



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EVENTOS HERCULEX, AGRISURE TG, AGRISURE VIPTERA E RR2 EM MILHO E RR EM SOJA

Jéssica Funari de **Ponte**^{1a}; Haiko E. **Sawazaki**^{1b}; Silvio H. R. **Grandi**^{1c}; Aildson P. **Duarte**^{2d};
Eduardo **Sawazaki**^{2d}

¹ Instituto Agronômico, Centro de Recursos Genéticos Vegetais; ² Instituto Agronômico,
Centro de Grãos e Fibras

Nº 13113

RESUMO- *No Brasil, a rotulagem de transgênico é obrigatória para alimentos com presença acima do limite de 1,0% do produto final. O objetivo deste trabalho foi otimizar métodos oficiais europeus existentes que utilizam o sistema de PCR em Tempo Real com Taqman, usando um sistema mais barato com BRYT™ Green, para identificar e quantificar os eventos transgênicos denominados Herculex, Agrisure TG, Agrisure Viptera e RR2 em milho e RR em soja. Foram extraídos o DNA de grãos de cultivares de milho, sendo 15 com e 12 sem evento, e 1 variedade de soja com e sem evento pelo método CTAB. Foi testada a especificidade de 62 iniciadores desenvolvidos através da interação genoma/inserto, os quais foram otimizados para reação de 15,0 µl, com 20 ng de DNA pelo método “Fast”, enquanto a quantificação foi realizada com o método “Standard” baseado na curva-padrão do DNA do evento, diluído a DNA sem evento, para reação com 100ng DNA, sendo relativa ao gene de referência (para milho Adh1 e para soja lec). A sensibilidade foi de 0,06%, o R2 variou de 0,94 a 0,98 e a Eficiência de PCR de 0,9 a 1,09 confirmando a viabilidade da análise específica e quantitativa de eventos transgênicos com uma metodologia mais barata, com sensibilidade, reprodutibilidade e robustez.*

Palavras-chaves: transgênicos, pcr em tempo real, BRYT™ Green, milho, soja

^aBolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUCCAMP, Campinas-SP, jessica_funari@hotmail.com, ^b Orientador, ^c Bolsista Biólogo, ^d Colaborador



ABSTRACT

In Brazil, the transgenic labeling of foods is required for the presence above 1.0% of the final product. The aim of this work was to optimize the existing European official methods that use the system real-time PCR with Taqman, using a cheaper system with BRYT™ Green, in order to identify and quantify the transgenic events named Herculex, Agrisure GT, Agrisure Viptera and RR2 in maize and in soybeans RR. The DNA of grains has been extracted by the CTAB method, from 15 corn cultivars with event, and 12 without event, and one variety of soybeans with and without event. The specificity of 62 primers developed through interaction genome/insert was tested, being primers optimized for reaction of 15,0 μ l with 20 ng of DNA by the "Fast" mode. Quantification was performed by the "Standard" mode, using 100ng DNA per reaction, based on the standard curve of DNA, with event diluted with DNA without event, and relative to the reference gene (maize Adh1 and soy lec). The sensitivity was 0.06%, the R2 ranged around 0.94 to 0.98, and the PCR efficiency around 0.9 to 1.09, confirming the viability of specific and quantitative analysis of transgenic events with a cheaper method, with sensitivity, repeatability and robustness.

Key-words: transgenic, real time pcr, BRYT™ Green, corn, soybean

1-INTRODUÇÃO

A detecção e quantificação de OGMs é exigência em quase todos os países para os quais o Brasil exporta alimentos. Na União Européia, o limite para não rotular um produto como geneticamente modificado é de 0,9% de OGMs (CE, 2003), no Brasil é de 1%(Decreto 4.680 de 24 de abril de 2003, BRASIL, 2003), na Suíça 0,1% e na Rússia e Japão 5%.

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

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



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

BRYT™ 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.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Extração de DNA

De cerca de 500 g de cada tipo de amostra na forma de semente, 20 g foi moída e armazenada em freezer. Foram extraídos o DNA de 15 cultivares de milho com evento e 12 sem evento, e 1 variedade de soja com e sem evento, conforme a Tabela 1. A extração de DNA foi feita com duzentas miligramas da amostra homogeneizada pelo método Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) de Cardarelli et al. (2005), com pelo menos três repetições. A integridade do DNA extraído foi analisada por agarose gel eletroforese e a quantificação por leitura em nanodrop.

Tabela 1. Lista de Cultivares de milho e variedade de soja, com e sem evento transgênico

AGROCERES	Nome comercial	Evento	DEKALB	Nome comercial	Evento
AG8088		sem	DKB390		Sem
AG8088 PRO 2	YieldGard VT Pro/RR2	89034XNK603	DKB390 PRO2	YG VT Pro/RR2	89034XNK603
AG8088YGRR2	YieldGard/RR2	810 X NK603			
			SYNGENTA		
DOW			STATUS		sem
2B707		sem	IMPACTO		sem
2B710		sem	TRUCK		sem
2B587		sem	STATUS VIP	Agrisure Viptera	MIR162
2B710 Hx	Herculex ® I	TC1507	IMPACTO VIP	Agrisure Viptera	MIR162
2B707 Hx	Herculex ® I	TC1507	TRUCK VIP	AgrisureViptera	MIR162
2B587 Hx	Herculex ® I	TC1507	MaximusTL VIP	Agrisure Viptera 2	Bt11XMIR162
2B710 HR	Herculex ² IRR2	TC1507xNK603			
Powercore	Powercore	MON89034xTC1507xNK603	AGROMEN		
			20A78		sem
PIONEER			30A37		sem
30F35		sem	20A78 HX	Herculex ® I	TC1507
30F35 H	Herculex ® I	TC1507	30A37 HX	Herculex ® I	TC1507
SOJA IAC			MONSOY		
Soja Foscarini	Foscarini	sem	GTS/MON40-3-2	95R51	Roundup Ready soybean

2.2-PCR em Tempo Real

Foi utilizada a metodologia de quantificação relativa de acordo com o utilizado pela JRC (ISO/FDIS), mudando-se apenas o tipo original com Taqman para o sistema com BRYT™ Green. Para cada amostra, a quantidade do caráter específico e a da referência endógena são



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

determinadas das respectivas curvas padrão. Assim, a quantidade do caráter específico dividido pela quantidade da referência endógena fornece o valor do evento normalizado. Para a quantificação relativa as análises foram feitas com iniciadores de referência do gene endógeno da lecitina (*Lec1*) em soja e, do gene álcool desidrogenase (*Adh1*) em milho

As reações e condições foram otimizadas para o 7500 Fast Real Time da Applied Biosystems para um volume de 15,0 μ l com 7,5 μ l do mix BRTY™ Green (Go Taq qPCR Máster MIX) da PROMEGA. Os iniciadores foram desenvolvidos de modo ao PCR ser evento-específico tendo como ponto inicial os da JRC. Foram realizadas análises com várias concentrações dos iniciadores para determinação da concentração mínima fornecendo o menor CT e maior magnitude do sinal gerado pelas condições de PCR, enquanto minimizando a amplificação não específica. Foi também sempre realizada a curva de dissociação para checar a formação de produtos não específicos porque produtos diferentes do esperado formam curvas em temperaturas diferentes.

2.3-Curva-padrão

Para quantificação foi utilizado o método de quantificação relativa baseada na construção da curva-padrão ou calibração, utilizando padrões com diferentes quantidades (S1, S2, S3 e S4), sendo geradas curvas de calibração para o caráter específico e o de referência. A curva foi obtida pela plotagem dos valores Ct dos pontos de calibração contra o logaritmo do número de cópias do DNA e pela estimativa da linha de regressão destes dados. Deste modo, a curva de calibração pode estimar o número de cópias nas amostras desconhecidas pela interpolação na curva de calibração. Para soja e milho o número absoluto de cópias na curva-padrão foi determinado pela divisão do peso do DNA amostra (nanogramas), pela média publicada do valor IC para genoma, sendo 20%(20ng) correspondente a 17.699 cópias genoma soja e 7.339 cópias genoma milho, se um genoma corresponde respectivamente a 1,13pg do DNA haplóide do genoma soja, e a 2,725pg do DNA haplóide genoma milho, de acordo com Arumuganathan & Earle, 1991.

A amostra S1 foi preparada pela mistura da quantidade apropriada de DNA evento com DNA não OGM para se obter 20% evento OGM por reação de 100ng de DNA de milho ou soja em um volume de 5 μ l, e a S2, S3 e S4, respectivamente 2,86%, 0,41% e 0,06%.

Para o cálculo da eficiência de PCR, o “slope” foi calculado “plotando-se os valores de CTs contra o logaritmo do número de cópias do caráter específico, ou seja:

$$\text{slope} = \Delta Ct / \Delta (\log \text{no. cópia do caráter específico})$$

A eficiência de PCR da curva de calibração foi calculada a partir do valor de “slope” pela equação:

$$\text{Eficiência PCR} = E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1.$$



3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Teste de extração de DNA:

Sendo a extração de DNA primordial para o sucesso da análise de PCR, foi realizado o teste de presença de inibidores. Exemplo do teste pode ser observado na Tabela 4 que apresenta os dados de comparação dos valores de Ct extrapolados com os valores Ct medidos pela amplificação do gene *Adh1* para as amostras de milho 1 e 2. Estes dados foram obtidos pelas análises de regressão das respectivas curva padrão, apresentadas na Figura 1, as quais, por sua vez, foram originadas dos valores de Ct da análise do gene *Adh1* das amostras 1 e 2, como apresentado na Tabela 2. A Tabela 3 apresenta os cálculos para obtenção das respectivas Eficiências de PCR.

Tabela 2. Valores de Ct da análise do gene *Adh1* das amostras 1 e 2, com valores do Tm e do logaritmo do número de cópias do evento

Diluição	Detetor	Ct/1	Tm	Ct/2	Tm	Log Cópias
S1	ADH	27,98	80,0	24,44	80,4	3,86
S1	ADH	28,09	80,0	25,95	80,4	3,86
S1	ADH	27,61	80,4	24,31	80,4	3,86
S2	ADH	30,55	80,4	27,17	80,8	3,02
S2	ADH	30,64	80,4	27,49	81,1	3,02
S2	ADH	30,36	80,7	27,32	81,1	3,02
S3	ADH	32,41	80,7	34,7	81,1	2,17
S3	ADH	33,33	80,7	34,48	81,1	2,17
S3	ADH	33,11	80,7	33,75	80,8	2,17
S4	ADH	36,74	73,8	35,38	81,4	1,32
S4	ADH	35,82	81,0	35,77	81,1	1,32
S4	ADH	36,67	74,1	35,03	80,4	1,32
NTC	ADH	Indet	82,1	Indet	82,0	
NTC	ADH	Indet	82,1	Indet	82,0	
NTC	ADH	Indet	82,1	Indet	82,0	

Tabela3. Cálculo da eficiência PCR do iniciador ADH75/189 para as amostras 1 e 2.

Amostra 1	Amostra2
Slope=(27,89-36,41)/(3,86-1,32)= -3,35	Slope=(24,90-34,39)/(3,86-1,32)= -3,73
Eficiência PCR=E=10 ^(-1/slope) -1=1,99-1=0,99	Eficiência PCR=E=10 ^(-1/slope) -1=1,85-1=0,85

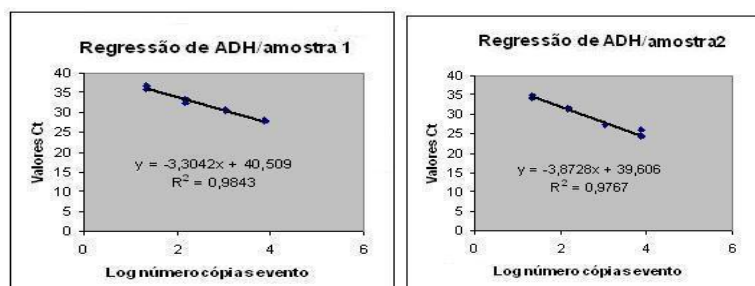


Figura 1. Regressão das curvas padrão do evento ADH com o iniciador 75/189 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA diluído com Low TE para reação com 100ng DNA das amostras 1 e 2



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 4. Dados de comparação dos valores de Ct extrapolados com os valores Ct medidos pela amplificação do gene *Adh1*:

Extração de DNA	R2	Inclinação curva	Ct extrapolado	Ct medido
1	0,98	3,35	27,85	27,90
2	0,97	3,73	24,71	24,90

Ocorrência de inibidores de PCR é considerada quando o valor de Ct medido é >0,5 ciclo comparado ao valor extrapolado da reta. A Tabela 4 mostra amostras não contaminadas.

3.2-Análise qualitativa

Foi testada a especificidade de 62 iniciadores desenvolvidos através da interação genoma/inserto (de ambas regiões 3' e 5'), otimizados para reação de 15,0 µl, com 20 ng de DNA pelo método “Fast” (Tabela 5) com 267 a 333nM dependendo do iniciador, sendo os melhores completamente específicos em relação as amostras da Tabela 1, além de amostras com os eventos BT11, Yield Gard e Yield Gard VT Pro. Houve um engano na amostra inicialmente considerada como Agrisure Viptera TL/TG, porém, após muitos iniciadores desenvolvidos, constatou-se que a amostra não tem o evento TG, sendo este evento não testado.

Tabela 5. Condições de PCR em Tempo Real pelo modo “Fast”

Evento/nome comercial	Iniciador/Concentração	Condições Fast
TC1507/Herculex I	81/174Hx/267nM	95°C/10s e 60°C/50s
MIR162/ Agrisure Viptera maize	144/222Mir/333nM	95°C/5s e 60°C/30s
NK603/ Roundup Ready 2	72/190NK/200nM	95°C/10s e 60°C/50s
GTS/ Roundup Ready soybean	124/225RR/333nM	95°C/5s e 60°C/30s

A Tabela 6 apresenta os melhores iniciadores desenvolvidos pelo laboratório com temperatura de anelamento utilizada em °C (T), concentração utilizada em nM, comprimento da amplificação em pares de bases (C) e Eficiência de PCR (E).

Tabela 6. Iniciadores com temperatura de anelamento (°C), concentração em nM, comprimento da amplificação em pares de bases (C), e Eficiência de PCR (E)

Evento / Nome comercial	Primer senso 5'-3' / Primer antisenso 5'-3'	T	nM	C	E
TC1507/Herculex I	81Hx: TTC ATC GTA AGA AGA CAC TCA GTA	53	267	94	0,98
	174Hx: 5'-AAT GCG TCA AAT ATC TTT GC				
MIR162/ Agrisure Viptera maize	144MIR: GCG CGC GGT GTC ATC TAT GTT ACTA	57	267	79	0,96
	222MIR: CTT CAG ACC ATG GCG GAC GTT TT				
NK603/ Roundup Ready 2	72NK: TCT CAA GCA TAT GAA TGA CCT CGA GTA	55	333	119	1,09
	190NK: GAAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACTA				
ADH1/álcool dehidrogenase	75ADH: TCG TTT CCC ATC TCT TCC TCC TT	53	133	115	0,9
	189ADH: TCC CTC ACC AGT TAC GAA ACC AA				
GA21/Roundup Ready corn -TG	15GA21: GTCA GCA ACG GCG GAA GGAT	56		89	
	103GA21: AGC TTG ACG GTG CCG GAG AT				
GTS/ Roundup Ready soybean	124RR:GCATTTTCATTCAAATAAGATCATAACATACAG	50	333	102	1,02
	225RR: TTT ATC GCA ATG ATG GCA TTT GTA G				
LEC/LECITINA	187Lec: TTG GTC GCG CCC TCT ACT	55	267	62	1,05



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

248Lec: GGC AAC GCT ACC GGT TTC

3.3-Análise Quantitativa

Para análise quantitativa foram utilizados de 133 a 333 nM, dependente do iniciador, com 1 etapa de 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento de 50°C a 57°C por 40 a 80 s e extensão a 60°C de 60 a 80s. As Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 apresentam as curva padrão, respectivamente dos eventos Herculex com iniciador 81/174, MIR162 com iniciador 144/222, NK603 com iniciador 72/190, GTS para iniciador 124/225 e LEC com iniciador 187/248 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA evento misturado a DNA sem evento (para o LEC diluição com Low TE) para reação com 100ng DNA e respectivas curvas de dissociação referente às respectivas amostras, 2B710Hx, Impacto VIP, DKB390 PRO2, 95R51, Foscarini, mostrando apenas um pico.

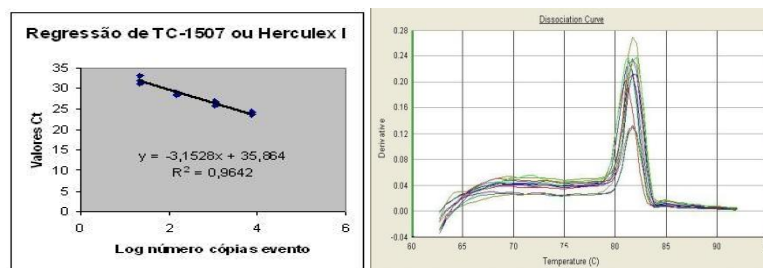


Figura 2. Regressão e dissociação da curva padrão do evento Herculex com o iniciador 81/174 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA evento misturado a sem evento para reação com 100ng DNA da amostra 2B710Hx.

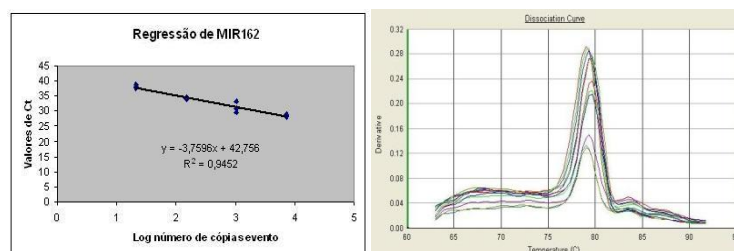


Figura 3. Regressão e dissociação do evento MIR162 com iniciador 144/222 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA evento misturado a sem evento para reação com 100ng DNA da amostra Impacto VIP.

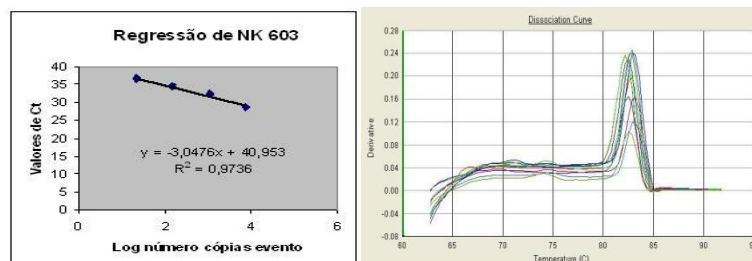


Figura 4. Curvas de regressão e dissociação do evento NK603 com iniciador 72/190 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA evento misturado a sem evento para reação com 100ng DNA da amostra DKB390 PRO2.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

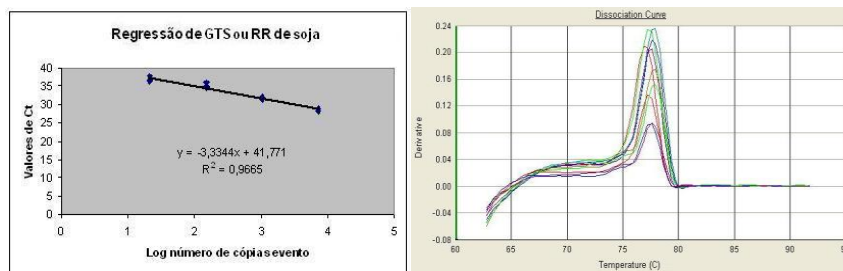


Figura 5. Curvas de regressão e dissociação do evento GTS ou RR de soja com iniciador 187/248 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA evento misturado a sem evento para reação com 100ng DNA da amostra 95R51.

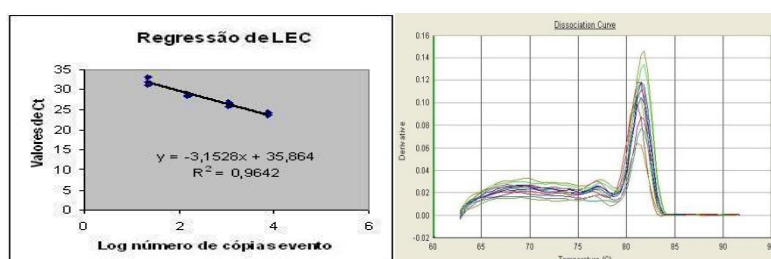


Figura 6. Curvas de regressão e dissociação do evento LEC com iniciador 124/225 para 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA diluído em Low TE para reação com 100ng DNA da amostra de soja Foscarini.

4-CONCLUSÃO

Tendo sido observado para todos os iniciadores, especificidade para cada respectivo evento, Limite de quantificação (LOQ) de 0,06% e eficiência de PCR dentro da faixa de 0,9-1,1 e ainda, tendo as análises com dois técnicos diferentes mostrarem resultados semelhantes, verificou-se que este trabalho viabiliza a análise específica e quantitativa de eventos transgênicos com uma metodologia mais barata, com sensibilidade, repetitividade e robustez.

5-AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.
A FAPESP – pelo auxílio financeiro
Ao CRGV – IAC, pela oportunidade de estágio.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arumuganathan K.; Earle, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species . **Plant Molecular Biology Reporter**, v9, p.208-218, 1991.

BRASIL. DOU - **Diário Oficial da União**. Publicado no dia 25.04.2003. Seção I, p.2.

CE. **Jornal Oficial da União Européia**. L 268/24, PT, 2003.

Cardarelli, P. et al. Detection of GMO in food products in Brazil. The INCQS experience. **Food Control**, v16, p.859-866, 2005.