Pubblicato su: SPVet.it - ISSN 1592-1581 (http://spvet.it/; http://indice.spvet.it); Numero 75/2012

XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Sorrento (NA), 24-26 Ottobre 2012

TIPIZZAZIONE OGM:

MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI METODI IN FAST PCR REAL-TIME

Pierboni E., Curcio L., Madeo L., Tovo G., Rondini C.*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

INTRODUZIONE

Il continuo aumento di OGM autorizzati determina la necessità da parte dei Laboratori preposti al controllo ufficiale, di adottare e validare costantemente nuove metodiche. Nel presente lavoro sono state scelte tecniche in PCR Real-time per la rilevazione di mais GM DAS59122 (7), MIR 604 (6), T25 (5) e soia GM MON89788 (9) e A2704-12 (8), ottimizzate e validate in modalità Fast, utile per la riduzione dei costi e dei tempi.

MATERIALI E METODI

Messa a punto metodo

Per ogni evento: è stato utilizzato DNA estratto o fornito da Materiale di Riferimento Certificato (0.1% o diluito allo 0.9%); si è eseguita l'ottimizzazione della concentrazione dei primers testando tre diverse concentrazioni combinate tra loro, in quadruplice copia; sono state verificate cinque concentrazioni crescenti di ogni probe, in quattro replicati (100nM, 150nM, 200nM, 250nM, 300nM).

Metodi Fast PCR Real-Time

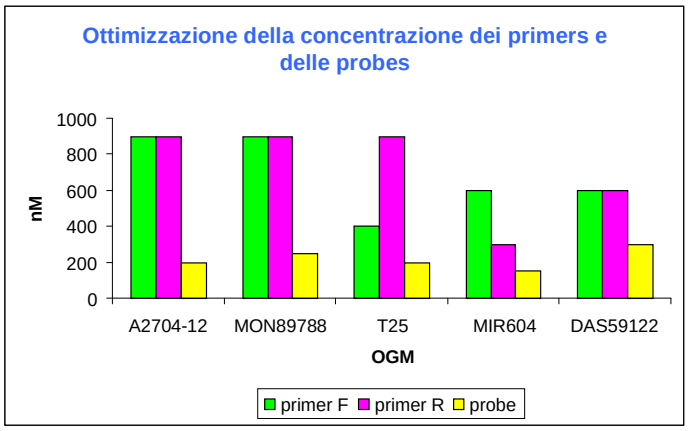
Tutte le prove sono state ottimizzate su piattaforma Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System in modalità Fast, utilizzando una concentrazione finale di TaqMan® Universal Fast PCR Master Mix 1x in un volume finale di 20 µL ed adottando il seguente profilo di amplificazione: stage 1 a 95°C per 20 secondi, stage 2, composto dal primo step a 95°C per 1 secondo e dal secondo step a 60°C per 20 secondi, ripetuto per 40 cicli.

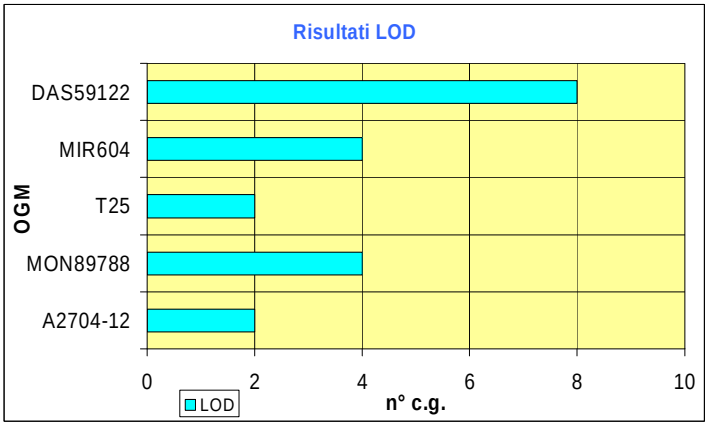
Validazione di Fast PCR Real-Time

Per la validazione di ogni metodo sono state testate la sensibilità, la specificità, la robustezza ed il LOD.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dall'ottimizzazione della concentrazione dei primers e delle probes per ogni singolo evento sono mostrati di seguito. A parità di quantità di DNA bersaglio utilizzata, la combinazione migliore è stata individuata in base al Ct più basso, un basso scarto tipo ed un alto ΔRn. I risultati per il LOD ottenuti per ogni singolo evento sono espressi in numero di copie genomiche (c.g.) e mostrati di seguito. I parametri di specificità e sensibilità così come quello della robustezza rientrano nei criteri di accettabilità (dati non mostrati).





Dai risultati ottenuti i metodi in Fast PCR Real-Time descritti sono validi per lo scopo stabilito. L'adozione di questa tecnologia apporta reali vantaggi rispetto alla PCR Real-Time in modalità standard, in quanto permette di ottenere risultati in circa un terzo del tempo con costi di reagenti inferiori. Gli obiettivi successivi riguarderanno la validazione e l'accreditamento delle relative prove quantitative, nonché l'estension delle analisi di tipizzazione ad altri eventi autorizzati e ad altre specie vegetali oltre a mais e soia.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1) http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.html
2) http://ec.europa.eu/food/dyna/gmregister/indexen.cfm
3) ISO 21571:2005 (Annex A.3 e B.1).
4) Kodama et al. Journal of AOAC International Vol. 93, No. 2 (2010). "Tendency for Interlaboratory Precision in the GMO Analysis Method Based on Real-Time PCR".
5) Protocol Community Reference Laboratory (CRL), Document Approval 15/06/2005. "Event-specific method for the quantitation of maize T25 using real-time PCR".
6) Protocol Community Reference Laboratory (CRL), Document Approval 04/04/2007. "Event-specific method for the quantitation of maize line MIR604 using real-time PCR".
7) Protocol Community Reference Laboratory (CRL), Document Approval 11/10/2005. "Event-specific method for the quantitation of maize 59122 using real-time PCR".
8) Protocol Community Reference Laboratory (CRL), Document Approval 14/05/2007. "Event-specific method for the quantitation of soybean line A2704-12 using real-time PCR".
9) Protocol Community Reference Laboratory (CRL), Document Approval 27/02/2008. "Event-specific method for the quantitation of soybean line MON89788 using real-time PCR".
10) Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 733/7500 Real-Time PCR Systems "Chemistry Guide".
11) Regolamento (CE) N. 1829/2003. G.U. (UE) L 268, 1-23.
12) Regolamento (CE) N. 1830/2003. G.U. (UE) L 268, 24-28.
13) Verification of analytical methods for GMO testing when complementing interlaboratory validated methods, ENGL 2011 (ISBN 978-92-79-19925-7).
14) Zel J., et al. (2012) Springer Briefs in Food, Health and nutrition pagg.75-82 (ISBN 978-1-4614-1389-9). "How to reliably test for GMOs".

* Ricerca Corrente MINSAL IZSUM 2010 - Ampliamento ed evoluzione della filiera analitica relativa agli OGM: messa a punto e validazione di prove in Fast PCR Real-Time per la rilevazione e la quantificazione di organismi transgenici non ancora e/o recentemente approvati in Europa.

Stampato a cura dell'Unità Operativa di Supporto Biblioteca, Informazione, Editoria (2012).

Quest'opera è stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.
Per leggere una copia della licenza visita il sito web http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/ o spedisci una lettera a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.