

**PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2022”**  
**RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 13/22 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**

**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: Sicurezza alimentare**

**Titolo del progetto:** Studio e sviluppo di saggi Multiplex in digital PCR (dPCR) da introdurre nel controllo ufficiale di alimenti e mangimi geneticamente modificati nell’ambito del network italiano dei laboratori OGM (NILO)

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico: Daniela Verginelli**

## SINTESI

Studio e sviluppo di saggi Multiplex in digital PCR (dPCR) da introdurre nel controllo ufficiale di alimenti e mangimi geneticamente modificati nell'ambito del network italiano dei laboratori OGM (NILO)

Parole chiave: PCR digitale, multiplex, OGM, sicurezza alimentare

Il progetto di ricerca si è articolato in due fasi, ognuna delle quali ha previsto il coinvolgimento delle due Unità Operative coinvolte, U.O.1 IZSLT ed U.O.2 IZSAM, in base alle rispettive competenze.

Nell'Unione Europea il rilevamento degli organismi geneticamente modificati (OGM) in alimenti e mangimi è comunemente ottenuto attraverso metodi di screening basati sull'amplificazione in PCR di elementi genetici e/o costrutti che sono frequentemente presenti nelle piante GM. Ma alcuni eventi GM essendo privi dei marker frequentemente ricercati, l'unico modo di rilevarli è di eseguire una PCR specie-specifica. Per tale motivo per lo svolgimento di questa ricerca sono stati individuati eventi GM che ne sono privi. Nella prima fase si è proceduto alla selezione degli eventi soia GM privi di elementi di screening da includere nello sviluppo di saggi multiplex in PCR digitale. Gli eventi soia GM inclusi nello studio sono stati i seguenti: MON87701 (identificatore unico MON-877Ø1-2), MON87769 (identificatore unico MON-87769-7), CV-127-9 (identificatore unico BPS-CV127-9) e DP305423 (identificatore unico DP-3Ø5423-1).

Inizialmente per gli eventi GM presi in esame sono stati considerati i rispettivi metodi in real time PCR in modalità singleplex (metodi evento specifici ed il metodo per la rilevazione del gene endogeno lectina) validati e pubblicati dal Laboratorio Europeo di riferimento (EURL-GMFF). Successivamente, i singoli metodi sono stati combinati per sviluppare un metodo multiplex in PCR digitale utilizzando due differenti piattaforme: la piattaforma BIORAD (QX200 Droplet Digital PCR System) e la piattaforma QIAGEN (QIAcuity Digital PCR System). Nel caso della piattaforma BIORAD la rilevazione del target avviene in una emulsione o droplet (ddPCR), mentre del caso della QIAGEN la rilevazione del target avviene su chip (cdPCR). Nella ddPCR QX200 Biorad poiché sono presenti 2 soli canali (FAM ed HEX), la rivelazione degli eventi transgenici e del gene endogeno (lectina) è stata effettuata utilizzando ciascuna sonda a bassa ed altra concentrazione ed un target viene rilevato con entrambe le sonde in modo da rilevare in contemporanea tutti e cinque i target. Invece la piattaforma QIAGEN essendo dotata di 5 canali la rilevazione dei target avviene utilizzando diversi reporter.

## SUMMARY

Study and development of a multiplex digital PCR (dPCR) assays to introduce in the official control of genetically modified in foods and feeds within the Italian network of GMO laboratories (NILO).

Key words: digital PCR, multiplex, GMO, food safety

The research project was divided in two phases, in each phase were involved two Operating Units, U.O.1 IZSLT and U.O.2 IZSAM, based on their respective skills.

In the first phase, the GM soybean events without screening elements were selected to be included in the development of multiplex digital PCR assays. The GM soybean events included in the study were the following: MON87701 (unique identifier MON-877Ø1-2), MON87769 (unique identifier MON-87769-7), CV-127-9 (unique identifier BPS-CV127-9) and DP305423 (unique identifier DP-3Ø5423-1).

Initially, for the GM events examined were considered the respective singleplex reference methods (event-specific methods for GM events and the method for the detection of the endogenous gene lectin) validated and published by European Laboratory for GMO (EURL-GMFF). Subsequently, the individual methods were combined to develop a digital multiplex method using the BIORAD platform (QX200 Droplet Digital PCR System) and the QIAGEN platform (QIAcuity Digital PCR System). With Droplet Digital PCR (ddPCR) Biorad the target is detected in droplets formed in a water-oil emulsion to form the partitions that separate the template DNA molecules, while the Qiagen QIAcuity platform uses a technology based on digital microfluidics. In the case of the BIORAD platform, in order to obtain all five signals simultaneously since there are only 2 channels, the detection of transgenes and of the endogenous gene (lectin) was carried out using a low concentration and high concentration of each probe and two probes together. On the other hand, the QIAGEN is equipped with 5 channels and was used for the pentaplex assay using different reporters; unlike ddPCR, it does not have the limit due to the delicate phase of generation of the droplets.