

Impiego di materiali di riferimento certificati per la quantificazione di OGM nel rapporto di numero di copie di DNA

La presente nota di applicazione fornisce orientamenti per l'uso corretto dei materiali di riferimento certificati per la loro frazione di massa geneticamente modificata (GM) di un evento specifico di modificazione genetica. Le informazioni riportate qui di seguito si riferiscono in particolare all'impiego di materiali di riferimento certificati quali l'ERM-BF413d e l'ERM-AD413 e dei futuri materiali di riferimento certificati per il loro rapporto di numero di copie di DNA.

Autore: Philippe Corbisier

Commissione europea – Centro comune di ricerca

Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgio

Email: philippe.corbisier@ec.europa.eu

INTRODUZIONE

L'Istituto IRMM del CCR ha messo a punto recentemente due nuovi tipi di materiali di riferimento certificati (CRM) che consentono l'adeguata applicazione della raccomandazione 2004/787/CE1 utilizzando un sistema di tracciabilità metrologica. La presente nota contiene delle istruzioni per l'utilizzazione dei nuovi CRM.

CARATTERISTICHE DEI NUOVI CRM PER OGM

A. Nuovi CRM per OGM in matrici

I valori certificati si basano su due unità di misura diverse. Oltre ad un valore certificato relativo alla frazione di massa di un determinato evento di trasformazione genetica (cfr. la nota di applicazione n. 4), il nuovo CRM è certificato in termini di rapporto di numero di copie di DNA. Questo parametro, espresso in percentuale, è calcolato nel modo seguente:

$$\text{Rapporto n. copie ADN} [\%] = \frac{\text{N. copie DNA GM} [\text{cp}]}{\text{N. copie DNA specifico del taxon} [\text{cp}]} \times 100$$

La certificazione si basa su misure della PCR quantitativa in tempo reale. Queste misure sono calibrate mediante un calibratore specifico del DNA del plasmide certificato in quanto contenente una copia della sequenza GM e una copia della sequenza target specifica del taxon per plasmide (cfr. parte B qui di seguito).

Pertanto, il rapporto del numero di copie di DNA del mais GM è strettamente legato all'evento di trasformazione considerato. Inoltre, nell'esempio summenzionato, il CRM ERM-BF413d dovrebbe essere utilizzato esclusivamente in associazione con il calibratore plasmidico ERM-AD413 e il metodo di rilevazione specifico per l'evento MON 8102. Il rapporto certificato del numero di copie di DNA del mais MON 810 (0,57%) è diverso dalla sua frazione di massa certificata (10,0 g/kg o 1,0%) in quanto il rapporto certificato di numero di copie tiene conto della zigosità, della ploidia e del processo di endoreplicazione delle sementi utilizzate per produrre questo materiale.

La matrice del CRM è destinata a controllare la qualità delle procedure analitiche, ivi comprese l'estrazione e la purificazione del DNA, e le varie fasi di misura della PCR per un determinato evento di trasformazione

B. Nuovi CRM per plasmidi di OGM

I calibratori certificati contengono un frammento di DNA che è specifico per una trasformazione genetica nonché un frammento di DNA che è specifico del taxon esaminato.

Questo plasmide contiene un frammento con 170 copie di base della giunzione 5' *plant-P35S* del mais MON 810 e un frammento con 351 copie di base del gene del gruppo ad elevata mobilità (*high mobility group*) endogeno del mais.

I valori certificati corrispondono, rispettivamente, al numero di frammenti GM clonati e al numero di frammenti di DNA specifico del taxon contenuti in ogni plasmide. Il rapporto numerico tra questi due frammenti di DNA, ottenuto con la PCR in tempo reale (duplex o singola) è fornito a titolo indicativo.

UTILIZZO DEL CALIBRATORE PLASMIDICO PER OGM

Il calibratore deve essere utilizzato in associazione con un metodo specifico di RT-PCR quantitativa¹.

Ogni calibratore è fornito in ghiaccio secco in un tubo di plastica chiuso e deve essere conservato a -20 °C fino al momento in cui viene utilizzato. Il contenuto dovrebbe in primo luogo essere scongelato, poi miscelato e infine, dopo aver aperto il tubo, diluito sotto flusso laminare per ridurre il rischio di contaminazione. Ogni tubo contiene circa 2×10^6 copie (cp) di plasmide per μL e il volume iniziale raccomandato per la diluizione in serie è di 50 μL . Occorre seguire il protocollo di diluizione indicato sul certificato. Il tampone di diluizione non è fornito.

Le serie di diluizioni dovrebbero essere preparate sempre all'ultimo momento e conservate in tubi chiusi; servono per preparare due curve di calibrazione (CC) (una per il transgene e una per il gene specifico del taxon). Ogni curva comporta 5 punti, ciascuno oggetto di tre misurazioni nella PCR (vedi l'esempio riportato qui di seguito). In ogni tubo il materiale di calibrazione è disponibile in quantità sufficiente per preparare 10 CC per entrambi i target, il che significa che il contenuto di un tubo consente di quantificare da 100 a 250 campioni complessivamente. Per la RT-PCR quantitativa si raccomanda di prelevare un campione di 5 μL di DNA stampo per ogni pozzetto PCR.

I valori Ct (*cycle threshold*) di fluorescenza misurati devono essere rappresentati in relazione al numero teorico di copie dei due frammenti al fine di produrre due CC. Queste sono utilizzate per quantificare il rapporto tra il DNA target GM e il DNA specifico del taxon presenti in un campione sconosciuto. I risultati possono a quel punto essere calcolati come il rapporto dei due target ed espressi in percentuale, conformemente alla raccomandazione 2004/787/CE. Un controllo di qualità interno (CQ) dei risultati della PCR può essere effettuato calcolando il rapporto medio dei valori Ct misurati per il target specifico del taxon e il target transgenico, per i punti di calibrazione corrispondenti a 2000 cp/ μL . Questo rapporto deve essere conforme al valore 1,04% (incertezza estesa di 0,06%) per

una PCR singola, come indicato nel rapporto di certificazione (vedi nota ERM di applicazione n. 1).

ESEMPIO

Il DNA genomico estratto da un campione sconosciuto e dal materiale di riferimento ERM-BF413d è analizzato mediante PCR in tempo reale utilizzando l'ERM-AD413 come calibratore. I valori Ct sono ottenuti per il calibratore ERM-AD413 previa amplificazione dei frammenti *hmg* e MON 810 (Tabella 1). I valori Ct medi per il campione sconosciuto, ossia 32,76 e 25,44, sono ottenuti per l'amplificazione dei frammenti MON 810 e *hmg* rispettivamente. Per il materiale di riferimento, i valori Ct medi, pari a 31,22 e 22,20, sono ottenuti per i frammenti MON 810 e *hmg*, rispettivamente.

Le pendenze e le intercette su Y delle due curve di calibrazione devono essere determinate per calcolare il tenore di MON 810 in entrambi i campioni, presumendo che una linea diritta sia la funzione modello più adeguata. I moduli incorporati in Microsoft®Excel o qualsiasi altro software di calibrazione/determinazione disponibile possono essere utilizzati per calcolare le pendenze e le intercette su Y.

Le pendenze (*b*) di entrambe le curve di regressione lineare sono calcolate

utilizzando la formula:
$$b = \frac{\sum (\log(x) - \log(\bar{x})) (y - \bar{y})}{\sum (\log(x) - \log(\bar{x}))^2}$$

in cui *x* rappresenta il numero di copie del frammento amplificato e *Y* rappresenta il valore Ct corrispondente. Le pendenze delle curve di calibrazione dei frammenti *hmg* e MON 810 riportate nella tabella 1 sono pari, rispettivamente, a -3,25 e -3,32.

Le intercette su Y (*a*) delle curve di regressione sono calcolate con la formula: $a = \bar{y} - b\bar{x}$ in cui $\log(x) = 0$. Nel nostro esempio i valori *a* per le curve di regressione per l'*hmg* e il MON 810 sono pari a 39,26 e 40,93, rispettivamente. Questi valori rappresentano i valori Ct teorici corrispondenti ad 1 cp di entrambi i frammenti. La pendenza serve a calcolare l'efficienza della PCR (ϵ) con la formula: $\epsilon = (10^{-1/b} - 1) * 100$. Nel nostro esempio, le efficienze della PCR erano pari a 99,7% e 103,1% per l'amplificazione dei frammenti MON 810 e *hmg* rispettivamente.

Il numero di copie (cp) di MON 810 presenti nel campione sconosciuto è calcolato come: $cp_{MON810} = 10^{\left(\frac{Ct_{MON810} - a_{MON810}}{b_{MON810}}\right)}$, in cui Ct_{MON810} , a_{MON810} e b_{MON810} sono i valori Ct, l'intercetta su Y e la pendenza ottenuti dall'amplificazione del MON 810. Lo stesso calcolo

viene effettuato per determinare il numero di copie del frammento *hmg* con la formula: $cp_{hmg} = 10^{\left(\frac{Ct_{hmg} - a_{hmg}}{b_{hmg}}\right)}$. In questo esempio il numero di copie medio calcolato di frammenti di MON810 e *hmg* presenti nel campione sconosciuto è 289 e 17878 cp, rispettivamente. Il contenuto di MON 810 del campione sconosciuto espresso in percentuale è pertanto pari a: $\frac{289}{17878} cp_{MON810} * 100 = 1,62\%$. Lo stesso calcolo viene effettuato per il materiale di riferimento contenente: $\frac{841}{177513} cp_{MON810} * 100 = 0,47\%$ di

MON 810. Tenendo conto dell'incertezza associata all'ERM-BF413d e dell'incertezza di misurazione (vedi nota di applicazione ERM n. 1), si può verificare se il valore misurato corrisponde ai valori certificati dell'ERM-BF413d. Nell'esempio riportato, il rapporto, pari a 1,05, dei valori Ct medi ottenuto per 10000 cp (5 µL di ERM-AD413 a 2000 cp/µL) corrisponde al valore indicativo di $1,04 \pm 0,06$ riportato nel certificato dell'ERM-AD413, il che significa che la quantificazione del materiale geneticamente modificato era corretta.

¹ Se i valori Ct per la NTC differiscono dal numero di cicli PCR effettuato, probabilmente si è verificata una contaminazione incrociata o un'amplificazione non specifica.

Numero totale di cp del frammento di MON 810	Valori Ct misurati			Ct medi
	replicazione 1	replicazione 2	replicazione 3	
50000	25,3	25,19	25,15	25,2
10000	27,57	27,62	27,66	27,6
1000	31,19	30,89	31,14	31,0
100	33,99	35,12	34,8	34,6
25	35,79	35,67	36,37	35,9
NTC	45	45	45	45
Numero totale di cp del frammento hgm				
500000	20,76	20,67	20,63	20,6
100000	22,92	23	23,04	22,9
10000	26,39	26,36	26,33	26,3
5000	27,31	27,29	27,37	27,3
1000	29,38	29,19	29,57	29,3
NTC	45	45	45	45

Tabella 1: Esempio di valori Ct sperimentali ottenuti utilizzando l'ERM-AD413 come calibratore. NTC¹ = senza modello di controllo.

¹ Raccomandazione della Commissione 2004/787/CE, del 4 ottobre 2004, relativa agli orientamenti tecnici sui metodi di campionamento e di rilevazione degli organismi geneticamente modificati e dei materiali ottenuti da organismi geneticamente modificati come tali o contenuti in prodotti, nel quadro del regolamento (CE) n. 1830/2003 (GU L 348 del 24.11.2004, pagg.18-26).

² ISO 21570:2005 *Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic based methods. Annex D2 Event-specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR.* (Alimenti – Metodi di rilevazione di organismi geneticamente modificati e prodotti derivati – metodi quantitativi basati sull'utilizzazione degli acidi nucleici - Allegato D2 Metodo specifico per l'evento considerato per la quantificazione relativa del DNA della varietà di mais MON 810 mediante il metodo della PCR in tempo reale). 93-99.