

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dipartimento di Scienze Ambientali

Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE

XXIII CICLO

2008-2010

**METODOLOGIE MOLECOLARI PER L'ANALISI OGM IN
MATRICI ALIMENTARI "FOOD AND FEED"**

Docente Guida:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Dottorando:

Dott. Daniel Campioli

Indice

Riassunto	4
Miglioramento genetico e organismi geneticamente modificati	6
Piante geneticamente modificate (PGM)	7
Miglioramento delle caratteristiche nutrizionali	9
Resistenze agli erbicidi	9
Resistenze a stress biotici	10
Resistenze a stress abiotici	11
Tracciabilità e normativa comunitaria	12
Normativa europea sugli OGM	14
Emissione in ambiente di OGM in Europa	14
Immissione sul mercato europeo di prodotti alimentari contenenti, costituiti o derivati da OGM	15
Etichettatura	16
Normativa italiana	16
“Food Genomics” e tracciabilità molecolare	18
Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti	20
Conservazione del DNA	21
Qualità del DNA e contaminanti	21
Artefatti della PCR	22
Metodi di estrazione del DNA da matrici alimentari	23
Analisi proteica delle matrici alimentari	25
Campionamento di materiale OGM	26
Metodologie per l’analisi di OGM in matrici alimentari	29
Metodi immunologici	29
La Real-Time PCR	32
Chimiche impiegate per la rivelazione dell’amplificato	34
SYBR® Green I	34
Sonde FRET	35
Sonde TaqMan™	36
Molecular beacons	37
Sonde Scorpion™	38
UniPrimer™	38
Sonde LNA™	38
Scopo della ricerca	40
Materiali	42
Metodi	44
Analisi immunologica di farine di soia campionate secondo il software OPACSA (OPTimal ACceptance Sampling by Attributes)	44
Analisi immunologica di farine contenenti mais tramite lateral flow devices (CI-Bt LFD)	46
Estrazione di DNA da foglie	46
Estrazione di DNA da farine e merendine	47

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich).....	48
Wizard®.....	49
Analisi spettrofotometrica del materiale estratto.....	50
PCR qualitativa per lo studio della degradazione del DNA estratto in pellet di mangime	50
PCR qualitativa per la verifica dell'amplificazione del gene endogeno di pomodoro β -fruttosidasi su diverse matrici.....	52
Real-time PCR TaqMan® Simplex su DNA estratto da pellet.....	52
Real-time PCR TaqMan® duplex su DNA estratto da tessuti di pianta di mais.....	53
Real-time PCR SYBR® Greener™ simplex su DNA estratto da campione commerciale e da conserva di pomodoro.....	55
Real-time PCR TaqMan® simplex su DNA estratto da campione commerciale	56
Risultati e Discussione	58
Analisi immunologica di farine di soia campionate secondo il software OPACSA (OPTimal ACceptance Sampling by Attributes).	58
Analisi immunologica di farine contenenti mais transgenico tramite lateral flow devices (CI-Bt LFD).....	60
Studio della qualità del DNA: DNA estratto da pellet di mangime.....	63
Studio dell'amplificabilità del DNA: DNA da pellet di mangime	68
PCR real-time Duplex – Tessuti di pianta di mais.....	71
Tracciabilità OGM – Merendine.....	78
Tracciabilità OGM - Pomodoro	91
Conclusioni e prospettive future	95
Bibliografia	97
Ringraziamenti.....	104

Riassunto

L'evoluzione del mercato mondiale degli organismi geneticamente modificati, e di conseguenza delle normative collegate ad esso, rende necessario uno studio approfondito sulle metodiche di analisi di queste matrici. Le normative di diversi paesi rende obbligatoria la tracciabilità e l'etichettatura dei prodotti alimentari "food and feed" contenenti OGM.

Il lavoro svolto in questo dottorato di ricerca si è quindi basato sullo studio delle metodologie utilizzate per l'analisi di matrici alimentari contenenti OGM, tramite l'applicazione della Food Genomics, intendendo con questo termine l'applicazione degli studi sul genoma degli organismi da cui si ricavano le materie prime per stabilire l'autenticità degli alimenti.

Il primo passo è stato di definire un protocollo d'estrazione del DNA per un'analisi della degradazione del materiale genetico estratto da pellet di mangime, che simulano la composizione del classico mangime ad uso zootecnico, formato da mais, soia, girasole, orzo e crusca. Questi pellet sono stati conservati a temperatura ambiente, 4°C e -20°C al fine di verificare lo stato di degradazione a diverse temperature. Le estrazioni di DNA sono state effettuate con un metodo CTAB specifico per farine, effettuando una prima estrazione a tempo T₀, una seconda dopo 3 settimane, una terza dopo 6 mesi e l'ultima dopo 18 mesi. L'analisi della resa in termini di DNA estratto mostra che l'estraibilità del DNA viene mantenuta per tutte le quattro estrazioni denotando però un calo del materiale estratto con l'avanzare del tempo di conservazione, e che lo si nota soprattutto nelle condizioni di stoccaggio a temperatura ambiente. Lo stesso metodo è stato applicato per l'estrazione di DNA da prodotti commerciali per verificare la presenza di OGM. Per effettuare un altro controllo è stato utilizzato un kit commerciale d'estrazione del DNA da tessuti e apparati di pianta di mais (foglia, brattea, stocco, radici, cariosside, trinciato, ovario), come confronto con il metodo CTAB.

E' stato effettuato un confronto fra le metodiche della Food Genomics con quelle che utilizzano le proteine tramite un'analisi di farine di mais e soia con lateral flow devices. Con la soia si utilizzano dei lateral flow devices commerciali mentre con il mais dei lateral flow devices sviluppati nel progetto COEXTRA. Il confronto dei dati ottenuti dall'analisi proteica con una successiva analisi di PCR, ha confermato che la sensibilità delle lateral flow strip è più ridotta di quelle delle metodologie di PCR.

Il passo successivo è stato di applicare al DNA estratto un'analisi in PCR real-time sulle matrici precedentemente descritte, che è la metodologia d'elezione applicata nel campo della Food

Genomics e dell'analisi di OGM. Nello studio della degradazione del DNA, è stata effettuata una PCR real-time con chimica TaqMan per la verifica dell'amplificazione del gene di mais endogeno zeina, che ha confermato la stabilità e l'amplificabilità del gene nelle varie condizioni analizzate. Con il DNA estratto tramite kit commerciale da vari organi della pianta di mais è stata applicata una PCR real-time duplex con i due geni endogeni zeina e alcol deidrogenasi e il costrutto transgenico Mon810. La PCR real-time duplex è risultata efficace su tutti i tessuti analizzati sia per zeina/Mon810 che per Adh/Mon810.

Per il prodotto commerciale, la verifica della presenza di materiale OGM è avvenuta prima tramite analisi in PCR end-point con primer specifici per i geni endogeni zeina e lectina e per il promotore 35S, comunemente presente nei costrutti transgenici, dando origine per lotti diversi a diversi risultati di amplificazione. I campioni positivi sono stati analizzati successivamente in PCR real-time con chimica e quindi verificati in base alla T_m degli ampliconi ottenuti. Il DNA estratto è stato controllato anche con primer specifici per i costrutti transgenici EPSPS e Mon810 sempre in real-time SYBER[®] Greener[™], confermando la presenza a bassi livelli di materiale transgenico.

Miglioramento genetico e organismi geneticamente modificati

La modificazione del genoma degli esseri viventi da parte dell'uomo viene fatta risalire a circa 14000 anni fa con l'addomesticamento del cane e circa 10000 anni fa con l'addomesticamento delle piante, quali legumi e grano. Le modificazioni genetiche indotte in tal modo sono state però in larga parte inconsapevoli ed è solo a partire dalla prima metà del 1900 che l'uomo ha preso coscienza dell'effetto a livello genetico indotto dai propri programmi di selezione. I metodi utilizzati tradizionalmente per modificare il patrimonio genetico degli esseri viventi sono essenzialmente due: la mutagenesi e l'incrocio. Nei programmi di miglioramento genetico, la frequenza con cui avvengono queste mutazioni viene generalmente amplificata utilizzando radiazioni o agenti chimici mutageni. L'uomo, nei secoli, ha sfruttato la variabilità prodotta dalle mutazioni per selezionare e costruire molte cultivar e razze animali oggi fondamentali per la sua sopravvivenza. L'incrocio è invece una tecnica che permette di unire le caratteristiche presenti in due individui diversi grazie al rimescolamento dei loro genomi sfruttando la riproduzione sessuale. Incroci interspecifici portano a sterilità dell'ibrido, così come nel caso del mulo e del bardotto, ma anche nel caso degli ibridi oggi utilizzati per le produzioni animali e vegetali. Il vantaggio di tale tecnica è la possibilità, una volta identificata fenotipicamente una caratteristica di interesse in una razza o in una varietà, di trasferirla in un'altra attraverso incroci mirati.

Alla mutagenesi e all'incrocio si è aggiunto un nuovo metodo di miglioramento genetico, la produzione di organismi modificati a livello del genoma. Per organismo geneticamente modificato (OGM) si può intendere un organismo il cui materiale genetico è stato alterato con metodologie diverse dalle usuali tecniche di incrocio, consentendo il trasferimento di geni da un organismo ad un altro, anche di specie distanti filogeneticamente. La prima strategia di modificazione del genoma basate sulle tecniche del DNA ricombinante risalgono agli anni 70 del secolo scorso, ad opera di Paul Berg, che costituì in vitro la prima molecola di DNA ricombinante. Nel 1982 la Food and Drug Administration approvò l'uso di insulina prodotta da batteri ricombinanti a scopi terapeutici su uomo. Nel 1981 vennero creati dei topi giganti con l'introduzione di un gene codificante per un ormone della crescita.

Piante geneticamente modificate (PGM)

La prima pianta geneticamente modificata (PGM) è stata prodotta nel 1983 presso i laboratori di genetica dell'Università di Gent, una pianta di tabacco contenente il gene per la resistenza alla kanamicina; mentre l'agricoltura transgenica ebbe inizio in Cina nel 1991 con la coltivazione di piante di tabacco resistenti a virus. Attualmente la produzione mondiale di OGM è concentrata principalmente negli Stati Uniti, seguiti da Argentina, Canada, Brasile, Cina, Australia e Sud Africa (tabella 1).

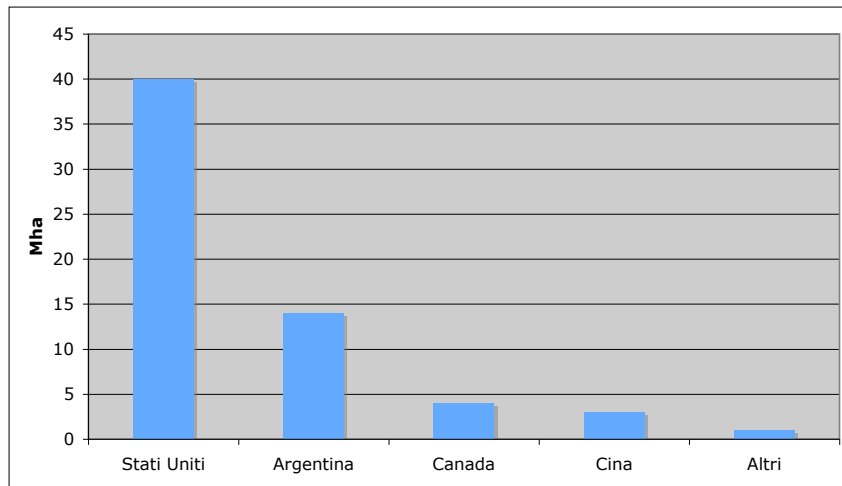


Tabella 1: Superfici delle coltivazioni transgeniche dei maggiori produttori mondiali (Fonte ISAA)

Quasi la metà della produzione mondiale di soia (46%) è fornita da varietà transgeniche. Le altre specie transgeniche maggiormente coltivate sono: cotone (20%), colza (11%), e mais (7%) (tabella 2). Negli ultimi anni sono state introdotte in coltivazione anche varietà transgeniche di barbabietola, lino, pomodoro, patata, riso, erba medica, radicchio e zucchini.

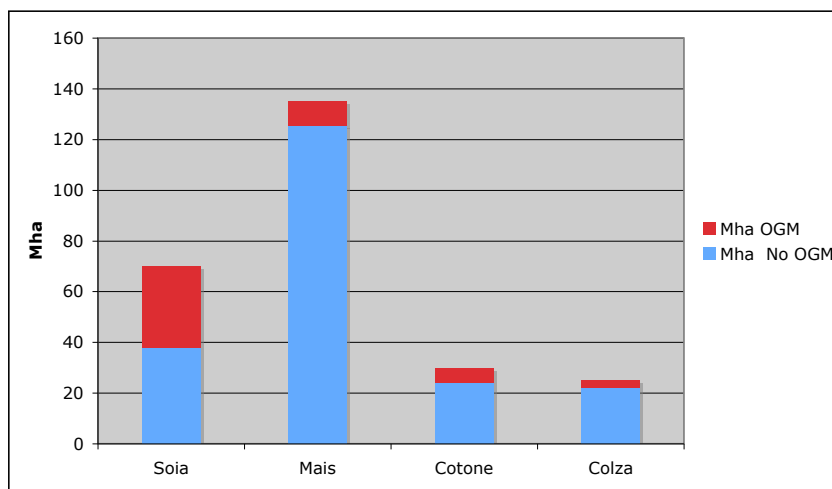


Tabella 2: Principali colture transgeniche mondiali e relativa superficie. (Fonte ISAA)

Le PGM possono essere distinte anche in base all'epoca di sviluppo:

- PGM di I° generazione: piante transgeniche costituite per incrementare la produttività, migliorando le difese contro patogeni e avversità ambientali, per ridurre i costi e per facilitare le pratiche agronomiche;
- PGM di II° generazione: piante transgeniche costituite per migliorare la qualità dei prodotti finali (tabella 3);

Specie	Transgeni	Caratteri principali
Mais	Cry 1A(b) EPSPS pat Barnase	Resistenza a lepidotteri Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinate-ammonio Maschiosterilità
Pomodoro	PG antisenso ACC-sintasi	Ritardata marcescenza Ritardata maturazione
Soia	EPSPS Δ 1,2 desaturasi	Tolleranza a glifosate Aumento acido oleico
Patata	Cry 3A CP	Resistenza a coleotteri Resistenza a virus PVY
Cotone	Nitrilasi EPSPS Acetolattato-sintasi	Tolleranza a bromossinile Tolleranza a glifosate Tolleranza a sulfunilurea
Colza	ACP tioesterasi EPSPS, Gox pat Barnase Nitrilasi 3-fitasi	Incremento acido laurico Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinate-ammonio Maschiosterilità Tolleranza a bromossinile Degradazione dei fitati
Bietola	EPSPS pat CP	Tolleranza a glifosate Tolleranza a glufosinate-ammonio Resistenza a WMV2, CMV e ZYMV
Lino	Acetolattato-sintasi	Tolleranza a sulfunilurea
Melone	Sam-K	Ritardata maturazione
Radicchio	Barnase	Maschiosterilità

Tabella 3: Alcune PGM di prima e seconda generazione (Tratto dal libro *Genetica e genomica*, G.Barcaccia e M.Faccinelli)

- PGM di III° generazione: piante transgeniche costituite per ottenere prodotti con nuove proprietà, come vaccini, componenti del sangue, vitamine, ormoni e enzimi terapeutici di origine umana o animale, cosmetici e bioplastiche;

La costituzione di varietà transgeniche ha permesso di ampliare il grado di espressione di molti caratteri agronomicamente importanti, connessi non soltanto alla produttività delle colture, ma anche alla qualità del prodotto. Le modificazioni principali riguardano:

- Miglioramento delle caratteristiche nutrizionali
- Resistenze agli erbicidi
- Resistenze a stress abiotici e biotici

Miglioramento delle caratteristiche nutrizionali

Il miglioramento delle qualità nutrizionali delle PGM riguarda principalmente la composizione in amminoacidi, lipidi e vitamine dei semi. Sono stati aumentati i valori di metionina e lisina in colza mais e soia con l'inserimento di geni codificanti per l'aspartato chinasi e la diidrodipicolinico-sintasi (Della Penna et al., 1999). Per quanto riguarda i lipidi sono stati incrementati i livelli di produzione di acido stearico e acido laurico in colza; acido stearico e acido oleico in soia. Altra importante modifica è stata la biosintesi del β -carotene in riso (Golden Rice) (Beyer *et al.*, 2002).

In campo commerciale un problema riscontrabile nella conservabilità dei frutti è la senescenza naturale, intervenendo sui geni che codificano gli enzimi cellulasi e pectasi tramite produzione dei loro rispettivi RNA antisense, si sono originati i pomodori Flavr Savr (Matthew *et al.*, 1994).

Resistenze agli erbicidi

Il principale prodotto utilizzato per l'eliminazione delle infestanti in campo è il Round-up, che agisce in modo sistemico sulle piante, tramite la presenza dell'erbicida glifosate. Sono stati isolati due geni distinti AroA di *Salmonella typhimurium* (Batterman et al., 1988) e CP4 di *Agrobacterium* (Harrison *et al.*, 1995), codificanti entrambi un enzima EPSPS non sensibile al glifosate, e ingegnerizzati per essere espressi nel cloroplasto. Così si sono ottenute varietà transgeniche di soia (fig. 1), pomodoro, tabacco, colza, cotone e barbabietola.

Roundup Ready® Soy (40-3-2)



Figura 1: Esempio di un costrutto transgenico, soia Roundup Ready (RRS). Sono evidenziati il promotore 35S, il gene CTP4, il gene EPSPS e il terminatore NOS. L'evento presenta anche un gene EPSPS troncato, formatosi durante l'inserzione nel genoma di soia.

Anche il gene isolato da *Achromobacter* codificante per una glifosate-ossidoreduttasi (GOX) porta alla degradazione dell'erbicida ad un prodotto non tossico per la pianta (S. Tan *et al.* 2005). Questo approccio è stato utilizzato in soia, cotone e tabacco per ottenere piante resistenti agli erbicidi basati sugli oxinili e sugli acidi fenocarbossilici. Per quanto riguarda gli erbicidi basati sulla fosfinotricina (PPT) sono stati isolati due geni, *bar* e *pat*, che controllano la fosfinotricina acetil-transferasi, portando alla detossificazione dell'erbicida (De Block *et al.* 1987). La resistenza alle sulfoniluree e agli imidazolinoni è stata apportata modificando il gene dell'acetolattato-sintasi (Haughn *et al.* 1988), l'enzima responsabile della sintesi di diversi amminoacidi che viene inibito da questa tipologia di erbicidi.

Resistenze a stress biotici

Nelle PGM sono state introdotte resistenze verso diversi agenti causanti stress biotici, quali: insetti, virus, funghi e batteri.

La resistenza verso insetti è principalmente portata dalle proteine Bt di *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*, che sono originate da una serie di geni che producono proteine capaci di controllare specifici insetti, quali ditteri, lepidotteri e altre ancora coleotteri. Questi geni sono stati inseriti in mais, soia, colza, tabacco, cotone, pomodoro e riso (Luis R. Herrera-Estrella *et al.* 2000). Questa δ -endotossina agisce sull'intestino medio delle larve comportando la lisi delle cellule dell'epitelio

Un altro metodo applicato per ottenere la resistenza agli insetti è lo sfruttamento dei geni codificanti per gli inibitori dell'amilasi e delle proteasi. A differenza delle endotossine queste proteine hanno un ampio spettro di azione contro insetti e agiscono anche verso quelli insensibili all'azione delle proteine Bt. Esempi di questo tipo sono il gene inibitore della tripsina di *Vigna sinensis*, che porta

resistenza alle larve di *Heliothis virescens* in tabacco e il gene che codifica per l'inibitore II della proteasi di patata efficace contro *Sesamia inferens*, insetto dannoso per questa cultura (Ussuf *et al.*, 2001). Per quanto riguarda l' α -amilasi, è stato inserito nel genoma di pisello un gene che codifica per l'inibitore di questa proteina, ottenendo piante di pisello resistenti al coleottero *Callosobrochus maculatus* (Solleti *et al.* 2008).

In pomodoro, tabacco, colza e riso sono stati inseriti geni che esprimono la chitinasi sotto il controllo del promotore CaMV, permettendo la resistenza di queste piante ai funghi del genere *Fusarium* (Jongedijk *et al.*, 1995; Schickler *et al.*, 1997).

Per i batteri sono state ottenute piante di patata resistenti al patogeno *Erwinia carotovora*, inserendo un gene del batteriofago T4 responsabile della sintesi di un lisozima tossico nel confronto del batterio (During *et al.*, 1993); e in riso è stato isolato un gene di resistenza (Xa21) verso il batterio *Xanthomonas oryzae* (Song *et al.* 1995).

Resistenze a stress abiotici

La resistenza a siccità, salinità e basse temperature nelle piante coltivate rappresentano degli obiettivi fondamentali per il miglioramento genetico. Nel campo del trasferimento genico sono state raggiunte recentemente delle importanti novità in questo campo, in *Arabidopsis* sono stati inseriti i geni coinvolti nella sintesi della betaina, composto che sembra coinvolto nella determinare la tolleranza ad alte concentrazioni saline (100 mM NaCl) e alle basse e alte temperature (Sulpice *et al.*, 2003). Piante transgeniche di pomodoro presentano un'espressione accentuata di un gene codificante un trasportatore ionico di *Arabidopsis* che comporta una resistenza ad altissime concentrazioni saline (200 mM NaCl) (Zang *et al.*, 2003).

Sono state sviluppate piante di tabacco e papaia OGM che si propongono di risolvere un altro problema comune: l'acidità dei suoli generata dalla presenza di ioni metallici, come l'alluminio. In queste piante è stato inserito un gene isolato da *Pseudomonas aeruginosa* che sintetizza una citrato sintasi, enzima responsabile della sintesi di acidi organici che si possono legare all'alluminio, formando composti non più tossici (De la Fuente *et al.*, 1997).

Tracciabilità e normativa comunitaria

Nell'accezione più recente si parla di tracciabilità di filiera come l'identificazione di tutte le aziende che hanno contribuito alla formazione del prodotto "dai primi anelli della catena alimentare fino al consumatore". Oggi la qualità non può essere più legata al singolo prodotto-azienda ma va intesa come qualità a livello di sistema. Ogni organizzazione è al tempo stesso fornitrice ed erogatrice di qualità nei confronti degli anelli contigui della filiera. La tracciabilità di filiera quindi rappresenta un potente strumento di controllo dei processi e di gestione delle crisi. La gestione dei flussi dei materiali consente: di conoscere in ogni momento cosa si sta facendo, di individuare con maggiore rapidità e sicurezza le cause di non conformità, di gestire nel tempo operazioni e materiali in vista del miglioramento e della standardizzazione della qualità e della riduzione dei costi (<http://www.agroqualita.it/tracciabilita>). Esistono tre tipi di tracciabilità:

1. "Upstream traceability" (tracciabilità a monte), che riguarda le fasi antecedenti la produzione, coltivazione agricola, trasporti, prima trasformazione;
2. "Production traceability" (tracciabilità durante la produzione), che concerne la fase di produzione del prodotto alimentare;
3. "Downstream traceability" (tracciabilità a valle), che riguarda la distribuzione sino al consumatore.

Le aziende secondo il Regolamento CE n. 178/2002, dovranno essere dotate di sistemi atti a consentire la tracciabilità dei generi agroalimentari, prodotti e immessi sul mercato, con il fine di localizzare il prodotto in qualsiasi punto della catena di distribuzione e di individuare l'esatto allevamento o campo da cui la materia prima proviene. Al punto 1 dell'articolo 18 del Regolamento CE n. 178/2002 è riportata infatti tale indicazione: *"E' disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime"*. Al punto 2 dello stesso articolo *"gli operatori del settore alimentare...devono essere in grado di individuare chi abbia loro fornito"* e il punto 3 *"gli operatori del settore alimentare... devono disporre sistemi... per individuare le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti..."* che permettono di comprendere la natura e le basi di tale definizione di tracciabilità.

Tali definizioni dovrebbero permettere di porre in atto una precisa identificazione degli ingredienti, degli intermediari e del prodotto finito. Tra gli attuali sistemi di identificazione possono essere annoverati i più conosciuti che sono rappresentati : dall'etichettatura, dal codice a barre, dai microchip e dagli RFID (Radio Frequency Identification).

L'Unione Europea ha emanato un "Testo Unico" sull'etichettatura di prodotti alimentari e bevande, si tratta della Direttiva n. 2000/13/CE, concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità.

In Italia, la materia è disciplinata, in generale, dal DLgs. n.109/1992, (attuazione delle direttive 89/395/CEE e 89/396 CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari), dal DLgs. n.68/2000 (Attuazione della direttiva 97/4/CE, che modifica la direttiva 79/112/CEE, in materia di etichettatura, presentazione e pubblicità dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale) e dal DLgs. n.181/2003 (attuazione della direttiva 2000/13/CE concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità emanato in attuazione della Direttiva 2000/13/CE.).

Questi decreti disciplinano in maniera rigorosa le caratteristiche delle indicazioni da riportare all'esterno delle confezioni. Il campo di applicazione comprende l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari.

E' possibile riassumerne in questo modo i punti fondamentali:

1. etichettatura: l'insieme delle menzioni, indicazioni, marchi di fabbrica o di commercio; immagini o simboli che si riferiscono al prodotto e figurano direttamente sull'imballaggio, su un'etichetta appostavi, su dispositivi di chiusura, su cartelli, anelli e fascette legati al prodotto medesimo, infine, immagini o simboli sui documenti di accompagnamento;
2. presentazione: la forma o l'aspetto conferito ai prodotti alimentari o alla loro confezione, il materiale utilizzato per il loro confezionamento, il modo in cui sono disposti sui banchi di vendita, l'ambiente nel quale sono esposti;
3. pubblicità: le regole di correttezza nel pubblicizzare le caratteristiche dei prodotti alimentari, in particolare con riferimento alla natura, all'identità, alla qualità, alla composizione, alla quantità, alla durabilità, al luogo di origine o di provenienza, al modo di ottenimento o di fabbricazione.

Normativa europea sugli OGM

A livello mondiale il commercio degli OGM è regolato dal protocollo di Cartagena, che ha il fine primo di realizzare un'armonizzazione delle procedure e dei criteri di valutazione della biosicurezza degli organismi geneticamente modificati. Questo protocollo definisce una procedura (Advanced Informed Agreement, AIA) che assicura al paese importatore l'accesso a tutte le informazioni necessarie per valutare i rischi ambientali legati agli OGM e il diritto di prendere una decisione prima dell'importazione degli OGM nell'ambiente. Il protocollo permette ai singoli stati di appellarsi al principio di precauzione, e quindi di vietare l'importazione di OGM anche in assenza di prove scientifiche relative alla loro pericolosità.

Emissione in ambiente di OGM in Europa

La direttiva 2001/18/CE “*on deliberate release of GMOs into the environment*” regola l'emissione deliberata in ambiente di OGM all'interno della comunità europea, intendendo per emissione deliberata una qualsiasi introduzione intenzionale nell'ambiente di OGM o una combinazione di OGM, per la quale non vengono usate specifiche misure di confinamento, al fine di limitare il contatto con la popolazione e con l'ambiente e per garantire un livello elevato di sicurezza. Per l'emissione in ambiente è previsto, da parte dei notificanti, una valutazione del rischio ambientale, le opportune misure di sicurezza e di intervento in caso di emergenza.

La stessa direttiva definisce anche le tecniche che hanno come risultato un organismo geneticamente modificato:

- tecniche di ricombinazione del materiale genetico che comportano la formazione di nuove combinazioni mediante l'utilizzo di un vettore di molecole di DNA e RNA o loro derivati, nonché il loro inserimento in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua. Nel caso delle piante questo tipo di ricombinazione avviene tramite l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* e virus fitopatogeni.
- 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;

- 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.

Immissione sul mercato europeo di prodotti alimentari contenenti, costituiti o derivati da OGM

La normativa europea riguardante l'immissione sul mercato di prodotti alimentari contenenti, costituiti o derivati da organismi geneticamente modificati è trattata dai regolamenti UE 258/1997, 1829/2003, 1830/2003 e 641/2004.

Il regolamento 258/97 è stato emendato dal regolamento 1829/2003, che viene applicato a tre categorie di prodotti: OGM destinati all'alimentazione umana e animale; gli alimenti ed i mangimi che contengono o sono costituiti da OGM; quelli ottenuti a partire o derivati da OGM. Sono esclusi dal campo di applicazione del regolamento i prodotti ottenuti per mezzo di un OGM, senza che ne derivi alcuna presenza transitoria di materiale genetico.

Il regolamento 1830/2003 disciplina invece la tracciabilità ed etichettatura dei prodotti che cadono sotto il campo di applicazione del regolamento 1829/2003 tramite un "identificatore numerico", ossia un codice alfanumerico che definisce le informazioni riguardanti le caratteristiche e i processi di trasformazione relativi agli alimenti prima indicati.

La procedura di autorizzazione afferma anche il ruolo centrale dell'EFSA (Autorità europea per la sicurezza alimentare), che ha il compito di valutare sul piano della sicurezza ambientale e sanitaria le domande di autorizzazione per l'immissione nel mercato di nuovi prodotti OGM o contenenti OGM. La domanda di autorizzazione viene presentata alle autorità competenti dei singoli stati, che successivamente la inoltrano all'EFSA; entro sei mesi l'EFSA, in base alle informazioni ricevute, emette un proprio parere, eventualmente rivolgendosi alle autorità nazionali competenti o ad uno dei laboratori comunitari di riferimento (CRL). La commissione quindi ha tempo 3 mesi per proporre al comitato per la catena alimentare e la salute degli animali una decisione sul rilascio dell'autorizzazione, basandosi sul parere dell'EFSA. Può emettere un parere diverso dall'EFSA ma in questo caso è tenuta a giustificare la sua decisione. Il prodotto autorizzato ottiene un riconoscimento decennale rinnovabile e viene inserito in un apposito registro.

Etichettatura

Nella normativa europea i regolamenti 1829/2003 (art. 12 e 24) e 1830/2003 definiscono il sistema di etichettatura dei prodotti alimentari contenenti, costituiti o derivati da OGM, a completamento della direttiva 2001/18.

Il regolamento 1830/2003 pone l'obbligo di etichettatura per prodotti che contengono una percentuale superiore all'0,9% di prodotti geneticamente modificati, autorizzati dall'Unione Europea. Se invece il prodotto GM non è autorizzato all'interno dell' UE, l'etichettatura non è obbligatoria se esso è presente nel prodotto in una percentuale inferiore allo 0,5%. Si prevede quindi l'obbligo di etichettatura quando la percentuale OGM modificata superi le soglie, precedentemente definite, del singolo ingrediente o del prodotto alimentare contenente un unico ingrediente. Queste regole si applicano:

1. Ai prodotti contenenti OGM o da essi costituiti
2. Agli alimenti ottenuti da OGM
3. Ai mangimi ottenuti da OGM

L'articolo 4 stabilisce che per i prodotti preconfezionati contenenti OGM o da essi costituiti gli operatori provvedono a far figurare sull'etichetta la dicitura: 'Questo prodotto contiene organismi geneticamente modificati' o 'Questo prodotto contiene (nome dell'organismo modificato)'. L'articolo 5 specifica che gli operatori che immettono in commercio prodotti derivati da OGM sono obbligati a trasmettere per iscritto a quelli che ricevono le seguenti informazioni: indicazioni di ciascun ingrediente dell'alimento ottenuto da OGM, indicazione di ciascuna delle materie prime o degli additivi del mangime ottenuti da OGM e nel caso di prodotti privi di elenco di ingredienti indicare che il prodotto è stato ottenuto da OGM.

Normativa italiana

In Italia la coesistenza di agricoltura convenzionale, biologica e transgenica è regolata dal decreto legge n. 279/2004. Secondo il decreto, le coltivazioni transgeniche devono essere praticate all'interno di filiere di produzione separate da quelle tradizionali, e ogni regione può definire un proprio regolamento per la coesistenza delle diverse colture. La direttiva 2001/18 è stata recepita in Italia dal D.Leg.224/2003.

E' stata recentemente approvata dal parlamento la legge 2363, in materia di etichettatura e di qualità dei prodotti alimentari, che impone l'obbligo di etichettatura dei prodotti alimentari contenenti

OGM, solo in base alla presenza (art.6): *“Al fine di assicurare ai consumatori una completa e corretta informazione sulle caratteristiche dei prodotti alimentari commercializzati, trasformati, parzialmente trasformati o non trasformati, nonché al fine di rafforzare la prevenzione e la repressione delle frodi alimentari, è obbligatorio, nei limiti e secondo le procedure di cui al presente articolo, riportare nell’etichettatura di tali prodotti, oltre alle indicazioni di cui all’articolo 3 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109, e successive modificazioni, l’indicazione del luogo di origine o di provenienza e, in conformità alla normativa dell’Unione europea, dell’eventuale utilizzazione di ingredienti in cui vi sia presenza di organismi geneticamente modificati in qualunque fase della catena alimentare, dal luogo di produzione iniziale fino al consumo finale”*. In attesa dell’attuazione di questa legge, restano ancora validi i parametri fissati dalla direttiva 2001/18.

“Food Genomics” e tracciabilità molecolare

L'aumentata sensibilità dei consumatori sulle tematiche riguardanti la composizione in materie prime degli alimenti ha portato alla necessità di verificare le normative per l'etichettatura dei prodotti alimentari. Un'etichettatura non corretta rappresenta una frode commerciale e nel campo alimentare si tratta spesso di modifiche apportate intenzionalmente al fine di ottenere illeciti guadagni. Le frodi più comuni possono essere classificate in:

- adulterazioni;
- sofisticazioni;
- falsificazioni;
- contraffazioni.

Le adulterazioni propriamente dette sono dovute alla sostituzione di una parte del prodotto con un altro di diversa origine o diverso o più basso costo economico.

Le sofisticazioni sono invece aggiunte di sostanze non previste dai disciplinari di produzione. Esempi tipici di sofisticazione sono rappresentati dall'aggiunta di coloranti alla pasta per farla sembrare all'uovo, di clorofilla alle confezioni di piselli (per ravvivare il colore verde), o di nitriti alle carni per farle sembrare più rosse. Il miglioramento di un prodotto è consentito, ma occorre rispettare le norme di legge che prevedono il tipo e la quantità di additivi che è possibile aggiungere, per non incorrere in una sofisticazione.

Le falsificazioni sono le frodi più gravi nel settore agroalimentare, in quanto consistono nella sostituzione di un prodotto con un altro, per esempio l'utilizzo della margarina al posto del burro. Le contraffazioni si verificano soprattutto a livello di marchi di prodotti tipici che vengono usati indebitamente (contraffazioni dei marchi come formaggio parmigiano, mozzarella di bufala della Piana del Sele).

Una etichettatura “fraudolenta” può inoltre avere serie conseguenze per la salute umana, specialmente nei confronti di consumatori allergici. Le allergie alimentari sono considerate un reale problema per la tutela della salute umana, specialmente nei paesi sviluppati. Recentemente l'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Unione Europea hanno emanato una lista di allergeni, in ordine di potenziale pericolosità, che devono essere riportati in etichetta (Direttive 2000/13/EC e 2003/89/EC).

Una corretta etichettatura è inoltre necessaria per una scelta consapevole da parte del consumatore, in coerenza con stili di vita, come il vegetarianismo o credi religiosi che puntano al consumo di cibi

etici. La legislazione in materia di etichettatura è quindi una necessità non solo per tutelare il consumatore, ma anche per garantire le stesse industrie alimentari da una potenziale concorrenza sleale.

I metodi analitici usati per l'identificazione di determinate specie animali o vegetali in prodotti alimentari sono basati sull'analisi di proteine e del DNA. L'identificazione di proteine avviene principalmente attraverso l'identificazione immunologica (Haza *et al.*, 1999; Kaw *et al.*, 2008) e tecniche elettroforetiche e cromatografiche (Richter *et al.*, 1999; Veloso *et al.*, 2002; Ferriera *et al.*, 2003).

Le metodiche molecolari basate sulla PCR (Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.*, 1987) offrono un valido supporto per l'identificazione delle frodi rivelandosi di facile realizzazione, sensibili, specifiche ed economiche, rispetto alle tradizionali analisi chimiche. L'uso di sistemi di analisi "highthroughput" quali microarray e micro-chips combinati ad una continua crescita dei sistemi di miniaturizzazione potranno permettere lo sviluppo di sistemi sempre più rapidi e di facile applicazione.

Il DNA è inoltre più stabile rispetto alle proteine, è presente in tutti i tessuti, è resistente alle alte temperature, tipiche dei processi industriali di preparazione degli alimenti.

La PCR permette di amplificare sequenze specifiche partendo sia da DNA genomico che da cDNA analizzando estratti di varia natura, anche con composizione estremamente complesse come ad esempio: sangue, capelli, tessuti di diversa origine, alimenti o anche su resti archeologici datati milioni di anni. Negli ultimi anni gli sviluppi nel campo della genomica, della bioinformatica, l'utilizzo di nuove metodologie di analisi in grado di gestire numeri sempre maggiori di campioni, l'aumentata conoscenza sul DNA estratto dagli alimenti hanno portato alla nascita di un nuovo approccio di grande importanza per la tracciabilità: la "Food Genomics".

Con questo termine si intende l'applicazione degli studi sul genoma degli organismi da cui si ricavano le materie prime per stabilire l'autenticità degli alimenti. La Food Genomics è stata applicata per la tracciabilità in matrici differenti: Olio d'oliva (Pafundo *et al.* 2007, Vietina *et al.* 2010), latte (Pirondini *et al.*, 2009) e pomodoro (Turci *et al.*, 2009).

Gli sviluppi delle metodologie molecolari hanno consentito di individuare differenze nel DNA di individui appartenenti a popolazioni, specie o generi diversi che consentono la loro identificazione o classificazione. Tali sequenze identificative sono dette "marcatori molecolari". Analizzando i residui di DNA presenti nell'alimento finito è possibile risalire all'organismo che ha fornito la

materia prima e stabilire la conformità con quanto dichiarato dal produttore (Marmioli *et al.*, 2003).

L'estrazione del DNA da matrici alimentari complesse

La difficoltà maggiore nelle analisi nell'analisi del DNA proveniente da matrici complesse, come possono essere i prodotti alimentari, è rappresentata certamente dalla estrazione. Risulta quindi fondamentale l'ottimizzazione delle metodiche estrattive attraverso il bilanciamento di diversi parametri. Un buon metodo di estrazione dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: elevata resa finale, buona qualità del DNA estratto, rapidità di esecuzione, economicità e capacità di processare contemporaneamente molti campioni. Poiché il DNA in un alimento è altamente degradato, presente in quantità limitate e mescolato con altre molecole (composti organici, proteine e acidi nucleici di diversa origine), il metodo estrattivo deve essere ottimizzato per eliminare questi possibili inquinanti.

Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti

La lavorazione industriale delle materie comporta spesso processi caratterizzati da trattamenti termici (cottura, sterilizzazione, pastorizzazione), alte pressioni, modificazioni del pH, irradiazione, disidratazione e reidratazione. Per esempio la preparazione di molti prodotti alimentari prevede temperature superiori ai 100°C per tempi dai 30 ai 60 minuti a pH 4. Il processamento termico è la causa principale della frammentazione del DNA. Bauer *et al.*, (2003) hanno evidenziato come durante il trattamento a caldo nella preparazione del tofu dalla soia, la massima lunghezza dei frammenti di DNA individuabili erano inferiore alle 1000 bp. Altri fattori che possono determinare variazioni alla struttura del DNA sono rappresentati da eventuali enzimi degradativi presenti negli ingredienti, o condizioni chimiche che possono accelerare la degradazione del DNA stesso. Le variazioni di pH sono una delle principali cause della perdita della struttura primaria della doppia elica del DNA dovuta alle diverse reazioni di ossidazione e idrolisi, che possono portare alla rottura del legame fosfodiesterico tra i nucleotidi. Uno studio effettuato su semi di soia (Y. Chen *et al.* 2005) RRS processati per ottenerne la farina (ammollo, macinazione, cottura ed essiccazione a spruzzo), seguito da estrazione di DNA e analisi con PCR end-point per il gene endogeno lectina e il transgene RR, ha mostrato che il gene endogeno mantiene una stabilità di amplificazione fino al

trattamento di cottura (amplicone massimo ottenuto di 863 bp), che si riduce drasticamente in seguito al trattamento di essiccazione (amplicone massimo ottenuto di 162 bp). Mentre per il transgene già dopo il trattamento con macinazione l'amplicone massimo ottenuto è stato di 408 bp, a partire da un amplicone di un effettiva lunghezza di 1512 bp. Quindi il gene endogeno risulta essere molto più stabile di quello relativo al transgene.

Conservazione del DNA

Altri parametri che possono influenzare la qualità e l'amplificabilità del DNA sono la temperatura di conservazione a cui è sottoposta la matrice analizzata, e anche la durata del trattamento. Daniel P.K. Ng *et al* (2008) hanno dimostrato che a partire da saliva conservata per 7 giorni a temperatura di 4°C è stato possibile estrarre DNA ed amplificarlo con PCR. Studi su cellule batteriche fatte sviluppare in latte a 4°C per 96 ore hanno mostrato che la densità cellulare non è diminuita durante il periodo di analisi e quattro successive estrazioni di DNA (0, 24, 36, 72 ore) hanno confermato una certa stabilità. Una successiva analisi in PCR end-point ha mostrato che l'amplificabilità del DNA ottenuto nelle quattro estrazioni rimane costante (McKillip *et al* 2002).

Altri studi su DNA plasmidico (Podivinsky *et al.*, 2009) hanno mostrato che campioni liofilizzati conservati a 4°C e -20°C, analizzati per 6 mesi, presentano una concentrazione di DNA molto stabile, così anche per campioni acquosi conservati a 4°C. Mentre per i campioni acquosi conservati a -20°C, la perdita di DNA è risultata più consistente.

Qualità del DNA e contaminanti

In seguito ai trattamenti subiti durante la lavorazione, il DNA estratto da matrici alimentari risulta quindi molto degradato e presente in piccole quantità, ovvero a basso numero di copie. La possibilità di poter identificare e amplificare mediante PCR questi frammenti in modo corretto diminuisce drasticamente. Studi sul DNA "antico" isolato da campioni biologici quali mummie e dinosauri, perciò non conservati per successive analisi sul loro materiale genetico, hanno dimostrato che aumentando il numero di cicli della reazione di amplificazione oltre le 45 ripetizioni diviene possibile produrre ampliconi, altrimenti non identificabili (Cooper *et al.*, 2000).

Tuttavia questo approccio aumenta le possibilità di contaminazioni durante l'amplificazione, risulta quindi necessario operare in condizioni di sterilità e introducendo controlli negativi sia di estrazione che di amplificazioni (Teletechea *et al.*, 2005). La presenza di inibitori co-estratti insieme al DNA è

uno dei maggiori problemi nelle successive analisi del campione. Gli inibitori della PCR comprendono: composti organici e fenolici, polisaccaridi, glicogeno, grassi, collagene, metalli come ferro e cobalto (Wilson *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998), sono da considerarsi come tali anche eventuali residui di cellule batteriche e qualsiasi DNA estraneo alla analisi. Gli inibitori possono: *i*) interferire con le metodiche di estrazione, *ii*) favorire la degradazione e la purificazione degli acidi nucleici, *iii*) inibire le reazione di amplificazione (Wilson *et al.*, 1997). L'assenza di amplificazione è quindi spesso imputabile alla presenza di inibitori e non solo alla mancata estrazione del DNA dal campione.

Nel caso dell'olio di oliva è necessario fare estrema attenzione nel purificare gli acidi nucleici, dagli eventuali inibitori come i polifenoli e altre molecole presenti nei prodotti di origine vegetale che contaminano inevitabilmente il DNA. D'altro canto spesso le rese dei metodi di estrazione utilizzati sono basse proprio perché si cerca di eliminare queste piccole molecole a scapito della quantità di DNA purificato.

Artefatti della PCR

L'analisi del DNA attraverso la PCR su campioni caratterizzati da un alto livello di degradazione e in basse quantità risulta spesso complicata dalla possibile generazione di artefatti e errori durante la fase di amplificazione. Come nel caso delle analisi sul DNA "antico", anche nella tracciabilità molecolare degli alimenti diventa di fondamentale importanza rispettare rigorosi parametri per una corretta applicazione della PCR (Pääbo *et al.*, 2004). Il clonaggio dei prodotti amplificati e il sequenziamento di cloni multipli diventa importante per individuare l'eterogeneità nei prodotti amplificati, dovuti alla contaminazione, al danneggiamento del DNA o ad errori della PCR stessa. Ogni estrazione deve includere almeno un'estrazione di controllo su un campione senza materiale biologico, ma trattato allo stesso modo. Similarmente, per ogni reazione di amplificazione, controlli negativi multipli dovrebbero essere eseguiti per distinguere le contaminazioni che avvengono durante l'estrazione e quelle che avvengono durante la preparazione della PCR. Le amplificazioni devono essere ripetute dalla stessa estrazione (ripetizioni biologiche) o da più estrazioni (ripetizioni tecniche). Questo serve a due scopi: *i*) permettere l'identificazione di contaminazioni sporadiche; *ii*) individuare eventuali cambiamenti negli ampliconi. Un altro parametro da valutare è la possibilità di quantificare il numero di molecole di DNA amplificabile, l'efficienza di amplificazione dovrebbe essere inversamente correlata con la lunghezza dell'amplificato atteso.

Metodi di estrazione del DNA da matrici alimentari

L'estrazione del DNA da matrici alimentari può avvenire con metodi sperimentali (CTAB o SDS) o tramite l'utilizzo di kit commerciali.

Bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB)

Il bromuro di cetil-trimetilammonio è un detergente cationico che ha la caratteristica di precipitare in maniera differenziale acidi nucleici, proteine e polisaccaridi a seconda della forza ionica della soluzione. L'estrazione del DNA con questo metodo è applicabile a foglie, semi, farine, mangimi e cibi processati; la procedura di estrazione risulta essere lunga e si utilizzano sostanze chimiche pericolose come cloroformio e fenolo. Il protocollo originale prevede l'utilizzo di cloroformio/alcol isoamilico per rimuovere le proteine e i polisaccaridi, possono essere utilizzati proteinasi K, per rimuovere la parte proteica, e RNasi, per rimuovere l'RNA. Sono stati applicati diversi protocolli CTAB, che prevedono l'utilizzo di reagenti diversi, come: SDS, PEG e cloruro di cesio (Demeke *et al.* 2009). Questo metodo di estrazione risulta essere il più vantaggioso in termini di costi e di resa estrattiva, anche se il CTAB è una sostanza inibitrice dell'enzima polimerasi (Marmioli *et al.* 2008).

Sodio dodecil solfato (SDS) e Polivinilpirrolidone (PVP)

L'SDS ha la funzione principale di rompere la parete cellulare e successivamente di complessarsi con proteine e polisaccaridi, al fine di rimuoverli. Esistono anche in questo caso diversi protocolli che utilizzano l'SDS, anche in combinazione con fenolo/cloroformio. Il PVP è adatto per matrici che contengono un'elevata quantità di composti polifenolici.

Kit commerciali

La maggior parte dei kit commerciali utilizza dei detergenti per rompere la parete cellulare come prima fase dell'estrazione, seguito da trattamento con proteinasi K e RNasi. Alcuni kit commerciali utilizzano delle soluzioni che migliorano il legame del DNA con i filtri delle colonnine di silice o alle biglie magnetiche. Altri metodi utilizzano elevate concentrazioni di sale e precipitazioni con

etanolo per isolare il DNA dai residui cellulari, e purificarlo. Ogni kit risulta essere spesso specifico per alcuni tipi di matrice, non per altre, influenzando alla fine la riuscita dell'analisi di quantificazione della componente OGM in PCR real-time. Dal confronto (Peano *et al.*, 2005) fra le rese estrattive di quattro tipi di kit commerciali, Wizard (Promega), DNeasy Plant Minikit (Quiagen), QIAamp DNA Stool Minikit (Quiagen), e Nucleo Spin Food (Macherey-Nagel), applicati su farine di mais, soia e su matrici alimentari contenenti le stesse farine, è risultato che il QIAamp DNA stool Minikit origina DNA di buona qualità con un basso livello di degradazione dalle matrici più semplici, mentre il Nucleo Spin Food è risultato il più efficiente nel recupero di DNA di buona qualità dalle matrici più complesse.

Analisi proteica delle matrici alimentari

Le proteine all'interno degli alimenti processati subiscono molte più modificazioni del DNA, che rendono spesso più difficoltosa la loro rilevazione. I trattamenti che prevedono alte temperature comportano: idrolisi dei legami peptidici, soprattutto dei residui di acido aspartico con altri amminoacidi; deaminazione delle asparagine, β -eliminazione delle cisteine, delle serine glicosilate e fosforilate; ossidazione delle istidine, metionine, cisteine, triptofano e tirosine (G.E. Means *et al.*, 1998). La quantità e il livello di queste modificazioni può variare anche in base alla durata del trattamento termico, dalla temperatura applicata e dal livello di pH. Interazioni fra tioli con ponti disolfuro con la creazione di nuovi tioli e ponti disolfuro sono altre reazioni comuni causate dalle alte temperature. In presenza di glucosio e altri zuccheri riducenti si ha la reazione di Maillard con i residui lisina delle proteine, e l'ottenimento di prodotti come pirroli e furani. In presenza di condizioni alcaline molte proteine delle piante subiscono delle β -eliminazioni delle cistine, delle serine e delle treonine.

Inoltre, come nel caso del DNA, è presente l'effetto matrice causato sia dalla presenza di composti particolari nell'alimento, sia dall'approccio utilizzato per l'estrazione delle proteine.

Campionamento di materiale OGM

Un problema comune nell'applicazione della tracciabilità è che gli errori di campionamento e sotto-campionamento sono spesso più significativi degli errori analitici e che l'errore aumenta al diminuire della concentrazione dell'analita. L'assunzione è che gli analiti sono distribuiti eterogeneamente all'interno degli alimenti, portando ad una difficile rappresentazione dell'intero prodotto nel singolo campione. Il campionamento prevede la raccolta di multipli sotto-campioni che sono successivamente omogeneizzati e miscelati, prima di ottenere il campione da analizzare.

L'obiettivo di un buon campionamento è di assicurare di generalizzare all'intera popolazione i risultati ottenuti per il singolo campione, e questo procedimento è detto inferenza. Un buon campionamento prevede che ciascuna unità della popolazione abbia la stessa probabilità di essere scelta, in tal caso il campione è definito come "randomizzato" o casuale. Un campione randomizzato ha il vantaggio di minimizzare gli errori sistematici (bias).

La raccomandazione UE 2004/787/CE regola gli aspetti inerenti agli orientamenti tecnici sui metodi di campionamento e di rilevazione degli OGM e dei materiali ottenuti da OGM come tali o contenuti nei prodotti, nel quadro del regolamento 1831/2003.

Questa raccomandazione definisce il materiale soggetto a normativa:

- LOTTO: quantitativo distinto e specificato di materiale, coerente con: norme ISTA (International Seed Testing Association), norma ISO 6644, norma ISO 13690, norme internazionali FAO per le misure fitosanitarie;
- LOTTO DI SEMENTI: quantitativo specificato di sementi fisicamente identificabile e uniforme non eccedente le dimensioni massime dei lotti stabilite nelle direttive in materia di sementi e corrispondente ad una partita o parte di essa;
- LOTTO DI ALTRO MATERIALE DI PROPAGAZIONE VEGETALE: numero di unità di un singolo prodotto, identificabile per la sua origine o composizione omogenea, non eccedente le dimensioni massime dei lotti stabilite nella normativa riguardante gli altri materiali di propagazione vegetale e corrispondente ad una partita o parte di essa;
- LOTTO DI ALIMENTI E MANGIMI: quantitativo di prodotti spediti o ricevuti in una sola volta e oggetto di un particolare contratto o documento di spedizione

La raccomandazione definisce anche le tipologie di campione e le metodologie di riduzione:

- CAMPIONE ELEMENTARE: piccolo quantitativo costante di prodotto prelevato da punti differenziati di campionamento sull'intero spessore del lotto (campionamento statico), o dal flusso di prodotti in movimento (campionamento dinamico) in un determinato lasso di tempo;
- CAMPIONE ELEMENTARE PER LA CONSERVAZIONE: piccolo quantitativo costante di prodotto prelevato da punti differenziati di campionamento sull'intero spessore del lotto (campionamento statico), o dal flusso di prodotti in movimento (campionamento dinamico) in un determinato lasso di tempo;
- CAMPIONE GLOBALE: quantità di prodotto ottenuta unendo e mescolando tutti i campioni elementari prelevati da un determinato lotto;
- CAMPIONE DA ANALIZZARE (o campione di laboratorio): quantità di prodotto prelevata dal campione globale inviata al laboratorio (numero dei prelievi varia a seconda delle finalità) ;
- CAMPIONE DI ANALISI: campione di laboratorio omogeneizzato, costituito dall'intero campione di laboratorio o da una sua frazione rappresentativa;
- CONTROCAMPIONE: campione conservato per un periodo di tempo ai fini di verifica o per dirimere eventuali contestazioni;

Lo stesso regolamento definisce un unità di misura di presenza di OGM: percentuale delle copie di DNA geneticamente modificato rispetto alle copie di DNA specifico del taxon bersaglio, calcolata in termini di genomi aploidi.

Sono stati sviluppati anche diversi software che simulano un lotto di sementi OGM, al fine di studiare la loro distribuzione; un programma utilizzato a tal fine è stato KeSTE (Kernel Sampling Technique Evaluation) (Paoletti et al. 2002), ed è risultato che analizzando piccole unità di semi OGM, la determinazione della percentuale OGM effettiva è soggetta ad una variazione molto accentuata; e che in presenza di una grossa stratificazione del materiale all'interno del lotto simulato comporta una minore variazione della percentuale OGM effettiva.

Uno studio effettivo sulla distribuzione di semi di soia OGM all'interno di stive di navi è stato effettuato con il progetto KeLDA (Paoletti et al. 2006). In questo progetto sono stati analizzati diversi lotti provenienti da navi di diversa origine geografica, e le farine ottenute sono state analizzate in PCR real-time per la quantificazione. La percentuale OGM effettiva determinata è

risultata variabile fra lo 0,01% e il 96,4%, con una grossa differenza fra lotti; lo studio ha anche dimostrato l'esistenza di strutture spaziali riguardanti la distribuzione degli OGM all'interno dei lotti, mostrando quindi che il materiale non è effettivamente distribuito casualmente, anche se queste strutture variavano tra i vari lotti.

Metodologie per l'analisi di OGM in matrici alimentari

Le metodologie utilizzate per l'analisi e la quantificazione di OGM in alimenti e mangimi sono: immunologiche, PCR end-point, PCR real-time.

Metodi immunologici

L'immunosaggio è un sistema analitico che usa anticorpi per testare la presenza nei reagenti dei rispettivi antigeni. La realizzazione di saggi per l'identificazione di proteine transgeniche in matrici alimentari eterogenee deve tenere conto di vari aspetti legati alle caratteristiche della proteina bersaglio, al tipo di anticorpo da utilizzare, al formato del saggio e ai criteri di validazione del saggio richiesti. Nel caso dell'analisi di matrici alimentari o farine contenenti OGM è necessario tenere conto che la modificazione genetica non è sempre diretta alla produzione di una proteina e spesso i livelli di espressione potrebbero non essere sufficienti (Van del Bulcke *et al.* 2006).

Al fine di sviluppare un immunosaggio sono da considerare diversi fattori: la disponibilità della specifica proteina, in condizione di relativa purezza, che possa essere utilizzata per immunizzare gli animali e produrre gli anticorpi richiesti; tenere conto del grado di omologia della proteina target con altre proteine presenti nell'ingrediente base e con proteine presenti nella matrice alimentare; in alcuni casi possono essere state selezionate varianti naturali resistenti dell'EPSPS (proteina target del glifosate), a causa dell'uso intensivo dello stesso erbicida. Alcuni anticorpi sviluppati per le tossine Bt presentano una cross-resistenza fra le diverse varianti della tossina.

In presenza di matrici alimentari molto processate, la proteina da analizzare può presentare la propria struttura secondaria e terziaria estremamente danneggiata e ciò può comportare il mancato riconoscimento da parte dell'anticorpo della stessa a causa della presenza di epitopi discontinui.

Quando ciò non è possibile spesso si mima lo stato della proteina, utilizzando come antigene la proteina denaturata anziché quella nativa

Può anche succedere che l'anticorpo non riconosca la proteina, non perché l'epitopo non sia presente ma perché l'epitopo è "nascosto" e non disponibile al riconoscimento con l'anticorpo a seguito dell'effetto matrice: interazione con altre sostanze presenti nella matrice (proteine, surfattanti es. saponine, composti fenolici, fosfatasi) o con detergenti utilizzati nel processo di estrazione.

Per l'analisi proteica in matrici alimentari i metodi immunologici più utilizzati sono:

- **Western blot**, e' un metodo altamente specifico, che fornisce risposte qualitative, per determinare se un campione contiene la proteina target sotto o sopra una determinata soglia. Poiché la separazione elettroforetica delle proteine è svolta in condizioni denaturanti i problemi di solubilizzazione, aggregazione e co-precipitazione della proteina target con altre proteine contaminanti è ridotto al minimo. Per la sua laboriosità, questa tecnica è maggiormente indicata a fini di ricerca o per il controllo di qualità degli anticorpi prodotti, piuttosto che per applicazioni di routine.
- **ELISA** (Enzyme Linked ImmunoAssay) e' un metodo altamente sensibile e semi-quantitativo. Consente di processare un numero elevato di campioni rapidamente o con costi relativamente contenuti ed è adatto per analisi routinarie. Consiste in una reazione sequenziale dove l'antigene è catturato e trattenuto tramite un legame con un anticorpo immobilizzato sul fondo di un pozzetto di una micropiastra. Un secondo anticorpo dotato di un marcatore viene impiegato per completare il sandwich molecolare. La molecola reporter viene utilizzata per individuare il sandwich dell'antigene compreso fra i due anticorpi. Dopo dei lavaggi, utilizzati per eliminare l'anticorpo non legato, viene aggiunto l'anticorpo detector, un anticorpo policlonale che riconosce un secondo epitopo dell'antigene ed è coniugato ad una molecola reporter ed è aggiunto anche un cromogeno. L'enzima perossidasi degrada il cromogeno generando un segnale (colorato) che è proporzionale alla concentrazione dell'antigene in un dato range di linearità. Per fermare lo sviluppo della reazione si aggiunge una reagente di stop.

L'ELISA è un metodo di analisi immunologica è stata utilizzata in diversi campi: clinico (Kato *et al.*, 1976), per la detection di virus in pianta (F. Clark *et al.*, 1976), per la detection di OGM nelle piante (J. Rogan *et al.*, 1992).

Sono disponibili sul mercato alcuni kit ELISA specifici per alcune matrici (prevalentemente farine) fornite di calibratori e dei relativi controlli negativi, gli standard esibiscono, una volta terminata la reazione, intensità di colori diversi in base alle diverse concentrazioni fornite. Comparando il colore del campione incognito con il colore degli standard è possibile determinare il range di concentrazione del campione e ottenere una stima semi-quantitativa. E' anche possibile inserire la piastra in un plate-reader e ottenere la lettura precisa della densità ottica per gli standard e calcolare la con l'aiuto di una curva di calibrazione la concentrazione del campione incognito.

I Kit ELISA forniscono risultati quantitativi entro ore, con limiti di misura compresi fra i 0.1%-0.3% w/w di farina transgenica nel lotto.

Una variante del test ELISA utilizza delle strip, in questo caso gli anticorpi diretti contro la proteina transgenica sono accoppiati a dei traccianti colorati. Quando la proteina transgenica viene solubilizzata ed entra in contatto questi anticorpi coniugati, si forma un complesso a sandwich che viene forzato a migrare lungo una cartina di nitrocellulosa insieme all'eccesso di anticorpo non legato. Durante la migrazione, ad una certa altezza, il complesso anticorpi - proteine viene focalizzato tramite un secondo anticorpo che riconosce l'antigene. La stessa cosa accade all'eccesso di anticorpo non legato in una zona superiore della strip. La focalizzazione ha come effetto lo sviluppo di colore e la colorazione dovuta all'eccesso di anticorpo funge da reazione di controllo (fig.2).

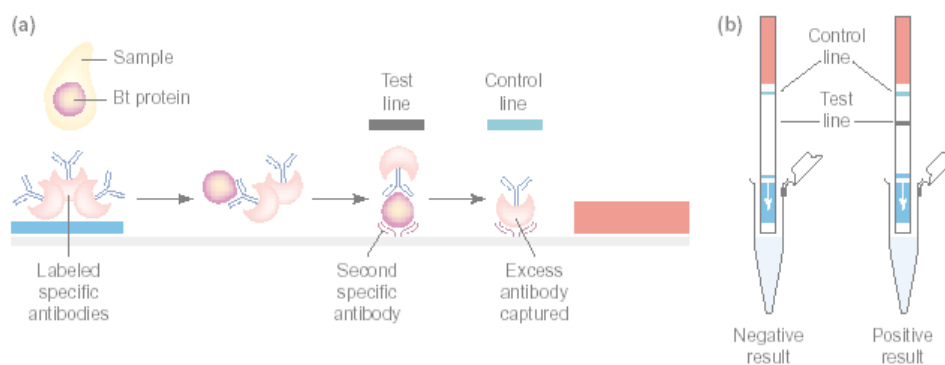


Figura 2: Reazione ELISA nei lateral flow devices

Le lateral flow stick forniscono informazione entro 5-10 minuti, sono economiche e utili per uno screening rapido nella fasi iniziali della filiera. Queste strip sono state sviluppate per l'identificazione di diverse proteine: Bt (Cry1Ab, Cry 9C, Cry 3b), CP4-EPSPS, PAT ; applicabili per analisi proteica su foglie, semi e farine, principalmente in soia, colza, mais e cotone.

Una variante del test ELISA prevede l'utilizzo di biglie magnetiche come supporto solido anziché il fondo di una micropiastra (Kourilov *et al.* 2002). Le biglie sono rivestite degli anticorpi utilizzati per la cattura dell'antigene. La possibilità di realizzare ciascun passaggio che porta al progressivo assemblaggio del sandwich, in sospensione per poi recuperare il prodotto fra un lavaggio e l'altro, consente una migliore cinetica di reazione, una migliore precisione e una più efficace eliminazione delle sostanze indesiderate.

La Real-Time PCR

La PCR rappresenta lo strumento più importante per le analisi di tracciabilità molecolare. Questa tecnica 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, mediante l'utilizzo di inneschi (primer) complementari a piccole porzioni di DNA stampo e di deossiribonucleotidi liberi.

Nel caso della Real-Time PCR (Lee *et al.*, 1993; Livak *et al.*, 1995) è possibile monitorare l'andamento della reazione durante il suo svolgimento: in questo modo i dati che si ottengono a fine ciclo si possono utilizzare per effettuare una quantificazione del frammento amplificato.

Questo è possibile tramite l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR. La fluorescenza emessa viene quindi misurata in tempo reale da un apposito rivelatore, in questo modo è possibile monitorare l'amplificazione della sequenza target durante l'intera reazione di PCR fino al raggiungimento del punto di plateau.

Un profilo di amplificazione è infatti composto da tre distinte fasi: esponenziale, in cui il prodotto di amplificazione aumenta seguendo l'equazione $X_n = X_0 (1+E)^n$; lineare, che porta al consumo dei reagenti e ad un conseguente rallentamento della cinetica della reazione; plateau, la reazione di amplificazione termina per mancanza di reagenti e il prodotto di amplificazione incomincia a degradarsi. La PCR tradizionale viene analizzata quando la reazione di amplificazione arriva al plateau, in questo modo non è possibile stabilire una correlazione diretta tra prodotto finale e la quantità iniziale di DNA realmente amplificato. I parametri che vengono valutati durante un'analisi in Real-Time PCR sono i seguenti (fig. 3):

1. la linea base della fluorescenza, denominata soglia che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato; cioè dove la fluorescenza supera del 5% il valore basale;
2. la linea soglia, parallela alla linea base, scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase lineare;
3. il ciclo soglia (C_T), specifico per ogni campione, identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia, in cui tutti i campioni raggiungono la stessa fluorescenza indipendentemente dal numero di cicli.

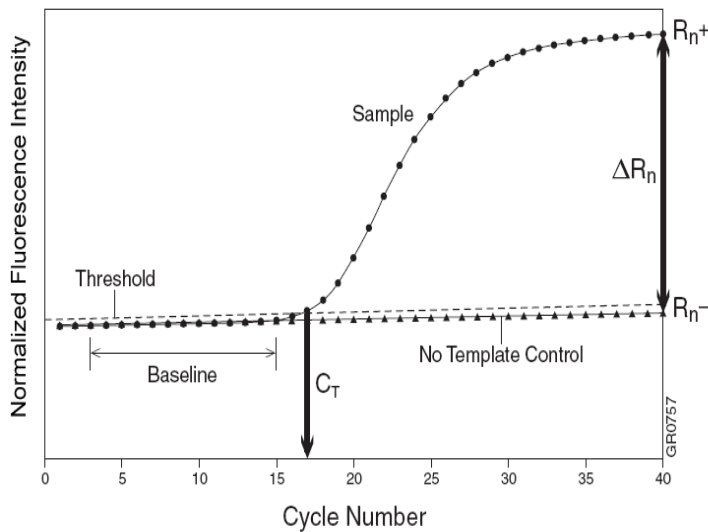


Figura 3: Esempio di grafico di amplificazione di PCR real-time. Sono riportati la soglia (threshold), la linea base della fluorescenza (baseline) e il ciclo soglia (cycle threshold).

Il ciclo soglia (C_T) è un indice preciso perché esiste una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA: minore è questa quantità e maggiore è il valore del ciclo soglia. Per potere effettuare una misurazione quantitativa è necessario effettuare parallelamente alla amplificazione della sequenza bersaglio, l'amplificazione di una serie di diluizioni di quantità note di DNA per poter realizzare una retta di taratura. Il valore di C_T di un campione sconosciuto verrà quindi interpolato nella retta di regressione che permetterà di calcolare la sua quantità. Il rapporto tra il quantitativo di gene target considerato e il quantitativo totale di DNA analizzato permetterà di ottenere un accurato calcolo della percentuale di DNA target presente.

La Real-Time PCR trova quindi applicazioni in diversi settori: la quantificazione virale (Niesters, 2001; Mengelle, 2003, Katoha *et al.*, 2008), l'analisi dell'espressione genica (Geese *et al.*, 2008), la valutazione dell'efficienza di un farmaco (drug therapy efficacy) (Leruez-Ville *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2003; Kogure *et al.*, 2004), l'individuazione di patogeni (Uhl *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2004; Perandin *et al.*, 2004; Watzinger *et al.*, 2004; Perlin *et al.*, 2008), la genotipizzazione (Donohoe *et al.*, 2000; Lyon *et al.*, 2001; Waterfall e Cobb, 2002; Bennett *et al.*, 2003; Wittwer *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2008), al campo immunologico (Adler *et al.*, 2003; Barletta *et al.*, 2004), alla tracciabilità molecolare nel settore alimentare (Lockley *et al.*, 2000).

Nel campo dell'analisi OGM la PCR real-time è la metodologia più applicata per la quantificazione e la detection del materiale transgenico. Per l'analisi di detection sono state utilizzate diverse chimiche real-time: SYBR, TaqMan®, MGB e molecular beacon e hanno mostrato la stessa efficienza in termini di amplificazione e cicli soglia su DNA estratto da soia OGM (Andersen *et al.*, 2006).

Chimiche impiegate per la rivelazione dell'amplificato

Le metodologie che possono essere utilizzate per rivelare la presenza dell'amplificato possono essere diverse.

SYBR® Green I

La soluzione più economica è rappresentata dall'uso dell'agente intercalante SYBR® Green I. Si tratta di un colorante fluorescente simile all'etidio bromuro che intercalandosi nella doppia elica, nel solco minore del DNA, incrementa di circa cento volte la sua fluorescenza, generando quindi un segnale visibile dal rivelatore proporzionale al numero di copie presenti. Il SYBR® Green I (e più recentemente il SYBER® Greener™) fa parte dei coloranti aspecifici sviluppati per le reazioni di PCR Real-Time: si tratta di una molecola fluorescente, in particolare una cianina asimmetrica la cui fluorescenza aumenta significativamente quando essa si trova complessata con il DNA a doppia elica: la molecola assorbe luce blu ($\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$) ed emette luce verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$) (fig. 4). Il legame del fluoroforo al DNA avviene secondo due modalità diverse: il SYBR® Green, infatti, è in grado sia di intercalarsi tra le coppie di nucleotidi della doppia elica, sia di legarsi al solco minore che si forma nella molecola di DNA (Zipper *et al.*, 2004).

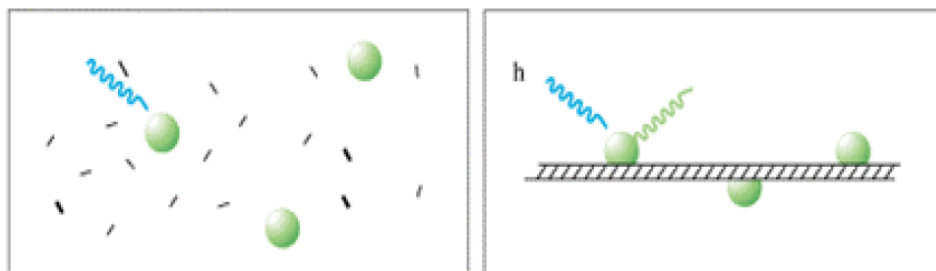


Figura 4: Attività delle molecole di SYBR Green

Il modo di legarsi al DNA rende questo intercalante un reporter generalmente aspecifico, che permette di monitorare l'andamento della reazione, ma non consente di riconoscere a priori il prodotto amplificato che determina la comparsa del segnale di fluorescenza: basandosi solamente sul grafico di amplificazione non è possibile sapere se la fluorescenza è data dal target voluto o da un prodotto aspecifico, è però possibile riconoscere i vari prodotti in base all'analisi delle curve di melting.

Per Temperatura di melting (T_m) si intende la temperatura alla quale un DNA a doppio filamento subisce denaturazione: dipende da diversi fattori, fra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento. Questo permette di identificare più specie di ampliconi prodotti nella stessa reazione e di eventuali amplificati aspecifici, come i dimeri di primer. Basandosi su questo principio, è stato dimostrato recentemente che è possibile sviluppare reazioni di Real-Time PCR multiplex con un numero anche elevato di target, purché i frammenti amplificati abbiano delle T_m sufficientemente differenti. Hernandez *et al.*, (2003) hanno sviluppato saggi di Real-Time PCR duplex e triplex con SYBR[®] Green I per identificare contemporaneamente più OGM (diversi eventi di soia e mais); un altro gruppo di ricerca, invece, ha messo a punto una reazione di Real-Time duplex PCR per rilevare la presenza di batteri patogeni contaminanti delle acque e degli alimenti in campioni di feci (Fukushima *et al.*, 2003).

L'analisi della curva di dissociazione viene fatta dallo strumento al termine della reazione di amplificazione e consiste in un graduale innalzamento della temperatura, a partire da una temperatura prefissata (ad esempio 60°C) fino ad arrivare a circa 90-95°C. Lo strumento rileva il segnale di fluorescenza per tutta la durata dell'analisi: all'aumentare della temperatura il SYBR[®] Green si separa lentamente dalle molecole di DNA, ma al momento della denaturazione dei due filamenti si ha un drastico calo della fluorescenza.

Un software apposito trasforma i dati, relativi alla curva di melting, nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale: ne risulta un grafico che mostrerà un picco nel punto di massima pendenza della curva di melting, e tale picco sarà in corrispondenza della temperatura di melting di quello specifico amplicone.

Sonde FRET

Un'altra tecnica per rivelare l'amplificato è data dall'utilizzo di sonde ad ibridazione, specifiche per la sequenza bersaglio, marcate con molecole fluorescenti (FRET, TaqMan[™], Molecular Beacons,

Scorpion). L'approccio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), sequenza specifico, è basato sul trasferimento di energia di risonanza fluorescente; un fluoroforo donatore, eccitato da una opportuna lunghezza d'onda, trasferisce la sua energia ad un fluoroforo accettore solo nel momento in cui si trova nelle sue immediate vicinanze. Il fluoroforo accettore emette luce ad una lunghezza d'onda superiore che viene rilevata in canali specifici. Il principio FRET dipende dalla vicinanza sterica dei due fluorofori, presenti su due sonde diverse, che nel caso che riconoscessero delle sequenze bersaglio ibridano uno davanti all'altro (fig. 5).

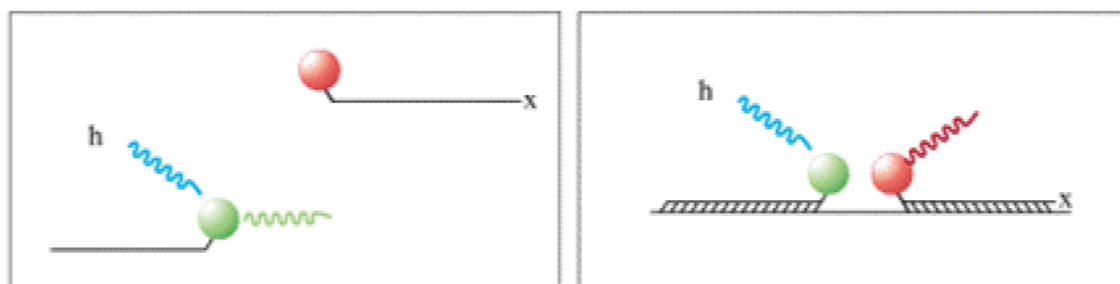


Figura 5: Principio del funzionamento delle sonde FRET

In assenza di amplificato non avviene il trasferimento di energia, il risultato finale è che la quantità di coppie di sonde ibridate aumenta assieme al prodotto di PCR; il segnale è proporzionale alla quantità di amplicone accumulato.

Questo tipo di sonde sono state utilizzate con successo in campo medico per evidenziare la presenza di sostituzioni di base (SNP) in grado di indurre nel paziente gravi malattie genetiche (Hartshorn, 2002; Van Dijk, 2002).

Sonde TaqMan™

Nel saggio TaqMan™ (Holland *et al.*, 1991; Heid *et al.*, 1996), la sonda fluorogenica presenta all'estremità 5' un fluoroforo detto "reporter" ed all'estremità 3' una molecola detta "quencher", in una configurazione di questo tipo, la molecola "quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del fluoroforo reporter. La sonda è complementare alla sequenza del DNA bersaglio compresa tra il "forward" e il "reverse" primer. Durante l'amplificazione, nella fase di ibridazione, sia i primer che la sonda si ibridano al filamento stampo, la sonda essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi. Durante l'estensione del primer, la DNA polimerasi incontra la sonda ibridata che le sbarrava la strada e quindi la degrada utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, portando così a termine la copiatura del frammento. Ogni qualvolta una sonda viene degradata dalla

Taq polimerasi, si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rilevabile dallo strumento. Per ogni coppia di prodotto PCR, una sonda viene degradata (fig. 6). La sonda TaqMan fornisce un'ulteriore specificità, eliminando la possibilità che siano rivelati prodotti amplificati aspecifici dovuti al “mismatch” e alla formazione di primer dimer.

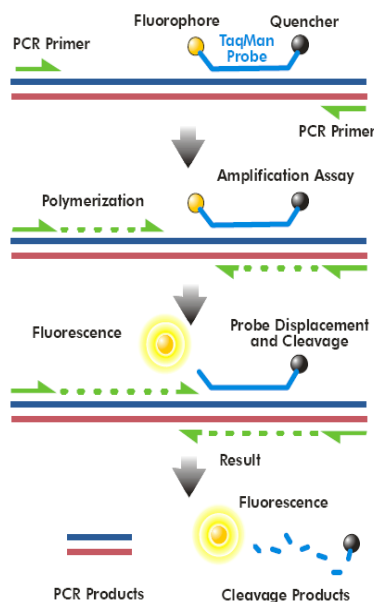


Figura 6: Funzionamento della PCR real-time con chimica TaqMan™

Molecular beacons

Un approccio alternativo vede l'impiego dei “molecular beacons” (Mhlanga *et al.*, 2001; Vet *et al.*, 2002; Abravaya, 2003; Tan, 2004). Questi sono oligonucleotidi a singolo filamento in grado di ibridizzare con uno specifico amplicone. Quando non sono legati essi si presentano in forma di “hairpin loop” e nelle due estremità terminali della forcina sono situati il “quencher”, costituito da due fluorofori ed il “reporter”, in modo che il primo impedisca al secondo di emettere fluorescenza. La sonda nel momento in cui si viene a formare il prodotto di amplificazione si ibrida, l'eliminazione dell'ingombro sterico, permette al reporter di emettere fluorescenza (via FRET).

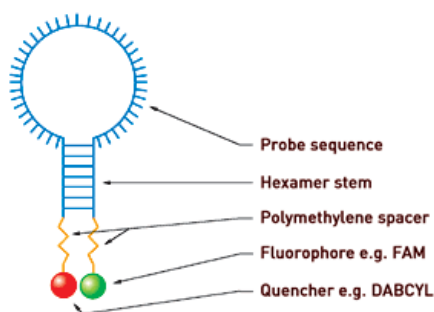


Figura 7: Esempio di molecular beacon

Sonde Scorpion™

I primer Scorpion™ (Saha *et al.*, 2001; Solinas *et al.*, 2001; Terry *et al.*, 2002) sono oligonucleotidi che presentano una porzione funzionale nel primer e una estensione in 5'. L'estensione, in grado di ibridarsi a un prodotto specifico, garantisce la specificità della sonda, due sequenze autocomplementari portano alle loro estremità un fluoroforo ed un quencher.

Nella struttura ad "hairpin loop" il "quencher" forma una struttura non fluorescente interagendo con il fluoroforo. Quando il primer interviene nella PCR in presenza di un appropriata sequenza bersaglio, si ha l'estensione del prodotto che presenterà una zona complementare a quella contenuta nella parte della sonda che contiene il quencher ed il reporter. La sonda quindi, con un movimento simile ad un colpo di frusta, andrà ad appaiarsi a questa zona complementare neosintetizzata. Il fluoroforo di conseguenza si allontanerà dal "quencher" e potrà emettere la specifica fluorescenza.

UniPrimer™

La reazione di amplificazione in Real-Time PCR può essere condotta anche utilizzando particolari primer chiamati UniPrimer™. L'UniPrimer™ consiste di una coda di 18 oligonucleotidi al 3' (Z sequence) e una sequenza intracomplementare al 5' marcata con molecole in grado di emettere fluorescenza per FRET.

La loro azione si svolge in maniera sequenziale ogni quattro cicli di amplificazione. Nel primo ciclo, il reverse primer che ha una particolare sequenza "tag", permette la sintesi del filamento bersaglio. Nel secondo ciclo utilizzando come innesco la sequenza "tag", il primer forward permette la sintesi di una sequenza complementare a quella sintetizzata precedentemente, a questo punto nel terzo ciclo l'UniPrimer™ ibrida con questa sequenza complementare attraverso la sequenza "tag", la struttura ad "hairpin" blocca, attraverso il "quencher", l'emissione di fluorescenza da parte del "reporter", nell'ultimo passaggio la sintesi del filamento da parte della polimerasi apre la struttura a forcina permettendo l'emissione della fluorescenza da parte del reporter.

Sonde LNA™

Un recente tipo di chimica che ha trovato una notevole espansione negli ultimi anni è quella che prevede l'impiego di sonde a LNA. Gli LNA® sono oligonucleotidi innovativi che contengono Locked Nucleic Acid™ (LNA), una base a LNA® è formata da un analogo di un acido nucleico che contiene un ponte metilenico tra il 2'-O e il 4'-C, questo ponte blocca in una conformazione 3'-endo l'anello ribofuranosico e chiude l'intera struttura in un anello rigido biciclico. Questa

particolare conformazione presenta caratteristiche d'ibridazione superiori ed una elevata biost rispetto ai convenzionali oligonucleotidi a DNA. Cambiando la conformazione dell'elica e aumentando la stabilità del duplex, l'integrazione di basi LNA[®] nella sequenza degli oligonucleotidi apre nuove prospettive negli studi di affinità sia con il DNA che con l'RNA. Sonde a LNA[®] possono essere usati per migliorare tecniche che richiedano sonde altamente specifiche, come nell'analisi SNP, in studi d'espressione e applicazioni quantitative per l'identificazione di transgeni. (Latorra *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2008; Salvi *et al.*, 2008).

Scopo della ricerca

La legislazione europea pone dei limiti alla presenza di OGM all'interno di alimenti, "food and feed", e nello stesso tempo permette la loro commercializzazione all'interno del mercato europeo. Perciò si rende necessario uno studio approfondito sulle metodologie utilizzate per l'analisi di OGM, sia per quanto riguarda lo studio del DNA che delle proteine.

Per quanto riguarda il DNA è importante definire un metodo di estrazione efficace da applicare su matrici alimentari differenti e che permetta un'analisi di DNA altamente degradato, sia in termini di processamento industriale, che in termini di condizioni di conservazione dell'alimento. Quindi il DNA ottenuto deve essere di buona qualità e utilizzabile per le successive analisi in PCR, sia per lo studio dei geni endogeni che dei transgeni. Per lo studio delle proteine è importante valutare l'efficacia dei sistemi utilizzati, anche perché spesso il livello delle proteine transgeniche presente negli alimenti risulta essere basso, sia in termini di percentuale che di disponibilità in seguito a lavorazioni industriali, e quindi difficilmente utilizzabile. Un altro punto critico è la modalità di campionamento del materiale analizzato, soprattutto per quanto riguarda le sementi, quasi sempre OGM. Le sementi sono trasportati spesso via nave, e nelle stive la loro distribuzione può variare di molto, perciò risulta essere importante definire una modalità di campionamento che origini dei campioni rappresentativi dell'intero lotto.

Perciò in questo lavoro di tesi si sono sviluppate diverse attività di ricerca:

- Verifica della modalità di campionamento determinata dal software OPACSA, sviluppato nell'ambito del progetto europeo COEXTRA, di farine di soia ottenute da semi stoccati in nave. L'analisi è stata effettuata su proteine tramite lateral flow strips commerciali.
- Verifica dell'efficienza di lateral flow devices sviluppati anch'essi nell'ambito del progetto COEXTRA, su farine di mais.
- Studio della degradazione del DNA estratto da pellets di mangime conservati: a temperatura ambiente, 4°C, -20°C. Sono state effettuate 4 estrazioni di DNA con metodo CTAB, la seconda estrazione è stata effettuata dopo 2 settimane dalla prima, la terza dopo 6 mesi, la quarta dopo 18 mesi. E' stata verificata l'amplificabilità del DNA estratto in PCR real-time TaqMan[®] con il gene endogeno zeina.
- Estrazione del DNA da vari tessuti di pianta di mais OGM MON810 100% con kit commerciale, e verifica dell'amplificabilità del DNA in PCR real-time duplex TaqMan[®], con i geni endogeni di mais zeina e alcool deidrogenasi, e con il transgene MON810.

- Verifica della presenza di OGM in merendine provenienti dalla grande distribuzione. E' stato estratto il DNA con metodo CTAB e analizzato in PCR end-point con primer specifici per il gene endogeno zeina e i componenti transgenici 35S, EPSPS e MON810. Successivamente è stata effettuata un'ulteriore analisi in PCR real-time con chimica SYBR[®]Greener[™] e TaqMan[®].
- Estrazione di DNA da pomodoro e conserve di pomodoro, con kit commerciale, e analisi in PCR end-point e PCR real-time con chimica SYBR[®]Greener[™] per la scelta di un gene endogeno da utilizzare in duplex con un transgene per la detection e quantificazione della componente OGM.

Materiali

Farine (Pellet)

Le farine utilizzate nel lavoro di studio della degradazione e amplificabilità del DNA sono riportate nella tabella 4. I pellet sono stati creati *in house* tramite l'utilizzo di un torchio a pressione di 130 bar.

Farina	Provenienza
Mais (<i>Zea mays L.</i>)	Consorzio agrario di Parma
Soia (<i>Glycine max L.</i>)	
Colza (<i>Brassica napus L.</i>)	
Girasole (<i>Helianthus annuus L.</i>)	
Orzo (<i>Hordeum vulgare L.</i>)	
Crusca	

Tabella 4: Farine utilizzate per lo studio della degradazione del DNA

Il pellet è composto da: 48% di farina di mais, 25% crusca, 10% orzo, 9% soia, 8% girasole.

Le farine di mais utilizzate per l'analisi con lateral flow devices provengono dalla FERA (Food and Environment Research Agency's), York, Inghilterra.

Semi di soia

I semi di soia utilizzati per l'analisi con lateral flow strip provengono dall'Istituto Superiore di sanità. Al fine di ottenere le farine, i semi sono stati macinati per 40 secondi.

Materiale vegetale

I vari tessuti di pianta di mais utilizzati per l'analisi in PCR real-time duplex sono: foglie, brattee, cariossidi, ovari, radici e trinciato. Il materiale è cresciuto in serra, e successivamente i singoli tessuti sono stati conservati a -80°C.

Alimenti

Per l'analisi della tracciabilità OGM è stata utilizzata una tipologia di campione commerciale, cioè una “merendina” acquistata in tre diversi supermercati e di due lotti diversi per ognuno. Le merendine di ogni lotto sono state macinate per 40 secondi al fine di ottenere materiale più omogeneo.

Per l'analisi sulla scelta del gene endogeno da utilizzare per la detection di OGM in conserva di pomodoro sono state utilizzate due diverse conserve acquistate presso un supermercato.

Metodi

Analisi immunologica di farine di soia campionate secondo il software OPACSA (OPTimal ACceptance Sampling by Attributes)

Il software OPACSA permette di definire il modo più economico di controllare la purezza dei lotti di granaglie (Kobilinsky et al., 2005). In questo caso si intende l'assenza di organismi geneticamente modificati, ma è applicabile anche in altri contesti. Un campione viene inviato al laboratorio per un'analisi iniziale, da questo campione vengono estratti uno o più sottocampioni, e viene quindi determinata la presenza o assenza di OGM per ognuno di loro. La procedura usata dai laboratori per controllare il primo campione è chiamato "piano di campionamento di accettabilità", ed è basato sull'analisi qualitativa per la presenza o assenza del difetto nel gruppo di granaglie.

Il campionamento secondo il software OPACSA deve essere effettuato in singolo e in doppio. Nel campionamento singolo, N gruppi di n semi sono macinati separatamente e analizzati per determinare l'assenza o presenza di OGM. Se ci sono X positivi sugli N gruppi, la proporzione OGM è stimata in base al rapporto X/N e il lotto è accettato se $X \leq A$, rifiutato se $X > A$, dove A è una soglia di accettabilità predeterminata.

Nel campionamento doppio, invece, N_1 gruppi di n_1 semi sono analizzati. Il lotto è accettato se $X_1 \leq A_1$, dove X_1 è il numero di gruppi positivi e A_1 la soglia predeterminata. Se $R_1 < X_1$ dove R_1 è una soglia predeterminata di rifiuto, allora il lotto è scartato. Se $A_1 \leq X_1 \leq R_1$, devono essere analizzati nuovi N_2 gruppi. Il lotto viene accettato se $X_2 \leq A_2(X_1)$, dove X_2 è il numero di positivi ottenuti fra gli N_2 gruppi e $A_2(X_1)$ una soglia predeterminata. La funzione $A_2: X_1 \rightarrow A_2(X_1)$ definisce per ogni valore di X_1 la soglia di accettabilità al secondo punto e deve essere una funzione decrescente di X_1 , perché più è grosso X_1 più piccolo deve essere X_2 per compensare. Nella classica modalità di controllo di qualità, questa funzione ha la forma $A_2 = A - X_1$ dove A_2 è un numero fissato. Il lotto è quindi accettato al secondo punto se $X_2 + X_1 \leq A$, e rifiutato se $X_2 + X_1 \geq R_2 = A_2 + 1$.

La procedura di campionamento prevede la suddivisione in due campionamenti, in base alla direttiva europea seguita:

- Due campionamenti secondo la raccomandazione europea sugli OGM (2004/787/CE), definiti B e B bis.

- Due campionamenti secondo la raccomandazione europea sulle micotossine (401/2006), definiti C e C bis. Questi campioni sono stati suddivisi, secondo la raccomandazione, in tre sottocampioni.

In seguito seguendo OPACSA sono stati effettuati i campionamenti singoli e doppi. Nel campionamento singolo sono stati macinati 451 semi di soia per ogni campione, e ogni campione è stato analizzato in triplicato. Nella prima fase del campionamento doppio sono stati macinati 395 semi per ogni campione, analizzato in singolo. Nella seconda fase invece 496 semi per campione, analizzato in doppio (tabella 5).

Campionamento singolo	Campionamento doppio – 1 step	Campionamento doppio – 2 step
BS 451	BD 395	BD2 496
BS 451	B BIS D 395	BD2 496
BS 451	C A D 395	B BIS D2 496
B BIS S 451	C B D 395	B BIS D2 496
B BIS S 451	C C D 395	C A D2 496
B BIS S 451	C BIS A 395	C A D2 496
C A S 451	C BIS B 395	C B D2 496
C A S 451	C BIS C 395	C B D2 496
C A S 451		C C D2 496
C B S 451		C C D2 496
C B S 451		C BIS A D2 496
C B S 451		C BIS A D2 496
C C S 451		C BIS B D2 496
C C S 451		C BIS B D2 496
C C S 451		C BIS C D2 496
C BIS A S 451		C BIS C D2 496
C BIS A S 451		
C BIS A S 451		
C BIS B S 451		
C BIS B S 451		
C BIS B S 451		
C BIS C S 451		
C BIS C S 451		
C BIS C S 451		

Tabella 5: Campioni analizzati

I semi sono stati macinati per 50 secondi, sono stati prelevati 8 g di farina e sono stati aggiunti 40 ml di acqua dentro una provetta da 50 ml. Il materiale è stato centrifugato per 5 minuti a 2000 rpm e, successivamente, sono stati prelevati 300 µl di surnatante in una eppendorf da 2 ml. Il surnatante è stato quindi analizzato con la lateral flow strip AGRASTRIP™ (Romer Labs, Tulln, Austria) specifico per l'identificazione della proteina CP4 EPSPS presente nella soia RR.

Analisi immunologica di farine contenenti mais tramite lateral flow devices (CI-Bt LFD)

Sono state analizzate sette tipologie di farine di mais, trattate e processate diversamente. Sono stati prelevati 200 mg di farina, in una eppendorf da 2 ml, per ogni tipologia. E' stato aggiunto 1 ml di buffer TGT, e il tutto è stato mescolato per inversione per 10 secondi. Il materiale è stato lasciato a riposare per 5 minuti e infine è stato inserito il lateral flow device CI-Bt specifico per l'identificazione della proteina Cry1Ab, sviluppato all'interno del progetto europeo Co-Extra in collaborazione con Fera (Food and Environment Research Agency, York, Inghilterra) e INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)

Estrazione di DNA da foglie

Il DNA genomico di foglia di mais è stato estratto con un metodo CTAB specifico per tessuti di pianta (Monsanto) modificato.

Il protocollo è stato applicato per 3 g di tessuto di foglia, precedentemente macinati in mortaio con pestello e azoto liquido, pesati in una provetta da 50 ml. Sono stati utilizzati 12,125 ml di un buffer di estrazione CTAB, 250 µl di β-mercaptoetanololo (2%) e 62 µl di proteinasi K (20 mg/ml). Il materiale è stato incubato per 60 minuti a 55°C. Sono stati aggiunti 20 ml di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) e il tutto è stato mescolato per inversione. La soluzione è stata successivamente centrifugata per 10 minuti a 13000 xg per separare la fase organica da quella acquosa, che è stata trasferita in una nuova provetta da 50 ml. Queste ultime due operazioni sono state ripetute altre 2 volte. Il DNA è stato fatto precipitare aggiungendo 2/3 di volume di isopropanolo (-20°C), mescolando successivamente per inversione e lasciando il tutto a -20°C overnight. Il DNA è stato successivamente pellettizzato tramite centrifugazione a 13000 xg per 20 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto è stato dissolto in 2 ml di TE (pH 8) e il tutto è stato trasferito

in una nuova provetta da 15 ml. Successivamente sono stati aggiunti 40 μ l di RNasi (10 mg/ml) per rimuovere l'RNA, incubando a 37°C per 30 minuti. Per estrarre il DNA sono stati aggiunti 2 ml di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) e centrifugato a 13000 xg per 10 minuti. La fase acquosa è stata trasferita in una nuova provetta da 15 ml ed è stato ripetuto lo step precedente. E' stato aggiunto ½ volume di ammonio acetato 7,5 M con 2 volumi di etanolo 100% alla fase acquosa, il tutto è stato mescolato per inversione e il DNA è stato messo a precipitare a -20°C per 30 minuti. In seguito la soluzione è stata centrifugata a 13000 xg per 20 minuti, al fine di far precipitare il DNA. E' seguito il lavaggio del pellet di DNA ottenuto tramite l'utilizzo di 1 ml di etanolo (70%), con una successiva centrifugazione a 13000 xg per 5 minuti. L'etanolo è stato rimosso e il pellet messo ad essiccare per 20 minuti a 37°C. Successivamente il pellet è stato disciolto in 500 μ l di TE.

Estrazione di DNA da farine e merendine

Il DNA genomico presente nelle farine e nelle merendine è stato estratto con un metodo CTAB specifico per farine, validato dal CRL (Community Reference Laboratory) (ISO 21571:2005 annex A.3) e ottimizzato dall'Istituto Superiore di Sanità per il suo utilizzo in matrici alimentari e in mangimi.

Per i pellet di mangime e le farine è stato utilizzato 1g di materiale, mentre per le merendine 600 mg di materiale. I volumi riportati di seguito sono specifici per le farine. In una provetta da 50 ml è stato aggiunto 1g di materiale con 2 ml di acqua sterile, il tutto è stato vortexato per 30 secondi e lasciato fermo a temperatura ambiente per 5 minuti. In seguito si sono aggiunti 6,5 ml di soluzione tampone CTAB (componenti e concentrazioni in tabella 6), seguito da vortex per 30 secondi.

Componenti	Concentrazione finale
Tris HCl	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
CTAB	20 g/l

Tabella 6: Componenti del tampone di estrazione

Sono stati aggiunti 50 μ l di RNasi (10 mg/ml), e la soluzione è stata messa ad incubare a 65°C per 30 minuti; dopo sono stati aggiunti 50 μ l di proteinasi K e nuovamente la soluzione è stata messa ad incubare a 65°C per 30 minuti. Il tutto è stato messo a centrifugare a 12000 xg per 10 minuti. Sono

stati trasferiti 4,5 ml di surnatante in una nuova provetta da 15 ml e aggiunto un pari volume di cloroformio, seguito da miscelazione. La soluzione è stata centrifugata a 12000 xg per 15 minuti. E' stato ripetuto il trattamento con cloroformio e la centrifugazione. Sono stati quindi prelevati 4,5 ml di surnatante e aggiunti 2 volumi di soluzione CTAB precipitante (componenti e concentrazioni in tabella 7), al fine di far precipitare il DNA e il tutto è stato lasciato riposare overnight a 4°C.

Componenti	Concentrazione finale
NaCl	400 mM
CTAB	5 g/l

Tabella 7: Componenti e concentrazioni del buffer precipitante

La provetta con il materiale è stata centrifugata a 12000 xg per 10 minuti, per fare precipitare il DNA. Il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato disciolto in 1,75 ml di NaCl (1,2 M) con l'aggiunta di un uguale volume di cloroformio. E' seguita una centrifugazione a 12000 xg, e il surnatante ottenuto è stato trasferito in una eppendorf da 2 ml. Sono stati aggiunti 0,6 volumi di isopropanolo, la soluzione è stata miscelata per inversione e lasciata a -20°C per 30 minuti. Il tutto è stato centrifugato a 12000 xg per 15 minuti, seguito dalla rimozione dell'isopropanolo. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo (70%) tramite inversione e una successiva centrifugazione a 12000 xg per 10 minuti. L'etanolo è stato successivamente rimosso e il pellet lasciato ad essiccare per 20 minuti a 37°C. Il precipitato è stato infine disciolto in 100 µl di acqua sterile.

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich)

L'estrazione di DNA dai vari tessuti di pianta di mais è stata effettuata con un kit commerciale specifico per l'estrazione di DNA genomico da pianta.

Sono stati utilizzati 100 mg di tessuto, precedentemente macinato con pestello e mortaio in azoto liquido. Sono stati aggiunti 350 µl di soluzione di lisi A e 50 µl di soluzione di lisi B, seguito da vortex. La soluzione è stata successivamente incubata a 65°C per 10 minuti con l'aggiunta di RNasi (50 unità) . Sono stati aggiunti 130 µl di soluzione precipitante per far precipitare i residui cellulari, lasciando il materiale per 5 minuti in ghiaccio. Segue una centrifugazione a 16000 xg per 5 minuti per far pellettizzare i residui cellulari, le proteine e i polisaccaridi. Il surnatante ottenuto è stato inserito su una colonnina di filtrazione GenElute™ e successivamente centrifugato a 16000 xg per 1 minuto, questo passaggio è servito per eliminare i residui cellulari non rimossi dal precedente step.

Sono stati aggiunti 700 µl di Binding Solution al precedente surnatante con successivo mescolamento per inversione. Sono stati aggiunti 500 µl di column preparation solution alla colonnina GenElute™ Miniprep Binding Column e centrifugato a 12000 xg per 1 minuto, al fine di massimizzare il legame del DNA alla membrana della colonnina, il liquido ottenuto è stato scartato. Successivamente sono stati caricati 700 µl della miscela Binding Solution e DNA nella colonnina GenElute™ Miniprep Binding Column, e il tutto è stato centrifugato a 16000 xg per 1 minuto. Il liquido ottenuto è stato scartato, e si ripetuto il passo precedente con il materiale rimasto. Il liquido è stato scartato con la provetta, lasciando la colonnina, che è stata inserita in una nuova provetta. Si è quindi passato alla fase di lavaggio della colonnina con l'utilizzo di 500 µl di Wash Solution, seguito da una centrifugazione a 16000 xg per 1 minuto. Il liquido è stato scartato e si è ripetuto il passo precedente con una centrifugazione di 16000 xg per 3 minuti per eliminare tutto l'etanolo residuo presente nella Wash solution. Si sono aggiunti 100 µl di Elution Solution, preriscaldata a 65°C, direttamente sul filtro della colonnina per eluire il DNA. Il materiale è stato successivamente centrifugato a 16000 xg per 1 minuto, al fine di ottenere il DNA eluito.

Wizard®

L'estrazione di DNA da conserva di pomodoro è stata effettuata tramite il kit commerciale Wizard® (Promega) con l'utilizzo di siringhe. Sono stati utilizzati 300 mg di campione, ai quali sono stati aggiunti 860 µl di tampone di estrazione, 100 µl di cloridrato di guanidina (5M) e 40 µl di proteinasi K, il tutto all'interno di una provetta da 2 ml. Segue un incubazione con agitazione (500 rpm) overnight a 50°C. Si lascia a raffreddare per 2 minuti e si centrifuga a 14000 rpm.

Vengono successivamente trasferiti 500 µl di surnatante in una nuova provetta da 2 ml e mescolati con 5 µl di RNasi. La miscela è stata incubata per 10 minuti a 37°C. E' stato aggiunto 1 ml di di Wizard® Resin e il tutto è stato mescolato dolcemente per 5 minuti. La miscela è stata spinta nella colonnina Wizard®, presente all'interno di una provetta da 2 ml, tramite l'utilizzo di una siringa da 10 ml. La provetta è stata eliminata e sostituita con una nuova, e la miscela DNA-resina è stata lavata con isopropanolo (80%).

La provetta contenente l'etanolo è stata scartata e sostituita con una da 1,5 ml. Le provette contenenti la colonnina sono state centrifugate per 30 secondi a 10000 rpm, e successivamente lasciate per 30 minuti a temperatura ambiente per portare all'evaporazione l'isopropanolo residuo. Successivamente le provette sono state centrifugate per 10 minuti a 14000 rpm e lasciate

nuovamente ad essiccare per 30 minuti; alla provetta sono stati aggiunti 50 µl di tampone di eluizione, preriscaldato a 50°C, per portare all'eluizione del DNA. Si lascia a riposare per 1 minuto a temperatura ambiente e si centrifuga per 1 minuto a 10000 rpm. La soluzione di DNA ottenuta si trasferisce in una nuova provetta da 1,5 ml.

Analisi spettrofotometrica del materiale estratto

Utilizzata per stimare la concentrazione e la qualità del DNA nell'estratto da foglie, farine e prodotti alimentari. Sono stati valutati i valori di assorbanza a 260 nm e 280 nm, con lo spettrofotometro *Beckman DU640* ed è stato calcolato il rapporto 260/280 nm per determinare la purezza rispetto a contaminazioni proteiche.

PCR qualitativa per lo studio della degradazione del DNA estratto in pellet di mangime

Lo studio della degradazione del DNA è stato svolto mediante l'utilizzo di coppie di primer disegnate sulla sequenze dei geni endogeni di mais: zeina (NCBI M23537) e alcool deidrogenasi (NCBI X04050) (tabella 8). Le zeine sono delle proteine di riserva solubili in alcool, ricche di metionina, che nel seme di mais rappresentano circa il 50% delle proteine dell'endosperma (Chui *et al.*, 1995). Il gene analizzato origina una proteina di 10 kDa.

Invece il gene che origina un enzima alcool deidrogenasi (40 kDa) è il gene *Adh1*.

Gene	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Amplicone
Zeina	GGGCTTGCCAGCTTGATG	AGGCCAACAGTTGCTGCAG	55 bp
Alcool deidrogenasi	TGTGTGTTGGGTTGCATCT	GCACCTTCTGCAGCCTTAAC	56 bp

Tabella 8: sequenze dei primer e dimensione degli ampliconi attesi utilizzati per lo studio di degradazione.

Nella tabella 9 sono riportati i reagenti utilizzati per la PCR, i loro volumi e concentrazioni

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μ l)
DNA	20 ng/ μ l	40 ng/ μ l	2
Buffer PCR	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	0,5
dNTPs	10 mM	0,4 mM	1
Primer Forward	10 μ M	0,24 μ M	0,6
Primer Reverse	10 μ M	0,24 μ M	0,6
FastStart Taq DNA polimerasi (Roche Applied Science)	5U/ μ l	1 U	0,2
Acqua	/	/	17,6
Volume finale	/	/	25

Tabella 9: Reagenti, concentrazioni e volumi della reazione di PCR

Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK), nelle condizioni riportate in tabella 10.

Fase PCR	Tempo	Temperatura °C	Cicli
1	10 minuti	95	1
2	30 secondi	95	40
	30 secondi	60	
	30 secondi	72	
3	7 minuti	72	1
4	Hold	4	/

Tabella 10: Impostazioni della reazione di PCR

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio a concentrazione 3,5% (w/v) (Sigma Aldrich, Sant Louis, USA) in tampone di corsa TAE 1X contenente l'agente intercalante GelRed 1000X (Biotium, Hayward, USA). I gel sono stati visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

PCR qualitativa per la verifica dell'amplificazione del gene endogeno di pomodoro β -fruttosidasi su diverse matrici

Le sequenze dei primers utilizzati provengono dal lavoro di Chaouachi *et al.* (2008), denominati PomTom (tabella 11). La proteina originata è responsabile dell'idrolisi del saccarosio in glucosio e fruttosio, sia in patata che pomodoro.

Gene	Primer forward 5'-3' (Lat1)	Primer reverse 5'-3' (Lat2)	Amplicone
β -fruttosidasi	CTGCCTCCGTCAAGATTTGGTCACT	CTCTTCCCTTTCTTGATGG	143 bp

Tabella 11: Sequenza dei primers PomTom

I reagenti utilizzati per la PCR sono riportati nella tabella 12

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μ l)
DNA	20 ng/ μ l	40 ng/ μ l	2
Buffer PCR	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	0,5
dNTPs	10 mM	0,4 mM	1
Primer Forward	10 μ M	0,24 μ M	0,6
Primer Reverse	10 μ M	0,24 μ M	0,6
FastStart Taq DNA polimerasi (Roche Applied Science)	5U/ μ l	1 U	0,2
Acqua	/	/	17,6
Volume finale	/	/	25

Tabella 12: Reagenti della PCR

Real-time PCR TaqMan[®] Simplex su DNA estratto da pellet

Per lo studio dell'amplificabilità del DNA estratto da pellet, in real-time PCR, sono stati utilizzati una coppia di primer e una sonda TaqMan[®] MGB (tabella 13) costruiti sul gene endogeno zeina (NCBI M23537). I primers utilizzati sono gli stessi della PCR end-point e, con la sonda, sono stati disegnati con il software *Primer Express* (Applied Biosystem).

Sonda	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Amplicone
VIC-CGTGTCCGTCCCTG-MGB	GGGCTTGCCAGCTTGATG	AGGCCAACAGTTGCTGCAG	55 bp

Tabella 13: Sequenza della sonda TaqMan[®]

I reagenti utilizzati, le concentrazioni applicate e i volumi sono riportati nella tabella 14

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μ l)
DNA	10 ng/ μ l	60 ng/ μ l	6
Buffer PCR TaqMan Master Mix (Applied Biosystem)	2X	1X	10
Primer Forward	10 μ M	0,75 μ M	1,5
Primer Reverse	10 μ M	0,75 μ M	1,5
Sonda	10 μ M	0,320 μ M	0,8
Acqua	/	/	0,2
Volume finale	/	/	20

Tabella 14: Reagenti, concentrazioni e volumi della reazione di PCR real-time.

Le reazioni di PCR sono state effettuate con lo strumento ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), con il seguente profilo termico (tabella 15):

Fase PCR	Tempo	Temperatura $^{\circ}$ C	Cicli
1	10 minuti	95	1
2	30 secondi	95	40
	30 secondi	60	
	30 secondi	72	
3	7 minuti	72	1
4	Hold	4	/

Tabella 15: Parametri della PCR

Real-time PCR TaqMan[®] duplex su DNA estratto da tessuti di pianta di mais

In real-time PCR sono stata utilizzate una coppia di primer e una sonda specifica costruita sui geni endogeni zeina (NCBI M23537) e alcool deidrogenasi (NCBI X04050), e sul costrutto transgenico MON810 (NCBI AY326434.1). Le sequenze dei primer e sonda specifici per alcool deidrogenasi provengono dal lavoro di Scholdberg *et al.* (2009) tabelle 16 e 17 sono riportate le sequenze dei primers e delle sonde utilizzate.

Gene	Sonda
Zeina	VIC-CGTGTCCGTCCTG-MGB
MON 810	FAM-AACAACCCAAACATCA-MGB
Alcool Deidrogenasi	NED-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-MGB

Tabella 16: Sequenze delle sonde utilizzate

Gene	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Amplicone
Zeina	GGGCTTGCCAGCTTGATG	AGGCCAACAGTTGCTGCAG	55 bp
MON 810	ACCAAGCGCCATGGA	GGCAGTTGTACGGGATGCA	57 bp
Alcool Deidrogenasi	CGTCGTTTCCCATCTCTTCTCC	CCACTCCGAGACCCTCAGTC	135 bp

Tabella 17: Sequenze dei primers utilizzati

I reagenti utilizzati, le concentrazioni applicate e i volumi sono riportati nella tabella 18. Le concentrazioni dei primer sono state determinate in precedenti lavori effettuati presso il nostro laboratorio, applicati per l'analisi di farine di mais OGM.

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μ l)
DNA	10 ng/ μ l	40 ng/ μ l	4
Buffer PCR TaqMan Master Mix (Applied Biosystem)	2X	1X	10
Primer Forward Endogeno	10 μ M	0,0375 μ M	0,075
Primer Reverse Endogeno	10 μ M	0,0375 μ M	0,075
Sonda Endogeno	10 μ M	0,2 μ M	0,4
Primer Forward MON 810	10 μ M	0,18 μ M	0,36
Primer Reverse MON 810	10 μ M	0,18 μ M	0,36
Sonda MON 810	10 μ M	0,2 μ M	0,4
Acqua	/	/	4,33
Volume finale	/	/	20

Tabella 18: Reagenti utilizzati per la PCR

Le reazioni di PCR sono state effettuate con lo strumento ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), con il seguente profilo termico (tabella 19):

Fase PCR	Tempo	Temperatura $^{\circ}$ C	Cicli
1	10 minuti	95	1
2	30 secondi	95	40
	30 secondi	60	
	30 secondi	72	
3	7 minuti	72	1
4	Hold	4	/

Tabella 19: Parametri della PCR

Real-time PCR SYBR[®] Greener[™] simplex su DNA estratto da campione commerciale e da conserva di pomodoro

In real-time PCR con chimica SYBR sono state utilizzate diverse coppie di primer specifici per diverse sequenze, sia per i geni endogeni che i transgeni. Le sequenze dei primers, e i relativi geni analizzati nel DNA estratto dal campione commerciale, sono riportati nella tabella 20. Le sequenze dei primer specifici per l'EPSPS sono stati disegnati con il software on-line *Primer 3*.

Gene	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Amplicone
Zeina	GGGCTTGCCAGCTTGATG	AGGCCAACAGTTGCTGCAG	55 bp
Alcool deidrogenasi	TGTGTGTTGGGTTTGCATCT	GCACCTTCTGCAGCCTTAAC	56 bp
35S	CGCACAATCCCCTATCCTT	AGCTTGTGACGCGTGCCTCT	82 bp
EPSPS	CGCGATCATACGGAAAAGAT	ATCCGTCTCGACGGTAAGGT	60 bp
MON 810	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	92 bp

Tabella 20: Sequenze dei primer utilizzati nella PCR

Per l'analisi del DNA estratto da conserva di pomodoro sono stati utilizzati primer relativi al gene endogeno di pomodoro LAT52. Questo gene codifica per una proteina fiore specifica, e sembra coinvolta nello sviluppo del polline. Sono state utilizzate sequenze di primer presenti nell'articolo di Yang *et al* (2005), Lat1 e Lat2 (tabella 21).

Gene	Primer forward 5'-3' (Lat1)	Primer reverse 5'-3' (Lat2)	Amplicone
Lat 52	AGACCACGAGAACGATATTTGC	TTCTTGCCTTTTCATATCCAGACA	92 bp

Tabella 21: Sequenze dei primer utilizzati per il gene endogeno LAT52

I reagenti utilizzati per le merendine, le concentrazioni applicate e i volumi sono riportati nella tabella 22. Per la PCR applicata su DNA estratto da conserva di pomodoro i dati sono riportati nella tabella 23.

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μl)
DNA	/	/	4
Buffer PCR SYBER[®] Greener[™] (Invitrogen)	2X	1X	7,5
Primer Forward	10 μM	0,75 μM	1,125
Primer Reverse	10 μM	0,75 μM	1,125
Acqua	/	/	1,25
Volume finale	/	/	15

Tabella 22: Reagenti, concentrazioni e volumi della reazione di PCR con DNA estratto da campione commerciale

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μ l)
DNA	/	/	4
Buffer PCR SYBER [®] Greener [™] (Invitrogen)	2X	1X	7,5
Primer Forward	10 μ M	0,75 μ M	1,125
Primer Reverse	10 μ M	0,75 μ M	1,125
Acqua	/	/	1,25
Volume finale	/	/	15

Tabella 23: Reagenti, concentrazioni e volumi della reazione di PCR con DNA estratto da conserva di pomodoro

Le reazioni di PCR sono state effettuate con lo strumento ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), con il seguente profilo termico (tabella 24):

Fase PCR	Tempo	Temperatura °C	Cicli
1	10 minuti	95	1
2	30 secondi	95	40
	30 secondi	60	
	30 secondi	72	
3	7 minuti	72	1
4	Hold	4	/

Tabella 24: Parametri della PCR

Real-time PCR TaqMan[®] simplex su DNA estratto da campione commerciale

Per l'analisi in real-time PCR del DNA estratto da campione commerciale sono state utilizzate diverse coppie di primer specifici per i geni endogeni zeina e alcool deidrogenasi, e per il promotore 35S (tabelle 25 e 26). I primer e la sonda specifici per il promotore 35S sono stati disegnati con il software *Primer Express* (Applied Biosystem).

Gene	Sonda
Zeina	VIC-CGTGTCCGTCCTG-MGB
Alcool deidrogenasi	NED-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-MGB
35S	FAM-ATGGACCCCCACCCACGAGGA-TAMRA

Tabella 25: Sequenze delle sonde utilizzate

Gene	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Amplicone
Zeina	GGGCTTGCCAGCTTGATG	AGGCCAACAGTTGCTGCAG	55 bp
Alcool deidrogenasi	CGTCGTTTCCCATCTCTTCTCC	CCACTCCGAGACCCTCAGTC	135 bp
35S	GCCGACAGTGGTCCCAA	GGAACGTCTTCTTTTCCACGAT	65 bp

Tabella 26: Sequenze dei primer utilizzati nella PCR

I reagenti utilizzati, le concentrazioni applicate e i volumi sono riportati nella tabella 27.

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (μ l)
DNA	/	/	2
Buffer PCR TaqMan Master Mix (Applied Biosystem)	2X	1X	7,5
Primer Forward	10 μ M	0,75 μ M	1,125
Primer Reverse	10 μ M	0,75 μ M	1,125
Probe	10 μ M	0,320 μ M	0,6
Acqua	/	/	2,65
Volume finale	/	/	15

Tabella 27: Reagenti, concentrazioni e volumi della reazione di PCR real-time.

Le reazioni di PCR sono state effettuate con lo strumento ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), con il seguente profilo termico (tabella 28):

Fase PCR	Tempo	Temperatura $^{\circ}$ C	Cicli
1	10 minuti	95	1
2	30 secondi	95	40
	30 secondi	60	
	30 secondi	72	
3	7 minuti	72	1
4	Hold	4	/

Tabella 28: Parametri della PCR

Risultati e Discussione

Analisi immunologica di farine di soia campionate secondo il software OPACSA (OPTimal ACceptance Sampling by Attributes).

E' stata effettuata una prima analisi su un primo gruppo di campioni, di seguito sono riportate le immagini delle strip utilizzate. Nel campionamento semplice ogni campione è stato analizzato in triplicato (fig. 8), e nel campionamento doppio una sola analisi per campione (fig.9)

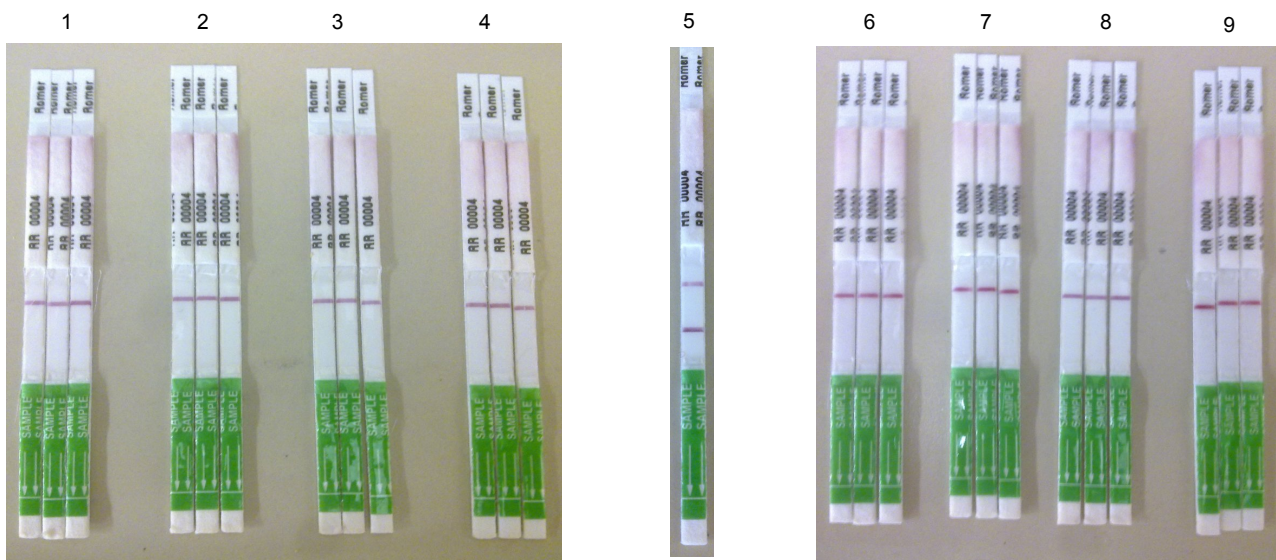


Figura 8 : Foto del 1 campionamento semplice di OPACSA. 1 – BS; 2- B BIS; 3- CA S; 4 – CB S; 5 – Controllo positivo farina di soia RR 1,5%; 6 – CC S; 7 – CBISA S; 8 – CBISB S; 9 – CBISC S.

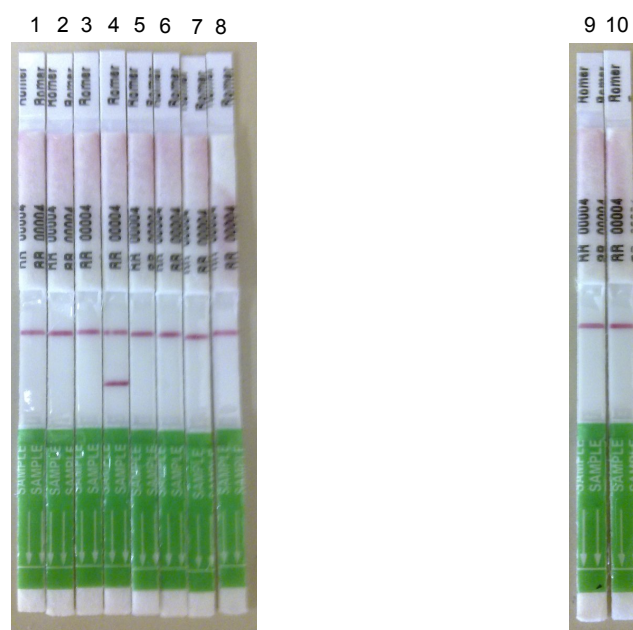


Figura 9: Foto del primo campionamento doppio. 1 – BD; 2- BBISD; 3- CAD ; 4 – CBD; 5 – CCD ; 6 – CBISA D; 7 – CBISB D; 8 – CBISC D; 9 – 10 CBDN2.

Per il campionamento singolo dall'analisi delle strip in figura 8 risulta che nei campioni analizzati non vi sono proteine EPSPS.

Dall'analisi del campionamento doppio risulta che il campione CBD compare il bandeggio relativo della proteina EPSPS, e in base alla modalità di analisi OPACSA prevista per il campionamento doppio si è passati ad analizzare il relativo secondo campione, in doppio. Che ha dato esito negativo.

Si è quindi proceduto all'analisi di un secondo stock di farine di soia, sempre con la stessa modalità

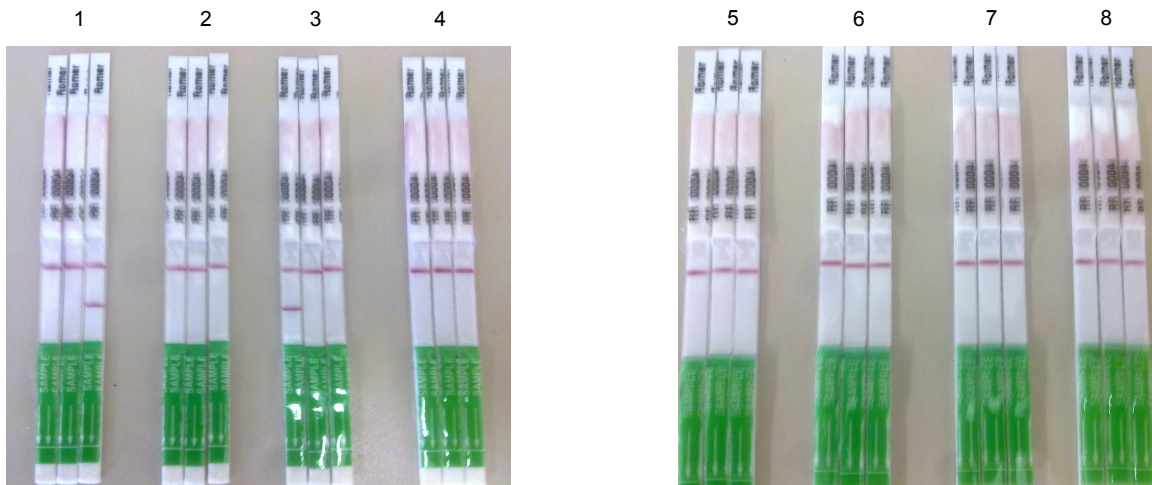


Figura 10: Foto del 2 campionamento semplice di OPACSA. 1 – CA; 2- CB; 3- CC ; 4 – CBISA ; 5 – CBISB 6 – CBISC ; 7 – B ; 8 – BBIS .



Figura 11: Foto del 2 campionamento doppio di OPACSA. 1 – BD; 2- BBISD; 3- CAD ; 4 – CBD; 5 – CCD ; 6 – CBISA D; 7 – CBISB D; 8 – CBISC D; 9 – 10 CBDN2.

Nel campionamento singolo i campioni CA e CB hanno mostrato in una sola analisi del triplicato la banda positiva, mentre nel campionamento doppio non sono risultati campioni positivi, e quindi non si è proceduto ad ulteriori analisi.

Analisi immunologica di farine contenenti mais transgenico tramite lateral flow devices (CI-Bt LFD)

Il lavoro è consistito nel verificare l'affidabilità di prototipi di LFD sviluppati nell'ambito del progetto COEXTRA. Nell'immagine successiva sono riportate le foto relative al controllo negativo e positivo di farine di mais (fig. 12).

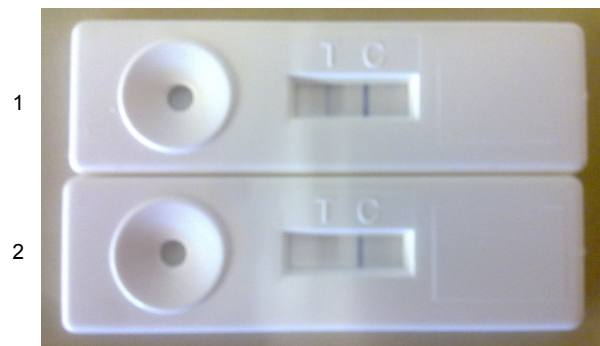
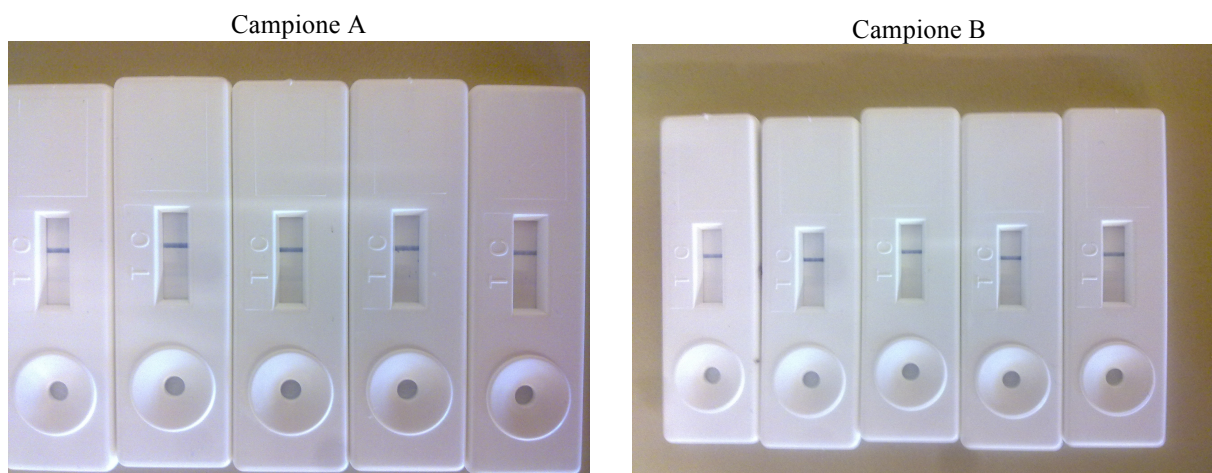


Figura 12: LFD, 1 – Campione di farina di mais MON810; 2 - Campione di farina non OGM.

Sono stati analizzati 7 diversi campioni di farina: A, B, C, D, E, F, G; di seguito sono riportate le foto (fig. 13) relative degli LFD utilizzati per la loro analisi. Ogni campione è stato analizzato in quintuplicato.



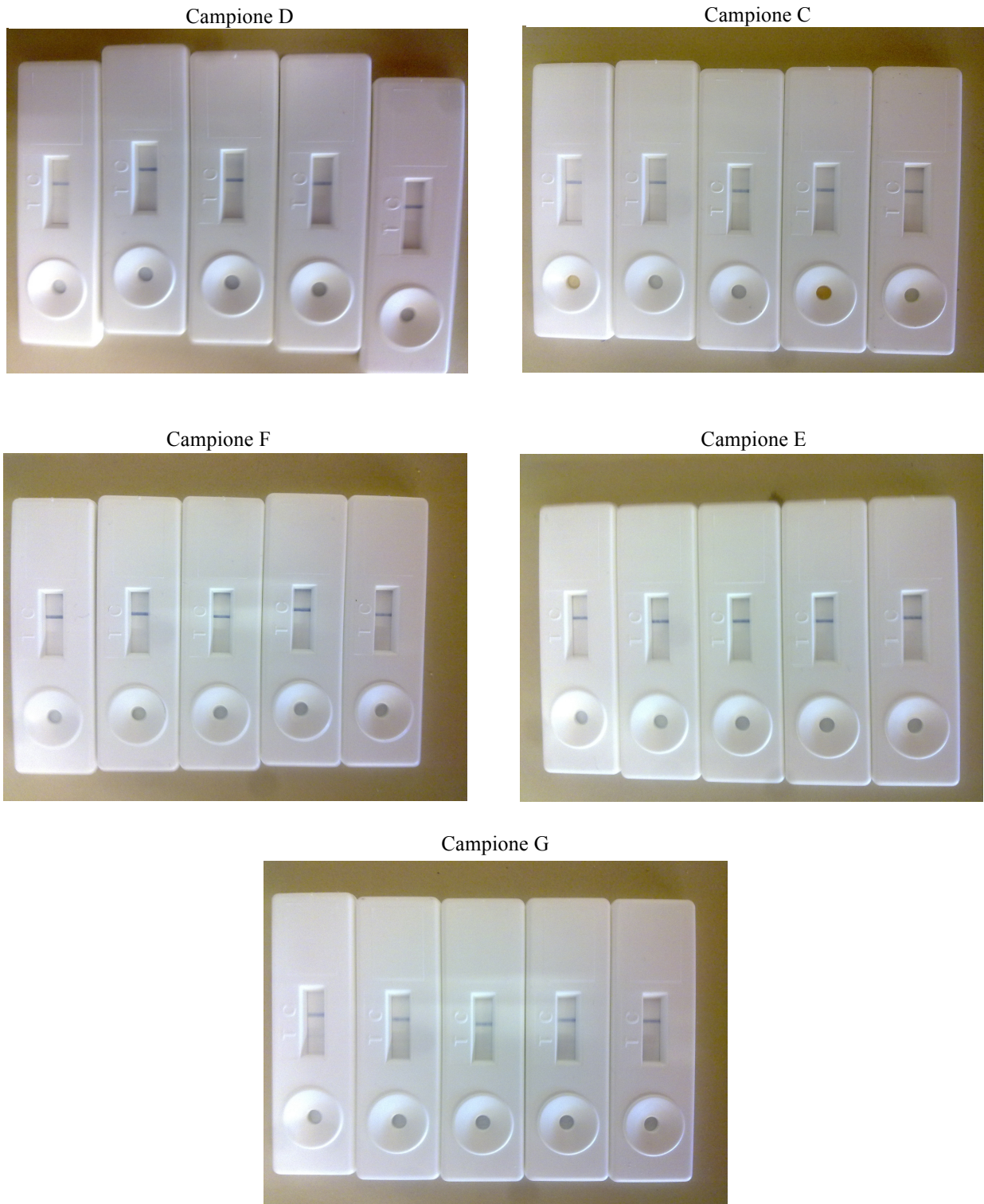


Figura 13: LFDs, Campioni A, B, C, D, E, F, G. Sono riportate le cinque strip utilizzate per l'analisi di ogni campione. La linea più visibile corrisponde al controllo positivo (C) di avvenuta reazione, mentre a T compare la linea di presenza della proteina transgenica.

	LFD	Risultato		LFD	Risultato
A	1	-	E	21	-
	2	-		22	+
	3	-		23	+
	4	-		24	-
	5	-		25	-
B	6	+	F	26	-
	7	+		27	-
	8	+		28	-
	9	+		29	?
	10	+		30	-
C	11	+	G	31	+
	12	+		32	+
	13	+		33	+
	14	+		34	+
	15	+		35	+
D	16	-	-	36	-
	17	-	+	37	+
	18	-			
	19	-			
	20	-			

Tabella 29: Riassunto dei risultati ottenuti. Ogni LFD è stato stato numerato come previsto dal piano sviluppato dal COEXTRA. Gli ultimi due campioni (36 e 37) sono i controlli positivo e negativo.

Nei campioni B , C e G tutte le strip hanno mostrato la presenza della proteina crylab; nel campione E solo 2 casi (LFD 22 e 23) hanno dato esito positivo, invece nel campione F in un caso si ha avuto la probabile presenza di una banda, che comunque risulta di difficile individuazione. La variabilità presente analizzando il campione E è dovuta probabilmente alla scarsa presenza di proteine crylab in questo campione di farina.

In generale le bande che compaiono su questo tipo di LFD sono molto tenui, anche perché sono state sviluppate per individuare anche la minima traccia di materiale OGM.

Al fine di avere un effettivo riscontro dei risultati ottenuti con queste strip sono state effettuate delle PCR end-point con primer specifici per il costrutto MON810, sul DNA estratto dalle farine con metodo CTAB. Di seguito è riportato un gel d'agarosio relativo a queste reazioni (fig. 35).

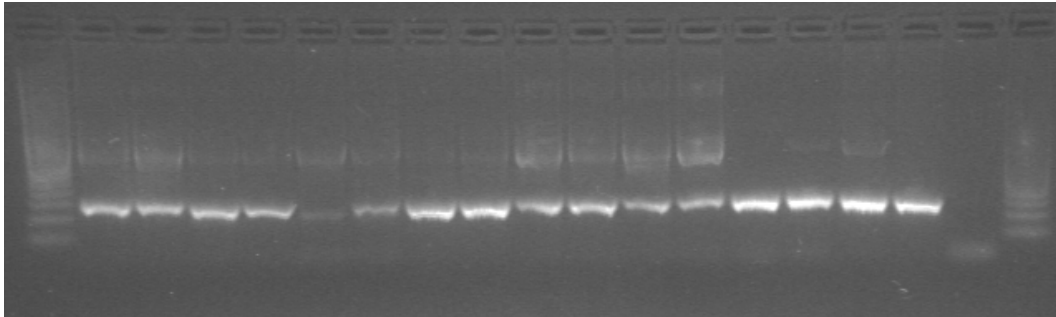


Figura 14: Gel d'agarosio (3,5%) relativo agli ampliconi ottenuti in PCR con primer specifici per il costrutto MON810. Corsie 1 e 18, marcatore 20 bp; Corsie 2-3, campione A; corsie 4-5, campione B; corsie 6-7, campione C; 8-9, campione D; 9-10, campione E; 11-12, campione F; 13-14, campione G; 15, DNA foglia di mais; 16, DNA farina di mais; 17, controllo negativo di PCR. L'amplicone atteso è di 55 bp.

Dall'analisi del gel risulta che in tutti i campioni analizzati si è ottenuta la comparsa dell'amplicone atteso per il costrutto Mon810, quindi i campioni presentano materiale geneticamente modificato, compresi i campioni A e D che dall'analisi con i lateral flow devices erano risultati negativi. Questi lateral flow devices hanno mostrato un parziale riscontro con l'analisi in PCR end-point nella detection di OGM, probabilmente dovuto alla bassa quantità di proteine OGM, e alla loro degradazione, all'interno di matrici processate.

L'applicazione all'analisi OGM di metodiche immunologiche deve quindi tenere conto che le proteine sono degli analiti che subiscono più alterazioni rispetto al DNA se trattate termicamente. Le processazioni che i semi subiscono durante la trasformazione in farina comporta inevitabilmente la rottura delle proteine e la perdita della loro struttura secondaria. Per la detection degli OGM negli alimenti le metodiche che utilizzano il DNA possono discriminare anche minime tracce di materiale geneticamente modificato, come mostrato dalla PCR end-point con il DNA estratto dalle farine.

Studio della qualità del DNA: DNA estratto da pellet di mangime

Sono state effettuate 9 estrazioni di DNA per ogni condizione di conservazione analizzata: temperatura ambiente (TA), 4°C e -20°C. L'estrazione (T0) è stata ripetuta a distanza di 2 settimane (T1), 6 mesi (T2) e 18 mesi (T3), per verificare la qualità del DNA estratto e la sua amplificabilità. Nei gel successivi (figura 15) è riportato il materiale estratto solo da i pellet a temperatura ambiente a T0 e T3, per un confronto.

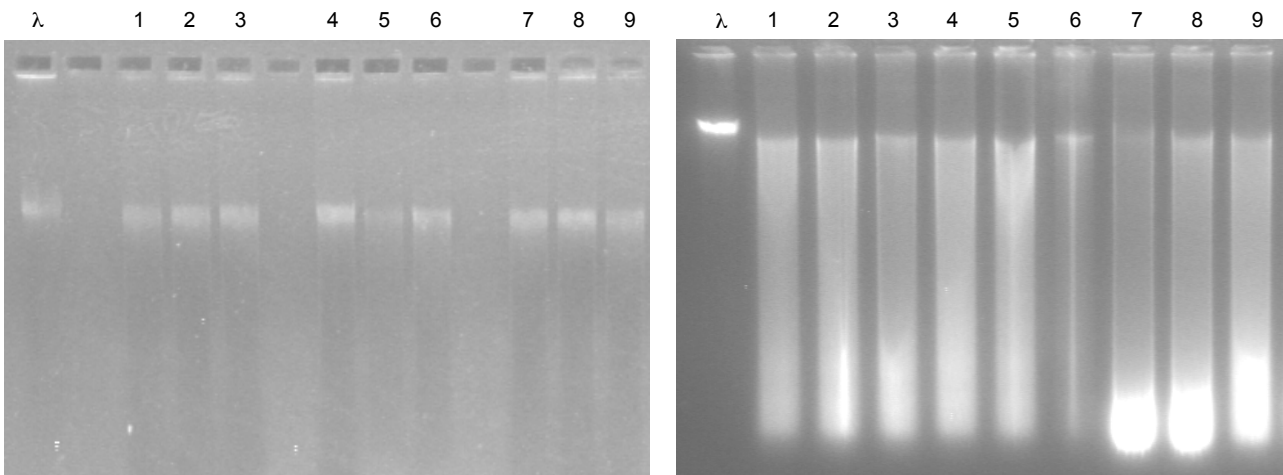


Figura 15: Gel d'agarosio (0,8%) relativi al DNA genomico estratto da pellet. Nel gel a sinistra sono riportate le 9 estrazioni di DNA effettuate al tempo iniziale, nella condizione a temperatura ambiente, caricando 2 μ l di materiale, confrontate con del DNA genomico di fago λ (70 ng). Nel gel a destra sono riportate, invece, le 9 estrazioni di DNA, sempre a temperatura ambiente, relative ai 18 mesi, confrontate anch'esse con DNA genomico di fago λ (70 ng).

Dall'analisi dei gel d'agarosio risulta evidente che il DNA genomico estratto a tempo 0 è di buona qualità, in quanto la banda relativa al genomico è integra; mentre per il DNA estratto dopo 18 mesi la qualità risulta essere peggiorata, perché compare uno smear consistente in tutti i campioni analizzati, indice di degradazione.

E' stata quindi verificata la qualità del DNA estratto e stimata la sua concentrazione tramite lettura spettrofotometrica ed applicazione della legge di Lambert-beer, moltiplicata per il fattore di diluizione (tabella 30).

$$[DNA] = Val. \text{ assorbanza } 260 \text{ nm} \times 50 \times \text{fattore di diluizione}$$

	T0		T1		T2		T3	
	260/280	[ng/ μ l]	260/280	[ng/ μ l]	260/280	[ng/ μ l]	260/280	[ng/ μ l]
TA	1,81	2677	1,81	24	1,54	898	1,38	1219
	1,85	2989	1,45	2255	1,55	1385	1,47	1084
	1,73	2536	1,49	1954	1,66	1473	1,52	945
	1,79	1936	1,75	1566	1,65	1434	1,52	1319
	1,45	2579	1,63	1923	1,58	1142	1,47	1459
	1,57	2051	1,8	1728	1,6	1576	1,42	1019
	1,8	3443	1,77	1343	1,61	1011	1,37	1034
	1,63	2416	1,65	751	1,63	1142	1,43	837
	1,7	2714	1,65	642	1,58	873	1,39	881
4°C	1,81	3126	1,58	3076	1,58	1915	1,67	1842
	1,82	2667	1,44	3691	1,49	1558	1,60	1956
	1,77	2446	1,55	2978	1,46	2290	1,67	357
	1,77	3383	1,64	2280	1,46	2497	1,95	1297
	1,7	1438	1,72	895	1,32	1234	1,74	1884
	1,75	3230	1,57	1180	1,49	2107	1,80	1256
	1,69	4342	1,72	1296	1,52	2876	1,50	1275
	1,56	4083	1,72	2324	1,53	2018	1,51	1305
	1,7	3562	1,7	1221	1,67	2457	1,57	2409
-20°C	1,82	2151	1,42	3369	1,63	2072	1,68	292
	1,83	2599	1,48	1449	1,61	1735	1,71	1294
	1,75	2003	1,62	2792	1,54	2246	1,70	1109
	1,77	2844	1,7	2257	1,6	647	1,72	2681
	1,83	2230	1,54	1748	1,61	1827	1,64	2767
	1,82	2891	1,81	690	1,63	1530	1,58	2169
	1,69	2010	1,72	1560	1,54	2567	1,58	2229
	1,72	3110	1,65	1394	1,47	2166	1,60	2359
	1,6	2135	1,7	2494	1,49	2416	1,59	2563

Tabella 30: Sono riportati i valori stimati di DNA (ng/ μ l) e il valore del rapporto fra le assorbanze determinate a 260 e 280 nm di tutti i campioni per ogni condizione analizzata (TA, 4°C, -20°C) e per tutte le estrazioni effettuate (T0, T1, T2, T3).

Si può notare che la resa estrattiva stimata (a partire da 1 g di materiale) in tutte le condizioni analizzate è elevata, e che il rapporto qualitativo 260/280 della maggioranza dei campioni della prima estrazione risulta essere compreso tra 1,7 e 1,8; indice di DNA di buona qualità, utilizzabile per le successive analisi in PCR. Nelle estrazioni successive il valore di questo rapporto tende a diminuire, soprattutto in modo molto marcato nella condizione di conservazione a temperatura ambiente con un valore compreso tra 1,38 e 1,5.

Nei grafici successivi (fig. 16) sono riportati i confronti di resa di DNA in termini di ng/μl fra le diverse condizioni di stoccaggio nelle 4 diverse estrazioni effettuate.

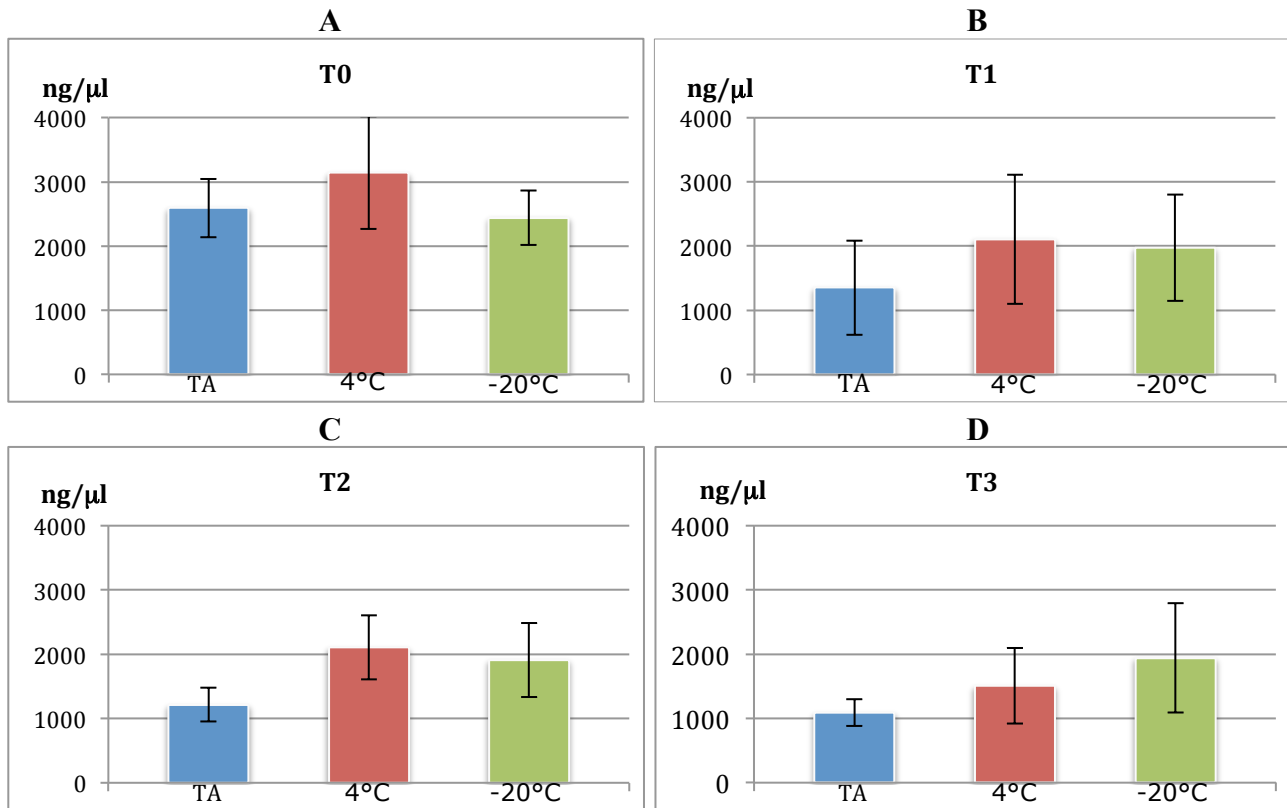


Figura 16: Nei grafici sono riportati i confronti fra le concentrazioni stimate nelle 4 estrazioni: T0 (A), T1 (B), T2 (C), T3 (D). Nell'asse delle ascisse sono riportate le tre condizioni analizzate (TA, 4°C, -20°C), mentre nelle ordinate il valore stimato della concentrazione del DNA, determinato con una media fra i valori ottenuti delle 9 estrazioni effettuate per ogni condizione. E riportata anche la deviazione standard della quantità stimata di DNA per ogni condizione analizzata.

Dall'analisi dei grafici A e B risulta che nelle due prime estrazioni la resa estrattiva rimane costante per tutte le condizioni prese in esame. Osservando il grafico C le rese risultano essere omogenee fra le condizioni a 4°C e -20°C, mentre nella condizione a temperatura ambiente la concentrazione di DNA stimata è diversa. Nel grafico D invece, la resa estrattiva risulta costante per tutte le condizioni. Dal confronto fra i grafici compare quindi che dopo 6 mesi di conservazione la resa stimata non risulta essere più costante fra le 3 condizioni prese in esame, ma che dopo 18 mesi ritorna omogenea, mostrando un calo della quantità stimata anche nelle condizioni a 4°C e -20°C. Un ulteriore confronto è stato effettuato anche fra le quattro estrazioni nelle tre condizioni di concentrazione analizzate, nella figura 9 sono riportati i relativi grafici.

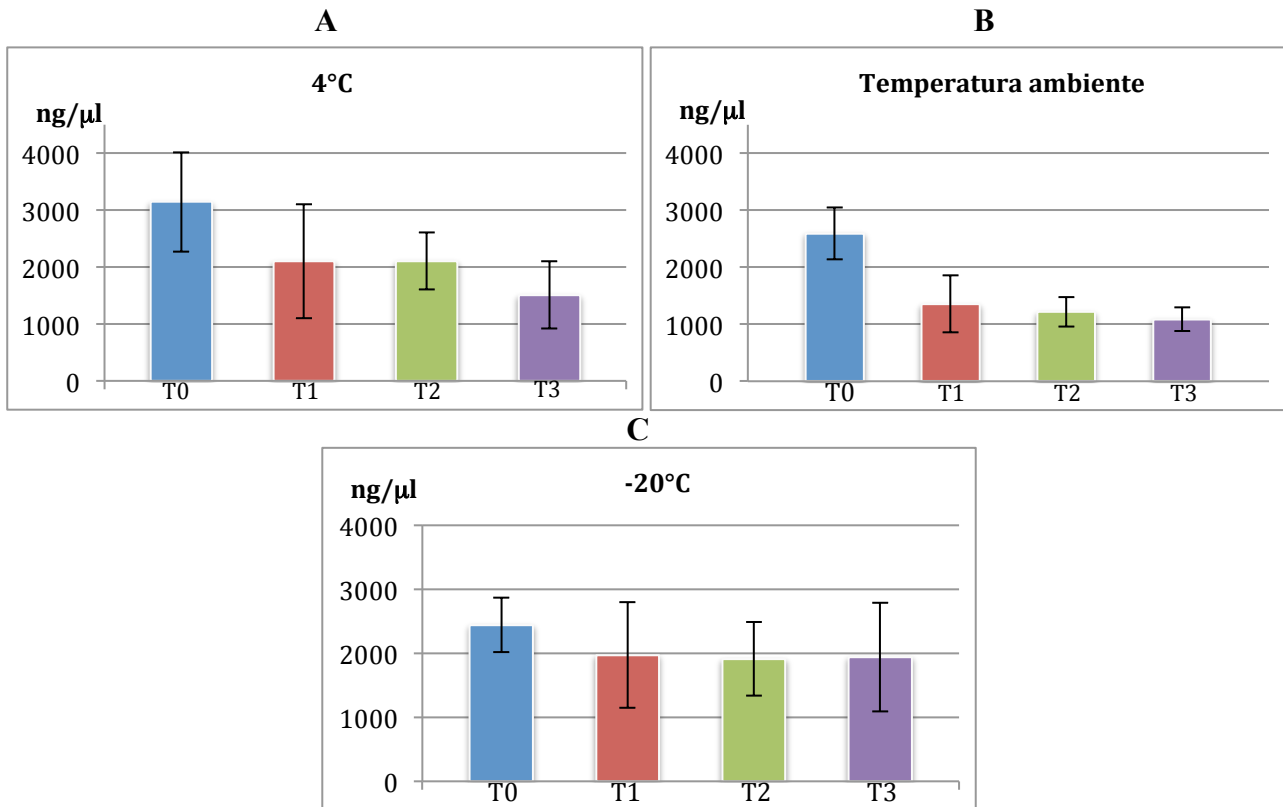


Figura 17: Nei grafici sono riportati i confronti fra le concentrazioni stimate nelle 3 condizioni di analisi: 4°C (A), TA (B), -20°C (C). Nell'asse delle ascisse sono riportate le quattro estrazioni effettuate (T0, T1, T2, T3), mentre nelle ordinate il valore stimato della concentrazione del DNA, determinato con una media fra i valori ottenuti delle 9 estrazioni effettuate per ogni condizione. E riportata anche la deviazione standard della concentrazione stimata per ogni estrazione effettuata.

Confrontando le tabelle, nella condizione di conservazione a temperatura ambiente (grafico A) la resa di DNA cala drasticamente già dopo la seconda estrazione (- 47,82%) e nelle successive si mantiene costante, con un calo della resa estrattiva media tra T0 e T3 del 58% . Nella condizione a 4°C (grafico B) la resa resta costante fino a T2, mentre a T3 diminuisce se confrontata con la prima estrazione, con un calo del valore medio di concentrazione del 52%. Nella condizione di conservazione -20°C (grafico C) la resa estrattiva rimane costante per tutte le condizioni analizzate, e confrontando i valori delle concentrazioni tra T0 e T3, il calo della concentrazione media risulta essere del 20,52% . I risultati sono stati confermati con l'applicazione di un'analisi ANOVA ad una via (tabella 31).

	<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
TA	Tra gruppi	13066574,96	3	4355524,986	20,29	0,000000149	2,9
	In gruppi	6868075,02	32	214627,3444			
	Totale	19934649,98	35				
4°C	Tra gruppi	12439053,56	3	4146351,185	6,97	0,0009	2,9
	In gruppi	19033864,62	32	594808,2693			
	Totale	31472918,17	35				
-20°C	Tra gruppi	1703838,418	3	567946,1394	1,18	0,332	2,9
	In gruppi	15312245,31	32	478507,6658			
	Totale	17016083,72	35				

Tabella 31: Analisi ANOVA. Nella tabella sono riportati i valori di: somma totale dei quadrati (SQ), gradi di libertà (gdl), varianza dei gruppi (MQ), il rapporto fra la varianza tra gruppi e quella nei gruppi (F), il valore di significatività e il valore di criticità (F crit). L'analisi è stata effettuata con un valore $p = 0,05$.

Nelle condizioni a temperatura ambiente e 4°C il valore di significatività è inferiore a 0,05, quindi l'ipotesi nulla dell'ANOVA, cioè che la media dei gruppi sia simile, è da rifiutare. Le medie calcolate fra le concentrazioni delle quattro estrazioni sono quindi differenti, indice che il DNA stimato presente nei pellet conservati a temperatura ambiente e 4°C è effettivamente diminuito nel tempo, analizzando anche i grafici.

Nella condizione di conservazione a -20°C il valore di significatività è superiore al valore 0,05 indice dell'omogeneità dei valori analizzati fra le quattro estrazioni. Quindi in base ai risultati ottenuti, l'estraibilità del DNA è mantenuta fino a 18 mesi di stoccaggio in tutte le condizioni analizzate, e soprattutto la resa si mantiene costante nella condizione di conservazione a -20°C.

Studio dell'amplificabilità del DNA: DNA da pellet di mangime

Al fine di verificare l'amplificabilità del DNA estratto sono state effettuate diverse PCR end-point con primer specifici per i geni endogeni zeina (fig. 18) e lectina (fig.19).

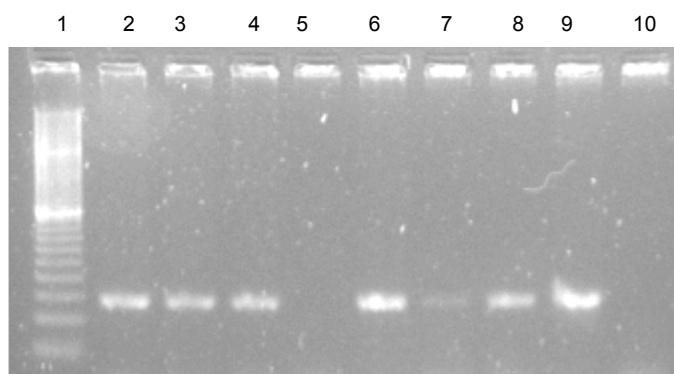


Figura 18: Gel d'agarosio (3%) relativo agli amplificati di PCR ottenuti con i primer specifici per alcool deidrogenasi su materiale estratto dai pellet a tempo iniziale (60 ng di DNA per campione). Corsia 1 – marcatore 20 bp, 2 – Pellet -20°C, 3 – Pellet a TA, 4 – Pellet 4°C, 5 – controllo negativo d'estrazione, 6 – farina di mais, 7 – farina di mais OGM, 8 – foglia di mais, 9 - foglia di mais OGM, 10 – Controllo negativo di PCR.

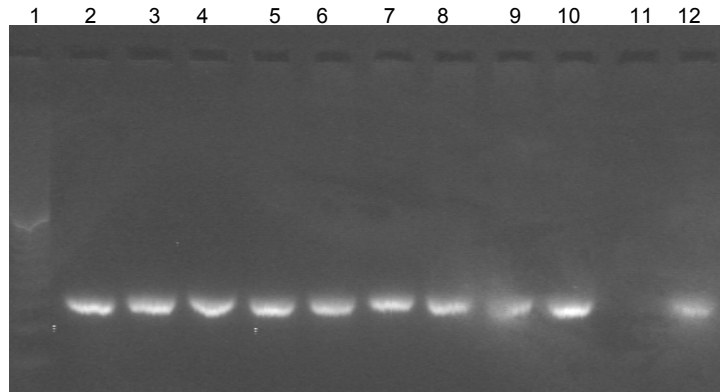


Figura 19: Gel d'agarosio (3%) relativo agli amplificati di PCR ottenuti con i primer specifici per lectina su materiale estratto dai pellet a T3 a temperatura ambiente (60 ng di DNA per campione). Corsia 1 – marcatore 20 bp, 2 – 10 campioni, 11 – controllo negativo di PCR, 12 – farina di soia.

Il DNA è risultato amplificabile sia nell'estrazione iniziale che in quella finale. La verifica dell'amplificabilità del DNA è stata effettuata anche in PCR real-time con chimica TaqMan[®] con l'utilizzo di primer e sonda specifici del gene endogeno zeina, in tutte le condizioni analizzate. Nella tabella successiva (32) sono riportati i valori di cicli soglia relativi al DNA amplificato di tutte le estrazioni, ed è anche riportato un grafico di amplificazione relativo al DNA amplificato a tempo 0 (fig. 20).

	T0	T1	T2	T3
	26,57	26,29	27,20	26,93
TA	27,05	26,79	26,47	26,87
	26,58	26,21	25,91	27,48
	26,57	26,61	27,44	26,59
4°C	27,54	26,77	27,28	27,32
	26,64	26,50	27,23	26,43
	25,63	25,74	26,56	25,87
-20°C	26,03	26,50	27,21	27,01
	27,34	27,65	26,92	26,73

Tabella 32: Cicli soglia ottenuti in PCR real-time. Sono riportati i valori per tutte le condizioni analizzate e le estrazioni effettuate

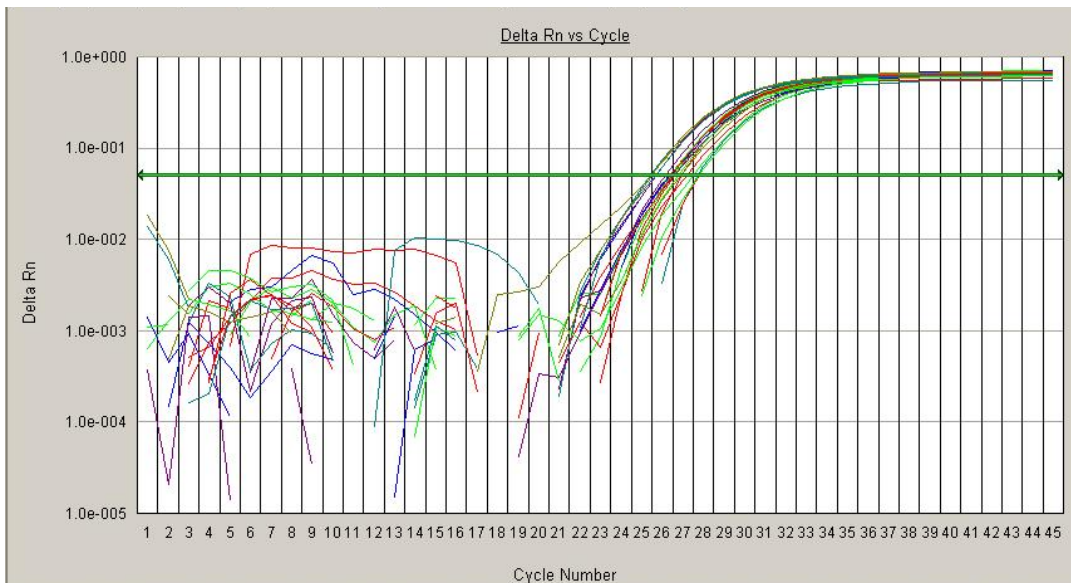


Figura 20: Grafico di amplificazione relativo al DNA estratto da pellet a tempo T0

Nei grafici successivi (fig. 21) sono riportati i cicli soglia ottenuti, per effettuare una comparazione.

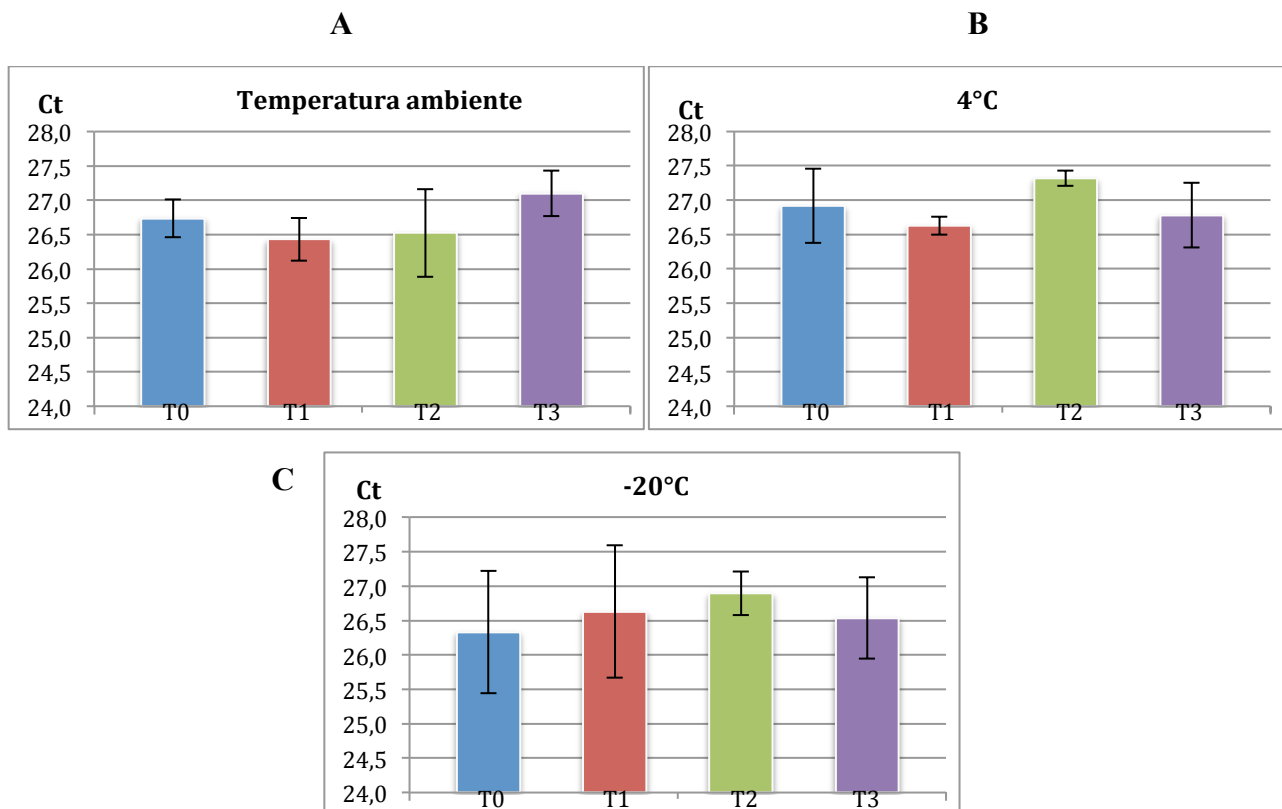


Figura 21: Comparazione fra i cicli soglia ottenuti dalla PCR real-time, analizzando le singole condizioni di stoccaggio: temperatura ambiente (A), 4°C (B), -20°C (C). Sono riportati in ascissa le 4 estrazioni (T0, T1, T2, T3) e in ordinata i valori dei cicli soglia ottenuti.

In tutte le condizioni di conservazione e ai tempi di estrazioni analizzati (grafici A, B, C) i cicli soglia sono risultati costanti, con una media di valori tra 26 e 27, e le deviazioni standard ottenute si sovrappongono tra loro. L'amplificabilità del DNA, utilizzando questi primer specifici per il gene endogeno zeina, resta stabile anche dopo 18 mesi di conservazione del materiale, nonostante la qualità e la resa del DNA estratto diminuisca nell'ultima estrazione.

Dallo studio effettuato quindi risulta che il metodo di estrazione CTAB utilizzato è ideale per l'applicazione su matrici complesse, e conservate a temperature differenti, come nel caso preso in esame.

Per quanto riguarda lo studio dello storage effect, la concentrazione del DNA stimata è risultata diminuire sensibilmente nel caso della condizione di stoccaggio a temperatura ambiente, mentre nelle altre due condizioni questa è stabile.

L'amplificabilità del DNA si è mantenuta costante in tutte le condizioni analizzate nelle 4 estrazioni, anche a temperatura ambiente, dove il rapporto determinato tra i valori di assorbanza 260 e 280 nm erano risultati bassi. La degradazione del DNA, riscontrata in questa condizione, è probabilmente avvenuta in seguito a deamminazione dei residui di citosina (Lindal *et al.* 1974), indotto dalla presenza di temperature più elevate. La presenza di DNA molto degradato non ha comunque portato ad ottenere cicli soglia più alti, come sarebbe stato prevedibile, quindi il gene endogeno zeina risulta essere molto stabile per l'analisi di matrici alimentari trattate.

PCR real-time Duplex – Tessuti di pianta di mais

Il DNA è stato estratto con il kit commerciale GenElute su diversi apparati e tessuti: foglie, brattee, radici, cariossidi, stocchi, ovari e trinciato di mais; sia OGM (varietà DKC 6575), contenente il transgene MON810, che non OGM (varietà Tietar). Per ogni materiale sono state effettuate 3 estrazioni. Nelle tabelle successive (33 e 34) sono state riportate le stime della quantità di DNA, ottenute dal valore di assorbanza 260 nm, e il rapporto fra i valori di assorbanza 260 e 280.

		Foglia		Brattea		Radici		Cariossidi	
		ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280
OGM	1	20,49	1,8	21,17	1,89	11,18	1,76	39,55	1,84
	2	53,31	1,87	24,93	1,81	7,96	1,78	45,5	1,9
	3	45,65	1,83	19,82	1,89	13,96	1,82	52,8	1,92
NON OGM	1	30,55	1,89	14,85	1,84	14,86	1,7	32,55	1,95
	2	36,29	1,89	16,83	1,89	18,2	1,72	40,6	2,02
	3	38,46	1,9	23,24	1,77	18,81	1,86	40	1,94

Tabella 33: Sono riportati i rapporti fra i valori di assorbanza 260 e 280 nm e la stima della concentrazione del DNA per: foglia, brattea, radici e cariossidi, sia OGM che non OGM.

		Stocco		Ovario		Trinciato	
		ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280
OGM	1	8,88	1,83	49,7	1,85	11,18	1,76
	2	10,13	2,3	29,25	1,89	7,96	1,78
	3	15,06	2,3	32,2	2,11	13,96	1,82
NON OGM	1	15,06	2,19	53,2	1,98	14,86	1,7
	2	10,23	2,78	42,7	2,1	18,2	1,72
	3	/	/	27,75	2,2	18,81	1,86

Tabella 34: Sono riportati i rapporti fra i valori di assorbanza 260 e 280 nm e la stima della concentrazione del DNA per: stocco, ovario e trinciato, sia OGM che non OGM.

Analizzando i valori della concentrazione stimata del DNA, risulta che l'estrazione di DNA da tessuti molto compatti come lo stocco e le radici è risultata difficoltosa, così come per il trinciato, dovuto probabilmente alla consistenza di questi tessuti. Mentre i valori del rapporto di qualità 260/280 sono risultati buoni. Gli estratti sono stati controllati su gel d'agarosio, e in figura 5 è riportato, a titolo esemplificativo, quello relativo al DNA estratto da foglie.

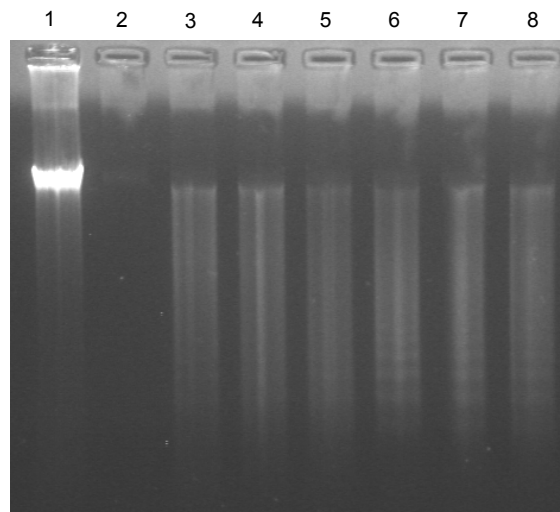


Figura 22: Gel d'agarosio (0,8%) relativo al DNA genomico estratto da foglie. Corsia 1 – marcatore λ , 3 – 5 DNA genomico foglia non OGM, 6 - 8 – DNA genomico di foglia OGM.

Il DNA ottenuto da foglia è molto degradato, anche per quello relativo ai tessuti non mostrati. La degradazione si è originata in seguito al passaggio del materiale genetico tramite la colonnina utilizzata per la purificazione dagli inibitori. Per verificare l'effettiva amplificabilità del DNA ottenuto, sono state effettuate delle reazioni di PCR end-point con primer specifici per il gene endogeno zeina e il costrutto transgenico MON810. Anche in questo caso sono riportati i gel d'agarosio relativo al DNA estratto da foglia (fig. 23).

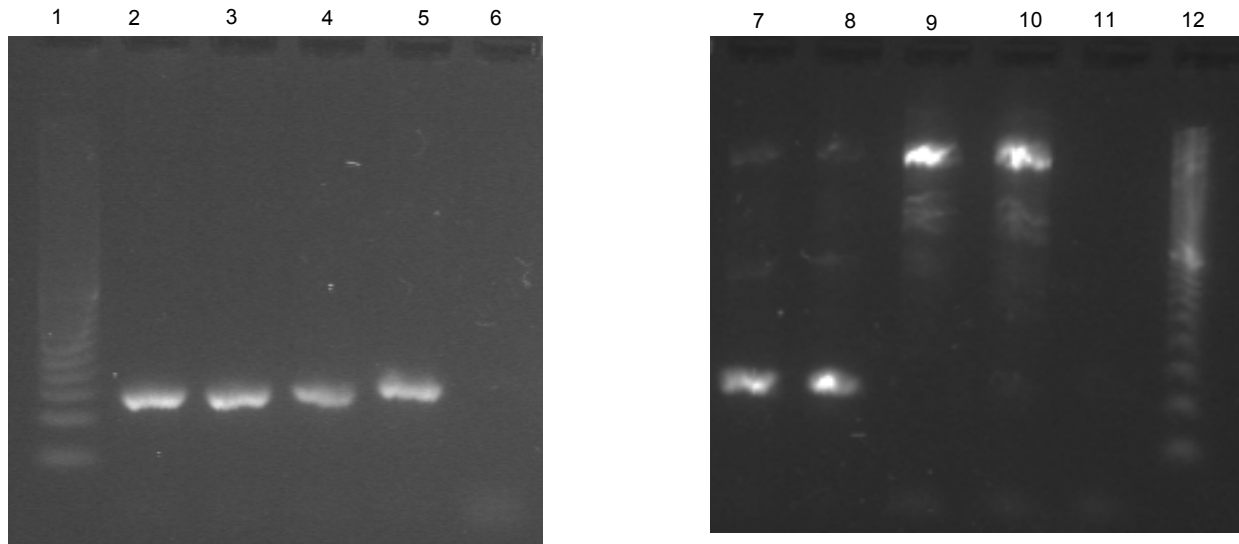


Figura 23: Gel d'agarosio (3%) relativo agli amplificati. Corsie 1 e 12 – marcatore 20 bp , 2 – 3 zeina foglia OGM, 4 - 5 – zeina foglia non OGM, 6 – controllo negativo di PCR zeina, amplicone atteso 55 bp; 7 – 8- MON810 foglia OGM, 9-10 MON810 foglia non OGM, 11 – controllo negativo di PCR MON810, amplicone atteso 57 bp.

Si sono quindi ottenuti gli ampliconi attesi per i primer utilizzati, sia per il gene endogeno, che per il transgene, nel caso del DNA estratto da foglia non OGM compare una banda aspecifica con i primer per MON810, ma in presenza di una sonda marcata in PCR real-time questo amplicone non sarà analizzato.

L'analisi successiva è stata effettuata in PCR real-time duplex con l'utilizzo di primer e sonde costruiti sulle sequenze dei geni endogeni alcool deidrogenasi e zeina, e del transgene MON810. Nella tabella 35 sono riportati i valori dei cicli soglia relativi alla coppia alcool deidrogenasi e MON810. E' stata utilizzata una serie di diluizioni di DNA di foglia di mais (40, 20, 10, 5 ng di DNA) al fine di determinare l'efficienza di amplificazione della PCR.

	Adh Ct	Dev. Standard	media	Mon810 Ct	Dev. Standard	media
Radici	24,79	0,42	24,32	23,42	0,07	23,46
	24,15			23,54		
	24,01			23,43		
Stocco	24,2	0,25	24,25	23,02	0,22	23,12
	24,03			22,97		
	24,53			23,37		
Trinciato	25,57	0,24	25,73	24,36	0,16	24,19
	25,62			24,16		
	26			24,05		
Cariosside	24,65	0,47	24,94	24,01	0,16	24,03
	24,68			23,89		
	25,48			24,2		
Brattea	24,35	0,36	24,54	23,59	0,35	23,40
	24,32			22,99		
	24,96			23,61		
Ovario	24,48	0,40	24,52	23,65	0,21	23,58
	24,93			23,75		
	24,14			23,34		
Foglia 40 ng	24,57	0,20	24,76	23,35	0,05	23,38
	24,76			23,35		
	24,96			23,43		
Foglia 20 ng	25,17	0,25	25,45	24,05	0,29	24,21
	25,53			24,04		
	25,64			24,54		
Foglia 10 ng	26,24	0,06	26,28	25,24	0,10	25,25
	26,35			25,35		
	26,24			25,16		
Foglia 5 ng	27,17	0,41	27,62	26,33	0,11	26,43
	27,96			26,55		
	27,72			26,42		

Tabella 35: Per ogni tessuto o apparato l'analisi dei cicli soglia è stata effettuata in triplicato, ed è stata determinata anche la deviazione standard. E' riportata anche la media del triplicato.

Le medie ottenute sono state riportate su grafici (fig. 24 e 25), con le deviazioni standard, al fine di confrontare i valori ottenuti. E' riportata anche la retta dei cicli soglia ottenuti, relativi al DNA di foglia diluito, per determinare l'efficienza di amplificazione della PCR duplex.

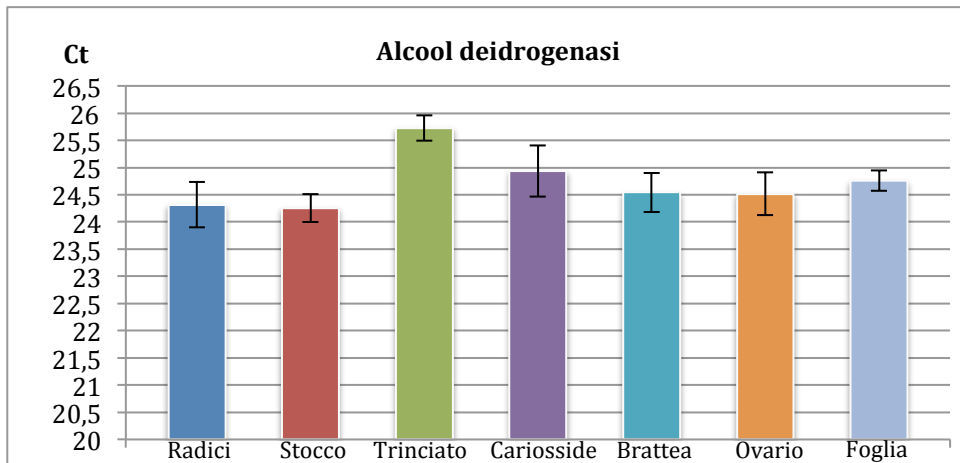


Figura 24: Nel grafico sono riportati in ascissa la tipologia di tessuto o apparato, e in ordinata il valore del ciclo soglia relativo al gene alcool deidrogenasi.

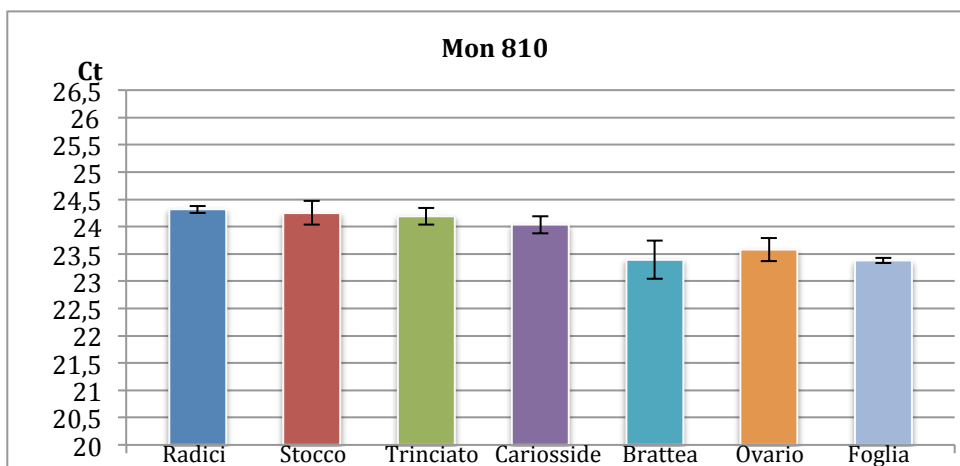


Figura 25: Nel grafico sono riportati in ascissa la tipologia di tessuto o apparato, e in ordinata il valore del ciclo soglia relativo al transgene MON810.

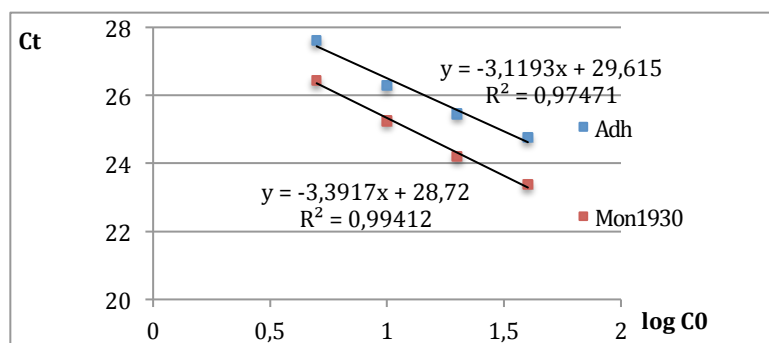


Figura 26: Nel grafico sono riportate le rette di taratura per la misurazione dell'efficienza di amplificazione della real-time. Nell'asse delle ascisse è riportato il valore del logaritmo della concentrazione iniziale, mentre nelle ordinate il valore dei cicli soglia. Sono riportate le equazioni delle due rette e il valore dell' R^2

In base alle equazioni ottenute e al valore R^2 della figura 26, l'efficienza di amplificazione dell'alcool deidrogenasi risulta essere pari a 1,08 (100%) mentre quella del MON810 è di 0,96 (96%) . La differenza fra i due valori è inferiore al 5 %, indice di assenza di competizione fra i primer e le sonde nelle due reazioni.

Dall'analisi dei grafici 24 e 25 risulta che l'espressione del gene endogeno è costante nei vari tessuti analizzati così come l'analisi del target per il costrutto transgenico. I cicli soglia più alti ottenuti nel caso del gene endogeno sono dovuti alla diversa concentrazione dei primer, maggiore nel caso dei primer specifici per il transgene.

Lo stesso tipo di analisi è stata effettuata per la coppia gene endogeno zeina e costrutto MON810 (tabella 36).

	Zeina Ct	Dev. Standard	media	Mon810 Ct	Dev. Standard	media
Radici	26,17	0,27	26,11	24,83	0,26	25,01
	26,35			25,3		
	25,81			24,89		
Stocco	25,78	0,36	25,44	24	0,10	24,10
	25,49			24,2		
	25,06			24,1		
Trinciato	26,18	0,20	26,23	25,16	0,31	25,35
	26,07			25,18		
	26,45			25,71		
Cariosside	24,99	0,35	25,39	24,27	0,09	24,34
	25,65			24,31		
	25,52			24,45		
Brattea	27,45	0,19	27,24	25,69	0,16	25,86
	27,08			26		
	27,19			25,89		
Ovario	25,94	0,33	26,25	25,14	0,14	25,29
	26,22			25,4		
	26,59			25,34		
Foglia 40 ng	28,56	0,25	28,34	26,73	0,16	26,59
	28,4			26,63		
	28,07			26,41		
Foglia 20 ng	29,59	0,13	29,73	27,63	0,24	27,36
	29,77			27,18		
	29,84			27,26		
Foglia 10 ng	30,88	0,59	30,92	28,58	0,48	28,42
	30,95			28,25		
	29,89			27,63		
Foglia 5 ng	31,34	0,13	31,48	28,93	0,44	29,43
	31,54			29,57		
	31,57			29,78		

Tabella 36: Per ogni tessuto o apparato l'analisi dei cicli soglia è stata effettuata in triplicato, ed è stata determinata anche la deviazione standard. E' riportata anche la media del triplicato.

Anche per questa PCR real-time duplex sono riportati di seguito i confronti fra i valori ottenuti per entrambi i geni (fig. 19, 20, 21).

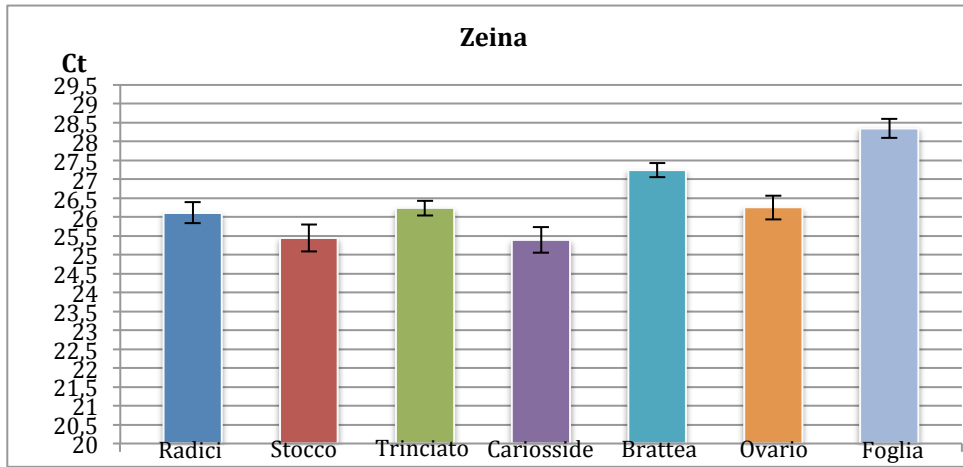


Figura 27: Nel grafico sono riportati in ascissa la tipologia di tessuto o apparato, e in ordinata il valore del ciclo soglia relativo al gene zeina.

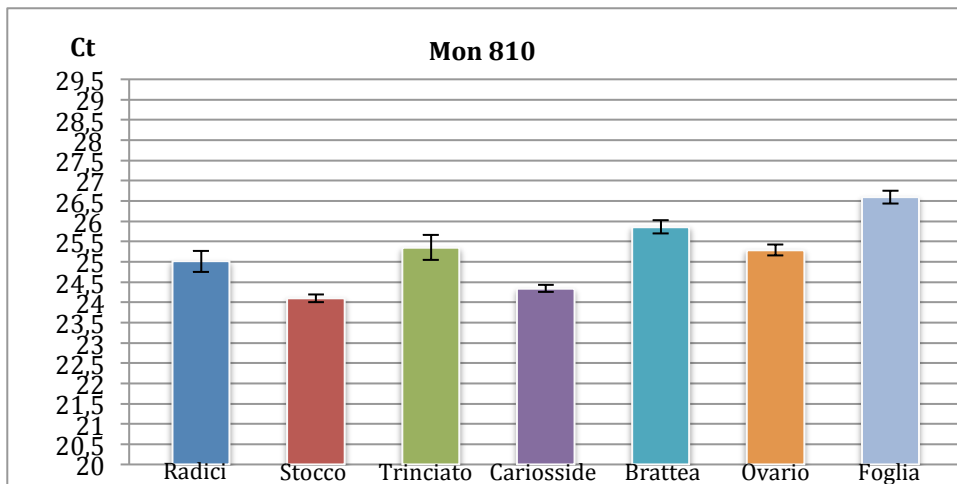


Figura 28: Nel grafico sono riportati in ascissa la tipologia di tessuto o apparato, e in ordinata il valore del ciclo soglia relativo al transgene Mon810.

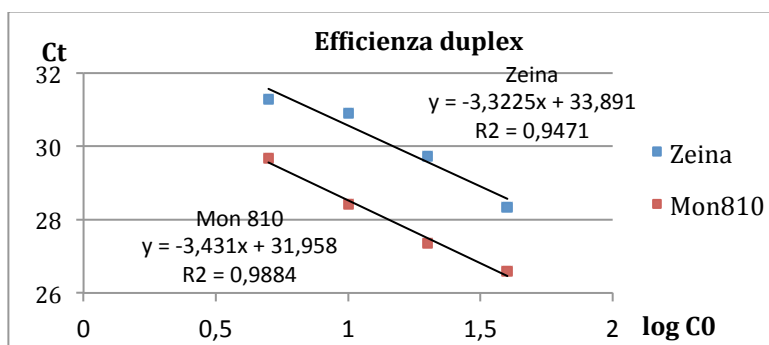


Figura 29: Nel grafico sono riportate le rette di taratura per la misurazione dell'efficienza di amplificazione della real-time. Nell'asse delle ascisse è riportato il valore del logaritmo della concentrazione iniziale, mentre nelle ordinate il valore dei cicli soglia. Sono riportate le equazioni delle due rette e il valore dell'R²

L'efficienza di amplificazione della zeina risulta essere pari a 1 (100%) mentre quella del MON810 è di 0,954 (95,4%) . La differenza fra i due valori è inferiore a 5 %, indice anche in questo caso di assenza di competizione fra i primer e le sonde delle due reazioni. Anche in questo caso la differenza di cicli soglia è dovuta alla maggiore concentrazione dei primer utilizzati per il transgene.

Come nel caso del DNA estratto da pellet conservato a temperatura ambiente, lo stato di degradazione è risultato molto elevato, causato dai filtri delle colonnine utilizzate in questo kit commerciale. I filtri hanno però rimosso le eventuali sostanze inibitrici di origine proteica e polisaccaridica fuoriuscite durante il processo di lisi cellulare, ottenendo dei valori del rapporto qualitativo determinato dall'analisi spettrofotometrica a 260 e 280 nm ottimali per un'applicazione in PCR. La presenza di DNA molto degradato non ha però inficiato l'amplificazione del DNA, infatti dall'analisi dei grafici risulta che l'espressione del gene endogeno rimane costante nei vari tessuti analizzati così come per il costrutto transgenico.

Quindi la PCR real-time duplex già applicata per l'analisi di farine di mais OGM è risultata ottimale anche per l'applicazione su diversi tessuti di pianta di mais, e in particolare nel caso del trinciato di mais, che è comunemente utilizzato come foraggio base per i bovini.

Tracciabilità OGM – Merendine

Al fine di verificare l'applicabilità dei metodi di tracciabilità alla presenza di OGM all'interno di prodotti alimentari di grande diffusione sono state analizzate diverse tipologie, e da uno di questi prodotti commerciali, sono stati ottenuti importanti risultati.

Sono stati analizzati 6 diversi lotti da questo campione commerciale, 2 lotti per ogni supermercato da cui sono state acquistate. Ogni singolo lotto di merendine è stato macinato e i campioni da analizzare sono stati prelevati dal materiale macinato.

La prima estrazione di DNA di controllo è stata effettuata però sui singoli componenti del campione commerciale, cioè una parte composta prevalentemente da cioccolato, e una composta da crema (fig. 30).

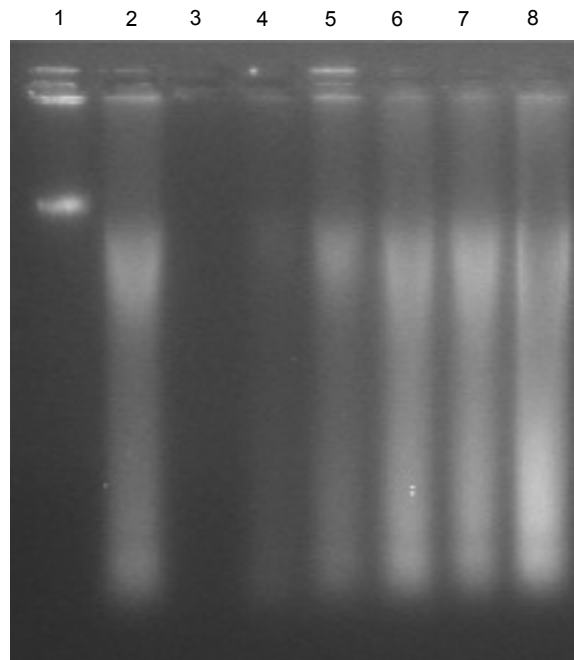


Figura 30: Gel d'agarosio (0,8%) relativo al DNA genomico estratto dal campione commerciale. Corsia 1 – DNA genomico di fago λ (70 ng), corsie 2-6-7-8 - DNA genomico estratto dalla componente di cioccolato; corsie 3-4 – DNA genomico estratto dalla crema del campione commerciale.

Il gel mostra che il DNA ottenuto dall'estrazione con CTAB è molto degradato e che quello estratto dalla componente grassa è meno rispetto a quello della componente di cioccolato.

Per verificare la presenza di eventuali OGM all'interno del DNA del campione commerciale è stata effettuata quindi un'analisi di PCR end-point con primer specifici per il promotore 35S, che risulta essere il promotore specifico dei transgeni presenti nelle piante OGM più commercializzate a livello mondiale.

Dall'analisi del gel (non riportato) risulta che nei campioni 4, 5 e 6 si ha la presenza della banda relativa all'amplicone atteso per il 35S, anche se molto tenue. Nel DNA estratto nella componente grassa non si è ottenuto alcun amplificato.

I campioni risultati positivi sono stati quindi analizzati in PCR real-time con tecnologia SYBR®Greener (fig. 31)(tab. 37).

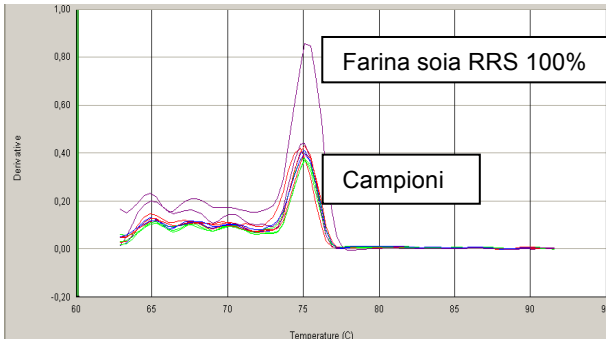


Figura 32: Curve di dissociazione degli ampliconi ottenuti tramite PCR real-time SYBR®Greener. Il materiale di controllo è DNA estratto da farina di soia RR 100%

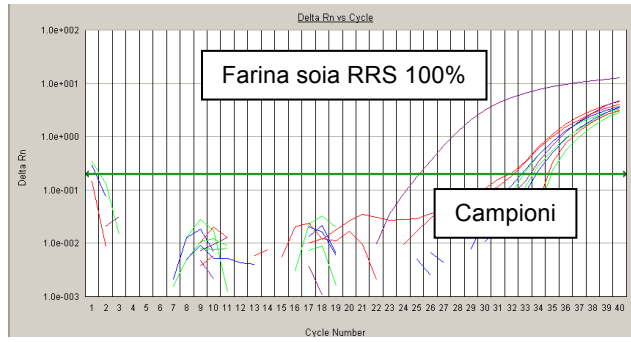


Figura 31: Curve di amplificazione.

Campione	CT 35S	Dev. Std.
4	33,68	0,43
4	33,9	0,43
4	34,87	0,43
5	34,44	0,36
5	33,65	0,36
5	34,64	0,36
6	33,65	0,42
6	34,64	0,42
6	35,00	0,42
Soia	26,43	0,094
Soia	26,23	0,094
Negativo	/	/

Tabella 37: Valori dei cicli soglia

L'analisi PCR real-time con chimica SYBR ha confermato la presenza di un promotore 35S all'interno del DNA estratto da merendine.

E' stata quindi effettuata l'analisi del DNA con PCR real-time con metodologia TaqMan® MGB (fig. 33 e tabella 38)

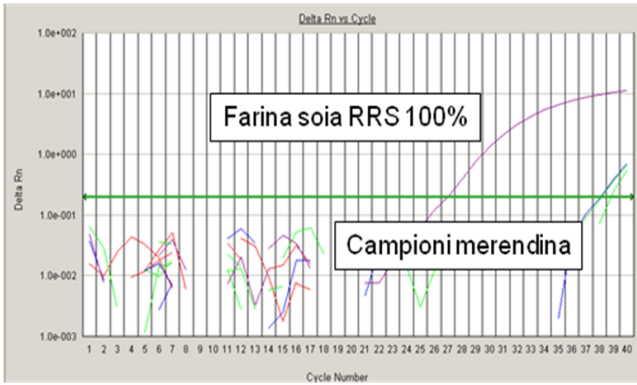


Figura 33: Curve di amplificazione della PCR real-time con sonda TaqMan® MGB

Campione	CT	Dev. Std.
4	/	
4	38,00	
4	/	
5	/	
5	/	
5	/	
6	/	
6	37,61	0,189583
6	37,23	0,189583
Soia	26,55	0,278472
Soia	27,12	0,278472
Negativo	/	

Tabella 38: Valori dei cicli soglia ottenuti

Degli stessi campioni analizzati con PCR real-time TaqMan® MGB, solo il campione 4 e il campione 6 hanno mostrato l'amplicone specifico del costrutto 35S.

Si è quindi proceduto ad analizzare gli altri lotti, tramite macinazione dell'intero campione commerciale, sono riportati i gel d'agarosio relativi al DNA genomico estratto dai lotti 1-2-5-6 (fig. 34-35-36). Per ogni lotto sono stati analizzati 6 campioni.

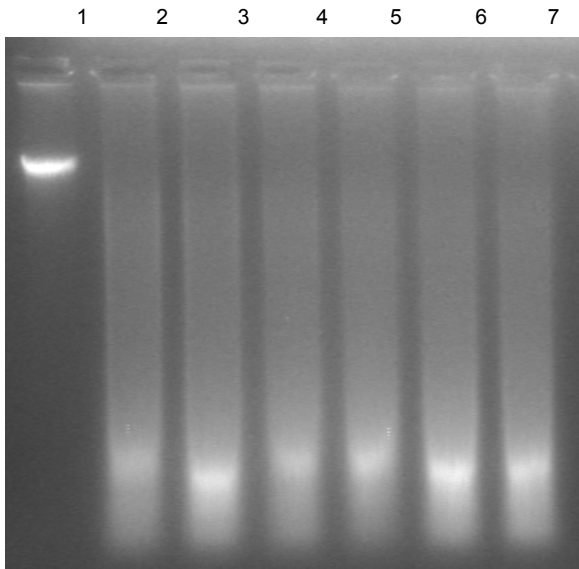


Figura 34: Gel d'agarosio (1%) relativo al DNA genomico estratto dal lotto 1. Corsia 1 - marcatore λ; corsie 2-7 - campioni 1-6

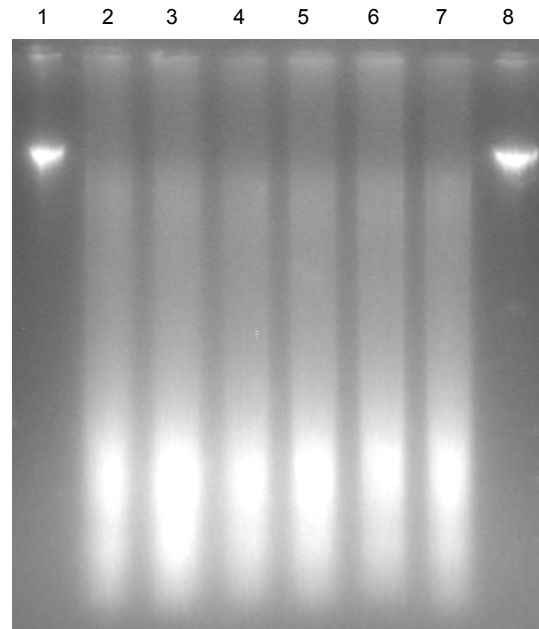


Figura 35: Gel d'agarosio (1%) relativo al DNA genomico estratto dal lotto 2. Corsie 1 e 8 - marcatore λ; corsie 2-7 - campioni 1-6

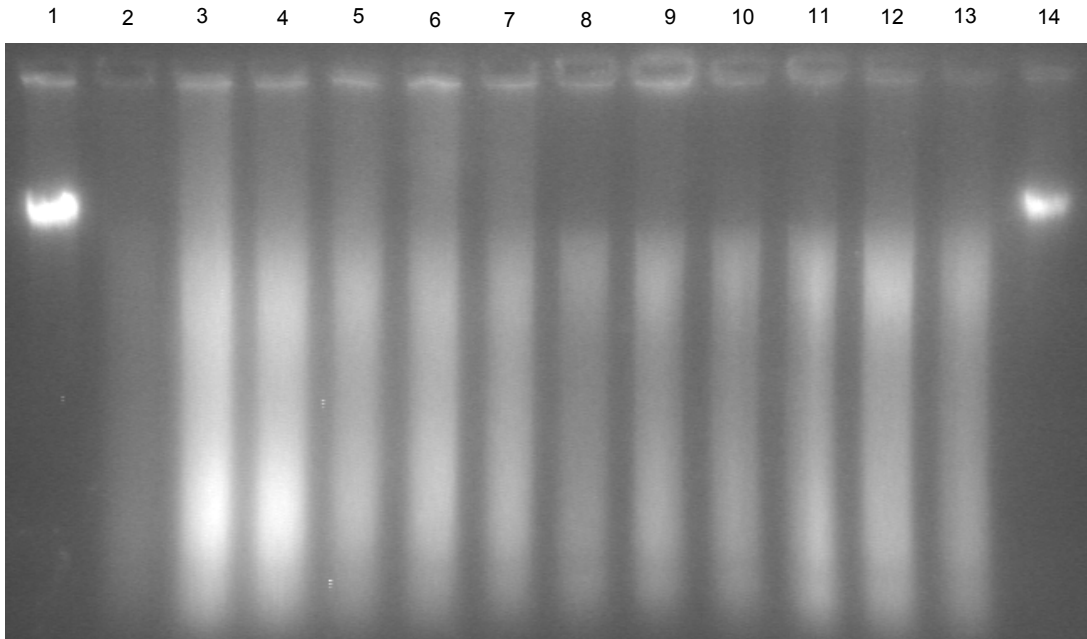


Figura 36: Gel d'agarosio (1%) relativo al DNA genomico estratto dal lotto 5 e 6. Corsia 1 - marcatore λ ; corsie 2-7 – campioni 1-6 lotto 5; corsie 8-13 – campioni 1-6 lotto 6

Dall'analisi del gel d'agarosio risulta che il DNA estratto è altamente degradato, ma comunque in quantità elevata. Di seguito è riportato il valore di assorbanza 260 e il rapporto qualitativo 260/280 determinati allo spettrofotometro e la relativa quantità in ng/ μ l di DNA stimata (tabella 39) riguardanti il lotto 1 e 2.

Campione	260	260/280	ng/ μ l	Campione	260	260/280	ng/ μ l
1	0,2235	1,49	97,62	1	0,2531	1,79	126,53
2	0,1953	1,69	161,05	2	0,3304	1,81	165,18
3	0,3221	1,594	134,82	3	0,2289	1,69	114,47
4	0,2691	1,56	123,32	4	0,2519	1,79	125,94
5	0,2467	1,56	166,8	5	0,2603	1,76	130,14
6	0,3302	1,42	165,1	6	0,278	1,67	139,02

Tabella 39: Valori di assorbanza a 260 nm, rapporto 260/280 e concentrazione stimata del DNA estratto dalle merendine. Nella tabella a sinistra i valori del lotto 1, a destra i valori del lotto 2.

Il DNA ottenuto presenta un rapporto qualitativo molto variabile tra i lotti, indice che l'estrazione del DNA dalla matrice è risultata difficoltosa, anche se la quantità ottenuta è risultata discreta. Anche per gli altri lotti la stima della concentrazione e il rapporto 260/280 del DNA sono risultati simili.

Quindi è stata verificata in PCR end-point la sua amplificabilità con primer specifici per il gene endogeno zeina di mais. Per ogni campione è stata effettuata un'analisi in triplicato (fig. 37 e 38).

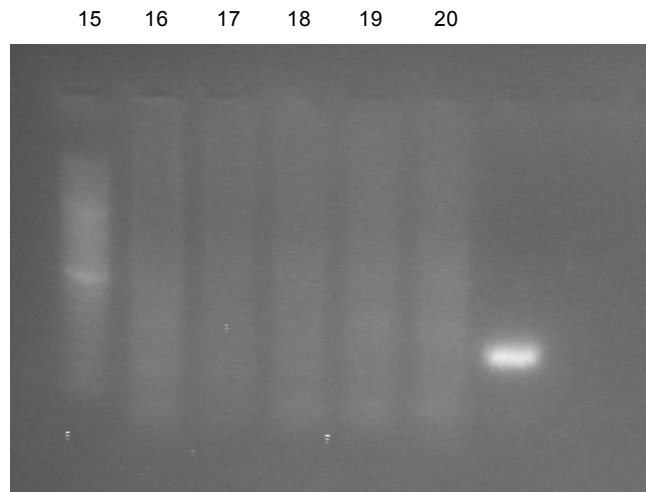
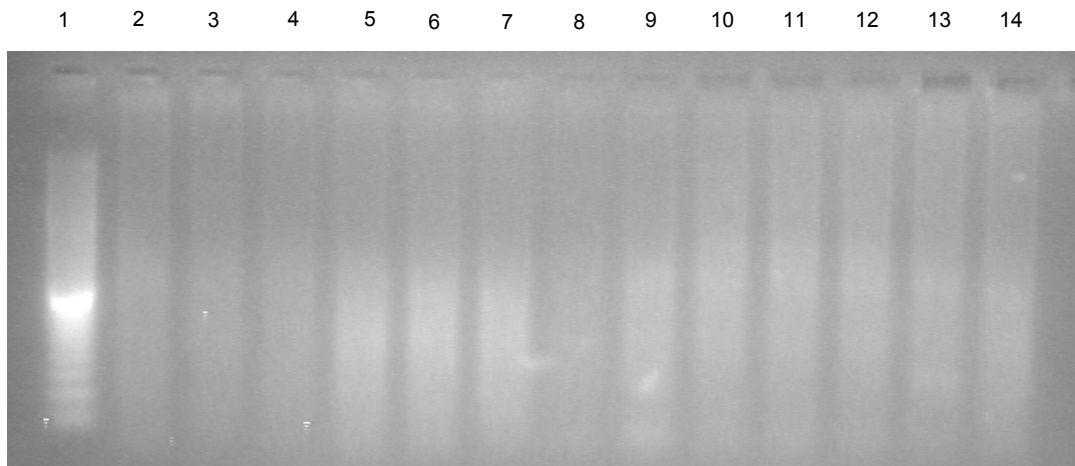


Figura 37: Gel d'agarosio (3,5%) relativo agli ampliconi ottenuti in PCR con primer specifici per la zeina, lotto 1. Corsie 1 e 21 – marker 20 bp; corsie 2-3-4 – campione 1; corsie 5-6-7 – campione 2; corsie 8-9-10 – campione 3; corsie 11-12-13; campione 4; corsie 14-16-17 – campione 5; corsie 18-19-20 – campione 6; corsia 21 – controllo positivo di PCR, DNA di foglia mais; corsia 22 – controllo negativo di PCR

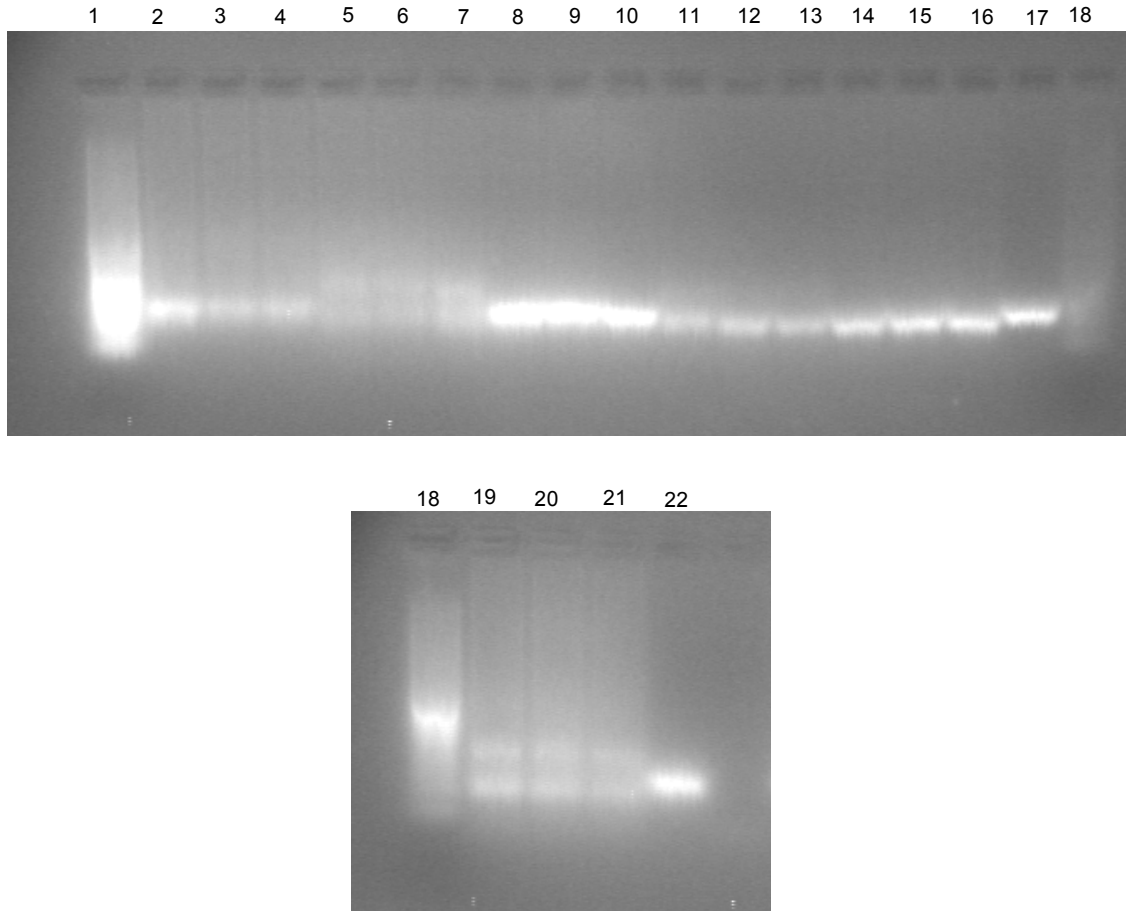


Figura 38: Gel d'agarosio (3,5%) relativo agli ampliconi ottenuti in PCR con primer specifici per la zeina, lotto 2. Corsie 1 e 18 – marker 20 bp; corsie 2-3-4 – campione 1; corsie 5-6-7 – campione 2; corsie 8-9-10 – campione 3; corsie 11-12-13 - campione 4; corsie 14-15-16 – campione 5; corsie 19-20-21 – campione 6; corsie 17-21 – Controllo positivo di PCR, DNA di foglia mais; corsia 23 – controllo negativo di PCR.

Confrontando i gel d'agarosio in figura 37 con quelli presenti in figura 38 si può notare la variabilità di amplificazione dovuta alla presenza di sostanze inibitrici della PCR, infatti nel primo lotto si ha assenza totale di ampliconi (fig. 37), mentre nel secondo lotto si ha la comparsa di ampliconi in tutti i campioni (fig. 38), e in alcuni casi la comparsa di una banda ulteriore dovuta alla presenza di DNA degradato. I campioni risultati positivi per il solo amplicone atteso sono stati sequenziati ed è stato confermato che l'amplicone ottenuto è quello relativo alla sequenza della zeina.

Lo stesso tipo di analisi è stata effettuata con primer specifici per il gene endogeno lectina di soia.

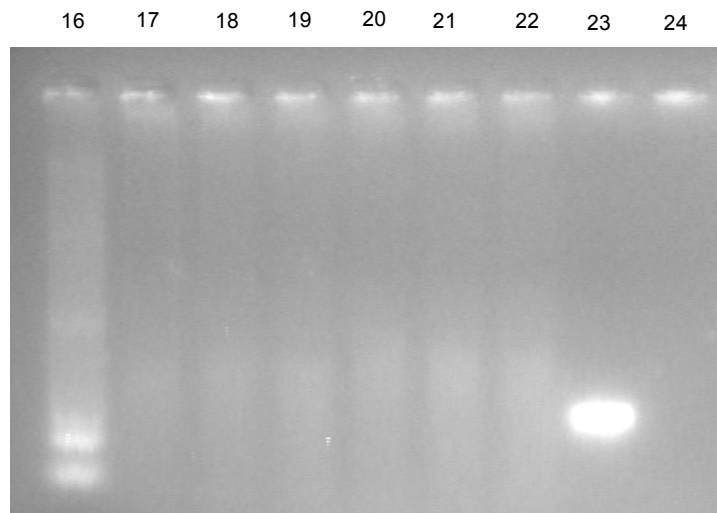
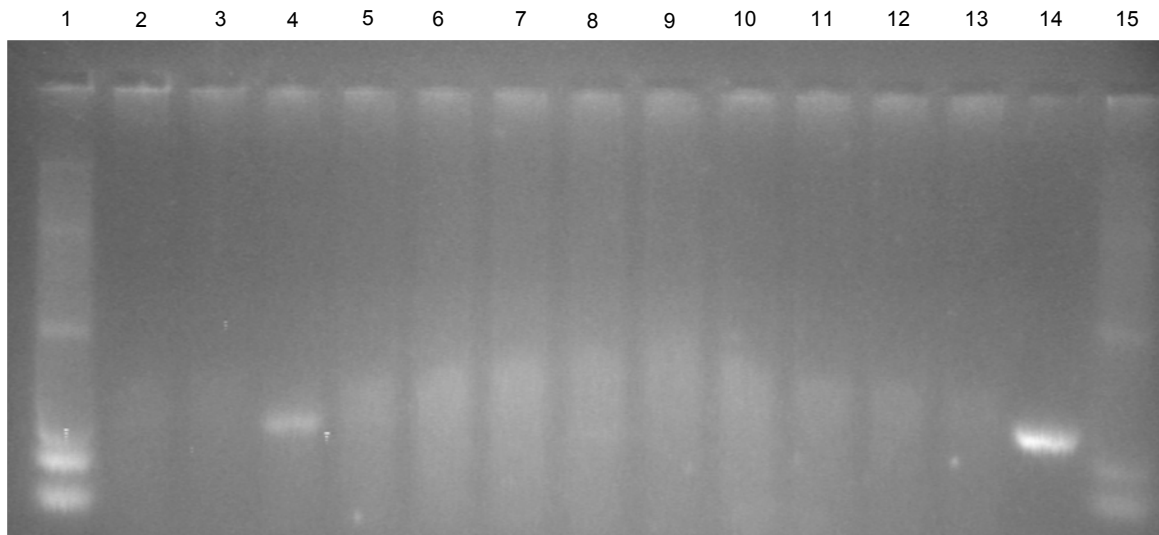


Figura 39: Gel d'agarosio (3,5%) relativo agli ampliconi ottenuti in PCR con primer specifici per la lectina, lotto 1. Corsie 1 e 18 – marker 20 bp; corsie 2-3-4 – campione 1; corsie 5-6-7 – campione 2; corsie 8-9-10 – campione 3; corsie 11-12-13 - campione 4; corsie 17-18-19 – campione 5; corsie 20-21-22 – campione 6; corsie 14-23 – Controllo positivo di PCR, DNA di farina di soia; corsia 24 – controllo negativo di PCR.

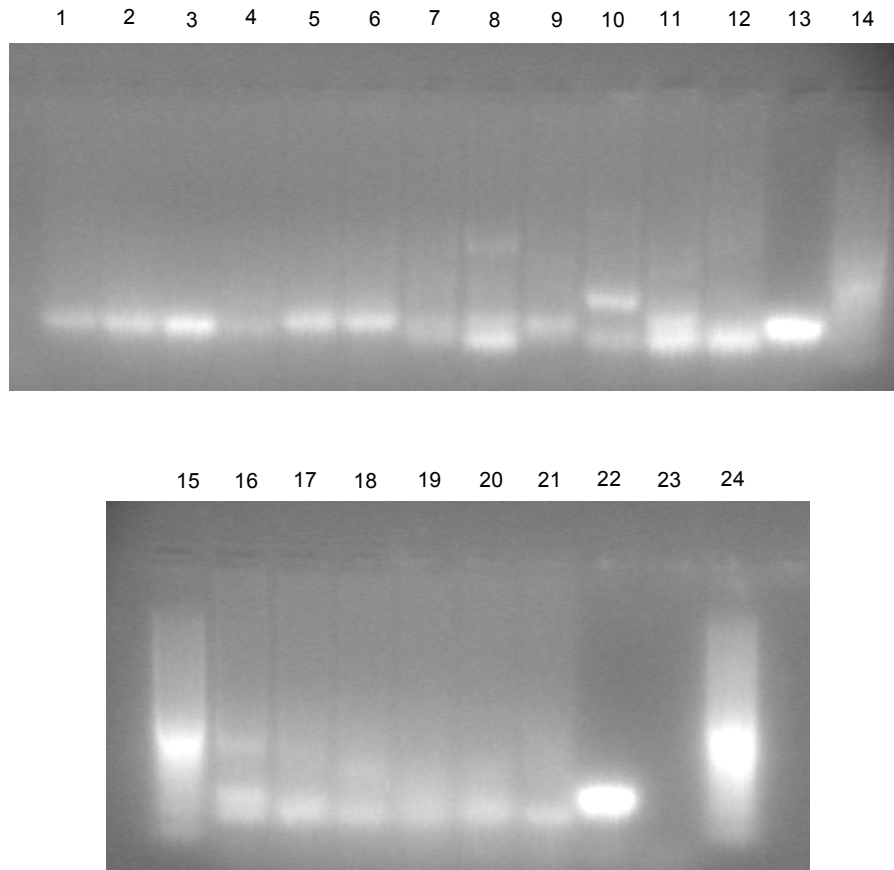


Figura 40: : Gel d'agarosio (3,5%) relativo agli ampliconi ottenuti in PCR con primer specifici per la lectina, lotto 2. Corsie 14-15-24 – marker 20 bp; corsie 1-2-3 – campione 1; corsie 4-5-6 – campione 2; corsie 7-8-9 – campione 3; corsie 10-11-12 - campione 4; corsie 16-17-18 – campione 5; corsie 19-20-21 – campione 6; corsie 13 e 22 – Controllo positivo di PCR, DNA di farina di soia; corsia 23 – controllo negativo di PCR.

Come nel caso precedente si nota, confrontando la figura 39 con la 40, la presenza di sostanze inibitrici della PCR. L'amplificazione del gene endogeno lectina è risultata positiva per una sola replica del campione 1 del lotto 1 (fig. 39) e positiva nel campione 1 e 2 del lotto 2 (fig. 40). Anche per questi ampliconi è stato fatto il sequenziamento ed è stata confermata la sequenza prevista per la lectina.

I campioni positivi sono stati verificati in PCR real-time PCR SYBER[®] Greener[™], di seguito sono riportate le curve di amplificazione relative agli amplificati del gene zeina, relativi al lotto2 (fig. 41-42).

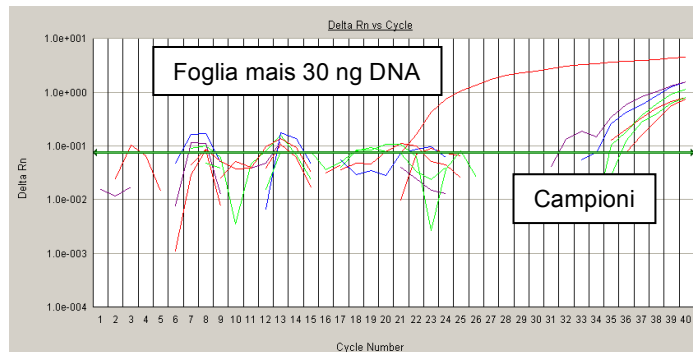


Figura 41: Curve di amplificazione relative al gene zeina dei campioni risultati positivi alla PCR del lotto 2. Come controllo positivo sono stati amplificati 30 ng di DNA di foglia di mais.

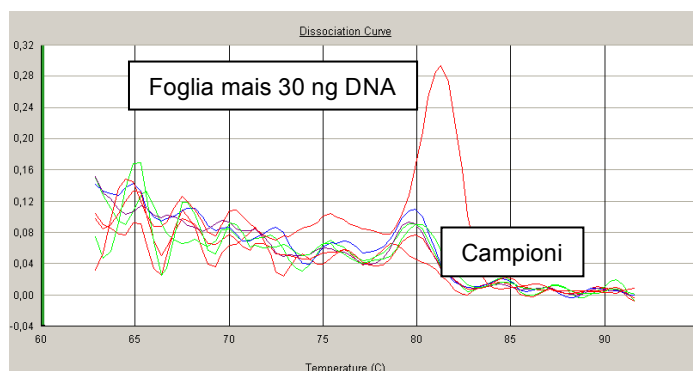


Figura 42: Curve di dissociazione relative al gene zeina. I picchi di dissociazione ottenuti dall'amplificazione del DNA estratto da campione commerciale corrispondono a quello ottenuto per la foglia di mais, la leggera differenza della temperatura di melting è dovuta alla degradazione del DNA estratto.

Sono stati analizzati anche gli altri lotti di merendine, e in generale il gene endogeno zeina mostra una amplificabilità maggiore rispetto al gene endogeno lectina, probabilmente dovuta alla minor presenza di soia all'interno del campione commerciale. La soia presente nel campione commerciale è sotto forma di lecitina.

Quindi si è passati ad analizzare la componente OGM, determinata precedentemente con l'analisi di screening OGM con PCR end-point del promotore 35S.

L'analisi è stata effettuata con primer specifici per il costrutto EPSPS, presente nelle varietà di soia, colza e mais Roundup Ready; e con primer evento specifici per il costrutto MON810, presente a sua volta nel mais MON810. Nei gel successivi sono riportati i risultati ottenuti per i campioni del lotto 6 analizzati per l'EPSPS (fig. 43).

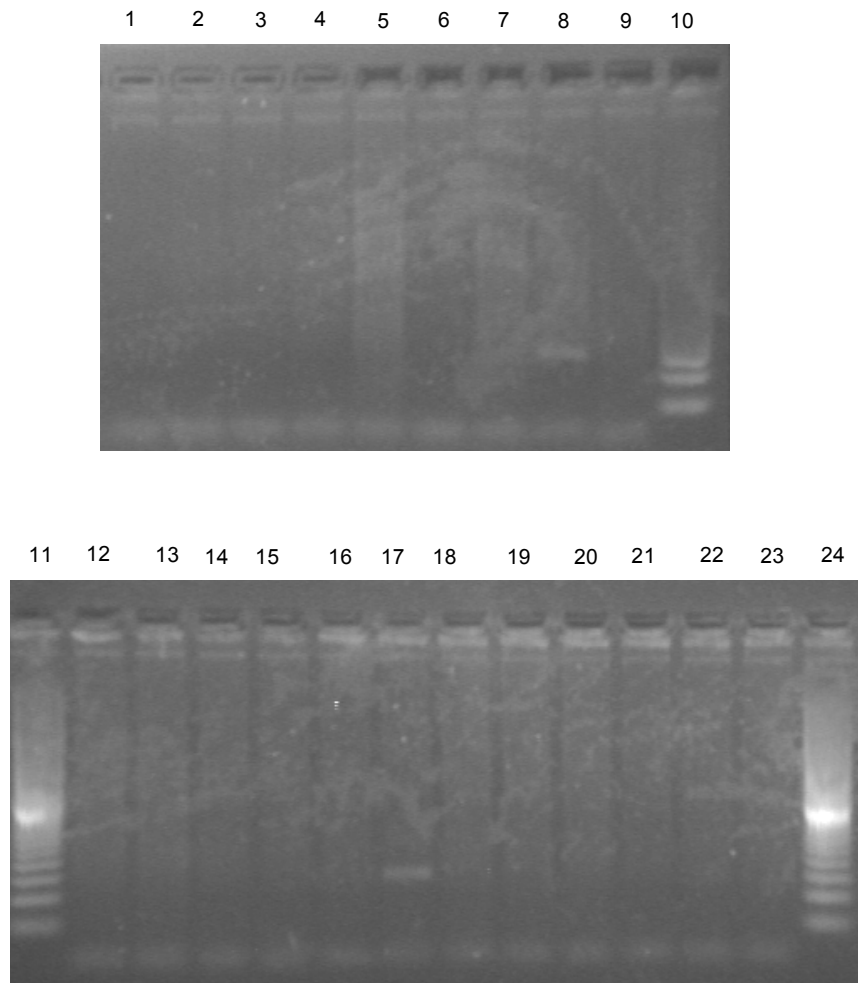


Figura 43: Gel d'agarosio (3,5%) relativo agli ampliconi ottenuti in PCR con primer specifici per il costrutto EPSPS, lotto 6. Corsie 10-11-24 – marker 20 bp; corsie 1-2-3 – campione 1; corsie 4-5-6 7– campione 2; corsie 9-12-13 – campione 3; corsie 14-15-16 - campione 4; corsie 18-19-20 – campione 5; corsie 21-22-23 – campione 6; corsie 8 e 17 – Controllo positivo di PCR, DNA di farina di soia;

Sono stati analizzati anche gli altri lotti, ma l'esito della PCR end-point è stato negativo, probabilmente dovuto alla presenza in tracce della componente OGM. Per verificare l'effettiva presenza in tracce di DNA transgenico sono stati analizzati quattro campioni del lotto 1 con PCR real-time SYBR®greener, per un ulteriore controllo (fig. 44-45).

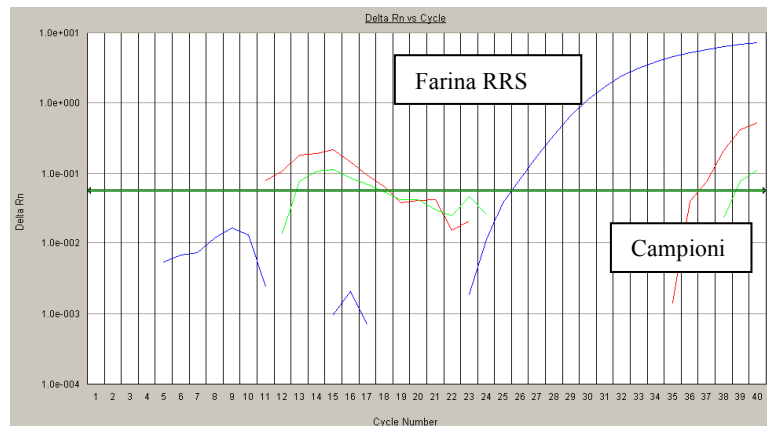


Figura 44: Curve di amplificazione relative agli amplificati ottenuti per il transgene EPSPS di alcuni campioni del lotto 1. Il controllo positivo è DNA estratto da farina di soia RR 100%

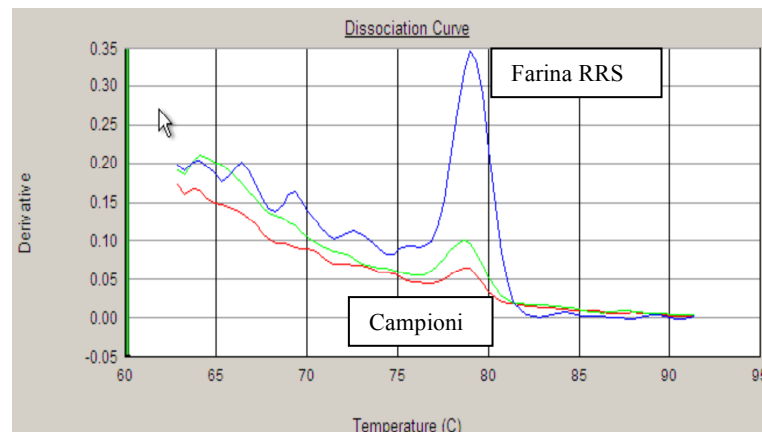


Figura 45: Curve di dissociazione relative agli amplificati ottenuti per il transgene EPSPS di alcuni campioni del lotto 1.

In PCR real-time si sono ottenuti degli amplificati (fig. 44 e 45), anche se presente in tracce. La temperatura di melting ottenuta per i campioni analizzati e la stessa del DNA di farina RRS amplificato. Lo stesso tipo di analisi è stata effettuata con primer specifici per il costrutto MON810 in PCR real-time SYBR Greener (fig. 21 e 22).

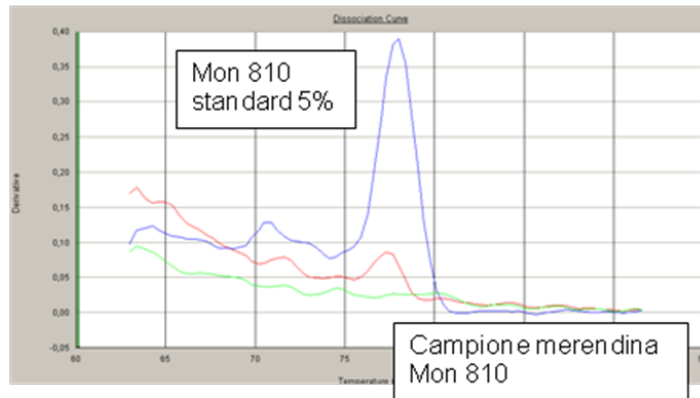


Figura 46: Curve di dissociazione relative agli amplificati ottenuti per il transgene MON810 di alcuni campioni del lotto 1. Il controllo positivo è DNA estratto da CRM di farina di mais MON810 5%.

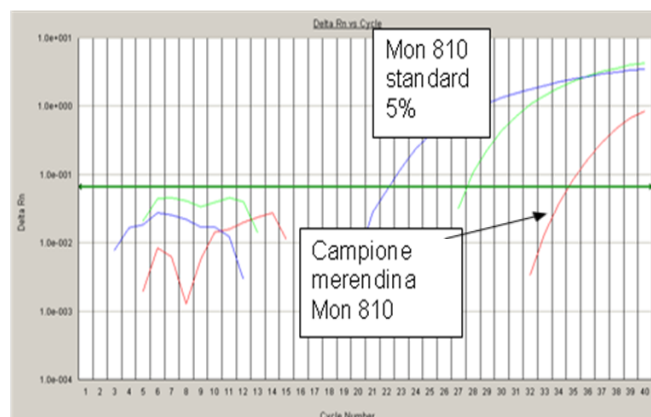


Figura 47: Curve di amplificazione relative agli amplificati ottenuti per il transgene EPSPS di alcuni campioni del lotto 1.

Anche in questo caso si sono ottenuti gli ampliconi specifici per il transgene analizzato.

L'analisi in PCR real-time SYBR[®] Greener[™] ha confermato la presenza di più materiale OGM nel DNA estratto dal campione commerciale, sia da soia che da mais, presente però in minime tracce. La normativa italiana, in base alla legge 2363, prevede che il prodotto sia etichettato come contenente OGM, mentre in base alla direttiva europea 2001/18 l'etichettatura è prevista quando la soglia è superiore allo 0,9%. In attesa dell'attuazione della legge italiana, resta fisso il limite dello 0,9%.

Il metodo di estrazione utilizzato si è quindi mostrato adatto anche per questo tipo di matrici, ottenendo una discreta resa; anche se l'amplificabilità del materiale ottenuto, analizzando i geni endogeni zeina e lectina, si è dimostrata parzialmente efficace, tenendo comunque conto della tipologia di matrice, in cui sono presenti molte sostanze chimiche che inibiscono la reazione di PCR.

La PCR real-time SYBER® Greener™ è un ottimo strumento per la detection di OGM, e quindi per l'individuazione di frodi alimentari, soprattutto tenendo conto dell'evoluzione della normativa italiana. L'approccio della Food Genomics può essere quindi applicato per tutte le matrici alimentari per la verifica della presenza di OGM.

Tracciabilità OGM - Pomodoro

La prima prova effettuata è stata con i primer specifici per il gene endogeno LAT52 in PCR real-time SYBR®greener su DNA estratto da pomodoro. E' riportato di seguito il grafico di amplificazione (fig. 48), le curve di dissociazione (fig. 49) e la retta di taratura (fig. 50), utilizzando il DNA estratto da pomodoro con quattro diluizioni, a partire da 100000 copie di genoma fino a 100 copie.

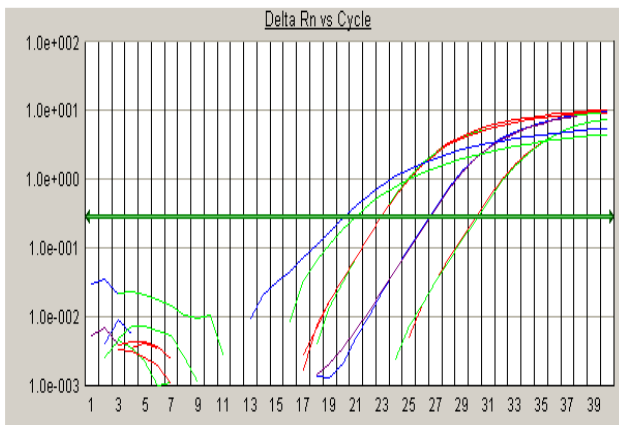


Figura 48 : Curve di amplificazione LAT52. 1 - 100000 copie; 2 - 10000 copie; 3 - 1000 copie; 4 - 100 copie

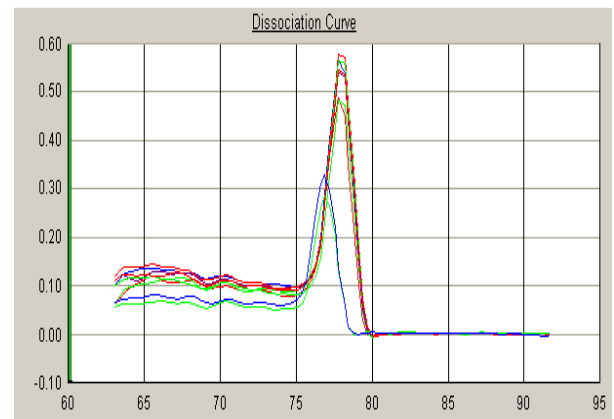


Figura 49 : Curve di dissociazione LAT52.

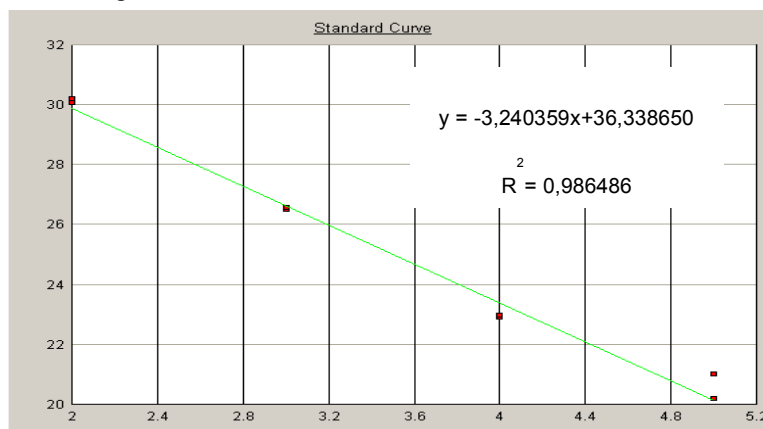


Figura 50 : Retta di taratura LAT52.

L'amplificazione del DNA di pomodoro con i primer LAT52 è risultata positiva. Si è quindi passati a provare i primer specifici per zeina utilizzati in PCR real-time TaqMan[®] su DNA estratto da pomodoro, per poter provare la specificità dei primer per l'applicazione di una PCR real-time multiplex (fig. 51).

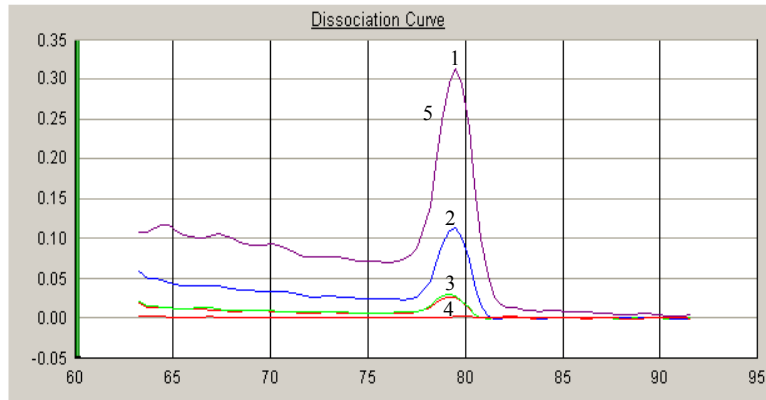


Figura 51 : Curve di dissociazione relative al DNA estratto da pomodoro e farina di mais. 1 - amplicone ottenuto con il DNA di mais; 2, 3, 4 – ampliconi ottenuti con il DNA di pomodoro; 5 – controllo negativo di PCR.

Si può notare che si sono ottenuti ampliconi anche nel DNA estratto da pomodoro, con la stessa temperatura di melting di quelli di mais. La stessa verifica è stata effettuata con i primer LAT52 su DNA estratto da farina di mais (fig. 52).

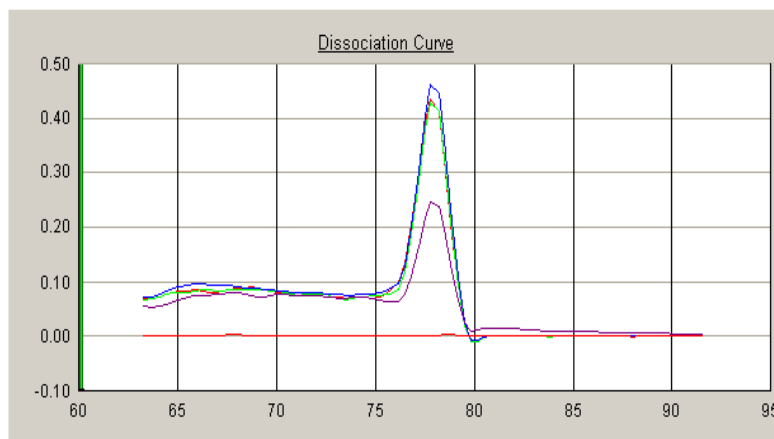


Figura 52 : Curve di dissociazione relative al DNA estratto da pomodoro e farina di mais. 1 - ampliconi ottenuti con il DNA di pomodoro; 2 – ampliconi ottenuti con il DNA di mais; 3 – controllo negativo di PCR.

Si è ottenuta un'amplificazione nel DNA di mais, quindi i primer utilizzati non risultano essere specifici solo per pomodoro.

Si è quindi provato ad utilizzare dei primer disegnati con il software Primer3, specifici per un gene endogeno delle solanacee, la β -fruttosidasi. Di seguito è riportato il gel d'agarosio (fig. 53) relativo ad una PCR end-point con l'utilizzo di questi primer denominati PomTom, testati su DNA estratto da diverse specie vegetali.

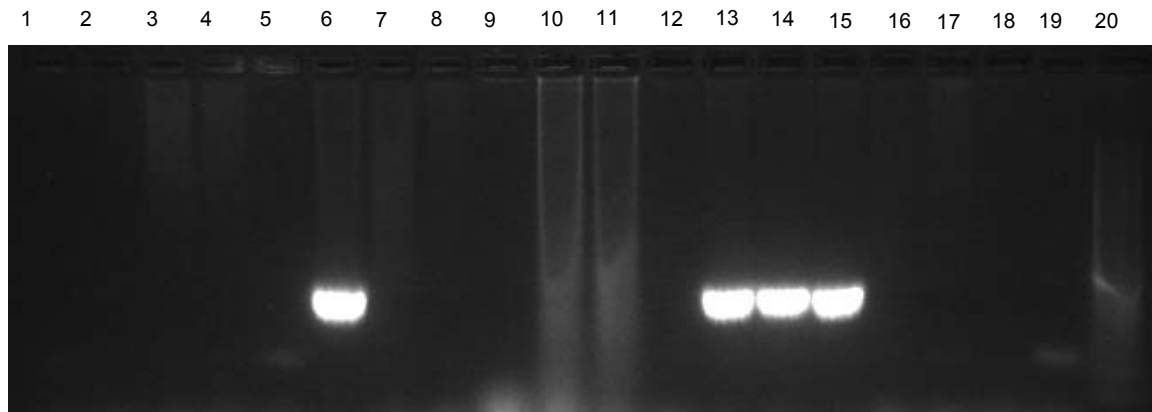


Figura 53 : Gel d'agarosio (3%) relativo agli ampliconi ottenuti con i primer PomTom. Corsia 1 – olivo; 2 – nocciolo; 3 – tabacco; 4 – Arabidopsis; 5 – Arabidopsis; 6 – patata; 7 – girasole; 8 – soia; 9 – riso; 10 – frumento; 11 – orzo; 12 – avena; 13, 14, 15 – pomodoro; 16 – mais; 17 – soia; 18,19 – controllo negativo di PCR; 20 – marcatore 20 bp

La PCR ha mostrato che questi primer risultano essere specifici per le solanacee, non originando ampliconi con il DNA delle altre specie.

Sono stati provati anche i primer specifici per il gene endogeno di mais (fig. 54), l'alcool deidrogenasi, già utilizzati per la duplex su tessuti di pianta di mais, per verificare la loro amplificabilità su DNA estratto da mais e da soia.

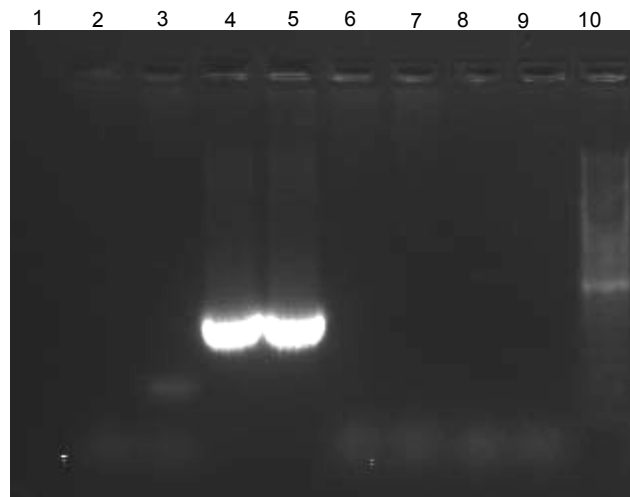


Figura 54 :Gel d'agarosio (3%) relativo agli ampliconi ottenuti con i primer specifici per l'alcool deidrogenasi. Corsie 2 e 3– pomodoro; 4 e 5 mais; 6 e 7; 8 e 9 – controllo negativo di PCR; 10 – marcatore 20 bp

Anche questi primer risultano essere specifici per la specie presa in esame. Quindi sia la coppia di primer PomTom che questi primer specifici per l'alcool deidrogenasi possono essere utilizzati per un'applicazione in PCR real-time multiplex su DNA estratto da matrici alimentari processate, contenenti più prodotti .

Conclusioni e prospettive future

L'aumento delle coltivazioni OGM e della commercializzazione dei relativi prodotti derivati, a livello globale, rende necessario un miglioramento delle metodologie d'analisi per questo tipo di prodotti, sia applicate per alimenti che per mangimi. Sarà necessario tenere in considerazione anche la legislazione presente in questo campo, poichè in continua evoluzione, spesso legata alla concezione che il consumatore possiede nel riguardo dei prodotti alimentari contenenti organismi geneticamente modificati. La nuova legislazione italiana riguardante l'etichettatura dei prodotti alimentari definisce che la sola presenza di OGM all'interno di alimenti comporta la necessità di segnalarlo, e quindi in presenza di un prodotto contenente OGM senza etichetta si ha una frode alimentare.

In questo lavoro di tesi si è voluto di conseguenza mettere in evidenza le metodologie più utilizzate applicabili a matrici alimentari di diverso tipo per l'analisi della presenza di OGM.

Il primo passo per effettuare una corretta analisi è stato di definire un metodo di estrazione del DNA applicabile per più prodotti alimentari e di basso costo, come il metodo CTAB utilizzato in questo lavoro. Lo stesso metodo ha mostrato la sua efficacia di estrazione del DNA su pellet di mangime conservato per 18 mesi, ottenendo del materiale genetico ancora amplificabile.

La PCR real-time si è dimostrata la metodologia d'elezione per l'analisi di tracciabilità negli alimenti, e associata all'utilizzo della chimica SYBER[®]Greener[™] e TaqMan[®], può essere usata per individuare la presenza in tracce di OGM.

La PCR real-time duplex sviluppata in questo lavoro si è dimostrata efficace per l'analisi dell'espressione OGM in diversi tessuti e apparati di pianta di mais, permettendo anche l'analisi di matrici come il trinciato, comunemente utilizzato come foraggio per i bovini. Lo sviluppo di una PCR real-time multiplex con la scelta di endogeni specifici per più specie vegetali, in questo caso pomodoro e mais, permette un'analisi su più componenti presenti all'interno di una matrice alimentare, unendosi anche con primer specifici per i costrutti OGM.

Le farine di soia sono importate da paesi in cui non è presente alcuna legislazione restrittiva nei confronti degli organismi geneticamente modificati, e spesso le farine che giungono in Italia contengono OGM, quindi l'applicazione di analisi in PCR real-time si rende necessaria al fine della detection. L'utilizzo di analisi immunologiche per la detection di OGM, nonostante il basso costo di

utilizzo e la praticità, spesso devono tenere conto che le proteine analizzate risultano essere alterate dai processi di trasformazione industriali.

Per le matrici alimentari più complesse come le merendine è stato importante definire un metodo d'estrazione efficace e una modalità di analisi adatta per la detection degli OGM, che hanno portato alla scoperta della presenza di OGM, successive analisi dovranno determinare il tipo di costrutto transgenico presente. Il prossimo passo sarà di applicare questo piano di analisi ad altri alimenti reperibili nella grande distribuzione, come biscotti, snack e prodotti salati.

Bibliografia

- Adler M., Wacker R., Niemeyer C.M.** (2003) A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 240-250.
- Andersen C. B., Holst-Jensen A., Berdal K.G., Thorstensen T., Thengs T.** (2006). Equal performance of TaqMan, MGB, Molecular Beacon, and SYBR Green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9658–9663.
- Barletta J.M., Edelman D.C., Constantine N.T.** (2004) Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol* **122**: 20-27.
- Bauer T., Weller P., Hammes W.P., Hertel C.** (2003) The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Res. and Tech.* **217**: 338-343.
- Bennett C.D., Campbell M.N., Cook C.J., Eyre D.J., Nay L.M., Nielsen D.R., Rasmussen R.P., Bernard P.S.** (2003) The LightTyper: high-throughput genotyping using fluorescent melting curve analysis. *Biotechniques* **34**: 1288-1292.
- Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R. and Ingo Potrykus.** (2002) Golden Rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin a deficiency. *Journal of nutrition* **132**: 506S-510S
- Brennan R.,E., Samuel J.,E.,** (2003) Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* **41**: 1869-1874.
- Burger H., Foekens J.,A., Look M.,P., Meijer-van Gelder M.,E., Klijn J.,G., Wiemer E.,A., Stoter G., Nooter K.** (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein lung resistance-related protein multidrug resistance-associated proteins 1 and 2 and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* **9**: 827-836.
- Batterman J., Leemans J.** (1988) Engineering herbicide resistance in plants. *Trends in genetic* **4**: 219-222.
- Chen Y., Wang Y., Ge Y., Xu B.** (2005). Degradation of endogenous and exogenous genes of Roundup-Ready soybean during food processing. *J. Agric. Food Chem* **53**: 10239-10243.
- Cooper A., Poinar H.N.** (2000) Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science* **289**: 1139
- Clark M. F., Adams A.N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol* **34**: 475-483.
- Chaouachi M., el Malki R., Berard A., Romaniuk M., Laval V., Brunel D., Bertheau Y.** (2008) Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* **56**: 1818–

1828.

De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Rao N., Thompson C., Van Montagu M. and Leemans J. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO journal* **vol.6 no.9**: 2513-2518.

Demeke T., Jenkins R. (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bional Chem* **396**:1977-1990.

De la Fuente J.M., Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L. (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**(5318):1566-8.

Della Penna D. (1999) Nutritional genomics: Manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science*. Vol. **285**.

Direttiva 2001/18/CE “On deliberate release of GMOs in the environment”

Donohoe G., Laaksonen M., Pulkki K., Ronnema T., Kairisto V. (2000) Rapid single-tube screening of the C282Y hemochromatosis mutation by real-time multiplex allele-specific PCR without fluorescent probes. *Clin Chem* **46**: 1540-1547.

During K., Porsch P., Fladung M., Lorz H. (1993). Transgenic potato resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal* **3**: 587-598.

Ferreira I.M., Caçote H. (2003) Detection and quantification of bovine ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *J Chromatogr A*. **1015**: 111-118.

Geese W.J., Achanzar W., Rubin C., Hariharan N., Cheng P., Tomlinson L., Ordway N., Dracopoli N.C., Delmonte T., Hui L., Krishnan B., Cosma G., Ranade K. (2008) Genetic and gene expression studies implicate renin and endothelin-1 in edema caused by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Pharmacogenet Genomics*. **18**: 903-910.

Harrison L., Bailey M., Naylor M., Ream J., Hammond B., Nida D., Burlette B., Nickson T., Mitsky T., Taylor M., Fuchs R. and Padgett S. (1995). The expressed protein in glyphosate tolerant soybean, 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate synthase from *Agrobacterium sp.* Strain CP4 is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* **126**: 728-740.

Haughn G., Smith J., Mazur B. and Somerville C. (1988). Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. **211, 2**: 266-271

- Hayashi N., Imamura Y., Hiyoshi Y., Takamori H., Beppu T., Hirota M., Baba H.** (2008) Rapid genotyping of tumor necrosis factor alpha with fluorogenic hybridization probes on the LightCyclertrade mark. *Clin Exp Med*. PMID: 18815866.
- Haza Ana I., Morales P., Martín R., García T., Anguita G., Sanz B., Hernández P.E.** (1999) Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 1043-1047.
- Jongedijk E., Tigelaar H., van Roekel J. S. C., Bres-Vloemans S.A., Dekker I., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C and Melchers L. S.** (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica* **85**: 173-180
- Katoh H., Ohya K., Fukushi H.** (2008) Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *J Virol Methods*. PMID: 18824037
- Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H., Ishikawa E.** (1976). Enzyme-Linked Immunoassay. *Eur. J. Biochem* **62**: 285-292.
- Kaw C.H., Hefle S.L., Taylor S.L.** (2008) Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Lupine Residues in Foods. *J Food Sci.* **73**: 135-140.
- Kobilinsky A., Bertheau Y.** (2005). Minimum cost acceptance sampling plans for grain control, with application to GMO detection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **75**: 189– 200
- Kogure T., Ueno Y., Iwasaki T., Shimosegawa T.** (2004). The efficacy of the combination therapy of 5-fluorouracil, cisplatin and leucovorin for hepatocellular carcinoma and its predictable factors. *Cancer Chemoterapy and Pharmacology* **53**: 296-305.
- Kourilov V., Steinitz M.** (2002). Magnetic-bead enzyme-linked immunosorbent assay verifies adsorption of ligand and epitope accessibility. *Analytical Biochemistry* **311**: 166–170.
- Lee L.G., Connell C.R., Bloch W.** (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **16**: 3761-3766.
- Leruez-Ville M., Minard V., Lacaille F., Buzyn A., Abachin E., Blanche S., Freymuth F., Rouzioux C.** (2004). Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis.* **38**: 45-52
- Lindahl T., Nyberg B.** (1974). Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **13** (16): 3405-3410.
- Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K.** (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Mol Biol.* **4**: 357-362.

- Lyon E.** (2001). Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Rev Mol Diagn* **1**: 92-101.
- Lockeley A.K., Bardsley R.G.** (2000) DNA based methods for food authentication. *Trends in Food Science & technology* **11**: 67-77.
- Marmiroli N., Peano C., Maestri E.** (2003). Advanced PCR techniques in identifying food components. In: Lees M (ed.) *Food authenticity and traceability*. Woodhead Publishing 3-33.
- Marmiroli N., Maestri E., Gulli M., Malcevschi A., Peano C., Bordoni R., De Bellis G.** (2008). Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem* **392**:369-384.
- Mackay I.M.** (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* **10**: 190-212.
- McKillip J.L., Jaykus L-A, Drake M.** (2002). Influence of growth in a food medium on the detection of *Escherichia coli* O157:H7 by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* **65**: 1775-1779.
- Means G.E.** (1998). Chemical modification of proteins: a review. *Journal of Food Biochemistry* **22**: 399-425
- Mengelle C., Pasquier C., Rostaing L., Sandres-Saune K., Puel J., Berges L., Righi L., Bouquies C. & Izopet J.** (2003) Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* **69**: 225-231.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Siaki R., Horn G. and Erlich H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Niesters H.,G.** (2001). Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods Mol Biol* **25**: 419-429.
- Ng D.P.K., Koh D., Choo S.G.L., Ng V., Fu Q.** (2004). Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clinica Chimica Acta* **343**: 191-194.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Deprés V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M.** (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 645-679.
- Paoletti C., Donatelli M., Kay S., Van den Eede G.** (2002). Simulating kernel lot sampling: the effect of heterogeneity on the detection of GMO contaminations. *Seed Science and Technology*
- Paoletti C., Heissenberger A., Mazzarra M., Larcher S., Grazioli E., Corbisier P., Hess N., Berben G., Lubeck P. S., De Loose M., Moran G., Henry C., Brera C., Folch I., Ovesna J., Van den Eede G.** (2006). Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *Eur. Food Res Technol* **224**: 129-139.

- Pafundo S., Agrimonti C., Maestri E., Marmiroli N.** (2007). Applicability of SCAR markers to food genomics: Olive oil traceability. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6052–6059.
- Peano C., Samson M.C., Palmieri L., Gulli M., Marmiroli N.** (2004). Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. *J. Agric Food Chem* **52**:6962-6968.
- Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L., Medici M.C., Arcangeletti M.C., Snounou G., Dettori G. & Chezzi C.** (2004) Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum Plasmodium vivax and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* **42**: 1214-1219.
- Perlin DS., Zhao Y.** (2008) Molecular diagnostic platforms for detecting Aspergillus. *Med Mycol.* **12**: 1-10.
- Pirondini A., Bonas U., Maestri E., Visioli G., Marmiroli M., Marmiroli N.** (2009). Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. *Food Control* **21**:663-668.
- Podivinsky E., Love J. L., van der Colff L., Samuel L.** (2009). Effect of storage regime on the stability of DNA used as calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **394**: 132-134.
- Richter W., Krause I., Graf C., Sperrer I., Schwarzer C., Klostermeyer H.** (1999) An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine-caseins. *Journal Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **204**: 21 26.
- Rogan J.G., Ream J.E., Berberich S.A., Fuchs R. L.** (1992). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for quantitation of neomycin phosphotransferase II in genetically modified cotton tissue extracts. *J. Agric. Food Chem* **40**: 1453-1458.
- Schickler H. and Chet I.** (1997). Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **19**: 196–201.
- Scholdberg T.A., Norden T.D., Nelson D.D., Jenkins D.R.** (2009). Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.* **57**:903-2911.
- Scholz M.** (1998) A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extract is determined as human collagen type I. *Anal. Biochem.* **259**: 283–286.
- Solleti S.K., Bakshi S., Purkayastha J., Panda S.K., Sahoo L.** (2008). Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confer resistance to storage pests, bruchid beetles. *Plant Cell Rep* **27**:1841–1850.

- Song W.Y, Wang G.L., Chen L.L, Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zu L.H., Fauquet C., Ronald P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270** no. **5243**:1804-1806.
- Sulpice R., Tsukaya H., Nonaka H., Mustardy L., Chen T.H.H., Murata N.** (2003). Enhanced formation of flowers in salt-stressed *Arabidopsis* after genetic engineering of the synthesis of glycine betaine. *The Plant Journal* **36**: 165-176.
- Tan S., Evans R., and Singh B.** (2005). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* **30**: 195–204.
- Teletchea F., Maudet C., Hänni C.** (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* **23** (7) :359-66.
- Turci M., Savo Sardaro M.L., Visioli G., Maestri E., Marmiroli M.** (2009). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control* **21**: 143-149.
- Uhl J.R., Bell C.A., Sloan L.M., Espy M.J., Smith T.F., Rosenblatt J.E. and Cockerill. E.** (2002) Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the detection of microbial pathogens: the Mayo-Roche Rapid Anthrax Test. *Mayo Clin Proc* **77**: 673-680.
- Ussuf K. K., Laxmi N. H. and Mitra R.** (2001). Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science*, vol. **80**, no. **7**: 847-853.
- Vietina M., Agrimonti C., Marmiroli M., Bonas U., Marmiroli N.** (2010). Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Van del Bulcke M., De Schrijver A., De Bernardi D., Devos Y., MbongoMbella G., Casi A. L., Moens W., Sneyers M.** (2006). Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real-life samples. *Eur. Food Res Technol* **225**: 49-57.
- Veloso A.C., Teixeira N., Ferreira I.M.** (2003) Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *J Chromatogr A.* **23**: 209-218.
- Waterfall C.M. and Cobb B.D.** (2002) SNP genotyping using single-tube fluorescent bidirectional PCR. *Biotechniques* **33**: 80-86.
- Watzinger F., Suda M., Preuner S., Baumgartinger R., Ebner K., Baskova L., Niesters H.G., Lawitschka A. and Lion T.** (2004) Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5189-5198.
- Wilson I.G.** (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741–375.

Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G. and Pryor R.J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* **49**: 853-860.

Yang L., Pan A., Jia J., Ding J., Chen J., Cheng H., Zhang C. Zhang D. (2005). Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **53**:183-190.

Zhang H.X., Blumwald E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* **19**: 765-768.

Ringraziamenti

La prima persona che devo ringraziare è il Professore Nelson Marmiroli per avermi dato la possibilità di effettuare il dottorato di ricerca nel laboratorio di Scienze ambientali dell'Università di Parma, e anche per i consigli e i suggerimenti dati. Devo ringraziare anche il dott. Alessio Malcevschi per la grossa disponibilità sempre mostrata in tutti questi tre anni di dottorato.

Il mio lavoro è stato realizzato grazie al contributo dei seguenti progetti di ricerca:

- CE Framework VI, Food Quality and Safety: dal 2007 “Integrated System for a Reliable Traceability of Food Supply Chains” (TRACEBACK);
- CE Framework VI, Food Quality and Safety: dal 2005 “GM and non-GM supply chains: their CO-Existence and TRAcability” (CO-EXTRA);
- CE Framework VI, Food Quality and Safety: dal 2006 “Developing and integrating novel technologies to improve safety, transparency and quality assurance of the chilled/frozen food supply chain– test case fish and poultry ” (CHILL-ON).

Un altro grazie va a tutto il personale del laboratorio e anche alle persone che hanno lavorato nel laboratorio durante il mio dottorato: Prof.ssa Elena Maestri, Marta Marmiroli, Caterina Agrimonti, Mariolina Gulli, Giovanna Visioli, Davide Imperiale, Maria Laura Tortorella, Veronica Pigoni, Luca Pagano, Urbana Bonas, Sara Graziano, Maria Luisa Savo Sardaro, Laura Bortolazzi, Giusy Roma, Simona Pafundo, Andrea Pirondini, Francesca Merangolo, Laura Paesano, Riccardo Alessio Sozzi, Manuela Turci, Cristina Samson, Irene della Ghezza, Valerio dell'Orletta, Davide Tondini e Claudia Pellacani.

Un ringraziamento particolare va a Michelangelo Vietina per l'aiuto, mai venuto a meno, anche nei momenti lavorativi più critici.

Naturalmente ringrazio i miei genitori e i miei nonni per la fiducia e il supporto che mi hanno dato in tutti questi tre anni.

