



**Università degli Studi di Bologna**  
(Sede amministrativa)



**Università degli Studi di Perugia**  
(Sede consorzata)

**Facoltà di Agraria**



**Dipartimento di Scienze Economiche-Estimative e degli Alimenti**  
Sezione Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti

**Dottorato di Ricerca in Biotecnologie degli Alimenti**  
Settore Scientifico Disciplinare: AGR/15

**Sviluppo ed ottimizzazione di metodi analitici innovativi atti  
alla quantificazione di proteine prodotte da organismi  
geneticamente modificati (OGM) negli alimenti**

*Dottoranda*

*Dott.ssa Monica Giovanna Laura Ermolli*

*Coordinatore*

*Prof. Giuseppe Losi*

*Relatore*

*Prof. Paolo Fantozzi*

*Dottorato XIX ciclo, Anno Accademico 2005/2006*

# INDICE

## I INTRODUZIONE

### Premessa

#### 1 Introduzione

- 1.1 Trasformazione genetica delle piante pag. 1
- 1.2 Soia, *Glycine max* pag. 6
- 1.3 Mais, *Zea mais* L. pag. 15

#### 2 OGM e Legislazione

- 2.1 Regolamenti Ue pag. 26
- 2.2 Concetto di coesistenza pag. 29
- 2.3 Metodi tradizionali per il controllo degli OGM pag. 38
- 2.4 Metodi innovativi pag. 43

#### 3 Metodiche di campionamento

- 3.1 Normativa Ue pag. 48
- 3.2 Normativa per la rilevazione di sementi GM pag. 48
- 3.3 Campionamento di prodotti agricoli sfusi GM pag. 49

## II SCOPO DELLA TESI

- 1 Scopo del progetto pag. 51

## III MATERIALI E METODI

#### 1 Campioni e reagenti

- 1.1 Scelta dei campioni pag. 52

|                         |   |          |
|-------------------------|---|----------|
| 1.2                     | Reagenti di laboratorio di largo consumo  | pag. 52  |
| <b>2</b>                | <b>Generazioni di anticorpi monoclonali</b>   |          |
| 2.1                     | Estrazione del DNA da farine di mais e soya   | pag. 53  |
| 2.2                     | Polymerase chain reaction   | pag. 57  |
| 2.3                     | Clonaggio ed espressione di un gene eterologo   | pag. 59  |
| 2.4                     | Purificazione delle proteine  | pag. 74  |
| <b>3</b>                | <b>Metodiche immunologiche classiche applicate per la valutazione degli anticorpi</b> |          |
| 3.1                     | ELISA indiretto   | pag. 77  |
| 3.2                     | Elettroforesi in gel di poliacrilammide   | pag. 79  |
| 3.3                     | Western blotting  | pag. 83  |
| <b>4</b>                | <b>Tecnologia x-MAP<sup>TM</sup>, Luminex<sup>®</sup></b>                             |          |
| 4.1                     | Saggio immunoenzimatico   | pag. 86  |
| 4.2                     | Saggio per acidi nucleici   | pag. 92  |
| <b>5</b>                | <b>ELISA Reverse m&amp;d</b>  |          |
| 5.1                     | Saggio immunoenzimatico   | pag. 97  |
| <br><b>IV RISULTATI</b> |   |          |
| <b>1</b>                | <b>Espressione delle proteine CP4EPSPS e Cry 1Ab</b>                                  |          |
| 1.1                     | Qualità e quantità del DNAg   | pag. 101 |
| 1.2                     | Amplificazione dei cDNA codificanti CP4EPSPS e Cry1AB                                 | pag. 103 |
| 1.3                     | Verifica dell'inserimento e quantificazione dei plasmidi                              | pag. 104 |
| 1.4                     | Analisi di restrizione  | pag. 107 |

|   |          |
|---|----------|
| 1.5 Ricombinazione  | pag. 109 |
| 1.6 Analisi dell'espressione  | pag. 111 |
| 1.7 Produzione delle proteine   | pag. 115 |
| 1.8 Utilizzo delle proteine sintetizzate  | pag. 116 |
| <b>2 Risultati dei Test ELISA</b>   |          |
| 2.1 Elisa indiretto   | pag. 117 |
| <b>3 Western blot</b>   |          |
| 3.1 Risultati dei Western blot  | pag. 120 |
| <b>4 Risultati e valutazione statistica dei metodi immunoenzimatici</b>   |          |
| 4.1 Kit ELISA commerciali a confronto   | pag. 123 |
| 4.2 Risultati e valutazione statistica del metodo immunoenzimatico<br>basato sulla ELISA Reverse m&d  | pag. 125 |
| 4.3 Risultati e valutazione statistica del metodo immunoenzimatico<br>innovativo per la quantificazione di Cry1Ab basato sulla<br>tecnologia xMAP | pag. 129 |
| <b>5 Saggio per acidi nucleici basato sulla tecnologia xMAP</b>   |          |
| 5.1 Risultati e valutazione statistica del metodo qualitativo<br>basato sulla tecnologia x-Map per acidi nucleici                                 | pag. 141 |
| <b>V DISCUSSIONE</b>  |          |
| <b>1 Metodi di analisi e legislazione europea</b>   |          |
| 1.1 Limiti della legislazione   | pag. 148 |
| <b>2 Limiti di informazione</b>   |          |
| 2.1 Reperimento di campioni reagenti  | pag. 149 |

|          |  |          |
|----------|--|----------|
| <b>3</b> | <b>Espressione di Cry1Ab e CP4EPSPS</b>  |          |
|          | 3.1 Clonaggio ed espressione di Cry1Ab   | pag. 150 |
|          | 3.2 Clonaggio ed espressione di CP4EPSPS | pag. 150 |

|          |                                    |         |
|----------|------------------------------------|---------|
| <b>4</b> | <b>ELISA Reverse m&amp;d e OGM</b> |         |
|          | 4.1 Saggio immunoenzimatico        | pag 150 |

|          |  |          |
|----------|--|----------|
| <b>5</b> | <b>Applicazione della tecnologia xMAP per la quantificazione di Cry1Ab</b> |          |
|          | 5.1 Saggio immunoenzimatico  | pag. 153 |
|          | 5.2 Saggio per acidi nucleici  | pag. 155 |

## **VI APPENDICE**

|          |                 |          |
|----------|-----------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Articoli</b> |          |
|          | 1° Articolo     | pag. 158 |
|          | 2° Articolo     | pag. 161 |
|          | 3° Articolo     | pag. 168 |
|          | 4° Articolo     | pag. 174 |

## **VII BIBLIOGRAFIA**

|          |                  |          |
|----------|------------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Referenze</b> | pag. 191 |
|----------|------------------|----------|

## **VIII RINGRAZIAMENTI**

|          |                       |          |
|----------|-----------------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Ringraziamenti</b> | pag. 201 |
|----------|-----------------------|----------|

## *Premessa*

Il presente progetto di Dottorato è stato inserito nel programma quinquennale di ricerca (2001-2006) dell'Unità di Biotecnologie ed Organismi Geneticamente Modificati dell'Istituto per la Salute e Protezione del Consumatore della Commissione Europea presente nel sito del Centro Comune di Ricerca di Ispra.

L'Unità svolge diverse attività in diretto supporto alla legislazione europea in materia di OGM. Particolarmente noto è il ruolo del Community Reference Laboratory (CRL), che ufficialmente, dal 18 Aprile 2004, si occupa della validazione dei metodi di quantificazione e riconoscimento di OGM. Altri temi di ricerca riguardano studi di stabilità ed integrità dei transgeni, la creazione di nuovi standard (plasmidici) per la quantificazione di OGM, la creazione di database e network che aiutino la diffusione delle informazioni disponibili sugli OGM ed infine lo sviluppo di nuovi metodi per l'individuazione e la quantificazione di OGM approvati e non approvati nelle matrici alimentari.

In quest'ultima attività trova collocazione il progetto di dottorato qui descritto.

---

# I INTRODUZIONE

---

## 1 Introduzione

Figura 1



Tumore del colletto-Pesco

### 1.1 Trasformazione genetica delle piante

La manipolazione genetica delle piante, utilizzando la tecnica degli incroci, è praticata dall'uomo da centinaia di anni e ha portato alla introduzione di molte nuove varietà vegetali con considerevoli e continui miglioramenti nelle rese e nella qualità delle coltivazioni (Chrispeels, 2000; Tabe, 1998; Bourlaug, 1997). Già nel Neolitico l'uomo coltivava piante che garantivano una maggiore resa produttiva fra le diverse varietà genetiche che la natura offriva, ad esempio oltre 20 varietà diverse di melo venivano coltivate ai tempi dei Romani e 43 varietà di riso erano presenti in Italia nei primi anni del 1800. Queste tecniche, tuttavia, sono estremamente lente e di utilità limitata considerando il numero esiguo di specie che è possibile incrociare. Non sono, inoltre, controllabili ed il risultato rimane piuttosto aleatorio, perché dipende dal trasferimento incontrollabile di geni per lo più sconosciuti. La tecnologia del DNA ricombinante odierna, basata su presupposti noti ed evidenze scientifiche provate, permette di imprimere una formidabile accelerazione al processo della selezione di nuove specie, superando ogni barriera di specie e modificando esclusivamente i geni desiderati (Birck, 1997). Dal primo trasferimento di geni eterologhi in piante di tabacco, descritto indipendentemente da tre gruppi di ricerca, nel 1984, i metodi di trasformazione di cellule vegetali si sono perfezionati e sono diventati sempre più affidabili. Ad oggi risultano trasformate con successo più di 120 specie vegetali diverse e numerose piante transgeniche o derivati di piante transgeniche vengono regolarmente commercializzate nel mondo (Collins, 1996; Pain, 2005). Nonostante una diffusa ostilità di larghi strati dell'opinione pubblica soprattutto europea riguardo alle piante transgeniche, è un dato di fatto che le piante transgeniche si stanno diffondendo rapidamente: basti pensare che negli USA le coltivazioni di mais transgenico hanno quasi completamente sostituito quelle di mais tradizionale (Leist,

1999; INRAN, 2004). In teoria la trasformazione vegetale offre l'opportunità di introdurre geni di qualunque origine nelle cellule vegetali. Queste cellule vengono, quindi, rigenerate producendo piante transgeniche che contengono ed esprimono la nuova informazione genetica desiderata (Duval, 1995; Engelmann, 1977; Betz, 2000).

### Dicotiledoni

Il metodo più diffuso per trasferire geni esogeni nelle piante, si basa sull'uso di vettori di trasformazione derivati da *Agrobacterium tumefaciens* e da *A. rhizogenes*, due batteri normalmente presenti nel suolo che infettano le cellule di molte piante dicotiledoni. Questi due batteri infettando le cellule vegetali provocano, il primo, una formazione tumorale nota come “galla del colletto” ed il secondo la formazione di radici avventizie nella zona di infezione (Fig 1). La patologia dovuta ad *Agrobacterium tumefaciens* era già stata descritta oltre 2000 anni fa e si presenta come una forma tumorale a volte di notevoli dimensioni. Tali formazioni sono la conseguenza del trasferimento, da parte del batterio, di un segmento di DNA, chiamato T-DNA, che è parte di un grosso plasmide (chiamato Ti: induttore di tumore) presente nella cellula batterica, nel DNA nucleare della pianta (Hooykaas, 1992). I geni presenti all'interno del T-DNA, delimitato da due segmenti di DNA di 25 paia di basi, non soltanto vengono integrati stabilmente nel genoma nucleare della cellula trasformata e successivamente della pianta transgenica da essa rigenerata, ma vengono anche espressi e trasferiti alla progenie della pianta transgenica (Fig.2). Il T-DNA contiene geni che controllano la sintesi di enzimi coinvolti nella produzione di auxine e citochinine, ormoni vegetali che regolano il processo di divisione cellulare nei tessuti infettati della pianta. Inoltre, altri geni presenti nel T-DNA determinano la sintesi di alcuni derivati aminoacidici, chiamati opine (octopina, nopalina, agropina), variabili a seconda del tipo di *Agrobacterium*, e vengono prodotte esclusivamente nelle cellule trasformate della pianta e utilizzate da *Agrobacterium* come fonte di azoto e di carbonio (Fig. 3) (Verpoorte, 2000).

In origine, utilizzando ceppi di *A. tumefaciens* di tipo selvatico, era estremamente difficile poter rigenerare piante trasformate dai tessuti tumorali. Una serie di manipolazioni del plasmide batterico Ti ha portato alla costituzione di diversi plasmidi modificati nei quali le sequenze di DNA responsabili della formazione tumorale sono state rimosse, mentre sono state conservate le sequenze che conferiscono al batterio la capacità di trasferire ed integrare



il DNA all'interno del DNA nucleare (la cosiddetta regione "*vir*"). Per superare i problemi connessi con la espressione dei geni esogeni trasferiti nella pianta, sono stati inoltre costruiti vettori plasmidici che contengono geni chimerici, costituiti cioè da sequenze di DNA di diversa origine, come ad es. la sequenza del promotore della nopalina sintasi (gene "*nos*") e sequenze codificanti la sintesi della neomicina fosfotransferasi che conferisce la resistenza all'antibiotico kanamicina. La presenza del gene che conferisce resistenza alla kanamicina consente di selezionare le cellule trasformate all'interno di una popolazione di cellule non trasformate per la loro capacità di crescere su terreni di coltura contenenti elevate concentrazioni dell'antibiotico.

Oggi sono disponibili diversi vettori plasmidici Ti derivati principalmente dall' *A. tumefaciens* per la trasformazione genetica di cellule vegetali. Uno tra i più utilizzati è un vettore "binario" costituito da due plasmidi uno dei quali (il plasmide helper) contiene le funzioni geniche necessarie per l'infettività di *Agrobacterium* (i geni di virulenza), mentre il secondo è disponibile per ricevere le sequenze di DNA esogeno da trasferire nella pianta. Una versione di tale vettore contiene anche un gene marcatore di origine batterica, il gene della glucuronidasi (GUS) che consente l'identificazione delle cellule trasformate mediante semplici colorazioni istochimiche (Herrera-Estrella, 1983).

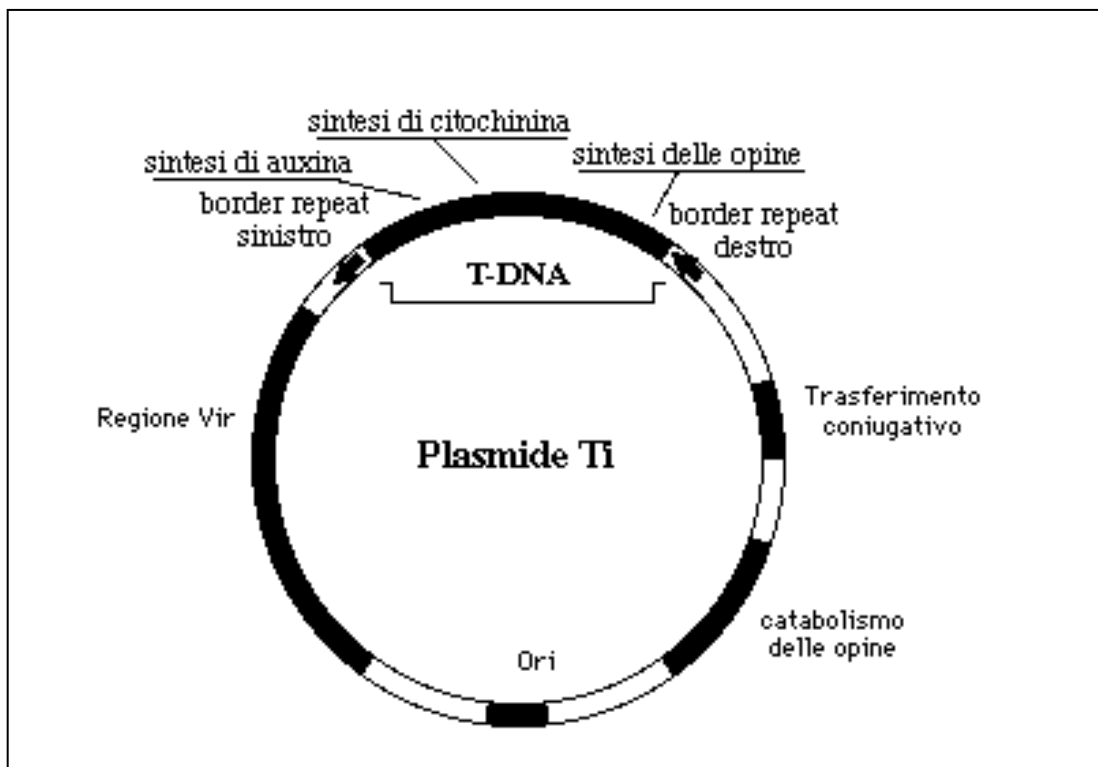


Figura 2. Mappa schematica del plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*

Il metodo di trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium* è estremamente semplice, poco costoso ed efficiente in molti sistemi in cui è disponibile un efficiente protocollo di rigenerazione di piante da un tessuto coltivato *in vitro*. Consiste nel coltivare tessuti della pianta in presenza di *Agrobacterium* per alcuni minuti o fino a diverse ore e quindi, dopo gli opportuni trattamenti per rimuovere *Agrobacterium*, nel promuovere la divisione cellulare, la selezione e la rigenerazione delle cellule trasformate. Mediante *Agrobacterium* è stato possibile trasformare tessuti di foglia, radici, ipocotili, piccioli, cotiledoni, embrioni derivati da polline, semi e persino piante (Ceccherini, 2003; Chilton, 1977; De Maagd, 1999).

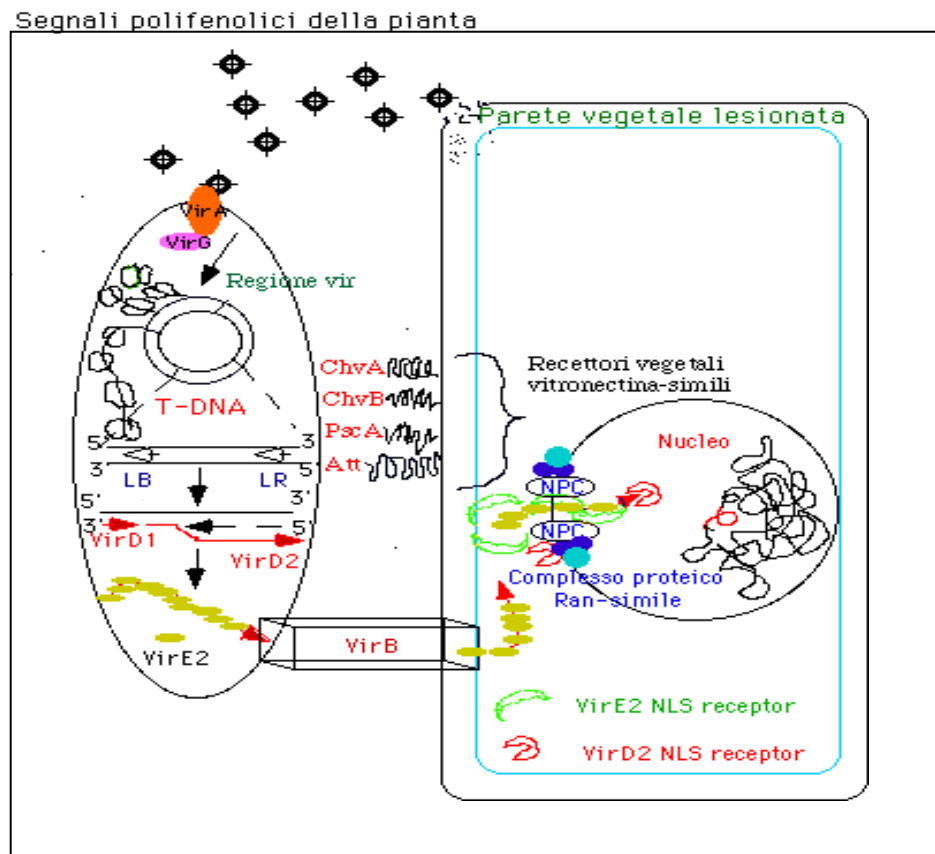


Figura 3. Segnali polifenolici della pianta

### Monocotiledoni

Alcune specie di monocotiledoni economicamente importanti non sono suscettibili all'infezione di Agrobatteri, vengono perciò utilizzate altre strategie di inserzione quali la microiniezione, l'elettroporazione, la trasformazione di protoplasti o la trasformazione diretta mediante bombardamento con micro-proiettili (particle-gun).

Più recentemente sono stati selezionati nuovi ceppi iper-virulenti di *Agrobacterium tumefaciens* capaci di infettare anche le Monocotiledoni. Fra le specie transgeniche coltivate a scopi commerciali, soia e mais rappresentano le colture geneticamente modificate a più ampia diffusione (Suslow, 2002).

### Trasformazione mediante bombardamento con microproiettili.

Un altro metodo molto utilizzato per eludere le restrizioni di specie imposte dallo spettro d'ospite di *A. tumefaciens* consiste nell'introdurre, direttamente in una cellula, DNA mediante il bombardamento di cellule o tessuti con microproiettili. La tecnica é basata sull'accelerazione di microproiettili (generalmente d'oro o di tungsteno) ricoperti di DNA contro una cellula o un tessuto vegetale con una forza sufficiente ad attraversare la parete cellulare e la membrana. Una volta all'interno della cellula il DNA si dissocia dal suo supporto e si integra nel DNA della cellula. I microproiettili possono essere accelerati in vari modi, ma negli apparati attualmente in uso, ciò avviene per effetto di aria o elio compressi. I microproiettili penetrano nelle cellule veicolando il materiale genetico senza compromettere in modo irreversibile l'integrità delle cellule stesse in quanto le lesioni prodotte sono temporanee. I bersagli finora utilizzati con questa tecnica sono costituiti da sospensioni cellulari, calli, embrioni immaturi, porzioni di embrioni maturi, meristemi, pezzi di foglie, microspore, polline. Il principale vantaggio del metodo biolistico consiste nella possibilità di utilizzare come bersaglio persino espianti intatti riducendo e, in alcuni casi, eliminando l'impiego di calli e sospensioni cellulari. Ciò ha permesso di superare con successo le difficoltà di rigenerazione esistenti in molte specie vegetali. Particolarmente efficace si é dimostrato nei confronti delle specie recalcitranti alla trasformazione (cereali, legumi) o che risultano difficili alla rigenerazione utilizzando le tecniche disponibili di coltura *in vitro*. Un altro esempio é dato dalle specie arboree per le quali nella maggior parte dei casi l'infezione con *Agrobacterium tumefaciens* risulta inefficace quando é associata a sistemi di rigenerazione non particolarmente efficienti (Southgate, 1995).

### 1.2 Soia, *Glycine max*

La soia é una pianta erbacea annuale delle Papilionacee, proveniente dalla Cina e dal Giappone, molto diffusa e coltivata per il foraggio e per l'estrazione dell'olio; é formata da foglie trifogliate, grappoli di fiori violetti o bianchi e baccelli con semi oleosi (Fig. 4). Ha un elevato contenuto proteico (oltre il 35% contro il 20-25% delle altre leguminose) e



**Figura 4. Soia.**

lipidico (il 18%) ed è facilmente adattabile a ogni tipo di suolo. **Le varietà** - Vi sono due varietà di soia: la soia gialla (la più commercializzata) e la soia nera (che invece viene consumata soprattutto sul luogo di produzione). Altri semi vengono chiamati "soia" ma appartengono in realtà alla famiglia dei fagioli: la soia rossa, detta *azuki* (*Phaseolus angularis*) e la soia verde, detta *fagiolo mung* (*Vigna radiata*). I principali produttori mondiali sono gli Stati Uniti, la Cina, l'India, l'Argentina e l'Italia. La soia è di gran lunga la principale coltura transgenica (nel 2000 rappresentava il 52% dei quaranta milioni circa di ettari di colture OGM; la coltivazione della soia transgenica è comunque vietata in Europa mentre negli USA rappresenta il 50% della produzione totale di soia e in Brasile il 64%). **Contributo alimentare** - Rispetto ai legumi nostrani, presenta una ripartizione tra macronutrienti diversa, fino al 35% di proteine e al 18% di grassi, contro, rispettivamente, il 20% (proteine) e il 2% (grassi) di fagioli, ceci e lenticchie. Inoltre, accanto all'apporto nutrizionale di alto valore, la soia contiene anche gli isoflavonoidi ai quali è riconosciuta, rispettivamente, un'azione ipocolesterolemizzante e di supporto alla produzione ormonale femminile. Grazie all'apporto notevole di lipidi, la soia produce derivati non solo proteici, ma anche con notevole componente di grassi, venendo a sostituire alimenti come il formaggio o l'olio.

Inoltre la presenza di fitoestrogeni (estrogeni di origine vegetale) agisce come sostituto degli estrogeni naturali in situazioni di carenza, come la menopausa, contrastando l'insorgere della osteoporosi, la cui causa principale è appunto la riduzione della produzione degli estrogeni da parte del corpo femminile. L'integrazione di fitoestrogeni diminuisce anche la probabilità di cancro al seno, la cui frequenza nelle donne asiatiche è decisamente inferiore a quella delle donne europee. La soia è però un alimento interessante anche per l'uomo, in quanto alcuni

studi hanno documentato una connessione tra una dieta ricca di proteine di origine vegetale derivante dalla soia e un basso rischio di contrarre il cancro al colon e alla prostata, due delle cause più diffuse di mortalità tra gli uomini. Come alimento è quindi importante per gli effetti benefici nella riduzione del colesterolo, nonché come fonte di proteine nell'alimentazione vegetariana. Sicuramente la soia è un ottimo alimento, ma non può essere usato come sostituto universale al posto del latte (latte di soia) o della carne (hamburger vegetali). Non è sovrapponibile perfettamente ai corrispondenti alimenti animali e un eccessivo consumo di soia rende difficoltoso l'assorbimento di micronutrienti come lo zinco.

**Alimentazione** - La soia può arrivare sulle nostre tavole sotto diverse forme: *farina di soia*, è simile alla farina estratta dai cereali, con la differenza che si utilizza come fonte il seme della soia. Si può usare come le normali farine in cucina per la preparazione di pasta, biscotti, dolci e pane. A differenza delle farine da cereali, non contiene glutine e quindi può essere una valida alternativa per i celiaci. Prodotti della soia quali *carne*, *germogli* e *latte* (privo di lattosio e di colesterolo, può provocare allergie a causa del contenuto in nichel) sono ormai largamente consumati

**Figura 5. Soia GM**



**Soia statunitense geneticamente modificata. Il Giappone la importa per la produzione di tofu**

anche in Italia. Il *miso* è particolarmente diffuso in Giappone. Si usa generalmente come insaporitore di minestre ed a volte viene venduto in versione aromatizzata. Il *natto*, simile al miso, ma dal gusto più deciso, è scarsamente conosciuto in Italia. L'*olio di soia*, reperibile sul mercato, è quello lavorato a caldo e trattato chimicamente e non ha particolari qualità. *Pane*, *pasta* e *fiocchi* vengono ottenuti miscelando farina di soia e farina di frumento. Le *noccioline di soia* sono costituite dai semi di soia fatti saltare nell'olio o tostati; sono usate per condire piatti o insaporire yogurt o primi. La *salsa di soia* viene prodotta mediante la fermentazione della soia e del frumento, dell'orzo e del riso, cotti in precedenza in acqua e con aggiunta di sale. Lo *shoyu* è una salsa ricavata dalla fermentazione della soia gialla e del frumento. Il *tamari* è una salsa di soia cinese, dal sapore di carne, molto salata. Il *tao-you* è un'altra salsa, ricavata però dalla soia nera. Il *tempeh* è un alimento molto diffuso in Indonesia, a base di

soia bollita e fermentata. Dai semi di soia fermentati si ottiene un composto pastoso usato per insaporire la pasta o il riso, come una specie di sugo, oppure panini o insalate o per insaporire le grigliate. Il *tofu* (formaggio di soia) si ottiene dalla coagulazione del latte di soia effettuata con composti del sodio (cloruro o solfato). Esistono molte versioni di tofu e non tutte ugualmente appetibili per il nostro gusto italiano. Cremoso e denso, ha l'aspetto simile al tomino o alla mozzarella. Essendo un derivato del latte di soia, ne presenta tutti i lati positivi (assenza di colesterolo e grassi saturi) e i lati negativi (assenza di calcio e scarso apporto di sali minerali). Può essere un parziale sostituto di uova o carne. Lo *yogurt* si ricava dal latte di soia.

### Coltivazioni di soia

La coltivazione della soia presenta dei problemi tra i quali la gestione delle erbe infestanti. Oltre 30 specie vegetali possono infestare le aree di coltivazioni della soia, causando perdite ingenti del raccolto. In assenza di interventi fitosanitari, il rischio di perdite nel raccolto raggiunge il 90%. Il controllo delle erbe infestanti viene effettuato combinando più tecniche agronomiche, quali: la preparazione adeguata del letto di semina, l'utilizzo di sementi certificate, l'opportuna scelta varietale e del periodo di semina migliore, trattamenti chimici a base di principi attivi erbicidi.

La tendenza nella gestione delle erbe infestanti è quella di effettuare dei trattamenti in post-emergenza con la coltura già sviluppata per verificare la presenza della flora infestante ed effettuare un intervento mirato (Fig. 6).



**Figura 6. Campo di soia libero da infestanti**

Spesso per operare un controllo erbicida efficace, vengono effettuati ogni anno più interventi in campo utilizzando diversi principi attivi ad azione selettiva che consentono di eliminare le diverse specie infestanti e di preservare l'integrità della coltura. I classici erbicidi utilizzati sono: quizalofop, trifluralin, pendimethalin, 2,4-D, imazethapyr. Il loro utilizzo comporta degli inconvenienti come la difficoltà di gestione dei principi attivi, i potenziali effetti tossici sulla coltura, la permanenza di metaboliti tossici nei prodotti finali, nel terreno e nelle acque. La pratica del diserbo della soia in pre-emergenza e in copertura è utile invece per controllare le infestanti resistenti al primo intervento. I principi attivi da utilizzarsi sono: Graminici quali alachlor e metolachlor con l'aggiunta di un Dicotilenodica quale linuron e pendimethalin. Da diversi anni esistono in commercio alcuni principi erbicidi ad azione totale a basso impatto ambientale e a bassa tossicità per gli animali, come glifosate e glufosinate ammonio, largamente impiegati per l'eliminazione di tutte le erbe durante la preparazione dei terreni colturali e la pulizia dei bordi stradali e ferroviari. L'utilizzare questi prodotti negli interventi diserbanti di post-emergenza semplifica notevolmente la gestione delle infestanti e può ridurre l'impatto ambientale degli interventi fitosanitari.

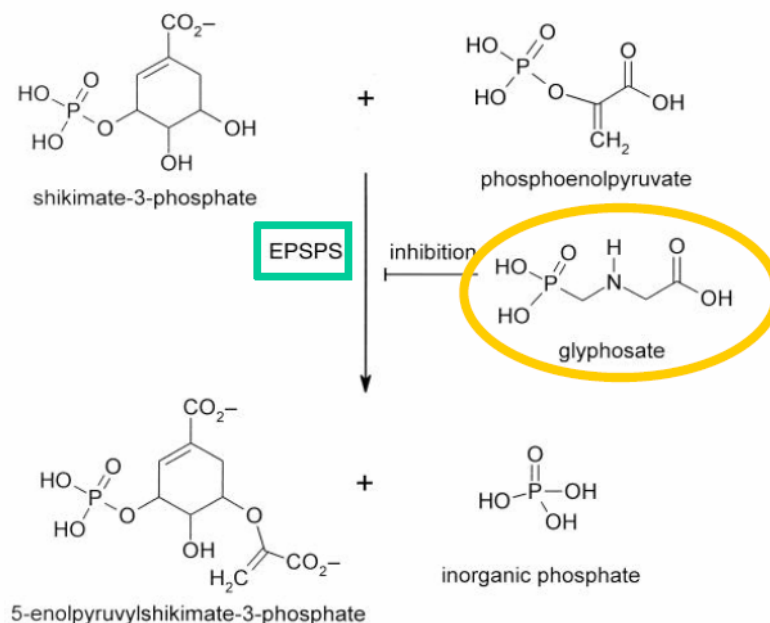


### Soia Round-Up Ready®

Questa soia, commercializzata dalla Monsanto, esprime un gene batterico per la tolleranza al glifosato. Questo erbicida a largo spettro ha un'alta biodegradabilità e nello stesso tempo è in grado di controllare molte infestanti del periodo di post-emergenza della soia. La linea di soia GTS 40-3-2 (nome commerciale della soia Roundup Ready®) è l'unica varietà di soia geneticamente modificata attualmente autorizzata ad essere commercializzata in Europa. Questa linea permette l'impiego del principio attivo erbicida glifosate normalmente letale per le varietà di soia tradizionale, anche durante la fase vegetativa di crescita. In un unico intervento, è pertanto possibile controllare efficacemente tutte le specie infestanti presenti in campo (Fig. 5).

### Glifosate: meccanismo di azione

Il glifosate (N-fosfonometilglicina) è una molecola ad azione erbicida, possiede una struttura chimica analoga al fosfoenolpiruvato e come tale si lega all'enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasi (EPSPS), inibendone l'attività (Fig. 7).



**Figura 7: Meccanismo di azione dell'erbicida glifosate**

EPSPS è un gene nucleare la cui proteina è uno degli enzimi chiave della catena biosintetica degli aminoacidi aromatici. La sua attività si svolge nel cloroplasto dove viene trasportata dopo la sua sintesi e dove catalizza la formazione del 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato a partire da acido shikimico-3-fosfato e fosfoenolpiruvato (fig. 8).

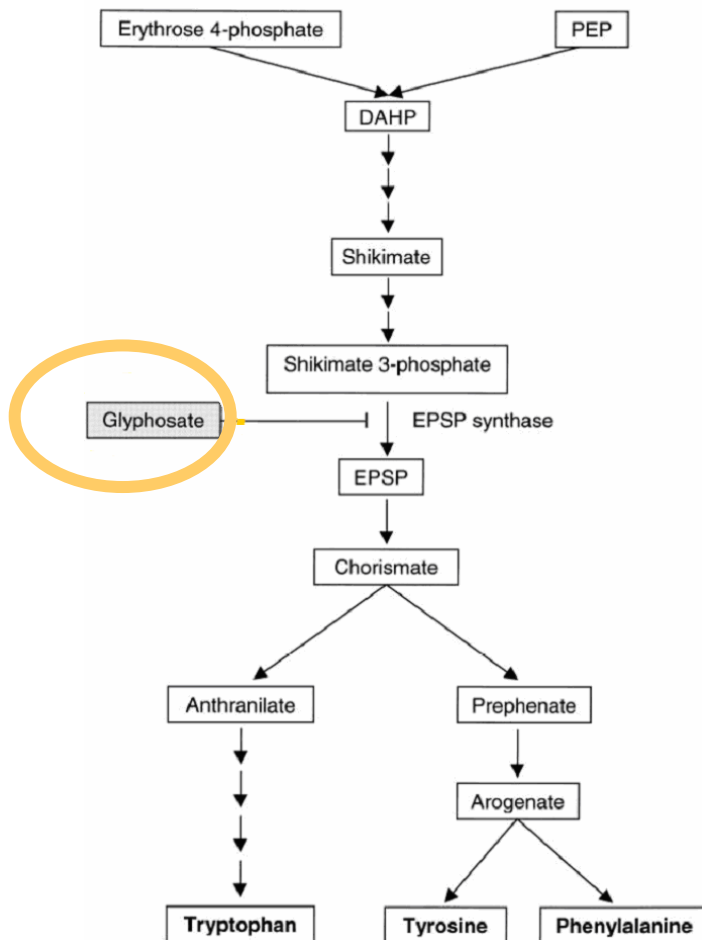


Figura 8: Via biosintetica degli aminoacidi aromatici

EPSPS è presente in piante, funghi e batteri, ma non nei mammiferi, uccelli e pesci nei quali non è presente la via biosintetica degli aminoacidi aromatici che devono essere assunti con la dieta. La molecola del glifosate quindi possiede limitata tossicità verso gli animali che potrebbero venire a contatto. Negli organismi sensibili la presenza di glifosate blocca la

produzione degli aminoacidi aromatici e delle molecole del metabolismo secondario che ne derivano causando l'arresto della sintesi proteica a cui segue la morte dell'organismo.

Il tratto di DNA utilizzato nella trasformazione proviene dal batterio *Agrobacterium tumefaciens* ceppo CP4 e l'enzima codificato (CP4-EPSPS) rende la pianta tollerante all'azione del principio attivo erbicida in quanto il sito di legame riconosciuto dal glifosate possiede alcune mutazioni che impediscono alla molecola di legarsi.

Il gene è stato inserito nella cultivar di soia A5403 originando la linea di soia GTS 40-3-2 tollerante al glifosate. La linea GTS 40-3-2 è stata ottenuta mediante trasformazione genica diretta (particle-gun) utilizzando il vettore plasmidico PV-GMGT04 contenente una singola cassetta genica per CP4-EPSPS costituita da:

- Promotore 35S
- Transit Peptide per la localizzazione cloroplastica (CTP)
- Regione codificante di CP4-EPSPS
- Terminatore della trascrizione NOS

La regione codificante origina una proteina di 456 aminoacidi del peso di 46 KDa (Monsanto, 2000). La selezione dei trasformanti avviene per crescita *in vitro* delle cellule infettate in presenza di glifosate.

Nel 1996, anno dell'entrata in commercio USA, questa varietà occupava meno del 5% della superficie totale coltivata a soia, nel 2004 rappresentava circa il 55% (41.4 milioni di ettari su 76 milioni di ettari, fonte Agbios).

L'utilizzo così diffuso di soia Roundup-Ready® è spiegato dalla semplificazione degli interventi erbicidi che ne derivano: il glifosate, infatti, permette il controllo di tutte le erbe infestanti direttamente in un unico trattamento, riducendo il numero di principi attivi e di interventi diserbanti necessari per la lotta alle infestanti con benefici in termini economici ed ecologici (Carpenter, 2002).

#### Aspetti di sicurezza ambientale

La sperimentazione per la valutazione delle caratteristiche agronomiche delle coltivazioni di soia Roundup-Ready® è stata eseguita nel Nord America dal 1991 al 1993. Le osservazioni in pieno campo hanno dimostrato che le coltivazioni di soia geneticamente modificata sono

del tutto equivalenti, in termini di caratteristiche agronomiche, al wilde type. I parametri scelti furono: tasso di crescita, produzione, tempi di fioritura e maturazione; ognuno dei quali non evidenzio` variazioni significative superiori alla normale variabilità rispetto alle cultivar tradizionali (Monsanto, 2000; Canadian Food Inspection Agency, 2001; Delannay, 1995).

Una delle perplessita` riguardanti le coltivazioni in campo aperto degli OGM è la possibilità che il transgene venga trasmesso accidentalmente alle colture tradizionali (Ray, 2003; Henry, 2003). La soia, pero`, è una pianta strettamente autoimpollinante e ciò rende improbabile la possibilità che avvenga un trasferimento genico indesiderato dalle piante OGM alle varietà spontanee o a piante di soia tradizionale coltivate in campi vicini.

Inoltre, nelle attuali zone di coltivazione della soia Roundup Ready<sup>®</sup>, il trasferimento del gene CP4-EPSPS in piante infestanti spontanee è estremamente improbabile grazie alla lontananza filogenetica da soia Roundup Ready<sup>®</sup>. L'unica reale possibilità di trasferimento genico tra soia RuR e varietà spontanee è presente nelle zone di origine del genere *Glycine*, dove però al momento non esistono coltivazioni di soia RuR (Canadian Food Inspection Agency, 2001). Anche nel caso in cui il trasferimento genico tra le due specie avvenisse, l'inserimento del gene CP4-EPSPS non conferirebbe un vantaggio selettivo in ambiente naturale. La pianta accidentalmente trasformata non acquisirebbe caratteristiche di per se infestanti, ed in ogni caso sarebbe possibile controllarne la presenza con interventi meccanici o chimici a base di principi attivi diversi dal glifosate (Carpenter, 2002). Un altro aspetto da considerare e` la possibile alterazione dell'ecosistema in cui vengono immesse le piante geneticamente modificate. Come dimostrato da numerosi esperimenti in campo, anche l'elevata concentrazione dell'enzima CP4EPSPS nel suolo non possiede effetti negativi sugli organismi che vengono a contatto con le piante GM. Cio` invece consente l'utilizzo di un prodotto a minor impatto ambientale che salvaguardia la fauna presente nel terreno (Carpenter, 2002). In teoria esiste anche la possibilità che geni codificanti per resistenze ad antibiotici vengano "trasmessi" a microrganismi del suolo; anche se questo evento è stato dimostrato possibile in laboratorio (Kay, 2002) non è ancora stata chiarita l'effettiva importanza del trasferimento genico spontaneo in condizioni naturali (Paget, 1999).

### Aspetti di sicurezza per alimentazione umana

Le analisi nutrizionali sulla composizione di zuccheri, grassi e proteine dei semi di soia prodotti dalle piante di soia transgenica indicano che non ci sono differenze significative imputabili alla trasformazione genica fra soia Roundup Ready® e altre varietà tradizionali coltivate (Padgett, 1995). Non vengono rilevate differenze sostanziali nemmeno per quanto riguarda la presenza di fattori antinutrizionali quali inibitori delle proteasi, lectine, emoagglutinine ed altri componenti ad azione tossica come dimostrano studi effettuati su animali alimentati con soia Roundup Ready® (OECD, 2001). La sequenza di aminoacidi della variante CP4-EPSPS è strettamente correlata a quella di EPSPS normalmente contenuta nelle piante. L'analisi comparata della sequenza aminoacidica e della struttura proteica di CP4-EPSPS evidenzia un basso potenziale di tossicità se confrontata con la struttura e la sequenza di proteine che hanno azione nociva nota. Ciò è ulteriormente confermato da numerosi esperimenti condotti *in vivo* (Hammond, 1996).

Animali di laboratorio alimentati con mangimi contenenti CP4EPSPS, purificata in quantità superiori a 1300 volte quelle normalmente presenti in una farina di soia RuR, non hanno messo in evidenza nessun effetto tossico rispetto ai controlli non trattati (Teshima, 2000). È importante sottolineare che EPSPS è un enzima normalmente contenuto in piante, batteri, funghi e negli alimenti da essi derivati e sino ad ora non sono mai stati segnalati fenomeni di tossicità o allergicità correlabili alla presenza di tale enzima. La possibilità che la nuova proteina possa avere potenziale allergenico è quindi remota. Recentemente sono state caratterizzate numerose molecole che inducono reazioni allergiche. Tali molecole hanno generalmente dimensioni, comprese tra i 10 e 70 KDa, sono altamente glicosilate, stabili alla digestione nello stomaco dei mammiferi. Ad eccezione delle dimensioni, CP4-EPSPS non ha le caratteristiche tipiche di un allergene ed è rapidamente degradato in ambiente acido (Williams, 2000).

### 1.3 Mais, *Zea mais* L.

Il mais è un cereale originario dell'America Latina e portato in Europa da Cristoforo Colombo (Fig. 9). Il mais è una pianta erbacea annuale appartenente alla classe delle Monocotiledoni, famiglia Graminacee. Nel corso degli ultimi secoli la sua coltivazione si è

diffusa in tutto il mondo, anche se le varietà attuali sono molto differenti da quelle originali. Si tratta di un cereale con un basso contenuto proteico e ricco di amido; inoltre, le sue proteine vegetali lo rendono poco adatto alla panificazione perché sono prive di glutine. Per questo motivo, il mais viene utilizzato soprattutto per la preparazione di polente, biscotti e fiocchi per la prima colazione. Le pannocchie fresche possono essere anche consumate bollite o alla griglia; infine, dai chicchi di mais si ottiene il pop-corn. Esso contiene: carboidrati: 75,8%; proteine: 9,2%; grassi: 3,8%; acqua: 12,5%; colesterolo: 0; sodio: tracce; calorie: 355. Le piante di mais sono caratteristiche per il fatto di avere sullo stesso individuo infiorescenze sia maschili, sia femminili portate separatamente: quella maschile è una pannocchia apicale, quella femminile è una spiga ascellare che si trova a circa metà del fusto. L'impollinazione dei fiori femminili perciò avviene per dispersione ad opera del vento dopo la maturazione del polline.



**Figura 9.** Piante di mais.

### Importanza commerciale del Mais

Il mais rappresenta una delle principali colture utilizzate per l'alimentazione umana ed animale. Campi coltivati a mais sono diffusi in oltre 100 Paesi. I maggiori produttori di mais nel mondo sono Stati Uniti, Cina, Brasile e Messico (fonte Agbios).

La produzione di semi viene utilizzata come punto di partenza per ottenere molti sottoprodotti per l'alimentazione e per l'uso industriale. Il mais viene impiegato principalmente nella produzione di mangimi per l'alimentazione degli animali; per quanto riguarda il consumo umano, viene utilizzato per l'estrazione di olio e amido impiegati come materie prime per la preparazione di numerosi prodotti, mentre solamente una minima quantità è utilizzata per il consumo diretto. L'amido di mais viene anche utilizzato industrialmente nelle fermentazioni batteriche come substrato per la produzione di etanolo,

mentre dalla pianta è possibile ottenere carta riciclata, pigmenti, cosmetici, parti di automobili e alcuni prodotti farmaceutici come antibiotici.

### Coltivazioni di mais

Nelle coltivazioni di mais i problemi che causano le maggiori perdite di raccolto sono due: la presenza delle erbe infestanti e le infestazioni di insetti.

Data l'importanza di questa coltura, numerose varietà di mais sono state ingegnerizzate.

Analogamente a quanto avviene nelle coltivazioni di soia, anche per il mais è necessario eliminare le erbe infestanti presenti in campo che tendono ad entrare in competizione con la coltura per i fattori di crescita riducendo in questo modo la resa del raccolto.

In commercio esistono più varietà tradizionali di mais resistenti ai principali principi attivi impiegati. I prodotti più utilizzati nei programmi di diserbo in colture non transgeniche contengono principi attivi come atrazina, alachlor, acetochlor, metolachlor. Queste molecole sono però poco degradabili e si accumulano nelle acque inquinandole.

Anche altre molecole come le solfoniluree (nicosulfuron e pirimisulfuron), che hanno un minore impatto ambientale, presentano alcune limitazioni nel loro impiego: esse possono avere effetto tossico sulla coltura in presenza di prodotti organofosforici impiegati per la lotta agli insetti. Inizialmente, si è tentato di sviluppare varietà di mais tolleranti all'azione degli erbicidi a basso impatto ambientale tramite l'induzione e la selezione di mutanti, senza però ottenere risultati soddisfacenti. Infine, si è riusciti ad individuare e trasferire le caratteristiche genetiche che rendono le piante di mais insensibili all'azione di questi erbicidi. La tolleranza al glifosate è stata ottenuta, introducendo nel genoma del mais, il tratto genico codificante per l'enzima CP4-EPSPS proveniente dal ceppo CP4 di *Agrobacterium tumefaciens*. Per rendere il mais resistente al glufosinate ammonio è stato invece introdotto il gene fosfinotricina-aciltransferasi o PAT. Con l'avvento delle linee di mais GM è oggi possibile utilizzare gli erbicidi totali a basso impatto ambientale come il glifosate e il glufosinate ammonio. Le infestazioni da insetti nelle colture di mais sono principalmente dovute ad un insetto, la piralide (*Ostrinia nubilalis*). La piralide è un lepidottero che attacca l'intera pianta di mais durante tutta la stagione, causando perdite nel raccolto che raggiungono in alcuni casi il 40% del totale.

Nonostante gli ingenti danni provocati dall'insetto, la difesa fitosanitaria viene eseguita raramente a causa delle difficoltà che si incontrano nell'effettuare i trattamenti con la coltura in fase avanzata di sviluppo. Gli attacchi di piralide, inoltre, sono difficilmente prevedibili e i trattamenti disinfestanti sono costosi.

Per l'ottenimento di varietà di mais transgeniche resistenti a questo parassita, sono stati inseriti i geni codificanti la proteina Cry 1Ab, tossica per l'insetto, contenuti in un batterio del suolo, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

### Mais GM

Al momento solo sei varietà di mais geneticamente modificate sono state autorizzate ad essere commercializzate nel mercato europeo. Le caratteristiche delle 12 varietà esistenti sono descritte in tabella I.

| <b>::Zea mays L. (Maize)</b>    |                      |  |
|---------------------------------|----------------------|--|
| <b>Event</b>                    | <b>Company</b>       | <b>Description</b>   |
| 176                             | Syngenta Seeds, Inc. | Insect-resistant maize produced by inserting the <i>cry1Ab</i> gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> . The genetic modification affords resistance to attack by the European corn borer (ECB).                                    |
| BT11<br>(X4334CBR,<br>X4734CBR) | Syngenta Seeds, Inc. | Insect-resistant and herbicide tolerant maize produced by inserting the <i>cry1Ab</i> gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , and the phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) encoding gene from <i>S. viridochromogenes</i> . |
| GA21                            | Monsanto Company     | Introduction, by particle bombardment, of a modified 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), an enzyme involved in the shikimate biochemical pathway for the production of the aromatic amino acids.   |



|                                   |                  |   |
|-----------------------------------|------------------|---|
| MON-00603-<br>6 x MON-<br>00810-6 | Monsanto Company | Stacked insect resistant and herbicide tolerant corn hybrid derived from conventional cross-breeding of the parental lines NK603 (OECD identifier: MON-00603-6) and MON810 (OECD identifier: MON-00810-6).                                      |
| MON-00863-5<br>x MON-<br>00603-6  | Monsanto Company | Stacked insect resistant and herbicide tolerant corn hybrid derived from conventional cross-breeding of the parental lines MON863 (OECD identifier: MON-00863-5) and NK603 (OECD identifier: MON-00603-6).                                      |
| MON-00863-5<br>x MON-<br>00810-6  | Monsanto Company | Stacked insect resistant corn hybrid derived from conventional cross-breeding of the parental lines MON863 (OECD identifier: MON-00863-5) and MON810 (OECD identifier: MON-00810-6).  |
| MON-00021-<br>9 x MON-<br>00810-6 | Monsanto Company | Stacked insect resistant and herbicide tolerant corn hybrid derived from conventional cross-breeding of the parental lines GA21 (OECD identifier: MON-00021-9) and MON810 (OECD identifier: MON-00810-6).                                       |
| MON810                            | Monsanto Company | Insect-resistant maize produced by inserting a truncated form of the <i>cry1Ab</i> gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1. The genetic modification affords resistance to attack by the European corn borer (ECB). |
| MON863                            | Monsanto Company | Corn root worm resistant maize produced by inserting the <i>cry3Bb1</i> gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> .   |
| NK603                             | Monsanto Company | Introduction, by particle bombardment, of a modified 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), an enzyme involved in the shikimate biochemical pathway for the production of the aromatic amino acids.                              |

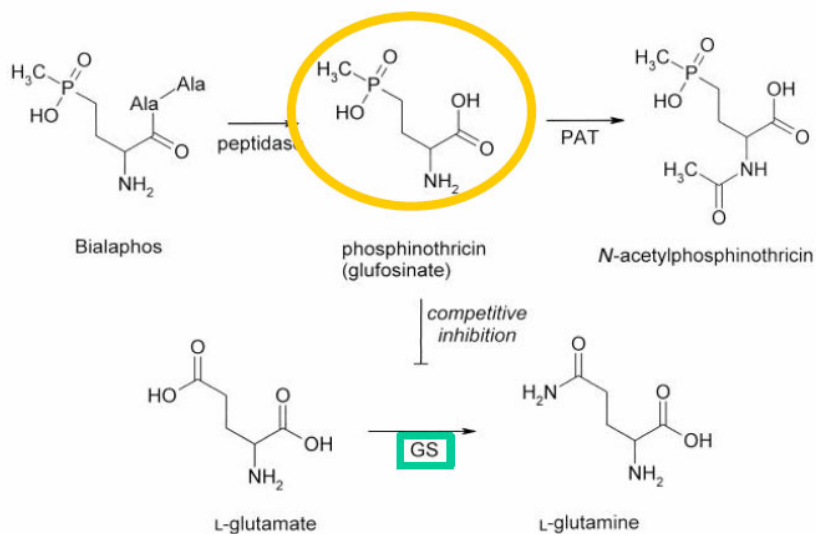
|          |  |   |
|----------|--|---|
| T14, T25 | Bayer CropScience<br>(Aventis<br>CropScience(AgrEvo))      | Glufosinate herbicide tolerant maize produced by inserting the phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) encoding gene from the aerobic actinomycete <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .   |
| TC1507   | Mycogen (c/o Dow<br>AgroSciences);<br>Pioneer (c/o Dupont) | Insect-resistant and glufosinate ammonium herbicide tolerant maize produced by inserting the <i>cryIF</i> gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> and the phosphinothricin N-acetyltransferase encoding gene from <i>Streptomyces viridochromogenes</i> . |

**Tabella I: Varietà di mais geneticamente modificato autorizzate per il commercio europeo. Fonte Agbios.**

### Meccanismo d'azione del Glufosinate ammonio

Il glufosinate ammonio è un principio erbicida contenente una miscela racemica dell'aminoacido fosfinotricina (4-idrossimetil fosfinoil D,L-omoalanina o PPT) il cui isomero L possiede azione antibiotica ed erbicida.

La fosfinotricina è un composto che fa parte di due tripeptidi di origine naturale, Bialafos e Fosalachina, isolati da alcuni microrganismi del suolo rispettivamente del genere *Streptomyces* (*S. hirsutus* e *S. viridochromogenes*) e *Kitasatosporia* (*K. phosalacina*). La struttura molecolare della fosfinotricina, prodotta grazie all'azione di una peptidasi, è analoga all'aminoacido glutammato. Come tale questa molecola agisce come inibitore competitivo per il sito di legame dell'enzima glutammina sintetasi coinvolto nella sintesi dell'aminoacido glutammina, a partire da acido glutammico e ammoniaca, e nei meccanismi di detossificazione da ammonio (Fig. 10).



**Figura 10: Meccanismo di azione dell'erbicida glufosinate ammonio**

L'inibizione di questo enzima causa un rapido accumulo di ione ammonio nei tessuti e l'inibizione della fotorespirazione indotta dai ridotti livelli di glutamina disponibili; tutti questi fattori contribuiscono alla morte della pianta che interviene dopo poche ore dal trattamento.

Gli stessi microrganismi produttori di questa molecola tossica possiedono i meccanismi per la sua inattivazione.

La detossificazione dall'antibiotico è resa possibile dalla modificazione della molecola ad opera di una trans-acetilasi (fosfinitricina-acil-tranferasi o PAT) isolata da *Streptomyces viridochromogenes* e *S. hygroscopicus*, in questo modo la forma acetilata non lega l'enzima bersaglio favorendone la regolare attività.

### Cry: meccanismo di azione

Le proteine Cry sono molecole prodotte dai batteri della specie *Bacillus thuringiensis spp.* durante la fase stazionaria di crescita. Le proteine Cry sono da tempo note per la loro tossicità verso alcuni generi di insetti e nematodi del terreno. In natura esistono oltre 40 tipi di proteine Cry, ciascuna delle quali, possiede azione tossica selettiva verso determinate specie.

Queste tossine, una volta entrate nell'apparato digerente, si legano ad un recettore specifico presente nell'epitelio intestinale del mesentero dell'animale bersaglio. In seguito al legame con i recettori, le proteine Cry polimerizzano formando dei pori all'interno dell'epitelio intestinale. L'apertura dei pori nella membrana causa la perdita di ioni e l'abbattimento del gradiente protonico, l'insetto, quindi rimane prima paralizzato e muore dopo pochi giorni dall'ingestione della tossina.

Non esistendo siti di legame o recettori per Cry nelle cellule intestinali dei mammiferi, la presenza di proteine Cry nei prodotti alimentari non ha per il momento mai evidenziato effetti tossici sulla salute degli stessi.

#### Aspetti di sicurezza ambientale

Dalle osservazioni effettuate in campo, non sono emerse variazioni significative nel comportamento in pieno campo per nessuna delle varietà prese in considerazione, salvo per le caratteristiche aggiunte di resistenza agli insetti ed ai trattamenti erbicidi (Canadian Food Inspection Agency, 2001).

La modificazione genetica pertanto non influenza né la crescita né lo sviluppo delle varietà transgeniche. Il fatto che l'impollinazione delle infiorescenze di mais sia "a fiore aperto" causa un'elevata dispersione di polline nell'ambiente (Ma, 2004).

La produzione e la vitalità del polline formato alle sei varietà di mais approvate non sono significativamente diverse da quelle delle cultivar tradizionali, quindi il flusso genico derivato è del tutto paragonabile a quello osservato nelle coltivazioni convenzionali (ACRE, 2002).

Piante della specie *Zea mais* sono sessualmente compatibili con altre piante spontanee del genere *Zea* e ad alcune del genere *Tripsacum* presenti in Messico, Nicaragua e Guatemala. L'ibridazione con piante appartenenti a specie vicine può originare ibridi fertili, ma questo evento risulta poco probabile a causa dell'incompatibilità genetica e del diverso comportamento nel periodo di fioritura (Klein, 2003). Inoltre l'incrocio formato mostra scarsa vitalità in ambiente selvatico e ridotta fertilità, ciò causa una rapida scomparsa dell'ibrido (Ellstrad, 1999). Sarebbe comunque possibile eliminare le piante eventualmente cresciute, eseguendo un intervento di tipo meccanico o chimico, utilizzando prodotti

differenti da quelli per i quali è stata creata la resistenza. Il problema principale riguardante l'introduzione di coltivazioni di mais GM in Europa, è la possibilità che il polline transgenico possa essere disperso dall'azione del vento e contaminare coltivazioni tradizionali. Per limitare la possibilità di incrocio tra varietà di mais OGM e tradizionale e mantenere isolate le due colture, il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali ha emanato un decreto legge che obbliga Regioni e Province a stabilire entro il 31 Dicembre 2005 una serie di norme attuative (Legge n°28, 2005).

#### Effetti secondari delle colture OGM sull'ecosistema

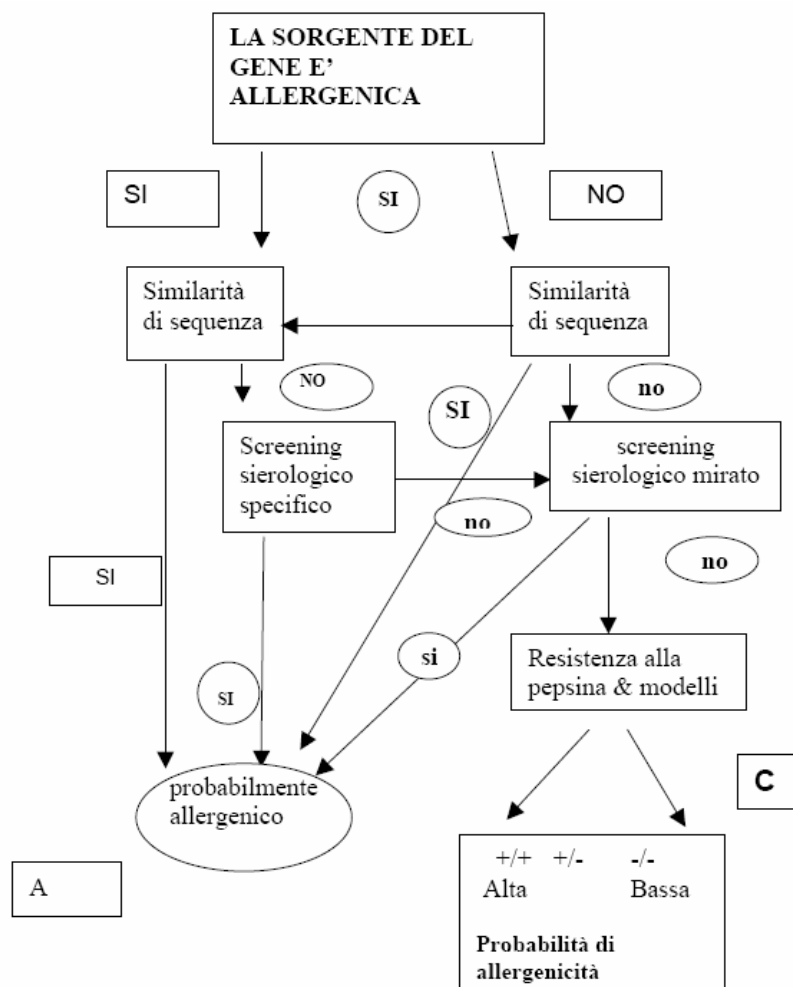
Dalle osservazioni effettuate in campo e dall'esperienza maturata con l'utilizzo dei bioinsetticidi a base di Bt, le nuove proteine contenute nelle piante GM non mostrano evidenti effetti tossici sulla fauna non-target nelle normali condizioni di esposizione.

E' stato verificato come alcune delle piante trasformate con i geni Cry, come mais e patata, producessero essudati radicali contenenti la tossina (Saxena, 2003; Pageta, 1999). In realtà gli effetti di questo comportamento anomalo in condizioni di campo non sono ancora stati definitivamente chiariti come non è ancora chiaro il destino dei residui colturali, quali DNA e proteine delle piante transgeniche nel terreno (INRAN, 2004). Nonostante siano stati evidenziati effetti dannosi del polline di mais Bt su alcune specie di farfalle innocue per le piantagioni maidicole come la farfalla monarca, studi successivi hanno evidenziato che il polline prodotto dalle piante Bt in condizioni naturali non ha effetti deleteri sulle popolazioni di queste farfalle. Anzi, l'eliminazione dei trattamenti insetticidi dovuti all'introduzione delle varietà geneticamente modificate ha consentito la salvaguardia delle popolazioni della fauna non target (Carpenter, 2002).

#### Aspetti di sicurezza nell'alimentazione umana

Analisi nutrizionali: dal confronto tra le composizioni alimentari (proteine, carboidrati, grassi ed altri componenti) delle farine modificate e quelle tradizionali non evidenzia differenze attribuibili alla modificazione genetica (Taylor, 1999). Il contenuto delle proteine CP4EPSPS, PAT e Cry 1Ab nei semi è molto basso. La quantità massima riscontrata di proteina Cry1Ab in semi di mais OGM è di 900 ng per ogni grammo di semi e viene

ulteriormente ridotta dalle lavorazioni industriali. La proteina CP4EPSPS ed in generale le trans-acetilasi analoghe alla proteina codificata da PAT sono molecole comunemente presenti in tutti gli alimenti di origine vegetale consumati quotidianamente senza per ora aver causato fenomeni di tossicità. L'introduzione nella dieta umana delle proteine Cry attraverso l'utilizzo di colture OGM ha destato qualche preoccupazione in quanto tali tossine non sono normalmente presenti nella dieta. Le proteine Cry1Ab di MON810, T25 e Bt11 evidenziano totale identità con la tossina Cry1Ab di *Bacillus thuringiensis*, che viene ampiamente utilizzata in agricoltura biologica, senza che si siano mai verificati episodi di tossicità. Dal confronto delle sequenze aminoacidiche delle tre proteine Cry contro la struttura e la sequenza di tossine note per mammiferi non è emersa nessuna omologia, pertanto tali molecole non sono state ritenute come possibili sostanze tossiche. Ciò è stato ulteriormente confermato da esperimenti *in vivo* in cui topi di laboratorio sono stati sottoposti ad una dieta addizionata con Cry in dosi molto elevate. Da questi esperimenti non è stato possibile mettere in evidenza nessuna traccia di tossicità dovuta alla presenza di Cry nella dieta dei topi. Anche il potenziale allergenico delle tre proteine Cry è stato valutato sia analizzando la sequenza aminoacidica sia verificando le loro caratteristiche fisico-chimiche. Dal confronto con le strutture aminoacidiche degli allergeni noti presenti in banca dati non ne è emersa alcuna omologia di sequenza. Solo le dimensioni delle proteine Cry sono, a volte, paragonabili a quelle di alcune molecole allergeniche note. Nessuna Cry, però, possiede elevata stabilità alla digestione con tripsina, questo significa che durante la digestione queste proteine vengono completamente degradate.



**NOTE ALLA FIGURA**

**A** - Qualunque risultato positivo ottenuto tramite l'omologia di sequenza con allergeni noti (tramite database esistenti o protocolli di screening di sieri) indica che la proteina espressa è verosimilmente allergenica.

**B** - Il grado di confidenza dei risultati negativi ottenuti dallo screening specifico di sieri è incrementato dall'analisi di un maggior numero di sieri. Se sono disponibili screening con un maggior numero di sieri gli screening con un basso numero di sieri vanno scoraggiati.

**C** - Quando si ottengono risultati positivi con i protocolli di resistenza alla pepsina o modelli animali, le proteine espresse hanno una elevata probabilità di diventare allergeni. Quando entrambi i protocolli generano risultati negativi è inverosimile che la proteina espressa diventi un allergene. Quando si ottengono risultati disuguali tra i protocolli di resistenza alla pepsina e modelli animali, la probabilità di allergenicità è intermedia, anche se spiegazioni razionali sono possibili in alcune contesti.

Figura 11: Iter procedurale per l'analisi delle molecole potenzialmente allergeniche (FAO, 2001)

## 2 OGM e Legislazione

### 2.1 Regolamenti Ue

L'Unione europea, al fine di garantire la sicurezza dei prodotti alimentari e il diritto all'informazione dei consumatori, ha deliberato un regolamento atto al controllo della commercializzazione e dell'utilizzo dei prodotti geneticamente modificati all'interno dei Paesi membri. La prima direttiva comunitaria approvata in materia di OGM (Direttiva 90/220 del 1990) e recepita a livello locale dai singoli Stati Membri regola l'immissione nell'ambiente di organismi geneticamente modificati.

Nella prima parte della Direttiva (parte A) vengono stabilite le disposizioni generali quali l'ambito di applicazione della normativa stessa. La parte B stabilisce l'*iter* amministrativo necessario all'immissione deliberata di un OGM nell'ambiente a scopo di ricerca, mentre nella terza (parte C) si stabiliscono le norme necessarie per l'immissione di un OGM in commercio. La direttiva è stata in seguito aggiornata attraverso il Regolamento (CE) n. 258/97 che definisce in modo più dettagliato la procedura necessaria per inoltrare la richiesta di autorizzazione alla commercializzazione dei prodotti biotecnologici. Tale richiesta deve essere presentata dagli enti produttori del nuovo OGM e deve contenere una serie di informazioni fra cui una valutazione del rischio ambientale onde garantirne la sicurezza. Tale documentazione deve contenere le seguenti informazioni.

1. Nome e indirizzo del richiedente.
2. Denominazione dell'alimento, sua descrizione ed eventi di trasformazione.
3. Informazioni in materia di rispetto del protocollo di Cartagena sulla biosicurezza.
4. Descrizione dettagliata del metodo di produzione.
5. Copia degli studi effettuati per dimostrare che l'alimento derivante da OGM soddisfa i criteri di sicurezza previsti.
6. Un'analisi comprovante che le caratteristiche dell'alimento non sono differenti da quelle della sua versione tradizionale, tenuto conto dei limiti accettati delle variazioni naturali.
7. Una dichiarazione attestante che l'alimento non dà luogo a preoccupazioni di ordine etico o religioso, o una proposta per la sua etichettatura.



8. Le condizioni di immissione in commercio dell'alimento o degli alimenti da esso derivati, comprese le condizioni specifiche di uso e di manipolazione.
9. Metodi di rilevazione, campionamento (inclusi riferimenti a metodi di campionamento esistenti, ufficiali o standardizzati) e identificazione dell'evento di trasformazione e, se del caso, di rilevazione e identificazione dell'evento di trasformazione dell'alimento e/o degli alimenti da esso derivati.
10. Campioni dell'alimento e rispettivi campioni di controllo e informazioni sul luogo in cui il materiale di riferimento è reso disponibile.
11. Una proposta per il monitoraggio successivo all'immissione in commercio in merito all'uso dell'alimento per il consumo umano.
12. Una sintesi del dossier in formato standardizzato.

L'articolo 8 di tale Normativa indica i requisiti necessari per l'etichettatura degli alimenti contenenti ingredienti derivati da OGM affinché il consumatore sia informato di qualsiasi cambiamento del prodotto.

Dal 1998 l'intero quadro normativo europeo relativo agli OGM e alle loro applicazioni nei diversi settori produttivi è stato completamente rivisto, adottando un approccio precauzionale al fine di garantire la massima tutela della salute umana e dell'ambiente.

Le successive Direttive approvate (Regolamenti (CE) n.49 e 50 del 2000 e Direttiva 18/2001/CE), nel rispetto del principio precauzionale, mirano al riavvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri.

I principali punti introdotti dalla nuova Direttiva, sono:

- Principi per la valutazione del rischio ambientale
- Regole per il monitoraggio post-rilascio degli effetti sulla salute e sull'ambiente
- Informazione e partecipazione del pubblico ai processi decisionali
- Limite temporale di 10 anni per l'autorizzazione
- Impegno ad assicurare l'etichettatura e la tracciabilità degli OGM
- Obbligo a fornire informazioni e metodi per l'identificazione degli OGM

Un altro punto fondamentale su cui si basa la Legislazione europea degli ultimi anni in materia di OGM è l'introduzione di un valore soglia, pari allo 0.9% di ogni singolo

ingrediente, oltre il quale viene imposta l'etichettatura. Tale presenza viene tollerata in quanto non è possibile escludere a priori un'eventuale contaminazione accidentale; per stabilire che tale presenza è accidentale, ogni operatore coinvolto nella catena di produzione dell'alimento deve essere in grado di dimostrare di aver preso tutte le misure necessarie per evitare l'uso di materiale transgenico. Più in generale, il tema della sicurezza alimentare è trattato nel Regolamento (CE) N. 178/2002 con il quale è stata istituita l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (ESFA). L'EFSA è un ente indipendente che lavora in collaborazione con le singole Autorità nazionali e ha il compito di fornire consulenze scientifiche e comunicazioni sui rischi esistenti o emergenti. Ancor più recentemente con i Regolamenti (CE) N. 1829/2003, 1830/2003, e il Regolamento (CE) N. 641/2004 recante le norme attuative, vengono definiti i nuovi principi di autorizzazione, etichettatura e tracciabilità degli ingredienti geneticamente modificati all'interno della filiera produttiva (Arts, 2002; Ahmed, 2002). Il Regolamento istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione e la vigilanza di alimenti e mangimi geneticamente modificati, delegando all'EFSA il compito di valutare le richieste di autorizzazione presentate. Ciò consente la semplificazione dell'*iter* di autorizzazione e garantisce un metro di giudizio unico a livello comunitario. Tra le normative collegate al Regolamento 1829/2003 deve essere posta particolare attenzione al Regolamento n.1830/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla tracciabilità ed etichettatura di OGM, in quanto assicura ad operatori e consumatori un'informazione accurata. Ai consumatori permette di esercitare un'effettiva libertà di scelta, mentre agli operatori del settore consente il controllo e la verifica delle diciture apposte sulle etichette degli alimenti e dei mangimi contenenti OGM. Con l'articolo 12 del Regolamento (CE) N. 1829/2003 la soglia oltre la quale viene imposta l'etichettatura è portata allo 0.9%, inoltre è stato stabilito un limite di tolleranza pari allo 0.5% per la presenza di OGM per i quali non è stata rilasciata l'autorizzazione. L'articolo 6, comma 3 del Regolamento (CE) N. 641/2004, istituisce il Laboratorio Comunitario di Riferimento (CRL) che ha il compito di verificare e validare il metodo di rilevazione e identificazione proposto dal richiedente in sede di autorizzazione.

Elenco delle Normative relative agli organismi geneticamente modificati

(Fonte Ministero della Salute)

Regolamento CE2092/91;

Regolamento CE 258/97 nuovi prodotti e nuovi ingredienti alimentari, (modificato dal Regolamento CE 1829/2003);

Regolamento CE 1139/98 obbligo etichettatura alimenti da OGM soia & mais (abrogato dal Regolamento CE 1829/2003);

Regolamento CE 1804/99 (produzioni animali biologiche);

Regolamento CE 49/2000 (etichettatura, definizione soglia) abrogato dal Regolamento CE 1829/2003;

Regolamento CE 50/2000 (etichettatura per additivi) abrogato dal Reg. CE 1829/2003;

DPCM 4/8/2000 (sospensione 4 OGM mais notificati – abrogato da sentenza TAR Lazio ottobre 2004);

Regolamento CE 1830/2003 del 22/9/2003 (Etichettatura e tracciabilità OGM); (G.U.U.E. n. L 268 del 18/10/2003)

Regolamento CE 1829/2003 del 22/9/2003 (alimenti e mangimi GM); (G.U.U.E. n. L 268 del 18/10/2003)

Regolamento CE 223 del 5/2/2003 (Etichettatura mangimi biologici); (G.U.U.E. n. L 031 del 06/02/2003)

D.Lvo 8 luglio 2003 n. 224, “Emissione deliberata nell’ambiente di OGM”; (G.U. n. 194 del 22/08/2003)

Raccomandazione CE 787/2004 del 04/10/2004 (Metodi di campionamento OGM);

Decisione n° 2005/317/CE del 18/04/2005 (provvedimenti emergenza Bt10);

Decreto Legislativo 10 marzo 2005, n.70 (G.U. n. 98 del 29/04/2000).

## 2.2 Concetto di coesistenza

La coesistenza non riguarda problematiche di tipo ambientale o sanitario ma è un problema di natura economica. Gli aspetti sanitari infatti sono considerati dalla Direttiva 2001/18 e dal Regolamento 1829/ 2003, garantendo che tutte le piante GM ed i prodotti da loro derivati autorizzati alla commercializzazione siano sicuri per l’uomo, per gli animali e per l’ambiente.

È necessario infatti garantire da un lato la possibilità per gli agricoltori di coltivare sia colture GM che convenzionali o biologiche garantendo dall'altro ai consumatori la possibilità di scegliere fra prodotti realmente diversi. Il tema della coesistenza è legato, infatti, alla capacità fisiologica delle piante di incrociarsi con piante della stessa specie o di specie affini. La possibilità della coesistenza dipende pertanto da tre fattori chiave:

- 1) tracciabilità,
- 2) etichettatura,
- 3) capacità degli agricoltori di fornire prodotti, di qualunque filiera, conformi agli obblighi di legge.

#### Pratiche di coesistenza.

Norme a garanzia della coesistenza esistono da molto prima dell'avvento delle piante GM e riguardano ad esempio la purezza della semente certificata, particolari produzioni quali il grano duro da pasta o le pratiche di agricoltura biologica. Appare pertanto utile, prima di analizzare più in dettaglio quanto previsto per le piante GM, visionare altri casi soggetti a norme di coesistenza e quali siano i principi fondanti alla loro base.

#### Grano e altre colture

In Italia è proibito produrre paste secche con farina di grano tenero. Tuttavia risulta possibile trovare una certa percentuale di grano tenero in quello duro e viceversa causata da contaminazione accidentale post raccolta. Di conseguenza gli addetti del settore si sono accordati fissando una soglia massima di grano tenero in duro del 3%. Nel 2001 un Decreto del Presidente della Repubblica ha ufficializzato tale soglia di tolleranza.

Altre specie agrarie in taluni casi presentano specifiche soglie di tolleranza quali la colza ad alto contenuto di acido erucico (HEAR) o il mais waxy.

- Colza HEAR: essendo l'acido erucico un cardiotossico, la sua presenza nelle partite di olio di colza per uso alimentare viene tollerata solo se al di sotto del 2%. Una distanza di isolamento di 100 m tra coltivazioni di colza HEAR e colza alimentare consente comunque di mantenere il contenuto di acido erucico al di sotto dello 0,5%.

- Mais waxy: questa varietà di mais presenta un contenuto di amilopectine superiore al 99%, rispetto all'amido totale, rendendola particolarmente interessante per l'industria alimentare. Per questo il mais waxy gode di un premium price di circa il 9%. Tale premio è però subordinato a una purezza del prodotto finale almeno del 96% (4% di tolleranza).

### Biologico

Il metodo di produzione biologico non consente l'uso di composti chimici o fertilizzanti di sintesi, inoltre il materiale di semina dovrebbe essere anch'esso certificato come biologico. Poiché tuttavia esistono limiti oggettivi al reperimento di materiale certificato, a volte risulta impossibile evitare che i trattamenti su coltivazioni limitrofe interessino anche campi biologici ed esistono problematiche agricole non gestibili con i metodi previsti dall'agricoltura biologica. Pertanto il Regolamento europeo prevede diverse deroghe spesso con durate temporali limitate e accompagnate da data di scadenza, generalmente finalizzate a ovviare a possibili periodi di indisponibilità di singoli ingredienti o mezzi di produzione.

### OGM e coesistenza

Poiché agricoltura biologica e convenzionale coesistono ormai da molti anni e si dispone di consolidate norme di coesistenza che garantiscono una gestione efficace, risulta chiara la necessità di normare efficacemente anche l'ingresso nel nostro sistema agricolo di coltivazioni GM al fine di preservare da un lato le peculiarità e tipicità dell'agricoltura italiana, dall'altro la libertà dell'agricoltore di poter adottare questa nuova tecnologia.

Prevedendo infatti un mercato con prezzi differenziati per i diversi prodotti (GM, convenzionali e biologici), il mancato rispetto degli obblighi di legge in termini di commistione accidentale tra colture può potenzialmente condurre a una perdita di reddito per gli agricoltori. Questo risulta vero sia nel caso in cui un agricoltore biologico o convenzionale si trovi costretto a etichettare un proprio prodotto come contenente OGM (ovvero laddove la presenza accidentale superi la soglia dello 0,9%), ma anche quando vi sia il deprezzamento di uno speciale prodotto transgenico che non raggiunga il grado di purezza richiesto.

Di vitale importanza risulta quindi essere un'efficace gestione della commistione accidentale tra colture geneticamente modificate e non, dovuta alla presenza di impurezze nelle sementi, all'impollinazione incrociata, a piante spontanee (provenienti soprattutto da precedenti colturali), o anche alle pratiche seguite per la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto, e delle conseguenze economiche che possono derivarne.

### Le norme di legge sugli OGM

Per tracciare efficaci misure di coesistenza risulta fondamentale conoscere il quadro normativo di riferimento, oltre al livello di commistione (soglia di tolleranza) consentito. Il testo normativo di riferimento è il Regolamento 1831/2003 e prevede l'etichettatura dei prodotti come "contenenti Organismi Geneticamente Modificati" qualora siano presenti in essi tracce di OGM in proporzione superiore allo 0,9%. Tali soglie, sottolinea la Commissione Europea in una successiva Raccomandazione, "sono applicabili indistintamente ai prodotti agricoli convenzionali e biologici" in assenza di precise norme che ne fissino di diverse per l'agricoltura biologica.

La Commissione ha inoltre tracciato, ricalcando quanto già visto per gli altri ambiti in cui è necessario garantire la coesistenza, i principi operativi cui dovrebbero ispirarsi le pratiche di coesistenza per gli OGM, ovvero, si è deciso che:

- è opportuno che le strategie nazionali e le migliori pratiche in materia di coesistenza siano elaborate in cooperazione con tutti i soggetti interessati e secondo criteri di trasparenza;
- le misure di gestione relative alla coesistenza dovranno rispecchiare i migliori risultati scientifici disponibili sulla probabilità e sulle fonti di commistione tra colture transgeniche e non transgeniche;
- le misure di gestione relative alla coesistenza devono fondarsi sulle pratiche e sui metodi di separazione già collaudati e tenere conto dell'esperienza acquisita in materia di movimentazione di prodotti agricoli di origine garantita e di metodi di produzione delle sementi;
- le misure relative alla coesistenza devono rispondere a criteri di efficienza ed efficacia economica ed essere proporzionate. Occorre evitare che esse siano più rigide di quanto sufficiente a garantire un contenuto accidentale di OGM inferiore alle soglie di tolleranza

fissate dalla normativa comunitaria. Ciò per evitare altresì di creare oneri non necessari a carico delle diverse filiere;

- le migliori pratiche in materia di coesistenza dovranno tener conto delle differenze tra le specie e varietà vegetali coltivate e i vari tipi di produzione (colture o sementi). Per garantire l' idoneità delle misure occorrerà tener conto anche delle differenze a livello regionale (condizioni climatiche, topografia, modelli produttivi, sistemi di rotazione, strutture aziendali, quota di colture GM in una data regione) che possono influenzare il grado di commistione tra colture GM e non GM;

- e' necessario sottoporre a un monitoraggio e a una valutazione costanti le misure di gestione e gli strumenti adottati, in modo da verificarne l'efficacia e trarne le informazioni necessarie per migliorare le misure nel tempo.

#### Le conoscenze scientifiche

Alla luce delle raccomandazioni europee, appare chiaro come le norme di coesistenza possano essere scritte in modo efficace solo alla luce delle migliori conoscenze scientifiche disponibili in tema di coesistenza (Crawley, 2001).

Da diversi anni sono in corso ricerche sia teoriche sia in campo che, utilizzando piante marcatrici o geneticamente modificate, consentono oggi di definire con precisione quali pratiche agricole e di gestione sono in grado di consentire la coesistenza nel contesto normativo e di biosicurezza europeo e italiano (Messean, 2006).

#### **Mais**

La coltura del mais riveste un ruolo preminente nell'agricoltura europea e italiana (in particolare padana) dove rappresenta la base alimentare per gli allevamenti zootecnici da cui provengono alcuni dei prodotti tipici più noti del nostro Paese. Il mais rappresenta inoltre una delle colture storiche dell'innovazione biotecnologica. Per la concomitanza di questi due fattori è stato oggetto di un'intensa attività sperimentale in tema di coesistenza che ha interessato l'intera Europa continentale (Germania, Francia, Spagna, Italia) e gli Stati Uniti (Fig. 12).

### La fisiologia riproduttiva

Il mais si presenta come una specie allogama anemofila, ovvero utilizza la dispersione del polline da parte del vento quale metodo di riproduzione (Ingram, 2002). Il polline di mais presenta caratteristiche tali (alto peso e bassa vitalità) da garantire una bassa dispersione nell'ambiente. Studi condotti tra gli anni '40 e '80 del secolo scorso hanno evidenziato come il polline di mais abbia una capacità fecondativa che si riduce drasticamente con la distanza, scendendo al di sotto dell'1% oltre i 5 metri (Bateman, 1974)

### Studi condotti

Il tema della coesistenza è attualmente tema di indagine in tutto il mondo, qui a titolo esemplificativo sono stati raccolti i principali studi svolti in Europa ed in particolare in Italia.

- *Francia*. Lo studio (POECB) ha considerato campi di mais GM resistente agli insetti delle dimensioni superiori ai 2 ettari. I risultati raggiunti indicano che la mescolanza scende sotto lo 0,9% a circa 5 metri di distanza dal campo coltivato con PGM. I ricercatori hanno inoltre misurato l'aumento di mescolanza che può avvenire durante le fasi di lavorazione del prodotto concludendo che è possibile la gestione sequenziale di partite OGM e convenzionali senza superare la soglia dello 0,9%.

- *Germania*. Lo studio (InnoPlanta) è stato condotto su 30 località di 7 regioni (Land). È stata utilizzata una varietà transgenica resistente agli insetti. Sebbene la dimensione del campo coltivato con OGM variasse tra 1 e 20 ettari, lo studio ha rilevato che in ogni configurazione la percentuale di OGM al di fuori del campo scendeva al di sotto dello 0,9% a una distanza di circa 20 metri.

- *Gran Bretagna*. Uno studio di coesistenza (DEFRA) è stato collegato al progetto FSE (Farm Scale Evaluation), che aveva lo scopo di misurare l'effetto sulla biodiversità di alcune colture GM resistenti ad una particolare classe di erbicidi. Analisi di coesistenza sono state effettuate su 55 campi di dimensioni variabili (5 - 10 ha) su un arco di anni. I risultati ottenuti hanno evidenziato una distanza di 4,4 metri come sufficiente a non superare la soglia dello 0,9%, sono invece richiesti 80 metri per il rispetto di una soglia dello 0,3%.

- *Spagna*. La Spagna è l'unico Stato europeo ad avere estese coltivazioni di mais geneticamente modificato ed è la nazione che vanta quindi la maggiore esperienza nelle



problematiche inerenti alla coesistenza. A tal fine è in corso da diversi anni un piano di monitoraggio nazionale (IRTA). Da quanto fino a ora osservato su campi sperimentali di 0,25 ettari emerge come entro 40 metri, nella direzione principale del vento, la presenza di OGM scenda al di sotto dello 0,9%.

I ricercatori hanno verificato inoltre che la presenza di 4 file di mais convenzionale attorno al campo OGM (comunque necessario per una corretta gestione del carattere di resistenza agli insetti) sono sufficienti ad assicurare la coesistenza. Queste considerazioni valgono comunque per campi circostanti di dimensioni inferiori all'ettaro; per campi di dimensioni superiori, conclude lo studio, tali accorgimenti non risultano necessari poiché la concentrazione di OGM nel raccolto si diluisce al di sotto dello 0,9%.

- *Svizzera*. In una ricerca (Agroscope FAL) svolta in ambito svizzero e poi applicata all'intero territorio nazionale si è evidenziata la possibilità di scendere al di sotto dello 0,5% di presenza accidentale di OGM a 50 metri e dello 0,9% già a 25 metri. Dalle proiezioni prodotte risulta inoltre come, anche imponendo una distanza di isolamento di 100 metri, 4 volte maggiore di quella richiesta per il rispetto della soglia Ue, più del 90% del territorio svizzero non presenti problematiche di coesistenza.

- *Italia*. Sono attualmente tre gli studi svolti in Italia per misurare i parametri di coesistenza. Lo studio condotto dal CINSA su commissione di COOP-Italia ha riguardato due località, una in Emilia-Romagna e una in Toscana. I ricercatori, non potendo usare varietà GM, hanno utilizzato varietà convenzionali con cariosside colorata con funzione di tracciante. Nella prima località, utilizzando 300 piante a cariosside colorata (circa 40 mq) i ricercatori hanno rilevato la presenza del tracciante fino ad una distanza massima di 5 metri. Nel secondo caso, utilizzando un'area emettitrice di 0 mq, i ricercatori sono stati in grado di rilevare il tracciante fino ad una distanza di 5 metri. Lo studio ha inoltre verificato che seminando in un campo di mais giallo il 20% di mais colorato, la presenza di cariossidi colorate nel prodotto scende all'1,2 %, mentre in presenza di una commistione del 2 % a livello di sementi, nei prodotti questa scende allo 0,13 % (Sorlini, 2004).

Un secondo studio, commissionato da CNR e Ministero dell'Ambiente, ha considerato una località in cui isole di mais sono state piantate a distanze predefinite separate da terreno non coltivato (per misurare la massima distanza percorribile dal polline mantenendo la capacità di

fecondare), riscontrando una presenza del tracciante inferiore all'1% a 40 metri e lo zero tecnico ad 80.

Un terzo studio, condotto nel 2005 con mais tradizionale colorato e coordinato dal C.R.A. di Bergamo e dal Parco Tecnologico Padano, ha coinvolto la filiera produttiva mais (AP-SOCLO, CEDAB). Nella ricerca sono stati considerati quattro schemi sperimentali suddivisi in sette località della Lombardia per un totale di 40 ettari e, accanto al flusso genico in condizioni ottimali, è stata valutata l'efficacia relativa di diversi sistemi di contenimento (zone buffer, spazi aperti di separazione, sfasatura di fioritura). I risultati ottenuti hanno indicato come in condizioni ottimali per il flusso genico si scenda al di sotto dello 0,9% ad una distanza media di 17,5 metri, lo 0,5% a 0 metri, mentre non si è raggiunto lo 0,1% (distanza massima testata 120 metri). Nel caso peggiore registrato si è sceso, nel lato sottovento, al di sotto dello 0,9% a 29 metri. I ricercatori hanno inoltre rilevato che l'uso di zone buffer di 15 metri consentirebbe di mantenere nel campo ricevente il flusso genico al di sotto dello 0,9%. Sfasature di fioritura contribuiscono inoltre ad una sensibile riduzione del flusso genico. Meno efficaci risultano gli spazi aperti tra le colture. Questi dati risultano in linea con i modelli statistici fino a ora sviluppati e con lo studio presentato dal IPTS-JRC (Bock, 2002).



**Figura 12. Confronto tra una varietà di mais tradizionale e una di mais Bt**

## **Soia**

La coltivazione non presenta problematiche di flusso genico in quanto l'autofecondazione supera il 99%. Inoltre, la mobilità del polline è minima: il tasso di impollinazione incrociata è dello 0,4% a 1 metro e scende allo 0,02% a 5 metri

### Propagazione della mescolanza lungo la filiera

Accanto a quanto fino a ora discusso, per consentire una reale coesistenza, risulta necessario garantire che la mescolanza non superi la soglia dello 0,9% richiesta per i prodotti non-OGM durante le fasi di lavorazione o a causa della presenza di contaminazioni nella semente. A tal riguardo il Consiglio Scientifico Europeo per le Piante, organismo dell'Unione europea, ha stimato le possibili mescolanze nei diversi processi di produzione per le varie colture.

### Considerazioni conclusive

- Le piante transgeniche non differiscono dalle varietà convenzionali nel loro comportamento in campo, eccetto per la caratteristica desiderata con modifica.
- I criteri che stanno alla base dei piani di coesistenza delle varietà convenzionali sono razionali e possono costituire il modello per stabilire analoghi criteri per le varietà transgeniche.
- Sono già oggi disponibili, per le principali colture, pratiche agricole che consentono di rispettare la soglia dello 0,9% per i prodotti non-OGM imposta dal Regolamento Europeo 1831/2003.
- Tali pratiche, correttamente predisposte, non comportano significativi aumenti dei costi di gestione e sono adattabili al contesto agrario italiano.
- Anche se le osservazioni fin qui raccolte indicano un'omogeneità di comportamento delle colture nei diversi ambienti analizzati, appare opportuno seguire un approccio che tenga conto anche delle caratteristiche pedoclimatiche e ambientali del territorio, per ottimizzare l'efficacia delle azioni intraprese e proporzionarle in modo tale da non gravare gli agricoltori di oneri superiori a quelli necessari.
- La ricerca in campo e i modelli statistici indicano che nel caso del mais, una distanza adeguata (di 5 - 40 metri) tra campi di mais geneticamente modificato e convenzionale è

sufficiente al fine di mantenere il livello di impollinazione incrociata sotto la soglia dello 0,9% sancita dalla Ue ai fini della dichiarazione “non-OGM”.

(Fonte: <http://www.aissa.it/Consensus2006.pdf>; Notiziario SIPAV numero 40, Aprile 2006)

### 2.3 Metodi tradizionali per il rilevamento degli OGM

L'analisi della presenza di OGM negli alimenti si basa sulla ricerca di segmenti di DNA o proteine esogene nell'organismo esaminato.

Il principale metodo utilizzato per l'identificazione proteica è l'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), mentre il per l'identificazione di tratti di DNA si utilizza la tecnica di Polymerase Chain Reaction (PCR).

#### PCR

I protocolli validati per l'identificazione e misurazione di OGM si basano prevalentemente sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) (Miraglia, 2004).

In generale, l'applicazione di questo metodo prevede la conoscenza della sequenza nucleotidica che si vuole monitorare. Il saggio sfrutta la capacità della DNA polimerasi di sintetizzare un tratto di DNA complementare ad un filamento di DNA che funge da stampo, partendo da un segmento che fa da “innesco” (primer) per la reazione di polimerizzazione. Nelle PCR qualitative o “end-point”, il prodotto della reazione di amplificazione viene comunemente visualizzato su di un gel di agarosio dopo corsa elettroforetica. In particolare, un'aliquota del prodotto di reazione viene caricato sul gel di agarosio o acrilammide contenente Bromuro di Etidio (BrEt) e, alla fine della corsa elettroforetica, viene posto su un transilluminatore a luce ultravioletta. Il DNA amplificato durante la corsa elettroforetica incorpora il BrEt risultando visibile agli UV.

Attraverso l'amplificazione classica end-point è solo possibile individuare la presenza di un particolare segmento di DNA all'interno del genoma, ma non è possibile quantificarlo. Tale approccio viene quindi utilizzato solo per lo screening iniziale, per poi eventualmente procedere alla quantificazione dei tratti specifici in un secondo tempo.

Per la quantificazione del target si utilizzano delle varianti della PCR quali la Q-PCR o la RT-PCR, quest'ultima attualmente è la tecnica di elezione per la quantificazione degli OGM come descritto in seguito.

### RealTime-PCR

La RT-PCR rappresenta una versione più sofisticata della PCR qualitativa. Con questa tecnica è possibile non solo individuare il transgene ricercato, ma anche ottenere una sua quantificazione. La tipologia di RT-PCR più utilizzata per la quantificazione degli OGM è quella basata sulla chimica TaqMan che ha unito le potenzialità della polimerasi con le tecniche di rivelazione in fluorescenza. La fluorescenza è generata ad ogni ciclo di reazione grazie all'utilizzo di un'apposita sonda marcata presente nella miscela di reazione. La sonda è un oligonucleotide complementare ad un tratto di DNA situato al centro del segmento target, marcata in 5' con un fluoroforo "Reporter" e in 3' con una molecola "Quencher". La lunghezza ridotta della sonda, normalmente di 20/25 nucleotidi, consente al "Quencher" di bloccare l'emissione di fluorescenza da parte del "Reporter" fino al momento opportuno. Ad ogni ciclo di PCR durante l'estensione dell'inesco, l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda e grazie all'attività esonucleasica la taglia, liberando il "Reporter" dal "Quencher" e permettendo l'amplificazione del target. In questo modo si genera, ad ogni ciclo, un segnale fluorescente corrispondente alla quantità di sonda liberata ed in ultima analisi al prodotto di PCR sintetizzato. Il monitoraggio in tempo reale della fluorescenza emessa durante la fase esponenziale della reazione permette di risalire, con gli opportuni calcoli, al numero di copie di target nel campione in analisi. L'amplificazione del target avviene in contemporanea con l'amplificazione di un gene di riferimento specifico dell'ospite in esame e presente in singola copia. L'efficienza di reazione delle due amplificazioni deve essere quanto più possibile identica e la quantificazione del numero di copie del gene di riferimento deve essere assolutamente precisa. Questi due fattori sono punti chiavi per garantire l'esattezza dei risultati ottenibili con la RT-PCR (Taverniers, 2004; Lipp, 2004). Disegnando opportunamente gli inneschi è possibile individuare anche la specie che è stata ingegnerizzata: è sufficiente che uno degli inneschi sia complementare ad un tratto presente nel transgene e l'altro complementare ad una regione del genoma ospite.

Questo approccio metodologico ha la peculiarità di essere l'unico metodo attualmente disponibile che soddisfi pienamente la Normativa inerente alla richiesta d'Autorizzazione alla commercializzazione di un nuovo OGM essendo l'unico metodo "evento specifico". Ossia attraverso la RT-PCR si identifica l'evento trasformante e la specie che lo ospita nonché si ottiene la quantificazione dell'evento stesso.

Ci sono però alcuni svantaggi nell'applicazione sistematica su larga scala di questo metodo. Principalmente, i test di RT-PCR sono molto laboriosi e richiedono l'utilizzo di strumenti e reagenti costosi. In particolare, i laboratori devono essere ben attrezzati ed il personale altamente specializzato e deve operare secondo un sistema di qualità se non di certificazione ed accreditamento. Inoltre la RT-PCR non è una tecnica multitarget ed i protocolli di amplificazione sono specifici anche per la matrice di partenza dalla quale si estrae il DNA da analizzare. Quindi è necessario validare uno specifico protocollo di amplificazione per ogni matrice alimentare di interesse, ciò rende questa tecnologia difficilmente applicabile per controlli di routine su larga scala e su grandi numeri.

Un'altra variabile nella quantificazione dei trasgeni nelle piante GM e soprattutto nei semi è il DNA stesso dei tessuti vegetali, nelle piante il corredo cromosomico non è una costante assoluta come lo è nelle cellule dei mammiferi. A tutto ciò si unisce l'errore sperimentale della RT-PCR che normalmente si aggira intorno al 30% rendendo problematico il trattamento dei dati per quei campioni che hanno contaminazioni intorno al valore di soglia legale imposta per l'etichettatura. Per finire un ulteriore fattore di incertezza non ancora risolto completamente riguarda il significato intrinseco del valore dello 0.9% in rapporto al numero di copie di geni presenti in un genoma aploide che dovrebbe rappresentare la reale quantità di OGM presente nel campione in oggetto (Kok, 2002; Lipp, 2005).

### Metodi Proteici

L'analisi proteica dalle piante transgeniche si attua attraverso l'applicazione di tecniche immunologiche. L'allestimento di un test immunoenzimatico dipende dalla disponibilità di anticorpi capaci di legare in modo selettivo la molecola bersaglio.

Gli anticorpi sono proteine solubili prodotte dal sistema immunitario e secrete nel plasma in risposta al contatto con molecole considerate estranee all'organismo. Per la produzione di

anticorpi monoclonali e policlonali a fini di ricerca si utilizzano solitamente animali da laboratorio (es. topi, conigli, polli). Lo sviluppo di anticorpi specifici contro le proteine OGM è una tappa obbligatoria nel processo di generazione di una linea di piante GM, essi servono per selezionare gli individui che esprimono efficacemente il costrutto. In seguito i test immunoenzimatici servono a monitorare la presenza della proteina nei diversi tessuti e stadi di sviluppo della pianta. Anche le valutazioni di tossicità (verso microrganismi del suolo, insetti ed altri esseri viventi) e allergenicità (riguardante l'alimentazione umana) sono correlate alla presenza della proteina. L'insieme di tutte le informazioni di laboratorio sulla composizione del costrutto e sulla proteina prodotta sono raccolte nel dossier richiesto dall'EFSA. Pertanto i produttori di piante GM prima ancora di ottenere la nuova varietà di pianta devono avere generato gli anticorpi per selezionarla.

Per l'analisi degli OGM sono disponibili attualmente kit commerciali basati principalmente su test ELISA e Lateral Flow Strip (LFS).

### ELISA

I test ELISA commerciali si basano sul principio dell'ELISA-sandwich che prevede l'impiego di due anticorpi, primario e secondario-marcato. Il rilevamento e la quantificazione del target avviene tramite una misura di assorbanza. La proteina target è trattenuta sul fondo della piastra dall'anticorpo primario ed è riconosciuta da un secondo anticorpo marcato con un enzima che, reagendo con un apposito substrato, permette il rilevamento e la quantificazione del target, che avviene una lettura di assorbanza allo spettrofotometro. Utilizzando una serie di campioni a concentrazione di OGM nota (standard) si costruisce una curva di riferimento dalla quale si estrapolano i valori espressi in percentuale corrispondenti ai campioni in esame.

I maggiori vantaggi riscontrabili nell'applicazione di questo metodo sono: facilità d'uso e costi contenuti. A differenza della RT-PCR non richiede strumentazioni costose né personale particolarmente qualificato, inoltre consente di analizzare numerosi campioni in breve tempo (Lipp, 2000).

## LFS

Le LFS consentono di avere risultati qualitativi in tempi ancora più rapidi rispetto agli ELISA test. Sono costituiti da un supporto solido cartaceo a forma di stringa a cui è legato un complesso immunoenzimatico che riconosce il target proteico. Quando le strisce vengono immerse nel buffer di lisi in presenza del campione, gli anticorpi primari risalgono per capillarità sino alla regione superiore della strip col campione dove l'anticorpo secondario immobilizzato riconosce a sua volta la proteina target. Se la molecola target è presente, il complesso anticorpo-proteina viene bloccato sulla striscia dall'anticorpo secondario e l'enzima coniugato all'anticorpo primario trasforma il substrato in un prodotto colorato evidenziando la presenza della proteina OGM.

Test analitici qualitativi e quantitativi basati sull'analisi proteica sono ampiamente diffusi negli USA dove si effettuano test di controllo di routine direttamente in campo, mentre in Europa non trovano ancora un'ampia diffusione.

Infatti solo il GMOChek™ RUR Soya Grain Test Kit, (Strategic Diagnostic Inc.) è stato validato in Europa per la rilevazione di soia Roundup Ready® in farine di soia.

Il principale appunto a discapito di questo approccio è il fatto di non essere un metodo evento specifico. Secondariamente non può essere sempre applicato, la presenza della proteina in forma monitorabile contrariamente a quanto avviene per il DNA non è sempre assicurata. È necessario infatti considerare diversi fattori che determinano la stabilità e la presenza delle proteine in generale e quindi anche delle proteine degli OGM. La concentrazione di proteina presente in un campione, a parità di peso, può variare in base allo stato di salute e sviluppo del campione. Ad esempio la quantità di proteina Cry 1Ab presente in farina di mais MON810 monitorata in diverse annate ha registrato un valore variabile tra 190 e 910 ng/g di farina (fonte Agbios).

La presenza della proteina integra dipende inoltre dalla lavorazione industriale a cui va incontro la matrice che la contiene. Alte temperature, variazioni di pH e altri trattamenti effettuati durante i processi di preparazione degli alimenti possono alterare o distruggere le proteine di interesse. I kit commerciali basati su test immunoenzimatici per la quantificazione degli OGM attualmente in commercio riescono ad identificare anche contaminazioni



dell'ordine di 0.1% (contenenti mediamente 0.5 ng di proteina per grammo di farina di mais) e quindi hanno una sensibilità del tutto paragonabile alle analisi RT-PCR. Per le loro caratteristiche di sensibilità, semplicità ed economicità, i test basati sull'analisi di proteine potrebbero essere efficacemente utilizzati anche negli abituali test di controllo eseguibili lungo la filiera alimentare.

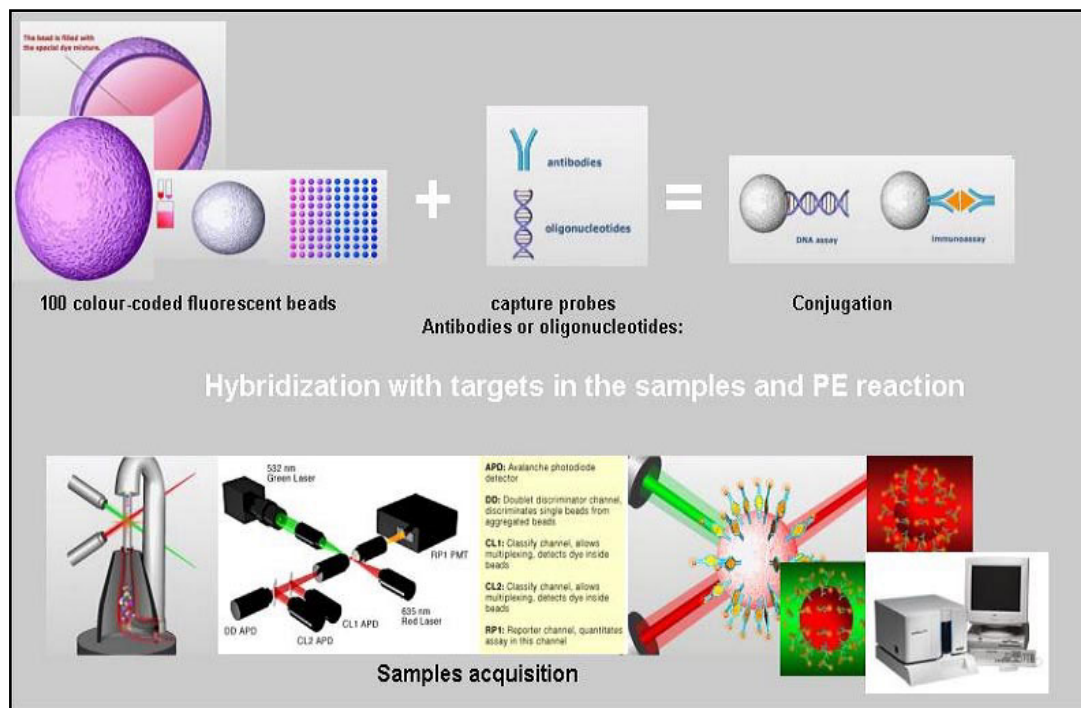
#### 2.4 Metodi innovativi

Questo progetto di dottorato nasce dalla considerazione della reale ed attuale richiesta di controllo degli OGM attraverso sistemi più economici, pratici e versatili. Il metodo ideale dovrebbe consentire, in un unico saggio, di monitorare parecchi se non tutti i target desiderati ed in tutte le matrici alimentari esistenti. Nel tentativo di dare una risposta a questa richiesta, due nuovi metodi sono stati applicati e valutati.

##### xMAP Technology

Il primo metodo proposto è basato sulla tecnologia xMAP (Multiplex Analite Profile) Technology della Luminex Corp. (USA). La tecnologia Luminex può essere definita come altamente versatile tanto da consentire un'analisi multipla, qualitativa e quantitativa, sia di DNA che di proteine. La x-MAP (Multiplex Analite Profile) Technology è un approccio innovativo che combina caratteristiche peculiari con altre tecniche analitiche note, quali, i microarrays fluidi, la citofluorimetria di flusso e le potenzialità della rivelazione in fluorescenza, in un'unica nuova metodica. In questa tecnologia, il supporto solido presente nei microarrays è sostituito da microsfere di polistirene del diametro di circa 5.6 µm che vengono sospese nel campione da analizzare. A sua volta il campione si trova in sospensione acquosa solitamente alloggiato in piastre multi-well da 96 pozzetti. Le microsfere sono internamente colorate con due diversi marcatori fluorescenti. Utilizzando in diversi rapporti i due marcatori, sono stati creati 100 differenti set di microsfere identificate commercialmente da un codice numerico (es. beads 154). Durante il saggio le microsfere passano attraverso un capillare presente nello strumento Luminex-100<sup>®</sup> e vengono eccitate da un raggio laser. Lo spettro specifico di emissione è caratteristico per ogni set di microsfere, pertanto lo strumento è in grado di identificare da 64 fino a 100 differenti tipi di microsfere (a seconda del modello

di strumento Luminex utilizzato). Sulla superficie delle microsfele sono presenti dei gruppi carbossilici terminali che permettono di legare sonde, o capture probe, di DNA o proteine secondo il saggio che si vuole allestire. I gruppi carbossilici sono attivabili attraverso una reazione in presenza di EDC e sulfo-NHS. Una volta che le sonde sono state legate alle microsfele si passa all'esecuzione del saggio che prevede l'incubazione delle microsfele con il campione in esame. Durante una prima incubazione si forma un complesso microsfera-capture probe-target. Per la quantificazione del target è necessario utilizzare un secondo marcatore fluorescente. Nel caso di un saggio proteico la marcatura secondaria è a carico degli anticorpi secondari che vengono perciò biotinilati; invece nel caso di un saggio per acidi nucleici il target viene biotinilato attraverso una reazione di PCR. Infine un'incubazione con streptavidina-ficoeritrina per dieci minuti permette lo sviluppo del segnale. Al termine delle incubazioni si sarà così formato nel campione un complesso microsfera-anticorpo primario-target-anticorpo secondario biotinilato- ficoeritrina che potrà essere quantificato utilizzando la piattaforma Luminex-100 o la versione HTS cioè "high through-put system" da otto capillari (Schema I). Il campione, che si trova in fase liquida, viene pescato dal capillare dello strumento che consente il passaggio di una microsfera per volta. Lo strumento analizza un numero fisso di microsfele impostato dall'operatore, solitamente 100. Durante il passaggio nel capillare le microsfele vengono investite da due laser: il primo di colore rosso che emette una radiazione a 635 nm, cioè nello spettro di assorbimento dei coloranti delle microsfele. Questo laser consente di identificare il tipo di microsfera che passa in quel momento nel capillare. Il secondo laser, di colore verde, emette una radiazione a 532 nm ed eccita la ficoeritrina associata alla marcatura secondaria. L'intensità della radiazione emessa dalla ficoeritrina è direttamente proporzionale alla quantità di target presente nel campione. Un software dedicato collegato allo strumento converte il segnale di fluorescenza rilevato (Mean Fluorescence Intensity, MFI) in un dato numerico.



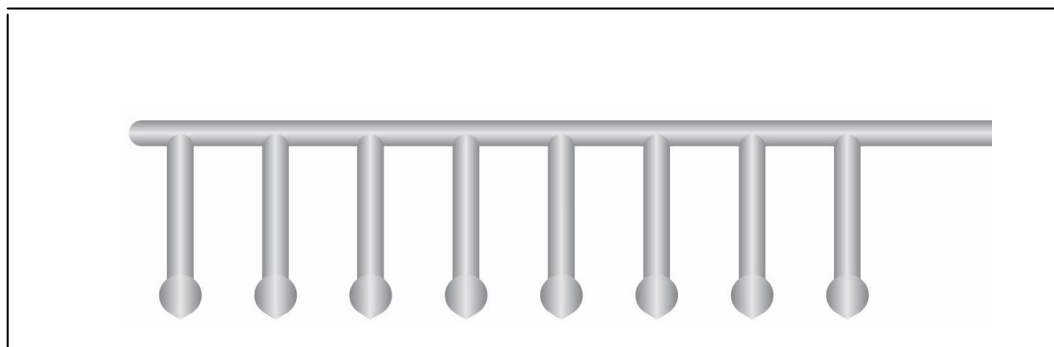
**Schema I: Schema di funzionamento della tecnologia xMap.**

Viste le potenzialita` del sistema ed i numerosi successi descritti in letteratura in campo clinico-diagnostico ottenuti applicando questo sistema di analisi, si e` pensato di applicare questa tecnologia anche in campo alimentare per la misurazione di OGM ed in particolare di sviluppare sia un saggio immuoenzimatico che un saggio per acidi nucleici. A differenza di altri settori di ricerca in questo campo la ricerca, e` frenata dalla mancanza di informazione circa le sequenze dei costrutti e dei prodotti proteici correlati. Tutte le informazioni relative agli OGM in commercio sono fortemente protette da Accordi di Confidenzialita` o da Marchi Registrati che ne vietano l'utilizzo anche a fini di ricerca. Pertanto in questo lavoro sperimentale e` stato possibile utilizzare solo le sequenze pubbliche quali quella del promotore p35S e di CP4EPSPS per la messa a punto di un saggio per acidi nucleici su soia, e di un saggio immuoenzimatico per il rilevamento e quantificazione di Cry1Ab e CP4EPSPS grazie alla collaborazione del Dr Markus Lipp della ditta Monsanto che ha fornito i primi reagenti. Il secondo sistema applicato e` l'ELISA Reverse (ER) che a differenza del sistema x-Map e` molto piu` pratico ed economico, adatto anche allo sviluppo di un "kit da campo" per la sola analisi multipla proteica. I due sistemi hanno caratteristiche

completamente differenti tanto da potere essere considerati complementari ma non alternativi.

#### ELISA REVERSE method&device

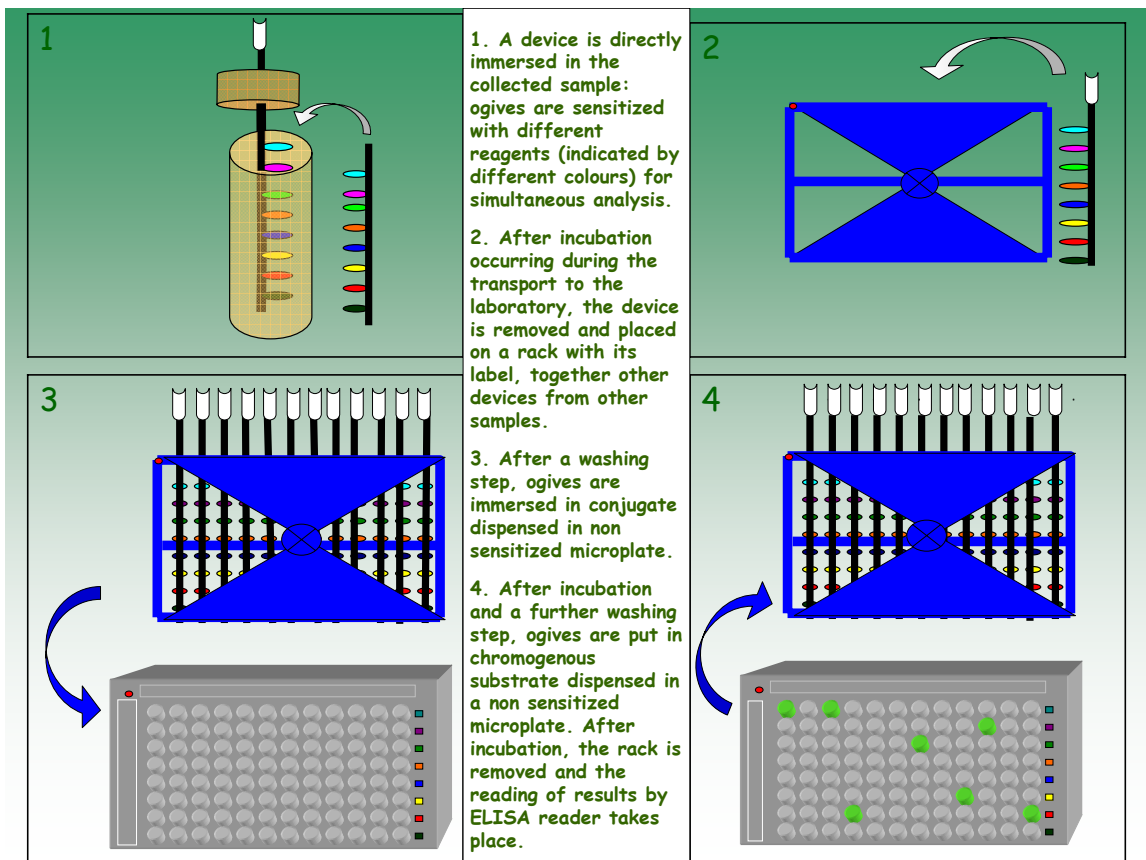
L'innovazione dell'ELISA Reverse m&d consiste nella forma della fase solida. Nel metodo ELISA convenzionale la fase solida e' costituita dai pozzetti delle micropiastre o microstrip fatte in plastica immunosorbente, mentre la fase solida dell'ER e' costituita da ogive che protrudono da una astina di polistirene puro (Fig. 13). La distanza tra le ogive e' calibrata e consente l'immersione delle ogive nei pozzetti di una micropiastre standard da 96 o 384 pozzetti.



**Figura. 13: ER device a 8 ogive**

Ogni ogiva del device puo` essere sensibilizzata all'occorenza con proteina differenti (anticorpi, antigeni, apteni e proteine in genere), consentendo in questo modo la ricerca simultanea in un singolo campione di piu` target con un unico device. Una volta sensibilizzato, il device puo` essere inserito direttamente nel recipiente contenete il campione da analizzare (contenitore tipo tubo da centrifuga Falcon da 50 mL) oppure in alternativa ogni singola ogiva puo` essere inserita in un pozzetto di una micropiastre in cui e` stato aliquotato il campione (solitamente 100 µL). Alla fine dell'incubazione, il cui tempo e` variabile da 20 min a due ore, il device viene lavato e incubato nuovamente con un secondo marcatore, solitamente un anticorpo marcato. Dopo un secondo lavaggio, il device viene

messo a contatto con il cromogeno per circa 15min prima di passare alla lettura della micropiastra con lo spettrofotometro (Schema II).



Schema II: ELISA Reverse m&d

Nel presente lavoro di tesi il device è stato impiegato per la messa a punto di un saggio immunoenzimatico per la quantificazione di Cry1Ab in campioni di mais GM e di un test multiplo per Cry1Ab ed EPSPS in campioni di mais e soia GM.

### **3 Metodiche di campionamento**

#### 3.1 Normativa Ue

In questo paragrafo viene riportato quanto concerne il campionamento, ricordando che il campionamento è alla base della valutazione statistica dei risultati di laboratorio, pertanto è anch'esso oggetto di studio e di legislazione.

#### 3.2 Normativa per la rilevazione di sementi GM

**a)** sementi o altri materiali di propagazione vegetale geneticamente modificati in lotti di sementi o di altri materiali di propagazione vegetale di varietà o cloni non modificati geneticamente;

**b)** sementi e altri materiali di propagazione vegetale geneticamente modificati derivanti da eventi di trasformazione diversi da quelli previsti per un lotto di sementi o di altri materiali di propagazione vegetale di una varietà o clone geneticamente modificato;

prevede che i campioni dovrebbero essere prelevati secondo i metodi internazionali in uso e, ove opportuno, da lotti aventi le dimensioni stabilite dalle direttive 66/401/CEE, 66/402/CEE, 68/193/CEE, 92/34/CEE, 98/56/CEE, 1999/105/CE, 2002/54/CE, 2002/55/CE, 2002/56/CE e 2002/57/CE del Consiglio. I principi generali e i metodi di campionamento delle sementi e degli altri materiali di propagazione vegetale dovrebbero essere conformi alle norme ISTA e alle istruzioni del manuale ISTA per il campionamento delle sementi. I sistemi di campionamento e di analisi delle sementi e degli altri materiali di propagazione vegetale dovrebbero soddisfare le prescrizioni della normativa specifica riguardante le sementi e gli altri materiali di propagazione vegetale per quanto attiene ai rischi statistici. Il livello di qualità dei lotti di sementi o di altri materiali di propagazione vegetale e l'incertezza statistica ad esso associata sono definiti in relazione alle soglie stabilite per gli OGM e si riferiscono alla percentuale delle copie di DNA geneticamente modificato rispetto alle copie di DNA specifico del taxon bersaglio, calcolata in termini di genomi aploidi.

### 3.3. Campionamento di prodotti agricoli sfusi GM

Il protocollo di campionamento si basa su una procedura in due fasi che consente, se necessario, di ottenere una stima dei livelli di presenza di OGM, insieme alla relativa incertezza espressa come deviazione standard, senza dover formulare alcuna supposizione sulla possibile eterogeneità degli OGM.

Per permettere di stimare la deviazione standard, occorre anzitutto preparare un campione globale e procedere all'analisi del campione da analizzare da esso ricavato onde accertare la presenza di materiali geneticamente modificati. Qualora il risultato dell'analisi si avvicini alla soglia stabilita ( $\pm 50$  % del suo valore), si raccomanda di analizzare i singoli campioni elementari per la conservazione onde quantificare l'incertezza associata.

È opportuno tenere conto dei seguenti documenti:

- a) norma ISO 6644 (2002);
- b) norma ISO 13690 (1999);
- c) norma ISO 5725 (1994);
- d) norma ISO 2859 (1985);
- e) norma ISO 542 (1990).

#### Protocollo per il campionamento di lotti di prodotti agricoli sfusi

Si raccomanda di fare in modo che il campionamento dei prodotti sfusi (granelle, semi oleosi) avvenga secondo i principi generali e i metodi di campionamento descritti nelle norme ISO 6644 e 13690. In caso di flussi di prodotti in movimento, il periodo di campionamento dovrebbe essere definito, secondo la norma ISO 6644, nel modo seguente: tempo totale di scarico/numero totale di campioni elementari. In caso di campionamento statico, i campioni elementari dovrebbero essere prelevati in specifici punti di campionamento. Tali punti di campionamento dovrebbero essere distribuiti uniformemente su tutto il volume del lotto, secondo i principi descritti nella norma ISO 13690. Il numero di campioni elementari o di punti di campionamento (in cui sono prelevati i campioni elementari che concorrono a costituire il campione globale e i campioni elementari per la

conservazione) è definito in base alle dimensioni del lotto come indicato nella seguente tabella:

Dimensioni del lotto (tonnellate) | Dimensioni del campione globale (chilogrammi) | Numero di campioni elementari |

$\leq 50$  | 5 | 10 |

100 | 10 | 20 |

250 | 25 | 50 |

$\geq 500$  | 50 | 100 |

Per i lotti da 50 a 500 tonnellate, le dimensioni del campione globale dovrebbero corrispondere allo 0,01 % delle dimensioni totali del lotto. Per i lotti inferiori a 50 tonnellate, il campione globale dovrebbe essere di 5 chilogrammi. Per i lotti di oltre 500 tonnellate, il campione globale dovrebbe essere di 50 chilogrammi. Ad ogni intervallo di campionamento (campionamento sistematico) o in ciascun punto di campionamento (campionamento statico) occorre prelevare un campione elementare di 1 chilogrammo e suddividerlo in due frazioni di 0,5 chilogrammi, da utilizzare rispettivamente come campione elementare per la produzione del campione globale e come campione elementare per la conservazione. Il campionamento di materiali di dimensioni maggiori rispetto alle granelle (ad esempio frutti, rizomi e patate) dovrebbe essere effettuato secondo la norma ISO 2859. Il campionamento dei semi oleosi dovrebbe essere effettuato secondo la norma ISO 542. Fonte: 2004/787/CE: Raccomandazione della Commissione, 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. 1831/2003 Testo rilevante ai fini del SEE, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea n. L 348 del 24/11/2004 pag. 0018 – 0026*.



## **II SCOPO DELLA TESI**

### **1 Scopo del progetto**

Lo scopo del progetto e` di sviluppare nuovi metodi analitici utili al controllo degli OGM potenzialmente presenti nelle matrici alimentari. A tal fine tre approcci differenti sono stati messi a punto, due per la messa in evidenza di proteine ed uno per acidi nucleici.

Nella descrizione dell'attività sperimentale, una prima parte e` dedicata alla generazione di anticorpi monoclonali utili per l'allestimento dei saggi, mentre nella seconda si descrivono i metodi sviluppati.

---

## **III MATERIALI E METODI**

---

### **1 Campioni e reagenti**

#### 1.1 Scelta dei campioni

I materiali di partenza utilizzati per la sperimentazione si possono dividere in tre categorie principali:

- a) proteine purificate e oligonucleotidi appositamente disegnati e sintetizzati;
- b) materiali di riferimento certificati IRMM (Institute for Reference Materials and Measurement of the EC-DG Joint Research Centre, Geel-B) contenenti percentuali note di materiale transgenico;
- c) standard commerciali;

Nel dettaglio:

farine di mais certificate IRMM per MON810 (ERM-BF413) e Bt-176 (ERM-BF411) e Bt-11 (ERM-BF410) contenenti <0.02%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2.0% e 5% di mais GM;

farine di soia certificate IRMM (ERM-BF410) contenenti 0%, 0.5% e 2.0% di Roundup Ready®;

mais Bt-11 standard material della Strategic Diagnostic Inc. (S.D.I., USA) contenente 0%, 0.15%, 0.5% e 2% di mais GM..Cry1Ab e CP4-EPSPS proteine purificate della Monsanto (Monsanto Company, Missouri USA). Le concentrazioni di partenza erano rispettivamente di 3.6 e 3.8 mg/mL.

#### 1.2 Reagenti di laboratorio di largo consumo

Elenco dei principali reagenti di laboratorio:

Sigma: polveri comuni e TMB substrato per ELISA

Merk: alcol, acidi e basi

Invitrogen: kit e vettori per il clonaggio genico

Fluka: soluzioni di uso comune

Bio-Rad: soluzioni di acrilammide

Roche: enzimi di restrizione e buffer

Amersham: anticorpi e kit per western blot

Eppendorf: kit di purificazione del DNA

Pierce: reagenti speciali quali Sulfo-NHS e biotina

Luminex: microsfere

Stratagene: Pfu polimerasi e buffers

Strategic Diagnostics (USA): ELISA kit commerciali delle ditte: GMOCheck Bt1 Maize test.

EnviroLogix, Inc. (USA), Cry1Ab/Cry1Ac Plate kit

Abraxis (USA), BT CryAC/Cry1Ab Abraxis LLC ELISA kit

Biomat snc (Rovereto, Italia), ELISA Reverse prototipi a 4 ogive HB10

Qiagen: colonnine Montage con Prosep-G (Millipore Cat. No. Lsk2abg60) per la purificazione di anticorpi.

## **2 Generazione di anticorpi monoclonali**

### 2.1 Estrazione del DNA da farine di soia e mais (metodo CTAB)

Il DNA genomico (DNAg) di mais e soia GM e' stato isolato e l'intera sequenza codificante corrispondente alle proteine di interesse CP4EPSPS e Cry1Ab e' stata amplificata.

L'amplificazione dall'intera sequenza codificante è un passo critico nel clonaggio in quanto molte variabili incidono sull'efficienza di reazione, come la presenza di molecole di amido o polifenoli che inibiscono l'attività delle DNA Polimerasi. L'estrazione e la purificazione del DNAg totale contenuto nella matrice di partenza e' pertanto un passaggio delicato.

I campioni disponibili per il clonaggio dei geni d'interesse sono stati farine di semi di soia Roundup Ready (100%), mais MON 810 (100%) e mais Bt11 (5%), oltre a farine di soia e mais tradizionali utilizzate come controlli negativi.

Il metodo CTAB ovvero cetiltrimetilammonio-bromuro, e' considerato a ragione il metodo di elezione per l'estrazione di DNA genomico da matrici vegetali. E' piuttosto lungo e tedioso, ma semplice da eseguire e non richiede l'utilizzo di reagenti tossici.

La lisi cellulare avviene in un tampone di EDTA, Tris-HCl contenente il CTAB che scioglie le membrane. Il CTAB è un detergente ionico che forma dei complessi insolubili con gli

acidi nucleici in soluzioni iposaline. In queste condizioni polifenoli e amido rimangono in soluzione e possono pertanto essere eliminati.

Dopo la rottura del tessuto vengono pertanto eseguiti alcuni passaggi di precipitazione e risospensione che permettono la purificazione e la concentrazione degli acidi nucleici.

In particolare:

- Pesare 100 mg di campione omogenato e trasferirlo in un tubo da centrifuga da 1.5 mL
- Aggiungere 300  $\mu$ L di acqua ultrafiltrata
- Aggiungere 500  $\mu$ L di CTAB-buffer (20 g/L CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8) e miscelare
- Aggiungere 20  $\mu$ L di Proteinasi K (20 mg/mL), miscelare e incubare a 65°C per 60-90 minuti
- Centrifugare per 10 minuti a 16.000 rpm (Allegra 25R Centrige, Beckman Coulter) a 4°C
- Trasferire il supernatante in un nuovo tubo da 1.5 mL
- Aggiungere 20  $\mu$ L di RNasi (10 mg/mL), miscelare e incubare a 65°C per 5-10 minuti
- Centrifugare per 10 minuti a 16.000 rpm a 4°C
- Trasferire il supernatante in un nuovo tubo da centrifuga contenente 500  $\mu$ L di cloroformio e omogenare con l'aiuto di un vortex per 30 sec
- Centrifugare per 10 minuti a 16.000 rpm a 4°C
- Trasferire il supernatante in un tubo da centrifuga contenente altri 500  $\mu$ L di cloroformio e agitare
- Trasferire il supernatante in un nuovo tubo da centrifuga
- Aggiungere 2 volumi di CTAB-precipitation solution (5 g/L CTAB, 0.04 M NaCl, pH 8) e incubare per 60 min a temperatura ambiente
- Centrifugare per 5 minuti a 16.000 rpm a 4°C
- Eliminare il supernatante
- Sciogliere il precipitato in 350  $\mu$ L di NaCl 1.2M
- Aggiungere 350  $\mu$ L di cloroformio e miscelare per 30 sec

- Centrifugare per 10 minuti a 16.000 rpm a 4°C
- Trasferire il supernatante in un nuovo tubo da centrifuga
- Aggiungere 0.6 volumi di isopropanolo e miscelare
- Centrifugare per 10 minuti a 16.000 rpm a 4°C
- Eliminare il supernatante
- Aggiungere 500 µL di etanolo 70% e agitare leggermente
- Centrifugare per 10 minuti a 16.000 rpm a 4 °C
- Eliminare il supernatante
- Risospendere il precipitato in 50 µL di acqua
- Il campione può essere conservato a -20°C

#### Dosaggio del DNA estratto

Il dosaggio del DNA estratto è stato ottenuto tramite uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260 nm dove gli acidi nucleici hanno il massimo assorbimento (o assorbanza). A 260 nm la lettura risente minimamente della presenza di altri contaminanti come carboidrati, fenoli e proteine che hanno un massimo di assorbimento rispettivamente a 230 nm e 280 nm. Il rapporto A260/A280 circa uguale a 2 è indice di purezza della preparazione.

1 µL di campione è quindi stato utilizzato per la lettura spettrofotometrica dopo ogni estrazione. La misura è stata condotta utilizzando lo strumento Eppendorf BioPhotometer in cuvette il cui volume minimo di lettura è di 50 µL.

L'assorbanza ottenuta viene moltiplicata per il F.C. e il fattore di diluizione (F.D.).

1 O.D.<sub>260</sub> = 50 µg/mL di DNA

Conc. DNA = A x F.C. x F.D.

#### Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi in gel di agarosio è una tecnica utile per separare macromolecole, in questo caso di DNA. Cio` avviene in base alla dimensione, alla carica elettrica e ad altre proprietà fisiche come la conformazione tridimensionale; l'elettroforesi si basa sulla capacità delle molecole di migrare in un campo elettrico generato da una differenza di potenziale che

costituisce la forza traente. La differente resistenza che incontrano le molecole nell'attraversare le maglie del gel consente la separazione delle diverse componenti. I campioni di DNAg o di cDNA dopo amplificazione vengono posti nei pozzetti creati nella matrice del gel e sottoposti al campo elettrico. Il DNA è carico negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, pertanto, migra verso il polo positivo (anodo).

La localizzazione del DNA all'interno del gel è stata visualizzata tramite colorazione con un intercalante fluorescente per acidi nucleici, l'etidio bromuro (Etbr), che intercalandosi alle basi del DNA emette luce rossa-arancio quando illuminato con raggi ultravioletti.

#### Preparazione del gel di agarosio

I gel di agarosio sono stati preparati sciogliendo polvere di agarosio in un tampone di corsa in percentuale (p/V) variabile secondo la risoluzione richiesta. Nel caso di DNA genomico è stato solitamente utilizzato un gel allo 0.8 - 1%, mentre per separare prodotti di PCR la percentuale di agarosio sale all'1.5 - 2.5%. Il tampone utilizzato per la corsa è stato Tris-acetato-EDTA o TAE (40 mM Tris-acetato pH 7.6, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O).

Dopo aver raffreddato il gel fino ad una temperatura di 50°C circa, viene aggiunto l' Etbr (concentrazione finale di 0.5 µg/mL).

Il gel così preparato viene versato ancora caldo (circa 50°C) nella vaschetta di corsa con il relativo pettine per la formazione dei pozzetti. A solidificazione avvenuta, il pettine viene rimosso e la lastra di gel viene posizionata all'interno della vaschetta da elettroforesi contenente il tampone utilizzato anche come liquido di corsa.

#### Caricamento dei pozzetti

Ai campioni di DNA in esame viene aggiunto gel loading buffer 1X (6X Loading Dye Solution, MBI Fermentas).

Successivamente si procede al caricamento dei pozzetti con 5 – 15 µL di preparato.

La corrente applicata agli elettrodi è di 7 V/cm pari ad un voltaggio complessivo di 70-150V, secondo la larghezza della vaschetta elettroforetica utilizzata. La durata totale della corsa varia da una a tre ore secondo la densità del gel e della sua lunghezza. La corsa viene normalmente interrotta quando la banda del tracciante di colore blu che corre nel gel come

una banda di DNA della lunghezza di 300 bp ha coperto almeno i 2/3 della lunghezza del gel. A fine corsa il gel viene posto su un transilluminatore e fotografato con un sistema digitale a telecamera GEL-DOC2000 system (Bio-Rad).

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tramite PCR è stato amplificato il tratto di DNA di interesse. *In vitro*, utilizzando come l'innesco della reazione due segmenti oligonucleotidici (primer) complementari alle estremità della sequenza che si vuole amplificare è stato possibile ottenere l'intera sequenza codificante dei geni di interesse, CP4EPEPS e Cry1Ab.

Il termociclatore utilizzato è uno strumento Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700.

Per isolare i geni di interesse Cry 1Ab e CP4-EPSPS sono state eseguite due PCR in condizioni altamente stringenti per garantire la massima specificità della reazione. Si è utilizzata una DNA polimerasi ad alta fedeltà estratta da *Pyrococcus furiosus* (*PfuUltra*<sup>TM</sup> Hotstart DNAPolymerase, Stratagene). La caratteristica principale di questa polimerasi è la presenza di un'attività esonucleasica 3'-5' che permette la correzione di eventuali errori di polimerizzazione.

Gli inneschi sono stati disegnati in modo che la temperatura di appaiamento ( $T_m$ ) dei primer fosse compresa tra i 55 e i 60°C, calcolata approssimativamente secondo la formula di uso corrente:

$$T_m \text{ C}^\circ = 2 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C}),$$

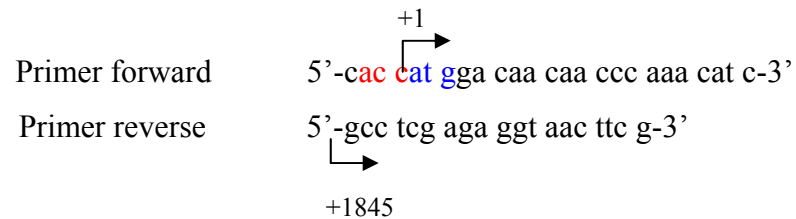
considerata sufficiente ad impedire l'appaiamento dei primer a sequenze di DNA aspecifiche. I primer disegnati hanno caratteristiche standard:  $T_m$  di circa 55 gradi, lunghezza di 18-20 nucleotidi, presenza di almeno due basi azotate C o G negli ultimi tre nucleotidi delle estremità.

Al 5' dei primer forward, immediatamente prima del codone ATG di inizio traduzione, è stata inserita una breve sequenza di quattro nucleotidi (CACC) che ha permesso il clonaggio direzionale all'interno del vettore plasmidico pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> per ottenere il corretto

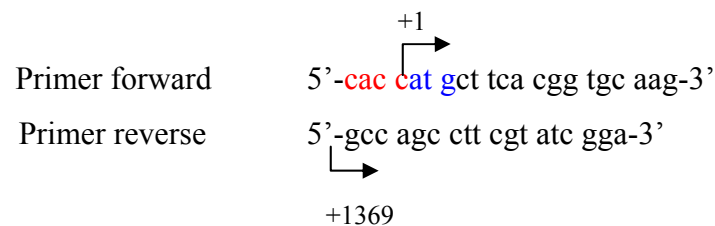
orientamento dei geni all'interno dei vettori e la conservazione del corretto "frame" di lettura durante la sintesi proteica.

Le sequenze dei primer utilizzati sono:

**Primer Cry1Ab di Bt 11 (riferimento sequenza NCBI, M60856):**



**Primer CP4-EPSPS (riferimento sequenza NCBI AF464188)**



Protocollo di amplificazione:

la reazione di amplificazione è stata condotta in tubi da PCR di 200 µL, in un volume finale di 50 µL contenenti:

|                         | Concentrazione finale per singolo tubo di reazione |
|-------------------------|--|
| DNA templatato          | 100 ng circa                                       |
| dNTP                    | 200 µM   |
| primer forward          | 0.2 µM   |
| primer reverse          | 0.2 µM   |
| MgCl <sub>2</sub>       | 1.5 µM   |
| Buffer di reazione 10X  | 1 X  |
| DNA Polimerasi          | 2.5 U  |
| Acqua millipore sterile | a volume   |



In ogni corsa è stato inserito un controllo negativo, in cui alla miscela di reazione non viene aggiunto nessun template da amplificare e un controllo positivo in cui è presente un DNA risultato positivo ad una reazione precedentemente condotta. Questi controlli assicurano sia l'assenza di contaminazioni casuali che la riuscita della reazione.

### Cicli di PCR

Il termociclatore viene così impostato:

1° fase: denaturazione a 94°C per 5 min

2° fase: 35 cicli di polimerizzazione alle seguenti temperature

94°C per 30 sec (fase di denaturazione)

55°C per 30 sec (fase di appaiamento)

72°C per 30 sec (fase di polimerizzazione)

3° fase: completamento delle reazioni a 72°C per 7 min

4° fase: conservazione a 4°C

### Purificazione di DNA da gel di agarosio

Dopo aver amplificato l'intero cDNA codificante per le proteine Cry1Ab e CP4EPSPS, il prodotto di PCR è stato caricato su gel di agarosio e la banda corrispondente al peso del tratto di DNA atteso è stata recuperata dal gel ripurificandola con il kit Perfectprep Gel Cleanup® (Eppendorf) seguendo il protocollo indicato dal produttore.

Il cDNA così recuperato è stato utilizzato per il clonaggio.

### 2.3 Clonaggio ed espressione di un gene eterologo

Per ottenere l'espressione delle proteine in un sistema eterologo è stato necessario isolare il gene di interesse e inserirlo in un vettore di espressione.

Il sistema utilizzato è stato il sistema commerciale della Gateway® Technology (*E. coli* Expression System Gateway® Technology e Directional TOPO® Cloning Kit Invitrogen™) che permette di introdurre il gene nel corretto orientamento in un vettore di clonaggio e ricombinarlo in un vettore di espressione secondo i seguenti passaggi:

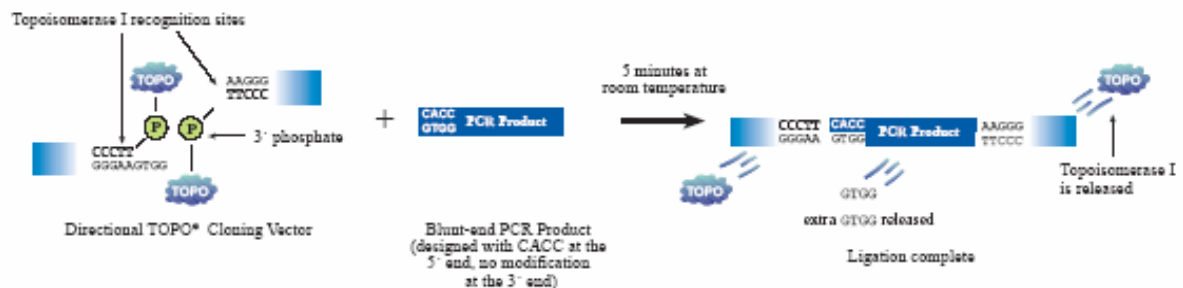
- 1 inserimento direzionale di un prodotto di PCR nel vettore plasmidico pENTR;

- 2 trasformazione del ceppo batterico competente *E.Coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 per la replicazione del vettore;
- 3 ricombinazione del gene in un vettore di espressione pDEST<sup>™</sup>;
- 4 trasformazione di un nuovo ceppo batterico competente (Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$  *E. coli*) per la replicazione del vettore;
- 5 estrazione dei vettori e trasformazione di un ceppo batterico *E. coli* BL21-AI<sup>™</sup> per l'induzione dell'espressione proteica.

### Generazione di un Entry Clone

La reazione di inserzione dell'inserto nel vettore pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> è catalizzata dall'enzima Topoisomerasi I del *Vaccinia* virus.

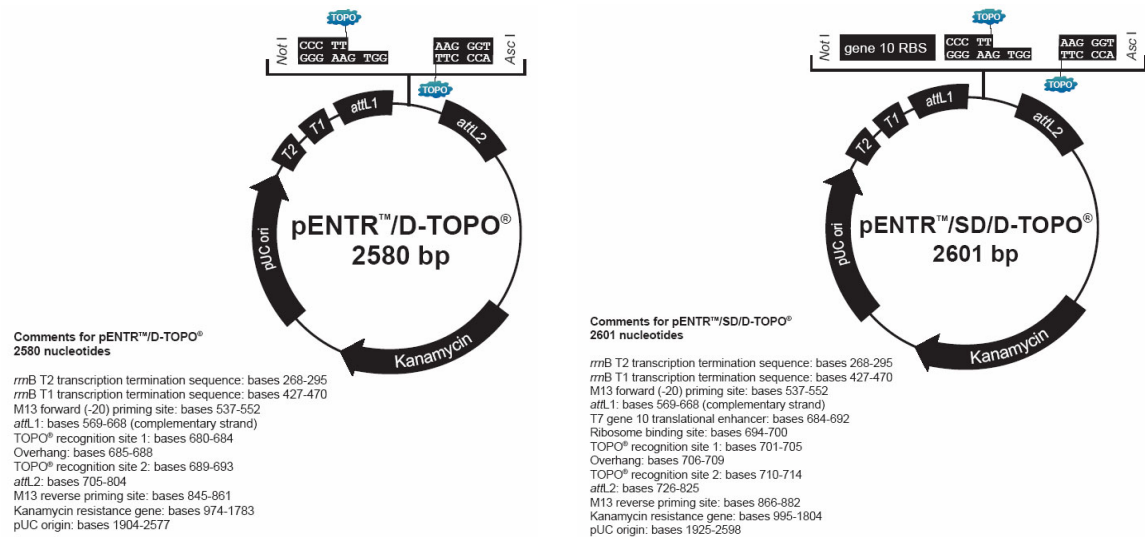
La Topoisomerasi I lega una sequenza specifica (CCCTT) contenuta all'interno del plasmidi utilizzata come vettore di clonaggio e catalizza il taglio di un'elica del DNA; l'energia liberata dal taglio viene conservata per formare il legame fosfodiesterico con il gene inserito (Fig. 14).



**Figura 14: Meccanismo di inserzione di un gene catalizzata da Topoisomerasi I di *Vaccinia* virus**

Per la replicazione del plasmide ricombinante, il vettore viene inserito in un ceppo di batteri competenti (*Escherichia coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10); la trasformazione avviene per induzione di uno shock termico a 42°C che destabilizza la parete cellulare rendendola permeabile all'entrata del plasmide.

Vengono utilizzati due tipi diversi di vettori (pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> e pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>) che differiscono per la presenza o l'assenza di una sequenza RBS (Ribosome Binding Sequence) al 5' del sito di inserzione (Fig. 15).



**Figura 15: Mappe genetiche dei plasmidi utilizzati per il clonaggio**

Come verrà spiegato in seguito, questo permetterà di ottenere due proteine di fusione con differenti caratteristiche.

### Protocollo di clonaggio

- Preparare la soluzione di clonaggio contenente i seguenti reagenti, il vettore e l'inserto.

Salt Solution (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>): 1 µL

Prodotto PCR : 0.5-4 µL (rapporto molare Prodotto  
PCR:Vettore 0.5:1 – 2:1)

TOPO<sup>®</sup> vector (15-20 ng/µl) : 1 µL

Acqua sterile : a volume

Volume totale : 6 µL

- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (22-23°C).
- Mantenere la reazione in ghiaccio fino alla trasformazione delle cellule competenti.

#### Trasformazione delle cellule competenti One Shot® TOP10

I vettori prodotti contengono un'origine di replicazione batterica che consente di produrne numerose copie all'interno di una cellula batterica ospite.

#### Protocollo di trasformazione

- Aggiungere 2 µL del prodotto della reazione di clonaggio per ogni aliquota di cellule competenti ONE Shot® TOP10
- Incubare in ghiaccio per 5-30 min
- Shock termico delle cellule per 30 sec a 42 °C
- Trasferire immediatamente in ghiaccio
- Aggiungere 250 µL di S.O.C. Medium (2% Triptone, 0.5% estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucosio) a temperatura ambiente.
- Incubare le provette in posizione orizzontale a 37°C per un'ora in agitazione (200 rpm).
- Piastrare 2 aliquote diverse (50 e 200 µL) per ogni coltura in piastre di LB contenenti 50 µL/mL di kanamicina per ottenere colture con 2 diverse densità colturali.
- Incubare le piastre a 37°C over-night.
- Verificare il giorno seguente il numero di colonie cresciute.

#### Estrazione di DNA plasmidico da colonie batteriche

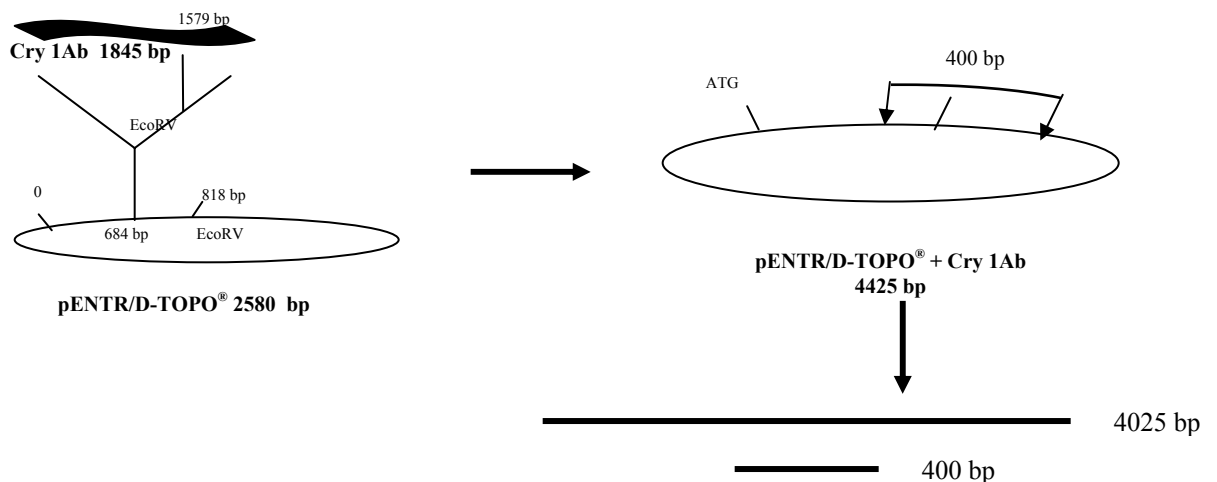
L'estrazione di DNA plasmidico da colonie batteriche permette di ottenere plasmidi purificati. Per il recupero dei plasmidi è stato utilizzato il kit FastPlasmid™ Mini (Eppendorf) che consente una rapida e semplice purificazione del DNA plasmidico. Il protocollo seguito è quello indicato dalla casa produttrice del kit di estrazione.

Analisi di restrizione

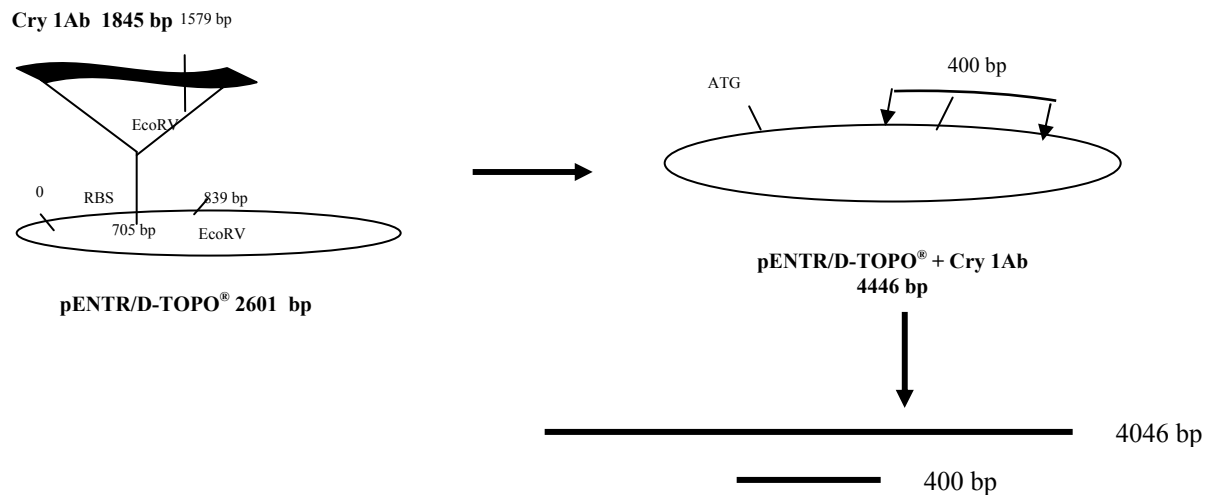
Una volta ottenuti i plasmidi purificati, è stata allestita una reazione di digestione. Fra le endonucleasi disponibili sono state scelte quelle che riconoscono un solo sito di taglio all'interno del gene inserito e uno all'interno del vettore plasmidico.

Nel caso dei plasmidi contenenti Cry1Ab è stato sufficiente l'utilizzo di un unico enzima di restrizione: Eco RV. La reazione avviene, secondo le indicazioni della ditta produttrice, in buffer B (10 mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoetanolo).

L'enzima di restrizione Eco RV riconosce e taglia la sequenza palindromica di DNA GAT|ATC. Tale sequenza è presente sia nel plasmide in posizione +818 bp rispetto all'origine di replicazione, sia all'interno del gene Cry1Ab in posizione +1579 bp dopo l'ATG iniziale. La mappa di restrizione risultante dalla digestione dei due plasmidi trasformati è mostrata nelle figure 16 e 17.

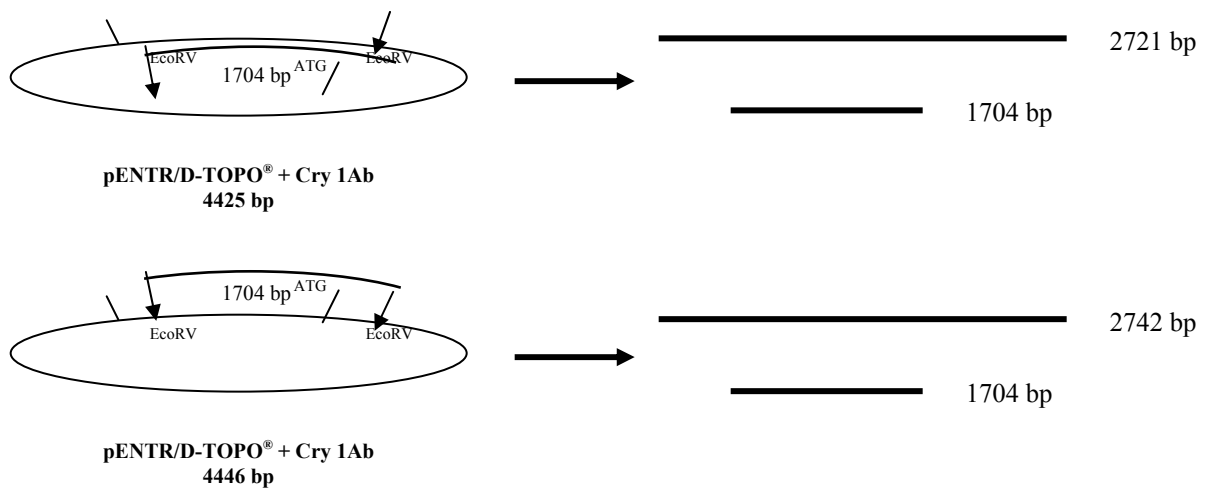


**Figura 16: Mappa di restrizione del plasmide pENTR/D-TOPO® + Cry 1Ab attesa dopo digestione con Eco RV.**



**Figura 17: Mappa di restrizione del plasmide pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> + Cry 1Ab attesa dopo digestione con Eco RV.**

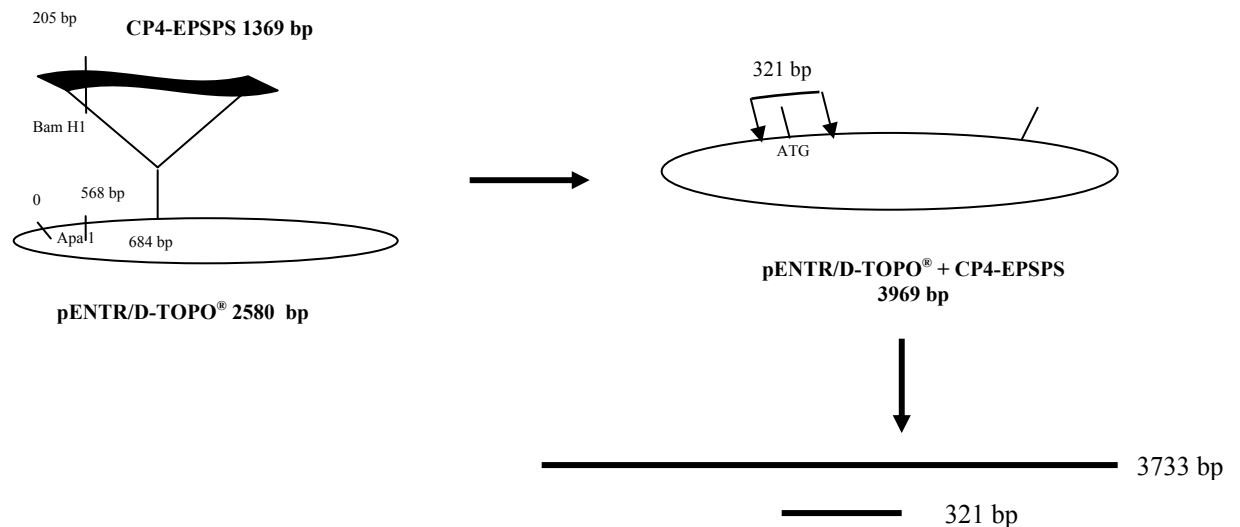
Nel caso i geni siano inseriti in posizione rovesciata si attende la seguente mappa di restrizione (Fig. 18).



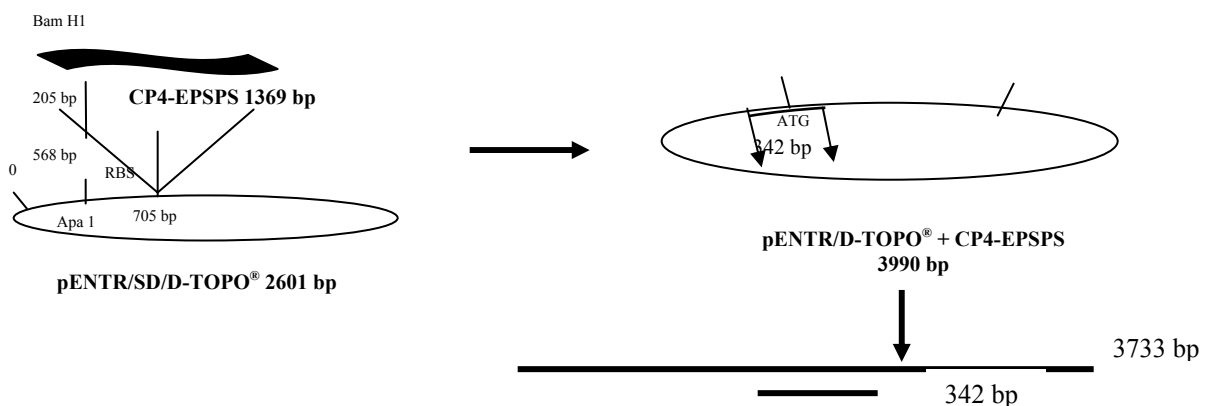
**Figura 18: Mappa di restrizione del plasmide pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> + Cry 1Ab e pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> + Cry 1Ab attesa dopo digestione con Eco RV con Cry 1Ab inserito in posizione scorretta**

Per l'analisi di restrizione dei vettori contenenti CP4-EPSPS si è scelta una coppia di enzimi di restrizione: il primo, Apa 1 possiede un sito di restrizione (GGGCC|C) in posizione + 568

rispetto all'origine di replicazione del vettore; il secondo, Bam H1 taglia la sequenza riconosciuta (G|GATCC) dopo 205 bp dal sito di inizio di traduzione del gene. I due enzimi sono entrambi attivi in buffer R<sup>+</sup> (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ditioeritritolo): in questo mezzo di reazione l'attività dei due enzimi è rispettivamente del 75% e del 50% rispetto alla loro attività massima. La mappa di restrizione attesa è mostrata nelle figure 19 e 20.

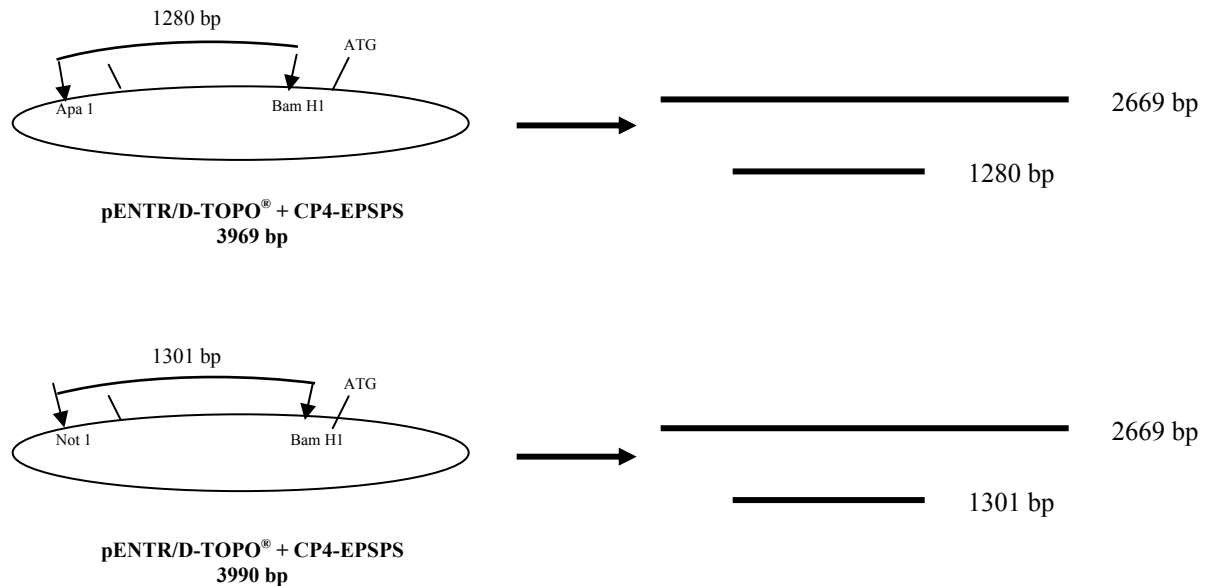


**Figura 19: Mappa di restrizione del plasmide pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> + CP4-EPSPS attesa dopo digestione con Apa 1 + Bam H1.**



**Figura 20: Mappa di restrizione del plasmide pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> + CP4-EPSPS attesa dopo digestione con Apa1 + BamH1**

Nel caso i geni siano inseriti in posizione rovesciata si prevede la seguente mappa di restrizione (Fig.21)



**Figura 21: Mappa di restrizione del plasmide pENTR/D-TOPO® + Cry 1Ab e pENTR/D/SD-TOPO® + Cry 1Ab attesa dopo digestione con Eco RV con Cry 1Ab inserito in posizione scorretta**

### Protocollo di digestione

Per l'allestimento della reazione vengono preparati in tubi da centrifuga da 1.5 mL, 15 µL di soluzione con la seguente formulazione:

|                        |            |
|------------------------|------------|
| DNA plasmidico         | 1 µg circa |
| Buffer di reazione 10X | 1 X        |
| Enzima di restrizione  | 0.3 U/µL   |
| Acqua                  | a volume   |
| Volume finale          | 15µL       |

Incubare la reazione a 37 °C per 2 ore

Il prodotto di digestione è visualizzabile con elettroforesi in un gel di agarosio 1%.



### Ricombinazione in vettori di espressione

Gateway<sup>®</sup> Technology assicura la ricombinazione sito-specifica del tratto di DNA inserito in una serie di vettori di destinazione (pDEST<sup>™</sup>) che consentono a loro volta l'espressione ad alto livello di proteine ricombinanti in *E. coli*.

La reazione di ricombinazione, mostrata in figura 22, avviene tra due siti ricombinogeni *attR* (*attR1* e *attR2*) e due siti *attL* (*attL1* e *attL2*) ad opera di tre enzimi.

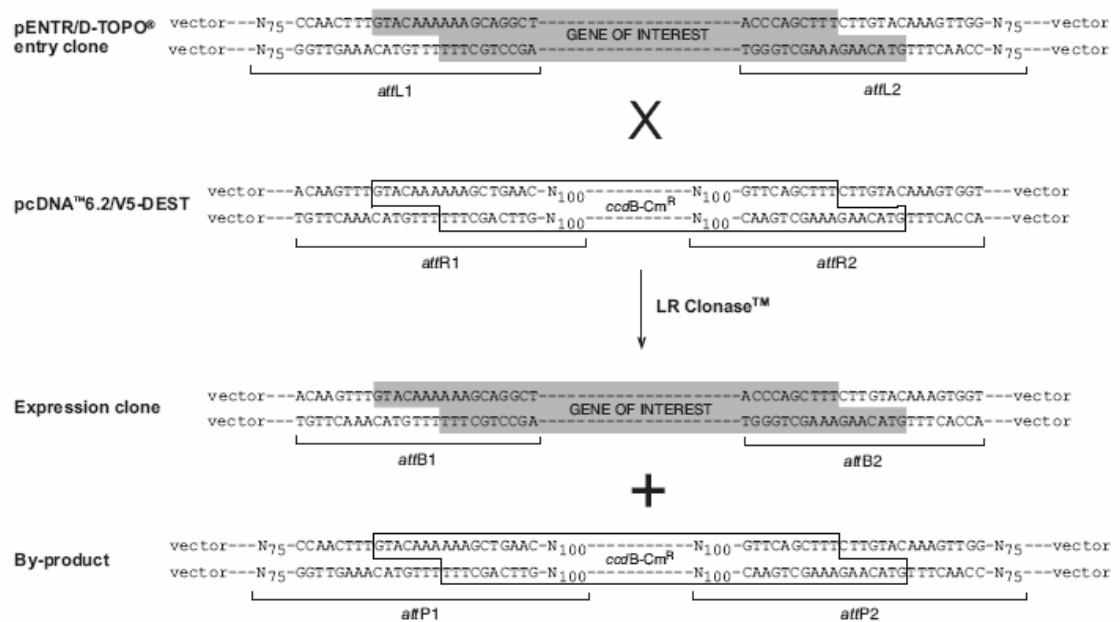


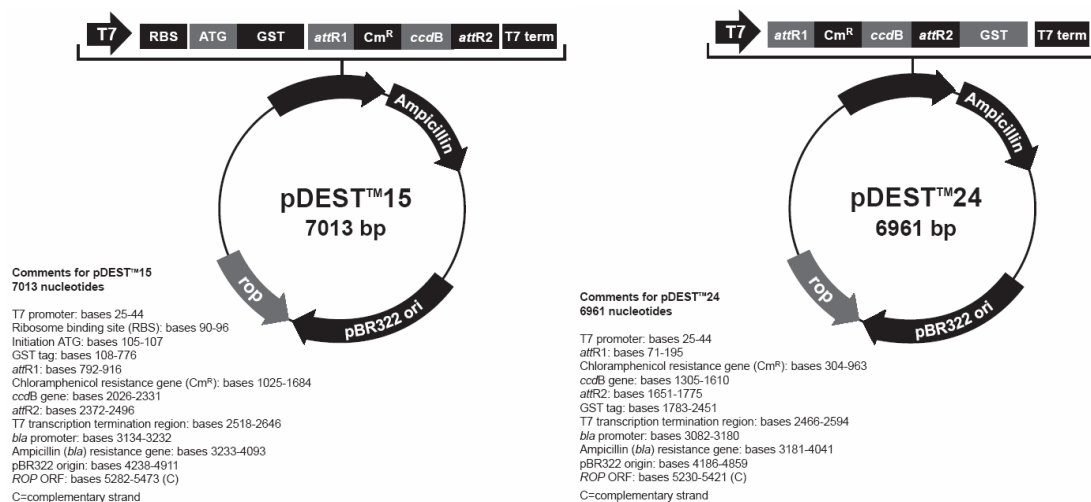
Figura 22: Reazione di ricombinazione LR Recombination

La LR Recombination è catalizzata dalla LR Clonase<sup>®</sup> Enzyme Mix, una miscela di enzimi contenenti Integrasi di batteriofago  $\lambda$  (Int), Excisionasi (Xis) e Fattore di Integrazione dell'Ospite di *E. coli* (IHF) che consentono lo scambio di pezzi di DNA compresi tra i due siti *att*.

Secondo il vettore utilizzato, i plasmidi vengono ricombinati in pDEST<sup>™</sup> vector modificati (pDEST<sup>™</sup> 15 e pDEST<sup>™</sup> 24) in modo da permettere la produzione di proteine di fusione ricombinanti.

I vettori pDEST™ sono caratterizzati dai seguenti elementi (fig.23):

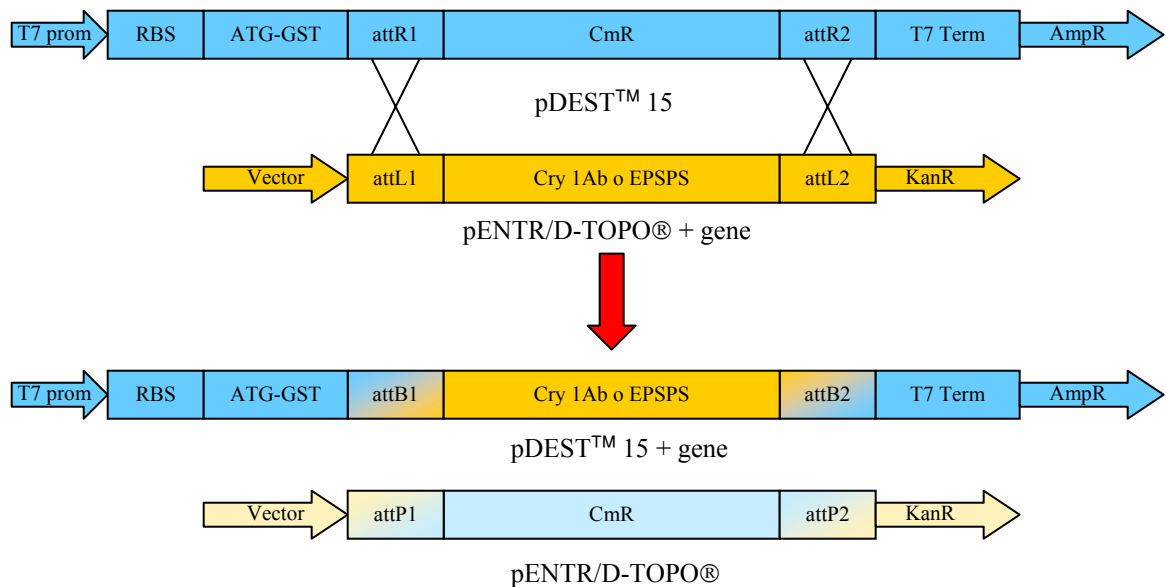
- T7 promoter per l'espressione ad alto livello del gene di interesse;
- Fusion Tags N- o C-terminali (GST) per la purificazione delle proteine ricombinanti;
- Due siti di ricombinazione, *attR1* e *attR2* per la ricombinazione dei geni inseriti nei vettori pDEST™;
- Marcatore di resistenza agli antibiotici ampicillina e carbenicillina;
- Origine di replicazione pBR322 per il mantenimento in poche copie del plasmide.



**Figura 23: Mappe genetiche dei plasmidi utilizzati per il clonaggio**

### Ricombinazione in pDEST<sup>TM</sup> 15

La ricombinazione nel plasmide pDEST<sup>TM</sup> 15 origina un vettore in cui il gene di interesse viene fuso al 5' della sequenza codificante per la Glutathione-S-Transferasi (GST) che forma la regione “tag” utilizzata per la purificazione (Fig. 24).



**Figura 24: Prodotto di ricombinazione tra pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> e pDEST<sup>TM</sup> 15**

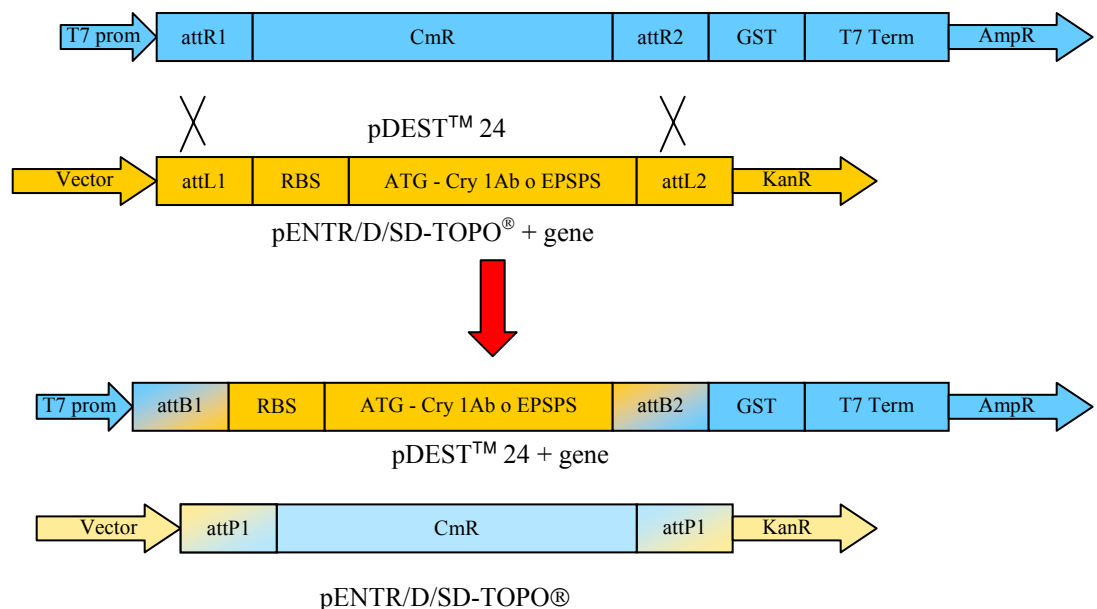
Il gene risultante contiene:

- la regione Shine-Dalgarno RBS a monte della regione codificante;
- il codone ATG di inizio trascrizione;
- la regione GST;
- il gene di interesse proveniente dal plasmide pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>.

Il gene inserito deve essere quindi “in frame” con la sequenza dei codoni della regione GST. Esso viene selezionato, dopo trasformazione di ceppi di *E. coli* Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>, per crescita in presenza di ampicillina (100  $\mu$ g/mL) o carbenicillina (50  $\mu$ g/mL).

### Ricombinazione in pDEST™ 24

Contrariamente a quanto avveniva nella reazione precedente, la ricombinazione dei geni in vettori pDEST™ 24 forma un plasmide in cui la regione Shine-Dalgarno RBS, l'ATG di inizio traduzione e il gene clonato provengono dal plasmide pENTR/D/SD-TOPO®<sup>®</sup>, mentre la regione tag GST, contenuta nei vettori pDEST™, si trova al C-terminale del prodotto di fusione risultante dalla ricombinazione (Fig. 25).



**Figura 25: Prodotto di ricombinazione tra pENTR/D/SD-TOPO® e pDEST™ 24**

Il DNA da esprimere è stato ottenuto utilizzando due primer che originano una sequenza che non contiene codoni di stop, inoltre dopo la ricombinazione la porzione GST deve risultare “in frame” con la regione codificante del gene inserito.

Come in precedenza, i plasmidi ricombinanti vengono selezionati dopo trasformazione di ceppi di *E. coli* Library Efficiency® DH5α™ dopo crescita in ampicillina o carbenicillina.

### Reazione di ricombinazione

- Diluire le soluzioni di plasmide pENTR/D(/SD)-TOPO® fino alla concentrazione di 50-150 ng/μL in TE pH 8.0).
- Preparare una soluzione contenente:

|   | Conc. finale       | Quantità   |
|---|--------------------|------------|
| Entry clone (pENTR/D(/SD)-TOPO <sup>®</sup> ) | 50-150 ng/ $\mu$ L | 100-300 ng |
| Destination vector (pDEST <sup>™</sup> )      | 150 ng/ $\mu$ L    | 300 ng     |
| 5X LR Clonase <sup>™</sup> Reaction Buffer    | 1.25 X             | 4 $\mu$ L  |
| TE Buffer, pH 8.0                             |                    | a volume   |
| Volume finale                                 |                    | 16 $\mu$ L |

- Rimuovere pochi minuti prima dell'utilizzo l'LR Clonase<sup>™</sup> enzyme mix dal congelatore
- Agitare l'LR Clonase<sup>™</sup> enzyme mix due volte per due secondi
- Ad ogni campione aggiungere 4  $\mu$ L e miscelare
- Incubare la reazione a 25°C per un'ora
- Aggiungere 2  $\mu$ L di "proteinas K solution" ad ogni reazione
- Incubare per 10 minuti a 37°C

La trasformazione e la purificazione dei plasmidi necessari per i passaggi successivi vengono effettuati estraendo i plasmidi con FastPlasmid<sup>™</sup> Mini (Eppendorf) e trasformando le colonie batteriche competenti *E. coli* Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> e *E. coli* BL21-AI<sup>™</sup> inducendo shock termico come visto in precedenza.

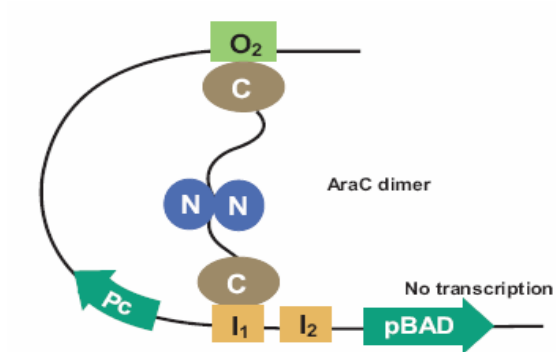
#### Espressione dei geni clonati

I vettori pDEST<sup>™</sup>15 e pDEST<sup>™</sup>24 sono caratterizzati dalla presenza del promotore della T7 RNA polimerasi a monte della regione che codifica per la fusione genica originata dalla ricombinazione.

L'enzima T7RNA polimerasi è presente nelle cellule di *E. coli* BL21-AI<sup>™</sup> One Shot<sup>®</sup> e si trova sotto il promotore *araBAD* che è regolato sia positivamente sia negativamente dal prodotto del gene *araC*.

La proteina AraC è un fattore trascrizionale attivo dopo la formazione di un complesso con lo zucchero L-arabinosio.

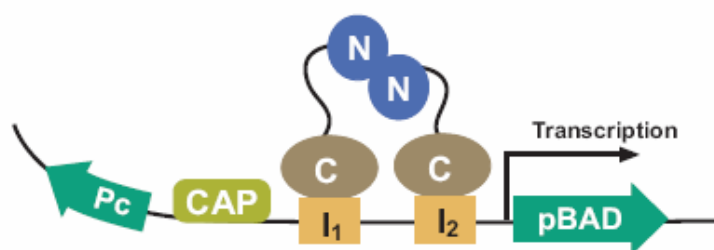
In assenza di L-arabinosio un dimero AraC lega i siti  $O_2$  e  $I_1$  dell'operone *araBAD* formando un loop di 210 paia di basi che inattiva la trascrizione genica (Fig. 26).



**Figura 26: Operone *araBAD* represso da assenza di arabinosio**

Per l'espressione del gene T7 polimerasi sono necessari due eventi:

- L-Arabinosio lega il dimero AraC che si stacca dal sito  $O_2$  e lega il sito  $I_2$  adiacente al sito  $I_1$ . Il distacco dal sito  $O_2$  permette la distensione del loop e l'inizio della trascrizione
- Il complesso cAMP activator protein (CAP)-cAMP lega il DNA inducendo il legame di AraC con le sequenze  $I_1$ - $I_2$  (fig. 27) ed aumentando la trascrizione basale.



**Figura 27: Operone *araBAD* indotto da di-arabinosio**

L'espressione basale della T7 polimerasi indotta da L-arabinosio può essere repressa aggiungendo glucosio nel terreno di crescita. Il glucosio agisce diminuendo i livelli di cAMP che, quindi, riducono la quota di proteina CAP che si lega al promotore *araBAD*.

I ceppi di *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> replicano e mantengono stabilmente i vettori pDEST<sup>TM</sup>, ma non possiedono il sistema di sintesi della T7 RNA Polimerasi indotto da arabinosio. Per questo motivo i plasmidi ricombinanti sono inseriti in *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>, replicati e riestratti per trasformare *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> One Shot<sup>®</sup> che possiede il sistema di attivazione della T7 RNA Polimerasi, ma non è in grado di mantenere stabilmente per lungo tempo i plasmidi.

#### Monitoraggio dell'espressione

Dopo aver purificato i plasmidi e aver trasformato un clone di *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> One Shot<sup>®</sup> per ogni tipo di vettore, è stato necessario indurre la sintesi delle proteine monitorando la produzione nel tempo per verificare le migliori condizioni di espressione.

In questa fase è stato preferibile utilizzare come antibiotico nei terreni colturali la carbenicillina al posto dell'ampicillina perché è stabile per un tempo superiore, ciò consente una migliore selezione delle cellule trasformate e una più alta espressione proteica.

Protocollo:

- Per ogni piastra di BL21-AI<sup>TM</sup> One Shot<sup>®</sup> selezionare 3 o 4 colonie e crescerle in 5 mL di LB + carbenicillina 50  $\mu$ g/mL a 37 °C in agitazione (200 rpm) fino al raggiungimento di un O.D.<sub>600</sub> compresa tra 0.6 e 1.0.
- Diluire la coltura in 5 mL di terreno LB fresco + carbenicillina 50  $\mu$ g/ml fino ad una O.D.<sub>600</sub> compresa tra 0.05 e 0.1 in modo che la coltura arrivi in breve tempo alla fase logaritmica di crescita.
- Far crescere la coltura a 37 °C in agitazione (200 rpm) per 2 – 3 ore, fino al raggiungimento di un O.D.<sub>600</sub> di circa 0.4.
- Suddividere ogni coltura in due sub-culture uguali e aggiungere L-arabinosio fino ad una concentrazione finale di 0.2% (p/v) ad una delle due sub-culture in modo da ottenere una coltura indotta e una non indotta di controllo.

- Prelevare 500  $\mu$ L di coltura, centrifugare a 13000 rpm per 30 sec ed eliminare il supernatante.
- Incubare le colture rimanenti a 37 °C in agitazione (200 rpm) per 4 – 5 ore.
- Ad ogni ora di incubazione prelevare 500  $\mu$ L di ciascuna coltura, centrifugare a 13000 rpm per 30 sec ed eliminare il supernatante fino al termine del volume.
- Conservare i pellet ottenuti a –20 °C.
- Per ogni clone si ottengono, ad ogni ora di incubazione, due pellet di cui in uno è stata indotta espressione.

Per l'analisi dell'espressione sono stati dapprima scongelati i pellet, poi sospesi in 80  $\mu$ L di buffer di caricamento per gel elettroforesi (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerolo, 2%  $\beta$ -mercaptoetanololo, 0.1% blu di bromofenolo, 0.2% SDS) e in seguito sonicati brevemente. Infine i campioni sono stati portati a 90-95°C per 5 minuti, centrifugati per 2-3 minuti alla massima velocità e del lisato sono stati caricati 10-15  $\mu$ L per ogni pozzetto di un SDS-PAGE.

#### 2.4 Purificazione delle proteine

I plasmidi pDEST™ 15 e pDEST™ 24 sono stati costruiti per l'espressione ad alti livelli di proteine chimeriche che hanno una porzione dell'enzima glutatione-S-tranferasi (GST) di *Schistosoma japonicum*.

Le fusioni di proteine con GST possono essere facilmente purificate da lisati batterici in cromatografia di affinità utilizzando Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences).

La matrice sulla quale avviene la cromatografia è una resina di sefariosio coniugata al glutatione. L'enzima GST lega selettivamente il glutatione della resina mentre la parte dell'estratto non legata viene eliminata dai lavaggi della resina.

La GST-proteina è recuperata dopo eluizione della resina con una soluzione di glutatione ridotto libero che si sostituisce alla resina staccando la proteina dalla matrice solida.



### Preparazione della resina

Protocollo:

- Agitare gentilmente la bottiglia per risospendere la resina.
- Prelevare 1.33 mL di resina (pari a 1 ml di resina necessaria alla purificazione di 4 mg di proteina potenzialmente contenute in 500 ml di coltura).
- Centrifugare a 500 rpm per 5 minuti per sedimentare la resina ed eliminare il supernatante.
- Lavare la resina con 20 mL di PBS 1X.
- Centrifugare a 500 rpm per 5 minuti per sedimentare la resina ed eliminare il supernatante.
- Aggiungere 1 mL di PBS 1X.
- Si ottengono 2 mL di resina 50%.

### Estrazione delle proteine da coltura batterica

Protocollo:

- Prelevare 250 mL di sospensione batterica.
- Centrifugare la coltura a 5000 rpm per 5 min ed eliminare il supernatante.
- Risospendere il pellet in 50 mL di Lysis Buffer (50 mM Tris pH 8, 5mM EDTA, 10% glicerolo, 0.5% NP40, 50 mM NaCl).
- Aggiungere 1 pastiglia di *Complete*<sup>TM</sup> (Roche) e DTT 1 mM.
- Sonicare la sospensione 4 volte in ghiaccio per 20 sec con intervallo di 1 min fra ogni ciclo.
- Centrifugare il lisato a 10000 rpm per 10 min.
- Trasferire il supernatante in un tubo da centrifuga da 50 mL.

### Purificazione in batch

Protocollo:

- Aggiungere 2 mL di resina 50% all'estratto proteico.
- Incubare l'estratto sotto lenta agitazione a 4 °C overnight.

- Centrifugare a 500 rpm per 5 minuti per sedimentare la resina ed eliminare il supernatante.
- Lavare la resina con 20 mL di PBS 1X.
- Centrifugare a 500 rpm per 5 minuti ed eliminare il supernatante.
- Ripetere il lavaggio altre 2 volte e centrifugare.
- Trasferire la resina in un tubo da centrifuga da 15 mL.

### Eluizione

#### Protocollo:

- Alla resina sedimentata aggiungere 1 mL di Glutathione Elution Buffer (10 mM glutathione ridotto, 50 mM Tris HCl, pH 8) e risospendere il gel.
- Incubare a temperatura ambiente per 30 min in agitazione.
- Centrifugare a 500 rpm per 5 minuti per sedimentare la resina.
- Trasferire il supernatante, contenente la proteina purificata in un tubo da centrifuga da 1.5 mL e conservare a 4 °C.
- Ripetere per altre 4 – 5 volte le eluizioni.

Le eluizioni sono riunite e concentrate dopo centrifugazione in Centricon Centrifugal Filter Devices.

Le proteine Cry1Ab e EPSPS così purificate e concentrate sono state spedite alla Moravian Biotechnology (Brno, Rep. Ceca) per la generazione degli anticorpi monoclonali corrispondenti. In particolare, per i saggi sviluppati con l'ELISA Reverse si sono utilizzati gli tali anticorpi (Tabella II).

| <b>Monoclonal<br/>Abs num.</b> | <b>Protein target</b> | <b>Hybridoma<br/>cell line</b> |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| CP4EPSPS 1.1                   | CP4EPSPS              | 7F5                            |
| CP4EPSPS 1.2                   | CP4EPSPS              | 7F5                            |
| CP4EPSPS 2.1                   | CP4EPSPS              | 4G1                            |
| CP4EPSPS 2.2                   | CP4EPSPS              | 4G1                            |
| CP4EPSPS 3.1                   | CP4EPSPS              | 4E11                           |
| CP4EPSPS 3.2                   | CP4EPSPS              | 4E11                           |
| CP4EPSPS 4.1                   | CP4EPSPS              | 2E1                            |
| Cry1Ab 1.1                     | Cry1Ab                | 1C8                            |
| Cry1Ab 1.2                     | Cry1Ab                | 1C8                            |
| Cry1Ab 2.1                     | Cry1Ab                | 4A1                            |
| Cry1Ab 2.2                     | Cry1Ab                | 4A1                            |
| Cry1Ab 3.1                     | Cry1Ab                | 4B2                            |
| Cry1Ab 3.2                     | Cry1Ab                | 4B2                            |

**Tabella II. Elenco degli anticorpi ottenuti.**

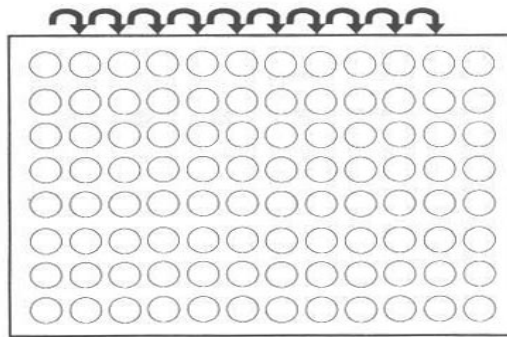
### **3 Metodiche immunologiche classiche applicate per la valutazione degli anticorpi**

#### 3.1 ELISA indiretto

Test ELISA indiretti sono stati allestiti per verificare la capacità e la sensibilità degli anticorpi contro CP4-EPSPS e Cry1Ab, rispettivamente.

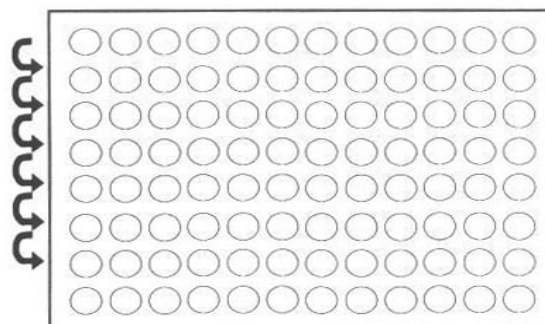
Protocollo:

- Riempire con 50  $\mu$ L di PBS (coating buffer) tutti i pozzetti di una piastra da 96 pozzetti.
- Ogni colonna della piastra viene caricata con una diluizione seriale 1:2 di proteina partendo da una concentrazione iniziale dell'ordine di 150  $\mu$ g/mL. La 12<sup>a</sup> colonna è invece stata lasciata vuota e utilizzata come controllo negativo (fig 28).



**Figura 18: Schema delle diluizioni di antigene dalla colonna 1 alla colonna 11**

- Incubare la piastra a 37 °C per 2 ore o overnight a 4°C
- Lavare per 2 - 3 volte la piastra con 200 µL di PBS
- Aggiungere ad ogni pozzetto 50 µL di blocking buffer (PBS, 5% BSA)
- Aggiungere ad ogni riga della piastra 50 µL di una diluizione seriale 1 : 2 di anticorpo da testare partendo da una concentrazione iniziale di 2 µg/mL in PBS, 5% (p/v) di latte scremato in polvere (blocking buffer) (fig. 29)



**Figura 29: Schema delle diluizioni di anticorpo primario**

- Incubare la piastra a 37 °C per 1 ora
- Lavare per 2 - 3 volte la piastra con 200 µL di PBS

Lo sviluppo della reazione è stato eseguito aggiungendo 50 µl di anticorpo secondario diluito 1 : 2500 coniugato a perossidasi di rafano, che riconosce la regione costante degli anticorpi di topo (Anti-mouse IgG HRP Linked, Amersham Bioscience).

- Incubare la piastra a 37 °C per 1 ora
- Lavare per 2 - 3 volte la piastra con 200 µL di PBS
- Aggiungere 50 µL di color reagent (SDI kit) e incubare a temperatura ambiente per 20 minuti
- Aggiungere 50 µL di stop reagent (SDI kit)
- Leggere l'assorbanza allo spettrofotometro a  $\lambda = 450$  nm (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad)

### 3.2 Elettroforesi in gel di poliacrilammide

La sensibilità con cui gli anticorpi anti-CP4-EPSPS e Cry1Ab riconoscono diverse quantità di bersaglio è stata valutata anche tramite western-blotting.

Quest'indagine prevede dapprima la separazione delle proteine di un estratto cellulare con un gel elettroforesi. L'elettroforesi in gel di poliacrilammide permette di separare proteine di diverse dimensioni grazie alla resistenza che queste incontrano nell'attraversare le maglie del gel quando sottoposte ad un campo elettrico. La concentrazione di acrilammide determina le dimensioni dei pori della maglia del gel, la concentrazione di acrilammide utilizzata per queste analisi è del 10%.

#### Gel non denaturante

L'elettroforesi in condizioni non denaturanti è stata utilizzata per verificare l'efficienza del riconoscimento delle due proteine. In condizioni non denaturanti la proteina mantiene la conformazione nativa e la mobilità dei polipeptidi dipende non solo dalla dimensione, ma anche dalla struttura e dalla carica elettrica netta.

La scelta del buffer di corsa da utilizzare dipende dal punto isoelettrico della proteina che si vuole evidenziare. Nel nostro caso è stato scelto un buffer fosfato con pH tra 5.2 e 8.0 in quanto, per esempio, il punto isoelettrico di CP4-EPSPS è di circa 5.4.

Preparazione del gel

- Preparare la soluzione di poliacrilammide in un tubo da centrifuga Falcon da 50 mL secondo le seguenti proporzioni per la preparazione di un gel 10%:

|  | Conc. finale | mL    |
|--|--------------|-------|
| 30% acrilammide/0.8% bis-acrilammide                 | 10%          | 13.3  |
| Buffer fosfato 4X, pH 5.8-8.0 (400 mM sodio fosfato) | 1 X          | 10.0  |
| 10% (p/v) ammonio persolfato (APS)                   | 0.05%        | 0.2   |
| TEMED  | 0.005%       | 0.02  |
| H <sub>2</sub> O                                     | a volume     | 16.48 |
| Volume finale  |              | 40    |

Preparazione dei campioni e corsa del gel

Per ogni analisi sono stati caricati nei pozzetti del gel diverse quantità di proteina (1000 ng, 100 ng, 20 ng) in modo da ottenere un ampio intervallo di valori che permettesse di rilevare la proteina anche nel caso in cui l'anticorpo avesse scarsa affinità con il target.

Nei pozzetti rimanenti sono stati caricati un marcatore di corsa (blu di bromofenolo) per verificare l'andamento dell'elettroforesi e 6 µg di Albumina di Siero Bovino (BSA) come controllo dell'avvenuto passaggio sulla membrana di nitrocellulosa durante il trasferimento delle proteine necessario per la tecnica western blot.

Ogni campione viene diluito in una soluzione di saccarosio 5% (p/v) in acqua per aumentarne la densità della soluzione e caricato nei pozzetti (volume totale 10-15µL).

La corsa avviene in buffer di corsa fosfato 1X (100 mM di sodio fosfato, pH 5.8-8) a 15 mA e interrotta dopo 1-2 ore fino a quando il marker di corsa raggiunge il fondo del gel.

Gel denaturante

L'elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) permette di separare le proteine in base al peso molecolare.

La presenza di un detergente anionico (Sodio Dodecil Solfato, SDS) che si lega alle proteine permette di annullare le cariche positive facendo assumere alla molecola una carica uniforme negativa.

In questo caso le proteine migrano unicamente in base alla loro dimensione.

### Preparazione del gel

Dopo aver assemblato i vetrini per il gel, lo spazio tra i due viene riempito con una soluzione di poliacrilammide 10% contenente:

| Running Gel                                      | Conc. finale | mL   |
|--|--------------|------|
| 30% acrilammide/0.8% bis-acrilammide             | 10%          | 5.00 |
| 4X Tris-Cl/SDS, pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS) | 1 X          | 3.75 |
| 10% (p/v) ammonio persolfato (APS)               | 0.33%        | 0.05 |
| TEMED  | 0.066%       | 0.01 |
| H <sub>2</sub> O                                 | a volume     |      |
| Volume finale                                    |              | 15   |

- Una volta aggiunto l'APS e il TEMED, versare immediatamente la soluzione (running gel) nello spazio fra i vetrini fino a riempire i 2/3 del volume
- Per livellare uniformemente il gel aggiungere lentamente acqua o isopropanolo fino al riempimento completo dello spazio rimanente.
- Dopo la polimerizzazione del gel (30 minuti circa), eliminare l'acqua e riempire con la soluzione di "stacking gel" contenente:

| Stacking gel                                      | Conc. finale | mL    |
|---|--------------|-------|
| acrilammide 30% /bis-acrilammide 0.8%,            | 3.9%         | 0.65  |
| Tris-Cl/SDS 4 X (0.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS) pH 6.8, | 1 X          | 1.25  |
| APS 10%,  | 0.5%         | 0.025 |

|                  |          |       |
|------------------|----------|-------|
| TEMED.           | 0.1%     | 0.005 |
| H <sub>2</sub> O | a volume |       |
| Volume finale    |          | 5.0   |

La presenza dello stacking gel consente la formazione dei pozzetti dopo aver introdotto un pettine prima della polimerizzazione e di compattare i campioni all'inizio della corsa vera e propria in modo da migliorare la risoluzione delle bande.

#### Preparazione dei campioni

- Diluire i campioni in SDS-PAGE sample buffer 1X (0.0625 M TrisHCl pH 6.8, glicerolo 10%, 2-mercaptoetanololo 2%, blu di bromofenolo 1% (p/v), SDS 2%).
- Denaturare i campioni per 5 min a 95°C e centrifugare per un minuto a 13000 rpm.
- Caricare 10-15 µL di campione per ogni pozzetto.
- Sospendere il marker di corsa liofilizzato (BluRanger™ Prestained Marker, Pierce) in 10 µL di acqua distillata e caricarlo in uno dei pozzetti del gel.

#### Condizioni di corsa

La corsa viene effettuata a 25 mA in buffer di corsa (25 mM Tris, 250 Mm glicina, 0.1% SDS) per circa un'ora fino a quando il marker di corsa blu arriva al termine del gel.

#### Visualizzazione e conservazione del gel

Protocollo:

- Dopo la fine della corsa elettroforetica, il gel viene recuperato e immerso in Comassie Blu (Simply Blu™ Safe Stain, Invitrogen) per un'ora, fino alla comparsa delle bande colorate.
- Eliminare il colorante in eccesso e immergere il gel in acqua per 1 - 2 ore per decolorare il gel e migliorare la risoluzione dell'immagine.
- Nel caso si voglia conservare il gel è necessario disidratarlo ponendolo tra due fogli di cellophane e lasciandolo due ore a 80°C sottovuoto (Gel-Dry, Biorad).



### 3.3 Western blotting

La tecnica Western blotting (o protein blotting) consente l'identificazione di una proteina all'interno del campione in esame. Dopo la separazione delle proteine presenti nel campione tramite corsa elettroforetica su gel di acrilammide, le proteine vengono trasferite su membrana. Il riconoscimento della proteina di interesse avviene mediante un anticorpo che lega selettivamente il target.

#### Trasferimento del campione su filtro di nitrocellulosa dopo corsa elettroforetica non denaturante

Al termine della corsa elettroforetica, il gel di poliacrilammide viene recuperato smontando l'apparecchio per la corsa, separando con cautela i vetrini.

All'interno dell'apparecchio per il trasferimento, viene allestito un "sandwich" orientato dal polo negativo al polo positivo e contenente nell'ordine:

- spugna
- due strati di carta assorbente 3M
- gel
- filtro di nitrocellulosa
- due strati di carta assorbente 3M
- spugna

Dopo aver montato e posizionato correttamente il "sandwich" nella cassetta, esso viene immerso nel buffer di corsa (200 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanolo) e applicata la corrente.

Il trasferimento avviene in condizioni tali per cui la proteina rimanga quanto più possibile nella sua conformazione nativa quindi è effettuato a 4°C ad un'intensità di 11 mA over-night.

#### Trasferimento del campione su filtro di nitrocellulosa dopo corsa elettroforetica denaturante

Terminata la corsa elettroforetica dal gel si elimina la porzione di stacking.

Per il trasferimento viene utilizzato il "Semi-Dry Elettroblotting Unit" (SIGMA ALDRICH) che consente il trasferimento rapido delle proteine già denaturate.

Viene costituito un nuovo “sandwich” sempre con orientamento anodo-catodo contenente nell’ordine:

- due strati di carta assorbente 3M imbevuta di buffer di trasferimento (0.04 M glicina, 10 mM Tris, 20% metanolo, 0.4% SDS)
- filtro di nitrocellulosa
- gel
- due strati di carta assorbente 3M imbevuta di buffer di trasferimento

Lo strumento viene chiuso e collegato alla corrente di intensità pari al prodotto dell’area del gel per 0.8.

Il trasferimento avviene in 20 - 30 minuti circa a temperatura ambiente.

#### Blocking

La membrana di nitrocellulosa ha come caratteristica la capacità di legare indistintamente tutte le proteine, pertanto dopo il trasferimento del campione è necessario saturare i legami rimasti liberi immergendola in una soluzione di TBS-T (0.1 M NaCl, 0.2 M TrisHCl pH 7.6, 0.1% Tween 20) contenente il 5% (p/v) di latte scremato in polvere per 30 - 60 minuti a temperatura ambiente. In questo modo si satura completamente la membrana e si riduce fortemente la possibilità di generare un segnale aspecifico.

Infine il filtro viene rapidamente lavato con TBS-T.

#### Incubazione con anticorpo primario

L’anticorpo specifico per la proteina da identificare viene diluito in TBS-T + il 5% (p/v) di latte scremato in polvere fino ad una concentrazione di 1 - 5 µg/mL.

L’incubazione avviene sotto agitazione per un’ora a temperatura ambiente o over-night a 4°C avendo cura che la soluzione ricopra uniformemente il filtro.

Si rimuove l’eccesso di anticorpo primario lavando il filtro per 2 o 3 volte con TBS-T per 10 - 15 minuti a temperatura ambiente.

### Incubazione con anticorpo secondario

L'anticorpo secondario utilizzato (Anti-mouse IgG HRP Linked, Amersham Bioscience) riconosce le regioni costanti degli anticorpi di topo; esso si trova in forma coniugata con una perossidasi di rafano (HRP) che consente l'identificazione delle proteine ad esso legate.

- Diluire l'anticorpo secondario in proporzione 1 : 10.000 in TBS-T.
- Incubare il filtro per 30 – 60 minuti a temperatura ambiente.
- Lavare il filtro per 2 o 3 volte con TBS-T per 10 – 15 minuti a temperatura ambiente.

### Sviluppo del segnale

Il sistema di sviluppo del segnale utilizzato (ECL Plus Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences) consente l'identificazione del complesso coniugato all'anticorpo-HRP dopo ossidazione del 1,2-diacilidrazide ciclico-luminolo (Lumigen PS-3).

La reazione, catalizzata dalla perossidasi, forma un estere di acridinio che in presenza di perossidi si degrada emettendo un segnale luminoso che impressiona una lastra autoradiografica.

Protocollo:

- Aggiungere la soluzione A alla soluzione B, fornite con il kit, in proporzione 1:40 per un volume finale pari a 0.1 mL/cm<sup>2</sup> di filtro.
- Disporre uniformemente la soluzione sulla membrana e incubare per 5 minuti.
- Eliminare l'eccesso di liquido e inserire il filtro, protetto da carta da lucido, in una cassetta per esposizione.
- In camera oscura, esporre il filtro ad una lastra fotografica per 10 secondi.
- Immergere la lastra fotografica nella soluzione di sviluppo diluita 1:10 (Dental x-ray developer, Kodak) fino alla comparsa di un'immagine distinta.
- Lavare la lastra con acqua e immergerla in soluzione di fissaggio diluita 1:10 (Dental x-ray fixer, Kodak).
- Sciacquare nuovamente la lastra con acqua.
- Asciugare la lastra.

- Esporre nuovamente la membrana ad una o due nuove lastre per un tempo superiore (da 30 secondi a 2 minuti circa) per ottenere la migliore qualità di immagine.
- Ripetere i passaggi di sviluppo e fissaggio delle lastre.

#### Riutilizzo delle membrane

Le membrane utilizzate per una prima analisi possono essere riutilizzate per altre analisi con anticorpi differenti.

Per far questo è necessario rimuovere gli anticorpi primari e secondari legati alla membrana durante il primo saggio. In questo modo le membrane nuovamente libere possono essere riutilizzate.

#### Protocollo di riutilizzo (stripping)

- Immergere la membrana nello stripping buffer (100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM TrisHCl pH 6.7) e incubare a 30°C per 30 minuti in agitazione
- Lavare la membrana due volte per 10 minuti con TBS-T a temperatura ambiente
- Blocking delle membrane per 30 - 60 minuti con TBS-T + 5% (p/v) di latte scremato in polvere
- Ripetere i passaggi per l'identificazione delle proteine visti in precedenza

### **4 Tecnologia xMAP™, Luminex®**

#### 4.1 Saggio immunoenzimatico

Il saggio immunoenzimatico è stato sviluppato e condotto sia per la quantificazione di Cry1Ab che di CP4EPSPS nelle modalità qui descritte.

La messa a punto di un protocollo Luminex è composto da tre passaggi fondamentali:

1. reazione di legame fra microsferi ed anticorpi primari (capture probe)
2. reazione di biotinilazione degli anticorpi secondari (detector probe)
3. esecuzione del saggio



Una volta che le sonde sono state legate alle microsfere si passa all'esecuzione del saggio che prevede l'incubazione delle microsfere con il campione in esame.

Durante questa prima incubazione si forma un complesso microsfera-anticorpo primario-target.

Per la quantificazione del target è necessario utilizzare un anticorpo secondario che porta una seconda marcatura fluorescente. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati biotinilati e attraverso un'incubazione con streptavidina-ficoeritrina è stata ottenuta la marcatura secondaria.

#### ***Anticorpi coniugati alla biotina (secondari)***

**CP4EPSPS:** 97AD17, 97R4.1, 97AD13A.2

**Cry1Ab:** 113L2.2

Al termine delle incubazioni si è così formato nel campione un complesso microsfera-anticorpo primario-target-anticorpo secondario biotinilato- ficoeritrina successivamente iquantificato.

#### **Attivazione dei siti carbossilici**

Protocollo:

- Sospendere e sonicare le microsfere.
- Prelevare  $5 \times 10^6$  microsfere e lavarle con 100  $\mu$ L di acqua distillata.
- Centrifugare le microsfere a oltre 8000 rpm per 1 - 2 minuti.
- Eliminare il supernatante e risospendere le microsfere in 80  $\mu$ L di fosfato di sodio monobasico 100 mM, pH 6.3.
- Risospendere e sonicare per 15 - 30 sec.
- Aggiungere 10  $\mu$ L di Sulfo-NHS 50 mg/ml in acqua distillata e risospendere.
- Aggiungere 10  $\mu$ L di 1-Ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 50 mg/ml (diluito in acqua distillata) e risospendere le microsfere.
- Incubare al buio per 20 min a temperatura ambiente in agitazione.

- Centrifugare le microsfere centrifugando a oltre 8000 rpm per 1 - 2 minuti, eliminare il supernatante e lavare due volte con 2-(N-Morphilino) etansulfonato (MES), 50 mM, pH 5.0 - 6.0.
- Risospendere in 100  $\mu$ L di MES 50 mM, pH 5.0 - 6.0, sonicare per 15 - 30 sec.

#### Reazione di coupling microsfere-anticorpi primari

Prima di poter essere utilizzati, gli anticorpi primari devono essere dializzati in PBS (10 mM fosfato di sodio monobasico, 150 mM NaCl, pH 7.4) in modo da allontanare la sodioazide presente nella soluzione di conservazione.

Protocollo:

- Aggiungere una quantità ottimale di anticorpo primario (1, 5, 25 o 125  $\mu$ g) in 400  $\mu$ L di MES 50 mM, pH 5.0 - 6.0
- Incubare al buio per 2 ore in agitazione a temperatura ambiente
- Centrifugare le microsfere centrifugando a oltre 8000 rpm per 1 - 2 minuti, eliminare il supernatante e risospendere in 250 – 1000  $\mu$ L di PBS-TBN (PBS + 0.02% Tween 20, 0.1% BSA, 0.02% azide)
- Incubare al buio per 30 min in agitazione a temperatura ambiente
- Lavare due volte con 1 mL di PBS-TBN
- Risospendere in 250 – 1000  $\mu$ L di PBS-TBN

#### Biotinilazione degli anticorpi secondari

Prima di iniziare la reazione di biotinilazione gli anticorpi secondari vengono dializzati overnight a 4°C in bicarbonato di sodio 0.1 M, pH 8.5 - 9.0 per rimuovere la sodioazide.

La biotina è una molecola che si lega a residui amminici liberi, normalmente di lisina, sotto forma di N-idrossisuccinimide-biotina (NHS-biotina).

Protocollo:

- Diluire la soluzione madre di NHS-biotina in H<sub>2</sub>O microfiltrata fino alla concentrazione di 1 mg/mL al momento della preparazione degli anticorpi
- Diluire l'anticorpo in H<sub>2</sub>O fino alla concentrazione di 1 mg/mL

- Aggiungere la biotina (25 - 250  $\mu\text{g}$  di biotina per milligrammo di anticorpo, in genere se ne utilizzano 60  $\mu\text{g}$ )
- Agitare bene la soluzione e incubare per 4 ore a temperatura ambiente
- Dializzare in PBS per rimuovere la biotina in eccesso over night a 4°C.

#### Preparazione dei campioni per il saggio Luminex

I campioni di farina e mais vengono sospesi nel buffer di estrazione (Extraction buffer, Strategic Diagnostic Inc.). Per ogni campione si sono pesati 250 mg di farina di mais o 100 mg di farina di soia.

Protocollo:

- Aggiungere 1 mL di “Extraction Buffer” 1X e omogenare la sospensione.
- Incubare la sospensione per 15 - 30 min.
- Nel caso di estratti di soia, diluire la soluzione 1 : 300.
- Centrifugare a 5000 rpm per 15 min.
- Trasferire il sovrnatante in un tubo da centrifuga.
- Ad ogni pozzetto di una piastra multi-well da 96, aggiungere 40  $\mu\text{l}$  di lisato.
- Aggiungere 5000 microsfele coniugate all’anticorpo primario per ogni pozzetto. Nello specifico 40  $\mu\text{L}$  di PBS, 1% BSA contenenti 125 microsfele/ $\mu\text{L}$ .
- Incubare al buio per 20 minuti a temperatura ambiente
- Aggiungere ad ogni pozzetto 40  $\mu\text{L}$  di PBS, 1% BSA contenente l’anticorpo secondario concentrato 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Incubare la sospensione per 20 minuti al buio a temperatura ambiente sotto agitazione
- Aggiungere 20  $\mu\text{L}$  di streptavidina-ficoeritrina (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS + 1% BSA) e incubare i campioni sempre mantenendo al buio per altri 10 minuti.
- In ogni piastra sono presenti almeno tre pozzetti per i controlli negativi contenenti:
  - Microsfele + Anticorpo secondario + PBS, 1% BSA
  - Solo Microsfele + PBS, 1% BSA
  - Solo Anticorpo secondario + PBS, 1% BSA



La lettura al Luminex viene effettuata dopo aver specificato al sistema operativo diversi parametri quali: il tipo di microsfere utilizzato, il volume del campione (solitamente vengono impostati 100  $\mu$ L), il numero di microsfere da leggere (solitamente 100) e l'intervallo di fluorescenza da considerare nel quale si dovrebbe avere la massima risoluzione del segnale.

Per definire la concentrazione di anticorpo primario e secondario da utilizzare per il saggio Luminex si sono compiute le seguenti prove:

- Titolazione dell'anticorpo primario
- Titolazione dell'anticorpo secondario

#### Titolazione dell'anticorpo primario

Si sono testate 4 concentrazioni differenti di anticorpo primario da legare a  $5 \times 10^6$  microsfere per definire quale tra queste fosse la concentrazione ottimale, ovvero la minor concentrazione di anticorpo che garantisce il massimo di segnale.

Rispettivamente 1, 5, 25 e 125  $\mu$ g di anticorpo primario sono stati coniugati a quattro aliquote ciascuna di  $5 \times 10^6$  microsfere. La concentrazione di anticorpo secondario è stata tenuta costante a 4  $\mu$ g/mL.

Il test è stato effettuato su campioni di riferimento.

#### Titolazione dell'anticorpo secondario

Sono state testate 5 concentrazioni di differenti anticorpo secondario biotinilato da utilizzare: rispettivamente 0.5, 1, 2, 4 e 8  $\mu$ g/mL. La concentrazione di anticorpo primario è stata tenuta costante a 25  $\mu$ g.

Il test è stato effettuato su 9 diluizioni seriali 1 : 2 di un estratto proteico di una farina 100% OGM.

#### Saggio su proteina isolata

E' stato eseguito un test al Luminex sulla proteina CP4-EPSPS purificata.

Per aver un ampio spettro di valori l'analisi è stata eseguita su alcune diluizioni 1 : 10 della proteina partendo da una concentrazione molto elevata (100 µg/mL), corrispondente a circa 1000 volte quella contenuta in una farina 100% RuR.

E' stato eseguito inoltre un test sulla proteina Cry 1Ab partendo da una concentrazione di 0.55 µg/mL, ossia circa 5 volte superiore alla concentrazione contenuta in un estratto di farina 100% MON810.

### Dosaggio delle proteine

La quantificazione di proteine presenti in una soluzione è stata determinata attraverso lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 595 nm dopo incubazione con la soluzione di 1X Bradford (Bio-Rad Laboratories).

La quantificazione delle proteine sfrutta la capacità posseduta dai polipeptidi di legare molecole di rame, presenti nel liquido di Bradford, che assorbono la luce. Per quantificare correttamente il contenuto proteico di una soluzione a titolo ignoto è necessario costruire una curva di calibrazione utilizzando una serie di soluzioni a concentrazione proteica nota.

Protocollo:

- Si preparano cinque soluzioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota di 0; 1; 2; 5; 10 µg/mL con volume finale di 1 mL.
- Preparare i campioni da analizzare in un volume finale di 1ml, solitamente si preleva 1 µL di campione (fattore di diluizione 1:1000) .
- Costruire con l'utilizzo delle letture degli standard una curva di taratura. La concentrazione dei campioni ignoti si ottiene per estrapolazione dalla curva di calibrazione.

### 4.2 Saggio per acidi nucleici

Il saggio per acidi nucleici e' stato progettato per la messa in evidenza del promotore CMV p35S, solitamente presente nella maggior parte dei costrutti utilizzati per la generazione di linee di piante GM, e di CP4EPSPS presente in soia RUR, di cui e' nota la sequenza nucleotidica.

Per la messa a punto di un protocollo Luminex per acidi nucleici i passaggi fondamentali sono tre come per il saggio immunoenzimatico:

1. reazione di legame fra microsferi e le sonde (capture probe);
2. reazione di biotinilazione dei target tramite PCR (detector molecules);
3. esecuzione del saggio.

### Campioni

p35S e epsps sono entrambi presenti nel DNAG di soya RUR (Certified Reference Materials (CRMs) for genetically modified Roundup Ready soya beans ERM-BF410) L'estrazione di DNA dai campioni con 5% e 0% di soya RUR e' stata realizzata con il kit Wizard plus SV Minipreps DNA extraction kit, (Promega, Italia). Il DNA estratto e' stato immediatamente risospeso in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0) e quantificato con il sistema PicoGreen Dye for dsDNA quantification con Bio-Rad VersaFluor Fluorometer. L'amplificazione dei frammenti corrispondenti ai due target e' stata allestita utilizzando concentrazioni di 50-20-10-5 e 2.5 ng di DNAG, rispettivamente.

### Disegno delle sonde ed inneschi

Tutte le sonde ed inneschi sono state disegnate con la stessa lunghezza tra i 18 e i 24 nucleotidi. Gli inneschi sono stati scelti in modo da produrre cDNA lunghi dai 100 ai 300 nucleotidi. Uno dei due inneschi per coppia e' stato marcato con biotina in 5' in modo da poter utilizzare per lo sviluppo del segnale la streptavidina-ficoeritrina. Il filamento di cDNA che e' stato prodotto aveva cosi' un filamento marcato con biotina. Questo filamento di cDNA e' quello complementare alla sonda legata alla microsfera. Il legame tra sonda e microsfera e' reso possibile da un gruppo 5' ammino-modificato in C12 della sonda.

Oltre alle sonde ed agli inneschi sono state sintetizzate per entrambi i target delle anti-sonde da utilizzare come controlli positivi del saggio.

Sequenze (fig.30):

p35S Forward Primer 5'-cat tgc gat aaa gga aag gc-3';

p35S Reverse Primer 5'-biotinilato-gga tag tgg gat tgt gcg tc-3';

p35S Probe 5'-gcc tct gcc gac agt ggt cc-3';  
p35S Anti-probe 5'-biotinilato-gga cca ctg tcg gac gag gc-3';  
epsps Forward Primer 5'-cct tca tgt tcg gcg gtc tc-3';  
epsps Reverse Primer 5'-biotinilato-gca agg taa cgg gaa gac g-3';  
epsps Probe 5'-gat ggg ccg cgt gtt gaa-3';  
epsps Anti-probe 5' biotinilated-gtt caa cac gcg gcc cat c-3'.

#### Condizioni di amplificazione

La reazione di amplificazione era così composta: Taq 5 U/μL Roche, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 200 μM, Primers 50 nM per reazione in un volume finale di 25 μL per campione. Impostazione del termociclatore: denaturing step at 94°C per 5min seguito da 35 cicli a 94°C 30", 55°C 30", 72°C 45", infine 72°C per 7min. Tutti I campioni sono stati caricati in triplicato.

#### Visualizzazione dei prodotti di PCR

1 μL del prodotto di reazione per ogni campione è stato visualizzato tramite lo strumento Agilent Bioanalyzer Lab-on-chip DNA 500.

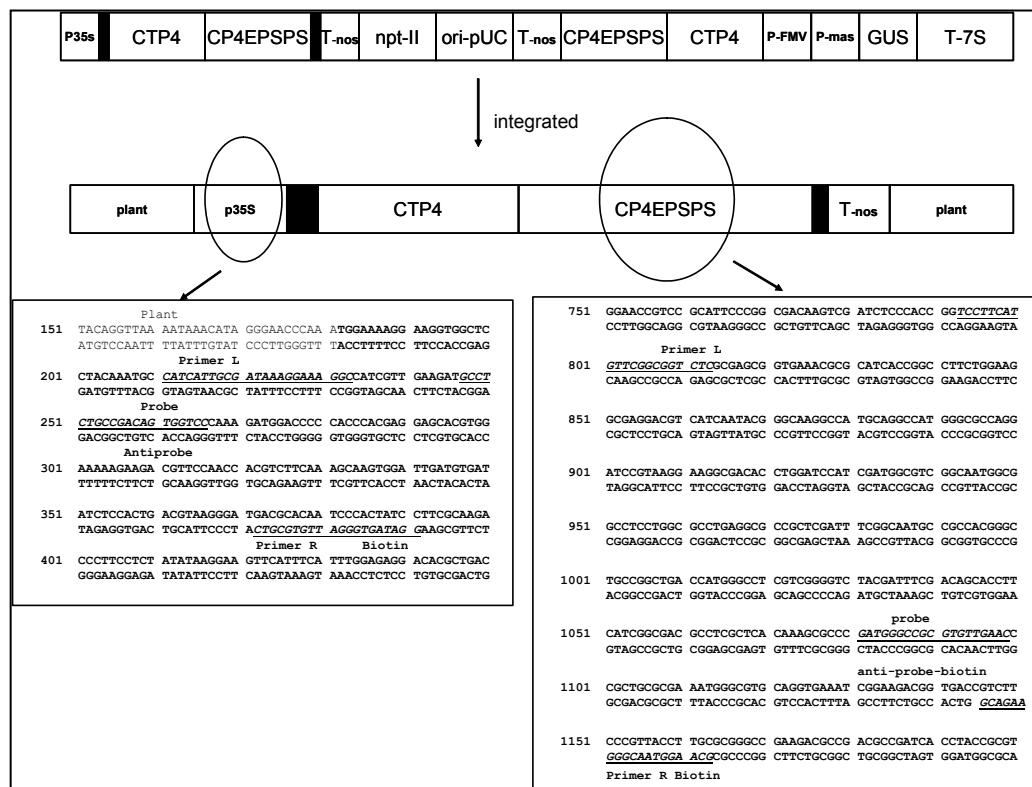


Figura 30. Struttura e sequenza del costrutto GTS40-3-2 integrato nel genoma di Soia Roundup Ready. Sequenza di giunzione tra il genoma della pianta/35S (EMBL accession #AJ308514 Cauliflower mosaic virus), genoma completo NC001497 e EPSPS costruito AY125353.

### Reazione di legame tra le sonde e le microsferi

Le microsferi del set Luminex N.152 sono state legate alla sonda specifica per p35S mentre le microsferi del set N.173 sono state legate alla sonda per epsps.

### Composizione dei Buffer

1. Coupling buffer: 0,1M Mes (2[N-Morpholino] ethanesulfonic acid, Sigma), pH 4,5.
2. Soluzione di lavaggio I: 0.02% Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma).
3. Soluzione di lavaggio II: 0,1% SDS (Lauryl sulfate, Sigma).
4. 20% Sarkosyl (N-Laurylsarcosine, Sigma).
5. Buffer per campioni: Tris-EDTA buffer 10 mM, pH 8.

6. 1,5 TMAC Soluzione di ibridazione: 5M TMAC (Sigma), 20% Sarkosyl, 1M Tris-HCl pH8, 0,5 M EDTA pH 8.

7. Soluzione di lavaggio: 20x SSPE (Phosphate buffer, pH7.4, sodium chlorite, EDTA, Sigma), Triton X-100 (Sigma).

Protocollo:

- prendere dell'EDC fresco e portarlo a T ambiente;
- la sonda deve essere sciolta in dH<sub>2</sub>O alla concentrazione di 1 mM (stock solution);
- sonicare per 20 sec il set di microsfere scelto;
- prelevare  $5 \times 10^6$  dallo stock e porle in un tubo da centrifuga nuovo quindi centrifugare per 2 min a 8000 rpm;
- Rimuovere il surnatante e aggiungere 50  $\mu$ L di 0,1 M MES pH 4,5 quindi sonicare per 20 sec;
- diluire la sonda 1:10 in dH<sub>2</sub>O (working solution);
- aggiungere 2  $\mu$ L di sonda alle microsfere e miscelare;
- preparare una soluzione 10 mg/mL di EDC in dH<sub>2</sub>O (fresca ogni volta);
- aggiungere 2,5  $\mu$ L della soluzione di EDC appena preparata alle microsfere e sonda, agitare ed incubare al buio per 30 min;
- preparare una seconda soluzione 10 mg/mL di EDC in dH<sub>2</sub>O (fresca ogni volta);
- aggiungere altri 2,5  $\mu$ L di EDC alle microsfere e ancora agitare ed incubare al buio per 30 min;
- aggiungere 1 mL di 0.02% di Tween-20 alle microsfere e centrifugare a 8000 rpm per 2 min;
- rimuovere il surnatante ed aggiungere 100  $\mu$ L di TE pH 8,0 quindi agitare e sonicare per 20 sec;
- diluire le microsfere 1:100 in dH<sub>2</sub>O;
- controllare l'effettivo numero delle microsfere al microscopio fluorescente utilizzando un vetrino conta cellule (Camera di Burkner);
- conservare le microsfere a 4°C al buio.

## Ibridazione tra microsfere+sonda e cDNA

### Protocollo

- Prendere lo stock di microsfere+sonda e risospenderle sonicandole per 20 sec;
- diluire un'aliquota di stock di microsfere a 150 microsfere/ $\mu$ L in 1.5 X TMAC quindi miscelare e sonicare per 20 sec;
- distribuire per ogni campione 33  $\mu$ L di questa soluzione;
- in tutti i controlli negativi (assenza di target) aggiungete 17  $\mu$ L di TE pH 8,0 per un volume finale complessivo di 50  $\mu$ L;
- in tutti i campioni da analizzare aggiungere da 5 a 200 femtomoli di prodotto di PCR (da 2 a 5  $\mu$ L del prodotto di PCR) e portare a volume di 50  $\mu$ L con TE pH 8,0, quindi mischiare;
- scaldare a 95°C per 1 - 3 min per permettere la denaturazione dei cDNA e quindi incubare a T ambiente per 15 min alla temperatura di ibridazione (solitamente dai 55 ai 60°C);
- preparare nel frattempo un' aliquota fresca di streptavidina – ficoeritrina 10  $\mu$ g/mL in 1X TMAC;
- aggiungere 25  $\mu$ L della soluzione appena preparata ad ogni campione, agitare e incubare per 5 min a temperatura ambiente al buio;
- analizzare i campioni al Luminex-100.

## **5 ELISA Reverse m&d**

### 5.1 Saggio immunoenzimatico

Tutti i test sono stati condotti su farine IRMM e standard commerciali.

La metodica dell'ER si compone di undici passaggi ognuno dei quali e' stato singolarmente ottimizzato per entrambi i target:

1. Sensibilizzazione delle ogive
2. Lavaggio
3. Blocking step
4. Lavaggio

5. Incubazione con il campione
6. Lavaggio
7. Incubazione con il coniugato
8. Lavaggio
9. Sviluppo del colore
10. Lettura spettrofotometrica
11. Interpretazione dei dati

Descrizione:

#### Sensibilizzazione

Per la sensibilizzazione di ogni singola ogiva, 100  $\mu$ L di coating buffer carbonato pH 9.6 contenente 10 ng/ $\mu$ L di anticorpo monoclonale per CRY1Ab o CP4EPSPS sono stati dispensati nei pozzetti di una micropiastre da 96. I tempi di incubazione possono variare da 1h a 37°C o tutta la notte a 4°C. Le concentrazioni di anticorpo primario testate sono state di: 5, 10, 20 e 40 ng/ $\mu$ L.

#### Lavaggio

Il lavaggio dei device avviene per immersione in PBST utilizzando un tubo da centrifuga Falcon da 50 mL. Il lavaggio viene ripetuto per 3 volte in tubi differenti con un volume minimo di 40mL di buffer.

#### Blocking step

Il blocking è stato eseguito incubando i device in 100  $\mu$ L di PBS, 1% BSA (in alternativa è possibile usare latte in polvere) per 2 ore a T ambiente.

#### Incubazione con il campione

In una micropiastre pulita, 100  $\mu$ L di campione (la concentrazione effettiva del target è ovviamente variabile a seconda della sensibilità del metodo) sono stati dispensati nei singoli pozzetti e messi in contatto con le ogive del device per 2 ore a T ambiente.



#### Incubazione con l'anticorpo secondario

L'anticorpo secondario marcato è stato nel frattempo dispensato in una nuova micropiastra in cui sono state immerse le ogive previo lavaggio.

#### Sviluppo del colore

Lo sviluppo del colore è stato ottenuto utilizzando 100 µL del substrato cromogeno commerciale TMB (Sigma) dispensato in una nuova micropiastra, in cui sono state immerse le ogive previo lavaggio. In presenza di HRP il substrato cromogeno produce una colorazione azzuro-bluastro in circa 15 minuti. La reazione è stata quindi fermata aggiungendo 100 µL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; con l'aggiunta della soluzione stoppante il campione vira immediatamente verso il colore giallo.

#### Lettura del segnale

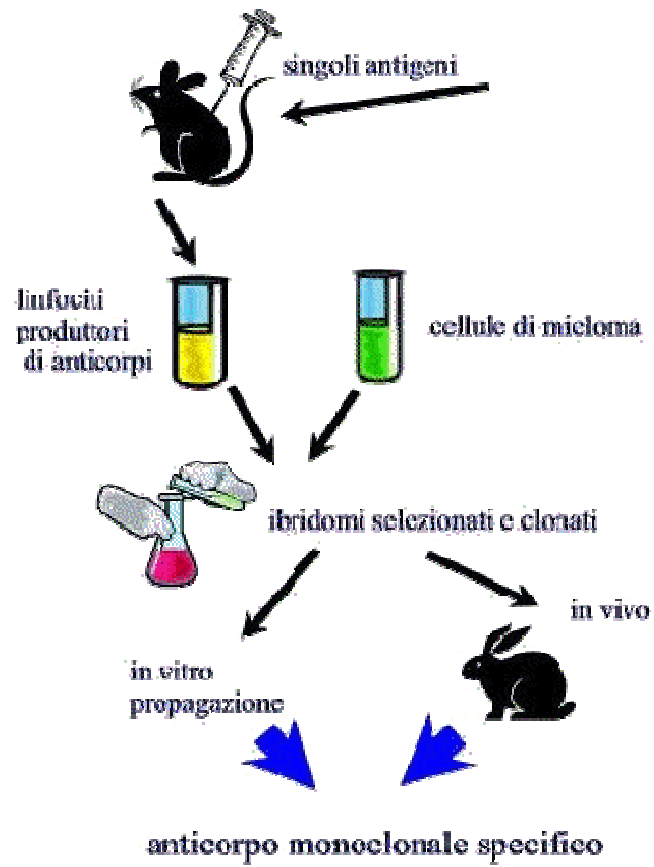
Si è eseguita la lettura spettrofotometrica dell'ultima micropiastra

Se il test è stato condotto in piastra è quindi possibile leggere un valore di assorbanza con un microplate reader (550 Bio-Rad) alla lunghezza d'onda di 450 nm.

#### Selezione degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi utilizzati per la messa a punto dei saggi basati sull'ER sono stati generati dalla Moravian Biotechnology. Le proteine purificate prodotte come descritto precedentemente furono spedite alla Moravian Biotechnology che ha così prodotto sette linee di "hybridoma cell lines" che producono anticorpi monoclonali contro la CP4EPSPS e sei che producono anticorpi contro Cry1Ab (vedi Tabella II e Schema III)

Per lo sviluppo dei test è stato utilizzato l'anticorpo CP4EPSPS 2.2 per la proteina EPSPS e CRY1Ab 2.1 per la proteina CRY1Ab. I surnatanti delle cellule di ibridoma (circa 50 mL per aliquota per linea cellulare) sono stati preventivamente purificati prima dell'allestimento del test. La purificazione è stata effettuata con colonnine da centrifuga Montage con Prosep-G (Millipore Cat. No. Lsk2abg60).



Schema III: Produzione di anticorpi monoclonali.

## IV RISULTATI

### I Espressione delle proteine CP4EPSPS e Cry1Ab

I risultati descritti in questo primo paragrafo sono da considerarsi preliminari per lo sviluppo dei protocolli di analisi innovativi che seguiranno.

#### 1.1 Qualità e quantità del DNAG

La qualità e quantità di DNA genomico utilizzato per il clonaggio del cDNA codificante per le proteine CP4EPSPS e Cry1Ab estratto dai campioni di mais e soia GM, come descritto in Materiali e Metodi, è riportato in figura 31 e nelle tabelle III e IV.

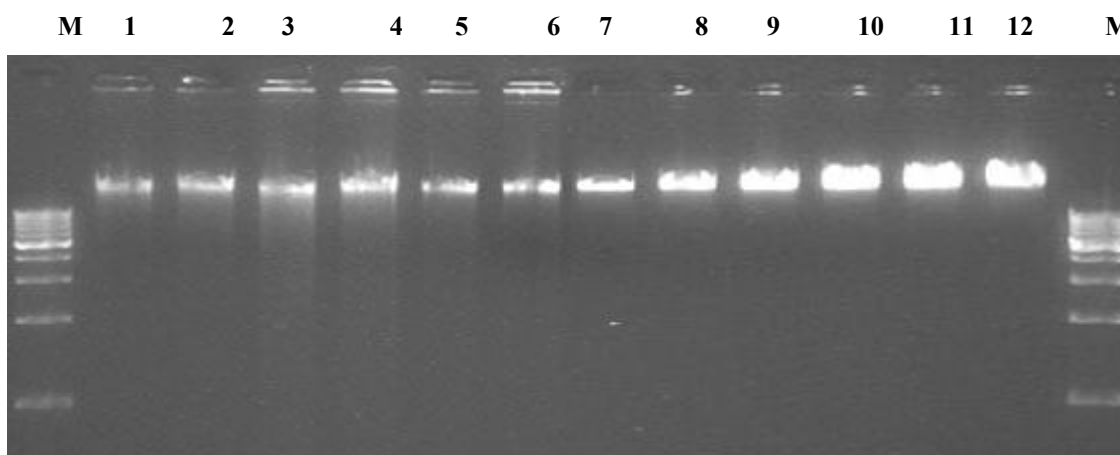
|                         | O.D.  | 260/280nm | ng/μL |
|-------------------------|-------|-----------|-------|
| <b>Mais 0% OGM</b>      |       |           |       |
| 1° campione             | 0,020 | 1.75      | 100,0 |
| 2° campione             | 0,030 | 1.85      | 150,0 |
| <b>Mais 100% Bt11</b>   |       |           |       |
| 1° campione             | 0,030 | 1.62      | 150,0 |
| 2° campione             | 0,022 | 1.47      | 110,0 |
| <b>Mais 100% MON810</b> |       |           |       |
| 1° campione             | 0,035 | 1.89      | 175,0 |
| 2° campione             | 0,037 | 1.67      | 185,0 |

**Tabella III: Quantità di DNA estratto da farine di mais, mais tradizionale, 100% mais Bt11 e mais MON810.**

|                      | O.D.  | 260/280nm | ng/ $\mu$ L |
|----------------------|-------|-----------|-------------|
| <b>Soia 0% RuR</b>   |       |           |             |
| 1° campione          | 0,062 | 1.62      | 310,0       |
| 2° campione          | 0,079 | 1.50      | 395,0       |
| 3° campione          | 0,044 | 1.73      | 220,0       |
| <b>Soia 100% RuR</b> |       |           |             |
| 1° campione          | 0,053 | 1.56      | 267,5       |
| 2° campione          | 0,049 | 1.83      | 245,0       |
| 3° campione          | 0,061 | 1.60      | 307,5       |

**Tabella IV: Quantità di DNA estratto dalle farine di soia tradizionale e RUR 100%.**

In generale, dai campioni di soia si sono ottenute quantità almeno 200 ng/ $\mu$ L o superiori, mentre dalle farine di mais la quantità estratta è risultata inferiore a 150 ng/ $\mu$ L (circa). L'integrità del materiale estratto è stata valutata visualizzando il DNAg su di un gel di agarosio al 1% (Fig. 31).

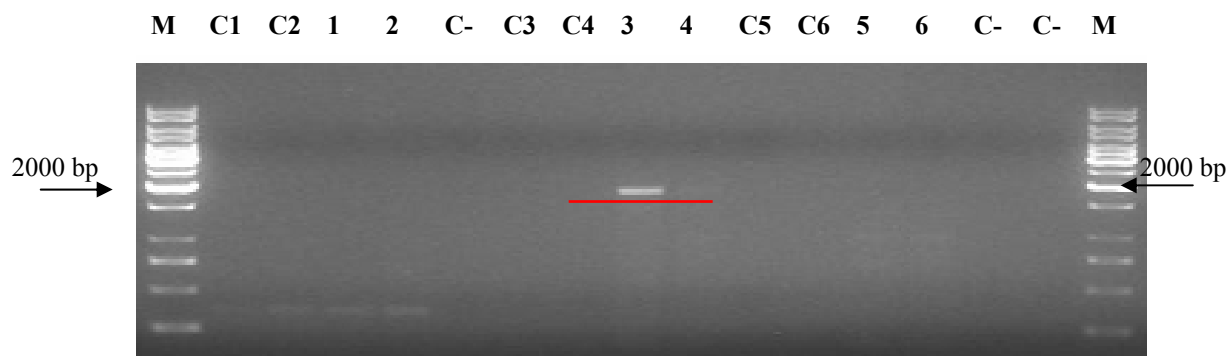


**Figura 31: DNAg estratti da farine. M: Molecular Weight Marker 1Kb. 1-2: Mais 0% OGM. 3-4: Mais MON810. 5-6 Mais Bt11. 7-9: Soia 0% OGM. Corsie 10-12: Soia 100% Roundup Ready®**

Il materiale estratto visualizzato su gel di agarosio è risultato integro e pertanto utilizzato per le reazioni di amplificazione.

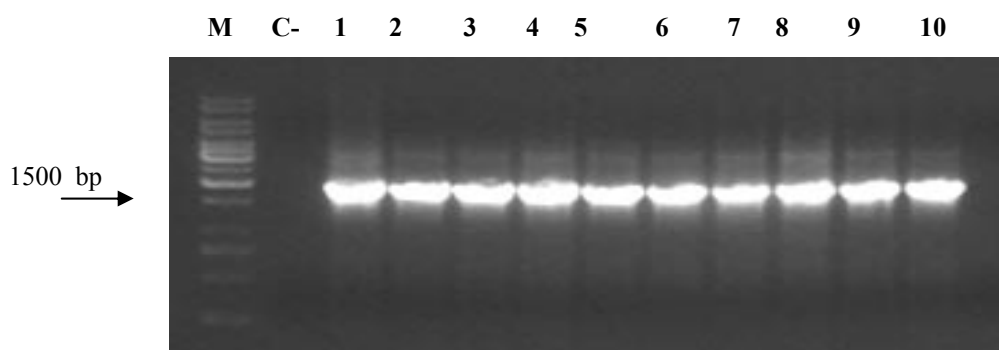
### 1.2 Amplificazione dei cDNA codificanti CP4EPSPS e Cry1AB

I prodotti di PCR sono stati anch'essi visualizzati su gel di agarosio come mostrato in figura 32.



**Figura 32: Prodotti PCR. M: Molecular Weight Marker 1Kb. C1-C2: soia 0% OGM. 1-2: soia 100% Roundup Ready®. C3-C4: mais 0% OGM. 3-4: mais Bt11. C5-C6: mais 0%. 5-6: mais MON810. C-: controllo negativo.**

Come previsto l'amplificazione di Cry1Ab di MON810 non ha prodotto nessuna porzione del relativo gene. La reazione di PCR è riuscita solamente per il gene Cry1Ab della farina di mais Bt11, il risultato è visibile dalla presenza di una banda luminosa all'altezza di circa 2000 paia di basi (bp). Il gene CP4EPSPS invece non è stato amplificato in questa reazione. In figura 33 è visibile il prodotto di una PCR positiva per il gene CP4EPSPS dopo elettroforesi su di un gel di agarosio 1%.



**Figura 33: PCR per CP4EPSPS. M: Molecular Weight Marker 1Kb. C-: Controllo negativo. 1-10: PCR sui campioni.**

Come previsto tutti i campioni amplificati hanno dato esito positivo. La banda visibile si trova all'altezza corrispondente al gene voluto (1369 bp).

I geni Cry1Ab amplificati ed i primi due campioni risultati positivi all'amplificazione di CP4EPSPS sono stati estratti dal gel e purificati. Gli amplificati sono stati quantificati allo spettrofotometro (Tab.V).

|                       | O.D.  | D.F. | Conc. (ng/ $\mu$ L) |
|-----------------------|-------|------|---------------------|
| Cry 1Ab 1° campione   | 0.013 | 100  | 65                  |
| Cry 1Ab 2° campione   | 0.004 | 100  | 20                  |
| CP4-EPSPS 1° campione | 0,003 | 100  | 15,0                |
| CP4-EPSPS 2° campione | 0,011 | 100  | 55,0                |

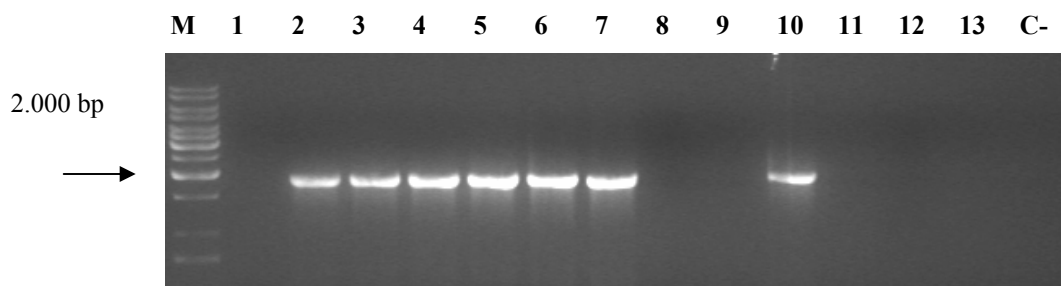
**Tabella V: Quantificazione del DNA estratto da gel di agarosio.**

Per ogni gene è stato utilizzato il campione più concentrato. Si è scelto quindi il campione n°1 di Cry1Ab e il campione n°2 di CP4EPSPS per allestire la reazione di clonaggio.

### 1.3 Verifica dell'inserimento e quantificazione dei plasmidi

Dopo il clonaggio dei cDNA nei plasmidi e selezione delle colonie batteriche recanti il plasmide, si è verificata l'effettiva presenza della sequenza di interesse nei vettori tramite PCR di controllo (fig.34-37):

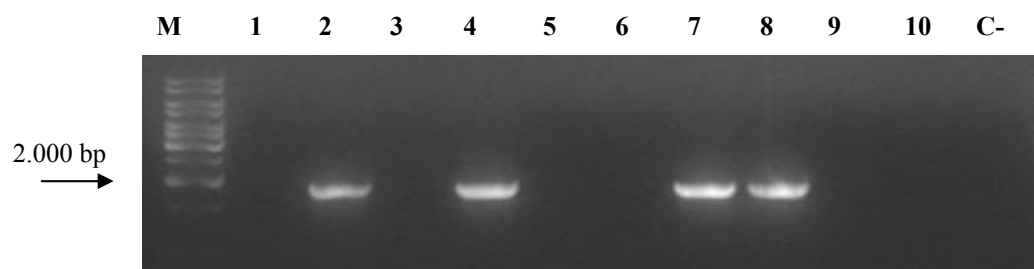
#### ***Cry1Ab in pENTR/D-TOPO®***



**Figura 34: cDNA di Cry1Ab inserito nei vettori pENTR/D-TOPO® M: Molecular Weight Marker 1Kb. 1-13: PCR sulle colonie cresciute. C-: controllo negativo.**

Solo le prime 5 sono state utilizzate in seguito.

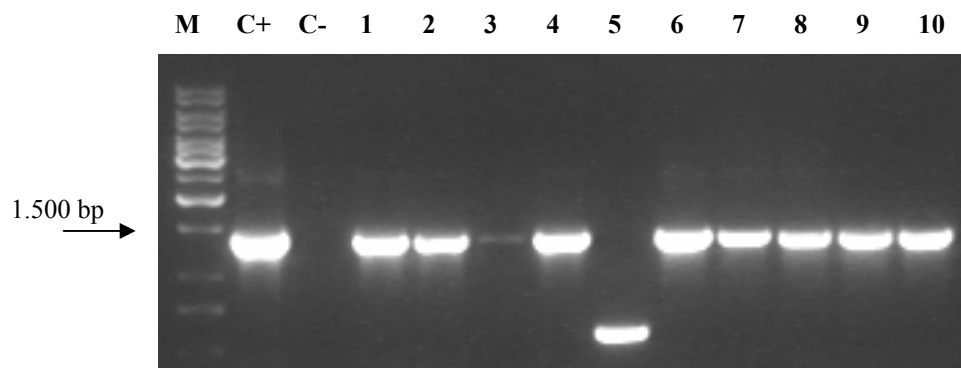
### *Cry1Ab in pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>*



**Figura 35:** cDNA di Cry1Ab inserito nei vettori pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> M: Molecular Weight Marker 1Kb. 1-10: PCR sulle colonie cresciute. C-: controllo negativo.

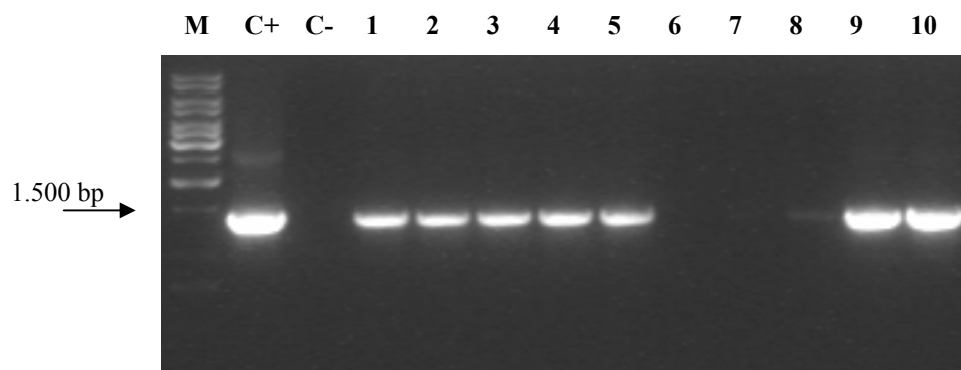
La figura 35 mostra, come accaduto anche in precedenza, l'assenza dell'inserto in alcuni cloni (pozzetti 3, 5, 6, 9, 10).

### *CP4EPSPS in pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>*



**Figura 36:** Verifica di inserzione tramite PCR. C+: Controllo positivo. C-: Controllo negativo. M: Molecular Weight Marker 1Kb. 1-10: PCR delle colonie cresciute.

In questo caso tutte le colonie cresciute hanno acquisito il gene CP4-EPSPS. Nella colonia 3 il segnale è molto debole, mentre nella 5 la banda ottenuta non corrisponde all'altezza corretta, per questo entrambe sono state eliminate.

**CP4EPSPS in pENTR/SD/D-TOPO<sup>®</sup>**

**Figura 37: Verifica di inserzione tramite PCR. C+: Controllo positivo. C-: Controllo negativo. M: Molecular Weight Marker 1Kb. 1-10: PCR delle colonie cresciute.**

Anche in questo caso la maggior parte delle colonie cresciute contiene il plasmide con l'inserto. Per il proseguimento del clonaggio nel vettore di espressione si sono selezionate le colonie n°1, 2, 3, 4, 5, 9 e n°10. I plasmidi estratti sono stati quantificati allo spettrofotometro; in tabella VI e VII sono riportate le quantità.

|   | <b>O.D.</b> | <b>Conc. (ng/<math>\mu</math>L)</b> |
|---|-------------|-------------------------------------|
| <b>pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>+Cry 1Ab</b>   |             |                                     |
| 1° campione                               | 0,028       | 140                                 |
| 2° campione                               | 0,038       | 190                                 |
| 3° campione                               | 0,039       | 195                                 |
| 4° campione                               | 0,034       | 170                                 |
| 5° campione                               | 0,046       | 230                                 |
| <b>pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup>+Cry1Ab</b> |             |                                     |
| 1° campione                               | 0,059       | 295                                 |
| 2° campione                               | 0,041       | 205                                 |
| 3° campione                               | 0,050       | 250                                 |
| 4° campione                               | 0,033       | 165                                 |

**Tabella VI: Quantificazione dei plasmidi contenenti Cry1Ab risultati positivi al controllo PCR.**



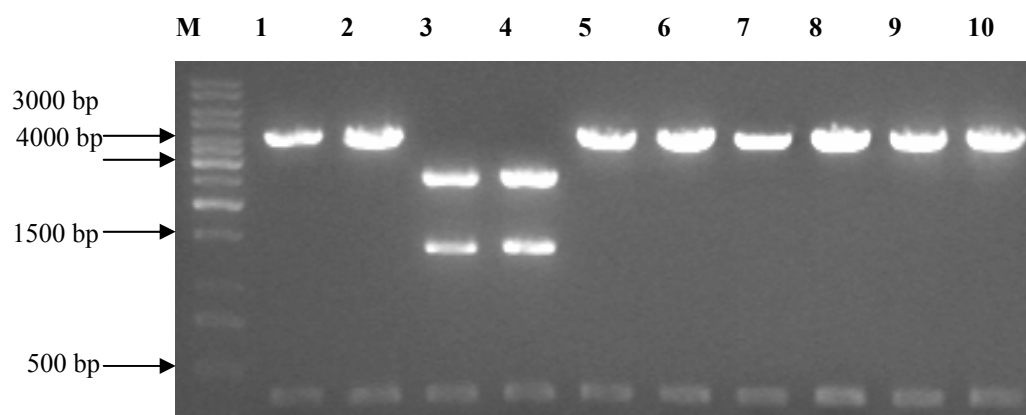
|  | <b>O.D.</b> | <b>Conc. (ng/μL)</b> |
|--|-------------|----------------------|
| <b>pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>+EPSPS</b>    |             |                      |
| 1° campione                              | 0,024       | 120                  |
| 2° campione                              | 0,031       | 155                  |
| 3° campione                              | 0,034       | 170                  |
| 4° campione                              | 0,029       | 145                  |
| 5° campione                              | 0,031       | 155                  |
| 6° campione                              | 0,036       | 180                  |
| 7° campione                              | 0,035       | 175                  |
| 8° campione                              | 0,027       | 135                  |
|  | <b>O.D.</b> | <b>Conc. (ng/μL)</b> |
| <b>pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup>+EPSPS</b> |             |                      |
| 1° campione                              | 0,030       | 150                  |
| 2° campione                              | 0,028       | 140                  |
| 3° campione                              | 0,042       | 210                  |
| 4° campione                              | 0,051       | 250                  |
| 5° campione                              | 0,041       | 205                  |
| 6° campione                              | 0,034       | 170                  |
| 7° campione                              | 0,034       | 170                  |

**TabellaVII: Quantificazione dei plasmidi contenenti CP4EPSPS risultati positivi al controllo con PCR.**

Anche in questo caso la quantità di DNA purificato (superiore a 50 ng/μL) è ampiamente sufficiente per proseguire con l'espressione dei cDNA.

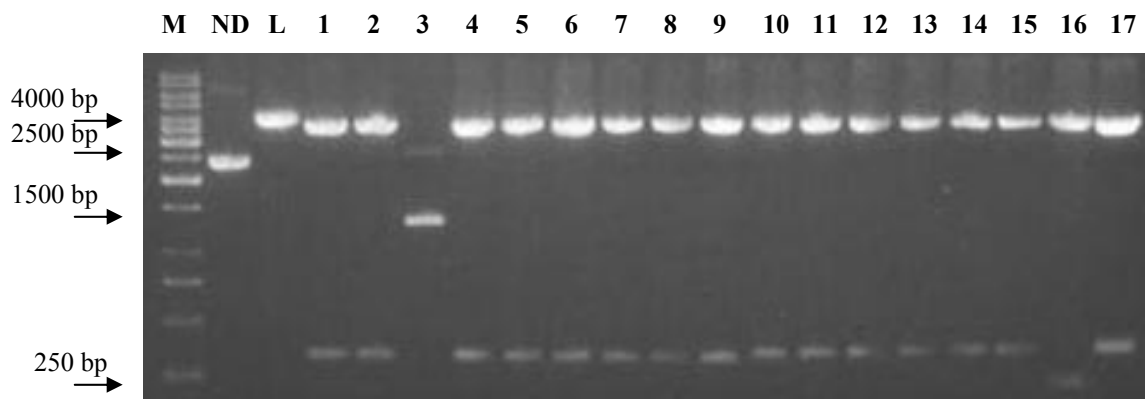
#### 1.4 Analisi di restrizione

Il corretto orientamento degli inserti è stato verificato mediante digestione enzimatica del plasmide contenente l'inserto. Il risultato è visualizzato nelle figure 38 e 39.

**Cry1Ab**

**Figura 38: Mappe di restrizione dei plasmidi utilizzati per il clonaggio. M: Molecular Weight Marker 1Kb. Campioni da 1 a 5: vettore pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>. Nei campioni 1, 2, 5 l'orientamento dell'inserto è corretto. Campioni da 6 a 10: vettore pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> tutti recanti l'inserto orientato correttamente.**

Dopo taglio enzimatico con Eco RV nei campioni 1, 2, 5 compaiono due bande del peso di circa 4000 e 400 bp che caratterizzano una corretta inserzione dell'inserto nei plasmidi pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>. Solamente nei due campioni n° 3 e 4 si è verificata un'inserzione anomala caratterizzata dalla comparsa di 3 bande del peso di 2700, 1300, 400 bp. L'inserimento scorretto del cDNA ha creato un nuovo sito di restrizione per cui si è generata una terza banda, altrimenti la sola inserzione scorretta avrebbe generato 2 bande di 2700 e 1700 bp. Nei campioni numero 6, 7, 8, 9 e 10 sono state caricate aliquote della reazione di taglio del plasmide pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> nei quali l'inserzione è avvenuta nel corretto orientamento e nel gel si evidenziano due bande del peso di 4000 e 400 bp.

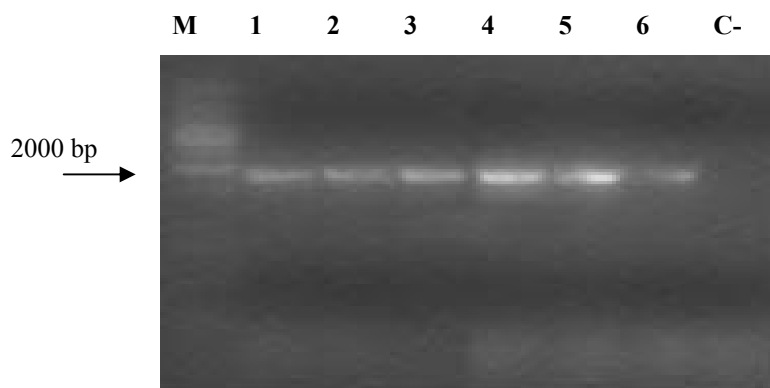
**CP4EPSPS**

**Figura 39: Mappa di restrizione dei plasmidi utilizzati per il clonaggio dopo inserzione dei cDNA. M: Molecular Weight Marker 1Kb. ND: vettore non digerito. L: vettore lineare. Campioni da 1-9 vettore pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>. Nei campioni 1, 2 e da 4 a 9 si evidenziano due bande caratteristiche di un orientamento corretto. Campioni da 10 a 17 vettore pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup>. Nei campioni da 10 a 15 e nel campione n. 17 appaiono 2 bande caratteristiche di un orientamento dell'inserto corretto.**

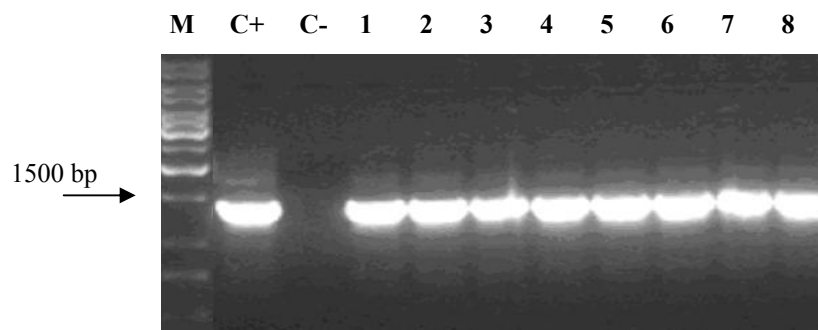
L'immagine del gel in figura 39 mostra come la maggior parte dei cloni ha mantenuto un plasmide contenente CP4-EPSPS inserito correttamente, infatti come atteso la reazione di digestione con l'enzima Apa I e Bam HI ha prodotto due bande di circa 3700 bp e 320 bp nelle colonie n. 1, 2 e da 4 a 15 tagliando i plasmidi pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> e pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup>. I plasmidi che hanno dato mappe di restrizione indicanti un inserimento scorretto sono il n° 3 e n° 16 in cui è possibile notare come le bande apparse siano di peso non conforme all'atteso.

### 1.5 Ricombinazione

Per verificare che i vettori di espressione che si sono ottenuti dalla ricombinazione tra i plasmidi pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> e pDEST<sup>™</sup>15, ed i plasmidi pENTR/D/SD-TOPO<sup>®</sup> e pDEST<sup>™</sup>24 siano corretti, ovvero contengano ancora i cDNA di interesse, viene allestita una reazione di amplificazione per riamplicare i cDNA inseriti. Nelle figure 40 e 41 sono riportati i prodotti di PCR ottenuti.

***Cry1Ab***

**Figura 40: cDNA di Cry1Ab inserito nei vettori di espressione. M: Molecular Weight Marker 1Kb. Campioni 1, 2, 3: amplificati da pDEST<sup>TM</sup>15. Campioni 4, 5, 6: amplificati da pDEST<sup>TM</sup>24. C-: Controllo negativo.**

***CP4EPSPS***

**Figura 41: cDNA di CP4-EPSPS inserito nei vettori di espressione. M: Molecular Weight Marker 1Kb. Campioni 1, 2, 3, 4: amplificati da pDEST<sup>TM</sup>15. Campioni 5, 6, 7, 8: amplificati da pDEST<sup>TM</sup>24. C-: Controllo negativo.**

Anche la seconda ricombinazione ha prodotto numerosi vettori contenenti il cDNA di interesse. Questi plasmidi sono stati in seguito replicati in *E. coli* ceppo DH5 $\alpha$ , estratti e quantificati. Nelle tabelle VIII re IX sono riportati i nanogrammi di plasmide recuperato.

|                                       | <b>O.D.</b> | <b>Conc. (ng/<math>\mu</math>L)</b> |
|---------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| <b>pDEST<sup>TM</sup>15 + Cry 1Ab</b> |             |                                     |
| 1° campione                           | 0,010       | 50                                  |
| 2° campione                           | 0,020       | 100                                 |
| 3° campione                           | 0,018       | 90                                  |
| <b>pDEST<sup>TM</sup>24 + Cry 1Ab</b> |             |                                     |
| 1° campione                           | 0,060       | 30                                  |
| 2° campione                           | 0,010       | 50                                  |
| 3° campione                           | 0,015       | 75                                  |

**Tabella VIII: Quantificazione dei plasmidi contenenti Cry1Ab risultati positivi al controllo.**

|   | <b>O.D.</b> | <b>Conc. (ng/<math>\mu</math>L)</b> |
|---|-------------|-------------------------------------|
| <b>pDEST<sup>TM</sup>15 + CP4-EPSPS</b> |             |                                     |
| 1° campione                             | 0,016       | 80                                  |
| 2° campione                             | 0,011       | 55                                  |
| 3° campione                             | 0,028       | 170                                 |
| 4° campione                             | 0,028       | 145                                 |
| <b>pDEST<sup>TM</sup>24 + CP4-EPSPS</b> |             |                                     |
| 1° campione                             | 0,008       | 40                                  |
| 2° campione                             | 0,006       | 30                                  |
| 3° campione                             | 0,013       | 65                                  |
| 4° campione                             | 0,009       | 45                                  |

**Tabella IX: Quantificazione dei plasmidi contenenti CP4-EPSPS risultati positivi al controllo.**

### 1.6 Analisi dell'espressione

Le dimensioni del Fusion Tag di GST sono diverse secondo il vettore utilizzato, la dimensione delle proteine di fusione che si ottengono sono mostrate in tabella X.

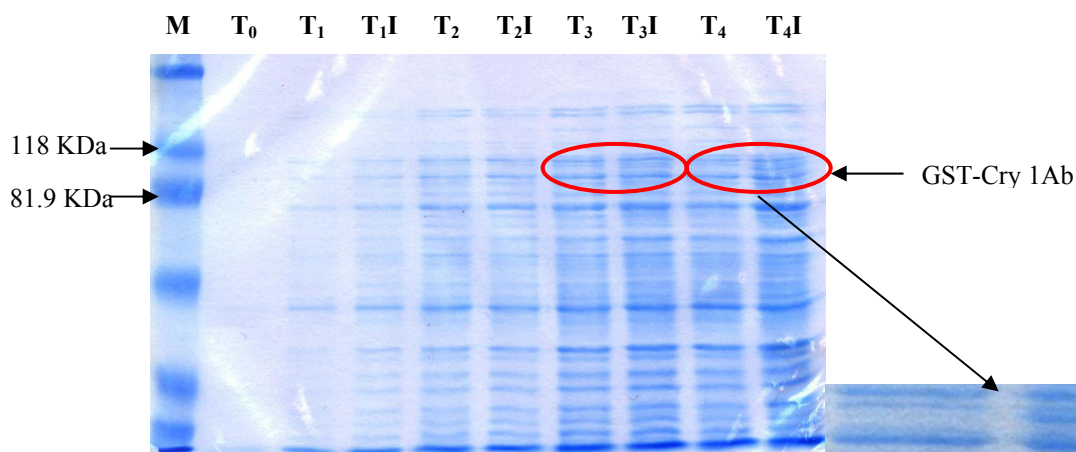
|                                   | Dimensione (kDa) | Dimensione finale (kDa) |
|-----------------------------------|------------------|-------------------------|
| Fusion Tag N-terminale (pDEST™15) | 27.7             | /                       |
| Fusion Tag C-terminale (pDEST™24) | 27.9             | /                       |
| Cry 1Ab                           | 68.9             | /                       |
| CP4-EPSPS                         | 48.6             | /                       |
| GST-Cry 1Ab in pDEST™15           | 68.9 + 27.7      | 96.6                    |
| GST-CP4-EPSPS in pDEST™15         | 48.6 + 27.7      | 76.3                    |
| Cry 1Ab-GST in pDEST™24           | 68.9 + 27.9      | 96.8                    |
| CP4-EPSPS-GST in pDEST™24         | 48.6 + 27.9      | 76.5                    |

**Tabella X: Dimensioni delle proteine di fusione attese.**

Dopo aver indotto l'espressione delle proteine di fusione, la quantità di proteina prodotta è stata visualizzata su di un gel di poliacrilammide al 10% (fig. 42-45).

In figura 12 è possibile apprezzare una banda a circa 96.6 kDa caratteristica di GST-Cry 1 Ab.

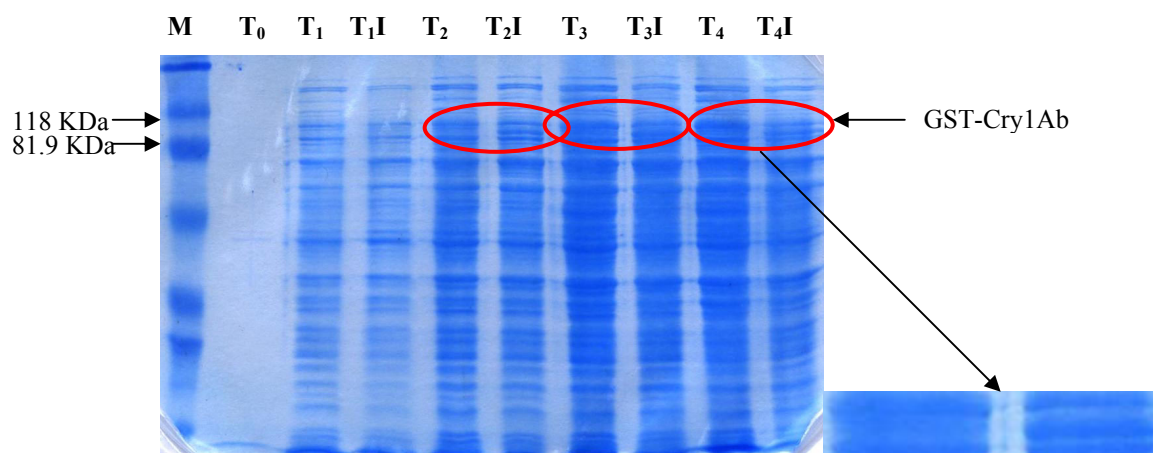
***pDEST™15 contenente Cry1Ab in BL21-AI™***



**Figura 42: Monitoraggio dell'espressione di GST-Cry1Ab ad ogni ora di induzione ( $T_n$ ) in pDEST™15. Confronto tra coltura non indotta ( $T_n$ ) ed una indotta ( $T_nI$ ) ad ogni ora. Dopo tre ore è possibile apprezzare una banda corrispondente a GST-Cry1Ab M: BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Pierce)**

L'analisi attenta della regione del gel corrispondente al peso della proteina di fusione Cry1Ab-GST ha permesso di identificare la comparsa di una banda nelle colonie in cui è stata indotta l'espressione.

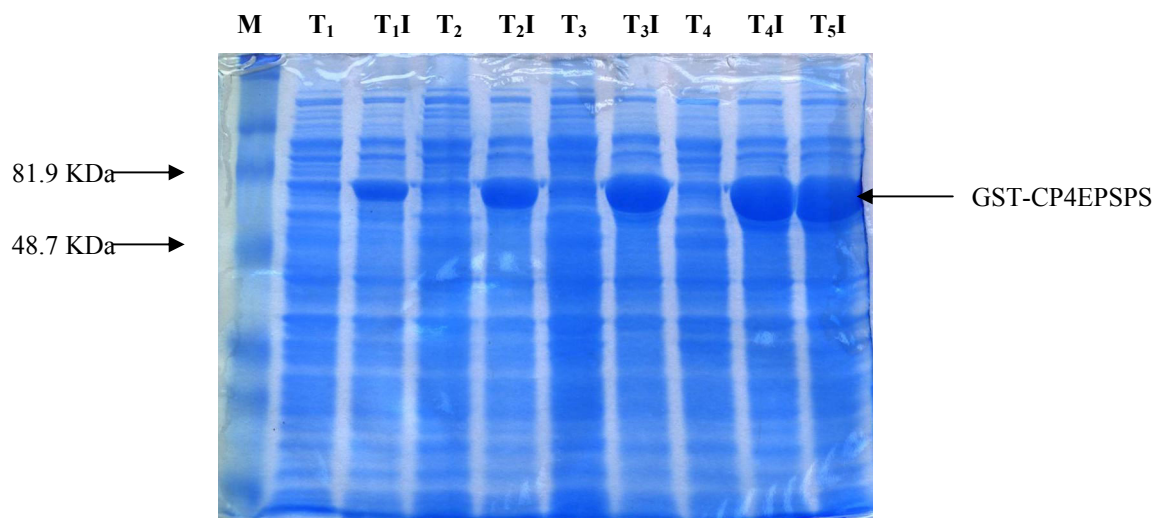
***pDEST<sup>TM</sup>24 contenente Cry1Ab in BL 21***



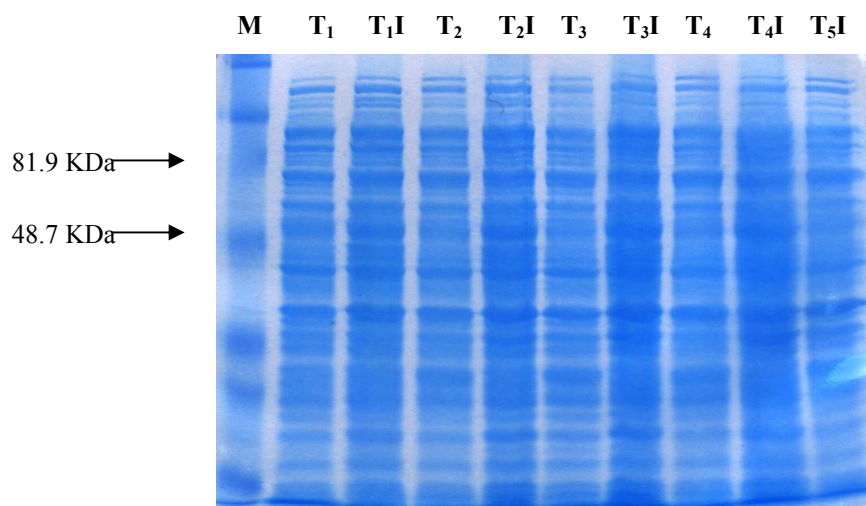
**Figura 43: Monitoraggio dell'espressione di GST-Cry1Ab ad ogni ora di induzione ( $T_n$ ) in pDEST<sup>TM</sup>24. Confronto tra coltura non indotta ( $T_n$ ) ed una indotta ( $T_nI$ ) ad ogni ora. Dopo due ore è possibile apprezzare una banda corrispondente a GST-Cry1Ab M: BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Pierce)**

Anche l'utilizzo del vettore pDEST<sup>TM</sup>24 ha consentito di esprimere la proteina di fusione. Le quantità prodotte sono sempre molto limitate anche se leggermente superiori rispetto all'induzione precedente.

Nella figura 44 è riscontrabile l'aumento di intensità della banda corrispondente a GST-CP4EPSPS all'aumentare del tempo di induzione, da una a cinque ore. L'espressione è stata ottenuta in cellule di *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> trasformate con il vettore pDEST<sup>TM</sup>15. In figura 45 lo stesso esperimento condotto su cellule *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> trasformate con pDEST<sup>TM</sup>24 non ha prodotto un risultato analogo, infatti nelle colonie indotte non appare nessuna banda corrispondente alla proteina attesa.

***pDEST<sup>TM</sup>15+CP4-EPSPS***

**Figura 44:** Monitoraggio dell'espressione di GST-CP4EPSPS ad ogni ora di induzione ( $T_n$ ) in *pDEST<sup>TM</sup>15*. Confronto tra coltura non indotta ( $T_n$ ) ed una indotta ( $T_nI$ ) ad ogni ora. Già dopo un'ora è possibile apprezzare una banda corrispondente a GST-CP4EPSPS M: BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Pierce)

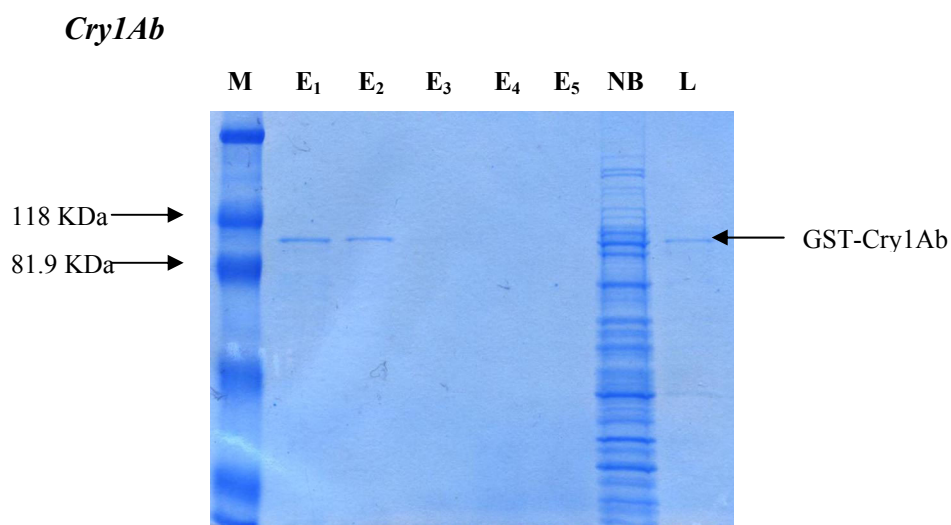
***DEST<sup>TM</sup>24+CP4-EPSPS***

**Figura 45:** Monitoraggio dell'espressione di GST-CP4EPSPS ad ogni ora di induzione ( $T_n$ ) in *pDEST<sup>TM</sup>24*. Confronto tra coltura non indotta ( $T_n$ ) ed una indotta ( $T_nI$ ) ad ogni ora. Dopo tre ore è possibile apprezzare una banda corrispondente a GST-Cry1Ab M: BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Pierce)



### 1.7 Produzione delle proteine

Alcune delle colonie esperimenti sono state utilizzate per la produzione e la purificazione su larga scala di entrambe le proteine in cromatografia d'affinità (fig. 46 e 47).



**Figura 46:** Visualizzazione di GST-Cry1Ab in SDS-PAGE dopo purificazione. E1-5: Eluizioni seriali della resina in cui si vedono chiaramente le bande corrispondenti a GST-Cry1Ab nel primo e secondo campione. NB: Estratto cellulare dopo purificazione. L: aliquota di PBS di lavaggio della resina prima del recupero della proteina che in parte viene rilasciata. M: BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Pierce)

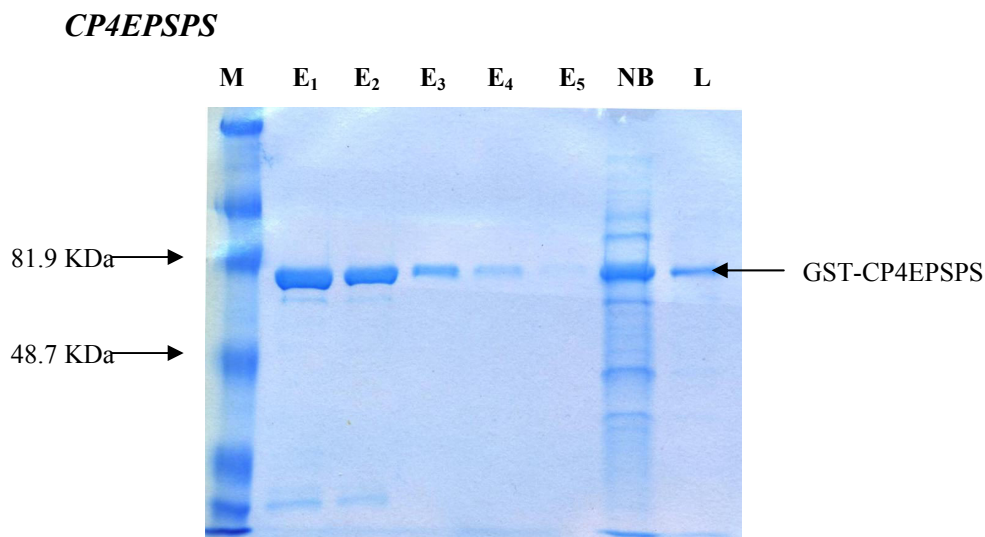
La purificazione in cromatografia di GST-Cry1Ab ha permesso di separare la proteina di fusione dal lisato cellulare, come dimostra la presenza di un'unica banda nel gel.

Parte del prodotto è rimasta nella frazione non legata alla resina, mentre parte viene persa durante i lavaggi.

Nonostante siano state provate diverse condizioni di incubazione fra lisato e resina, non è stata ottenuta una purificazione più efficiente.

Le diverse eluizioni positive sono state riunite, concentrate e quantificate ottenendo 2 mL di GST-Cry1Ab con una concentrazione finale pari a 0.80 mg/mL.

La figura 47 mostra l'andamento della purificazione di CP4EPSPS col procedere delle eluizioni.



**Figura 47: Visualizzazione di GST-Cry1Ab in SDS-PAGE dopo purificazione. E1-5: Eluizioni seriali della resina in cui si vedono chiaramente le bande corrispondenti a GST-Cry1 Ab nel primo e secondo campione. NB: Estratto cellulare dopo purificazione. L: aliquota di PBS di lavaggio della resina prima del recupero della proteina che in parte viene rilasciata. M: BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (Pierce).**

La proteina di fusione prodotta dalle colonie che esprimono il gene GST-CP4EPSPS è stata efficientemente purificata dal lisato cellulare. Le prime due eluizioni sono state riunite in un'unica aliquota mentre le rimanenti sono state concentrate.

In totale sono stati ottenuti 3 mL di GST-CP4EPSPS con concentrazione di 1.25 mg/mL

La presenza di due bande aggiuntive potrebbe derivare dalla sintesi di forme incomplete della proteina.

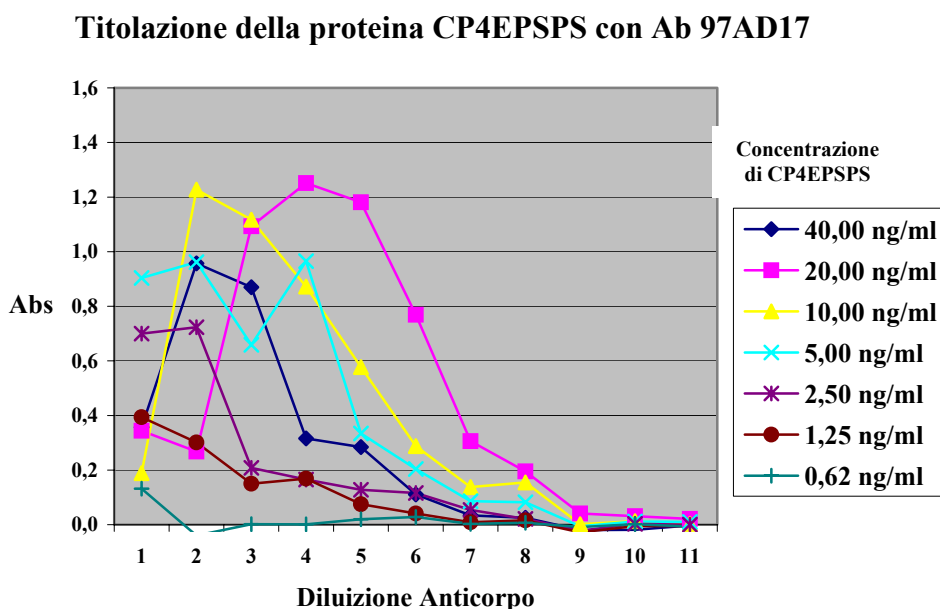
### 1.8 Utilizzo delle proteine sintetizzate

Le proteine, così ottenute, sono state spedite alla Moravian Biotechnology per la generazione degli anticorpi monoclonali corrispondenti.

## 2 Risultati dei Test ELISA

### 2.1 ELISA indiretto

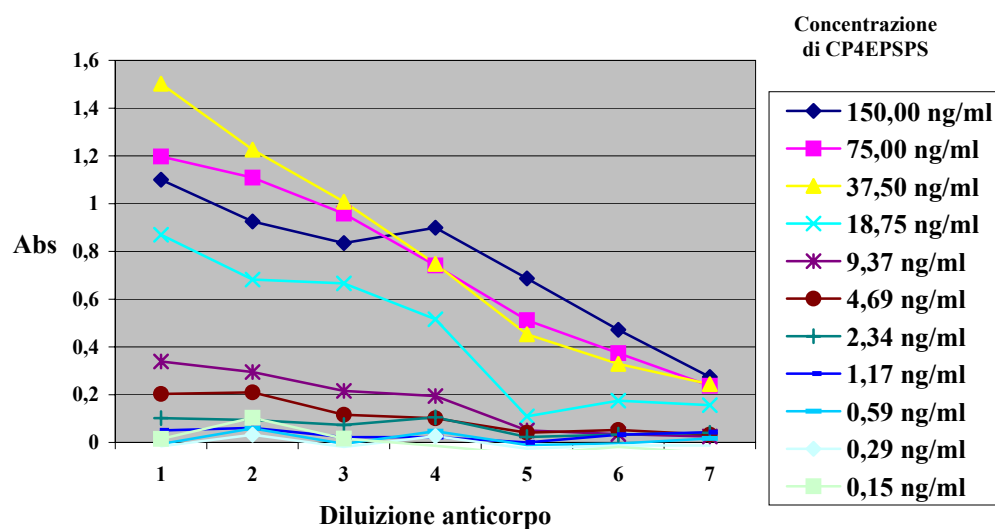
Gli anticorpi 97AD17, 97AC1.1, 97R1.1, 97R4.1 (Monsanto) sono stati testati in un test ELISA indiretto per verificare la loro capacità di riconoscere la proteina CP4-EPSPS a diverse concentrazioni; si sono testate diluizioni seriali (1:2) dei quattro anticorpi. La concentrazione iniziale di ognuno era di 2  $\mu\text{g/mL}$ . I risultati del test ELISA sono sotto riportati (fig.48-51).



**Figura 48: Valori di assorbanza rilevate dopo test ELISA indiretto con 97AD17 contro CP4EPSPS**

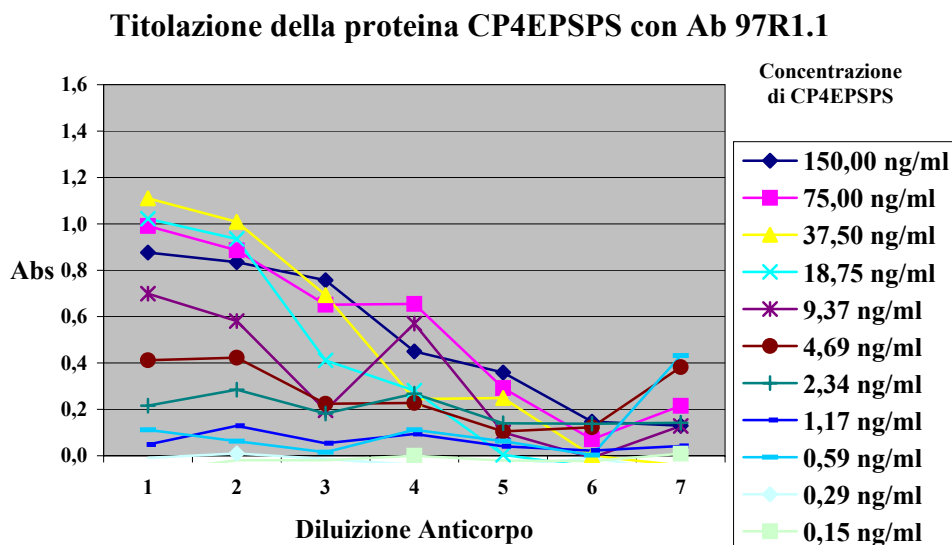
L'analisi delle assorbanze dimostra che l'anticorpo 97AD17 permette la rilevazione di CP4-EPSPS anche alla concentrazione di 1.25 ng/mL. Più precisamente, 2  $\mu\text{g/mL}$  di anticorpo sono in grado di rivelare la presenza di 1.25 ng/mL generando un segnale di assorbanza pari a 0.4. Tale valore è considerato significativo perché superiore di tre volte al valore di assorbanza dei controlli negativi.

### Titolazione della proteina CP4EPSPS con Ab 97AC1.1



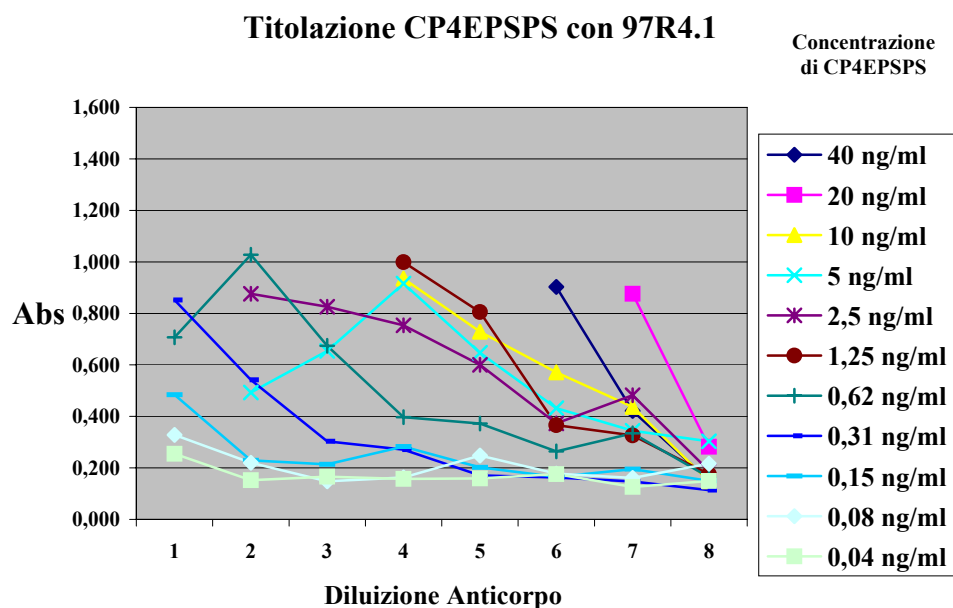
**Figura 49: Valori di assorbanza rilevate dopo test ELISA indiretto con 97AC1.1 contro CP4EPSPS**

L'anticorpo 97AC1.1 riconosce CP4EPSPS a partire da una concentrazione di 18,75 ng/mL. Con questo anticorpo solo con 18,75 ng/mL di proteina si raggiunge un valore di assorbanza pari a circa 0,84 significativamente differente dal bianco. Con 9,37 si raggiungono infatti valori di assorbanza inferiori a 0,38.



**Figura 50:** Valori di assorbanza rilevate dopo test ELISA indiretto con 97R1.1 contro CP4EPSPS

L'anticorpo 97R1.1 è in grado di rilevare concentrazioni di CP4-EPSPS di 4,69 ng/mL con un valore di assorbanza pari a 0.41.



**Figura 51:** Valori di assorbanza rilevate dopo test ELISA indiretto con 97R4.1 contro CP4EPSPS

La figura 51 mostra che l'anticorpo 97R4.1 possiede una sufficiente affinità per il proprio antigene. Fino alla settima diluizione (0.31 ng/mL) l'anticorpo riesce ad identificare la proteina ad una concentrazione inferiore a 2 ng/mL anche se la sensibilità alle altre concentrazioni di antigene e anticorpo risulta inferiore ai reagenti utilizzati in precedenza.

La mancanza di alcuni valori nei grafici è dovuta alla presenza di precipitati nei pozzetti contenenti le maggiori concentrazioni di anticorpo e antigene; la presenza di queste forme insolubili abbassa l'intensità del colore formato rendendo la lettura non attendibile.

Alcuni dei valori, inoltre, sono stati omessi dai grafici per rendere più leggibili i dati ottenuti.

### 3 Western blot

#### 3.1 Risultati dei Western blot

Sono state eseguite ulteriori analisi tramite Western blot dopo corsa su gel non denaturante, sia con gli anticorpi in forma libera che dopo essere stati legati alle microsfere o biotinilati. In entrambi i casi si è voluto verificare che la capacità di legare il target non fosse alterata (fig. 52-56).

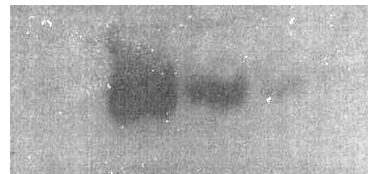
#### 97 AC 1.1

BSA 200ng 20ng Blu



97AC1.1

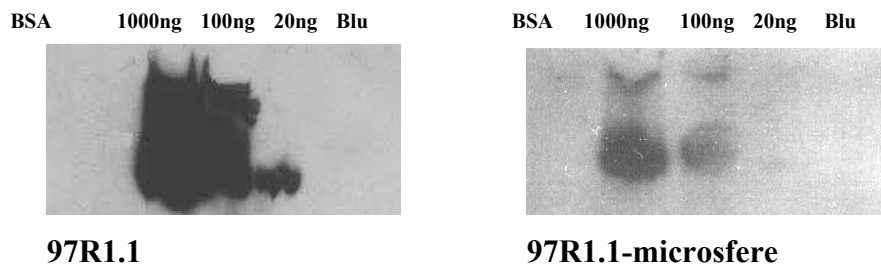
BSA 1000ng 100ng 20ng Blu



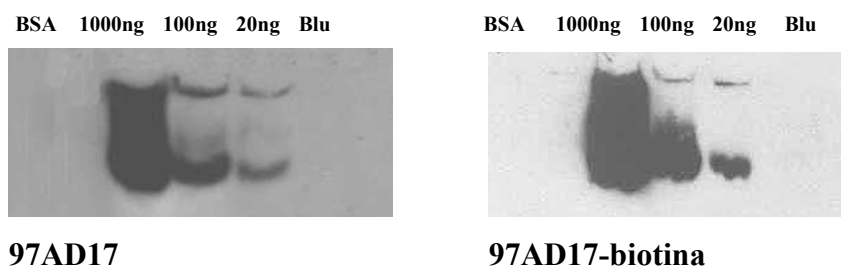
97AC1.1-microsfere

**Figura 52: Western blot su CP4EPSPS con 97AC1.1 in forma libera e coniugata alle microsfere**

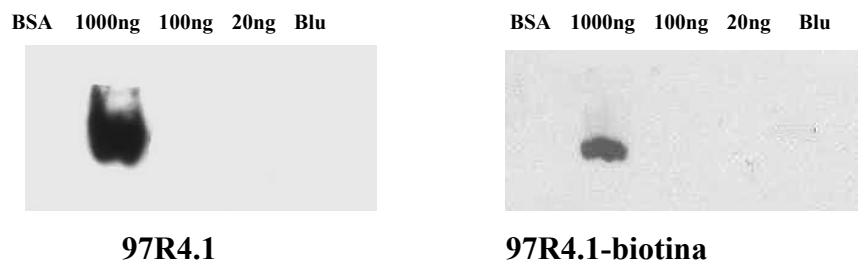
Dalle immagini possiamo rilevare come l'anticorpo 97AC1.1 riconosca la proteina CP4EPSPS in entrambi i casi fino ad una quantità di 20 ng.

**97 R 1.1****Figura 53: Western blot su CP4EPSPS con 97R1.1 in forma libera e coniugata alle microsfere**

L'anticorpo 97R1.1 utilizzato nei saggi Luminex come primario (capture probe) riconosce in forma libera 20 ng di CP4EPSPS, mentre in forma coniugata 100 ng.

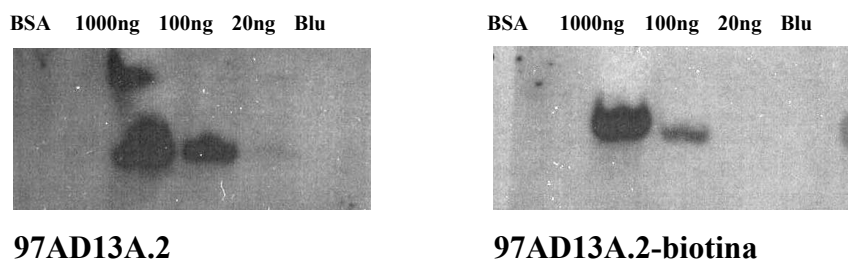
**97 AD 17****Figura 54: Western blot su CP4EPSPS con 97AC1.1 in forma libera e coniugata a biotina**

Le immagini dei Western blot riguardanti l'anticorpo 97AD17 utilizzato come secondario nel test Luminex mostrano che l'anticorpo permette di rilevare una quantità di proteina di 20 ng in entrambe le forme.

**97 R 4.1****Figura 55: Western blot su CP4EPSPS con 97R4.1 in forma libera e coniugata a biotina.**

L'anticorpo secondario 97R4.1 non possiede una sensibilità paragonabile a quella degli anticorpi precedenti. Esso permette di identificare il proprio antigene solamente alla quantità di 1000 ng, mentre a quantità inferiori non viene rilevato alcun segnale.

### **97 AD 13 A.2**



**Figura 56: Western blot su CP4EPSPS con 97AD13A.2 in forma libera e coniugata a biotina.**

L'anticorpo considerato consente di rilevare la proteina fino ad una quantità di 100 ng, mentre a livelli inferiori il segnale è molto debole.

Dalle immagini è possibile dedurre che le reazioni di biotinilazione e cross-linking alle microsfere non hanno influenzato in maniera determinante la capacità degli anticorpi di legare i loro epitopi.



In tabella XI sono riassunti i risultati ottenuti.

| Anticorpi      | EPSPS |           |         |
|----------------|-------|-----------|---------|
|                | 20 ng | 100 ng    | 1000 ng |
| 97AC1.1        | +     | +(200 ng) | /       |
| 97AC1.1-Mic    | -/+   | +         | +       |
| 97R1.1         | -/+   | +         | +       |
| 97R1.1-Mic     | -/+   | +         | +       |
| 97AD17         | +     | +         | +       |
| 97AD17-biot    | +     | +         | +       |
| 97R4.1         | -     | -         | +       |
| 97R4.1-biot    | -     | -         | +       |
| 97AD13A.2      | -/+   | +         | +       |
| 97AD13A.2-biot | -/+   | +         | +       |

**Tabella XI: Tabella riassuntiva sulla sensibilità degli anticorpi anti CP4EPSPS rispetto a diverse quantità di target utilizzato.**

#### 4 Risultati e valutazione statistica dei metodi immunoenzimatici commerciali.

##### 4.1 Kit ELISA commerciali a confronto

Per poter valutare le prestazioni dei metodi innovativi proposti, Luminex immuoassay ed in seguito ER m&d, e' stato necessario svolgere un'analisi preventiva sulle performance dei metodi ELISA commercialmente disponibili. I risultati ottenuti con l'applicazione di tre kit commerciali (K1, K2, K3) per la misura di Cry sono descritti nell'articolo pubblicato su AQUAL, riportato in appendice e in tabella XII.

I parametri statistici valutati e le relative formule sono:

-Relative repeatability standard deviation ( $RSD_r$ ) espresso come  $RSD_r = SD_r / \bar{x}$  (in %).

E' indice di ripetibilità del metodo applicato nelle stesse condizioni.

K1:  $RSD_r = 12.4\%$ ; K2:  $RSD_r = 16.1\%$  e K3:  $RSD_r = 7.6\%$ ;

-*Reproducibility repeatability standard deviation* ( $RSD_R$ ) così calcolata  $RSD_R = SD_R / \bar{x}$  (in %). E' un parametro che tiene conto dei diversi operatori e dei diversi livelli (in questo caso % di OGM) testate. K1:  $RSD_R = 37.2\%$ ; K2:  $RSD_R = 18.0\%$  e K3:  $RSD_R = 8.6\%$ ;

-*Limit of detection* (LOD) e' la minima quantità di analita monitorabile. La formula e':  $LOD = \bar{x}$  (bianco) +  $3 \times SD$  (in % di GMO). K1:  $LOD = 0.034\%$ ; K2:  $LOD = 0.107\%$  e K3:  $LOD = 0.037\%$ ;

-*Limit of quantitation* (LOQ) e' la minima quantità di analita quantificabile con un livello accettabile di precisione ed accuratezza. La formula applicata e':  $LOQ = \bar{x}$  (bianco) +  $9 \times SD$  (in % di GMO). K1:  $LOQ = 0.082\%$ ; K2:  $LOQ = 0.259\%$  e K3:  $LOQ = 0.089\%$ ;

-*Accuracy* e' indice della vicinanza tra il valore osservato ed il valore vero. La formula e': (Observed Value / Theoretical Value) x100;

| Kit | Level | Theoretical value<br>(in % of GMO content) | Measured value<br>(in % of GMO content) | Accuracy<br>(%) | Repeatability<br>variance | Reproducibility<br>variance |
|-----|-------|--|---|-----------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1   | 1     | 0  | 0.0001                                  | -               | 0.0001                    | 0.0002                      |
|     | 2     | 0.1  | 0.2664                                  | 266.4           | 0.0041                    | 0.0120                      |
|     | 3     | 0.5  | 1.0324                                  | 206.5           | 0.0239                    | 0.1315                      |
|     | 4     | 1  | 1.8460                                  | 184.6           | 0.1103                    | 0.5227                      |
|     | 5     | 2  | 2.8642                                  | 143.2           | 0.2710                    | 1.2009                      |
|     | 6     | 5  | 3.7894                                  | 75.8            | 0.1136                    | 1.6877                      |
| 2   | 1     | 0  | 0.0316                                  | -               | 0.0008                    | 0.0009                      |
|     | 2     | 0.1  | 0.2453                                  | 245.3           | 0.0690                    | 0.0962                      |
|     | 3     | 0.5  | 0.6426                                  | 128.5           | 0.0226                    | 0.0292                      |
|     | 4     | 1  | 1.2779                                  | 127.8           | 0.0433                    | 0.0445                      |
|     | 5     | 2  | 2.5260                                  | 126.3           | 0.2448                    | 0.2915                      |
|     | 6     | 5  | 5.7559                                  | 115.1           | 0.6412                    | 0.8600                      |
| 3   | 1     | 0  | 0.0102                                  | -               | 0.0001                    | 0.0002                      |
|     | 2     | 0.1  | 0.1203                                  | 120.3           | 0.0006                    | 0.0011                      |
|     | 3     | 0.5  | 0.5783                                  | 115.7           | 0.0032                    | 0.0076                      |
|     | 4     | 1  | 0.9986                                  | 99.9            | 0.0093                    | 0.0149                      |
|     | 5     | 2  | 1.6412                                  | 82.1            | 0.0200                    | 0.0256                      |
|     | 6     | 5  | 2.6745                                  | 52.9            | 0.0039                    | 0.0105                      |

**Tabella XII. La tabella riporta i dati di ripetibilità, riproducibilità e accuratezza dei risultati ottenuti per ogni livello di contaminazione indagata. Campioni IRMM.**

#### 4.2 Risultati e valutazione statistica del metodo immunoenzimatico basato sulla ELISA Reverse m&d.

I risultati ottenuti applicando i protocolli sviluppati per la quantificazione di Cry1Ab e per l'analisi qualitativa simultanea di Cry1Ab e CP4EPSPS con l'ELISA Reverse m&d sono stati descritti, statisticamente valutati e pubblicati sulla rivista Food Add. And Cont., come integralmente riportato in appendice, nelle figure 57 e 58 e nelle tabelle XIII-XVII

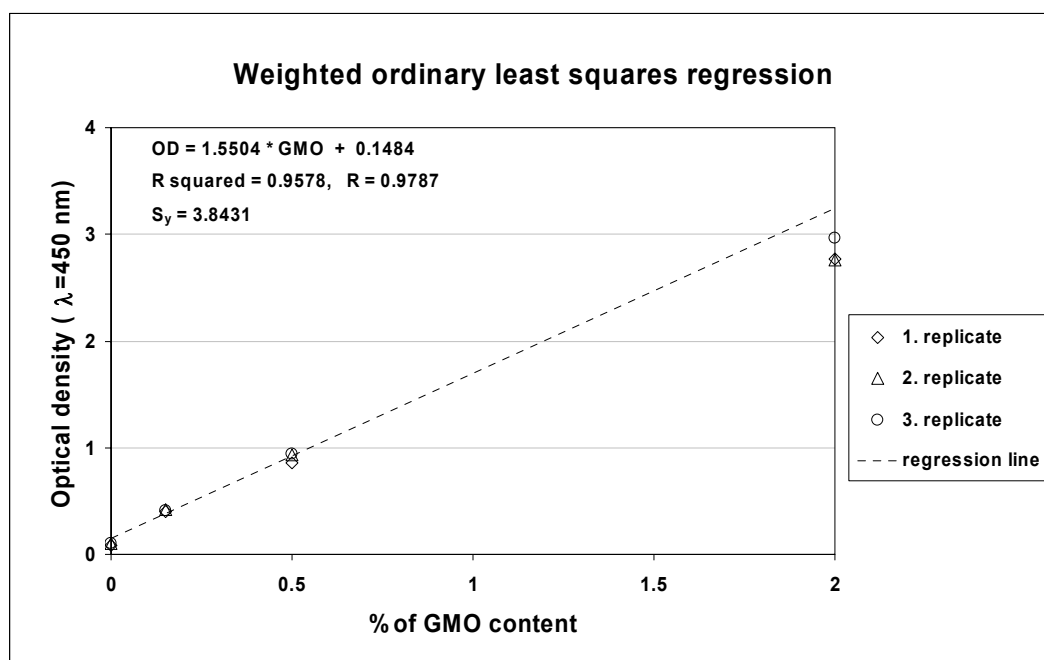


Figura 57. Curva di calibrazione lineare per il test quantitativo condotto per Cry1Ab.

In ascissa sono riportate le concentrazioni di mais GM utilizzato (da 0% al 2%) mentre in ordinata i corrispondenti valori di densità ottica osservata.

| Ordinary least squares regression* |             |                |          |                 |             |
|------------------------------------|-------------|----------------|----------|-----------------|-------------|
|                                    | Coefficient | Standard Error | p-value  | 95% probability |             |
|                                    |             |                |          | Lower limit     | Upper limit |
| % of GMO content                   | 1.7084      | 0.0464         | < 0.0001 | 1.6089          | 1.8078      |

Tabella XIII. Cry1Ab test quantitativo eseguito in un intervallo di concentrazioni note tra lo 0% e 0.5%. In tabella sono riportati i valori: coefficiente di regressione, errore standard ed i valori del p-value in un intervallo di confidenza del 95% di probabilità.

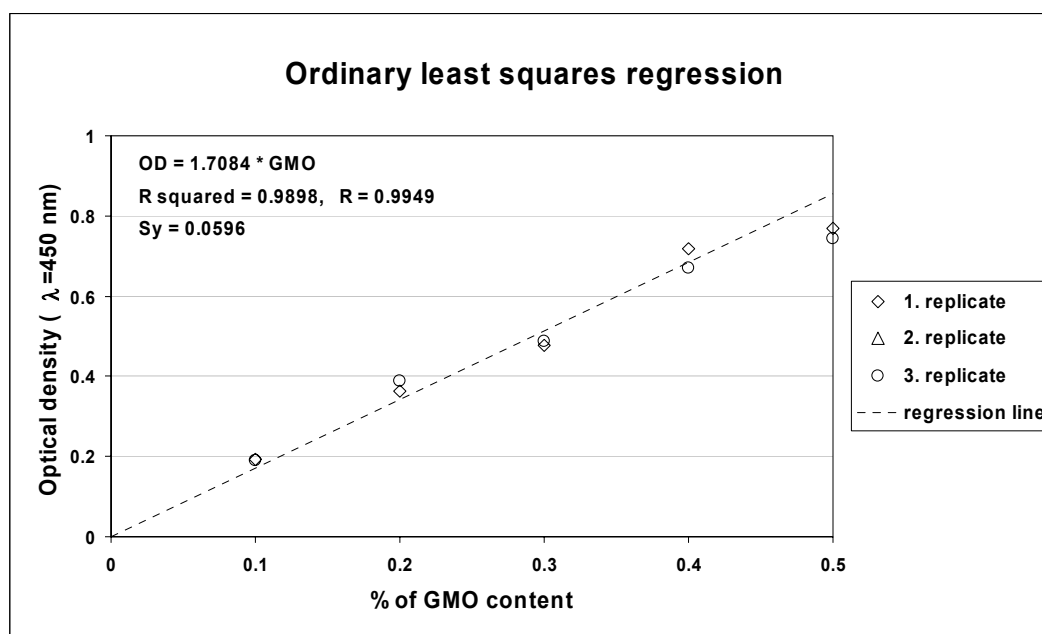


Figura 58. Curva di calibrazione lineare per il test quantitativo condotto per Cry1Ab. In ascissa sono riportate le concentrazioni di mais GM utilizzato (da 0% a 0.5%) mentre in ordinata i corrispondenti valori di densità ottica osservata.

| Level | % of GMO content  |                | Accuracy (%) | Mean OD | Repeatability of characteristics |         |
|-------|-------------------|----------------|--------------|---------|----------------------------------|---------|
|       | Theoretical value | Observed value |              |         | SD                               | RSD (%) |
| 1     | 0                 | –              | –            | 0.0992  | 0.0111                           | 11.18   |
| 2     | 0.15              | 0.1702         | 113.47       | 0.4123  | 0.0085                           | 2.05    |
| 3     | 0.5               | 0.4929         | 98.58        | 0.9125  | 0.0448                           | 4.91    |
| 4     | 2                 | 1.7304         | 86.52        | 2.8312  | 0.1154                           | 4.08    |

Tabella XIV. Test quantitativo per Cry1Ab. In tabella sono riportati i valori di accuratezza e ripetibilità per ogni livello di contaminazione misurato (intervallo da 0% al 2%).

| Level | % of GMO content  |                | Accuracy (%) | Mean OD | Repeatability of characteristics |         |
|-------|-------------------|----------------|--------------|---------|----------------------------------|---------|
|       | Theoretical value | Observed value |              |         | SD                               | RSD (%) |
| 2     | 0.1               | 0.1155         | 115.45       | 0.1973  | 0.0089                           | 4.51    |
| 3     | 0.2               | 0.2231         | 111.54       | 0.3811  | 0.0156                           | 4.10    |
| 4     | 0.3               | 0.3075         | 102.49       | 0.5253  | 0.0744                           | 14.17   |
| 5     | 0.4               | 0.4235         | 105.87       | 0.7234  | 0.0561                           | 7.76    |
| 6     | 0.5               | 0.4644         | 92.89        | 0.7934  | 0.0652                           | 8.22    |

Tabella XV. Test quantitativo per Cry1Ab. In tabella sono riportati i valori di accuratezza e ripetibilità per ogni livello di contaminazione testato (intervallo da 0% a 0.5%).

| <b>Multiple comparison tests</b> |                      |                     |                                 |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| <b>Total proteins</b>            | <b><i>t</i>-test</b> | <b>Tukey's test</b> | <b>Bonferroni <i>t</i>-test</b> |
| <b>25 µg/mL</b>                  | S                    | s                   | ns                              |
| <b>50 µg/mL</b>                  | S                    | s                   | ns                              |
| <b>100 µg/mL</b>                 | Ss                   | ss                  | s                               |

ss – significant at the 0.05 level

s – significant at the 0.1 level

ns – not significant at the 0.1 level

**Tabella XVI.** La concentrazione ottimale di anticorpi primari non purificati da legare alle microsfere è stata determinata testando 25, 50, 100 µg/mL di proteine totali contenute nel mezzo di coltura degli ibridomi. I risultati di tre differenti test statistici hanno confermato la significativa differenza tra i controlli negativi e tutti gli altri livelli di contaminazione testati (SAS software, ANOVA test).

| <b>Weighted ordinary least squares regression *</b> |                    |                       |                       |                        |                    |
|---|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|
|   | <b>Coefficient</b> | <b>Standard Error</b> | <b><i>p</i>-value</b> | <b>95% probability</b> |                    |
|   |                    |                       |                       | <b>Lower limit</b>     | <b>Upper limit</b> |
| <b>Intercept</b>                                    | 0.1484             | 0.0186                | < 0.0001              | 0.1070                 | 0.1898             |
| <b>% of GMO content</b>                             | 1.5504             | 0.1029                | < 0.0001              | 1.3210                 | 1.7797             |

\*acquired by SAS software

**Tabella XVII.** Cry1Ab test quantitativo eseguito in un intervallo di concentrazioni note tra 0% e 2%. In tabella sono riportati i valori: coefficiente di regressione, errore standard, *p*-value in un intervallo di confidenza del 95% di probabilità.

#### 4.3 Risultati e valutazione statistica del metodo immunoenzimatico innovativo per la quantificazione di Cry1Ab basato sulla tecnologia xMAP.

Durante i mesi in cui si sono svolti gli esperimenti che hanno portato alla sintesi *in vitro* di Cry1Ab e CP4EPSPS si sono contemporaneamente ottenuti i primi risultati con la tecnica xMAP. Con l'utilizzo degli anticorpi forniti dalla Monsanto sia contro Cry1Ab che contro CP4EPSPS si è iniziata la sperimentazione con la determinazione delle concentrazioni ottimali di anticorpi primari e secondari da utilizzare nelle analisi.

##### Quantificazione di Cry1Ab

Per stabilire la concentrazione ottimale di anticorpo primario da legare alle microsfere si è allestito un saggio in cui  $5 \times 10^6$  microsfere vengono legate rispettivamente a 1, 5, 25, 125  $\mu\text{g}$  di anticorpo. Il test è stato effettuato su una farina 0% e 2% MON810 e un controllo negativo contenente BSA. La capacità legante dell'anticorpo primario è stata testata su una concentrazione del 2% di OGM in modo che fosse evidente la capacità dell'anticorpo di riconoscere il target presente a basse concentrazioni.

Il segnale ottenuto ha un massimo di intensità di fluorescenza (MFI di 1427) in corrispondenza dei 25  $\mu\text{g}$  e non aumenta ulteriormente con l'aumentare della concentrazione dell' anticorpo a 125  $\mu\text{g}$ . I controlli, 0% e BSA, sono effettivamente negativi garantendo l'assenza di un segnale aspecifico o di fondo. Pertanto la concentrazione dell'anticorpo primario o capture probe da legare a  $5 \times 10^6$  microsfere è stata fissata in 25  $\mu\text{g}$ .

Per stabilire la concentrazione ottimale di anticorpo secondario da utilizzare si è deciso di testare 5 concentrazioni diverse di anticorpo: 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , su una scala molto ampia di percentuale OGM, da 0 al 100% in modo da verificare che la concentrazione scelta fosse non solo in grado di evidenziare il target alle basse concentrazioni, ma coprisse una scala di valori abbastanza ampia. La quantità di proteina contenuta nelle diluizioni corrisponde ad un range di contaminazione da farine OGM compreso tra lo 0.4% e il 100%. La tabella XVIII mostra i valori di fluorescenza rilevata dallo strumento alle diverse concentrazioni di anticorpo secondario utilizzate.

| % OGM   | MFI       |          |          |                 |          |
|---------|-----------|----------|----------|-----------------|----------|
|         | 0.5 µg/mL | 1 µg/mL  | 2 µg/mL  | <b>4 µg/mL</b>  | 8 µg/mL  |
| 100,00% | 24871,33  | 26692,67 | 25968,17 | <b>25735,25</b> | 22403,17 |
| 50,00%  | 25620,67  | 26679,33 | 25793,33 | <b>25235,00</b> | 22928,83 |
| 25,00%  | 24978,33  | 25740,33 | 24788,67 | <b>25355,92</b> | 20451,33 |
| 12,50%  | 20264,00  | 23676,00 | 21743,00 | <b>23943,08</b> | 18390,33 |
| 6,25%   | 12457,83  | 17824,00 | 17479,50 | <b>21633,92</b> | 13723,50 |
| 3,00%   | 7368,00   | 10020,00 | 10028,33 | <b>15966,92</b> | 9566,17  |
| 1,50%   | 4318,33   | 5883,17  | 6105,33  | <b>9099,25</b>  | 6428,50  |
| 0,78%   | 2202,17   | 3029,50  | 3396,50  | <b>5461,75</b>  | 4747,83  |
| 0,38%   | 952,33    | 1365,50  | 1809,00  | <b>3169,75</b>  | 2475,50  |
| 0,00%   | -5,00     | 2,50     | 4,00     | <b>12,58</b>    | 16,00    |

**Tabella XVIII: Valori di fluorescenza emessa a diverse concentrazioni di anticorpo secondario**

In grassetto la colonna con valori di fluorescenza massima ottenuti utilizzando 4 µg/mL di anticorpo secondario.

Eseguendo un saggio Luminex<sup>®</sup> con le condizioni sopra descritte (anticorpo primario 25 µg per 5x10<sup>6</sup> microsfere e anticorpo secondario 4 µg/mL) si è ottenuta una curva di quantificazione per Cry1Ab. I valori ottenuti sono stati riportati in figura 59.



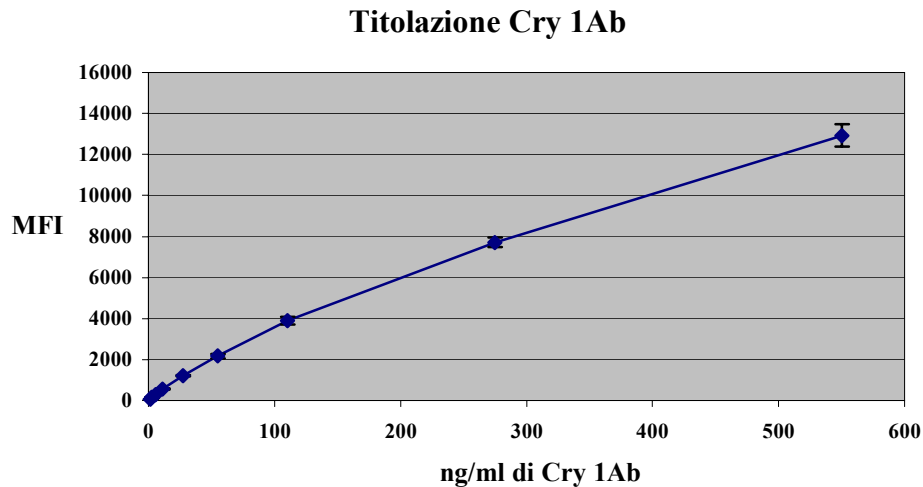


Figura 59: Fluorescenza emessa dai campioni contenenti di Cry 1Ab purificata da 0 a 550 ng/mL

Il grafico (fig.59) mostra l'andamento della fluorescenza rilevata dallo strumento alle diverse concentrazioni di proteina purificata utilizzata da 0 a 550 ng/mL.

Analizzando più in dettaglio la regione tra 0 e 12 ng/mL (fig. 60) è possibile verificare che il sistema riesce ad identificare concentrazioni minime di proteina pari a circa 2 ng/mL.

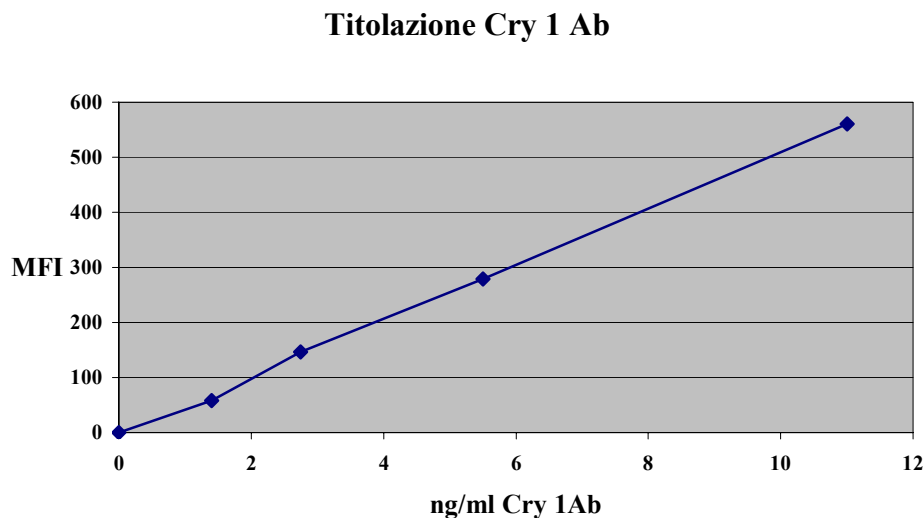


Figura 60: Fluorescenza emessa dai campioni contenenti di Cry1Ab purificata fino a 11 ng/mL

| Cry 1Ab (ng/mL) | MFI     | CV (%) |
|-----------------|---------|--------|
| 1.4             | 58,49   | 18     |
| 2.75            | 146,80  | 5.7    |
| 5.5             | 278,61  | 3.23   |
| 11              | 560,87  | 5.28   |
| 27.5            | 1210,94 | 2.06   |
| 55              | 2172,97 | 4.79   |
| 110             | 3898,69 | 4.6    |

**Tabella XIX: Fluorescenza emessa dai campioni contenenti Cry1Ab purificata e i relativi coefficienti di variazione**

La tabella XIX mostra i valori relativi ai coefficienti di variazione ottenuti dai test effettuati sulla proteina Cry1Ab purificata.

#### Saggio su farine certificate

E' stata ripetuta la stessa analisi su tre farine di mais certificate IRMM contenenti percentuali dello 0, 0.5 e 2% di farine di mais MON810.

Le fluorescenze rilevate sono mostrate di seguito (tab. XX, fig. 61).

| % OGM | MFI       |         |         |                |
|-------|-----------|---------|---------|----------------|
|       | 0.5 µg/mL | 1 µg/mL | 2 µg/mL | 4µg/mL         |
| 0 %   | 11,00     | 9,17    | -4,67   | <b>38,50</b>   |
| 0.5 % | 270,83    | 93,50   | 339,33  | <b>575,33</b>  |
| 2.0%  | 1311,00   | 1473,50 | 1531,67 | <b>2405,50</b> |

**Tabella XX: Fluorescenza emessa dai campioni di farine certificate IRMM**

I risultati indicano che il sistema è in grado di rilevare la presenza di basse concentrazioni di farine MON810, infatti il segnale ottenuto a percentuali dello 0.5% (oltre 570 MFI) e del 2% (2405 MFI) è ben al di sopra del rumore di fondo (valore massimo di 38,50 MFI). In tabella XXI sono mostrati i valori relativi al coefficiente di variazione (CV) per ogni valore testato.

### Farine di mais MON810 (IRMM)

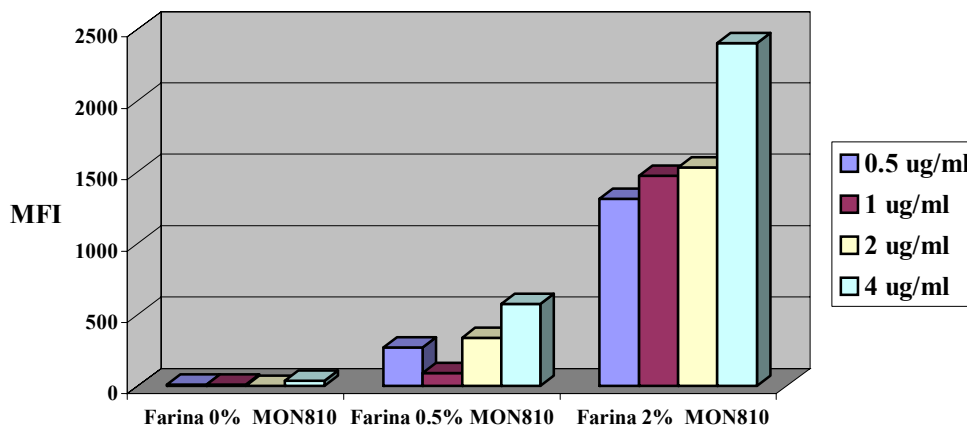


Figura 61: Test eseguito su mais MON810.

| % OGM | MFI (4 $\mu\text{g/mL}$ ) | CV (%) |
|-------|---------------------------|--------|
| 0 %   | 38,50                     | 35.4   |
| 0.5 % | 575,33                    | 7.60   |
| 2%    | 2405,50                   | 3.65   |

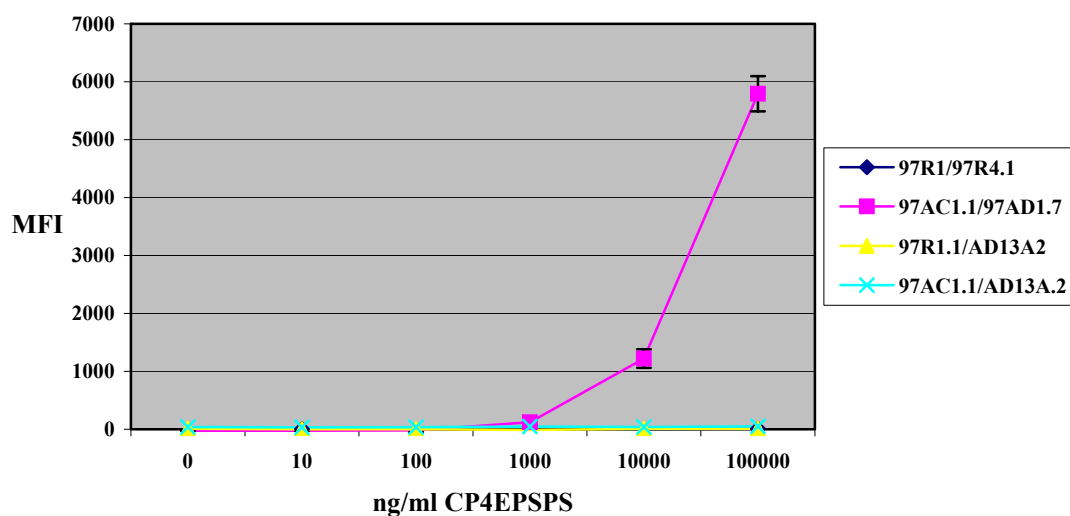
Tabella XXI: Fluorescenza emessa dai campioni di farine certificate IRMM e relativi coefficienti di variazione.

### Saggio su soia Roundup-Ready®

Il protocollo sviluppato per il saggio su MON810 è stato applicato in tutte le fasi anche per il saggio su soia Roundup Ready®. Purtroppo i risultati non sono stati altrettanto soddisfacenti

in quanto non viene rilevato alcun segnale nemmeno utilizzando farina di soia OGM 100%. Per verificare se i problemi riscontrati potessero derivare dalle fasi di preparazione dei campioni è stato eseguito un test al Luminex con la proteina CP4EPSPS purificata a concentrazioni da 0 a  $10^5$  ng/mL con tutte le coppie di anticorpi disponibili.

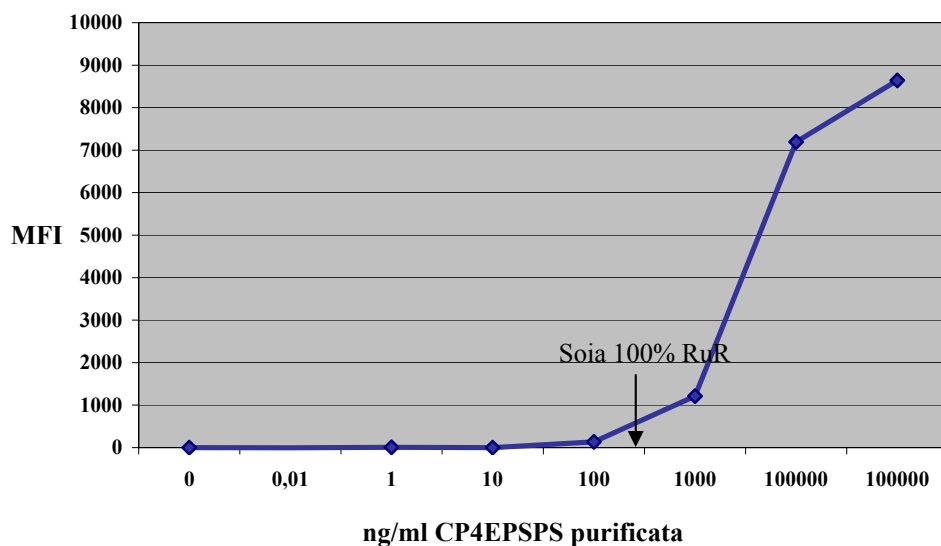
### Saggio su CP4EPSPS purificata



**Figura 62.** Test effettuato su CP4EPSPS proteina purificata.

La curva di fluorescenza prodotta con i risultati di un saggio Luminex utilizzando le diverse coppie di anticorpi disponibili su quantità crescenti di proteina purificata (da 0 a  $10^5$  ng/mL) mostra come il sistema non riesca a quantificare la proteina purificata nel range di interesse cioè da 0 a 100 ng/mL. Solo una coppia di anticorpi riesce a quantificare il target, ma la prima concentrazione visibile è di 10  $\mu$ g/mL, cioè circa 10.000 superiore al valore atteso. Per migliorare il saggio si è provato a prolungare i tempi di incubazione utilizzando solo la coppia 97AC1.1 - 97AD17. Il risultato è mostrato in figura 62.

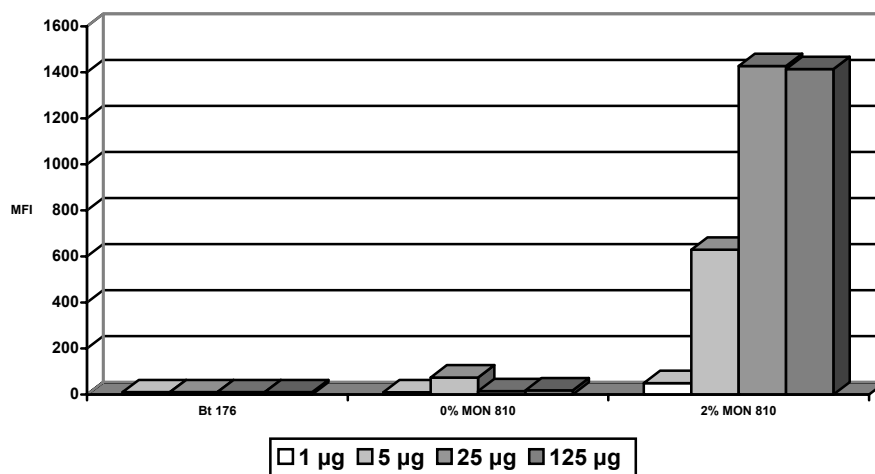
### Saggio su CP4EPSPS purificata



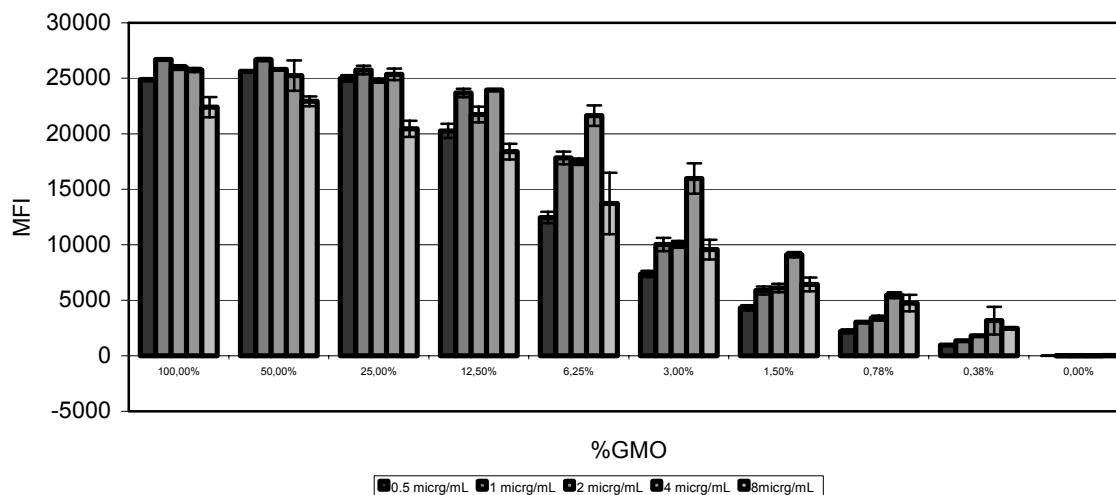
**Figura 63: Fluorescenza emessa dai campioni contenenti di CP4-EPSPS purificata dopo incubazioni protratte per più di un'ora.**

L'allungamento dei tempi di incubazione ha permesso di ottenere un miglioramento rilevante (100 volte) della sensibilità del sistema ma comunque non sufficiente a quanto richiesto. Lo strumento è in grado di rilevare una quantità di proteina di circa 100 ng/mL. In questo modo si potrebbero identificare solo farine 100% Roundup Ready<sup>®</sup> ma non percentuali inferiori. I risultati ottenuti con proteina purificata dimostrano che il fallimento del test non deriva dalle fasi di preparazione dei campioni, ma dall'inefficienza con cui la coppia di anticorpi lega la proteina (fig. 63). Il risultato indica chiaramente che con questi anticorpi non è possibile mettere a punto un protocollo valido per la quantificazione di soia Roundup-Ready<sup>®</sup> con il sistema Luminex.

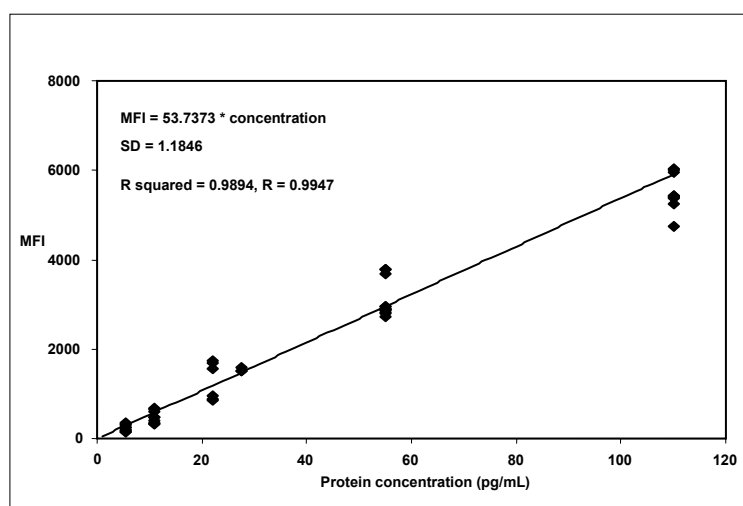
I risultati definitivi ottenuti applicando il protocollo sviluppato per la quantificazione di Cry1Ab utilizzando la tecnologia xMAP della Luminex Corp. sono stati descritti, statisticamente valutati e pubblicati sulla rivista J. Agric. Food Chem., come integralmente riportato in appendice e nelle figure da 64 a 68 e nelle tabelle da XXII a XXV.



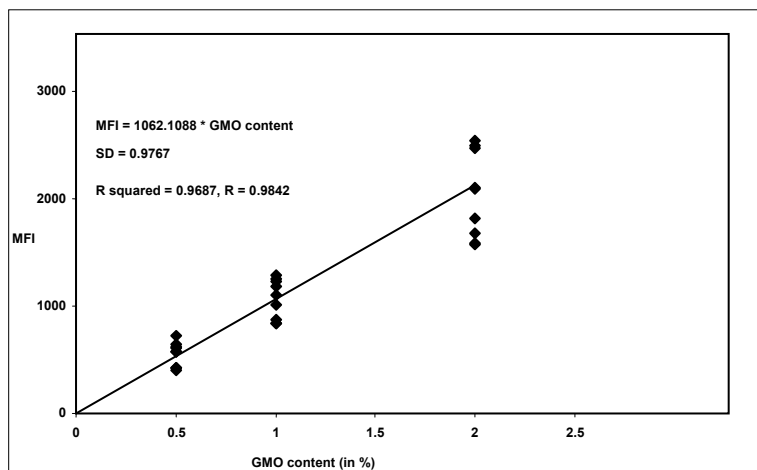
**Figura 64. Titolazione dell'anticorpo primario. Il test è stato effettuato utilizzando farine di: 0% e 2% di MON810 e Bt176 come controllo negativo. Il segnale di fluorescenza ottenuto è stato riportato in ordinata come Intensità di Fluorescenza Media (Mean Florescent Intensity - MFI). Dai risultati ottenuti 25 µg di capture antibody/5X10<sup>6</sup> microsferi si è rivelata la concentrazione ottimale.**



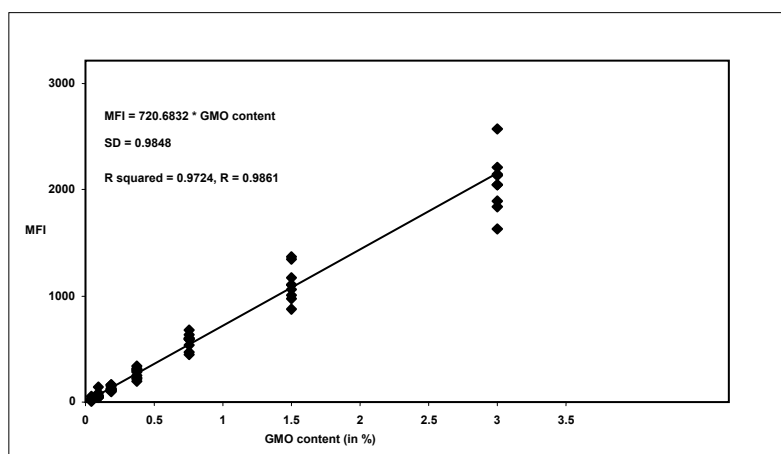
**Figura 65. Titolazione dell'anticorpo secondario: il test quantitativo per Cry1Ab è stato realizzato su una diluizione seriale di un campione di 100% MON810. Nel test si sono testate cinque differenti concentrazioni di anticorpo secondario (0.5, 1, 2, 4, 8 µg/mL). Il test si è dimostrato lineare in un range di concentrazioni di GMO tra 0% e 3%. La concentrazione ottimale di anticorpo secondario è stata determinata in 4 µg/mL. Il segnale satura ad un livello di contaminazione pari al 25%.**



**Figura 66. Curva di calibrazione lineare per il test quantitativo condotto per Cry1Ab. Regressione lineare calcolata utilizzando la proteina purificata in un range tra 0 e 110 ng/mL.**



**Figura 67.** Curva di calibrazione lineare per il test quantitativo condotto per Cry1Ab. Regressione lineare calcolata utilizzando tre concentrazioni di farine di mais MON810, pari a 0.5, 1, 2%.



**Figura 68.** Curva di calibrazione lineare per il test quantitativo condotto per Cry1Ab. Regressione lineare calcolata utilizzando estratti proteici del 100% di MON810 in un range di valori tra 0 e 3%.



|                        | Slope     | Standard error | p-value  | 95% probability bands |           |
|------------------------|-----------|----------------|----------|-----------------------|-----------|
|                        |           |                |          | Lower                 | Upper     |
| <b>GMO content**</b>   | 53.7373   | 0.8118         | < 0.0001 | 52.1041               | 55.3705   |
| <b>GMO content***</b>  | 720.6832  | 15.4123        | < 0.0001 | 689.8745              | 751.4919  |
| <b>GMO content****</b> | 1062.1088 | 37.4138        | < 0.0001 | 985.2037              | 1139.0140 |

\*Calcolati con il software SAS.

\*\*Caratteristiche di regressione lineare calcolate basandosi sui risultati ottenuti con la *proteina purificata*

\*\*\*Caratteristiche di regressione lineare calcolate basandosi sui risultati ottenuti con gli *standard IRMM*.

\*\*\*\*Caratteristiche di regressione lineare calcolate basandosi sui risultati ottenuti con le diluizioni del *100% MON810 IRMM*.

Tabella XXII. Parametri statistici che descrivono il test quantitativo per Cry1Ab.

| ID IRMM<br>CRMs | Observed<br>GMO content<br>(%) | Expected<br>GMO content (%) | MFI    | Recovery<br>(%) | Repeatability<br>RSD (%) | Intermediate<br>precision RSD<br>(%) | Predicted<br>concentration<br>(pg/mL) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|--------|-----------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| ST1             | 0.52                           | 0.5                         | 553.4  | 104.2           | 8.1                      | 26.8                                 | 10.3                                  |
| ST2             | 1.01                           | 1                           | 1069.9 | 100.8           | 1.9                      | 18.9                                 | 19.9                                  |
| ST3             | 1.92                           | 2                           | 2037.1 | 95.9            | 5.2                      | 21.9                                 | 37.9                                  |

Tabella XXIII. Caratteristiche della curva di regressione lineare del test condotto con materiali di riferimento IRMM MON810 allo 0.5%, 1% e 2%.

| ID of dilution | Observed GMO content (%) | Expected GMO content (%) | MFI    | Recovery (%) | Repeatability RSD (%) | Intermediate precision RSD (%) | Predicted concentration (pg/mL) |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| D1             | 0.034                    | 0.04                     | 24.5   | 85.0         | 44.8                  | 49.8                           | 0.46                            |
| D2             | 0.092                    | 0.093                    | 66.1   | 98.6         | 10.8                  | 44.2                           | 1.23                            |
| D3             | 0.183                    | 0.185                    | 132.2  | 99.1         | 7.1                   | 26.4                           | 2.46                            |
| D4             | 0.376                    | 0.375                    | 270.7  | 100.2        | 8.9                   | 18.5                           | 5.04                            |
| D5             | 0.792                    | 0.75                     | 571    | 105.6        | 6.7                   | 14                             | 10.6                            |
| D6             | 1.544                    | 1.5                      | 1112.6 | 102.9        | 6.4                   | 21.6                           | 20.7                            |
| D7             | 2.858                    | 3                        | 2059.5 | 95.3         | 7.4                   | 18                             | 38.3                            |

**Tabella XXIV. Caratteristiche della curva di regressione lineare del test condotto con estratti di MON810 100% in un range di diluizioni dall' 0.04% al 3%. Da notare: D1<LOD.**

| ID of purified protein | Observed concentration (pg/mL) | Expected concentration (pg/mL) | MFI     | Recovery (%) | Repeatability RSD (%) | Intermediate precision RSD (%) |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------|--------------|-----------------------|--------------------------------|
| PP1                    | 4.5                            | 5.5                            | 244.1   | 82.6         | 7.3                   | 33.9                           |
| PP2                    | 8.9                            | 11                             | 481.7   | 81.5         | 7.4                   | 31.9                           |
| PP3 (1)*               | 23.9                           | 22                             | 1283.5  | 108.6        | 5.6                   | 42.1                           |
| PP4 (2)**              | 28.7                           | 27.5                           | 1540.2  | 104.2        | 2.8                   | —                              |
| PP5                    | 57.4                           | 55                             | 3086.8  | 104.4        | 2.5                   | 16.4                           |
| PP6 (1)                | 102.5                          | 110                            | 5508.2  | 93.2         | 4.4                   | 7.9                            |
| PP7 (2)**              | —                              | 275                            | 10002.2 | —            | 3.4                   | —                              |
| PP8*                   | —                              | 440                            | 8628.4  | —            | 4.8                   | 14.4                           |
| PP9                    | —                              | 550                            | 11080.6 | —            | 3.5                   | 22.6                           |

\* risultati basati su 6 misure parallele

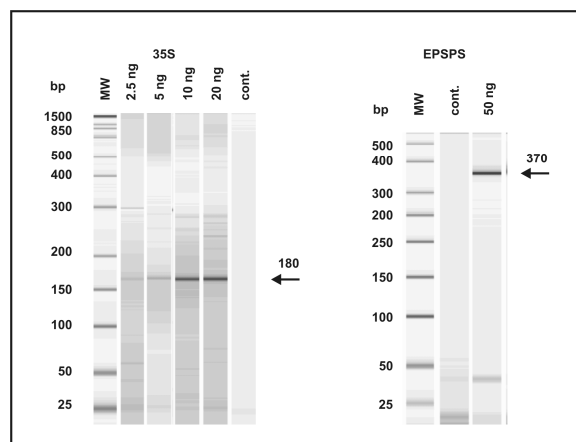
\*\* risultati basati su tre misure parallele

**Tabella XXV. Caratteristiche della curva di regressione lineare del test condotto con la proteina purificata Cry1Ab in un range tra 5.5 ng/mL e 550 ng/mL.**

## 5 Saggio per acidi nucleici, xMap Technology Luminex™

### 5.1 Risultati e valutazione statistica del metodo qualitativo basato sulla tecnologia xMap per acidi nucleici

Nella figura 69, 1  $\mu$ L di prodotto di PCR ottenuto sia per p35S che per epsps e' stato analizzato tramite lo strumento Bioanalyser, Agilent. La banda specifica per p35S e' presente in tutte le condizioni di amplificazione, 2.5 ng di DNAg sono gia' sufficienti per produrre una banda visibile. Al contrario la banda relativa ad epsps e' visibile solo nella reazione in cui sono stati utilizzati 50 ng di DNAg di partenza.



**Fig 69: A) Visualizzazione dei prodotti di PCR per p35S (180 bp) ed epsps (370 bp) ottenuta con lo strumento Bioanalyser Lab-on-Chip 500, Agilent.**

### Metodo qualitativo per mettere in evidenza la presenza di epsps

In tabella XXVI sono riportati i valori di deviazione standard (SD) e ripetibilita' del test (RDSr) calcolati partendo dai segnali di fluorescenza rilevati diluendo in maniera seriale con un fattore di diluizione di 1:5 il prodotto di PCR ottenuto per epsps.

Le quantità testate partono da 17 µL di prodotto di PRC, in tabella pari al 100%, fino a 0.528 µL pari all'1,6%. Da notare che i valori di RSD<sub>r</sub> calcolati sono tutti al di sotto del valore limite del 25% (Tab. XXVI).

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| Level (PCR prod.)         | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 1.6                       | 33665    | 183             | <b>8.6</b>           |
| 3.25                      | 52819    | 230             | <b>7.9</b>           |
| 6.25                      | 5284     | 73              | <b>1.8</b>           |
| 12.25                     | 50613    | 225             | <b>4.6</b>           |
| 25                        | 110      | 10              | <b>0.2</b>           |
| 50                        | 4826     | 69              | <b>1.0</b>           |
| 100                       | 106754   | 327             | <b>4.0</b>           |

\*based on two replicate measurements

**Tabella XXVI: Ripetibilità del metodo in un range tra il 100% e 1.6% della massima quantità di 17µL di prodotto di PCR (target epsps). I valori di RSD<sub>r</sub> risultano sempre inferiori alla soglia limite del 25%.**

Il valore di LOD del metodo calcolato per epsps sulla base dei risultati ottenuti con l'anti-sonda è uguale a 50.4 (MFI), mentre il valore di LOQ è risultato di 151.1 (MFI).

In tabella XXVII sono riportati i valori di SD e RSD<sub>r</sub> calcolati partendo dai segnali di fluorescenza rilevati utilizzando i prodotti di PCR. Gli amplificati sono stati a loro volta ottenuti amplificando DNA<sub>g</sub> di materiali di riferimento IRMM a concentrazione nota.

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (GMO%)              | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.5                       | 1127087  | 1062            | <b>25</b>            |
| 1                         | 1024921  | 1012            | <b>17</b>            |
| 2                         | 871830   | 934             | <b>14</b>            |

\*based on three replicate measurements

**Tabella XXVII. Ripetibilità del metodo utilizzando come materiale di partenza gli standard IRMM per soia RUR alle concentrazioni di 0.5, 1 e 2%, rispettivamente. Anche in questo caso i valori di RSD<sub>r</sub> risultano inferiori alla soglia limite del 25%.**

Ripetendo gli esperimenti in giorni differenti nell'arco di sei mesi i risultati sui materiali IRMM sono non immediatamente comparabili con i precedenti come dimostrato dall'aumento del valore di RSD<sub>R</sub> (tab XXVIII).

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (GMO%)                       | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 0.5                                | 13947931 | 3735            | <b>89</b>            |
| 1                                  | 14019730 | 3744            | <b>63</b>            |
| 2                                  | 5330504  | 2309            | <b>34</b>            |
| 100                                | 99336    | 315             | <b>3.8</b>           |

\*based on two replicate measurements

**Tabella XXVIII. Ripetibilità delle misure in tempi diversi. L'aumento dei valori di RSD<sub>r</sub> indica come le condizioni di freschezza dei reagenti incidano sulla ripetibilità delle misure per epsps.**

#### Metodo qualitativo per evidenziare tracce di p35S

In tabella XXIX sono riportati i valori di SD e RSD<sub>r</sub> calcolati partendo dai segnali di fluorescenza rilevati diluendo in maniera seriale con un fattore di diluizione di 1:5 il prodotto di PCR ottenuto per p35S.

I valori di RSD<sub>r</sub> calcolati sono tutti al disotto della soglia del 25%.

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (PCR prod)          | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 1.6                       | 1239     | 35              | <b>15</b>            |
| 3.25                      | 6149     | 78              | <b>5.0</b>           |
| 6.25                      | 123931   | 352             | <b>17</b>            |
| 12.25                     | 214102   | 463             | <b>13</b>            |
| 25                        | 381709   | 618             | <b>9.3</b>           |
| 50                        | 431534   | 657             | <b>7.8</b>           |
| 100                       | 274021   | 523             | <b>5.5</b>           |

\*based on two replicate measurements

**Tabella XXIX. Ripetibilità del metodo in un range tra il 100% e 1.6% della massima quantità di 17µL di prodotto di PCR (p35S). I valori di RSD<sub>r</sub> risultano sempre inferiori alla soglia limite del 25%.**

Ripetendo gli esperimenti in giorni differenti nell'arco di sei mesi, i risultati ottenuti non sono sempre comparabili come dimostrato dall'aumento del valore di RSD<sub>r</sub> che sale sino ad un massimo di 101 per il livello di 3.25% pari a 1,056µL di prodotto di PCR (Tab.XXX).

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (PCR prod)                   | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 1.6                                | 37517    | 194             | <b>80</b>            |
| 3.25                               | 2545980  | 1596            | <b>101</b>           |
| 6.25                               | 2305539  | 1518            | <b>73</b>            |
| 12.25                              | 131573   | 363             | <b>10</b>            |
| 25                                 | 6763484  | 2601            | <b>39</b>            |
| 50                                 | 6328753  | 2516            | <b>30</b>            |
| 100                                | 1729363  | 1315            | <b>14</b>            |

\*based on three replicate measurements

**Tabella XXX. Ripetibilità delle misure dei differenti livelli in tempi diversi. L'aumento dei valori di RSD<sub>R</sub> indica come le condizioni di freschezza dei reagenti incidono sulla ripetibilità delle misure per p35S.**

Il valore di LOD del metodo per p35S calcolato sulla base dei risultati ottenuti con l'anti-sonda è di 45.1 (MFI), mentre il valore di LOQ è risultato di 135.4 (MFI). Entrambi i valori sono comparabili con quelli ottenuti per epsps.

In tabella XXXI sono riportati i valori di SD e RSD<sub>r</sub> calcolati partendo dai segnali di fluorescenza rilevati monitorando la presenza di p35S utilizzando come campioni gli standard IRMM per soia RUR a concentrazione nota di trasgene.

I valori di RSD<sub>r</sub> calcolati sono tutti al di sotto della soglia del 25%.

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (nmol)              | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.5                       | 136608   | 370             | <b>3.0</b>           |
| 1                         | 13026    | 114             | <b>0.9</b>           |
| 2                         | 532109   | 729             | <b>6.3</b>           |

\*based on two replicate measurements

**Tabella XXXI. Ripetibilità del metodo utilizzando come materiale di partenza standard IRMM a concentrazione nota di soia RUR, rispettivamente di 0.5, 1 e 2%. Anche in questo caso i valori di RSD<sub>r</sub> risultano di molto inferiori alla soglia limite del 25%.**

Ripetendo gli esperimenti in giorni differenti nell'arco di sei mesi i risultati sui materiali IRMM sono ancora comparabili come dimostrato dall'aumento del valore di RSD<sub>r</sub> che non sale oltre il 17.6% (Tab.XXXII).

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (nmol)                       | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.5                                | 4727753  | 2174            | 17.6                 |
| 1                                  | 4967451  | 2229            | 17.5                 |
| 2                                  | 159270   | 399             | 3.5                  |

\*based on two replicate measurements

**TabellaXXXII. Ripetibilità delle misure dei differenti livelli in tempi diversi. L'aumento dei valori di RSD<sub>r</sub> indica come le condizioni di freschezza dei reagenti incidono sulla ripetibilità delle misure per p35S nei materiali di riferimento.**

### Sensibilità del metodo

Per valutare la sensibilità del sistema si è diluita ulteriormente l'anti-sonda di p35S. Da 0.4 nmoli si è scesi fino a 0.78125 femtomoli, ottenendo i risultati di RDS<sub>r</sub> e RDS<sub>R</sub> riportati nelle tabelle XXXIII e XXXIV.

I valori di RSD<sub>r</sub> non salgono sopra il 12,2%, indice di una buona ripetibilità del metodo mentre mentre aumentano i primi tre livelli in tabella XXXIII indicando che nell'arco di sei mesi la ripetibilità scende fino a livelli non accettabili per le concentrazioni più basse.

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (nmol)              | Variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.00078125                | 6597     | 81              | 2.8                  |
| 0.0015625                 | 179061   | 423             | 12.2                 |
| 0.003125                  | 74415    | 273             | 6.3                  |
| 0.00625                   | 23300    | 153             | 2.7                  |
| 0.0125                    | 223391   | 473             | 6.2                  |
| 0.025                     | 21172    | 146             | 1.5                  |
| 0.05                      | 678028   | 823             | 7.2                  |
| 0.1                       | 1302681  | 1141            | 8.7                  |
| 0.2                       | 43212    | 208             | 1.5                  |
| 0.4                       | 550993   | 742             | 5.9                  |

\*based on two replicate measurements

**Tabella XXXIII. Ripetibilità del metodo in un range tra 0.78125 femtomoli e 0.4 nmoli di target (p35S). I valori di RSD<sub>r</sub> risultano sempre inferiori alla soglia limite del 25%.**

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (nmol)                       | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 0.00078125                         | 3706229  | 1862            | <b>64</b>            |
| 0.0015625                          | 3168141  | 1996            | <b>57</b>            |
| 0.003125                           | 2010430  | 1511            | <b>35</b>            |
| 0.00625                            | 779781   | 839             | <b>15</b>            |
| 0.0125                             | 73150    | 545             | <b>7.2</b>           |
| 0.025                              | 1763967  | 1255            | <b>13</b>            |
| 0.05                               | 4532631  | 1560            | <b>14</b>            |
| 0.1                                | 10248984 | 2339            | <b>18</b>            |
| 0.2                                | 6520700  | 2517            | <b>19</b>            |
| 0.4                                | 6253197  | 2578            | <b>20</b>            |

\*based on three replicate measurements

**Tabella XXXIV. Ripetibilità delle misure dei differenti livelli testati in tempi diversi. L'aumento dei valori di RSD<sub>R</sub> indica come le condizioni di freschezza dei reagenti incidano sulla ripetibilità delle misure per p35S soprattutto a concentrazioni inferiori a 6.25 femtomoli.**

Il valore di LOD del metodo per p35S calcolato sulla base dei risultati ottenuti con l'anti-sonda così diluita è di 165.8 MFI, mentre il valore di LOQ è risultato di 497.5 (MFI).

Vista la capacità del metodo di rilevare la presenza dell'anti-sonda a concentrazioni così basse, si sono misurati anche campioni di PCR molto diluiti. I risultati riportati nelle tabelle XXXV e XXXVI sono relativi alla misura di un campione IRMM di farina di soia RUR al 5%. 2.5 ng di DNA<sub>g</sub> di questo campione sono stati amplificati ed il prodotto di PCR è stato diluito in maniera seriale con un rapporto di 1:5.

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| PCR product (%)           | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.0064                    | 0.13     | 0.36            | <b>0.46</b>          |
| 0.032                     | 53       | 7               | <b>1.1</b>           |
| 0.16                      | 5384     | 73              | <b>2.1</b>           |
| 0.8                       | 19443    | 139             | <b>1.4</b>           |
| 4                         | 906      | 30              | <b>0.3</b>           |
| 20                        | 242374   | 492             | <b>4.6</b>           |
| 100                       | 190697   | 436             | <b>4.1</b>           |

\*based on two replicate measurements

**Tabella XXXV. Ripetibilità del metodo. Il prodotto di PCR è stato diluito serialmente con un rapporto di 1:5. In tabella sono riportati i valori di RSD<sub>r</sub> per tutti i livelli di diluizione. I valori di RSD<sub>r</sub> risultano sempre inferiori alla soglia limite del 25%.**



| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| PCR product (%)                    | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 0.0064                             | 0.86     | 0.93            | <b>1.18</b>          |
| 0.032                              | 1779.8   | 42              | <b>6.6</b>           |
| 0.16                               | 748.5    | 27              | <b>0.8</b>           |
| 0.8                                | 1227.0   | 35              | <b>0.4</b>           |
| 4                                  | 418.0    | 20              | <b>0.2</b>           |
| 20                                 | 19014.9  | 138             | <b>1.3</b>           |
| 100                                | 109779.0 | 331             | <b>3.1</b>           |

\* based on three replicate measurements

**Tabella XXXVI. Ripetibilità delle misure dei differenti livelli testati in giorni diversi nell'arco di due settimane. I valori di RSD<sub>R</sub> sono comparabili con i valori di RSD<sub>R</sub>.**

---

## **V DISCUSSIONE**

---

### **1 Metodi di analisi e legislazione europea**

#### 1.1 Limiti della legislazione

La legislazione europea, nell'esprimere la presenza di OGM in qualsiasi contesto, utilizza un valore di percentuale definito dal rapporto tra il peso del materiale GM ed il peso totale dell'oggetto considerato moltiplicato per 100.

Il significato di questa unità di misura è incerto e soprattutto di scarsa utilità pratica nel momento in cui ci si pone di fronte alla necessità di quantificare gli OGM attraverso metodi di analisi basati sulla misura di acidi nucleici o di proteine. Nell'applicazione dei metodi di RT-PCR questa percentuale viene tradotta nella pratica di laboratorio in numero di copie di transgene presenti all'interno di un genoma aploide (Garcia-Canas, 2004). Questa conversione implica una serie di approssimazioni che inficiano notevolmente il risultato. Le cause di incertezza sono più d'una, ma in primo luogo andrebbe considerato che il contenuto di DNA nei diversi tessuti vegetali non è una costante. In particolare, nei semi di mais si ritrovano sia tessuti germinali che tessuti di origine materna, ciò rende praticamente impossibile definire con esattezza il numero di genomi aploidi presenti (Trifa, 2003).

Sommando questa prima incertezza all'errore strumentale dell'RT-PCR, attestato intorno al 30% (fonte JCR-CRL, Ispra), si ottiene una stima del contenuto di OGM affetta da un errore considerevole. Per ciò che riguarda i metodi proteici, per ora ancora poco utilizzati, il dibattito sul significato dell'unità di misura non è ancora stato concretamente affrontato. In questo caso risulta prima di tutto ancor più complicato definire una relazione quantitativa tra presenza della proteina prodotta dal transgene e numero di copie del transgene stesso, in secondo luogo si dovrà affrontare il problema della conversione di questo dato in un valore rapportabile alla "percentuale" così come espressa dalla legislazione europea. Per la completa attuazione delle normative con le quali viene richiesta la completa tracciabilità e rintracciabilità di tutti gli ingredienti presenti negli alimenti, la problematica delle unità di misura è sicuramente un punto di importanza fondamentale.

## **2 Limiti di informazione**

### 2.1 Reperimento di campioni e reagenti

Come descritto nell'introduzione, lo sviluppo di anticorpi specifici contro le proteine codificate da piante GM è un processo indispensabile durante la fase di creazione e sviluppo della nuova varietà. Quindi in teoria numerosi anticorpi contro tutte le varietà di "proteine-GM related" potrebbero essere disponibili ed invece non lo sono. La stessa problematica riguarda la disponibilità dei materiali di riferimento o delle proteine purificate che potrebbero essere utilizzare come standard nei saggi di analisi. In realtà non è possibile trovare in commercio alcun anticorpo che riconosca proteine OGM; solamente la ditta Abraxis, produttrice di kit ELISA, ha messo recentemente in catalogo la proteina Cry1Ab purificata e due anticorpi che la riconoscono. Per allestire altri saggi l'unica alternativa è quella di produrre in laboratorio gli anticorpi ed i relativi materiali di riferimento affrontando tutti i costi e le incertezze che ne derivano. Anche in questo caso, però, ci sono difficoltà insormontabili, perché reperire le informazioni necessarie per clonare l'intero transgene non è possibile. In banca dati (NCBI) sono presenti solamente minime parti della sequenza del trasgene, utili solo per il controllo della sequenza amplificata dai metodi validati per l'identificazione e quantificazione dell'evento. L'intera sequenza dei costrutti è contenuta nei dossier presentati all'Autorità competente per l'ottenimento dell'autorizzazione alla commercializzazione, ma questa informazione è strettamente confidenziale e non divulgabile. Pertanto senza un accordo diretto con i produttori delle varietà transgenica, non è possibile arrivare alle informazioni necessarie per il clonaggio, l'espressione e la conseguente produzione di anticorpi per il riconoscimento della proteina. Il problema dell'assenza di una completa informazione è ancora più importante se si pensa all'impossibilità oggettiva che si ha attualmente di monitorare gli OGM non approvati in Europa, per i quali non si hanno né informazioni sulla sequenza, né materiali di riferimento. Per questi motivi un completo monitoraggio di tutte le varietà OGM esistenti è attualmente irrealizzabile anche se previsto per legge.

### **3 Espressione di Cry1Ab e CP4EPSPS**

#### 3.1 Clonaggio ed espressione di Cry1Ab

Le sequenze inserite nelle piante GM commercializzate in Europa non sono generalmente disponibili, se non con rarissime eccezioni. Il cDNA completo di Cry1Ab è stato pertanto ricavato da mais Bt11 e non da mais MON810 come in origine pianificato, perché MON810 è protetto da brevetto. Bt11 e MON810 codificano entrambi per la proteina Cry1Ab attiva, ma la proteina espressa da mais MON810 contiene, oltre al sito attivo, anche altri domini funzionali. Questa situazione si riscontra per la maggior parte degli OGM già presenti sul mercato, limitando enormemente la possibilità di sviluppare metodi analitici per il loro controllo. Le fasi di clonaggio fino all'espressione della proteina non hanno presentato particolari difficoltà, mentre più problematica è stata la determinazione delle condizioni di induzione e recupero della proteina. Malgrado i tentativi fatti per aumentarne la produzione, non si sono raggiunti valori superiori a 100 µg/mL con entrambi i vettori di espressione pDEST™15 e pDEST™24 utilizzati. Un'aliquota di 1 mg di proteina è stata inviata alla Moravian Biotechnology per la produzione dei relativi anticorpi monoclonali.

#### 3.2 Clonaggio ed espressione di CP4EPSPS

Il disegno sperimentale per il clonaggio e l'espressione di CP4EPSPS e Cry 1Ab è stato identico. A differenza di Cry1Ab, CP4-EPSPS è stata espressa più abbondantemente utilizzando il vettore di espressione pDEST™15.

Un'aliquota di 1 mg di proteina è stata inviata alla Moravian Biotechnology per la produzione dei relativi anticorpi monoclonali.

### **4 ELISA Reverse m&d e OGM**

#### 4.1 Saggio immunoenzimatico

Alle ogive dell'ER si sono legati con successo entrambi gli anticorpi monoclonali diretti contro Cry1Ab ed EPSPS con il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. I dispositivi

plastici immunoassorbenti utilizzati in questo lavoro, sia per il test singolo che per il multiplo, sono stati progettati con quattro ogive, ogni device è stato pertanto sensibilizzato con entrambi gli anticorpi dedicando due ogive alla misura di Cry1Ab e due per EPSPS nel caso del test multiplo. Tutti i risultati riportati in questa tesi e nell'articolo pubblicato sono stati ottenuti effettuando ogni prova almeno tre volte ed il disegno sperimentale ha previsto la misura di ogni campione in triplicato. Per lo sviluppo del test quantitativo per il riconoscimento della proteina di Cry1Ab, due ogive del device sono state legate con gli anticorpi monoclonali specifici, le altre due ogive sono state dedicate ai controlli. La prova è stata ottimizzata in modo da raggiungere i requisiti standard imposti per l'analisi di GMO secondo le norme ISO 21572:2002 e quanto descritto da Paoletti et al, 2005. In particolare, le condizioni del saggio sono state ottimizzate per raggiungere i valori di LOD e di LOQ che permettano la rilevazione e la quantificazione di contaminazioni intorno allo 0.1% come permette ELISA convenzionale (Ermolli, 2005). L'analisi quantitativa di Cry1Ab è stata effettuata all'interno di un range di contaminazione dallo 0.1 al 2%. Per verificare ulteriormente la capacità del test di distinguere differenze minime tra diversi livelli di contaminazione si sono allestiti saggi con i campioni contaminati con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5%. In tutti i casi, i parametri considerati per la valutazione del metodo sono stati: accuratezza, ripetibilità del test all'interno dei singoli livelli (RSD<sub>r</sub>), ripetibilità del test in tempi diversi (RSD<sub>R</sub>), deviazione standard, LOD e LOQ. I risultati ottenuti indicano che: la linearità della risposta si ottiene all'interno del range di contaminazione tra lo 0% e il 0.5% ed è stata ulteriormente confermata quando la stessa analisi è stata effettuata in un range più ampio, da 0% al 2%. I limiti di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati espressi in percentuale e sono stati calcolati come segue:  $LOD = [3x \text{ (bianco) } SDb \text{ (bianco)}] / q1$  ( $q1 = slope$  della linea di regressione),  $LOQ = [9x \text{ (in bianco) } SDb \text{ (bianco)}] / q1$ . Tenendo conto della pendenza della linea di regressione calcolata nell'intervallo tra 0.1 e 0.5%, LOD risulta uguale a 0.0054 ed il valore di LOQ di 0.0162. Nello stesso modo si sono calcolati i limiti di rilevazione e di quantificazione tenendo conto della pendenza della linea di regressione ottenuta nell'intervallo più ampio, 0.1 - 2%. I valori calcolati  $LOD = 0.0056$ , e  $LOQ = 0.0168$  sono valori paragonabili ai

precedenti, confermando la bontà del test. L'accuratezza del metodo è definita come la vicinanza fra un risultato della prova ed il valore di riferimento accettato (valore teorico). L'accuratezza del metodo è stata calcolata con la formula  $(\text{valore osservato}/\text{valore teorico}) \times 100$  ed espresso in %. Tal valore è considerato accettabile all'interno del  $\pm 25\%$  del valore teorico accettato. Come indicato nei Risultati, l'accuratezza del metodo assume valori compresi tra 86.52 e 113.47, ovvero all'interno dell'intervallo di valori considerati accettabili. Lo scarto quadratico medio di ripetibilità (RSD) espresso dalla formula  $RSD_r = DS_r/(\text{in } \%)$  è stato usato per caratterizzare le prestazioni dell'analisi nelle circostanze di ripetibilità. I valori ottenuti sono anche in questo caso all'interno dell'intervallo di valori di accettabilità (Paoletti, 2005). Oltre al protocollo per la quantificazione di Cry1Ab è stato messo a punto un protocollo qualitativo multiplo per valutare la presenza di due proteine simultaneamente, Cry1Ab presente in mais GM e CP4EPSPS presente in soia RUR. In questo caso, due delle quattro ogive del dispositivo sono state legate con l'anticorpo che riconosce EPSPS e le altre due ogive con l'anticorpo specifico per Cry1Ab. Le ogive dei dispositivi sono state sensibilizzate come indicato nella sessione dei Materiali e Metodi. Per CP4EPSPS è stato necessario stabilire la quantità ottimale del mezzo di coltura contenente l'anticorpo da utilizzare per la sensibilizzazione delle ogive. L'anticorpo non purificato presente nel mezzo di coltura dell'ibridoma è stato utilizzato in tre quantità differenti. I risultati dei test sono stati quindi analizzati mediante 3 differenti test statistici, t-test, test del Tukey, t-test di Bonferroni mediante ANOVA (software SAS). La quantità ottimale di proteina totale che deve essere utilizzata per la sensibilizzazione delle ogive è risultata di 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; solo in questo caso infatti si è registrata una differenza significativa fra campioni con GM e campioni senza OGM. Il metodo è stato valutato su campioni privi di OGM e su campioni contenenti una miscela con diverse proporzioni di soia 1% GM e di mais 1% GM. I risultati sono stati statisticamente valutati al fine di verificare la capacità del test di distinguere fra il campione privo di OGM e tutti gli altri campioni con contaminazione di OGM. L'analisi statistica effettuata con tre test differenti, t-test, test del Tukey e t-test di Bonferroni (ANOVA software SAS), ha confermato i risultati ottenuti. In conclusione, se applicabili, i metodi proteici risultano economicamente convenienti, pratici e rapidi,

adatti come screening test e per analisi multiple, particolarmente comodi quando si devono testare grandi quantità di campioni. In particolare, i test multipli facilitano ed accelerano l'indagine completa dei prodotti alimentari come dei singoli ingredienti, così come l'identificazione di contaminazioni trasversali. Infatti, in adempimento agli obblighi di legge dell' Ue in materia di controlli alimentari e di sicurezza (Rif. 1139/98, 2003/99/EC, 2004/43/EC, 466/2001/EC) ed in considerazione con quanto richiesto per escludere la presenza di malattie, agenti inquinanti o contagiosi, presenza di OGM e altro ancora, innumerevoli analisi di laboratorio devono essere effettuate prima che un alimento possa essere commercializzato. Nella messa a punto del metodo i parametri imposti per legge perché un metodo possa essere validato ed utilizzato dalle autorità di controllo sono stati tutti rispettati, il metodo risulta pertanto conforme a quanto richiesto dalle normative europee. In conclusione, il presente lavoro descrive l'applicazione del ER e lo sviluppo di due protocolli per l'analisi di GMO in matrici alimentari; la qualità dei risultati ottenuti, la versatilità e la flessibilità del metodo giustificano ulteriori sviluppi nell'applicazione del sistema per il monitoraggio di altri target significativi per la sicurezza in campo agro-alimentare.

## **5 Applicazione della tecnologia xMAP per la quantificazione di Cry1Ab**

### 5.1 Saggio immunoenzimatico

Questo studio ha evidenziato come l'uso dei saggi immunoenzimatici possa essere alla base di nuove applicazioni in campo biotecnologico, in particolare qui applicato al controllo degli organismi geneticamente modificati. Il sistema Luminex proposto può essere utilizzato con piastre da 96, come in questo lavoro, o da 384-pozzetti, oltre alla possibilità di analizzarne simultaneamente quattro piastre con la versione dello strumento più avanzata HTS al posto del modello base Luminex-100 da noi utilizzato. Con la versione HTS, acronimo di High Through put System, lo strumento Luminex offre la possibilità di automatizzare il saggio e renderlo adatto all'analisi di centinaia di campioni simultaneamente. Con la versione Luminex-100 l'analisi dei campioni su piastra da 96-pozzetti è completa in circa due ore, cinquanta minuti per la preparazione del campione ed un'ora per analisi dei campioni attraverso lo strumento. La valutazione

del costo del saggio è direttamente collegata al numero di target inclusi nel saggio stesso. Per singola analisi il costo è comparabile a quello di una RT-PCR o di un ELISA test (uno e due Euro, rispettivamente) ma nel caso di rilevazioni simultanee multiple i costi per campione vengono ridotti proporzionalmente. In generale, la possibilità di monitorare più target contemporaneamente fornisce una visione più completa e più approfondita del campione, rendendo i test immunoenzimatici ancor più attraenti. Si pensi per esempio all'avvento degli OGM di seconda generazione contenenti transgeni multipli. Il monitoraggio anche di questi nuovi prodotti biotecnologici ci spinge a sviluppare nuovi approcci metodologici che ci consentano di compiere le analisi in modo efficace, esaustivo ed economicamente accettabile. L'informazione e la sicurezza sono due argomenti chiave nella politica della Commissione europea a difesa dei consumatori. Pertanto, l'identificazione e tracciabilità degli OGM sia nei foraggi che nei cibi dovrà essere assicurata e ciò sarà fattibile solo con sistemi di analisi che consentano il monitoraggio di molteplici "contaminazioni" simultaneamente sia in campioni grezzi che in prodotti alimentari e foraggi finiti. A tale riguardo, la prima applicazione della piattaforma immunologica Luminex-100 utilizzata per l'analisi quantitativa di una proteina OGM dimostra come i tradizionali saggi enzimatici potrebbero evolversi (Ermolli, 2006). In particolare, il saggio qui ottimizzato è stato calibrato in modo da raggiungere valori di LOD e LOQ tali da permettere la rilevazione e la quantificazione di contaminazioni intorno allo 0.1%, in linea con i convenzionali test ELISA. Purtroppo, a causa della mancanza di anticorpi commercialmente disponibili, non è stato possibile sfruttare completamente la capacità di analisi multipla del sistema. Nel manoscritto pubblicato, abbiamo potuto riportare soltanto la quantificazione singola di Cry1Ab. Dai risultati possiamo però evincere che il sistema è lineare ed ha prestazioni ottimali tra valori di percentuali di OGM tra lo 0% e il 3%: ciò risulta particolarmente utile per valutare livelli di contaminazione intorno allo 0.9% (soglia di legge sopra alla quale scatta l'obbligo di etichettatura). Questo risultato è paragonabile alle prestazioni dei kit commerciali ELISA e dell'ELISA Reverse per il quale, usando gli stessi anticorpi, la linearità è stata realizzata all'interno del range di valori tra lo 0% e il 2% (Ermolli, 2006; Ermolli, 2006). Inoltre la valutazione degli altri parametri, quali l'accuratezza ed la RDS,



conferma che il sistema è paragonabile all'ER e all'ELISA tradizionale. In particolare, l'accuratezza ed i valori di RDS sono tra l'81.5 e il 108.6% e di 1.9-10.8% (tranne punto D1<LOD), rispettivamente, in accordo con i valori dell'ER e dell'ELISA, dove l'accuratezza ha valori tra l'86.52 e il 113.47%; mentre l'RSD da 2.05 a 14.17% (Ermolli, 2006). I kit commerciali ELISA hanno, in generale, valori di accuratezza inferiori, cioè nella gamma di 52.9-266.4% e RDS da 7.6% a 16.1% (Ermolli, 2006). I valori di LOD e di LOQ del test xMAP risultano inoltre paragonabili ai valori di LOD e di LOQ dell'ER. Effettivamente, LOD e LOQ dell'ER sono uguali a 0.0056% ed a 0.0168%, rispettivamente, mentre LOD del test basato sull'xMAP Tech., calcolato usando tre materiali differenti (la proteina purificata, diluzioni dell'estratto della proteina MON810 di 100% e di CRMS) è di 0.764 pg/mL, 0.018% (0.357 pg/mL) e 0.056% (~ 0.751 pg/mL), rispettivamente; mentre il valore migliore di LOQ è stato realizzato usando CRMS ed è di 0.054% (~ 1.072 pg/mL) (Ermolli, 2006). LOD e LOQ dei kit commerciali ELISA sono di 0.034-0.107% e di 0.082-0.259%, rispettivamente (Ermolli, 2006). In conclusione, il potenziale del sistema qui descritto pare in grado di compiere un'analisi multipla all'interno della stessa preparazione di campione con valori di sensibilità ed accuratezza adeguati. Anche nel settore agro-alimentare, selezionando un pannello di anticorpi differenti ognuno dei quali legato a un set di microsferi fluorescenti, sarebbe possibile la quantificazione di parecchi target simultaneamente come già dimostrato in altri campi d'applicazione (ISO 21572:2002; ISO 5725:1994; IUPAC, 2007, Carson, 1999; Seideman, 2002; Martins, 2002; Yang, 2001; Ye, 2001).

## 5.2 Saggio per acidi nucleici

Il saggio multiplo per la messa in evidenza delle sequenze specifiche di epsps e p35S mediante l'applicazione della Tecnologia xMap si è rivelato all'altezza delle aspettative, ovvero versatile e sensibile come atteso. L'estrazione del DNAg e l'amplificazione dei due target non ha presentato nessun problema specifico. Il disegno delle sonde e degli inneschi è stato realizzato sulla base della sequenza riportata in figura 30 con l'ausilio di un software commerciale (Premier Primer 4) con il quale si è verificata l'assenza di falsi appaiamenti. Attraverso la diluizione seriale dell'anti-sonda per p35S è stato possibile

testare il grado di sensibilità del metodo definendo i parametri di LOD e LOQ, rispettivamente pari a 45.1 (MFI) e 135.4 (MFI).

In particolare, per p35S e' stato possibile diluire l'anti-sonda fino a 0.78125 femtomoli ed ottenere ancora un segnale rilevabile con un valore di RSDr di soli 2.8. A tale diluizione si registra di contro una perdita di riproducibilità del saggio nel tempo. Cio' probabilmente e' indice di instabilità dei reagenti a livelli così spinti di diluizione. I valori di RSD<sub>R</sub> per gli ultimi tre livelli di diluizione testati non sono infatti più accettabili, risultando di 35, 57 e 64% rispettivamente. Pertanto l'ultima diluizione con un valore di RSDr e RSD<sub>R</sub> accettabile e' di 6,25 nmoli. Tale quantità di target e' generalmente considerata presente in un solo microlitro di prodotto di amplificazione con una buona efficienza di reazione, considerando che nel saggio e' possibile aumentare la quantità di prodotto di reazione da testare fino a 17 microlitri, pare evidente che il metodo e' sufficientemente sensibile allo scopo.

L'efficienza di amplificazione e' ovviamente un punto cruciale per la riuscita del saggio, ma non determinante. Cio' e' dimostrato chiaramente da epsps dove si e' riscontrata un'efficienza di amplificazione molto più bassa rispetto a quella di p35S. Consideriamo la figura 69, la banda di epsp e' visibile solo se la reazione di amplificazione viene condotta su almeno 50 ng di DNA genomico, mentre la banda di p35S e' visibile già partendo da 2,5 ng di DNAg per reazione. In seguito però il saggio non conferma questa differenza iniziale facendo registrare dei valori di LOD, LOQ, RSDr e RSD<sub>R</sub> paragonabili rispetto a quelli osservati per p35S. Questa evidenza ci permette di confidare nel metodo per lo screening multiplo di numerosi eventi simultaneamente. In un'unica amplificazione si potrebbero "marcare" i diversi target da identificare in seguito con lo strumento Luminex. La marcatura dei target condotta tramite PCR puo' assicurare che per ogni target ci sia, alla fine dei cicli di amplificazione, un numero minimo di molecole marcate che possono essere individuate dallo strumento Luminex. Essendo questa applicazione del metodo puramente qualitativa, non e' più determinante l'efficienza di reazione delle singole reazioni di amplificazione, ma solo che alla fine dei cicli di amplificazione ogni target sia rappresentato da un numero di molecole marcate visibili

allo strumento. Attualmente si sta implementando il sistema cercando di ottimizzare il saggio per un numero minimo di dieci target.

## Articoli

## 1° Articolo

Accred Qual Assur (2006) 11: 55–57  
DOI 10.1007/s00769-005-0027-2

PRACTITIONER'S REPORT

Monica Ermolli  
Anna Fantozzi  
Massimiliano Marini  
Domenico Scotti  
Branko Balla  
Sebastian Hoffmann  
Maddalena Querci  
Claudia Paoletti  
Guy Van den Eede

### Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins

Received: 26 May 2005  
Accepted: 22 August 2005  
Published online: 23 November 2005  
© Springer-Verlag 2005

Presented at AOAC Europe/Eurachem Symposium March 2005, Brussels, Belgium

M. Ermolli (✉) · A. Fantozzi ·  
M. Marini · D. Scotti · B. Balla ·  
S. Hoffmann · M. Querci · C. Paoletti ·  
G. Van den Eede  
Biotechnology and GMOs Unit and  
ECVAM Unit, Institute for Health and  
Consumer Protection (IHCP), European  
Commission, DG Joint Research Centre  
(JRC),  
Via E. Fermi 1,  
21020 Ispra (VA), Italy  
e-mail: monica.ermolli@jrc.it  
Tel.: +39-0332-785149  
Fax: +39-0332-785904

**Abstract** GMO protein content in maize flours or fresh crops can be easily assessed by the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and immunochromatographic (lateral flow) strip tests commercially available. Therefore, ELISA can be seen as a useful tool for screening, for control purposes and for traceability implementation. In order to highlight the importance of monitoring GMO protein presence in food products and to investigate the performance of representative ELISA commercial kits, we evaluated three commercial kits by measuring the amount of Cry1Ab/Cry1Ac in IRMM certified reference materials.

**Keywords** GMO · Immunoassay · ELISA · Cry 1Ab

#### Introduction

A large number of qualitative and quantitative methods are currently available for GMO detection. At the moment the most commonly applied approach for GMO quantification is based on the real-time PCR technique (RT-PCR). The RT-PCR is an expensive and sophisticated technique requiring well-equipped laboratories and trained operators. Another approach, based on protein detection, could be eventually used for screening purposes when a huge number of samples have to be analysed. The protein-based methods have the potential of serving as cost-efficient, practical and quick tools for screening, for multiplex analysis and for traceability. For example, Cry 1Ab GMO protein content in maize flours or fresh crops can be easily assessed by the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) tests commercially available. In the present communication, we describe the results obtained in our laboratory using three commercial kits. Three operators tested the ability of the kits to quantify the target and to provide repeatable and reproducible results. The same mi-

croplate reader (Bio-Rad model 550, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California) was used by measuring the amount of Cry1Ab/Cry1Ac in IRMM certified reference materials over a 3-day period (short-interval time). Prior to application of this method for control purposes, the method should be tested through a complete validation study.

#### Material and methods

##### Selected ELISA kits tested

Three different commercial ELISA kits for recognizing MONS10 in raw materials were randomly selected after a search on the web. The three kits selected were:

- K1: S.D.I. GMOCheck Btl Maize Test Kit cat. n. 7110000.
- K2: EnviroLogix Inc. Cry1Ab/Cry1Ac Plate Kit cat. n. AP 003.

Table 1 Data represent the repeatability, reproducibility and accuracy of results for each percentage level of IRMM standard

| Kit | Level | Theoretical value (In % of GMO content) | Measured value (In % of GMO content) | Accuracy (%) | Repeatability variance | Reproducibility variance |
|-----|-------|---|--------------------------------------|--------------|------------------------|--------------------------|
| 1   | 1     | 0                                       | 0.0001                               | –            | 0.0001                 | 0.0002                   |
|     | 2     | 0.1                                     | 0.2664                               | 266.4        | 0.0041                 | 0.0120                   |
|     | 3     | 0.5                                     | 1.0324                               | 206.5        | 0.2039                 | 0.1315                   |
|     | 4     | 1                                       | 1.8460                               | 184.6        | 0.1103                 | 0.5227                   |
|     | 5     | 2                                       | 2.8642                               | 143.2        | 0.2710                 | 1.2009                   |
|     | 6     | 5                                       | 3.7894                               | 75.8         | 0.1136                 | 1.6877                   |
| 2   | 1     | 0                                       | 0.0316                               | –            | 0.0008                 | 0.0009                   |
|     | 2     | 0.1                                     | 0.2453                               | 245.3        | 0.0690                 | 0.0962                   |
|     | 3     | 0.5                                     | 0.6426                               | 128.5        | 0.0226                 | 0.0292                   |
|     | 4     | 1                                       | 1.2779                               | 127.8        | 0.0433                 | 0.0445                   |
|     | 5     | 2                                       | 2.5260                               | 126.3        | 0.2448                 | 0.2915                   |
|     | 6     | 5                                       | 5.7559                               | 115.1        | 0.6412                 | 0.8600                   |
| 3   | 1     | 0                                       | 0.0102                               | –            | 0.0001                 | 0.0002                   |
|     | 2     | 0.1                                     | 0.1203                               | 120.3        | 0.0006                 | 0.0011                   |
|     | 3     | 0.5                                     | 0.5783                               | 115.7        | 0.0032                 | 0.0076                   |
|     | 4     | 1                                       | 0.9986                               | 99.9         | 0.0093                 | 0.0149                   |
|     | 5     | 2                                       | 1.6412                               | 82.1         | 0.0200                 | 0.0256                   |
|     | 6     | 5                                       | 2.6745                               | 52.9         | 0.0039                 | 0.0105                   |

K3: Abraxis LLC ELISA kit called BT CryAC/Cry1Ab code 510001.

#### Samples

Certified reference material of genetically modified MON810 dried maize was provided by IRMM. In addition, the internal standards were provided in all kits and were used as indicated in the user's instructions. Certified reference material from IRMM (IRMM-413) is available in six different mass fractions of GMO maize: <0.02%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2% and 5%.

#### Experimental design

Tests were repeated three times for each kit. Each kit contained a standard plate of 96 wells. The testing involved three different operators and was conducted on different days. The standard samples were defined according to the user's instructions to mimic the normal operational procedure.

The unknown samples, derived from the IRMM-413 MON810 certified reference material, were quantified according to the manufactures standard curve supplied with the kits. Unknown samples of each concentration level were tested, each in triplicate.

#### Results

The relative repeatability standard deviation ( $RSD_r$ ) expressed by the formula  $RSD_r = SD_r / \bar{x}$  (in %) was used to characterize the kits performance under repeatability con-

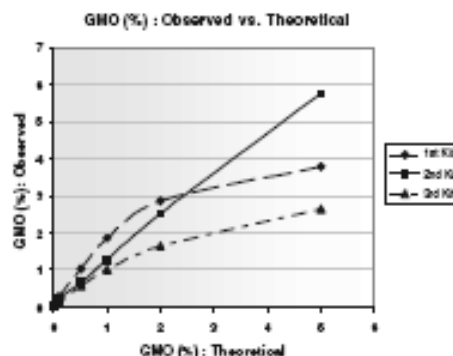


Fig. 1 Scatter plot. Relationship between observed vs. theoretical values for three kits expressed in % of the GMO content

ditions. It was calculated as the mean of the  $RSD_r$ s across all levels; where  $RSD_r$  at the level was acquired as the mean of all partial  $RSD_r$ s obtained for all operators—K1,  $RSD_r = 12.4\%$ ; K2,  $RSD_r = 16.1\%$  and K3,  $RSD_r = 7.6\%$ .

The relative reproducibility repeatability standard deviation ( $RSD_R$ ) expressed by the formula  $RSD_R = SD_R / \bar{x}$  (in %) was used to characterize the performance of the kits under reproducibility conditions. It was calculated as the mean of the  $RSD_R$ s across all levels; where  $RSD_R$  at the level was calculated among all operators—K1,  $RSD_R = 37.2\%$ ; K2,  $RSD_R = 18.0\%$  and K3,  $RSD_R = 8.6\%$ .

The limit of detection (LOD) is the lowest amount or concentration of analyte in a sample which can be reliably detected. It was calculated using the formula  $LOD = 3(\text{Blank})$

$+3 \times SD$  (in % of GMO content) – K1, LOD=0.034%; K2, LOD=0.107% and K3, LOD=0.037%.

The limit of quantitation (LOQ) is the lowest amount or concentration of analyte in a sample that can be reliably quantified with an acceptable level of precision and accuracy. It was calculated using the formula  $LOQ = 3 \times (\text{Blank}) + 9 \times SD$  (in % of GMO content)—K1, LOQ=0.082%; K2, LOQ=0.259% and K3, LOQ=0.089%.

Accuracy is the closeness of agreement between a test result and the accepted reference value. It is calculated using the formula  $(\text{observed value}/\text{theoretical value}) \times 100$  and is expressed in % (Table 1).

### Conclusion

We have considered parameters such as accuracy, repeatability and reproducibility, RSD, LOD and LOQ to evaluate the performance of the kits according to the level of GMO content. The results were collected in Table 1 and visualized

in Fig. 1. They indicate that kits differ from each other, especially at the highest levels, e.g. in the difference between the measured and theoretical values. The acceptable accuracy (within  $\pm 25\%$  of the accepted theoretical value) with the lowest repeatability and reproducibility variance (fifth and sixth column in Table 1) in each level was achieved by the K3. As reported in Table 1 (second and third columns) and Fig. 1, only the performance of the K2 kit reflects a linear relationship between the theoretical (labelled on the certified material) and measured values in the range of 0 to 5% of GMO content; however, we have to consider that these kit results are not applicable for quantification of the GMO content below 0.26% because the LOD value is 0.259%. In conclusion, concerning the results obtained, K3 seems to be the most reliable, followed by K2 and the K1. Provided that immunoassays are potentially powerful tools in food analysis, further optimization and formal validation are necessary for a complete evaluation of their performance before they are used routinely for control purposes.

### References

1. Thompson M, Ellison SLR, Wood R, (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC technical report. *Pure Appl Chem*. 74(5):835–855
2. ISO (2002) *Foodstuffs: methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products: protein-based methods*. EN ISO 21572:2002, ISO, Geneva
3. ISO (1994) *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. EN ISO 5725:1994, ISO, Geneva
4. IUPAC (1997) *Compendium of chemical terminology*, 2nd edn., IUPAC, Research Triangle Park, North Carolina
5. Paolelli C, Mazzara M (2005) *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing*. ENGL method performance requirements, EU DG-JRC Ispra, Italy

## Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and CryIAB genetically modified protein detection and quantification

M. ERMOLLI<sup>1</sup>, A. PROSPERO<sup>1</sup>, B. BALLA<sup>1</sup>, M. QUERCI<sup>1</sup>,  
A. MAZZEO<sup>2</sup>, & G. VAN DEN EEDE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnology & GMOs Unit, Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), European Commission, DG-Joint Research Centre (JRC), Via. E. Fermi 1, 201020149 (MI), Italy and* <sup>2</sup>*Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Dermatiti, Via De Sanctis, 85100, Campobasso, Italy*

(Received 30 November 2005; revised 17 February 2006; accepted 14 March 2006)

### Abstract

An innovative immunoassay, called enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Reverse, based on a new conformation of the solid phase, was developed. The solid support was expressly designed to be immersed directly in liquid samples to detect the presence of protein targets. Its application is proposed in those cases where a large number of samples have to be screened simultaneously or when the simultaneous detection of different proteins is required. As a first application, a quantitative immunoassay for CryIAB protein in genetically modified maize was optimized. The method was tested using genetically modified organism concentrations from 0.1 to 2.0%. The limit of detection and limit of quantitation of the method were determined as 0.0056 and 0.0168 (expressed as the percentage of genetically modified organisms content), respectively. A qualitative multiplex assay to assess the presence of two genetically modified proteins simultaneously was also established for the case of the CryIAB and the CP4EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) present in genetically modified maize and soy, respectively.

**Keywords:** Genetically modified organisms (GMOs), immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Reverse, CryIAB, CP4EPSPS

### Introduction

The development and optimization of methods and protocols for detecting and quantifying genetically modified organisms (GMO) in food and feed is one of the main activities of the European Commission Biotechnology & GMOs Unit. The work reported herein takes into consideration the current need for monitoring the presence of several contaminants in food and feed products. In compliance with European Union requirements for assuring food safety and traceability, several tests have to be performed. In particular for GMOs, Regulation (EC) 1831/2003 (European Commission 2003b) concerns the traceability and labelling of products containing traces of GMOs at or above the fixed 0.9% legal threshold. Following European Union

requirements concerning the traceability and labelling of products containing traces of GMOs, a protocol for the simultaneous detection of different GMO-related proteins was developed in the form of an innovative and convenient solid-phase immunoassay.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Reverse (ER) is a new method (the device has been patented by the Science and Technological Park, MoliseInnovazione; Patent Number PCT WO 03/085401 A1). The ER was developed on the basis of an immunosorbent plastic device that allows the introduction of the solid phase of an ELISA reaction directly into the liquid sample, therefore solving several practical problems linked to the traditional ELISA format. Briefly, the ER solid-phase (device) is constructed of polystyrene pins

Correspondence: M. Ermolli. E-mail: ermolli@jrc.it

ISSN 0265-205X print/ISSN 1366-5847 online © 2006 Taylor & Francis  
DOI: 10.1080/02652050600690763

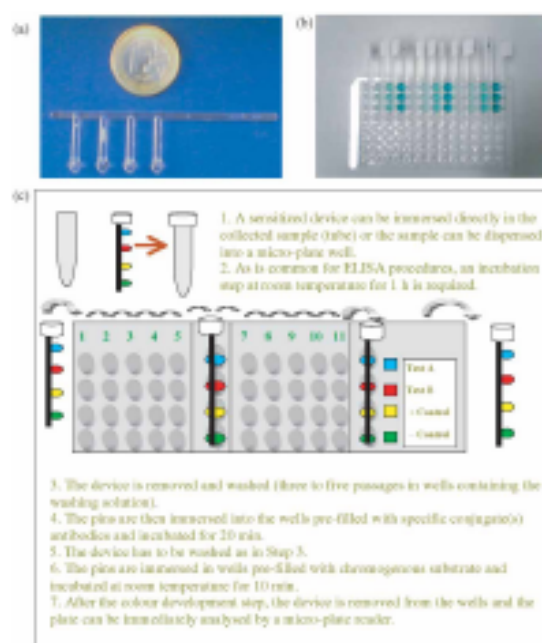


Figure 1. ELISA Reverse technology. For experimental trials, prototypes of immunoconjugent devices were realized in polystyrene BB10, which had a conformation of rods with four pins. (a) A single device displayed close to a €1 coin so that the device shape and dimensions can be appreciated; (b) devices positioned inside the low binding microplate during the colour development step; (c) scheme for the ELISA Reverse procedure.

protruding from a rod and positioned at modular distance. Each pin can be used to detect a specific target. Therefore, the number of targets detectable depends on the number of pins present on the device. Multiplex assay and single detection can be performed following the same protocol; the only difference is the secondary conjugated antibody chosen according to the aim of the assay. The pins can be immersed directly in samples collected in individual tubes of variable volume or distributed into 96-well micro-plates (devices at 4/12 pins) or 384 well micro-plates (devices at 8/24 pins). As in the common ELISA procedure, the protocol consists of a 1-h incubation time in the presence of the target followed by three washing steps. Then the incubation step in the presence of the secondary antibody is commonly 16–20 min followed by a second cycle of washing and the colour development step of 10 min. All these steps in the ER procedure can be performed in micro-plates; the number of the micro-plates used during the whole procedure

is defined each time according to the number of devices used for the assay (Figure 1).

In a previous study, the ER was successfully applied for the simultaneous detection of different antibodies in bulk milk tested for the presence of *Salmonella*, bovine rhinotracheitis and bovine leucosis infections (Mazzoc et al. 2004). The method was found to be reliable and versatile for the simultaneous detection of multiple targets, allowing the possibility to increase the sample volume enhancing method sensitivity, reducing costs, simplifying samples handling, and the washing/drying steps of the solid phase.

The technology offers additional advantages: it avoids sample concentration; no specific laboratory environment is required; coupled dried devices can be stored as the ELISA plate at 4°C for several months; and the protocol for multiplex detection is hardly and fast as the single target detection. Quantitative analyses can be performed using a micro-plate reader as for the ELISA assays.



Table 1. Cry1AB quantitative test: summary of the weighted ordinary least-squares regression acquired by SAS software: regression coefficients, standard errors, *p*-values and confidence limits for 95% probability in the range 0–2% for genetically modified organisms content.

|  | Coefficient | Standard error | <i>p</i> | 95% probability |             |
|--|-------------|----------------|----------|-----------------|-------------|
|  |             |                |          | Lower limit     | Upper limit |
| Intercept  | 0.1484      | 0.0186         | <0.0001  | 0.1070          | 0.1898      |
| Percentage of genetically modified organisms content | 1.5504      | 0.1029         | <0.0001  | 1.3210          | 1.7797      |

As for all immunoassays, the limiting factor is the dependence on the availability of suitable antibodies or proteins for the sensitization of the pins. In this paper, the aim was to explore the possibility of detecting traces of the Cry1AB protein contained in some genetically modified (GM) maize lines (e.g. Bt11 and MON810) and to measure the quantity of the GM protein within the range 0.1–2.0% (weight GMO/weight). Second, the ability to use the device for multiplex assay was evaluated after binding two different GM-specific antibodies on the same device, i.e. the Cry1AB and CP4EPSPS as examples of the most representative GM proteins present in the food market in the European Union.

#### Materials and methods

##### Antibodies

Specific monoclonal antibodies against Cry1AB were kindly provided by Monsanto (Missouri, USA). Mouse immunoglobulin-G (IgG) monoclonal antibodies against CP4EPSPS were produced by Monoclonal Biotechnology (Brno, Czech Republic). Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)-labelled monoclonal secondary antibodies anti-selected GM proteins were purchased from Strategic Diagnostic (USA) and used as described by the product's guide (Cat. Nos 7110000 and 7100000).

##### Samples

Bt11 maize standard material at 0, 0.15, 0.5 and 2% was purchased from Strategic Diagnostic, Inc. (Delaware, USA) (Cat. No. 7110000). Serial dilutions of the 2% standard in phosphate-buffered saline (PBS) were prepared to obtain the 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5% Bt11 concentrations also tested in the experiments. Certified Reference Materials (CRMs) for genetically modified Roundup Ready soya beans (ERM-BF410) at 0 and 1%, as well as CRMs for genetically modified Bt-11 maize (ERM-BF412) at 0 and 1% were from IRMM (Geel, Belgium).

##### Plastic support

Prototypes of polystyrene-activated devices HB10 were produced from Biomat inc (Rovereto, Turin, Italy), while low-binding micro-plates were purchased from Thermo Electron Corporation (Vantaa, Finland).

##### Other reagents

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system for ELISA (Cat. No. T0440) was purchased from Sigma Aldrich (Milan, Italy). Lysis buffer was 10 mM sodium borate buffer, pH 7.5.

##### Assay conditions

**CP4EPSPS device coating step.** The optimal amount of capture antibodies to be used was estimated by testing 25, 50, and 100 µg ml<sup>-1</sup> of total proteins of the hybridomas supernatant containing the monoclonal antibodies against CP4EPSPS. A total of 100 µg ml<sup>-1</sup> was the most reliable amount of total proteins (see the Results and Discussion and Table 1). Sensitization of the pins was performed overnight at 4°C by dispensing in the low binding micro-plates 100 µl of carbonate buffer, pH 9.6, containing 100 µg ml<sup>-1</sup> of total proteins.

**Cry1AB device coating step.** A total of 100 µl of the carbonate buffer containing 10 µg ml<sup>-1</sup> of purified antibodies against Cry1AB was used. The blocking step was performed in a micro-plate in the presence of PBS containing 5% non-fat dried milk for 2 h at room temperature (Crowther 2000). The coupled dried devices can be stored at 4°C up to 3 months.

##### Samples

Preparation of the samples for the Cry1AB quantitative assay was performed by homogenizing 1 g of each maize standard (0, 0.15, 0.5 and 2%) in 4 ml of lysis buffer. Samples containing 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5% GM maize were obtained by serial dilutions of the 2% standard in PBS.

Samples used for the Cry1AB and CP4EPSPS qualitative assays consisted of maize and soy

at 0 and 1% GM content, respectively. Maize samples were extracted as previously described; soy samples were prepared by homogenising 0.45 g of each standard in 4 ml of lysis buffer. Samples were then centrifuged at 5300g for 15 min.

#### Quantitative and qualitative assay protocol

Following lysis, 100- $\mu$ l sample supernatant were transferred in triplicate into the micro-plate wells, and pins were introduced and incubated for 1 h at room temperature. The devices were then removed and washed at least three times before being immersed in 100  $\mu$ l of the secondary-conjugated antibody solution (dilution 1:10 000) previously distributed in a clean micro-plate. The incubation step was at room temperature for 1 h. After incubation and three rounds of washing, the devices were incubated in 100  $\mu$ l of TMB substrate for 20 min for the visualization of the complex. A total of 100  $\mu$ l of stopping solution (1 N sulfuric acid) was then added to each well to block the reaction. Absorbance values were immediately read on a Bio-Rad micro-plate reader at 450 nm.

Data analysis was performed according to the aim of the test. In all experiments, one pin of the device was used as a 'blank'.

All experiments were repeated at least three times independently following the same experimental design.

#### Results and discussion

We successfully coupled both monoclonal antibodies at our disposal to the solid supports following the

protocol previously described. The devices at our disposal were designed with four pins, as shown in Figure 1.

All tests reported herein were conducted three times, and all samples were measured in triplicate. For the development of the quantitative assay, the solid supports were coupled with specific monoclonal antibodies recognizing the CryIAB protein. The test was optimized to match the standard requirements imposed for GMO analysis (International Standards Organization 2002; Paoletti and Mazzera 2005). In particular, the test conditions were optimized in order to reach values of limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) allowing the detection and quantification of contamination around the 0.1% level as the conventional ELISA tests (Fimoli et al. 2006).

The CryIAB quantitative assay was performed within the range 0.1–2% of GM maize content, as shown in Figure 2 and Table I.

To fine-tune the method performance and to verify its ability to distinguish among those samples with close GMO content values at low concentrations, the assay was also performed with samples at 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% (Figure 3 and Table II). In both cases, the parameters considered for the evaluation of the method were accuracy, repeatability, standard deviation (SD), relative standard deviation (RSD), LOD and LOQ according to the level of GMO content (Tables III and IV). The results indicate a very good performance of assay: the linearity achieved within the range 0–0.5% was confirmed when the same analysis was performed from 0 to 2% (Figures 2 and 3 and Tables II and III). The LOD and LOQ were expressed

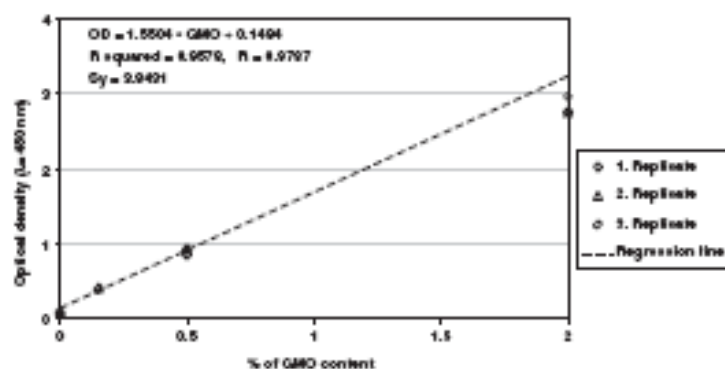


Figure 2. Weighted ordinary least-squares regression for the CryIAB quantitative test. An association between the optical density and the percentage of genetically modified organisms content was obtained in the range 0–2% of CryIAB.

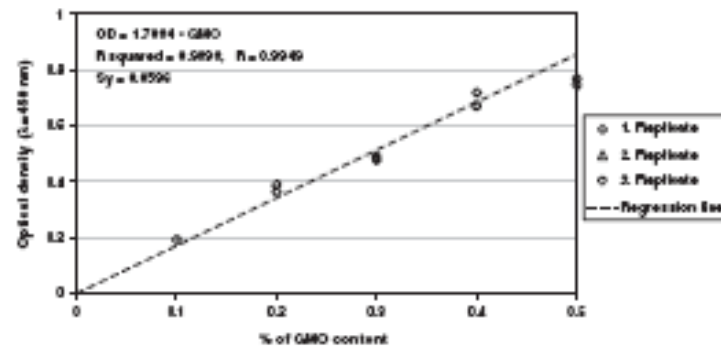


Figure 3. Ordinary least-squares regression for the CytIAB quantitative test. An association between the optical density and the percentage of genetically modified organisms content was obtained in the range 0-0.5% of CytIAB.

Table II. CytIAB quantitative test: summary from the ordinary least-squares regression for CytIAB quantitative test calculated by SAS software: regression coefficient, standard error, *p*-value and confidence level for 95% probability in the range 0-0.5% genetically modified organisms content.

|  | Coefficient | Standard error | <i>p</i> | 95% probability |             |
|--|-------------|----------------|----------|-----------------|-------------|
|  |             |                |          | Lower limit     | Upper limit |
| Percentage of genetically modified organisms content | 1.7088      | 0.0464         | <0.0001  | 1.6089          | 1.8078      |

Table III. Data representing the repeatability and accuracy of the results for each percentage level of genetically modified organism tested. The samples were obtained by the CytIAB quantitative test.

| Level | Percentage of genetically modified organisms content |                |              | Mean of OD | Repeatability characteristics |         |
|-------|--|----------------|--------------|------------|-------------------------------|---------|
|       | Theoretical value                                    | Observed value | Accuracy (%) |            | SD                            | RSD (%) |
| 1     | 0  | -              | -            | 0.0692     | 0.0111                        | 11.18   |
| 2     | 0.15   | 0.1702         | 113.47       | 0.4123     | 0.0085                        | 2.05    |
| 3     | 0.5  | 0.4929         | 98.58        | 0.9125     | 0.0448                        | 4.91    |
| 4     | 2  | 1.7304         | 86.52        | 2.8512     | 0.1154                        | 4.08    |

OD=Optical density.

Table IV. CytIAB quantitative test: repeatability and accuracy of the results for each percentage level of genetically modified organisms tested samples.

| Level | Percentage of genetically modified organisms content |                |              | Mean of OD | Repeatability characteristics |         |
|-------|--|----------------|--------------|------------|-------------------------------|---------|
|       | Theoretical value                                    | Observed value | Accuracy (%) |            | SD                            | RSD (%) |
| 2     | 0.1  | 0.1155         | 115.45       | 0.1975     | 0.0089                        | 4.51    |
| 3     | 0.2  | 0.2251         | 112.54       | 0.3811     | 0.0156                        | 4.10    |
| 4     | 0.3  | 0.3075         | 102.49       | 0.5253     | 0.0744                        | 14.17   |
| 5     | 0.4  | 0.4235         | 105.87       | 0.7294     | 0.0561                        | 7.76    |
| 6     | 0.5  | 0.4644         | 92.88        | 0.7934     | 0.0652                        | 8.22    |

OD=Optical density.

in a percentage of GMO content and calculated as follows:

$$\text{LOD} = \frac{[\bar{x}_0(\text{blank}) + 3 \times \text{SD}_0(\text{blank})]}{q_1}$$

where  $q_1$  is the slope of the regression line

$$\text{LOQ} = \frac{[\bar{x}_0(\text{blank}) + 9 \times \text{SD}_0(\text{blank})]}{q_1}$$

Considering the slope of the regression line calculated from 0.1 to 0.5%, LOD was equal to 0.0054 and LOQ was equal to 0.0162. In the same way, the LOD and LOQ calculated by considering the slope of the regression line from 0.1 to 2% showed comparable values, i.e. 0.0056 and 0.0168, respectively. Method accuracy is defined as the closeness of agreement between a test result and the accepted reference value. It was calculated using the formula:

$$\text{Method accuracy (\%)} = \left[ \frac{\text{observed value}}{\text{theoretical value}} \right] \times 100.$$

Its value is considered acceptable when within  $\pm 25\%$  of the accepted theoretical value. As shown in Tables III and IV, method accuracy was within the accepted range, achieving values from 86.52 to 113.47. The repeatability standard deviation (RSD), expressed by the formula:

$$\text{RSD, (\%)} = \frac{\text{SD}_r}{\bar{x}}$$

was used to characterize the assay performance under repeatability conditions. The values obtained in the experiments were significantly lower than the acceptable threshold rate of 25% (Pacini and Mazzera 2005).

A qualitative multiple protocol to assess the presence of two GM proteins simultaneously has also been established for the Cry1AB and CP4EPSPS proteins. In this case, two of the four

pins of the device were coupled with the antibody recognizing EPSPS and the other two pins with the antibody specific for Cry1AB.

The device pins were coupled as indicated in the Materials and methods. For CP4EPSPS, a preliminary titration step was required to establish the optimal coupling conditions. Three different amounts of total proteins of the hybridomas medium were tested and the results analysed by three different pair-wise tests (*t*-test, Tukey's test, Bonferroni *t*-test) in analysis of variance (ANOVA) acquired by SAS software. As reported in Table I, the tests gave significant difference between the blanks and the GM samples only if  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  of total proteins were used.

The results of the multiple screening tests are summarized in Table V. The assay was tested on 0% samples and on samples containing a mixture of GM soy and GM maize, both at the 1% GMO level. The results were evaluated statistically to verify the ability of the assay to distinguish between 0% and all others measurements performed at the 1% GMO level of contamination. The assay was reliable and the results of the three different pair-wise tests (*t*-test, Tukey's test, Bonferroni *t*-test) used by ANOVA acquired by the SAS software confirmed the data.

When applicable, protein-based methods have the potential to serve as cost-efficient, practical, and quick tools for screening and for multiplex analysis, especially for routine controls on large amount of samples. In particular, multiple screening facilitates and speeds up the full characterization of food products and of the single ingredients, as well as the identification of cross-contamination. To comply with the different requirements established by the current European Union legal framework on food control and safety (European Commission 1998, 2001, 2003a, 2004), several parameters, from the infectious diseases and contaminants to GMO

Table V. The optimal amount of capture antibodies to be coupled to the device using 25, 50,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  of total proteins were tested of the hybridomas supernatant containing monoclonal antibodies against CP4EPSPS. The results for three different pair-wise tests used by ANOVA acquired by SAS software proved the significant difference between the 0% genetically modified organism (GMO) level and other GMO tested levels. A total of  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  was the selected amount.

| Total protein ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Multiple comparison tests |              |                           |
|---|---------------------------|--------------|---------------------------|
|   | <i>t</i> -test            | Tukey's test | Bonferroni <i>t</i> -test |
| 25                                      | s                         | s            | n.s.                      |
| 50                                      | s                         | s            | n.s.                      |
| 100                                     | ss                        | ss           | s                         |

s, Significant at the 0.05 level; s, significant at the 0.1 level; n.s., not significant at the 0.1 level.

Table VI. Qualitative multiplex assay: the results of three different pair-wise tests used by ANOVA acquired by SAS software proved the significant difference between the 0% genetically modified organism (GMO) level and 1% GMO level in samples containing a mixture of genetically modified (GM) soy and GM maize.

| GMO                                   | Multiple comparison tests |              |                           |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
|                                       | <i>t</i> -test            | Tukey's test | Bonferroni <i>t</i> -test |
| Soy <sup>a</sup>                      | ss                        | ss           | ss                        |
| Soy <sup>a</sup> + Maize <sup>a</sup> | ss                        | ss           | s                         |
| Maize                                 | ss                        | ss           | ss                        |

Samples were measured at the following levels with GMO content (%):<sup>a</sup> 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5; and <sup>a</sup>0, 0.5, 1.25 and 2.5. ss, Significant at the 0.05 level; s, significant at the 0.1 level.

detection and quantification, need to be taken into consideration before the commercialization of a food product and, consequently, various analyses have to be performed.

The threshold limits imposed on an assay for food analysis have been thoroughly evaluated in the present study and the results are in line with expectations confirming the potentiality of the method. The present paper reports the application of the device and of the relative assay for GMO analysis and the results obtained. The versatility and flexibility of the method justify further development of the method with the inclusion of other significant food safety targets.

#### Acknowledgements

The collaboration between DG-Joint Research Centre (JRC) and Molise University was enhanced by the ENEA-Innovation Relay Centre IRIDE as part of the IRC NETWORK created by European Commission.

#### References

- Crother JR, editor. 2000. The ELISA guidebook. Totowa, NJ: Humana.
- Ermelli M, Fanzoni A, Meoli M, Scotti D, Ballo B, Steffano S, Querci M, Paoletti C, Van den Bide G. 2006. Food safety: Screening tests used to detect and quantify GMO proteins. Accreditation and quality assurance. *Journal of Quality, Compatibility and Reliability in Chemical Measurement* 11: 55–57.
- European Commission. 1998. Council Regulation (EC) No. 1186/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particular other than those provided for in Directive 1901/28/EC. Official Journal of the European Union L 159:4–7.
- European Commission. 2001. Commission Regulation (EC) No. 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union L 071:1–15.
- European Commission. 2003a. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/434/EEC and repealing Council Directive 90/117/EEC. Official Journal of the European Union L 325:31–40.
- European Commission. 2003b. Regulation (EC) 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Official Journal of the European Union L 268:24–38.
- European Commission. 2004. Commission Directive 2004/45/EC of 15 April 2004 amending Directive 90/55/EEC and Directive 2002/55/EC as regards sampling methods and methods of analysis for the official control of the levels of aflatoxin and ochratoxin A in food for infants and young children (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union L 113:14–16.
- International Standards Organization (ISO). 2002. EN ISO 2157:2002. Foodstuffs — methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Protein-based methods. Geneva, Switzerland: ISO.
- Mazzon A, Patrucco G, Blagetti M, Prospero A, Gaem C, Patrucco R, Rosato MP. 2006. ELISA Reverse Technology per il controllo di pesticidi unitari negli allevamenti da latte. In Proceedings of the VI Congresso Nazionale SIELV, Albano Terme (FD), Italy, 10–12 November 2004. pp 199–200.
- Paoletti C, Mazzon M. 2005. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. ENGL Method Performance Requirements. Available at: <http://gmo-jrc.181600/Method%20equipment.pdf>.

**First Application of a Microsphere-Based Immunoassay to the  
 Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs):  
 Quantification of Cry1Ab Protein in Genetically Modified Maize**

ANNA FANTOZZI,<sup>†</sup> MONICA ERMOLLI,<sup>\*‡</sup> MASSIMILIANO MARINI,<sup>§</sup>  
 DOMENICO SCOTIL,<sup>#</sup> BRANKO BALLA,<sup>‡</sup> MADDALENA QUERCI,<sup>‡</sup>  
 STEPHEN R. H. LANGRELL,<sup>‡</sup> AND GUY VAN DEN EEDE<sup>‡</sup>

Biotechnology and GMOs Unit, Institute for Health and Consumer Protection, DG-Joint Research Centre, European Commission, I-21100 Ispra (Va), Italy; Institute of Biochemistry and Genetics, Centre for Biomedicine, Department of Clinical-Biological Sciences (DKBW), University of Basel, Mattenstrasse 28, CH-4058 Basel, Switzerland; Reference Materials Unit, Institute for Reference Materials and Measurements, European Commission, 2440 Geel, Belgium; and GEI Srl, via Tirrenia 2/b, 0057 Maccarese, Fiumicino (Rm), Italy

An innovative covalent microsphere immunoassay, based on the usage of fluorescent beads coupled to a specific antibody, was developed for the quantification of the endotoxin Cry1Ab present in MON810 and Bt11 genetically modified (GM) maize lines. In particular, a specific protocol was developed to assess the presence of Cry1Ab in a very broad range of GM maize concentrations, from 0.1 to 100% [weight of genetically modified organism (GMO)/weight]. Test linearity was achieved in the range of values from 0.1 to 3%, whereas fluorescence signal increased following a nonlinear model, reaching a plateau at 25%. The limits of detection and quantification were equal to 0.018 and 0.054%, respectively. The present study describes the first application of quantitative high-throughput immunoassays in GMO analysis.

**KEYWORDS:** GMO; immunoassay; Cry1Ab; high-throughput analysis; quantitative detection assay; fluorescent beads

**INTRODUCTION**

Development of innovative analytical tools for the precise detection and quantification of genetically modified organism (GMO) presence in human food and animal feedstuffs is a legal prerequisite and technical challenge for official authorization and market access in the European Union (EU). With respect to genetically modified (GM) food and feed, the new European regulatory framework, that is, Regulations (EC) 1829/2003 and (EC) 1830/2003, aims at reinforcing the confidence of consumers by improving the traceability and control of food and feedstuffs with respect to legal and technical efforts to maintain identity preservation of GMO- and non-GMO-based product supply chains. They also identify a threshold value of 0.9% (1) for the presence of adventitious or technically unavoidable EU-approved GM content in otherwise GM-free product lines (2, 3). The consequence of such a threshold setting, and the detailed traceability and labeling requirements, gives rise to the specific need for analytical methods for the reliable detection, identifica-

tion, and quantification of a given authorized GM line, in particular, for general enforcement and control activities and in the event of any possible future risk management requirement. The most commonly applied methodology is based on the real time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique, which allows event-specific detection and quantification of a particular GM line according to the authorization requirements. However, RT-PCR is not suitable for high throughput, wide-scale screening approaches, particularly for routine control application at various critical control points along the food/feed chain where, for example, more immediate and fast assays can be usefully employed (4, 5). In such circumstances the application of RT-PCR is unsustainable in terms of cost and management to be widely adopted; consequently, alternative platforms are needed. As potential complementary high-throughput approaches to such control screening requirements, developments in protein-based detection technologies could be harnessed that allow for trait-specific detection and quantification, as well as event-specific traits. Furthermore, protein-based methods have the potential to serve as cost-efficient, rapid screening tools, such as, the ELISA kits for GMO detection and quantification that have the potential of measuring the amount of Cry1Ab/Cry1Ac in IRMM certified reference materials (4). The present study outlines the application of a quantitative immunoassay based on fluorescent

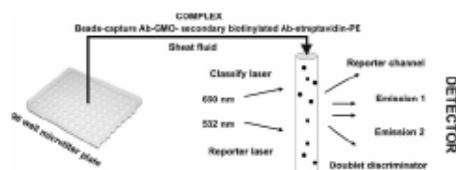
\* Corresponding author (telephone +39 0332 785149; fax +39 0332 785904; e-mail monica.ermolli@irc.it).

<sup>†</sup> University of Basel.

<sup>‡</sup> Institute for Health and Consumer Protection.

<sup>§</sup> Institute for Reference Materials and Measurements.

<sup>#</sup> GEI Srl.



**Figure 1.** Description of the detection system. Single beads are transported by the fluid from each well of the 96-well microtiter plate to the laser chamber through a capillary. Inside the instrument the beads are struck by two different lasers, the classify channel (660 nm) and the reporter channel (532 nm). The first one excites the fluorescence identifying each bead and the second one excites the fluorescence of the streptavidin-conjugated phycoerythrin (PE). A combination of the two different emissions from the dye beads and the signal of the PE staining are detected by the instrument and plotted as mean fluorescent intensity (MFI). In addition, a side scatter detector allows double discrimination.

beads and liquid-array technology for high-throughput screening of a common GM trait (the insecticidal protein endotoxin Cry1Ab), representing the first experimental application of this technology for general GMO control purposes.

The assay is based on a specific monoclonal antibody covalently linked to color-coded fluorescent beads that specifically recognize target proteins present in the sample extracts. A secondary biotinylated antibody, directed against a different epitope of the same target protein, reacts with the samples, forming a complex that, in the presence of streptavidin-phycoerythrin (PE), can be detected. Detection and quantification of the immunocomplex is obtained via fluorescence emitted by the PE, and the specificity of the signal is assured by the color-coded beads to which it is coupled (Figure 1).

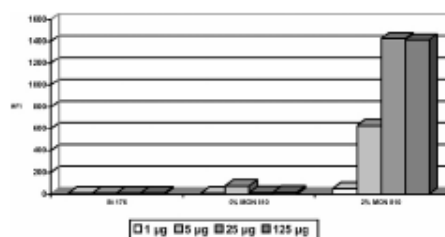
The advantage of this method would be the possibility of simultaneously detecting and quantifying up to 100 different target proteins within the same sample due to the color specificity of each bead combined to fluorescence intensity emitted by each complex after laser excitation.

The entire detection procedure takes less than an hour from the preparation of the lysate to sample analysis by the dedicated software. This method has been successfully applied in other fields of research such as multiple cytokine analysis, detection of cancer markers, apoptosis, gene expression, genotyping, and antibody screenings (5–12).

The present study describes the applicability of this method to the detection and quantification of Cry1Ab protein and sets the basis for the development of a high-throughput screening platform for this and other GM traits currently authorized in the EU and globally.

#### MATERIALS AND METHODS

**Samples.** Certified reference materials (CRMs) for genetically modified MON810 maize (ERM-BF413) and CRMs for GM Bt-176 maize (ERM-BF411), both at six different mass fractions (<0.2, 0.1, 0.5, 1, 2, and 5%), as well as kernels of pure MON810 line were from IRMM (IRMM, Geel, Belgium). Cry1Ab purified protein was kindly provided by Monsanto (St. Louis, MO). A high-throughput device for Cry1Ab quantification [Luminex-100 (Luminex Corp., Austin, TX)] and carboxylated microspheres of a specific microsphere set (item L100-C154-01) were purchased from Luminex Corp. The pair of specific monoclonal antibodies recognizing Cry1Ab protein was kindly provided by Monsanto. Information on antibody-binding capacity is limited to data received from Monsanto (personal communication and unpublished data) from whom the antibodies were received. The antibodies were



**Figure 2.** Capture antibody titration. The test was performed on 2% MON810, 0% MON810, and Bt176 included as negative controls. Fluorescent signal obtained was plotted as mean fluorescent intensity (MFI). The optimal concentration of capture antibody was obtained using 25  $\mu\text{g}$  of capture antibody/ $5 \times 10^6$  beads.

subsequently used according to the company's recommendation(s). However, we tested their specificity by ELISA and Western blot analysis, including ELISA reverse mAb as recently published (5).

Cross-linking of the fluorescent beads was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $5 \times 10^6$  beads were activated for 20 min in 80  $\mu\text{L}$  of 100 mM monobasic sodium phosphate, pH 6.3, containing 500  $\mu\text{g}$  of 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) (Pierce/Rockford, IL; catalog no. 22980) and 500  $\mu\text{g}$  of *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS, Pierce catalog no. 24500). Activated microspheres were washed twice with PBS, pH 7.4 (10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.4), suspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS containing 125  $\mu\text{g}$  of capture antibody, and incubated at room temperature for 2 h with mixing. Capture antibodies were dialyzed into PBS to avoid any primary amines at a final concentration of 1 mg/mL. Coupled microspheres were washed twice with PBS-TBN (PBS, pH 7.4, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA, and 0.05% sodium azide) and stored in PBS-TBN at 4 °C in the dark.

Secondary antibody biotinylation was performed as follows: briefly, to remove any primary amines from the antibody solution, an overnight dialysis was performed at 4 °C in  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  solution, pH 8.5. To each gram of antibody was conjugated 60  $\mu\text{g}$  of  $\text{NH}_2$ -Zlink-biotin solution in DMSO by incubation at room temperature with shaking for 4 h. To remove unbound biotin the solution was dialyzed overnight in PBS, pH 7.4.

**Protein Extraction Procedure.** MON810 kernels were initially ground. Total proteins were extracted from the obtained flour and CRMs using a lysis buffer containing 10 mM sodium borate buffer, pH 7.5; 250 mg of each sample was incubated for 15 min in 1 mL of lysis buffer at room temperature. After centrifugation at 5300 rcf for 10 min, supernatants were recovered.

Serial dilutions (in PBS, 1% BSA, and 0.05%  $\text{NaN}_3$ ) of the Cry1Ab purified protein were used as positive controls. Total protein concentration was assessed by conventional Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; catalog no. 500-0001). For the Cry1Ab protein quantification assay, 30  $\mu\text{L}$  of solution containing 3000 microspheres coupled with the capture antibody was added in each well of a filter bottom microtiter plate (Multiscan<sub>plus</sub> BV filter plate, Millipore Corp., Billerica, MA). Fifty microliters of samples was added to the microspheres, and the reactions were incubated for 20 min at room temperature. After incubation, the samples were washed twice by filtration and resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of PBS-BSA. Fifty microliters of secondary antibody (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added to each sample and incubated at room temperature for an additional 20 min. Samples were then washed twice by filtration and resuspended with 50  $\mu\text{L}$  of PBS-BSA. Fifty microliters of streptavidin-*R*-phycoerythrin (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added, and the reactions were incubated at room temperature for 10 min. Samples were washed twice with PBS-BSA and finally resuspended in 100  $\mu\text{L}$  before being analyzed by the Luminex-100 device.

**Statistical Tool.** Weighted ordinary least-squares regression was performed using SAS software (SAS Institute Belgium-Luxembourg Kasteel de Robiano, Tervuren, Belgium; SAS user base plus analyst

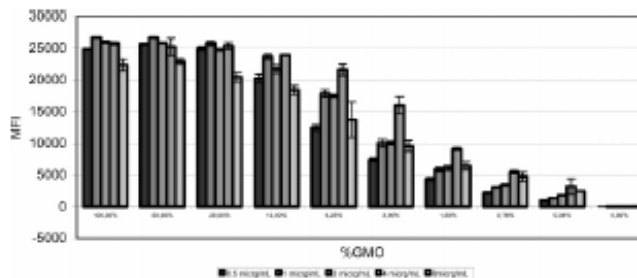


Figure 3. Titration of secondary antibody: Cry1Ab quantification assay performed on serial dilutions of pure MON810 maize line. The test was performed using five different concentrations of secondary antibody. Linearity was observed between 0 and 3% GMO content. The best secondary Ab concentration was 4 µg/mL, and MFI achieved saturation level at 25% of GMO content.

version 8.2). The squared standard deviation was used as a parameter for the SAS analysis.

The assay relies on the use of specific monoclonal antibodies selectively and covalently attached to color-coded beads that form a complex with the target protein when incubated with the given samples. A secondary biotinylated antibody binding to a different epitope of the same target protein forms a sandwich complex that is labeled in the presence of streptavidin-PE. Each sample is then collected and transported past the lasers via a capillary fluid sheet that allows single-bead suspension, essential for quantification reliability. Inside the instrument two different lasers strike the complexes: the 650 nm laser (classification channel) excites the fluorescence code of the bead, whereas the second 532 nm reporter channel excites the PE. The emissions of the two different wavelengths are collected by decoders, and the combinations of these two values first identify the target (specific antibody attached to each bead set) and then quantify the presence of each target (PE) (Figure 1). Simultaneous analysis of several samples was performed by using 96-wells microtiter plates. Multiple assays within each well can be performed for a maximum of 100 different targets. In our assay, the microspheres were efficiently coupled with specific monoclonal antibodies recognizing the protein Cry1Ab following the protocol described by Luminex (<http://www.luminexcorp.com/support/protocols/protein.html>). As part of the experimental design all experiments were repeated three times under independent conditions following the same experimental design. All samples were loaded in triplicate. Bt-176 GM maize was included in the experimental design in all experiments as a negative control.

## RESULTS

A quantitative immunoassay was established for the detection of the endotoxin protein Cry1Ab. Protein detection strictly depends on the availability of specific and functional antibodies that in the GMO field are not yet commercially available. The tests were performed on different types of GM maize matrices: flour of pure MON810 line and the conventional CRM, both sourced from the IRMM, Geel, Belgium, and pure Cry1Ab recombinant protein (Monsanto), using monoclonal antibodies recognizing the target protein kindly provided by the GMO producer (Monsanto). Following the procedure of in-house validation, assay reliability was tested for Cry1Ab protein quantification. To establish the optimal amount of antibody to be coupled to  $5 \times 10^6$  beads, four different amounts (1, 5, 25, and 125 µg) of antibody were tested. Tests were performed on lysates of MON810 at 0 and 2% of GMO percentage using GM maize line Bt-176, which does not contain detectable Cry1Ab, as negative control. Coupling efficiency was evaluated by the Luminex-100 instrument measuring the sample's fluorescence intensity and using a standard concentration of secondary

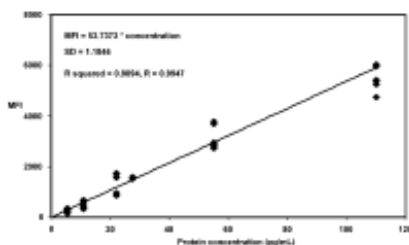


Figure 4. Weighted ordinary least-squares regression. The regression line was calculated using Cry1Ab purified protein within a range of 0–110 ng/mL.

antibody (4 µg/mL). The maximum fluorescence intensity (MFI) was generated by samples of MON810 at 2% GMO level when 25 µg of antibody was coupled to  $5 \times 10^6$  beads, and this value was not further increased when more antibody was used in coupling. No signal was detected by MON810 0% and by Bt-176 samples (Figure 2), indicating that no background signal was obtained as a result of unspecific binding of secondary antibody.

Titration of the secondary antibody was also performed testing five different antibody concentrations (0.5, 1, 2, 4, and 8 µg/mL). The assay was performed on a serial dilution of protein extracted from the 100% GM MON810 in order to analyze a broad range of GMO percentages and repeated on CRM certified GMO standards at 0, 0.5, and 2%. In each analysis, the highest level of fluorescence intensity was achieved by using 4 mg/mL of secondary antibody (Figure 3).

The test was optimized to match standard requirements imposed for GMO analysis in compliance with EU legislation. Therefore, the GMO percent range of major interest was close to 0.9%. Subsequently, linear curves were obtained for each matrix based (Cry1Ab purified protein, IRMM CRMs, and dilution of 100% MON810 protein extracts) samples containing 0–3% GMO. Within the 0–3% range the assay shows linearity and optimal performance; calibration lines are shown in Figures 4–6. Coefficient of correlation values were 0.9947, 0.9842, and 0.9861, respectively (Figure 4–6). Tables 1–4 show regression characteristics of the three curves, confirming that the best assay performance was achieved when Cry1Ab purified protein was used (data obtained by applying SAS software version 8.2 with a confidence level of 95%, Tables 1–4). For assay evaluation



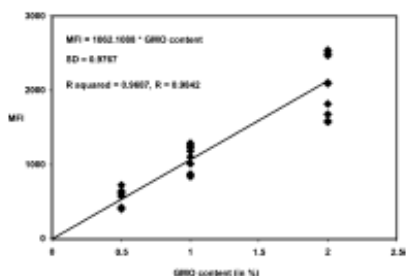


Figure 5. Weighted ordinary least-squares regression. The regression line was calculated using MON810 maize line at 0.5, 1, and 2%.

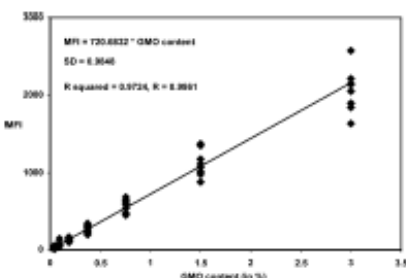


Figure 6. Weighted ordinary least-squares regression. The regression line was calculated using extracts of pure MON810 maize line within the range of 0–3%.

we took into consideration parameters such as recovery, reproducibility, and intermediate precision (14–16) (<http://gmo-crl.jrc.it/doc/Method%20requirements.pdf>).

Recovery is described as the closeness of agreement between the observed value and the expected value. It was calculated using the formula  $(\text{observed value}/\text{expected value}) \times 100$  and is expressed in percent. Assay recovery values were all in the acceptable range of  $100 \pm 25\%$ . The repeatability standard deviation (RSD) expressed by the formula  $\text{RSD} = \text{SD}/\bar{x}$  (in percent) exhibited values in the range of 1.9–10.8%, with only one exception at point D1 (Table 3). Repeatability RSD (percent) was calculated on three parallel measurements, whereas intermediate precision RSD (percent) was calculated on three values corresponding to the mean of three parallel measurements (Tables 2–4). Precision is the closeness of agreement between independent results obtained under stipulated conditions (e.g., repeatability, reproducibility).

Above values of 3% GMO, the signals increased following a nonlinear model, reaching a plateau at 25% (Figure 3). In particular, the assay conditions were optimized to reach values of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) allowing the detection and quantification of contamination around the 0.1% level as with conventional ELISA tests (4). The LOD was calculated using the formula  $\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/\text{slope}$  (expressed in concentration units and in percent of GMO content). The LOD calculated using the slope value obtained from the purified protein measurements was 0.764 pg/mL. The LOD calculated starting from CRMs was equal to 0.018%

Table 1. Weighted Ordinary Least-Squares Regression Characteristics

|                          | slope     | standard error | p value | 95% probability bands |           |
|--------------------------|-----------|----------------|---------|-----------------------|-----------|
|                          |           |                |         | lower                 | upper     |
| GMO content <sup>a</sup> | 53.7373   | 0.8118         | <0.0001 | 52.1041               | 55.3705   |
| GMO content <sup>b</sup> | 720.6832  | 15.4123        | <0.0001 | 689.8745              | 751.4919  |
| GMO content <sup>c</sup> | 1062.1088 | 37.4138        | <0.0001 | 985.2037              | 1139.0140 |

<sup>a</sup> Acquired by SAS software. <sup>b</sup> Regression characteristics are based on purified protein. <sup>c</sup> Regression characteristics are based on IRMM standards. <sup>d</sup> Regression characteristics are based on IRMM dilutions.

(0.357\* pg/mL), and the LOD calculated from 100% MON810 protein extract dilutions was 0.056% ( $\sim 0.751$ \* pg/mL).

The LOQ is the lowest amount or concentration of target in a sample that can be reliably quantified with an acceptable level of precision and accuracy. It was calculated using the formula  $\text{LOQ} = 9 \times \text{SD}/\text{slope}$  (expressed in concentration units and in percent of GMO content). The best value of LOQ equal to 0.054% ( $\sim 1.072$ \*\* pg/mL) was achieved by using CRMs. The LOQ using purified protein and the LOQ of 100% MON810 protein extract dilutions were 2.292 pg/mL and 0.168% ( $\sim 2.253$ \*\* pg/mL), respectively. Although not reported here, multiple quantitative analyses for both CP4EPPSPS and Cry1Ab were also performed to verify system capability to detect and quantify different GMO targets simultaneously. However, results obtained on the CP4EPPSPS quantification were not comparable, or consistent, as the single Cry1Ab data set, in particular, with reference to reproducibility. This may have been due to CP4EPPSPS antibody instability (data not shown).

## DISCUSSION

This work highlights the use of an immunoassay as the basis of a high-throughput approach for applications in biotechnology, specifically to control enforcement actions related to genetically modified organisms. The high-throughput system we used allows for either 96- or 384-well plates with the option to analyze four plates simultaneously and is compatible with front-end plate-handling robotics. A 96-well plate assay is completed in less than 2 h and 30 min for the preparative steps and 1 h for instrument analysis. The estimation of the cost per assay is directly link to the number of targets included in the assay. For a single analysis the cost is close to that of the RT-PCR assay or ELISA (close to 1 and 2 euros per well, respectively), but in the case of multiple simultaneous detections the costs per sample would be proportionally reduced. Proteomic screening of potentially contaminated crops can in fact reduce uncertainty by providing more information about crop composition than targeted analysis alone or in combination with qualitative multiplex PCRs. In addition, multivariate statistical methods can be applied to analyze the results to obtain a clearer overall picture of how the given samples relate to each other, rather than the comparison of single compounds. These facts may make proteomics increasingly attractive, especially with the advent of second-generation GM crops containing multiple transgenes in the EU.

Consumer awareness on food safety is of considerable societal concern within the EU. Monitoring adventitious GM presence for identity preservation and traceability measures along the food/feed chain highlights the need of high-throughput analysis in the investigation of several contaminations in either raw samples or finished food products and feedstuffs. In this respect, the first application of the fluorescent bead based immunologic assay/Luminex platform to GMO protein for quantitative

Table 2. Regression Characteristics of the Curve Obtained Using CRMs at 0.5, 1, and 2% Mon810 Maize Line

| ID IRMM CRM | observed GMO content (%) | expected GMO content (%) | MFI    | recovery (%) | repeatability RSD (%) | intermediate precision RSD (%) | predicted concentration (pp/mL) |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| ST1         | 0.52                     | 0.5                      | 553.4  | 104.2        | 8.1                   | 26.8                           | 10.3                            |
| ST2         | 1.01                     | 1                        | 1069.9 | 100.8        | 1.9                   | 18.9                           | 19.9                            |
| ST3         | 1.92                     | 2                        | 2037.1 | 95.9         | 5.2                   | 21.9                           | 37.9                            |

Table 3. Regression Characteristics of the Curve Obtained Using Extracts of Pure MON810 GM Maize Line within the Range of 0.04–3%<sup>a</sup>

| ID of dilution | observed GMO content (%) | expected GMO content (%) | MFI    | recovery (%) | repeatability RSD (%) | intermediate precision RSD (%) | predicted concentration (pp/mL) |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| D1             | 0.034                    | 0.04                     | 24.5   | 85.0         | 44.8                  | 49.8                           | 0.46                            |
| D2             | 0.092                    | 0.093                    | 66.1   | 98.6         | 10.8                  | 44.2                           | 1.23                            |
| D3             | 0.183                    | 0.185                    | 132.2  | 99.1         | 7.1                   | 25.4                           | 2.46                            |
| D4             | 0.375                    | 0.375                    | 270.7  | 100.2        | 8.9                   | 18.5                           | 5.04                            |
| D5             | 0.752                    | 0.75                     | 571    | 105.6        | 6.7                   | 14                             | 10.6                            |
| D6             | 1.544                    | 1.5                      | 1112.6 | 102.9        | 6.4                   | 21.6                           | 20.7                            |
| D7             | 2.858                    | 3                        | 2059.5 | 95.3         | 7.4                   | 18                             | 38.3                            |

<sup>a</sup> D1 < LOD.

Table 4. Regression Characteristics of the Curve Obtained Using Cry1Ab Purified Protein within a Range of 5.5–550 ng/mL

| ID of purified protein | observed concentration (pp/mL) | expected concentration (pp/mL) | MFI     | recovery (%) | repeatability RSD (%) | intermediate precision RSD (%) |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------|--------------|-----------------------|--------------------------------|
| PF1                    | 4.5                            | 5.5                            | 244.1   | 82.6         | 7.3                   | 33.9                           |
| PF2                    | 8.9                            | 11                             | 481.7   | 81.5         | 7.4                   | 31.9                           |
| PF3 (1) <sup>a</sup>   | 23.9                           | 22                             | 1283.5  | 108.6        | 5.6                   | 42.1                           |
| PF4 (2) <sup>a</sup>   | 28.7                           | 27.5                           | 1540.2  | 104.2        | 2.8                   |                                |
| PF5                    | 57.4                           | 55                             | 3085.8  | 104.4        | 2.5                   | 16.4                           |
| PF6 (1)                | 102.5                          | 110                            | 5505.2  | 93.2         | 4.4                   | 7.9                            |
| PF7 (2) <sup>a</sup>   |                                | 275                            | 10032.2 |              | 3.4                   |                                |
| PF8 <sup>b</sup>       |                                | 440                            | 8628.4  |              | 4.8                   | 14.4                           |
| PF9                    |                                | 550                            | 11090.6 |              | 3.5                   | 22.6                           |

<sup>a</sup> Outputs are based on six parallel measurements. <sup>b</sup> Outputs are based on three parallel measurements.

analysis can be foreseen as a complementary tool to the ELISA assays generally applied only for screening purposes, as we previously have shown (4). In particular, the assay conditions were optimized to reach LOD and LOQ values, allowing the detection and quantification of contamination around the 0.1% level as with conventional ELISA tests. Unfortunately, due to the lack of commercially retrievable antibodies against GMO related proteins, it was not possible for us to fully exploit the multiplex potentiality of the system. In the present paper, only the quantification of a single GMO target trait is reported. The data provided show that the system is linear and has its optimal performance within the range of 0–3% GMO, perfectly in line with the contamination limits imposed by the legislation. This result is comparable to the performance of the commercial ELISA kits and of the ELISA reverse Cry1Ab quantitative assay in which, using the same antibodies, linearity was achieved within the range of 0–2% (4, 5). Also, the evaluation of the other parameters, such as the assay recovery and RDS, confirms that the system is comparable with the ELISA and ELISA reverse assays. In particular, the assay recovery and RDS values were in the range of 81.5–108.6 and 1.9–10.8% (except point D1), respectively, in accordance with the values of the ELISA reverse assay, with which the accuracy was in the range of 86.52–113.47% and the RSD was from 2.05 to 14.17% (5). Commercial ELISA kits were, in general, less accurate, showing values of accuracy in the range of 52.9–266.4% and RDS values from 7.6 to 16.1% (4). The LOD and the LOQ values of the

innovative assay were also comparable to the LOD and LOQ values of the ELISA reverse. Indeed, ELISA reverse LOD and LOQ were equal to 0.0056 and 0.0168%, respectively, whereas the microsphere-based immunoassay LODs, calculated using three different materials (the purified protein, CRMs, and 100% MON810 protein extract dilutions), were equal to 0.764 pp/mL, 0.018% (0.357\* pp/mL), and 0.056% (~0.751\* pp/mL), respectively; meanwhile, the best value of LOQ was achieved by using CRMs and equal to 0.054% (~1.072\*\* pp/mL) (5). LOD and LOQ of commercial ELISA kits were in the range of 0.034–0.107 and 0.082–0.259%, respectively (4).

In conclusion, the potential of the system here described enables us to look forward to a multiple-target assay able to detect and quantify different GM traits simultaneously occurring within the same sample preparation. Here, a panel of different antigen-reactive capture antibodies could be cross-linked to individually distinguishable color-coded beads, allowing quantification of several targets as already demonstrated in other fields of application (6–13).

## LITERATURE CITED

- (1) European Commission. Recommendation (EC) 787/2004 of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context

- of Regulation (EC) 1830/2003. Text with EEA relevance. *Off. J. Eur. Communities* 2004, L348, 0018–0026.
- (2) European Commission. Regulation (EC) 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Off. J. Eur. Communities* 2003, L268, 0001–0023.
- (3) European Commission. Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off. J. Eur. Communities* 2003, L268, 0024–0028.
- (4) Ermolli, M.; Fantozzi, A.; Marini, M.; Scotti, D.; Balla, B.; Hoffmann, S.; Querci, M.; Proietti, C.; Van den Eede, G. Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins. *Accredit. Qual. Assur.* 2006, 11, 55–57.
- (5) Ermolli, M.; Prospero, A.; Balla, B.; Querci, M.; Mazzeo, A.; Van den Eede, G. Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and CryIAB GM proteins detection and quantification. *Food Addit. Contam.* 2006, 23, 876–882.
- (6) International Standard (ISO) 21572:2002. *Foodstuffs—Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products—Protein-Based Methods*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2002.
- (7) International Standard (ISO) 5725:1994. *Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1994.
- (8) International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Gold Book. Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed.; McNaught, A. D., Wilkinson, A., Eds.; Blackwell Scientific Publications, Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1997.
- (9) Carvon, R. T.; Vignali, D. A. Simultaneous quantification of 15 cytokines using a multiplex flow cytometer assay. *J. Immunol. Methods* 1999, 227, 41–52.
- (10) Seidenman, J.; Peritt, D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 micro-sphere system. *J. Immunol. Methods* 2002, 267, 165.
- (11) Martins, T. B. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9, 41–45.
- (12) Yang, L.; Tran, D. K.; Wang, X. BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic biosensor. *Genome Res.* 2001, 11, 1888–1896.
- (13) Ye, F.; Li, M.; Taylor, J. D.; Nguyen, Q.; Colton, H. M.; Casey, W. M.; Wagner, M.; Weinar, M. P.; Chen, J. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum. Mutat.* 2001, 17, 305–316.
- (14) Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 835–855.
- (15) Taylor, J. D.; Briley, D.; Nguyen, Q. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques* 2001, 3, 661–666, 668–669.
- (16) Janosy, G.; Jani, I. V.; Kahan, M.; Burnett, D.; Mandy, F.; Shapiro, H. Precise CD4 T-cell counting using red diode laser excitation: for richer, for poorer. *Cytometry* 2002, 50, 78–85.

Received for review May 29, 2006. Revised manuscript received November 28, 2006. Accepted November 30, 2006.

JF061506P

**Draft**

**First application of fluorescent micro-sphere based assay to GMO detection: 35S gene promoter and *epsps* sequences were detected in genetically modified Soya.**

Anna Fantozzi<sup>1</sup>, Monica Ermolli\*, Massimiliano Marini<sup>2</sup>, Branko Balla, Maddalena Querci, and Guy Van den Eede.

Biotechnology & GMOs Unit, Institute for Health and Consumer Protection, DG-Joint Research Centre, European Commission, I-2120 Ispra (Va), Italy.

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics. Centre for Biomedicine Department of Clinical-Biological Sciences (DKBW). University of Basel Mattenstrasse 28 CH-4058 Basel Switzerland.

<sup>2</sup>Reference Materials Unit, Institute for Reference Materials and Measurements, European Commission, 2440 Geel, Belgium

**Abstract**

An innovative multiple screening protocol allowing the detection of specific DNA sequences of *epsps* and p35S in GM Soya flours simultaneously, was developed. Utilizing the Luminex x-MAP technology and the Luminex-100 instrument, two different sets of fluorescent beads were cross-linked to specific oligonucleotide probes for both sequences, respectively. A specific PCR reaction was set up to insert a biotinylated oligonucleotide in both PCR fragments. This step allowed the detection of the amplification product through binding with a streptavidin-phycoeritrin conjugate. In particular, the protocol aimed to assess very low amount of target. Parameters such as accuracy, repeatability and reproducibility, RSD, LOD and LOQ were considered to evaluate the performances of the assay. The potential of the system here described, enables us to look forward to a multiple target assay able to detect and

quantify tens of sequences simultaneously occurring within the same sample preparation. The present study describes the first application of a multi-target fluorescent micro-sphere based assay to DNA GMO detection.

Key words: GMO, *epsps*, p35S, multiple assays, fluorescent beads.

## **Introduction**

The need to comply with mandatory GM thresholds and the increasing number of genetically modified events present on the European food and feed market, gives us the motivation to develop an innovative multi-target protocol to assess GMO presence.

Adventitious contamination of GM material in a free food background is difficult to avoid, but labelling and traceability of GM presence is required by the EU regulation starting from 0.9% (1-3). The majority of the validated protocols for GMO determination are based on polymerase chain reaction due to its sensitivity, specificity and applicability to the analyses of complex matrixes. Two main different approaches have been developed to quantify targets by PCR. The first method was based on the competitive quantitative PCR (QC-PCR) (4, 5). In such method an internal standard (competitor DNA) added in a known amount to the samples, competes with the target DNA for the primer during the reaction. The internal standard have to be amplified with the same efficiency of the target but have also to be distinguished from it by size. A good quantification can be reach only when both conditions are respected. The PCR products are analysed by a digital imaging device which keep of an ethidium bromide gel electrophoresis. This procedure is poorly reproducible and accurate also due to the limited resolution of slab gel electrophoresis. Although the system has great potentiality it was abandoned and replaced by the Real Time PCR (RT-PCR). To quantify GMO the RT-PCR is actually the main tool utilised in Europe where several validated protocols are available (<http://gmo-crl.jrc.it/>). The method is based on the use of fluorescent markers for detecting the PCR product synthesised during each cycle of the reaction. Target quantification is calculated in the early cycle of the reaction when the amplification follows a linear regression curve and the PCR product concentration correlates well with the concentration of the initial target molecules (6). In the EU recommendations and directives,

the unit of measurement for GMO is the % of total weight/GMO weight. To apply PCR methods this unit of measurement has been converted in relative copy number between the specific GMO event observed and a taxon-specific DNA sequence using an appropriate reference material. Besides its great popularity, also this approach has some limitations and disadvantages. The first limit consists in a low inter-laboratory reproducibility as confirmed by the high values of RDS as reported and demonstrated in several studies by different Authors (7-13). Secondly, RT-PCR is not applicable when multiple targets have to be measured or a huge amount of samples have to be tested routinely. In these cases, the RT-PCR appears highly time consuming and really expensive because of few targets can be quantify in a single run and for its correct application are necessary trained workers and a well equipped laboratories.

More sophisticated and expensive approaches have been recently developed for GMO detection such as DNA microarray technique, combined methods as PCR plus capillary gel electrophoresis analyses and multiplex end-point PCR for specific matrix. Although, all these approaches could help in particular cases to asses the GMO presence in specific complex matrixes, they are generally applicable with difficulties by control laboratories for GMO checking on daily bases.

In this study we propose an innovative system that may allow multi-target analysis based on the usage of commercial fluorescent beads coupled to specific oligonucleotide probes for target detection and possible quantification after target amplification by PCR. The method is based on fluorescent detection using the Luminex 100 device. The Device is a computer-enhanced flow cytometer that uses microspheres composed of polystyrene and methacrylate to provide surface carboxylate functionality. The fluorescent beads are commercially available in 100 distinctly colored sets obtained by the producer mixing two fluorophores (red and orange) in a unique ratio. Differently colored beads sets can be individually coupled via the surface carboxylate moiety to a specific oligonucleotide probe for a unique nucleic acid sequence. Once individually coupled, the beads sets can be mixed and the mixture can be used to probe complex solutions containing multiple tagged sequences in a single hybridization step. Few cycles of amplification can be sufficient to label target sequences adding biotinylated-nucleotides into the PCR reaction mixture. The procedure is therefore

composed by a target amplification step, during which the targets were labelled plus a detection step performed through the Luminex device.

In previous studies the Luminex xMap technology was successfully applied for nucleic acid detection and quantification in several fields as genetic disease diagnoses, genotyping, gene expression profiling and in several others applications based on protein recognition. Here we described the first application in GMO DNA detection assessing the simultaneous presence of p35S and *epsps*, confirming the reliability and versatility of the system to be widely applied. Comparing the Luminex assay to the RT-PCR method the main advantage consists in the possibility to detect in one run up to 100 different targets in a sample, saving a lot of time and reducing the cost of the analysis, the cost of a multiplex assay is comparable to a single run of RT-PCR.

The technology offers additional advantages of a high throughput version (HTS). The HTS instrument runs up to 4 microplates for either 96- or 384-well plates and is compatible with front-end plate handling robotics reducing hands-on time.

As for all GMO assays, the limiting factor in probes and primers design, is the dependence on the availability of information on the full-length GMO sequences.

The aim of this study was to explore a new technique able to detect few target molecules and to investigate the versatility and the performances of the system. We established an assay for detecting p35S and *epsps* in Soya RUR as examples of the most representative GM element present on the EU food market.

### **Material and Methods**

p35S and *epsps* fragments were amplified from genomic DNA from Certified Reference Materials (CRMs) for genetically modified Roundup Ready soya beans (ERM-BF410) at 5% and 0%. DNA extraction was performed by the Wizard plus SV Minipreps DNA extraction kit, (Promega, Italy). DNA was resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0) and quantify with PicoGreen Dye for dsDNA quantification with BioRad VersaFluor Fluorometer. DNA amplification was performed adding into the reaction mixture 50-20-10-5-2.5 ng of genomic DNA, respectively. The reaction mixture was composed by Taq 5 U/ $\mu$ L Roche, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 200  $\mu$ M, Primers 50 nM per reaction in a final volume of 25

μL each all samples. Amplification steps were: denaturing step at 94°C for 5min followed by 35 cycles of 94°C 30", 55°C 30", 72°C 45", finally 72°C for 7min. All samples were run in triplicate. The sequences of primers and probes designed for the experiments were: p35S Forward Primer 5'-cat tgc gat aaa gga aag gc-3'; p35S Reverse Primer 5'-biotinilated-gga tag tgg gat tgt gcg tc-3'; p35S Probe 5'-gcc tct gcc gac agt ggt cc-3'; p35S Anti-probe 5'-biotinilated-gga cca ctg tcg gac gag gc-3'; epsps Forward Primer 5'-cct tea tgt tcg gcg gtc tc-3'; epsps Reverse Primer 5'-biotinilated-gca agg taa cgg gaa gac g-3'; epsps Probe 5'-gat ggg ccg cgt gtt gaa-3'; epsps Anti-probe 5' biotinilated-gtt caa cac gcg gcc cat c-3'.

An aliquote of 1 μL of each PCR products was loaded on a Lab-on-Chip 500 to be analysed by the Agilent Bioanalyzer. The samples were then used to set up Luminex DNA quantification experiments.

#### Selected microsferes:

Luminex bead set N.152 were coupled with the oligonucleotide probe specific for 35S while the bead set N.173 were coupled with the probe oligonucleotide specific for epsps.

#### Beads cross-linking reaction protocol:

0.2 nanomoles of the capture probe were incubated with  $5.0 \times 10^6$  of the stock micro spheres in 50 μL of Coupling buffer (0,1M Mes (2[N-Morpholino}ethanesulfonic acid, Sigma), pH 4,5. 2.5 μL of a fresh solution 10 mg/ml EDC was added into the reaction tube and incubated for 30 min at RT (repeat EDC addition and incubation). Beads were washed first with 1.0 ml of 0.02% Tween-20 followed by 1.0 ml of 0.1% SDS. Coupled micro spheres were finally diluted the in 100 μL of TE, pH 8.0.

Beads recovery after conjugation was evaluated by inverted microscope count. Coupling efficiency was measured by beads titration with the specific biotinilated oligonucleotide anti-probe per each target.

#### Oligonucleotide hybridization:

Once an appropriate oligonucleotide-coupled microsphere set is selected beads are resuspended by vortex and sonication for approximately 20 seconds. 33μl of Working Microsphere Mixture (150 micro spheres/ μl in 1.5X TMAC Hybridization Buffer) were incubated with 17 μl of TE pH 8.0 containing biotinilated complementary oligonucleotide (5-200 femtomoles) after mixing gently but thoroughly.



To prevent evaporation the reaction plate was covered and incubated at 95-100°C for 1 to 3 minutes to denature any secondary structure in the sample oligonucleotides and then incubated at hybridization temperature (55°C) for 15 minutes. \*

Signal development:

25µl of Reporter Mix containing streptavidin-R-phycoerythrin 10mg/ml in 1X TMAC was added to each well and mixed gently by pipetting up and down several times, and incubated at hybridization temperature for 5 minutes.

Measurements:

50µl of final reaction volume were analyzed at hybridization temperature on the Luminex100 analyzed according to the system manual. \* These steps can be combined with the use of a thermal cycler programmed as follows: Hold at 95°C, 1 (to 3) minutes Hold at hybridization temperature, forever.

**Results**

We tested the instrument potential of analyzing DNA mixtures. In particular, we chose to analyze the presence of the GTS 40-3-2 in RoundupReady standard materials.

We designed primers to amplify fragments either in the 35S promoter region of the constructs or in the EPSPS portion of the protein and used a reverse primer biotinilated.

Specific probes complementary to the reverse strand of the amplicon and matching in a central region of it was designed for both targets and cross-linked to two different sets of beads. We have coupled beads N.152 with an oligonucleotide probe specific for 35S and beads N.173 with a probe specific to EPSPS following the protocol previously described.

Beads recovery after conjugation was evaluated by inverted microscope count.

Coupling efficiency was measured by beads titration with the specific biotinilated oligonucleotide anti-probe per each target. Beads cross linking efficiency was assessed by incubating known amounts of beads to serial dilutions of a biotin labeled anti-probe oligonucleotide and detected following streptavidin-PE incubation at the Luminex-100. An example of the titration curve is represented in Fig. 5

To set-up the instrument we analyzed standard reference material (5% Roundup Ready Soya) provided by the institute for reference Material IRMM-Geel.

Genomic DNA was extracted from Full-Fat Soya flour 5% GMO utilizing the Wizard DNA Miniprep extraction kit, Promega

Table 1 shows the Glycine max genome copy number per 100 ng and an estimate of the transgene copy N. of a 1% transgenic plant.

The minimum GMO copy number tested was amplified from 2.5 ng of genomic 5% GMO Roundup Ready DNA preparation containing 111 GMOs copies. PCR conditions were optimized not to reach saturation levels. PCR products were visualized using the AGILENT 2100 Bioanalyzer lab on chip instrument (fig.3). Serial dilutions of the PCR product for EPSPS and S35 biotinilated amplicons were performed and hybridized to the conjugated beads for Luminex detection.

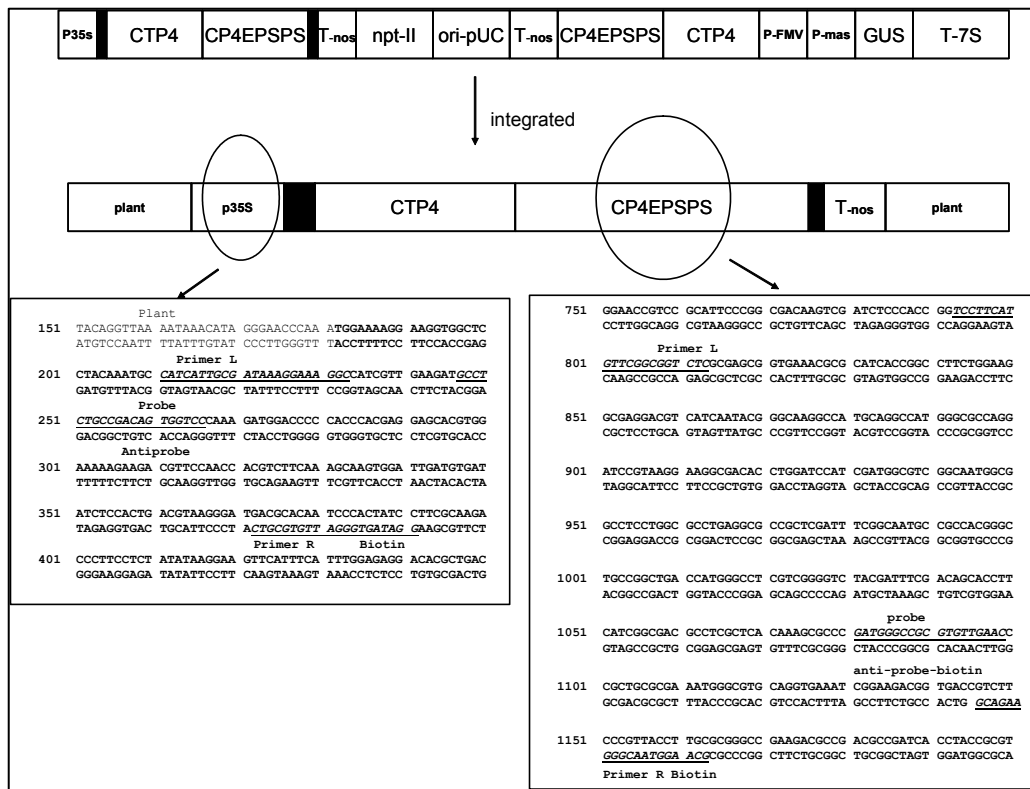


Fig 1. Schematic representation of the GTS40-3-2 transgenic construct and of the integrated parts into the Roundup Ready Soya genome.

**Junction sequence plant/35S EMBL accession #AJ308514 and Cauliflower mosaic virus, complete genome NC001497 EPSPS synthetic construct AY125353**

EPSPS

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| dil PCR prod              | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 1.6                       | 33665    | 183             | 8.6                  |
| 3.25                      | 52819    | 230             | 7.9                  |
| 6.25                      | 5284     | 73              | 1.8                  |
| 12.25                     | 50613    | 225             | 4.6                  |
| 25                        | 110      | 10              | 0.2                  |
| 50                        | 4826     | 69              | 1.0                  |
| 100                       | 106754   | 327             | 4.0                  |

\*based on two replicate measurements

**LOD = 50.4 (MFI)**

**LOQ = 151.1 (MFI)**

EPSPS (IRMM)

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (GMO%)              | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.5                       | 1127087  | 1062            | 25                   |
| 1                         | 1024921  | 1012            | 17                   |
| 2                         | 871830   | 934             | 14                   |

\*based on three replicate measurements

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (GMO%)                       | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 0.5                                | 13947931 | 3735            | 89                   |
| 1                                  | 14019730 | 3744            | 63                   |
| 2                                  | 5330504  | 2309            | 34                   |
| 100                                | 99336    | 315             | 3.8                  |

\*based on two replicate measurements

**LOD = 629 (MFI)**

**LOQ = 1888 (MFI)**

p35s

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| Dil PCR prod              | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 1.6                       | 1239     | 35              | 15                   |
| 3.25                      | 6149     | 78              | 5.0                  |
| 6.25                      | 123931   | 352             | 17                   |
| 12.25                     | 214102   | 463             | 13                   |
| 25                        | 381709   | 618             | 9.3                  |
| 50                        | 431534   | 657             | 7.8                  |
| 100                       | 274021   | 523             | 5.5                  |

\*based on two replicate measurements

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| Dil PCR prod                       | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 1.6                                | 37517    | 194             | 80                   |
| 3.25                               | 2545980  | 1596            | 101                  |
| 6.25                               | 2305539  | 1518            | 73                   |
| 12.25                              | 131573   | 363             | 10                   |
| 25                                 | 6763484  | 2601            | 39                   |
| 50                                 | 6328753  | 2516            | 30                   |
| 100                                | 1729363  | 1315            | 14                   |

\*based on three replicate measurements

**LOD = 45.1 (MFI)**

**LOQ = 135.4 (MFI)**

Calibration: anti-probe

---

repeatability conditions\*

---

| level (nmol) | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
|--------------|----------|-----------------|----------------------|
| 0.00078125   | 6597     | 81              | 2.8                  |
| 0.0015625    | 179061   | 423             | 12.2                 |
| 0.003125     | 74415    | 273             | 6.3                  |
| 0.00625      | 23300    | 153             | 2.7                  |
| 0.0125       | 223391   | 473             | 6.2                  |
| 0.025        | 21172    | 146             | 1.5                  |
| 0.05         | 678028   | 823             | 7.2                  |
| 0.1          | 1302681  | 1141            | 8.7                  |
| 0.2          | 43212    | 208             | 1.5                  |
| 0.4          | 550993   | 742             | 5.9                  |

---

\* *based on two replicate measurements*

---

intermediate precision conditions\*

---

| level (nmol) | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
|--------------|----------|-----------------|----------------------|
| 0.00078125   | 3706229  | 1862            | 64                   |
| 0.0015625    | 3168141  | 1996            | 57                   |
| 0.003125     | 2010430  | 1511            | 35                   |
| 0.00625      | 779781   | 839             | 15                   |
| 0.0125       | 73150    | 545             | 7.2                  |
| 0.025        | 1763967  | 1255            | 13                   |
| 0.05         | 4532631  | 1560            | 14                   |
| 0.1          | 10248984 | 2339            | 18                   |
| 0.2          | 6520700  | 2517            | 19                   |
| 0.4          | 6253197  | 2578            | 20                   |

---

\* *based on three replicate measurements*

**LOD = 165.8 (MFI)**

**LOQ = 497.5 (MFI)**

### PCR Samples

| repeatability conditions* |          |                 |                      |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (nmol)              | variance | SD <sub>r</sub> | RSD <sub>r</sub> (%) |
| 0.0064                    | 0.13     | 0.36            | 0.46                 |
| 0.032                     | 53       | 7               | 1.1                  |
| 0.16                      | 5384     | 73              | 2.1                  |
| 0.8                       | 19443    | 139             | 1.4                  |
| 4                         | 906      | 30              | 0.3                  |
| 20                        | 242374   | 492             | 4.6                  |
| 100                       | 190697   | 436             | 4.1                  |

\*based on two replicate measurements

| intermediate precision conditions* |          |                 |                      |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------------------|
| level (nmol)                       | variance | SD <sub>R</sub> | RSD <sub>R</sub> (%) |
| 0.0064                             | 0.86     | 0.93            | 1.18                 |
| 0.032                              | 1779.8   | 42              | 6.6                  |
| 0.16                               | 748.5    | 27              | 0.8                  |
| 0.8                                | 1227.0   | 35              | 0.4                  |
| 4                                  | 418.0    | 20              | 0.2                  |
| 20                                 | 19014.9  | 138             | 1.3                  |
| 100                                | 109779.0 | 331             | 3.1                  |

\*based on three replicate measurements

### Discussion

The present manuscript describes the potentiality of the multi-target DNA screening assay for applications specifically to control enforcement actions related to genetically modified organisms. Multi-target screening assays of potentially contaminated crops can in fact reduce uncertainty by providing more information about crop composition than targeted analysis alone. In addition, multivariate statistical methods can be applied to analyze the results in

order to obtain a clearer overall picture of how the given samples relate to each other, rather than the comparison of single compounds. These facts may make multi-target assays an increasingly attractive, especially with the advent of second generation GM crops containing multiple transgenes in the EU. Consumer awareness on food safety is of considerable societal concern within the EU. Monitoring adventitious GM presence for identity preservation and traceability measures along the food/feed chain highlights the need of multi-target and high throughput analysis in the investigation of several contaminations in either raw samples or finished food products and feedstuffs. In this respect, the first application of the fluorescent bead based assay/Luminex platform to DNA GMO for qualitative analysis can be foreseen as a complementary tool to RT-PCR assays generally applied only for quantitative purposes of a single target. Here, a panel of different capture probes could be cross linked to individually distinguishable colour coded beads allowing quantification of several targets as already demonstrated in other fields of application (6-13).

The high throughput system we used allows for either 96- or 384-well plates with the option to analyze four plates simultaneously and is compatible with front-end plate handling robotics. A 96-well plate assay can be completed in less than one day, from 1 to 3 hours for DNA extraction, 1 hour for DNA quantification and qualitative checking by agarose gel electrophoresis, finally 1 hour for instrument analysis. The estimation of the cost per assay is directly link to the number of targets included in the assay. For single analysis the cost is close to RT-PCR assay or ELISA (close to one Euro and two Euro each well, respectively) but in case of multiple simultaneous detections the costs per sample would be proportionally reduced.

In particular, the assay conditions were optimized in order to reach limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values allowing the detection and quantification OGM traces. Unfortunately, due to the lack of full length DNA sequences of several GMO traits was not possible for us to fully exploit the multiplex potentiality of the system. In the present manuscript, only two GMO related sequences were used as a model of multi-target detection. The data provided show that the system is capable to detect traces of targets: surely below

limits imposed from the legislation to GMO. Here the DNA presence is expressed in number of molecules in a range of values from femtomoles to nanomoles.

As an alternative to most common detection and quantification tools, we propose the use of a high through-put system that will allow the detection of 100 different DNA sequences in a single sample and up to 9600 target sequences simultaneously. Luminex Laboratory Multi Analyte Profiling (LABMAP3) assay system is extremely versatile and offers the possibility to evaluate both DNA and protein amounts. We describe here a new multiplexed assay using the LABMAP3 system as the first application for DNA-GMO analysis. It will allow identification and quantification with the prospective of being able to deal with a growing amount of samples to be analyzed and certified for marketing approval or labeling purposes. Potential application for this innovative strategy could include pre- and post-marketing assays.

In conclusion, the potential of the system here described, enables us to look forward to a multiple target assay able to detect and quantify different GM traits simultaneously occurring within the same sample preparation.

#### References to be included

European Commission, Recommendation (EC) No 787/2004 of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. Text with EEA relevance. *Official Journal*. 2004, L 348, 0018 - 0026

European Commission, Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal*. 2003, L 268, 0001-0023.

European Commission. Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Official Journal*. 2003, L 268, 0024-0028.

Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H. F. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87:2725-2729



Hubner P., Studer E., Lüthy J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 10:353-358 (1999).

Higuchi R; Fockler C; Dollinger G; Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11:1026-1030.(1993)

Hohne M, Santisi C R, Meyer R. Real-time multiplex PCR: an accurate method for the detection and quantification of 35S CaMV promoter in genetically modified maize containing food. *European Food Research and Technology*, 2002, 215(1): 59-64

EU Tender Report Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products. Report of the EU Tender XXIV/98/A3/001 or Internet (2000)

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/biotech/biotech05\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/biotech/biotech05_en.pdf)

Hubner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P: Validation of PCR methods for quantification of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*, 84:1855-1864. (2001)

Pauli U, Schouwey B, Hubner P, Brodmann P, Eugster A: Quantitative detection of genetically modified soybean and Maize: method evaluation in a Swiss ring trial. *Mitt Lebensm Hyg* 2001, 92:145-158.

Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D, Song P: Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *JAOAC Int* 2005, 88:136-155.

Holst-Jensen A, Berdal KG: The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *JAOAC Int* 2004, 87:927-936.

Ermolli M., Fantozzi A., Marini M., Scotti D., Balla B., Hoffmann S., Querci M., Paoletti C. and Van den Eede G. Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins". *Accreditation and Quality Assurance (ACQUAL) 11*: 55-57. (2006)

Ermolli M, Prospero A., Balla B., Querci M., Mazzeo A. and Van den Eede G. Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and Cry1AB GM proteins detection and quantification. *Food Additive & Contaminants* 23, 876-882 (2006).

International Standard (ISO) 21572:2002. Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein-based methods. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland. (2002)

International Standard (ISO) 5725:1994. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland. (1994).

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Gold Book. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd Edition. Blackwell Scientific Publication. Edited by McNaught, A.D. & Wilkinson, A. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1997).

Carson, R.T., Vignali, D.A. Simultaneous quantification of 15 cytokines using a multiplex flow cytometer assay. *J. Immunol. Methods.* , 227, 41-52. (1999).

Seideman, J., Peritt, D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 micro-sphere system. *J. Immunol Methods*, 267, 165 (2002).

Martins, T.B. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 41-45 (2002).

Yang, L., Tran, D.K., Wang, X. BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic bioassay. *Genome Res.*, 11, 1888-98 (2001).

Ye, F., Li, M., Taylor, J.D., Nguyen, Q., Colton, H.M., Casey, W.M., Wagner, M., Weiner, M.P., Chen, J. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat*17, 305-16 (2001).

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. *Pure Appl. Chem.*, 74, 835-855 (2002).

Taylor, J.D., Briley, D., Nguyen, Q. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques.* 3, 661-6, 668-9. (2001)

Janossy, G., Jani, I.V., Kahan, M., Barnett, D., Mandy, F., Shapiro, H. Precise CD4 T-cell counting using red diode laser excitation: For richer, for poorer. *Cytometry.* 50, 78-85 (2002).

Flagella M, Bui S, Zheng Z, Nguyen CT, Zhang A, Pastor L, Ma Y, Yang W, Crawford KL, McMaster GK, Witney F, Luo Y. A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling. *Anal Biochem.*, 352(1):50-60 (2006).

Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, Hogenesch J, O'connell RM, Cheng G, Saez E, Miller JF, Tontonoz P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*, 119(2):299-309, (2004).

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL,

Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834-838 (2005).

Dunbar SA, Jacobson JW. Rapid screening for 31 mutations and polymorphisms in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by Luminex xMAP suspension array. *Methods Mol Med.*, 114:147-71 (2005).

Strom CM, Janeczko RA, Anderson B, Redman J, Quan F, Buller A, McGinniss MJ, Sun WM. Technical validation of a multiplex platform to detect thirty mutations in eight genetic diseases prevalent in individuals of Ashkenazi Jewish descent. *Genet Med*, 7(9):633-9, (2005).

Aston CE, Ralph DA, Lalo DP, Manjeshwar S, Gramling BA, DeFreese DC, West AD, Branam DE, Thompson LF, Craft MA, Mitchell DS, Shimasaki CD, Mulvihill JJ, Jupe ER, 2005, Oligogenic combinations associated with breast cancer risk in women under 53 years of age *HUMAN GENETICS*, 116(3):208-21

Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, Diccico-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet.*, 77(5):851-68, (2005).

Bruchova H, Krac(caron)marova A, C(caron)erny V, Brdic(caron)ka R, Using LabMAP Luminex technology for SNP detection. *Klinicka Biochemie a Metabolismus*, 13(34)/2/ 87/91(2005).

Cowan LS, Diem L, Brake MC, Crawford JT, 2004, Transfer of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 474-477

Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, Wheeler CM. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis*, 191(6):969-76 (2005)

Dunbar SA. Applications of Luminex(R) xMAPtrade mark technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta*, 363(1-2):71-82, (2005).

Hancock DK, Tully LA, Levin BC. A Standard Reference Material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics*, 86(4):446-61, (2005).

Hurley JD, Engle LJ, Davis JT, Welsh AM, Landers JE. A simple, bead-based approach for multi-SNP molecular haplotyping. *Nucleic Acids Research*, 32: e186, (2005).

Li ZP, Kambara H. Single Nucleotide Polymorphism Analysis Based on Minisequencing Coupled with a Fluorescence Microsphere Technology *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(8):1256-1260 , (2005)

Page BT, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *J Clin Microbiol*, 43(9):4507-14 (2005).

---

## VII BIBLIOGRAFIA

---

1. Aarts, H.J., van Rie, J.P., Kok, E.J. Traceability of genetically modified organisms. *Expert Rev Mol Diagn.* Jan; 2 (1):69-76 (2002)
2. Ahmed, F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology.* May; 20 (5):215-23 (2002).
3. Aston, CE, Ralph DA, Lalo DP, Manjeshwar S, Gramling BA, DeFreese DC, West AD, Branam DE, Thompson LF, Craft MA, Mitchell DS, Shimasaki CD, Mulvihill JJ, Jupe ER, 2005, Oligogenic combinations associated with breast cancer risk in women under 53 years of age *HUMAN GENETICS*, 116(3):208-21 (2005).
4. Background Paper Gene Flow From Genetically Modified Crops ACRE (2002).
5. Bateman, A.J. Contamination of seed crops. II. Wind pollination. *Heredity* I: 235-46 (1947).
6. Benayed, R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, Dicicco-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH, 2005, Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet.*, 77(5):851-68 (2005).
7. Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology* 32, 156-173 (2000).
8. Biagini, R.E., Murphy D.M., Sammons D.L., Smith J.P., Striley C.A.F., MacKenzie B.A. Development of multiplexed fluorescence microbead covalent assays (FMCAs) for pesticide biomonitoring. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 470-477 (2002).
9. Birch, R.G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 48: 297-326 (1997)
10. Bock A.K., Lheureux K., Libeau-Dulos M., Nilsagård H., Rodriguez-Cerezo E. Scenarios for co-existence of genetically modified, conventional and organic crops in European agriculture (IPTS - JRC) v.sito [aphis.usdagov/brs/soybean](http://aphis.usdagov/brs/soybean) (2002).
11. Bourlaug, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1997, 3: 119-127 (2005).
12. Bruchova, H, Krac(caron)marova A, C (caron)erny V, Brdic(caron)ka R, 2005, Using LabMAP Luminex technology for SNP detection. *Klinicka Biochemie a Metabolismus*, 13(34)/2/ 87/91 (2005)
13. Cai, H., White, P.S., Torney D., Deshpande A., Wang, Z., Marrone, B., and Nolan, J.P. Flow cytometry-based minisequencing: A new platform

- for high-throughput single nucleotide polymorphism scoring. *Genomics*, 66: 135-143 (2000).
14. Canadian Food Inspection Agency, Plant Biosafety Office Decision Document DD95-05: Determination of Environmental Safety of Monsanto Canada Inc.'s Glyphosate Tolerant Soybean (*Glycine max* L.) Line GTS 40-3-2 (2001).
  15. Canadian Food Inspection Agency, Plant Biosafety Office. Decision Document DD 2002-35 Determination of the Safety of Monsanto Canada Inc.'s Roundup Ready™ Corn (*Zea mays* L.) Line 603 (2001).
  16. Carpenter, J., Felsot, A., Goode, T., Hammig, M., Onstad, D., Sankula, S. Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops Council for Agricultural Science and Technology (2002).
  17. Carson, R.T. Vignali, D.A. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *Journal of Immunological Methods*, 227: 41-52 (1999).
  18. Ceccherini, M.T., Potè J., Kay, E., Van, V.T., Maréchal, J., Pietramellara, G., Nannipieri, P., Vogel, T.M., Simonet, P. Degradation and Transformability of DNA from Transgenic Leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan., pp: 673-678 (2003).
  19. Chilton, M., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciacky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E. W. Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cell: the Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell* (1977).
  20. Chrispeels, M.J. Biotechnology and the Poor. *Plant Physiology*, 124, pp.3-6 Sep (2000)
  21. Collins, G.B., Shepard, R.G. Engineering Plants for Commercial Products and applications Vol. 792 *Annals New York Academy of Sciences*, New York (1996).
  22. Commission Directive 2004/43/EC of 13 April 2004 amending Directive 98/53/EC and Directive 2002/26/EC as regards sampling methods and methods of analysis for the official control of the levels of aflatoxin and ochratoxin A in food for infants and young children (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* L 113, 20/04/2004 P. 0014 – 0016
  23. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal* L 07, 16/03/2001 P. 0001 – 0013
  24. Council Regulation (EC) No 1139/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. *Official Journal* L 159 , 03/06/1998 P. 0004 – 0007

25. Cowan, LS, Diem L, Brake MC, Crawford JT. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 474-477 (2004).
26. Crawley, M.J. Biotechnology: Transgenic crops in natural habitats. *Nature*, 409, 682– 683. (2001).
27. Crowther, J. R. (editor). The ELISA guidebook. Humana Press (Totowa, New Jersey 2000)
28. De Maagd, R. A., Bosh D., Stiekema, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science* (1999).
29. Delannay, X., Bauman, T.T., Beighley, D.H. et al. Yield Evaluation of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line after Treatment with Glyphosate Crop Science (1995).
30. Deshpande, A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, Wheeler CM. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis*, 191(6):969-76 (2005)
31. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. *Official Journal of the European Union L 325*, 12.12.2003 P. 0031 – 0040.
32. Dunbar, SA, Jacobson JW. Rapid screening for 31 mutations and polymorphisms in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by Luminex xMAP suspension array. *Methods Mol Med.*, 114:147-71 (2005).
33. Dunbar, SA. Applications of Luminex(R) xMAPtrade mark technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta*, 363(1-2):71-82 (2005).
34. Duval, Y, Angelman, F. and De Durand-Gasselín, T. Somatic embryogenesis and Syntetic seed. *Biotechnology and Agriculture and Forestry*, vol. 30 Y.P.S. Bajaj, ed. Springer Verlag, Berlin 335-352 (1995).
35. Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., Hancock, J.F. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology & Systematics* 30 pp 539 – 563; ACRE (1999)
36. EN ISO 21572:2002: Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein-based methods.
37. EN ISO 5725:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
38. Engel KH, Frenzel T, Miller A. Current and future benefits from the use of GM technology in food production (2002).

39. Engelmann, F. In vitro conservation methods. In: Biotechnology and Plant genetic resources. Callow J.A., Ford-Llyd B.V. and Newbury H.J. eds. CAB International, Wallingford, Oxon. 119-161 (1977).
40. Ermolli M., Fantozzi A., Marini M., Scotti D., Balla B., Hoffmann S., Querci M., Paoletti C. and Van den Eede G. Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins". Accreditation and Quality Assurance (ACQUAL). 11: 55-57. (2006)
41. Ermolli M, Prospero A., Balla B., Querci M., Mazzeo A. and Van den Eede G. Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and Cry1AB GM proteins detection and quantification. Food Additive & Contaminants 23, 876-882 (2006).
42. European Commission, Recommendation (EC) No 787/2004 of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. Text with EEA relevance. Official Journal. 2004, L 348, 0018 - 0026
43. European Commission, Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal. 2003, L 268, 0001-0023.
44. European Commission. Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Official Journal. 2003, L 268, 0024-0028.
45. EU Tender Report (2000) Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products. Report of the EU Tender XXIV/98/A3/001or Internet [http://europa.eu.int/comm/food/fs/biotech/biotech05\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/biotech/biotech05_en.pdf).
46. FAO, WHO Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology (2001).
47. Fantozzi A, Ermolli M, Marini M, Scotti D, Balla B, Querci M and Guy Van den Eede. First application of a micro-sphere based immunoassay to GMO detection: quantification of Cry1Ab protein in GM maize. J. Agric. Food Chem. 55, 1071-1076 (2007).
48. Flagella, M, Bui S, Zheng Z, Nguyen CT, Zhang A, Pastor L, Ma Y, Yang W, Crawford KL, McMaster GK, Witney F, Luo Y. A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling. Anal Biochem., 352(1):50-60 (2006).
49. Garcia-Canas, V, Cifuentes, A, Gonzalez, R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. Crit Rev Food Sci Nutr.; 44 (6):425-36. (2004).



50. Gilliland, G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H. F. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 87:2725-2729 (1990).
51. Hadd, A.G., Laosinchai-Wolf W., Novak C.R., Badgett M.R., Isgur L.A., Goldrick M., and WalkerPeach C.R. Microsphere Bead Array and SequenceValidation of 5/7/9T Genotypes for Multiplex Screening of Cystic Fibrosis Polymorphism. *Journal of Molecular Diagnostics*, 6: 348-355 (2004).
52. Hammond, B.G., Vicini, J.L., Hartnell, G.F., Naylor, M.W., Knight, C.D., Robinson, E.H., Fuchs, R.L., Padgett, S.R. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *Journal of Nutrition* 126, 717-727 (1996).
53. Hancock, DK, Tully LA, Levin BC. A Standard Reference Material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics*, 86(4):446-61 (2005).
54. Henry, C, Morgan D, Weekes R, Daniels R, Boffey C. Farm scale evaluations of GM crops: monitoring gene flow from GM crops to non-GM equivalent crops in the vicinity. Part I: Forage Maize. [http://www.genfood.at/download/DEFRA\\_2003\\_geneflow\\_maize.pdf](http://www.genfood.at/download/DEFRA_2003_geneflow_maize.pdf). (2003).
55. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., Schell, J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector *Biotechnology*. 1992;24:377-81 (1983).
56. Higuchi R; Fockler C; Dollinger G; Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11:1026-1030. (1993)
57. Hohne, M, Santisi C R, Meyer R. Real-time multiplex PCR: an accurate method for the detection and quantification of 35S CaMV promoter in genetically modified maize containing food. *European Food Research and Technology* 215(1): 59-64 (2002).
58. Holst-Jensen,A, Berdal KG: The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *J AOAC Int*, 87:927-936 (2004).
59. Hooykaas, P.J. and Schilperoot, R.A. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathology* 32: 157-179 (1992).
60. Hubner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P: Validation of PCR methods for quantification of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*. 84:1855-1864 (2001).

61. Hubner, P., Studer E., Lüthy J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 10:353-358 (1999).
62. Hurley, JD, Engle LJ, Davis JT, Welsh AM, Landers JE. A simple, bead-based approach for multi-SNP molecular haplotyping. *Nucleic Acids Research*, 32: e186 (2005).
63. Ingram, J. Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specified limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape. MAFF Project no.RO0123. Accessed 7/8/2002 at; MAFF (2001) Background Note On Separation Distances; (2002)
64. International Standard (ISO) 21572:2002. Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein-based methods. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland 2002.
65. International Standard (ISO) 5725:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland 1994.
66. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Gold Book. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition. Blackwell Scientific Publication. Edited by McNaught, A.D. & Wilkinson, A. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 1997.
67. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Ricerche sugli OGM in agricoltura (2004).
68. IUPAC Compendium of Chemical Terminology; 2nd Edition (1997)
69. Janossy, G., Jani, I.V., Kahan, M., Barnett, D., Mandy, F., Shapiro, H. Precise CD4 T-cell counting using red diode laser excitation: For richer, for poorer. *Cytometry*. 50, 78-85 (2002).
70. Janossy, G., Jani, I.V., Kahan, M., Barnett, D., Mandy, F., Shapiro, H. Precise CD4 T-cell counting using red diode laser excitation: For richer, for poorer. *Cytometry*. 50, 78-85 (2002).
71. Joseph, SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, Hogenesch J, O'connell RM, Cheng G, Saez E, Miller JF, Tontonoz P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*, 119(2):299-309 (2004).
72. Kay, E., Vogel, T. M., Bertolla, F., Nalin, R., Simonet, P. In Situ Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Transgenic (Transplastomic) Tobacco Plants to Bacteria (2002).
73. Klein, E.K., Lavigne, C., Foueillassar, X., Gouyon, P.H., Laredo, C. Corn pollen dispersal: quasi-mechanistic models and field experiments. *Ecol Monographs* 73:131-150. (2003).
74. Kok, E.J., Aarts, H.J., Van Hoef, A.M., Kuiper, H.A. DNA methods: critical review of innovative approaches. *J AOAC Int.* May-Jun; 85 (3):797-800 (2002).

75. Leist, N. Meeting the Needs of the Markets for Seed Worldwide. Proc. Of the World Seed Conference, Cambridge UK, 6-8 Sept., 47-50 (1999).
76. Li, ZP, Kambara H. Single Nucleotide Polymorphism Analysis Based on Minisequencing Coupled with a Fluorescence Microsphere Technology Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 5(8):1256-1260 (2005).  
  
Lipp M. et al. Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. Journal of AOAC International (2005).
77. Lipp, M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D, Song P: Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. J AOAC Int. 88:136-155 (2005).
78. Lipp, M., Anklam, E., Stave, J. W. Validation of an Immunoassay for Detection and Quantitation of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study (2000).
79. Lu, J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR, MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature, 435: 834-838 (2005)
80. Ma, B.L., Subedi, K.D., Reid, L.M. Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighbouring Transgenic Hybrids. Crop Science 44:1109-1112 (2004).
81. Martins, T.B. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 9, 41-45 (2002)
82. Mazzeo A., Petracca G., Biagetti M., Prospero A., Gaeta C., Paternesi B., Rosato M.P. 2004. ELISA Reverse Technology per il controllo di parametri sanitari negli allevamenti da latte. VI Congresso Nazionale SIDILV, Abano Terme (PD), pp. 199-200 (2004).
83. Messean, A., Angevin F., Gomez-Barbero, M., Menrad, K., Rodriguez-Cerezo, E. New case studies on the coexistence of GM and non-GM crops in European agriculture (IPTS-EC DGJRC). (2006).
84. Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J., Schimmel, H., Rentsch, J., Van Rie, J.P., Zagon, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. Food Chem Toxicol. Jul;42 (7):1157-80 (2004).
85. Monsanto Company. Updated molecular characterization and safety assessment of Roundup Ready<sup>®</sup> soybean event 40-3-2 (2000).
86. OECD. Consensus Documents on Compositional for New Varieties of Soybean: Key food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients (2001).
87. Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R. Fuchs, R.L. The composition of glyphosate-tolerant soybean

- seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition* 126, 702-716 (1995).
88. Page, BT, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *J Clin Microbiol*, 43(9):4507-14 (2005).
  89. Pageta, E., Lebrunb M., Freyssinetc, G., Simoneta, P. The fate of recombinant plant DNA in soil. Current and future benefits from the use of GM technology in food production. (1999).
  90. Paine, J.A. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23, 482 – 487. (2005)
  91. Paoletti C., Mazzara M.: Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. ENGL Method Performance Requirements (2005).
  92. Pauli U, Schouwey B, Hubner P, Brodmann P, Eugster A: Quantitative detection of genetically modified soybean and Maize: method evaluation in a Swiss ring trial. *Mitt Lebensm Hyg*, 92:145-158 (2001).
  93. Ray J.D., Kilen T.C., Abel C.A., Paris R.L. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ Biosafety Res.*2:133-8 v.sitoeurop.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out93\_gmo\_en.pdf. (2003).
  94. Saxena, D. and Stotzky, G. Fate and effect in soil of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants. In Ministero dell' Ambiente e della Tutela del Territorio (2003): "Collection of biosafety reviews". International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. (ICGEB), pag. 7-83 (2003).
  95. Seideman, J., Peritt, D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 micro-sphere system. *J. Immunol Methods*, 267, 165 (2002)
  96. Sorlini, C. Biodiversità e organismi geneticamente modificati. Ministero Ambiente.CNR.COOP Italia.2004. OGM:la ricerca "sul campo". (2004)
  97. Southgate, E.M., Davey, M.R., Power, J.B. and Marchant, R. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. In: *Biotechnology Advances*, 13: 631-651 (1995).
  98. Strom, CM, Janeczko RA, Anderson B, Redman J, Quan F, Buller A, McGinniss MJ, Sun WM. Technical validation of a multiplex platform to detect thirty mutations in eight genetic diseases prevalent in individuals of Ashkenazi Jewish descent. *Genet Med*, 7(9):633-9 (2005).
  99. Suslow, T.V. et al. Biotechnology Provides New Tools for Plant Breeding. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. V.sito anrcatalog.ucdavis.edu per un compendio sulle principali tecniche di ingegneria genetica. (2002).
  100. Tabe, L. Higgins, T.J. Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends in Plant Science* (1998).

101. Taverniers, I., Van Bockstaele, E., De Loose M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal Bioanal Chem.* Mar; 378 (5):1198-207. Epub 2003 Dec 20 (2004).
102. Taylor, J.D., Briley, D., Nguyen, Q. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques.* 3, 661-6, 668-9 (2001).
103. Taylor, J.D., Briley, D., Nguyen, Q. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques*, 3, 661-6, 668-9 (2001).
104. Taylor, N.B., Fuchs, R.L., MacDonald, J., Shariff, A.R. & Padgett, S.R. Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated with Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10), 4469-4473 (1999).
105. Teshima, R., Akiyama, H., Okunuki, H., Sakushima, J., Goda, Y., Onodera, H., Sawada, J., Toyoda, M. Effect of GM and non-GM soybeans on the immune system of BN rats and B10A mice. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* vol. 41 (3) p.18 (2000).
106. Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. *Pure Appl. Chem.*, 74, 835-855 (2002).
107. Trifa, Y., Zhang, D. DANN Contenti in Embryo and Endosperm of Maize Kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO Quantification. *Journal of of Agricultural and Food Chemistry* (2003).
108. Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Memelink, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* (2000).
109. VII Rapporto Nomisma sull'Agricoltura Italiana (1999).
110. Wang, L., K.D. Cole, A.K. Gaigalas, and Y.Z. Zhang. Fluorescence nanometer microspheres as reporter for sensitive detection of simulants of biological threats using multiplexed suspension arrays. *Bioconjugate Chemistry*, 16: 194-199 (2005).
111. Whitehead, G.S., J.K.L. Walker, K.G. Berman, W.M. Foster, and D.A. Schwartz. Allergen-induced airway disease in mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285: L32-L42 (2003).
112. Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31, 117-165 (2000).
113. Yang, L., Tran, D.K., Wang, X. BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic bioassay. *Genome Res.* 11, 1888-98 (2001).

114. Ye, F., Li, M., Taylor, J.D., Nguyen, Q., Colton, H.M., Casey, W.M., Wagner, M., Weiner, M.P., Chen, J. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat.* 17, 305-16 (2001).

## **VIII RINGRAZIAMENTI**

---

I miei personali ringraziamenti vanno:

Al Professor Paolo Fantozzi,  
grazie al quale ho potuto conseguire il Dottorato.

All'Unità di Biotecnologie ed Organismi Geneticamente Modificati,  
che mi ha consentito di operare presso i suoi laboratori.

Ad Anna Fantozzi, Massimiliano Marini e Domenico Scotti,  
senza i quali niente di tutto ciò sarebbe stato possibile.

Ai Professori Luigi Montanari ed Alessandra Mazzeo,  
sempre presenti e disponibili.

Grazie di cuore a tutti coloro che hanno contribuito al raggiungimento di questo  
importante traguardo.