



Identificazione di OGM in alimenti e mangimi: aggiornamenti

27/10/2021

Davide La Rocca
Katia Spinella



Agenda

- ❑ Come sono identificati gli OGM
- ❑ Sequenziamento degli OGM
- ❑ Illustrazione progetto in corso (CA1)
 - ❑ Obiettivo
 - ❑ Wet Lab
 - ❑ Dry Lab
 - ❑ Avanzamenti in letteratura
- ❑ Conclusioni vantaggi e svantaggi NGS



Come sono identificati gli OGM?



Come sono identificati gli OGM?

Fasi Cruciali:

- Rilevazione endogeno
- Screening OGM
- Tipizzazione
- Quantificazione

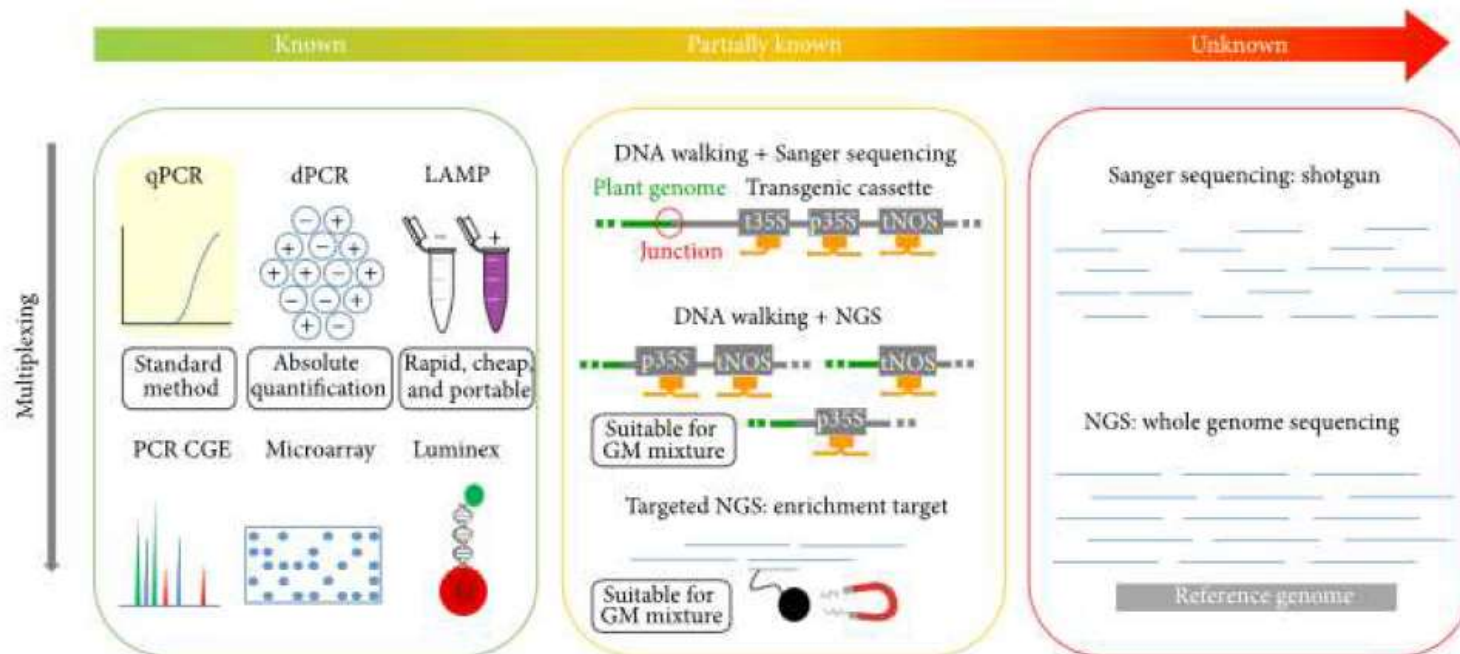


Problematiche legate al flusso analitico in qPCR per la ricerca di OGM

- ❖ Specie GM contaminanti non dichiarate in etichetta
- ❖ Presenza di organismi donatori (es. virus CaMV)
- ❖ Low-throughput
- ❖ Necessaria conoscenza a priori della sequenza target
- ❖ Presenza di eventi GM non autorizzati



Overview degli approcci analitici per gli OGM



Fraiture et al, 2015



NGS e applicazione nel campo degli OGM

- **Caratterizzazione molecolare di:**

- Eventi OGM singoli/multipli
- Nuove piante OGM
- Campioni misti

- **Sviluppo di nuovi metodi di sequenziamento per:**

- Determinare la composizione di un campione (identificazione specie vegetali)
- Rilevare la presenza di OGM in un campione
- Quantificare gli OGM presenti nel campione

- **Sviluppo di nuovi saggi di Real time PCR per la routine diagnostica basati sulle conoscenze acquisite tramite le analisi in NGS**



Caratterizzazione molecolare tramite WGS

Sono necessarie:

- piattaforme NGS ad elevata resa (genomi vegetali di grandi dimensioni)

Specie vegetali di interesse OGM	Dimensione genoma (H)
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	372 Mb(diploide)
Lino (<i>Linum usitatissimum</i>)	373 Mb (diploide)
Riso (<i>O. sativa</i> L. ssp <i>japonica</i>)	385 Mb (diploide)
Barbabietola (<i>Beta vulgaris</i>)	758 Mb (diploide)
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	840 Mb (autotetraploide)
Soia (<i>Glycine max</i>)	1115 Mb (diploide)
Colza (<i>Brassica napus</i>)	1235 Mb (allotetraploide)
Cotone (<i>Gossypium hirsutum</i>)	2250 Mb (allotetraploide)
Mais (<i>Zea mays</i>)	2300 Mb (diploide)
Fumento (<i>Triticum aestivum</i>)	16000 Mb (alloesaploide)

- Infrastrutture informatiche ad elevata potenza di calcolo e in grado di archiviare grandi moli di dati
- Competenze di bioinformatica e biostatistica per la realizzazione e la gestione dei software di analisi dei dati di sequenza



Progetto in corso al CROGM

Convenzione Attuativa 1 (CA1)

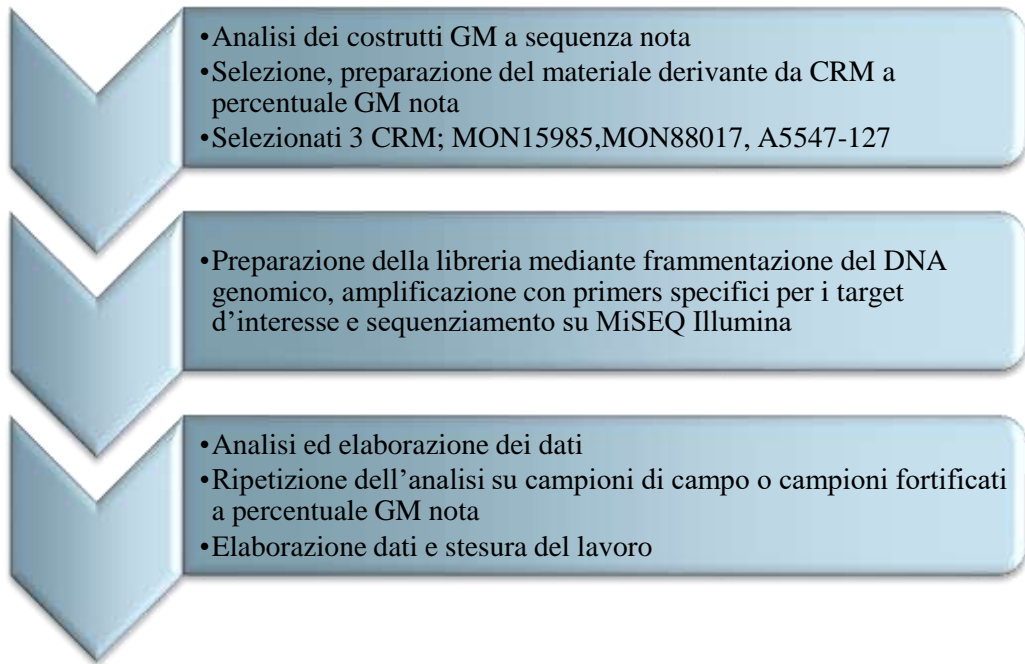


Obiettivo

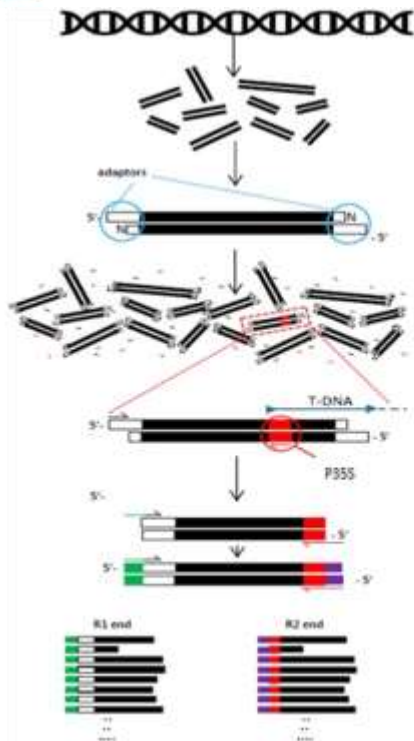
- Sviluppo di una strategia analitica partendo da elementi genici comunemente ricercati in fase di screening, ad esempio il promotore costitutivo del virus del mosaico del cavolfiore *CaMV-35S (p35S)* per caratterizzare il costrutto e l'insert site del DNA esogeno all'interno del genoma della specie ospite.
- Sviluppo di saggi in real-time PCR per la rilevazione e quantificazione nei prodotti commerciali di questi nuovi eventi caratterizzati.



FASI DEL PROGETTO



Protocollo di pre-arricchimento



1. Isolamento delle regioni genomiche contenenti elementi noti

2. DNA WALKING: Sequenziamento e caratterizzazione delle sequenze fiancheggianti



Esperimento pilota

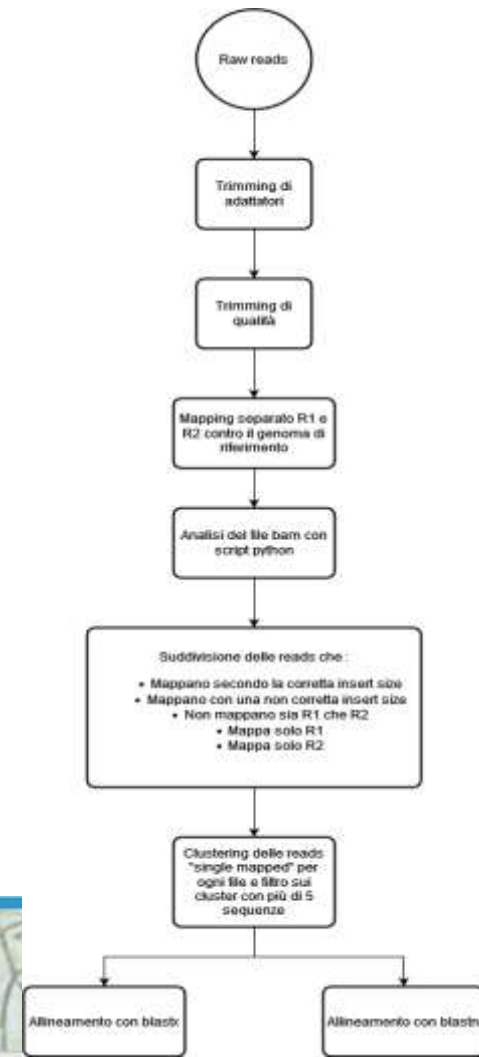
materiale derivante da CRM a percentuale GM nota

Specie vegetale	Evento GM	metodo di trasformazione	Numero promotori 35S
cotone	MON15985 (MON531+ MON15987)	Biolistic+Agrobacterium	4
mais	MON88017	Agrobacterium tumefaciens	1
soia	A5547-127	biolistic method	1

- ❖ Appaiamento perfetto con l'oligonucleotide selezionato
- ❖ Presenza di una o più copie del promotore p35S a singolo o doppio enhancer
- ❖ Disponibilità della sequenza di riferimento dell'inserto transgenico con le regioni genomiche fiancheggianti
- ❖ Appartenenza a diverse specie vegetali per testare la risposta dei DNA genomici alla sonicazione
- ❖ Disponibilità di materiale di riferimento certificato 100% GM.



Dry Lab



Dry Lab

A seguito di eventuali inserzioni multiple del costruito GM o di parti del costruito nel genoma host, risulta difficile ritrovarsi le sequenze mappate solo in un cromosoma. Perciò bisogna andare direttamente sugli allineamenti e recuperare le coppie di sequenze che abbiano un'adequata insert size



Dry Lab

Le sequenze “single mapped” ovvero le reads R1 che risultano mappate mentre le corrispondenti R2 no, e viceversa, potrebbero darci informazioni sulle porzioni che sono tra l’evento GM e il genoma host



Dry Lab

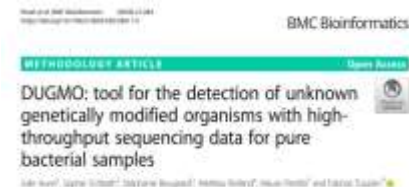
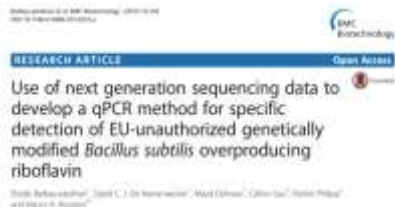
Si effettuano due ricerche con blast:

- Una per valutare la presenza di proteine che potrebbero essere state aggiunte
- L'altra per valutare non solo la porzione codificante, ma anche quella non



MOGM cosa sono?

I MOGM sono Microrganismi geneticamente modificati (MOGM)



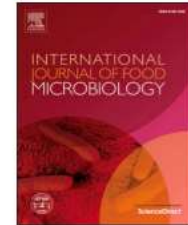
Avanzamenti in letteratura



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



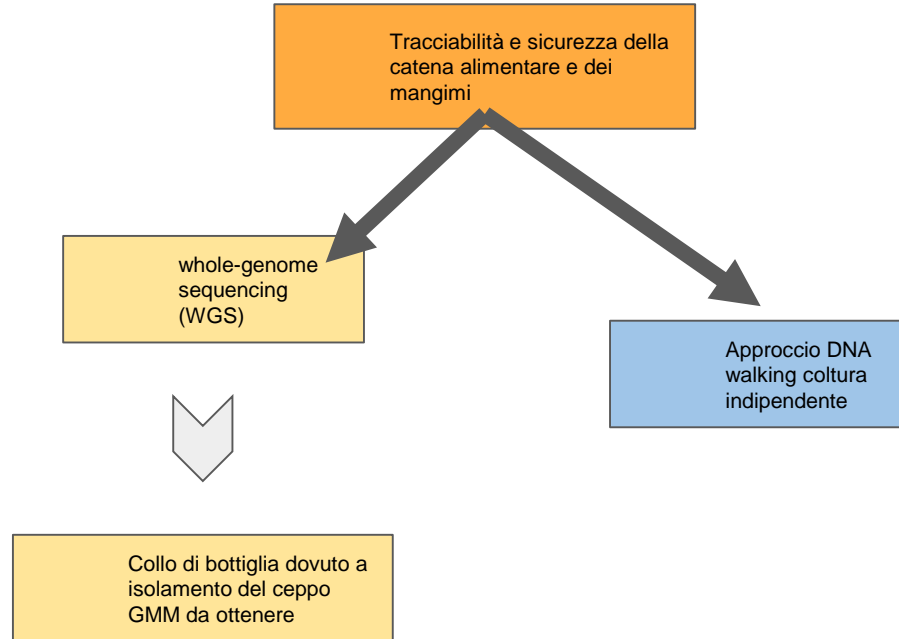
DNA walking strategy to identify unauthorized genetically modified bacteria in microbial fermentation products

Marie-Alice Fraiture, Nina Papazova, Nancy H.C. Roosens^{*}

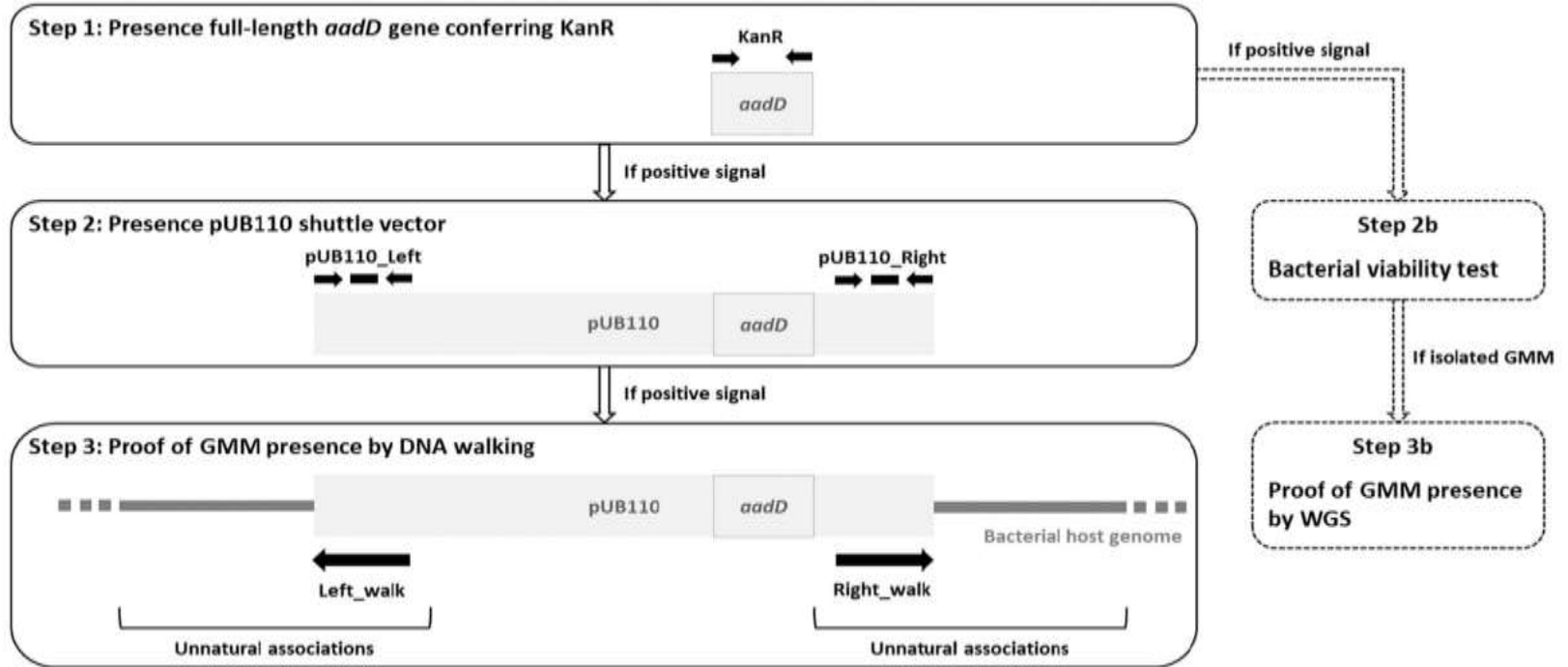
Sciensano, Transversal activities in Applied Genomics (TAG), J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussels, Belgium



Avanzamenti in letteratura



Avanzamenti in letteratura

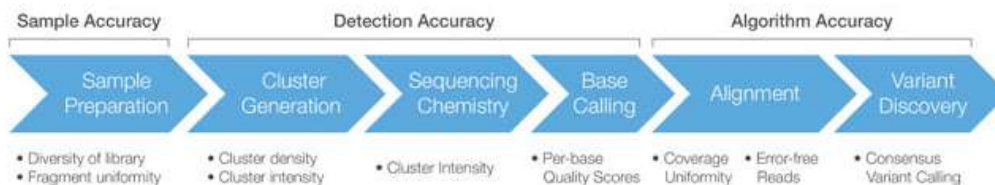


Contributo NGS

Caratterizzare in maniera più approfondita il campione ampliando il numero di bersagli molecolari analizzati:

- Ricercare più specie vegetali
- Ricercare più elementi di screening
- Identificare nuovi eventi GM non autorizzati
- Analizzare i genomi delle specie vegetali di interesse OGM
- Per identificare nuovi geni endogeni

Aspetti da considerare:



Factors that Contribute to Platform Accuracy



Grazie a tutti per l'attenzione

