

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente
Curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas

‘PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)’

Holst-Jensen, A.; Rønning, S.B.; Løvseth, A.; Berdal, K.G. (2003)

Trabalho realizado por Nuno Domingues, nº24178
Disciplina de Biologia Molecular
Docente: Nuno Henriques

Introdução

- ➡ O que são e como se fazem OGMs?;
- ➡ Categorias e aplicações de sequências alvo PCR;
- ➡ Alvos de referência: especificidade quanto à espécie ou taxon;
- ➡ Quantificação baseada em PCR {
 - PCR Competitiva;
 - Real-Time PCR;
 - PCR Multiplex;
- ➡ Limites de detecção e quantificação;
- ➡ Projecto 'Qpcrgmofood';
- ➡ Validação dos métodos PCR;
- ➡ Conclusões.

Introdução (continuação)

OGM (Organismo Geneticamente Modificado)



Inserção de genes específicos com auxílio de enzimas de restrição (transformação por eliminação ou substituição, mas mais regularmente por inserção de um gene)



Um OGM é definido por um único processo de transformação



Alimentos que possuem OGMs ou derivados



PCR utilizado como técnica de detecção e quantificação de OGMs em alimentos que os possuem

Introdução (continuação)

Problemas na detecção de DNA por PCR:

- Acesso à informação sobre primers que podem ser utilizados;
- Acesso a DNA propício à análise.

Actualmente não há pares de primers para identificação e quantificação seguras para a maior parte dos OGMs.

Informação disponível apenas para as empresas de biotecnologia

Em 2003 apenas se conheciam CRMs (Certified Reference Materials) para 4 OGMs.



Introdução (continuação)

Testes a OGMs podem-se restringir a apenas um simples PCR de rastreio para detecção do DNA modificado MAS...

- Identificação do OGM do qual o DNA deriva ou;
- Quantificação do DNA derivado de OGM.

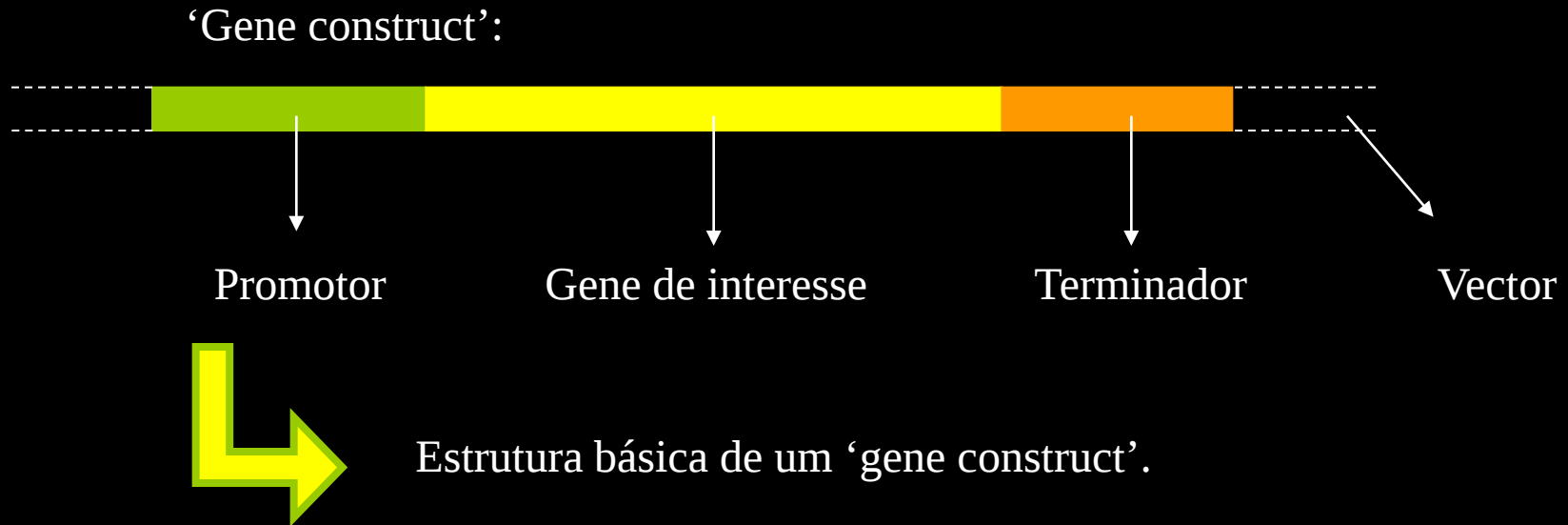


Grande aumento dos custos dos testes, ainda mais se for um maior número de OGMs.

Desenvolvimento de técnicas de custos menores e eficazes.



Introdução (continuação)



A escolha da sequência alvo do PCR é o factor mais importante para controlar a especificidade do método PCR!

Introdução (continuação)

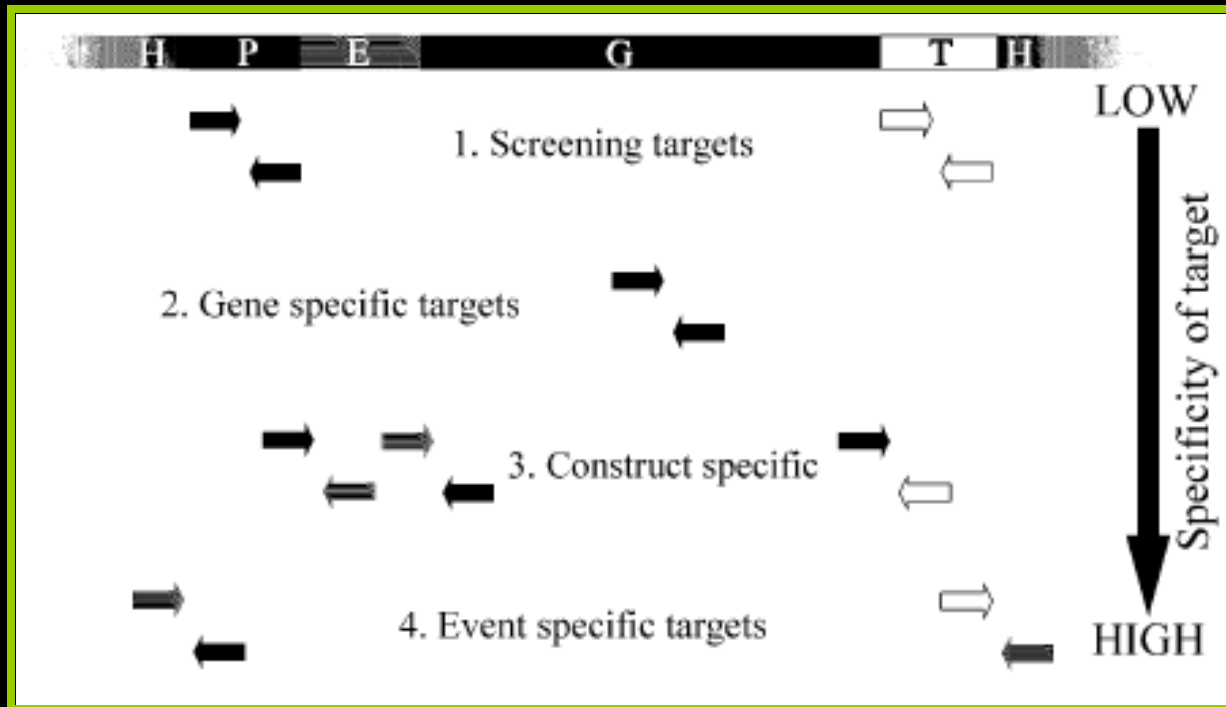


Figura 1 – Esquema dum gene e os 4 tipos de ensaios baseados em PCR com o aumento de especificidade.

Pelo menos 4 categorias:

Cada categoria corresponde à composição do fragmento de DNA que é amplificado no PCR.

Categorias das sequências alvo do PCR

Categoria		Alvo do PCR
1. Alvos de rastreio	→	Promotor e terminador
2. Alvos específicos do gene	→	Gene
3. Alvos específicos do 'construct'	→	Elementos adjacentes do gene construct (p.e. Promotor e o gene de interesse)
4. Alvos 'event specific'	→	Locais de inserção do DNA no vector

O MAIS ESPECÍFICO!



‘Gene stacking’

Mas até os mais específicos têm limitações.

Um descendente híbrido de outros 2 OGMs (T25 e Mon810) pode ter as 2 assinaturas...



...Num teste PCR as suas assinaturas não podem ser distinguidas



‘Gene Stacking’

- Nos EUA, se os OGMs parentais são autorizados, o híbrido também é.
- Na Europa o híbrido é tratado como um novo OGM e precisa de autorização separada.

PROBLEMA NA QUANTIFICAÇÃO

Alvos de referência: o princípio da quantificação do conteúdo GM

Princípio da quantificação é comparar a abundância de cópias do genoma ao número de cópias do alvo PCR GM.

A quantificação tem de ser relativa a alguma coisa



Na UE – ao ingrediente (sob a forma de peso normalmente, mas também pode ser por exemplo número de unidades)

Considera-se que o número de moléculas de DNA obtidas por unidade de peso é igual, mesmo que seja de origem GM ou não.

A incerteza dos métodos (os mais eficazes) é estimada em 25%!

Tipos de PCR para quantificação

1. PCR Competitiva;
2. RT-PCR (PCR em Tempo Real);
3. Outros em desenvolvimento.

1. PCR Competitiva

O 1º método inventado para quantificar OGMs.

Quantificação feita por comparação da quantidade de produto no final.

2 sequências alvo com características e amplificabilidade semelhantes são co-amplificadas num único tubo —————> Competem pelos nucleótidos livres, pelos primers e DNA polimerases.

PCR Competitiva

Logo assume-se que a quantidade final de produto corresponde à do início da reacção.

- Este método requer o desenvolvimento de moléculas competidoras e é muito sensível às concentrações iniciais e diluição do DNA;
- Necessita de pipetações massivas do DNA amplificado e visualização por gel de agarose;
- Alto risco de contaminação.

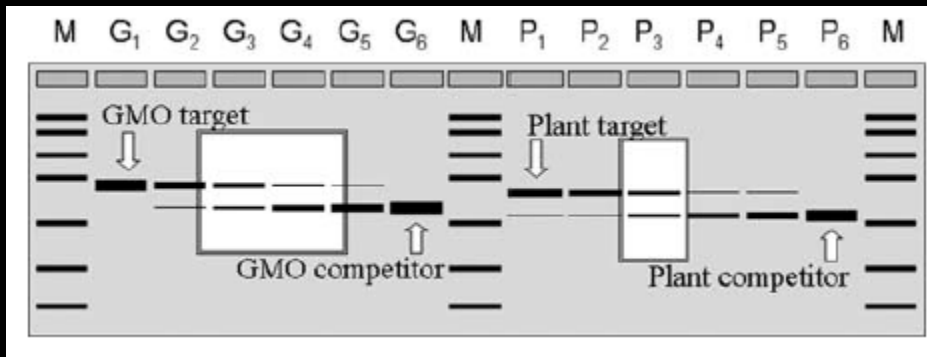


Figura 2 – Resultados de PCR competitiva (dupla neste caso).

'Real-Time' PCR

2. PCR em Tempo Real

Alternativa mais sofisticada —————> O mais usado hoje em dia.



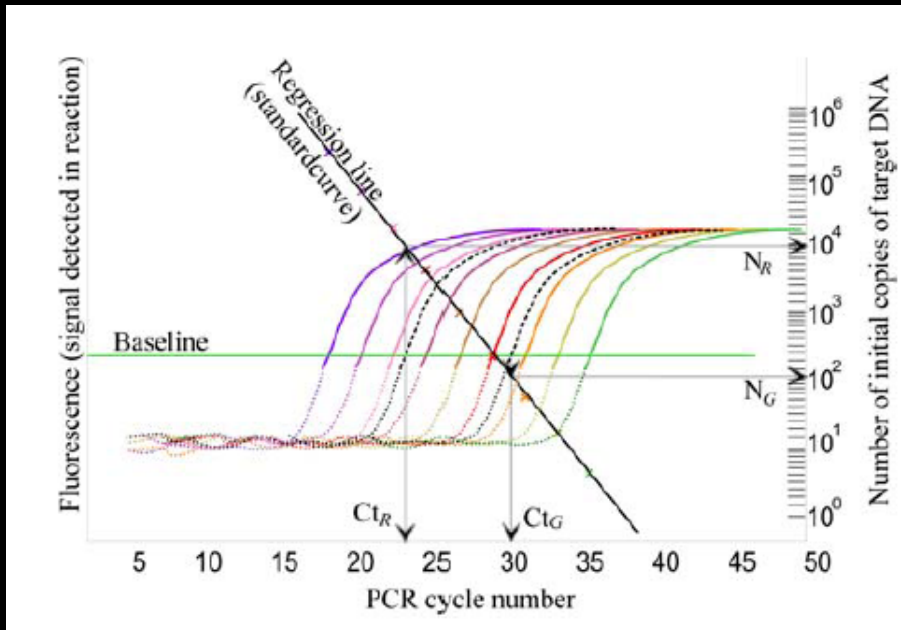
É feita uma monitorização da reacção de amplificação (em tempo real) num ambiente fechado – a reacção não é interferida.

É medido um sinal fluorescente que corresponde à quantidade amplificada que vai aumentando e pode ser visto num monitor.



'Real-Time' PCR (continuação)

- O software específico converte o sinal em estimativas quantitativas;
- Baixo risco de contaminação;
- Método mais rápido (cerca de 30 minutos, em contraste com as 3 horas ou mais da PCR competitiva).



Quantificação feita por comparação de curvas de referência ou outros.

Equipamentos muito caros por isso procuram-se desenvolver novas técnicas para o efeito.

Figura 3 – Real-time PCR.

'Real-Time' PCR (continuação)

1



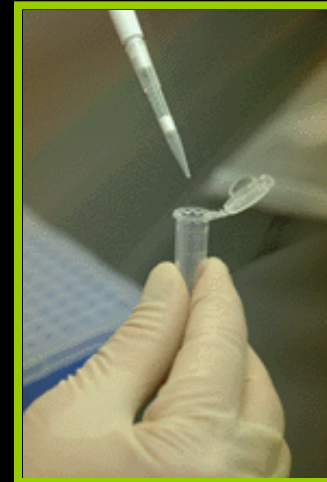
2



4



3



Limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ)

Limite de detecção (LOD)

Limite de quantificação (LOQ)



Definidos como as quantidades mais baixas que podem ser detectadas (quantificadas) com fiabilidade.

Os laboratórios indicam o LOD e o LOQ.

Concentração mínima a que a presença do analito será detectada com mais de 95% de probabilidade.

Pode ser determinado fazendo análises sucessivas usando várias concentrações do analito.

Projecto 'Qpcrgmofood'

Detecção de alimentos geneticamente modificados, fiável, standardizada, específica e quantitativa.

Objectivos do projecto:

1. Prover novos métodos validados ao CEN (Comité Europeu de Normalização);
2. Trabalhos em:
 - Extracção de DNA;
 - Genes de referência;
 - Caracterização de sequências específicas de evento;
 - Desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação;
 - Validação de métodos;
 - Estudos sócio-económicos em relação aos métodos para a detecção de OGMs.



Validação dos métodos PCR

Validação dos métodos de detecção e quantificação não é directa, devido a problemas relacionados com:

- A disponibilidade de materiais de referência;
- Princípios de quantificação;
- Expressão do LOD e LOQ;
- Aplicabilidade do LOD e do LOQ em diferentes tipos de amostras.

3 componentes num estudo de validação:

- O método;
- O material usado no teste;
- A performance dos participantes.

Conclusões

Desafios dos métodos de detecção:

- Acessibilidade a material derivado de OGMs;
- Métodos de extracção de DNA;
- Redução de custos;
- Implementação de LOD e LOQ específicos para cada amostra.



Validação de métodos depende bastante destes factores.

Conclusões (continuação)

Principais realizações no projecto 'Qpcrgmofood':

- Identificação de genes de referência específicos de espécies para plantas de cultivo importantes;
- Caracterização de eventos de transformação;
- Desenvolvimento de métodos quantitativos de evento específico para vários OGMs, bem como métodos multiplex;
- Melhor compreensão e expressão do LOD e LOQ em testes PCR para OGMs;
- Estratégias melhores para validação de métodos de detecção de OGMs.

Bibliografia

Fandke, M.; Schneider, A.; Grönewald, C.; Berghef-Jäger, K. (2002) Real-Time PCR Quantification of Roundup Ready Soybean with the LightCycler Instrument, *Biochemica*, 2: 12-14.

Gilliland, G.; Perrin, S.; Blanchard, K.; Bunn, H.F. (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 2725-2729.

Holst-Jensen, A.; Rønning, S.B.; Løvseth, A.; Berdal, K.G. (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**: 985-993.

Studer, E.; Rhyner, C.; Lüthy, J.; Hübner, P. (1998) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize, *Z Lebensm Unters Forsch A*, **207**: 207-213.