

Identificação Específica dos Eventos Yieldgard, Yieldgard VT PRO e Agrisure TL por PCR em Tempo Real¹

Haiko Enok Sawazaki¹; Silvio Henrique Reginato Grandi²; Aildson Pereira Duarte³ e Eduardo Sawazaki³

¹Recursos Genéticos/IAC, Campinas, SP henok@iac.sp.gov.br, ²Bolsista FAPESP, Campinas, SP henrique.grandi33@gmail.com, ³Grãos e Fibras/IAC, Campinas, SP aildson@apta.sp.gov.br e sawazaki@iac.sp.gov.br

Resumo- A detecção e quantificação de organismo geneticamente modificado (OGM) é exigência em quase todos os países para os quais o Brasil exporta alimentos. Na Europa os métodos oficiais usam a técnica de análise quantitativa evento-específica com o sistema Taqman. Este estudo faz parte do desenvolvimento de diagnose quantitativa específica de eventos OGM, através de PCR em Tempo Real, utilizando-se o sistema SYBR Green ou o BRYT™ Green. Foram analisadas 10 amostras com os cinco eventos: Agrisure TL (Bt11), YieldGard, YieldGard VT PRO, Herculex I e AG8088YGRR2 (MON810X RR2 ou NK603), tendo sido utilizadas três quantidades de DNA (0,5ng, 20 ng e 50ng) para cada amostra. Foi testada a especificidade de 16 iniciadores desenvolvidos através da interação genoma/inserto. Pela otimização das reações observou-se que os iniciadores diferenciaram especificamente os eventos de milho Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO. As reações das curvas padrão resultaram nos valores de eficiência de PCR para os iniciadores do gene Adh1, eventos Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO de, respectivamente, 0,94; 0,97; 0,93 e 0,95.

Palavras-chave: diagnose OGM, SYBR Green, MON810, Bt11, MON89034.

Introdução

A detecção e quantificação de organismo geneticamente modificado (OGM) são exigência em quase todos os países para os quais o Brasil exporta alimentos. A análise de rotina de produtos alimentícios contendo OGMs compreende as três etapas: 1- detecção; 2- identificação do OGM presente na amostra, para determinar se este é autorizado e; 3- quantificação do OGM no produto, para checar a necessidade de rotulagem ou não, conforme a legislação (PETIT et al., 2003).

A técnica para detecção dos eventos transgênicos mais utilizada é a de análise quantitativa evento-específica, realizada por PCR em Tempo Real, sendo este o método oficial utilizado pela Europa através de métodos validados pela ISO 17025 e ISO 9001 que são encontradas na JRC Compendium of Reference Methods for GMO analysis. A vantagem do pcr em tempo real é possibilitar a determinação da quantidade original do DNA da amostra pois o nível de amplificação é monitorado continuamente durante os ciclos de PCR, enquanto o pcr comum só mostra o patamar final da amplificação,

¹ Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro e bolsa do estagiário

dependente da perda de eficiência da enzima e concentrações de substrato, nucleotídeos e iniciadores. Quando suficiente produto é acumulado para produzir sinal de fluorescência detectável, o número do ciclo em que isto ocorre é chamado “threshold cycle”, ou Ct. Como o Ct é determinado na fase exponencial, quando os reagentes não são limitantes, depende principalmente da quantidade inicial do substrato, sendo utilizado para calcular a quantidade inicial do substrato presente na reação.

As metodologias da JRC usam o sistema de fluorescência denominado Taqman que necessita além dos iniciadores, de sondas. Os detectores fluorescentes SYBR Green ou Green BRYTTM têm o mesmo princípio de detecção de produtos da reação de PCR. Conforme são criados os fragmentos amplificados, os corantes se ligam a cada nova cópia de DNA de fita dupla, aumentando a intensidade de fluorescência proporcionalmente a quantidade de produto de PCR formado. As vantagens deste sistema de monitoramento de reação é que o reagente fluorescente é mais barato que o Taqman e não requer sonda. A desvantagem é que pode originar sinal falso positivo quando ocorre ligação com DNA de fita dupla não específico, necessitando da otimização da reação para amplificar apenas a banda específica.

Este estudo de diagnóstico específico para os eventos Agrisure TL, YieldGard e YieldGard VT PRO, é o início do programa para o diagnóstico de eventos transgênicos em plantas, para futura obtenção da Iso 17025 pelo laboratório.

Material e Métodos

Foi utilizada a metodologia de quantificação relativa de acordo com o utilizado pela JRC (DELOBEL, et al., 2008; SAVINI et al., 2008; MAZZARA et al., 2009), mudando-se apenas o tipo original com Taqman para o sistema SYBR Green ou BRYTT^M Green. Para a quantificação relativa desenvolveu-se como iniciador de referência o baseado no gene da álcool desidrogenase (Adh1). As curvas padrão foram realizadas com as diluições de S1 (20ng), S2(4ng), S3 (0,8ng) e S4 (0,16ng).

Todos os procedimentos foram realizados sob rigorosas condições de assepsia com o moinho tipo A11 Basic Mill da IKA.

Para a otimização da reação de PCR em Tempo real além dos testes de concentração dos iniciadores foram realizadas análises com três quantidades de DNA para cada amostra: com 5, 20 e 50 ng, para verificar a consistência da resposta de cada amostra com alteração da quantidade de DNA. Foram utilizadas as amostras de sementes

de milho DKB390YG e AS1572YG (YieldGard); Impacto TL (Bt11); AG8088PRO, DKB185PRO, DKB390PRO, AG8016pro (YieldGard VT PRO); 30F35 (não transgênica); 10F35Hx (HerculexI); AG8088YGRR2 (MON810X RR2 ou NK603).

A extração de DNA foi feita em triplicata, com trezentos miligramas da amostra homogeneizada, pelo método Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) de Cardarelli et al. (2005). A presença e integridade do DNA extraído foram analisadas com corrida eletroforética e a quantificação por espectrofotômetro.

As reações e condições foram otimizadas para cada iniciador e realizadas no ABI 7500 Fast da Applied Biosystems para um volume de 15,0 µl com 7,5 µl do Mix SYBR ou BRYTT Green e 67 a 134nM dependente de cada iniciador com 1 etapa de 95 °C por 10/2 minutos (dependente do kit de fluorescência) seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento com temperatura dependente dos iniciadores por 25s (1 min e 30 s para curva padrão) e extensão a 60°C for 15 s.

Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta os iniciadores desenvolvidos para reação com SYBR ou BRYTT Green (iniciadores com 50 a 150pb, G/C de 20 a 80%, com os 5 nucleotídeos da extremidade 3' com até 2 Cs e /ou Gs), para serem evento-específicos devido à interação genoma/inserto. São apresentados os dois pares de iniciadores estudados para cada evento, sendo que os com a terminação N foram os melhores.

Pela tabela 2 e figura 1 que apresentam os valores de Cts e curvas de amplificação e dissociação de amostras com os iniciadores Bt11FN e Bt11RN, observou-se que para análises com 5ng e 20 ng DNAs a amplificação do evento específico BT11 (Impacto TL) foi muito maior em relação aos demais e ainda, a temperatura de dissociação foi diferente para o evento Bt11, permitindo sua diferenciação específica. Com 50ng de DNA (figura 1) os iniciadores Bt11FN e Bt11RN foram totalmente específicos para o evento Bt11.

Pela tabela 3 e figura 2 que apresentam os valores de Cts e curvas de amplificação e dissociação de amostras com os iniciadores YGFN e YGRN para análises com 5ng, 20 ng e 40 ng DNAs, verificou-se que as amplificações observadas para o evento YieldGard nas amostras DKB390YG e AG8088RR2, apresentaram valores de Ct menores, confirmando a presença deste evento. Análises com 5ng e 20 ng não foram específicas. Com 40 ng, embora a amostra DKB390PRO tenha também apresentado

leitura de Ct, é de maior valor e o Tm é diferente para análises com 5ng, 20 e 40 ng, possibilitando a diferenciação do evento YieldGard. Análises com 50 ng não detectaram o DKB390PRO, porém também não o evento AG8088RR2.

Verificou-se de acordo com a tabela 4 e figura 3, que os Cts do evento YieldGard VT PRO para análises com 5 e 20 ng de DNA das amostras só não diferenciaram a amostra Impacto TL, a qual, porém, apresentou valores mais altos de Ct, enquanto a análise com 50 ng de DNA das amostras foi completamente específica para o evento YieldGard VT PRO.

Na Tabela 5 e Figura 4 estão apresentados os valores de Ct e curvas de amplificação das curvas padrão, realizada com as diluições S1, S2 S3 e S4 dos DNAs das cultivares 30F35 não transgênica para o par de iniciadores ADHN, Impacto TL para o par de iniciadores Bt11N, DKB390YG para o par de iniciadores YGN e DKB390PRO para o par de iniciadores 38094N, cujas reações resultaram, respectivamente, nas eficiências de PCR de 0,94, 0,97; 0,93 e 0,95.

Conclusões

Através da otimização das análises os iniciadores desenvolvidos diferenciaram especificamente os eventos de milho Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO. As reações das curvas padrão resultaram nos valores de eficiência de PCR para os iniciadores do gene Adh1, eventos Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO de, respectivamente, 0,94; 0,97; 0,93 e 0,95, comprovando a eficiência das reações.

Literatura Citada

Cardarelli, P.; BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA, R.T.B.; CRUZ, F.P.; GEMAL, H.L.. Detection of GMO in food products in Brazil. The INCQS experience. Food Control, v16,n.10, p.859-866, 2005.

Delobel C.C., Larcher S., Mazzara M., Van Den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Maize Event Bt11 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication DOI 10.2788/4370 (2008).

MAZZARA, M.; Grazioli E.; Savini C., Van Den Eede G. Report on the verification of the performance of a MON810 Event-specific method on Maize line MON810 using Real time PCR- Online publication DOI 10.2788/59036 (2009).

Petit, L. BARAIGE, F.;BALOIS, A-M.; BERTHEAU, Y.; FACH, P. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. European Food Research and

Savini C., Bogni A., Grazioli E., Munaro B., Mazzara M., Van Den Eede G. "Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON89034 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication DOI 10.2788/68713 (2008).

Tabela1. Sequência dos iniciadores utilizados para cada evento com as temperaturas em °C para o anelamento (Ta) e dissociação ou “melting” (Tm) e tamanho da amplificação em pares de bases (C)

Iniciador/Nome comercial	Seqüência 5’-3’	Tm	Ta	C
Bt11F/Agrisure TL	GGG TTG TGT GGC CAT TTA TC	70	48	104
Bt11R/Agrisure TL	TGA CGC TCA GTG GAA CGA A	71		
Bt11NF/Agrisure TL	GGG TTG TGT GGC CAT TTA TCA TC	76		
Bt11NR/Agrisure TL	ACG CTC AGT GGA ACG AAA ACT CA	77		
YGF/YieldGard	GAC GAA GGA CTC TAA CGT TTA ACA	71	48	83
YGR/YieldGard	ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT CAC	71		
YGNF/YieldGard	AGG ACG AAG GAC TCT AAC GTT TAA CAT C	77	49	86
YGNR/YieldGard	CAC CTT CCT TTT CCA CTA TCT TCA CA	76		
89034F/YG VT PRO	CAT ATT GAC CAT CAT ACT CAT	60	40	70
89034F/YG VT PRO	GTA TCT ATA ATA CCG TGG TTT	59		
89034NF/YG VT PRO	TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC	79	49	141
89034NF/YG VT PRO	AAG CTA GAT GTG CCA TGA AGA AAC TTT G	79		
ADHF	CCC GTc gtt Tcc cat ctc ttc Ct	80	55	141
ADHR	TCC GAG ACC CTC AGT CCG ACA GT	80		
ADHNF	CCG Tcg ttT ccc atc tct tcC t	77	53	128
ADHNR	AGT CCG ACA GTC CCT CAC CAG TTA	77		

Tabela2. Leitura dos Cts com o par de iniciadores Bt11NF(134nM) e Bt11NR(67nM) para 5ng, 20ng e 50 ng DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação (Tm)

Evento	Detector	Ct/5ng	Ct/20ng	Ct/50ng	Tm/5ng	Tm/20ng	Tm/50ng
IMPACTO TL	Bt11	28,2	26,54	28,13	78,3	78	76,7
IMPACTO TL	Bt11	27,85	25,6	27,33	78,6	78,7	77,7
DKB390YG	Bt11	33,96	38,88	Indeterm	78,3	81,5	81
DKB390YG	Bt11	33,42	38,14	Indeterm	78,6	81,5	81,2
AG808RR2	Bt11	37,25	Indeterm	Indeterm	79	75,6	78,7
AG808RR2	Bt11	39,71	Indetermi	5,05	79,3	79,4	79,1
DKB390PRO	Bt11	38,77	37,71	4,9	81,7	81,8	81,5
DKB390PRO	Bt11	36,6	38,33	Indeterm	81,4	81,8	81,5
30F35Hx	Bt11	35,27	Indeterm	4,73	76,6	79,8	83,2
30F35Hx	Bt11	37,58	Indeterm	Indeterm	77,6	84,5	83,2
NTC	Bt11	37,56	37,83	Indeterm	79,3	79,8	79,1
NTC	Bt11	38,42	38,23	Indeterm	80,4	84,5	76,7

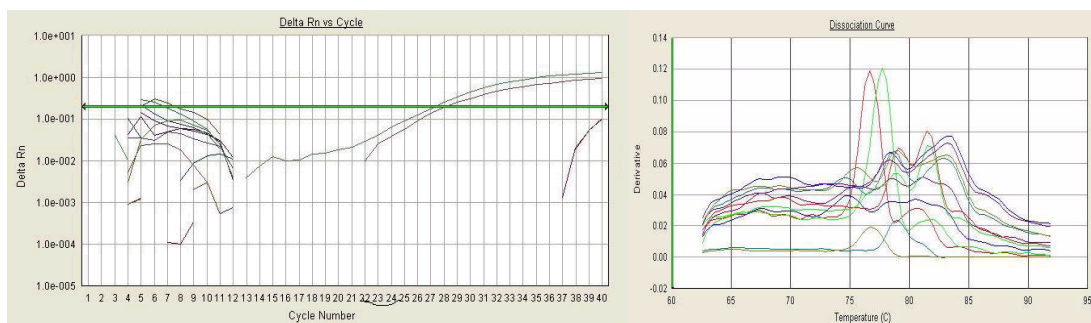


Figura 1. Curvas de amplificação e dissociação para 50 ng DNAs de vários eventos com os iniciadores Bt11FN e Bt11RN.

Tabela 3. Leitura dos Cts com 134nM para cada iniciador YGNF e YGNR, para 5, 20 e 40 ng DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação (Tm)

Evento	Detector	Ct/5ng	Ct/20ng	Ct/40ng	Tm/5ng	Tm/20ng	Tm/40ng
DKB390YG	Y Gard	34,2	33,61	35,22	76	77	77
DKB390YG	Y Gard	33,93	33,49	33,33	76,6	77,7	77,3
DKB390PRO	Y Gard	36,6	37,63	38,55	79,7	79,7	79,4
DKB390PRO	Y Gard	36,86	37,62	38,69	79,8	79,3	79,7
IMPACTO TL	Y Gard	37,71	38,85	Indeterm	77,7	78	77,7
IMPACTO TL	Y Gard	37,89	38,03	Indeterm	77,4	78	77,7
AG8088RR2	Y Gard	34,45	32,43	33,72	78,3	78,3	78
AG8088RR2	Y Gard	33,65	32,77	35,22	74,9	78,3	78
30F35Hx	Y Gard	35,47	37,59	Indeterm	73,2	80,1	79,4
30F35Hx	Y Gard	35,92	37,89	Indeterm	73,6	80,1	79,7
NTC	Y Gard	Indeterm	Indeterm	Indeterm	78,3	79,1	79,4
NTC	Y Gard	Indeterm	Indeterm	Indeterm	78	76	80,1

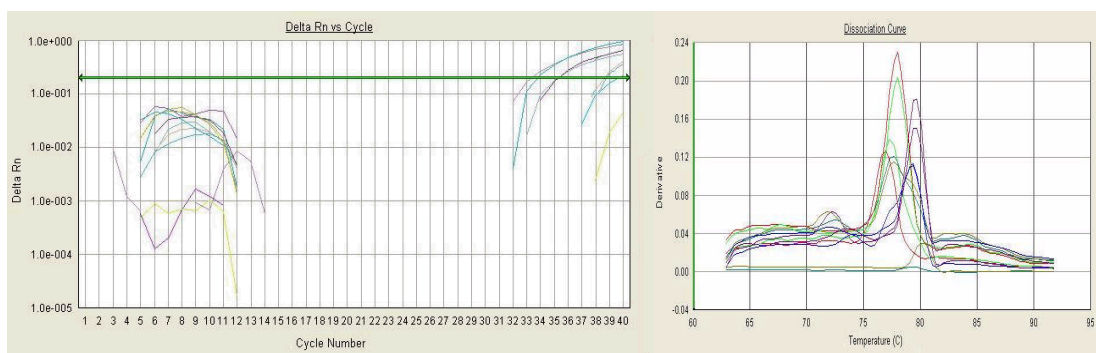


Figura 2. Curvas de amplificação e dissociação de 40ng DNAs dos eventos da Tabela 3 com os iniciadores YGNF e YGNR.

Tabela 4. Leitura dos Cts com o par de iniciadores 89034NF(134nM) e 89034NR(67nM) para 5ng, 20ng e 50 ng DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação (Tm).

Evento	Detector	Ct/5ng	Ct/20ng	Ct/50ng	Tm/5ng	Tm/20ng	Tm/50ng
DKB390PRO	89034	36,34	34,37	33,48	76,9	77,4	76,3
DKB390PRO	89034	36,04	33,47	27,62	77,3	77,7	77
DKB185PRO	89034	35,79	38,31	29,13	77,3	77,4	77,4
DKB185PRO	89034	35,65	35,81	33,56	77,3	77,7	77,7
DKB390YG	89034	Indeterm	Indeterm	4,8	65,9	80,1	80,5
DKB390YG	89034	Indeterm	Indeterm	5,62	74,5	80,8	80,8
IMPACTO TL	89034	38,69	39,45	4,85	76,2	76,7	76,3
IMPACTO TL	89034	39,9	38,85	Indeterm	76,2	76,7	76,3
30F35Hx	89034	Indeterm	Indeterm	4,78	76,2	77	76,3
30F35Hx	89034	Indeterm	Indeterm	5,62	76,2	77	76,3
NTC	89034	Indeterm	Indeterm	Indeterm	66,6	67,3	66
NTC	89034	Indeterm	Indeterm	Indeterm	80,7	66,6	73,6

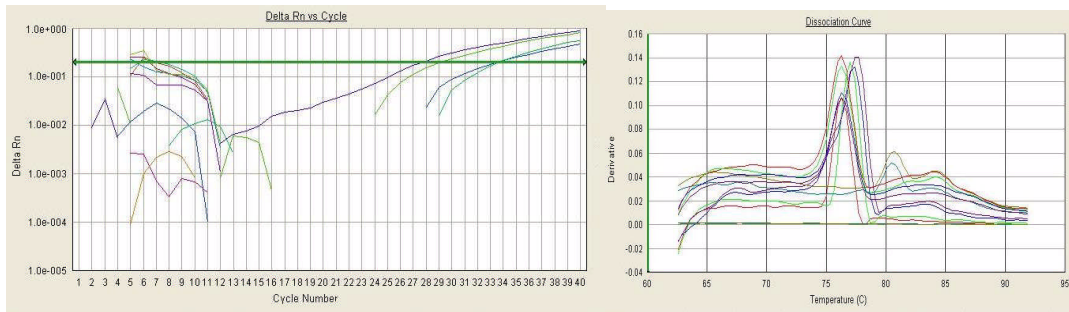


Figura 3. Curvas de amplificação e dissociação para 50 ng DNAs dos eventos da Tabela 4 com os iniciadores 89034NF e 89034NR

Tabela 5. Leitura dos Cts para o par de iniciadores ADHN (134nM cada), Bt11N, YGN e 89034N, com as diluições S1, S2, S3 e S4 dos respectivos DNAs: 30F35 não transgênico, Impacto TL, DKB390YG e DKB390PRO.

Diluição	Detetor	Ct	Detetor	Ct	Detetor	Ct	Detetor	Ct	Log S
S1	ADHN	30,24	BT11	28,71	YGN	31,38	89034	29,88	3
S1	ADHN	30,07	BT11	28,58	YGN	31,38	89034	30,25	3
S1	ADHN	30,24	BT11	28,48	YGN	31,45	89034	30,18	3
S2	ADHN	32,95	BT11	31,25	YGN	34,74	89034	32,85	2,3
S2	ADHN	32,75	BT11	31,34	YGN	34,4	89034	32,53	2,3
S2	ADHN	33,15	BT11	31,39	YGN	34,4	89034	32,46	2,3
S3	ADHN	35,12	BT11	33,59	YGN	36,26	89034	35,38	1,6
S3	ADHN	35,57	BT11	33,59	YGN	35,13	89034	35,23	1,6
S3	ADHN	35,45	BT11	33,54	YGN	36,09	89034	35,54	1,6
S4	ADHN	37,46	BT11	36,04	YGN	38,79	89034	37,17	0,9
S4	ADHN	37,33	BT11	35,41	YGN	38,79	89034	37,41	0,9
S4	ADHN	37,63	BT11	35,73	YGN	38,70	89034	37,52	0,9
NTC	ADHN	Indet	BT11	Indet	YGN	Indet	89034	Indet	
NTC	ADHN	Indet	BT11	Indet	YGN	Indet	89034	Indet	
NTC	ADHN	Indet	BT11	Indet	YGN	Indet	89034	Indet	

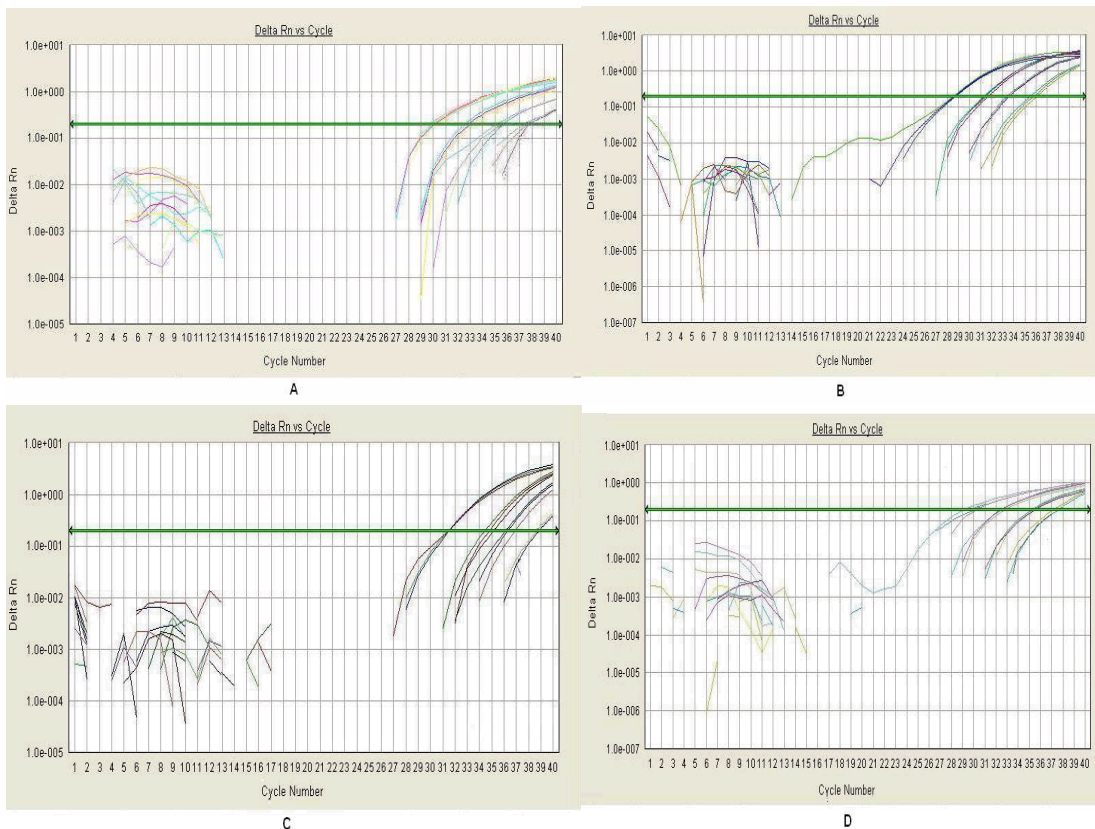


Figura 4. Curvas de amplificação das curvas padrão realizadas com as diluições de DNA de acordo com a Tabela 5 com os iniciadores: A- ADHN; B- Bt11N; C- YGN; D- 89034.