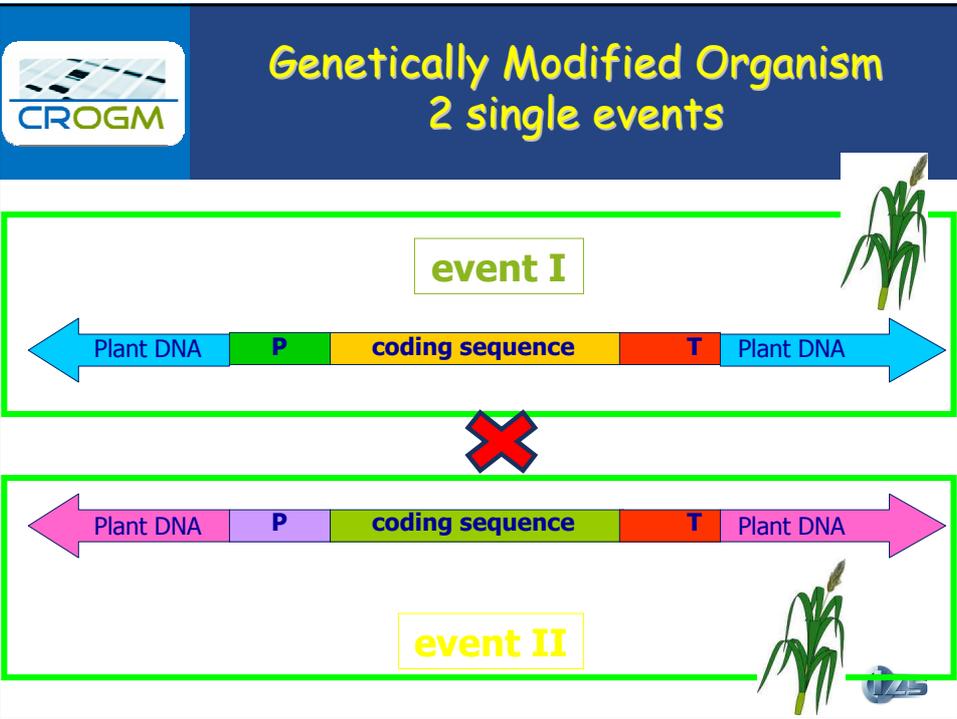


Sistema CRE-LOX

(mais LY038: Contenuto elevato di Lys per l'allevamento di maiali e polli - gene rimosso nptII)



Dale et al (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10558-10562



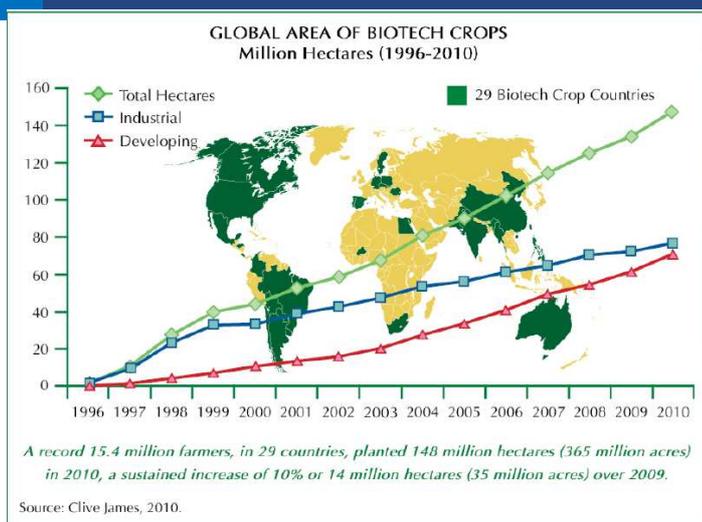


CARATTERISTICHE IMPORTANTI PER UN “EVENTO DI TRASFORMAZIONE”

- . Stabilità d'integrazione e di espressione del “nuovo DNA” nel genoma ricevente
- . Assenza di alterazioni strutturali e funzionali a carico del genoma ricevente dopo l'inserimento del “nuovo DNA”
- . Definizione del numero preciso di copie del “nuovo DNA” integrate nel genoma ricevente
- . Possibilità di regolazione spaziale e/o temporale dell'espressione del “nuovo DNA” nel genoma ricevente (casi particolari)



DIFFUSIONE DELLE COLTURE GM NEL MONDO

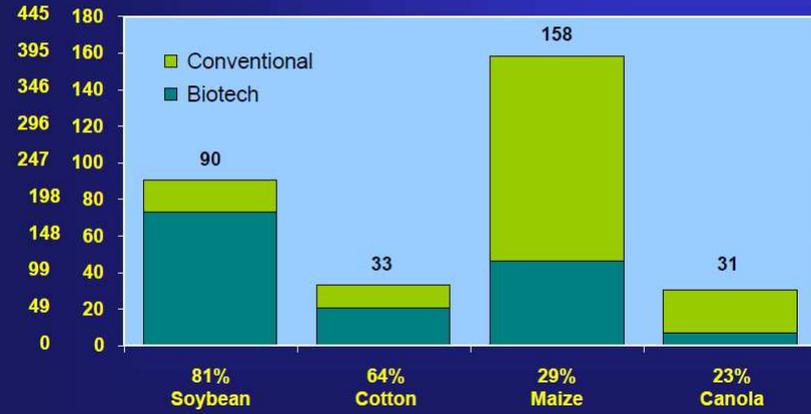


Clive J, ISAAA; 2010

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2010



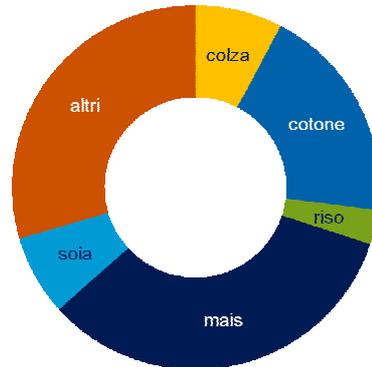
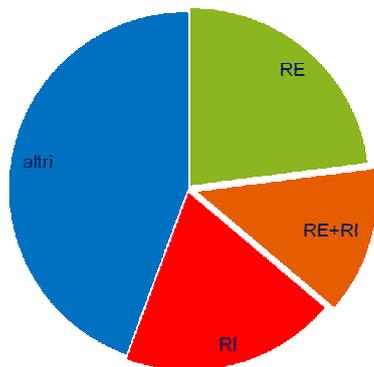
M Acres



Source: Clive James, 2010



PIANTE GM



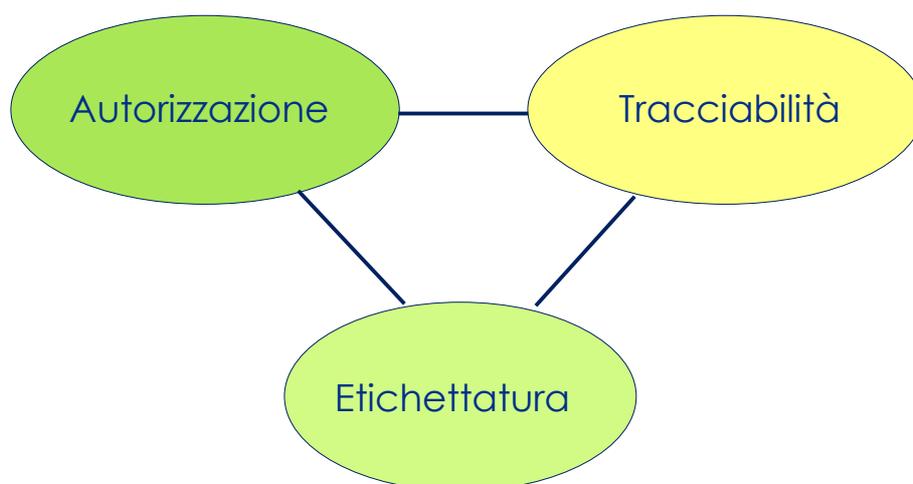


Obiettivi principali della legislazione europea sugli alimenti e mangimi GM

1. Protezione della salute umana e del benessere animale;
2. Garantire procedure armonizzate per la valutazione del rischio e l'autorizzazione alla commercializzazione di alimenti e mangimi OGM nell'UE secondo criteri di efficienza e trasparenza (45 mesi c.a.).
3. Garantire una chiara etichettatura di alimenti e mangimi GM al fine garantire la libertà di scelta dei consumatori e degli allevatori.

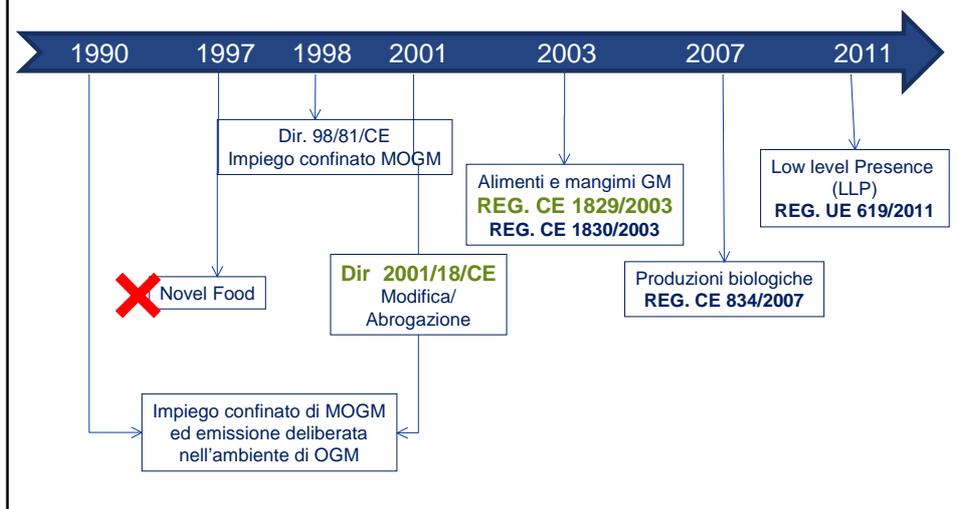


Normativa UE su OGM





Quadro normativo alimenti e mangimi OGM



Direttiva 2001/18/CE sull'emissione deliberata di OGM nell'ambiente

- Rilascio sperimentale di OGM nell'ambiente (parte B)
- Immissione di OGM sul mercato: coltivazione, importazione, trasformazione (parte C)
- abrogazione della Dir. 90/220/CE
- Definizione di OGM
- Metodologia e principi per la valutazione del rischio ambientale;
- Obbligatorietà di etichettatura e tracciabilità dei prodotti OGM a tutti i livelli di commercializzazione;
- Obbligatorietà del monitoraggio post-marketing, valutazione degli effetti a lungo termine del rilascio nell'ambiente;
- Durata delle autorizzazioni di 10 anni e procedure per il rinnovo;
- **Pubblicità delle informazioni: coltivazioni e mercato di OGM in UE**



Deliberate releases and placing on the EU market of Genetically Modified Organisms - GMO Register

<http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/>



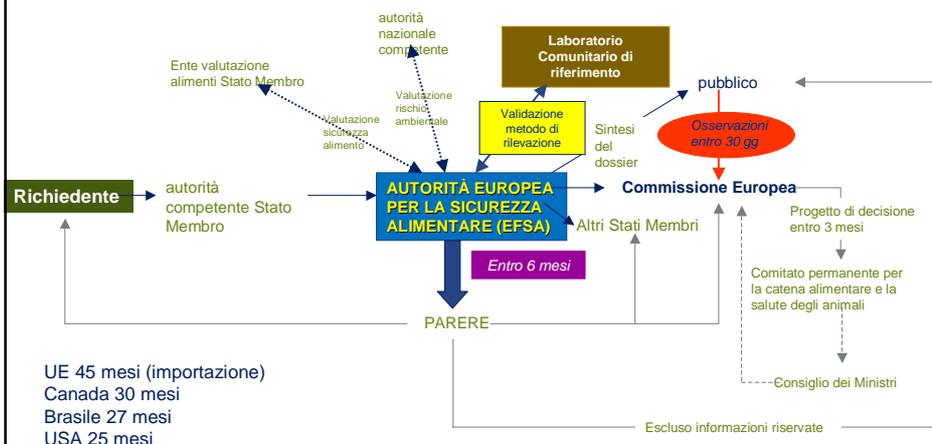
Regolamento (CE) N° 1829/2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati

- Si applica ad alimenti e mangimi geneticamente modificati;
- Definisce le procedure comunitarie per l'autorizzazione e vigilanza degli alimenti e mangimi geneticamente modificati;
- Definisce le norme per l'etichettatura degli alimenti e mangimi geneticamente modificati.
- Principio "one door – one key": il notificante puo chiedere l'autorizzazione per tutti gli scopi (produzione di alimenti e mangimi, importazione, prodotti industriali e **coltivazione**).
- Etichettatura obbligatoria per alimenti e **mangimi GM**, **indipendentemente dalla rilevabilità del DNA e delle proteine.**
- **Soglia di tolleranza dello 0,9% rispetto all'ingrediente! (purchè la contaminazione sia accidentale o tecnicamente inevitabile)**
- **Il notificante fornisce metodi e materiali di riferimento per l'identificazione.**



Regolamento (CE) N° 1829/2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati

Procedura di autorizzazione (articoli 5, 6, 7)





Regolamento (CE) N° 1829/2003
relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati

Registro Comunitario degli alimenti e dei mangimi GM

http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm

Community register of genetically modified food and feed.

Genetically modified cotton				
Transformation event/ Unique ID/ Company	Genes Introduced / characteristics	Authorized use	Authorization Expiration Date	Details
Cotton (MON1445) MON-Ø1445-2 Monsanto	Genetically modified cotton that contains: cp4 epsps gene inserted to confer tolerance to the herbicide glyphosate	Food produced from MON1445 cotton (cottonseed oil)	18/12/2011	
		Food additives produced from MON1445 cotton	Renewal of authorization ongoing	
		Feed produced from MON1445 cotton (feed materials and feed additives)	Renewal of authorization ongoing	
Cotton (MON15985) MON-15985-7 Monsanto	Genetically modified cotton that contains: cry1Ac and cry2Ab2 genes inserted to confer insect-resistance highly selective in controlling Lepidopteran insects	Food additives produced from MON-15985-7 cotton	Renewal of authorization ongoing	
		Feed produced from MON15985 cotton (feed materials and feed additives)	Renewal of authorization ongoing	
Cotton (MON15985 x MON1445) MON-15985-7 x MON-Ø1445-2 Monsanto	Genetically modified cotton that contains: cry1Ac and cry2Ab2 genes inserted to confer insect-resistance highly selective in controlling Lepidopteran insects	Food additives produced from MON15985 x MON1445 cotton	Renewal of authorization ongoing	
		Feed produced from MON15985 x MON1445 cotton (feed materials and feed additives)	Renewal of authorization ongoing	
Cotton (MON531) Monsanto	Genetically modified cotton that contains: cp4 epsps gene inserted to confer tolerance to the herbicide glyphosate	Food produced from MON 531 cotton (cottonseed)	18/12/2011	

International Affairs

Organisations
Codex
OIE
Import Conditions
Pets and Animal Welfare
Enlargement
Agreements

Menu

GM Register
Introduction

Authorised products

Cotton (MOH1445)
Cotton (MOH15985)
Cotton (MOH15985 x MOH1445)
Cotton (MOH531)
Cotton (MOH531 x MOH1445)
Maize (BT1)
Maize (DAS1597)
Maize (GA21)
Maize (MOH810)
Maize (MOH863)
Maize (MOH863 x IIR603)



Regolamento (CE) N° 1829/2003
relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati

Registro Comunitario degli alimenti e dei mangimi GM

http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm



N. aut. 23
N. rit. 2



N. aut. 3



N. aut. 7



N. aut. 2



N. aut. 1



N. aut. 1



N. aut. 3
N. rit. 3



Regolamento (CE) N° 1830/2003

tracciabilità ed etichettatura di organismi geneticamente modificati

Tracciabilità: 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 (art.3).

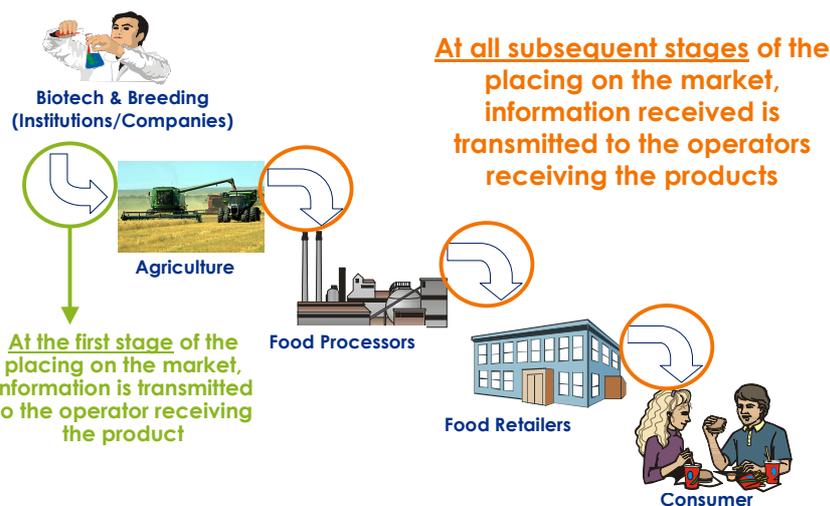
SCOPI:

- Controllo e verifica dell'etichettatura;
- monitoraggio dei potenziali effetti sulla salute e sull'ambiente
- garantire il tempestivo ritiro dal mercato di prodotti costituiti o derivati da OGM nel caso emergano rischi per la salute o per l'ambiente.

Il regolamento elenca gli adempimenti documentali che gli operatori devono ottemperare per garantire la tracciabilità degli OGM



TO WHOM information shall be transmitted:





Etichettatura

“contiene farina prodotta da mais geneticamente modificato”

“contiene soia geneticamente modificata”

~~“potrebbe contenere prodotti geneticamente modificati”~~

~~“contiene prodotti geneticamente modificati”~~



ETICHETTATURA

soia MON40-3-2 2%



soia MON40-3-2 0,5%

mais MON810 0,5%
mais BT11 0,6%



soia MON40-3-2 0,5%
mais MON810 0,8%



0,9%



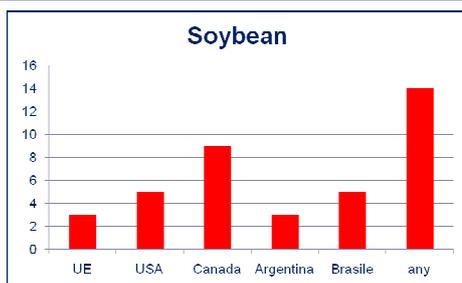
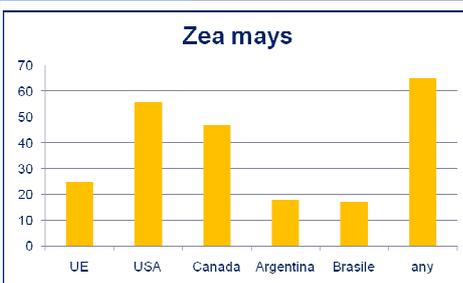
Produzioni biologiche

REG. CE 834/2007 Art. 9 par 2

2. Ai fini del divieto di cui al paragrafo 1 riguardante gli OGM o prodotti derivati da OGM per alimenti e mangimi, gli operatori possono fare affidamento sull'etichetta o qualsiasi altro documento che accompagna un prodotto e che sia apposto o fornito ai sensi della direttiva 2001/18/CE, del regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati (1), o del regolamento (CE) n. 1830/2003.



Esistono OGM non autorizzati in UE?



Approvazioni asincrone

REG. UE 619/2011

Soglia di tolleranza dello **0,1%** nei **mangimi** per eventi GM autorizzati alla commercializzazione in paesi terzi e l'UE abbia iniziato la valutazione del rischio, siano disponibili metodo e CRM...

Mais: 3272, 98140, MIR162, MON 87701

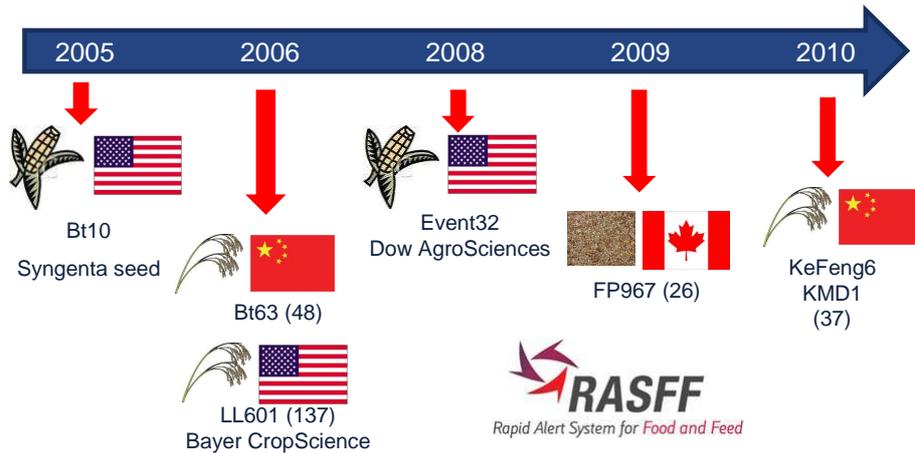
Soia: 356043, 305423, A5547-127

Cotone: 281-24-236/3006-210-23

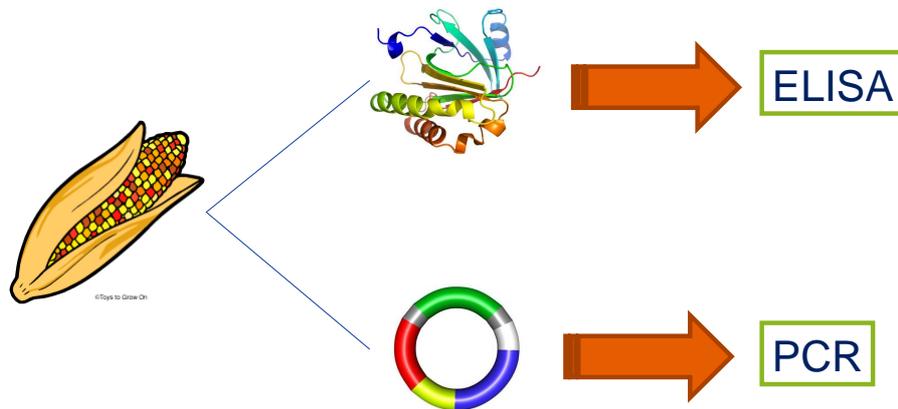
Riso: LLRICE62



Esistono OGM non autorizzati per la commercializzazione?

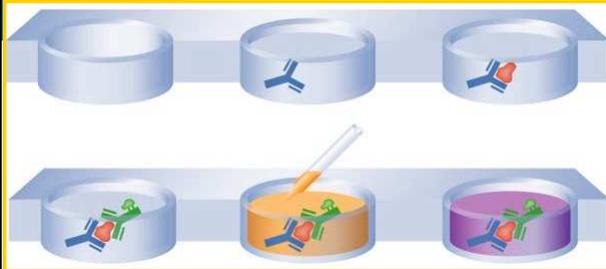


Tecniche e approccio analitico





METODI DI ANALISI DELLE PROTEINE: ELISA



PRO e CONTRO

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

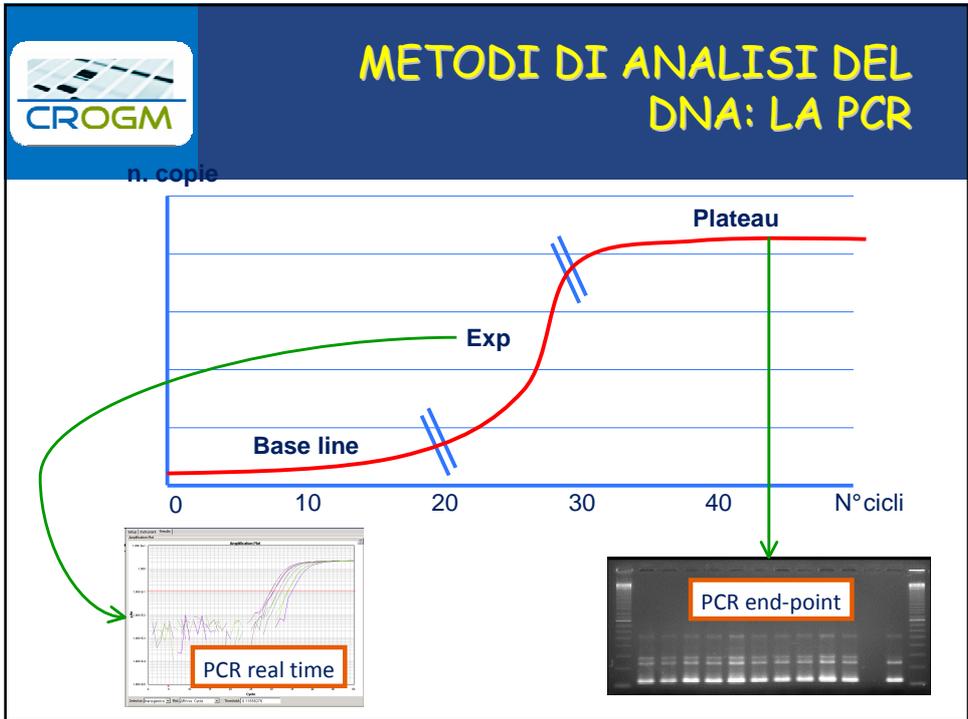


METODI DI ANALISI DEL DNA: LA PCR



PRO e CONTRO

- elevate sensibilità e specificità
- applicabile ad alimenti finiti
- quantitativa
- costosa
- richiede strutture di laboratorio adeguate



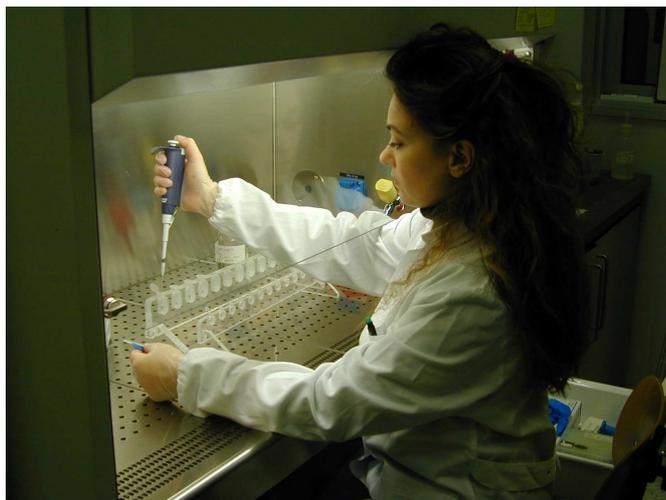
PCR END POINT: L'ANALISI DEI RISULTATI

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

The graph shows Log [DNA] on the y-axis and Cycle # on the x-axis. It highlights the **Linear** phase, the **Exponential** phase, and the **Plateau** phase. A red circle highlights the plateau region, with labels for **Ethidium-Gel detection** and **Variable yield**. Below the graph are two gel electrophoresis images, A and B, showing bands of varying intensity corresponding to different cycle numbers (1-16). Image A shows bands up to cycle 10, while image B shows bands up to cycle 16.



ALLESTIMENTO PCR

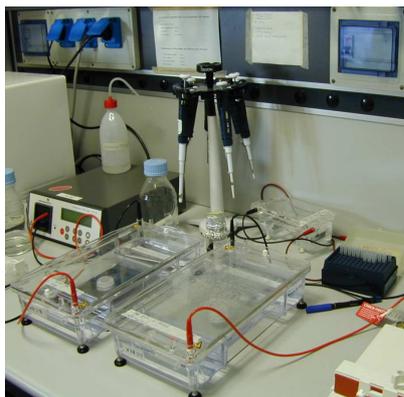


AMPLIFICAZIONE DNA

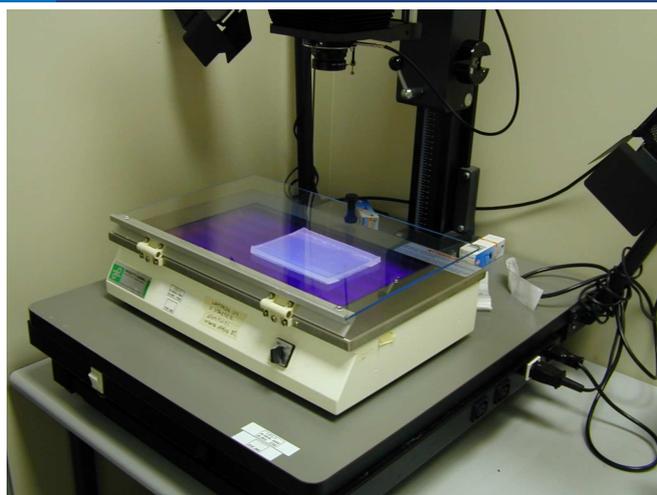




ELETTROFORESI DELL'AMPLIFICATO

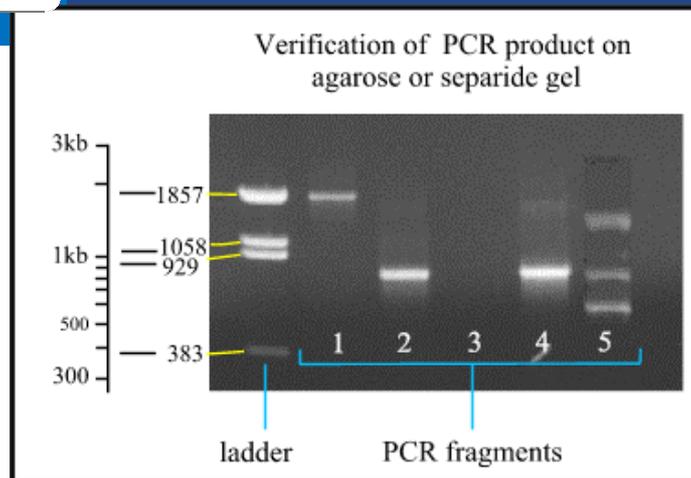


RIVELAZIONE DELL'AMPLIFICATO



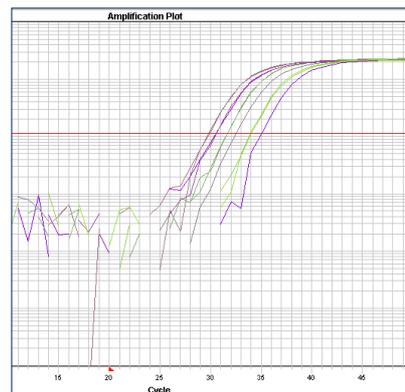


Elettroforesi dell'amplificato



METODI DI ANALISI DEL DNA: LA PCR REAL TIME

- L'analisi si effettua in fase esponenziale e non al termine dell'amplificazione.
- Si può discriminare tra le quantità di DNA nei singoli campioni.
- Non sono richiesti passaggi successivi alla fase di amplificazione.





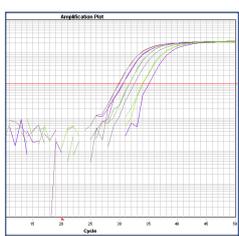
METODI DI ANALISI DEL DNA: LA PCR REAL TIME

Rivelazione specifica

PCR real time

Rivelazione aspecifica

- TaqMan probe
- Molecular Beacons
- Amplifluor™ hairpin primers
- LUX™ Fluorogenic Primers
- BD QZyme
- Scorpions
- HybProbes

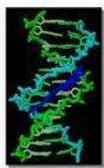


- Sybr Green
- LC Green
- SYTO9
- Eva Green
- Chromofy
- BEBO



Rivelazione aspecifica

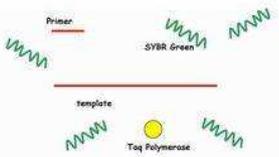
SYBR® green Dye



Double stranded DNA Binding Dye

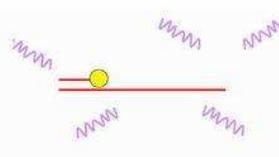
SYBR Green detection 1

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



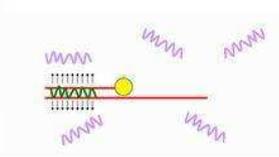
SYBR Green detection 2

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



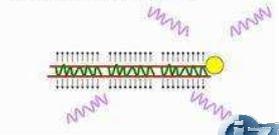
SYBR Green detection 3

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



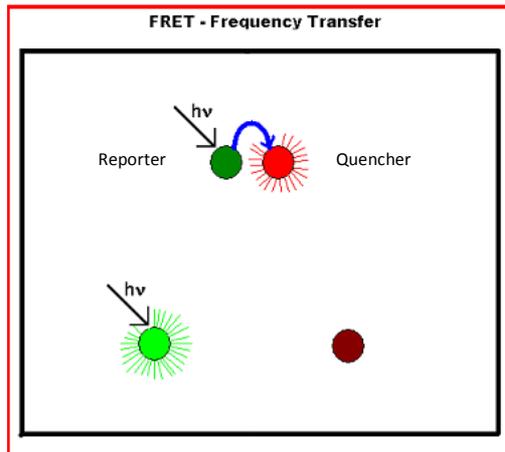
SYBR Green detection 4

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



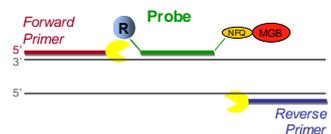
Fluorescence
Resonance
Energy
Transfer



REAL TIME: TAQMAN

- ⊙ saggio della 5' esonucleasi.
- ⊙ Prevede l'utilizzo di una sonda marcata con 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.

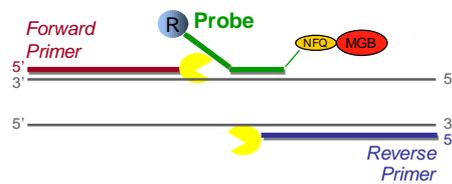
Saggio 5'-3' esonucleasico





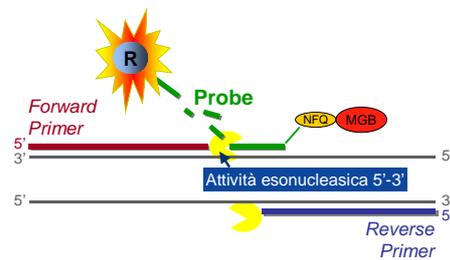
REAL TIME: TAQMAN

Saggio 5'-3'esonucleasico



REAL TIME: TAQMAN

Saggio 5'-3'esonucleasico



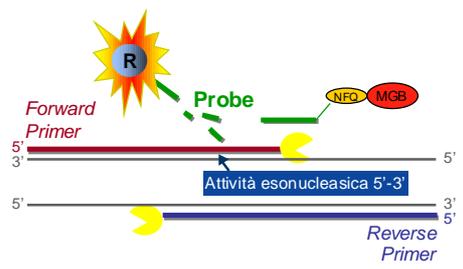
Spostamento e Taglio





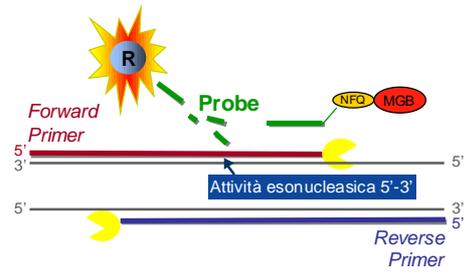
REAL TIME: TAQMAN

Saggio 5'-3'esonucleasico



REAL TIME: TAQMAN

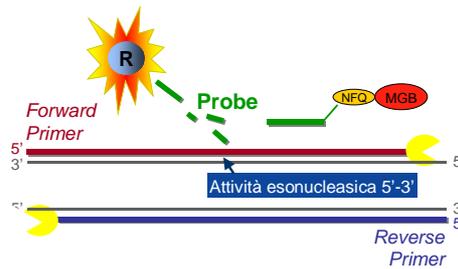
Saggio 5'-3'esonucleasico





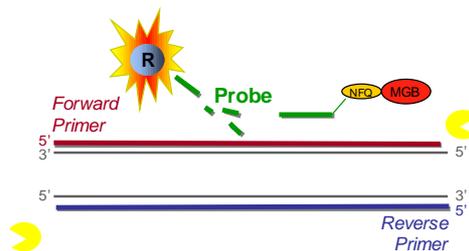
REAL TIME: TAQMAN

Saggio 5'-3'esonucleasico



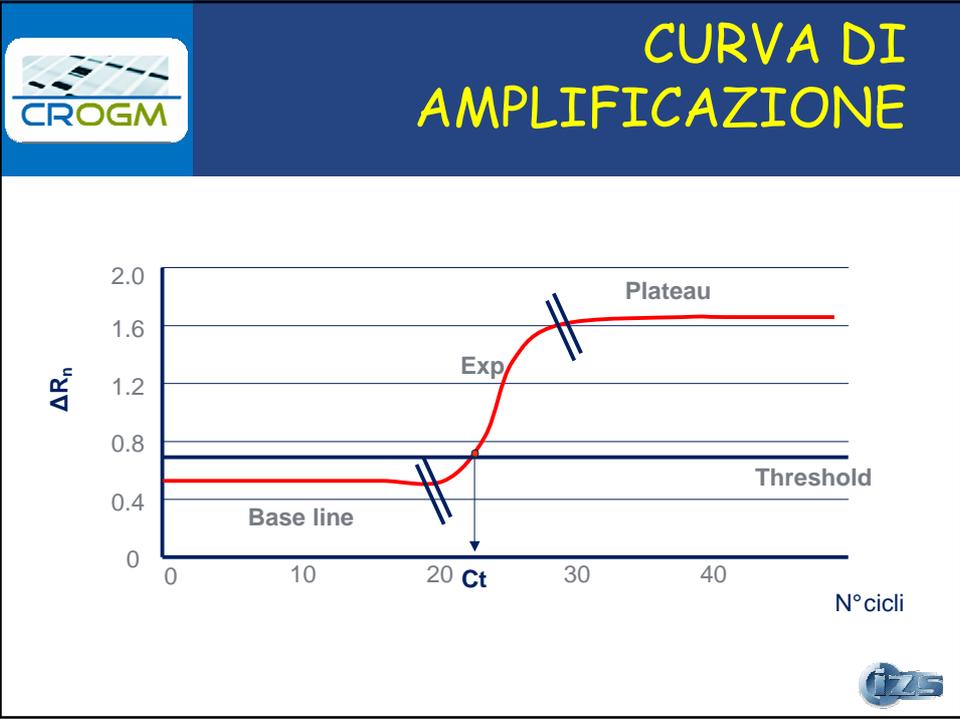
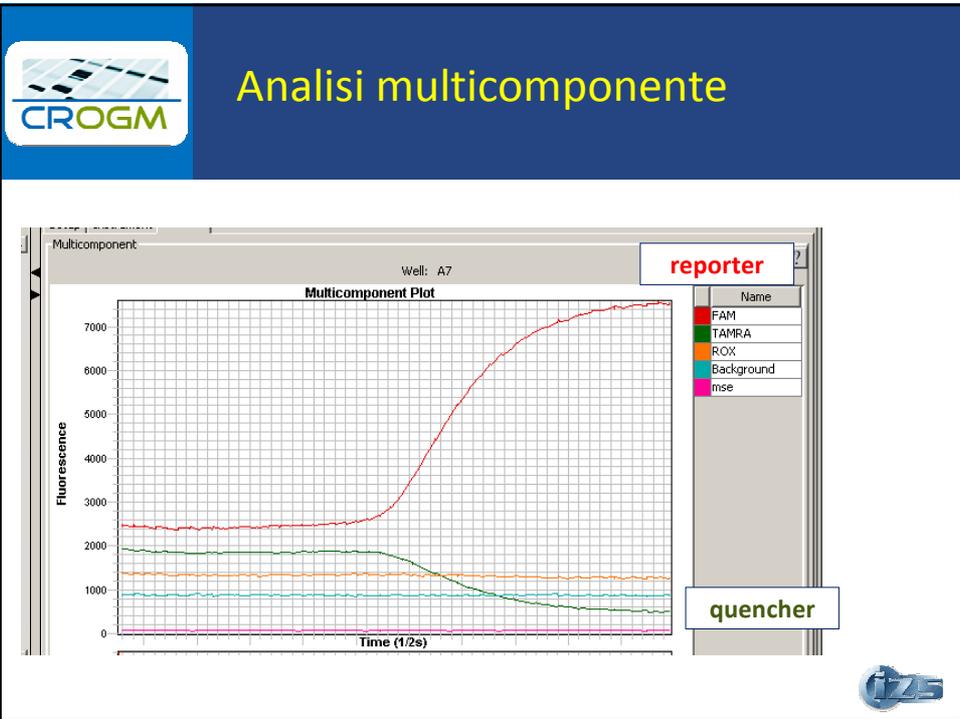
REAL TIME: TAQMAN

Saggio 5'-3'esonucleasico



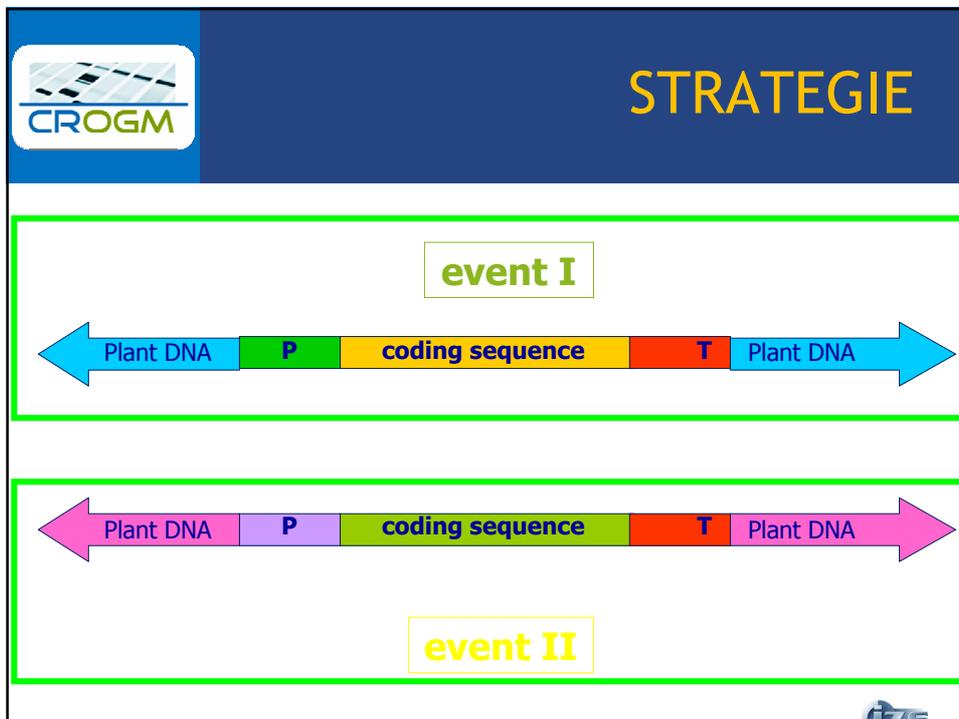
Polimerizzazione completa

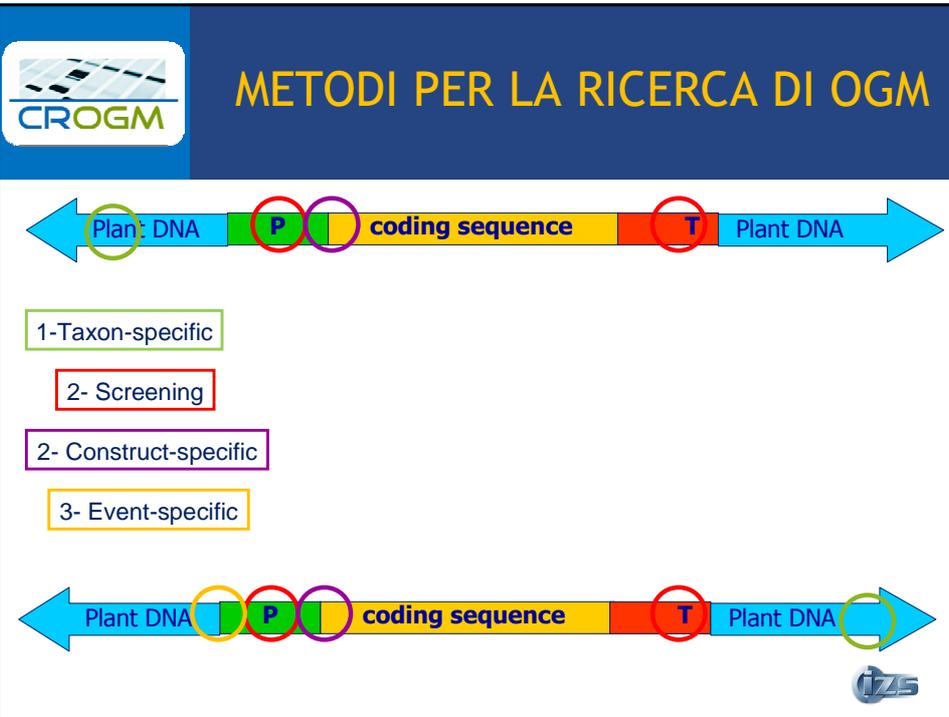




MON40-3-2					Lectina						
	Vel	N. Copie	Log(n.copie)	Ct	Parametri della curva standard		Vel	N. Copie	Log(n.copie)	Ct	Parametri della curva standard
S1	A1	22124	4.345	25.98	Pendenza: -3.520	S1	E1	221239	5.345	21.73	Pendenza: -3.439
	A2	22124	4.345	26.02	Intercoetta: 41.343		E2	221239	5.345	21.75	Intercoetta: 40.100
	A3	22124	4.345	26.06	R ² : 0.994		E3	221239	5.345	21.82	R ² : 1.000
S2	A4	4425	3.646	28.52	Threshold: 0.2	S2	E4	44249	4.646	24.05	Threshold: 0.2
	A5	4425	3.646	28.58	Baseline		E5	44248	4.646	24.09	
	A6	4425	3.646	28.54			E6	44249	4.646	24.03	
A7	885	2.947	31.00	S3		E7	8850	3.947	26.52	Start: 3	
A8	885	2.947	31.04		E8	8850	3.947	26.59	End: 19		
A9	885	2.947	30.89		E9	8850	3.947	26.55			
S4	A10	177	2.248	33.58	S4	E10	1770	3.248	28.92		
	A11	177	2.248	33.33		E11	1770	3.248	28.81		
	A12	177	2.248	33.33		E12	1770	3.248	28.97		
S5	B1	35	1.549	35.23	S5	F1	354	2.549	31.33		
	B2	35	1.549	35.75		F2	354	2.549	31.42		
	B3	35	1.549	36.69		F3	354	2.549	31.33		
C0	D10			Undetermined	C0	H10			Undetermined		
	D11			Undetermined		H11			Undetermined		
	D12			Undetermined		H12			Undetermined		

Campioni												
Copie MON40-3-2						Copie Lectina						Risultat
	Well	Ct	N. copie			Well	Ct	N. copie				
CII	B4	3148	633.47	Media	638.23	F4	22.75	110825.55	Media	109845.55	%	0.58
	B5	3145	646.16	Dev.St.	6.91	F5	22.73	112927.30	Dev.St.	3671.19	SD %	0.02
	B6	3148	635.07	Dev.St. re	1.08	F6	22.82	105783.81	Dev.St. re	3.34	Dev st. re	3.51





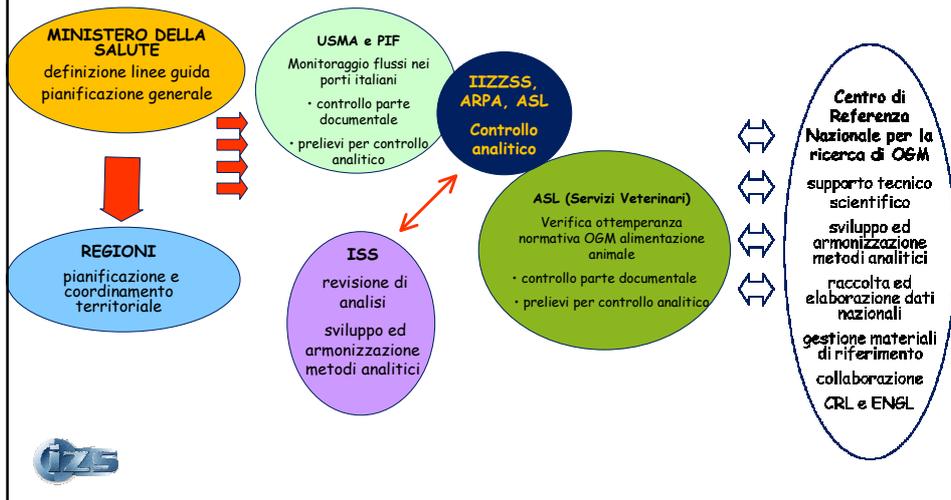
SPECIE VEGETALE	Eventi	P35S	NOS	NPTII	PAT	CP4-EPSPS
→	3272	-	+	-	-	-
→	BT10	+	+	-	+	-
→	BT11	+	+	-	+	-
→	BT176	+	-	-	-	-
→	DAS1507	+	-	-	+	-
→	DAS59122	+	-	-	+	-
→	GA21	-	+	-	-	-
→	MIR604	-	+	-	-	-
→	MON810	+	-	-	-	-
→	MON863	+	+	+	-	-
→	M863xM810	+	+	+	-	-
→	MON89034	+	+	-	-	-
→	MON88017	+	+	-	-	+
→	NK603	+	+	-	+	+
→	T25	+	-	-	+	-
→	98140	+	-	-	-	-
→	MIR162	-	+	-	-	-
→	LY038	-	-	-	-	-
→	DAS-59132-8	+	-	-	+	-
→	A2704	+	-	-	+	-
→	A5547	+	-	-	+	-
→	DP-305423	-	-	-	-	-
→	DP-356043	+	-	-	-	-
→	MON40-3-2	+	+	-	-	+
→	MON89788	-	-	-	-	-
→	MON87701	-	-	-	-	-

Campione 1
P35S -
Nos +
NPTII -
Pat -
CP4EPSPS -

Campione 2
P35S +
Nos +
NPTII +
Pat -
CP4EPSPS -



Il controllo ufficiale



Prospettive future

Nuovi OGM
&
Nuove tecniche per la
modificazione genetica
di organismi viventi



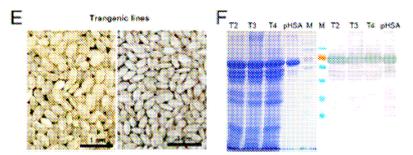


OGM UTILIZZATI COME BIOREATTORI PER LA PRODUZIONE DI FARMACI:



mAb anti HIV in piante di tabacco clinical trial fase 1 (June Pharma-Planta, UK).
JL Fox. (2011) Nature Biotechnology, 29(10) p852

Albumina umana da riso GM per applicazioni clinica e colture cell in alternativa a quella estratta da siero.
Y He et al. (2011) PNAAS



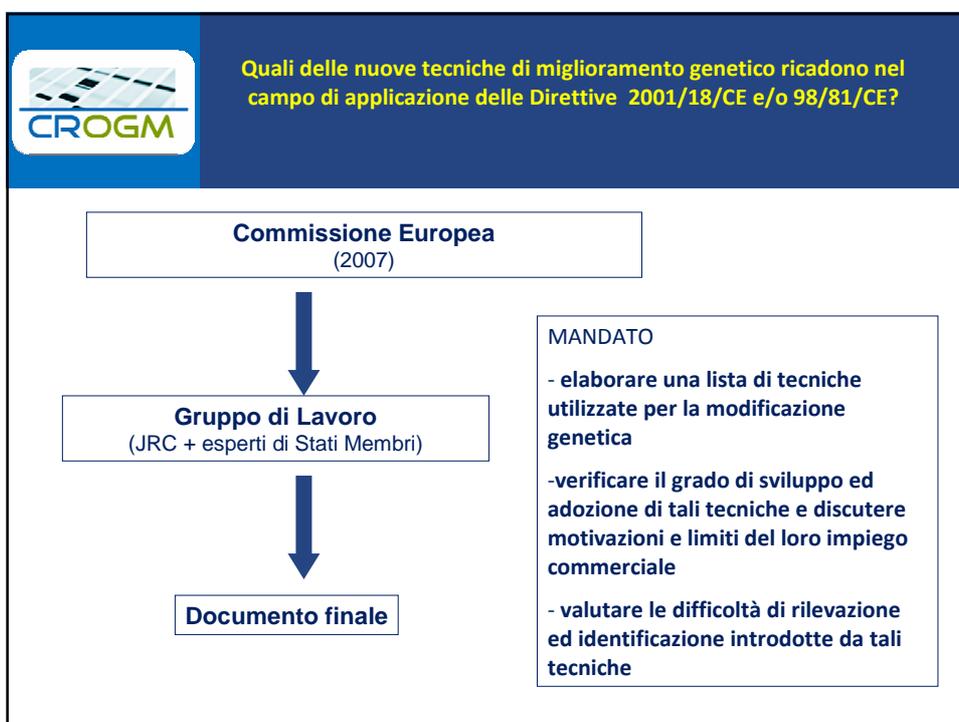
OGM IN ACQUACOLTURA

- a) to enhance growth and/or efficiency of food conversion,
- b) to enhance commercially significant flesh characteristics,
- c) to control reproductive activity and/or sexual phenotype,
- d) to increase resistance of species to pathogens/parasites,
- e) to increase tolerance to/of environmental variables such as temperature,
- f) to modify behaviour, e.g. aggression, and
- g) to control fertility and/or viability.

Table 1. Aquatic species in which GMOs have been induced

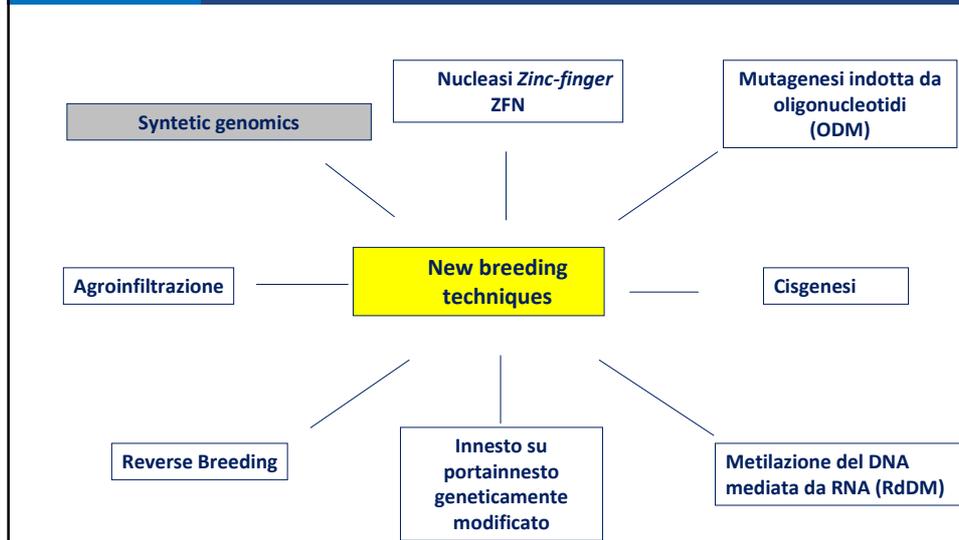
Common name	Latin name	Number of constructs employed to generate transgenics
Fish		
Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	6
Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	4
Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	3
Tilapia	<i>Oreochromis spp.</i>	12
Morone	<i>Oreochromis latipes</i>	17
Zebrafish	<i>Braconichthys raxwori</i>	14
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	14
Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	9
African catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	1
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7
Common roach	<i>Oncorhynchus alpestris</i>	1
Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	5
Scorpaenidae	<i>Scorpaenidae</i>	2
Sea bream	<i>Lateolabrax japonicus</i>	2
Red Sea bream	<i>Diplodus serra</i>	1
Blue sea bream	<i>Mullus barbatus</i>	1
Walleye	<i>Stizostedion vitreum</i>	1
Others		
Brown shrimp	<i>Litopenaeus setiferus</i>	1
Seaweed	<i>Enteromorpha flexilis</i>	1
Sea Urchin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1
	<i>Arbacia lixula</i>	
	<i>Haliotis rufescens</i>	1







NUOVE TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO



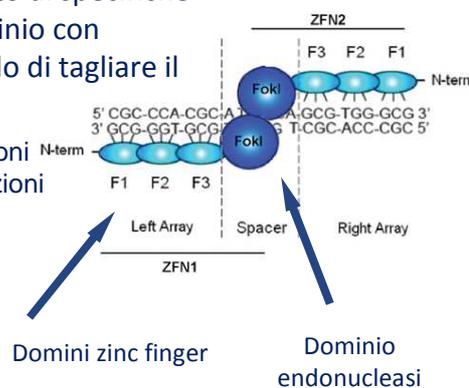
Zinc finger nuclease (ZFN) technology

Le nucleasi zinc finger sono costituite da alcuni domini di riconoscimento di specifiche sequenze di DNA e da un dominio con attività endonucleasica in grado di tagliare il DNA a doppio filamento

ZFN-1: Induce delle brevi interruzioni nel DNA con generazione di mutazioni

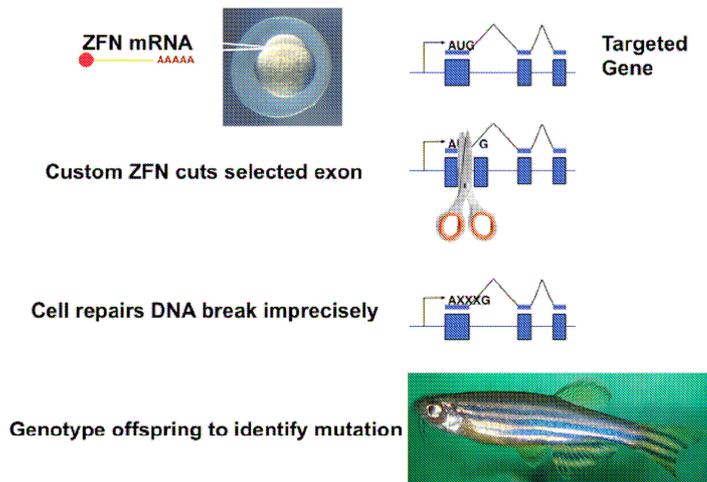
ZFN-2: Mutagenesi mirata con introduzione di piccole molecole di DNA complementare al target, induzione di piccole mut.

ZFN-3: Come ZFN-2 ma il DNA esogeno inserito è di alcune kb





Silenziamento di un gene mediante nucleasi zinc finger ricombinante

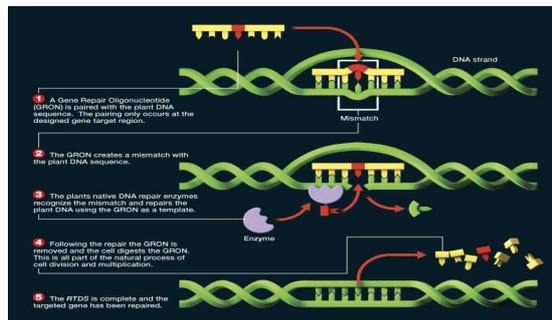


Stephen C. Ekker ZEBRAFISH Volume 5, Number 2, 2008



Mutagenesi indotta da oligonucleotidi (ODM)

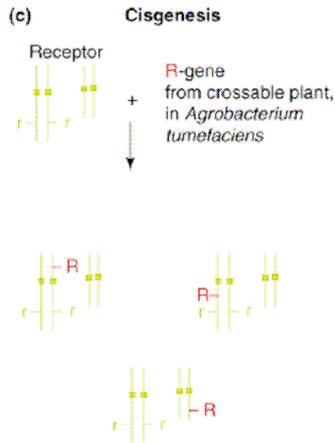
Gli oligonucleotidi legandosi al DNA modificano una sequenza di DNA (mutazioni puntiformi sito specifiche nel genoma della pianta indistinguibili a livello molecolare dalle mutazioni spontanee e da quelle indotte con mutageni fisici o chimici).



Questa tecnica non introduce nuovi geni attraverso la tecnologia del DNA ricombinante



Cisgenesi



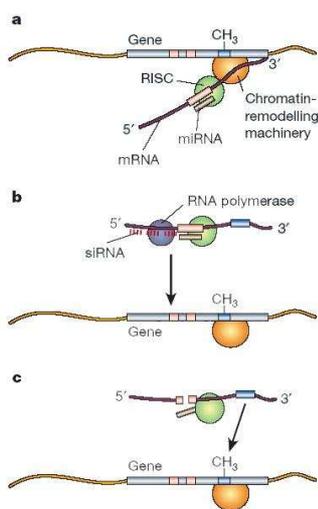
Modificazione genetica di una pianta ricevente effettuata con un gene proveniente da una pianta donatrice di specie sessualmente compatibile.

Le piante cisgeniche possono portare uno o più cisgeni, ma non contengono transgeni.

La cisgenetica differisce dalla transgenetica poiché rispetta le barriere riproduttive pur avvalendosi della tecnologia del DNA ricombinante



Metilazione del DNA mediata da RNA (RdDM)



Processo epigenetico naturale di regolazione della trascrizione di un gene.

Consiste nella metilazione di citosine presenti nel promotore del gene

L'inibizione dell'espressione di un gene mediante la metilazione del DNA bersaglio può essere indotta introducendo artificialmente sequenze di DNA codificanti specifici frammenti di RNA di piccole dimensioni (micro RNA e short interfering RNA).

La metilazione del gene è ereditabile ma non è stabile.

E' possibile selezionare progenie priva di DNA esogeno.

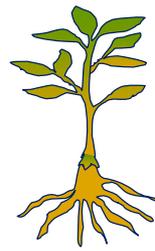


Innesto su portainnesto geneticamente modificato

Una marza (epibionte) non modificata viene innestata su un rizoma (ipobionte) geneticamente modificato per la resistenza a malattie (virus o funghi).

L'epibionte non sarà transgenico, e di conseguenza neanche polline, semi e frutti che ne derivano.

Alcuni metaboliti, proteine, ed RNA possono tuttavia essere trasportati attraverso il sistema vascolare dall'apparato radicale al resto della pianta.

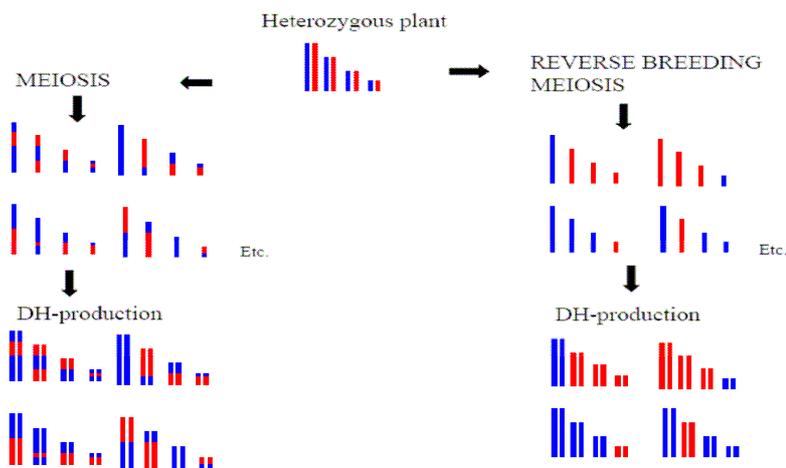


epibionte non GM

ipobionte GM



Reverse Breeding



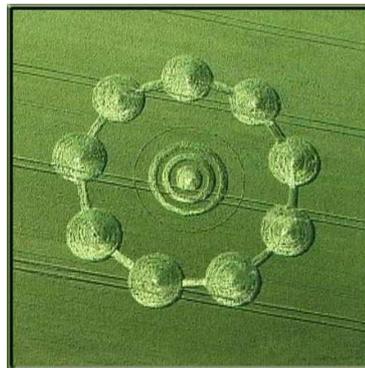


Agroinfiltrazione

Infiltrazione meccanica mediante siringa di un costrutto genico direttamente nel tessuto vegetale (generalmente foglia).

Espressione locale e transiente molto elevata.

Utile per verificare in modo economico l'effetto sulla pianta dell'espressione del gene d'interesse.



GRAZIE