BIOTECNOLOGIE

Prime applicazioni dell'analisi PCR quantitativa nel controllo degli Organismi Geneticamente Modificati

G.L. Bianchi,
E. Ferrari,
S. Fior
G. Quagliaro,
S. Tolomio

ERSA
Servizio Chimico Agrario e della Certificazione

Nonostante il divieto all'uso di piante transgeniche, anche per il comparto agricolo, come per il settore alimentare, esiste un problema di contaminazione accidentale da Organismi Geneticamente Modificati (OGM) a carico delle sementi tradizionali impiegate nel nostro territorio.

Dal 1999 l'ERSA ha impegnato numerose risorse per costituire un Laboratorio di Biotecnologie in grado di:

- fornire un adeguato servizio di analisi a favore degli imprenditori agricoli;
- svolgere un'attività sperimentale per il monitoraggio della qualità del materiale di propagazione.

Il primo passo per la realizzazione di questo obiettivo è stato lo sviluppo delle tecniche di analisi in forma qualitativa in linea con gli aggiornamenti provenienti dal modo scientifico.

A partire dal 2001, dopo il perfezionamento delle tecniche sopracitate, sono iniziate le prove per lo sviluppo dei metodi quantitativi di riconoscimento delle piante transgeniche nell'ambito del progetto sperimentale per il monitoraggio della qualità delle sementi.

Questa scelta si è resa necessaria per adeguare le capacità operative del laboratorio alle norme in corso di discussione a livello europeo relative all'introduzione di soglie di contaminazione accidentale degli OGM anche a carico delle sementi tradizionali.

In questa pubblicazione sono descritti i principi generali dell'analisi quantitativa mediante Real-Time PCR (PCR=Polymerase Chain Reaction) e delle procedure ad essa correlate.

Le analisi per il riconoscimento di OGM sono state effettuate utilizzando la tecnica Real Time PCR che, a differenza della PCR qualitativa, permette la verifica in tempo reale della reazione e la definizione di una serie di parametri che permettono poi di determinare la percentuale di contaminazione di un campione.

La procedura di analisi prevede un campionamento, eseguito secondo alcuni criteri, e l'estrazione del DNA dal campione che deve essere sottoposto ad amplificazione.

Il riconoscimento di un OGM non avviene mediante una elettroforesi in gel di agarosio, come nella PCR qualitativa, ma in base ad una misura strumentale di fluorescenza emessa, quantificabile e visualizzabile graficamente.

Il campionamento

L'approccio seguito per definire i criteri di campionamento si basa sul principio che non è possibile stabilire se un lotto di semente oggetto di studio è esente da contaminazioni da OGM senza sottoporre a test tutti i semi che formano la partita da controllare.

E' invece possibile definire la dimensione del campione da sottoporre ad analisi per dimostrare che un lotto di semente, risultato negativo al controllo, presenta una percentuale di contaminazione inferiore ad una soglia predefinita di accettabilità o tolleranza.

Nel caso in cui la percentuale di contaminazione di un lotto è bassa, inferiore al 10%, e la popolazione (seme) è molto grande, la probabilità di trovare un campione di semente contaminato da OGM segue la distribuzione di Poisson.

In base a questa distribuzione è possibile definire la probabilità di trovare almeno un campione di seme positivo in funzione dei seguenti parametri:

- Dimensioni (taglia) del campione (N);
- Numero di campioni saggiati (k);
- Infezione reale del lotto di seme ovvero la soglia di tolleranza ammessa (I);
- Probabilità di avere una contaminazione in un campione (Pc): $Pc = 1-e^{-NI}$;
- Sensibilità del metodo di analisi ovvero la probabilità di rilevare la contaminazione in un campione (Ps);

In base alla distribuzione di Poisson la probabilità di avere un risultato positivo dall'analisi di un campione (Pd) è il prodotto di due probabilità: Pc x Ps.

Fissato k, la probabilità di avere almeno un risultato positivo (P+) è uguale a $1-(1-Pd)^k$.

Considerato che attualmente non è stata ancora fissata per legge una soglia di tolleranza per le sementi e che l'orientamento è quello di abbassare il limite per gli alimenti dall'1% allo 0,5%, nell'impostazione del campionamento si è deciso di adottare quest'ultimo valore come soglia di tolleranza ammissibile (I).

Con queste premesse, si è scelto di effettuare il monitoraggio della qualità delle sementi con l'analisi su 2 campioni di 500 semi, verificato che nelle nostre condizioni sperimentali Ps è stato determinato pari a 1.

Con questi criteri la probabilità di trovare almeno un campione positivo sui due saggiati è risultata essere pari al 99,33%, valore giudicato adeguato per gli scopi sperimentali prefissati.

Le procedure di estrazione degli acidi nucleici

Il primo passo per l'applicazione della tecnica PCR è l'estrazione del DNA genomico della pianta. Esistono diversi protocolli che possono essere applicati direttamente da ogni laboratorio ed anche altri metodi che richiedono l'acquisto di specifici kit presso ditte private.

Spesso i kit in commercio presentano il vantaggio di essere più rapidi, riducendo la durata del ciclo di estrazione, e di garantire una maggiore qualità del DNA estratto anche se a fronte di un maggior costo e di una minore resa finale.

Nel caso di un monitoraggio finalizzato prima alle analisi di screening e successivamente a quelle quantitative da svolgere su centinaia di campioni in tempi relativamente brevi, le esigenze analitiche sono diverse e superiori a quelle di un semplice test qualitativo.

Pertanto, presso il laboratorio di Biotecnologie è stato perfezionato un metodo di estrazione avente le seguenti caratteristiche:

- Elevata resa finale;
- Buona qualità del DNA ottenuto (scarsa degradazione, buon rapporto 260/280);
- Rapidità di esecuzione;
- Economicità;
- Capacità di processare contemporaneamente molti campioni.

Il processo, che può essere suddiviso in vari passaggi, inizia con l'omogeneizzazione del campione di semente, preventivamente congelato con azoto liquido (-160 °C) e macinato a polvere fine con un omogeneizzatore, con una soluzione in grado di estrarre gli acidi nucleici dal nucleo e dalla cellula vegetale. Il passaggio successivo si basa sull'uso combinato di solventi, quali Fenolo e Cloroformio/Alcool Isoamilico 24:1, per la separazione delle proteine che possono causare, tramite la frazione enzimatica, la degradazione del DNA. In questa fase la frazione proteica viene fatta precipitare mediante centrifugazione ad alta velocità, mentre il DNA resta in soluzione e viene recuperato.

Nelle fasi successive gli acidi nucleici vengono prima complessati per mezzo di una resina costituita da silice-magnetite che si lega specificamente al DNA.

Successivamente il complesso DNA-silice-magnetite viene separato rapidamente dalle altre frazioni solubili tramite un magnete.

Il DNA estratto viene quindi sottoposto a lavaggi con Etanolo prima di essere definitivamente eluito dalla silice-magnetite per mezzo di acqua distillata.

La quantificazione dell'estrazione viene eseguita mediante spettrofotometro ed eventualmente anche con corsa su gel di agarosio al 2% (Fig. 1).

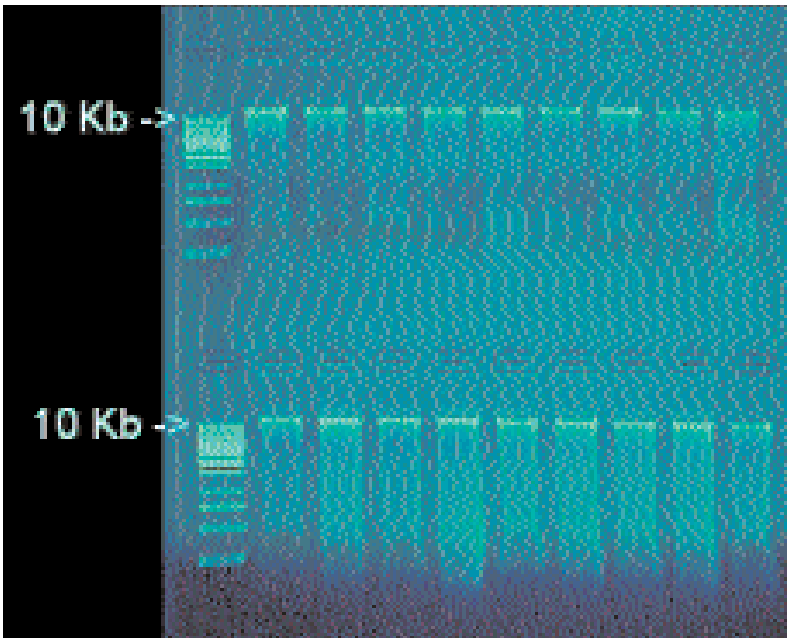


Fig. 1 - Gel elettroforesi di DNA estratto da farina di mais con il metodo Silice-Magnetite

ERSA_5_02_47_58.qxd 11/12/2002 16.09 Pagina 57

La Real-Time PCR

Il principio della tecnica

La PCR si basa sull'impiego di un enzima, la Taq Polimerasi, che catalizza la reazione di amplificazione in vitro di una particolare sequenza di DNA a partire da una frazione di acido nucleico che viene utilizzato come stampo.

Nel caso della Real Time PCR è anche possibile monitorare l'andamento della reazione mentre è ancora in svolgimento ed i dati che si ottengono a fine ciclo si possono utilizzare per effettuare una quantificazione relativa del frammento amplificato. Questo è possibile tramite l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione PCR. La fluorescenza emessa in seguito ad uno specifico irraggiamento da parte della sorgente luminosa del termociclatore viene quindi misurata in tempo reale da una telecamera CCD. Tutti le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da personal computer.

La Real Time PCR si può realizzare mediante l'impiego di coloranti intercalanti (es. SYBR green), che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA, oppure con sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento amplificato del transgene ricercato, marcate con molecole fluorescenti.

Esistono diverse tipologie di sonde ma in questo lavoro sono presentati i risultati della sperimentazione svolta mediante l'uso di sonde TaqMan.

La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del transgene da amplificare. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher".

In una configurazione di questo tipo la molecola "Quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del "Reporter": Nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, quando l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda effettua il distacco del "Reporter". In questo modo il fluoroforo va in soluzione, non subisce più l'inibizione del "Quencher" ed emette fluorescenza (Fig. 2). In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione.

Il protocollo di analisi

L'amplificazione è stata effettuata utilizzando un termociclatore della ditta Bio-Rad mod. Icycler provvisto di gruppo ottico per la misura della fluorescenza.

Fig. 2 - Ciclo della Real Time PCR con sonde TaqMan

Per la preparazione delle miscele di reazione è stato utilizzato il Supermix-UDG Platinum qPCR 2X della ditta Invitrogen-Life Technologies, provvisto di enzima Uracyl-N-Glycosilasi per prevenire le contaminazioni incrociate.

I primers e le sonde sono stati sintetizzati dalla MWG-Biotech in base a sequenze ricavate dalla bibliografia o tramite ricerche svolte direttamente dal Laboratorio di Biotecnologie nei database disponibili in internet.

Attualmente sono utilizzate diverse sonde per l'amplificazione dei geni endogeni Zeina del Mais e Lectina della Soia, per il promotore 35S e per i transgeni Roundup Ready, BT176, Bt11, Mon810 e T25.

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in triplo sia per gli standard che per i campioni con un volume finale di reazione di 25 ❍l (❍l=microlitro, 1 ❍l=10^{-6} litri) ed una quantità di DNA compresa tra 50 e 100 ng. I primers e le sonde sono stati impiegati a concentrazioni variabili da 0,2 fino a 0,5 ❍M.

Il ciclo di amplificazione prevede una prima fase di 3 minuti a 50 °C per l'attivazione dell'enzima Uracyl-N-Glycosilasi, una seconda fase di 3 minuti a 95 °C per denaturare l'UNG ed attivare la Taq Polimerasi e poi una successione di 50 cicli, costituiti da 15 secondi di denaturazione a 95 °C e da una fase di appaiamento ed estensione di 1 minuto a 62 °C, nei quali avviene la misura della fluorescenza emessa.

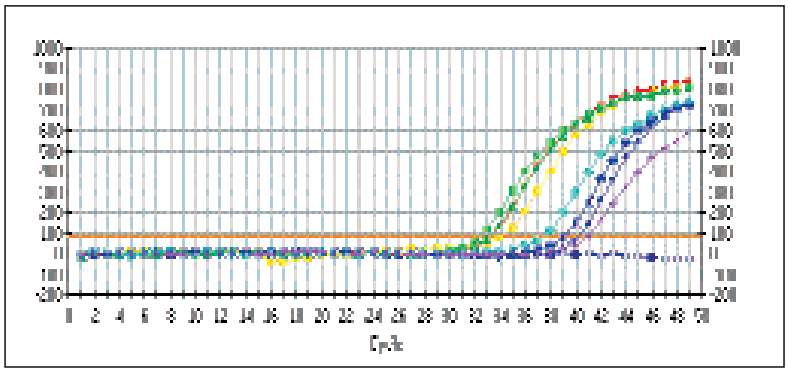


Fig. 3 - Grafico della Real Time PCR

Fig. 4 - Retta di taratura dello standard

L'elaborazione dei dati analitici

La curva di amplificazione di un prodotto PCR è solo teoricamente esponenziale, ma in realtà, dopo la prima fase, assume un andamento rettilineo che progressivamente raggiunge un valore massimo al quale tendono tutti i campioni, a prescindere dalla quantità di DNA di partenza (Fig. 3).

Nello studio di un grafico di PCR vengono definiti tre parametri:

- La linea base della fluorescenza, che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato;
- La linea soglia, parallela alla linea base, scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale;
- Il ciclo soglia, specifico per ogni campione, identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia.

Il ciclo soglia (Ct=Cycle treshold) è un indice preciso perché esiste una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA.

Il calcolo della percentuale di OGM può essere effettuato mediante l'amplificazione, sia per il gene endogeno che per il transgene, di uno standard a concentrazione nota di DNA che serve per la costruzione di una retta di taratura (Fig. 4) o per ricavare mediante formule la percentuale di OGM nel campione incognito.

Conclusioni

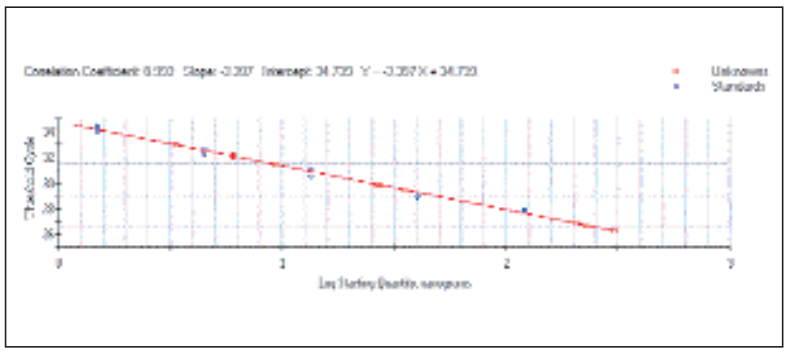
Nel corso del progetto sperimentale di monitoraggio della qualità delle sementi è stata applicata con esito positivo la tecnica Real Time PCR per la quantificazione degli OGM.

Le prove effettuate presso il Laboratorio di Biotecnologie del Servizio Chimico-agrario e della Certificazione dell'ERSA di Pozzuolo del Friuli (UD) rappresentano tuttavia solo il primo passo verso un'applicazione finalizzata ad un'attività di certificazione nell'ambito del comparto agro-alimentare.

Si rende infatti necessario aumentare il bagaglio di esperienze maturate finora in questo settore effettuando ulteriori prove su matrici alimentari, con particolare riferimento alle tecniche di estrazione del DNA da prodotti sottoposti a lavorazioni industriali, dove i trattamenti termici possono determinare una degradazione degli acidi nucleici.

Per quanto riguarda la tecnica quantitativa bisogna inoltre considerare che non esistono al momento dei metodi ufficiali di analisi e che anche gli standard disponibili sul mercato spesso non sono di grande qualità e non sono disponibili per tutti gli OGM che devono essere ricercati.

Il percorso per perfezionare la tecnica è appena iniziato ma l'inserimento dell'ERSA nell'ambito del gruppo di lavoro nazionale coordinato dall'Istituto Superiore della Sanità (ISS) per la validazione dei protocolli di analisi degli OGM è la migliore garanzia per il miglioramento delle capacità operative del Laboratorio di Biotecnologie in linea con gli sviluppi del mondo della ricerca.



Bibliografia

Screening method for the identification of genetically modified organisms (GMO) in food. DG JRC, Environment Institute, Consumer Protecion & Food Unit.

Hemmer, W. (1997) Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS. Disponibile in Internet al sito: www.bats.ch/abstr/297intro.htm

Maniatis, T., Fritsch, E. F.,& Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

G.L. Bianchi, S. Peressini. (2000) Prime applicazioni di biotecnologie per il riconoscimento di mais transgenico. Notiziario ERSA 1-2/2000 23-28

Thornton C.G., Hartley J.L., Rashtchian A. (1982) Utilizing uracil dna glycosylase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UDG activity following thermal cycling. Biotechniques 13:180-182

User bulletin #2: ABI prism 7700 sequence detection system, Applied Biosystems, December 110, 1997 (Updated 10/2001)

Technical note No. LC11/2000, Roche Molecular Biochemicals, absolute quantification with external standards