

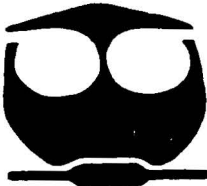


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LA TÉCNICA DE PCR APLICADA A LA DETECCIÓN DEL PROMOTOR 35S EN GRANOS Y ALIMENTOS DERIVADOS DE MAÍZ.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
CLAUDIA LUIS AGUIRRE



MÉXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

P R O F E S O R E S

Presidente **ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS**

Vocal **AMANDA GALVEZ MARISCAL**

Secretario **ISMAEL BUSTOS JAIMES**

1er. Suplente **FRANCISCO RUIZ TERAN**

2do. Suplente **MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorios 312 (Depto. Alimentos y Biotecnología) y 101 (Depto. Bioquímica) Edificio "E", Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA Amanda Gálvez Mariscal

SUPERVISOR TÉCNICO Fco. Javier Plasencia de la Parra

SUSTENTANTE Claudia Luis Aguirre

Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal line. The top signature is circled and appears to be 'AEM'. The middle signature is 'Fco. Javier Plasencia de la Parra'. The bottom signature is 'Claudia Luis Aguirre'.

AGRADECIMIENTOS

A quienes son lo más valioso en mi vida...

Mi familia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

A mis profesores, en especial mis asesores.

A mis amigos.

Este trabajo se realizó en los laboratorios 312 (Depto. de Alimentos y Biotecnología) y 101 (Depto. De Bioquímica) Edificio "E" de la Facultad de Química de la UNAM gracias al financiamiento del proyecto DGAPA-PAPIT No. IN 218101.

La tesista recibió una beca PROBETEL en el periodo julio a diciembre 2001 y febrero a julio 2002.

CONTENIDO.

ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN.	2
II. INTRODUCCIÓN.	3
III. ANTECEDENTES.	9
1. Estrategias para transformar plantas	9
2. Organismos modificados genéticamente	12
3. Detección de organismos modificados genéticamente (OMG)	13
4. Clasificación de métodos de detección de ADN en base a su especificidad	16
5. Métodos cuantitativos usando PCR	19
6. Factores que limitan la PCR	20
7. Necesidades Futuras	23
8. Nixtamalización	25
IV. OBJETIVOS	33
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	34
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Extracción de ADN	35
2. Concentración de extractos de ADN.	38
3. Diseño de cebadores (primers)	39
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	43
5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	46
6. Extracción de ADN de geles de agarosa.	47
7. Reacción de restricción	49
8. Secuenciación	52
VII. RESULTADOS	54
1. ADN genómico	54
2. Amplificación del gen endógeno RPA-1	56
3. Amplificación del promotor 35S	59
4. PCR anidada.	64

5. Secuenciación	67
6. Análisis de costos	71
VIII. DISCUSIÓN	74
IX. CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AFP	Acuerdo Fundamentado Previo
NASBA	Amplificación de secuencias base con ácidos nucleicos
CDB	Convenio sobre Diversidad Biológica
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
ELISA	Ensayo enzimático ligado a un inmunoadsorbente
MG	Modificado genéticamente
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMG	Organismo modificado genéticamente
OVM	Organismo vivo modificado
PEG	Polietilenglicol
Taq Pol	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
P-35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
RPA-1	Proteína de replicación A-1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Solución amortiguadora Tris-Ácido bórico-EDTA
T-NOS	Terminador de Nopalina sintasa
TLCAN	Tratado de Libre Comercio de América del Norte
CaMV	Virus de mosaico de la coliflor

I. RESUMEN

Debido al desarrollo de nuevas tecnologías en la producción de alimentos y a regulaciones sobre los productos de estas tecnologías, la detección de productos genéticamente modificados se ha convertido en una necesidad para la venta y el seguimiento de alimentos en algunos países.

Este trabajo presenta la implementación de un método rápido y económico de extracción de ADN de granos y alimentos derivados de maíz, para su empleo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de detectar la secuencia del promotor 35S, del virus del mosaico de la coliflor pues se encuentra presente en la mayoría de los granos comerciales manipulados genéticamente.

Para el desarrollo del método se amplificó como control positivo un fragmento de 300 pb del gen de replicación de la proteína A-1 (RPA-1) presente en el genoma de maíz.

La presencia del promotor 35S se determinó utilizando dos pares de *primers* s; el par 35-DIR y 35S-R amplificó un segmento de 280 pb en una primera reacción de PCR cuyo producto se sometió posteriormente a una reacción de restricción con el enzima *Asp700* y a una PCR anidada usando un segundo par de *primers* s 35-INV y 35S-F dirigido a un segmento interno de 151 pb, con la finalidad de corroborar indirectamente la identidad de la secuencia amplificada. Así mismo se empleó como control positivo el estándar de polvo de maíz certificado Bt176 de Fluka para amplificar el segmento interno de 151 pb.

La técnica de extracción de ADN y amplificación por PCR se probó con 30 muestras de alimentos comerciales de maíz que incluyeron granos enlatados, tostadas, tortillas y botanas, de las cuales 10 resultaron positivas. En una de estas muestras se confirmó por secuenciación la identidad del fragmento de ADN.

II. INTRODUCCIÓN

El cultivo comercial de plantas modificadas genéticamente (MG) se inició con tabaco resistente a virus en China en 1992. En 1994, el tomate FlavrSavr® con niveles reducidos de poligalacturonasa (maduración retardada) se convirtió en la primera planta MG sembrada para cultivo comercial en EUA. Desde entonces, el área dedicada al cultivo de plantas MG ha aumentado considerablemente. En el año 2000, el área de cultivo de las plantas MG continuó aumentando y se llegó a cubrir un total de 44.2 millones de hectáreas (James, 2000).

La soya, el maíz, el algodón y la canola transgénicos han sido los cultivos dominantes en los últimos años, pues datos de 2000, indican que el 16% de los 271 millones de hectáreas dedicadas al cultivo correspondieron a estos cuatro productos. En EUA toda la soya y la canola MG plantada en 2000 corresponde a variedades tolerantes a herbicidas. El maíz y el algodón MG fueron variedades tolerantes a herbicidas o resistentes a insectos, o ambos (Brown *et al.*, 2001).

Sin embargo, no en todo el mundo se han aceptado cultivos MG y algunos países han impuesto regulaciones muy estrictas.

El Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea imponen un etiquetado claro y obligatorio de los organismos modificados genéticamente (OMG) citado en la Directiva (EC/220/2001), y de los productos derivados presentes en el mercado, exceptuando los productos donde la presencia de trazas de OMG autorizados no pueda evitarse y se encuentren dentro de los límites establecidos (porcentajes menores a 1% de ADN modificado genéticamente del ADN total) para el producto de interés de acuerdo con la Directiva (EC/468/1999) (Anklam, 1999; Lipp, *et al.*, 1999).

El gobierno de Suiza requiere un etiquetado de los productos derivados de OMG con base en las posibilidades para su detección usando métodos analíticos de ADN recombinante y se ha establecido como límite un 1% de ADN modificado genéticamente del ADN total. En Noruega y Hungría el límite para etiquetar los productos derivados de OMG es de 2%, cuando el límite no es rebasado, el etiquetado no es obligatorio (Meyer, 1999).

El gobierno mexicano no exige el etiquetado de los OMG y tampoco cuenta con métodos certificados para su detección pero ahora resulta indispensable este tipo de información para el comercio exterior, principalmente con el mercado Europeo.

En Río de Janeiro, en la reunión de la Cumbre de la Tierra (1992) se propuso la creación de un Protocolo Internacional de Bioseguridad como instrumento legalmente vinculante para la regulación del movimiento transfronterizo de organismos vivos manipulados genéticamente. El mandato del Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) publicado el 7 de mayo de 1993 en el *Diario Oficial de la Federación*, artículo 19 textualmente dice: "Las partes consideraran la necesidad y modalidades de un Protocolo que ponga a punto los procedimientos apropiados, incluyendo, en particular, el Acuerdo Fundamentado Previo (AFP), en el campo de la transferencia, el manejo y el uso seguros de cualquier Organismo Vivo Modificado (OVM) resultante de la biotecnología y que pueda tener efectos adversos en la conservación y el uso sustentable de la diversidad biológica".

Organismo Vivo Modificado (OVM) se define como aquel organismo que posea una combinación novedosa de material genético obtenida a través de la utilización de biotecnología moderna.

El Acuerdo Fundamentado Previo (AFP) se aplica al primer movimiento transfronterizo de un OVM que se pretende liberar intencionalmente en el ambiente, y tiene por objeto permitir que los países importadores tengan la libertad soberana de solicitar la información necesaria para realizar una evaluación del riesgo de liberar en sus territorios ese OVM. Una vez realizado el análisis de

riesgo se permitiría el movimiento transfronterizo con un consentimiento explícito, por escrito (Gálvez, 2000).

El interés de las naciones sobre el posible impacto de los OMG sobre la diversidad biológica ha aumentado considerablemente y como resultado de esto en 1999 se redactó el Protocolo de Cartagena, en esta ciudad colombiana.

El Protocolo de Cartagena para la Bioseguridad.

El Protocolo de Bioseguridad en su artículo 1° menciona como objetivo "contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna, mediante el análisis de riesgos de los organismos genéticamente modificados que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta la salud humana y concentrándose concretamente en los movimientos transfronterizos" (Secretaría de CBD, 2000).

Con fecha de 1° de julio de 2002, en el *Diario Oficial de la Federación* apareció la ratificación de México al Protocolo de Cartagena en materia de Bioseguridad. Sin embargo México no cuenta aún con toda la reglamentación necesaria para evaluar los riesgos de la liberación de todas las categorías de OVM, como para asegurar la inocuidad para el medio ambiente y la salud de todos los productos que contengan al organismo vivo. Es necesario contar con una legislación especial de bioseguridad que establezca definiciones y políticas a seguir en materia de bioseguridad, a la vez que sirva para la debida instrumentación del Protocolo de Bioseguridad (Gálvez, 2000).

Con un propósito ilustrativo se analizó el estado actual del derecho mexicano y la normatividad relativa a la protección de la biodiversidad. De forma concisa se presenta el perfil del actual marco jurídico vigente y aplicable en México en materia de OVM.

-
- La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos no contiene de manera expresa la facultad de legislar en materia de Bioseguridad.
 - La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente y su reglamento regulan la evaluación de riesgo en materia de liberación de transgénicos al ambiente en materia acuícola y forestal y, en cuanto a las actividades agropecuarias, sólo en el caso de que impliquen cambios de uso de suelo de áreas forestales.
 - La Ley General de Salud regula, específicamente a los productos biotecnológicos, definidos por su artículo 282 Bis como "aquellos alimentos, ingredientes, aditivos, materias primas, insumos para la salud, plaguicidas, sustancias tóxicas o peligrosas, y sus desechos, en cuyo proceso intervengan organismos vivos o parte de ellos, modificados por técnica tradicional o ingeniería genética". Se establece la obligación de informar a la Secretaría de Salud sobre los productos biotecnológicos o sus derivados, "que se destinen al uso o consumo humano". Respecto de su etiquetado, se señala que deberá regularse por las normas oficiales mexicanas.
 - La Ley Federal de Sanidad Vegetal incluye, dentro de su concepto de "insumo fitosanitario" al material transgénico, y a este último lo define como genotipos modificados artificialmente que debido a sus características de multiplicación y permanencia en el ambiente, tienen la capacidad para transferir a otro organismo genes recombinantes con potencial de presentar efectos previsibles o inesperados. Igualmente señala en su artículo 43 que la aplicación, uso o manejo de material transgénico está sujeto al certificado fitosanitario correspondiente, pero sólo en el área de programas experimentales y combate a plagas.
 - La Ley Federal de Variedades Vegetales, sus disposiciones son más bien dirigidas a la propiedad intelectual sobre OGM del reino vegetal, protegiendo los derechos de los obtentores (persona física o moral que mediante un proceso de mejoramiento haya obtenido y desarrollado, una variedad vegetal de cualquier género y especie) de variedades vegetales nuevas, a través de su respectivo registro.
-

-
-
- La Ley sobre Producción, Certificación y Comercio de Semillas y su reglamento contemplan la obligación de solicitar una autorización para realizar investigaciones con materiales transgénicos vegetales de alto riesgo, requisitos para importar semilla y lineamientos para certificación y verificación de las mismas.
 - El Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios regula, en su Título Décimo Octavo, a los productos biotecnológicos. En su capítulo único (Arts. 164 a167), se señala que son objeto de tal reglamento los alimentos, ingredientes, aditivos o materias primas para uso o consumo humano, que han sufrido alguna manipulación genética. Los responsables de estos productos deberán presentar la información técnica de ellos a la Secretaría de Salud, a fin de demostrar la "inocuidad y estabilidad" de los mismos, y su comercialización estará sujeta a la evaluación que se haga por parte de las autoridades sanitarias respectivas. Igualmente se señala que las etiquetas de los productos objeto del reglamento, deberán contener información con respecto a las características y el riesgo que representen estos productos para la salud, "conforme a lo que disponga y especifique la Secretaría para el caso". Se señala que en las "normas" se establecerán los lineamientos o especificaciones sobre actividades, establecimientos, productos y servicios biotecnológicos y, por "normas", deberán entenderse las normas oficiales mexicanas.
 - La NOM-FITO-056-1995 regula requisitos fitosanitarios para la movilización nacional, importación y establecimiento de pruebas de campo de organismos manipulados mediante la aplicación de ingeniería genética.
 - En cuanto a las iniciativas de ley, en el proceso de consulta interna del poder legislativo se superó la iniciativa de Ley de Bioseguridad presentada por el PVEM, por la presentada por el PAN, la cual ya fue propuesta aunque aún no se dictamina.

De lo anterior se puede concluir que la normatividad aplicable a la bioseguridad y a los OVM en México no está completa y no tiene un sustento constitucional suficientemente explícito. Además no existe un concepto preciso de bioseguridad y requiere ser armonizado con los instrumentos internacionales (Besares, 2000).

La necesidad de esta normatividad se acentúa por el hecho de que México es centro de origen y diversidad de numerosos cultivos de importancia comercial, como el tomate, el frijol, la papa, los chiles, y el maíz.

En los estados de Sonora y Tamaulipas se cultivan a nivel experimental y semi-comercial (se dice que son cultivos semi-comerciales porque en México no existe la ley apropiada para darles el estatus de cultivos comerciales a estos cultivos) algodón y soya MG.

El maíz MG es el cultivo que ocupa mayores extensiones de áreas cultivadas en países productores de granos MG como EUA. El hecho de ser una especie de polinización abierta podría facilitar el escape de genes a través del polen permitiendo la hibridación y posible introgresión de los transgenes a las variedades criollas de maíz por lo que su cultivo no está permitido en México.

El maíz importado que proviene de los EUA por las cuotas del TLCAN no está segregado de los granos no-MG, por lo que resulta importante su identificación, así como la de los alimentos derivados en el mercado nacional, para poder informar y monitorear su destino en nuestro país (Gálvez, 2001).

En nuestro grupo de trabajo resulta de gran interés desarrollar métodos específicos, económicos, sensibles y prácticos para detectar transgenes, con particular interés en granos y alimentos derivados de maíz con diferentes grados de procesamiento.

III. ANTECEDENTES

1. Estrategias para transformar plantas

La producción de plantas transgénicas depende de la introducción de ADN foráneo en el genoma de la planta, seguido de la regeneración para producir plantas intactas y la subsecuente expresión de los genes introducidos.

La principal barrera para introducir ADN a la célula vegetal es la pared celular, que está constituida por polisacáridos, principalmente celulosa, polímero de glucosa, y pectina, polímero de ácido galacturónico.

Algunos de los métodos empleados para introducir ADN foráneo a células vegetales y los principios en que se basan se presentan a continuación:

1.1. Transformación de protoplastos con PEG (polietilenglicol)

Este fue uno de los primeros métodos empleados para transformar plantas en el que la regeneración de plantas transgénicas fue efectiva cuando se utilizaron suspensiones de células embrionarias (células no diferenciadas capaces de dividirse), para el aislamiento de protoplastos (células desprovistas de su pared celular externa rígida). La metodología implica la transferencia directa de ADN al interior de protoplastos facilitada por el PEG.

Este método tiene muchas limitaciones. Los cultivos celulares embrionarios a partir de los cuales se aíslan los protoplastos son difíciles de iniciar y de mantener ya que la capacidad de regeneración de estos cultivos declina gradualmente conforme pasa el tiempo, además la regeneración de plantas a partir de protoplastos es una labor intensiva, ineficiente, tardada y dependiente del genotipo. Sin embargo este método se sigue usando para la transformación de algunas especies vegetales (Tyagi *et al.*, 1999; Walden *et al.*, 1995).

1.2. Electroporación

El uso de electroporación para la transformación de plantas ha sido preferido por algunos investigadores porque ha demostrado ser más eficiente en la regeneración de plantas transgénicas en comparación con el método PEG. Este método ha sido empleado para transformar cereales.

La electroporación emplea pulsos de electricidad de alto voltaje para inducir la formación temporal de poros en la membrana de la célula hospedera. Dichos poros permiten el paso del material genético al interior de la célula hospedera.

Este método tiene las mismas limitantes que el método PEG debido a que el ADN foráneo también se introduce en protoplastos, a partir de los cuales se regeneran las plantas transgénicas (Tyagi *et al.*, 1999; Walden *et al.*, 1995).

1.3. Aceleración de partículas o biobalística

El sistema de aceleración de partículas introduce el material genético a células intactas y tejidos, el método es popular debido a que pueden obtenerse plantas transgénicas a partir del "bombardeo" de cualquier tejido, eliminando con esto los inconvenientes del aislamiento y la regeneración de protoplastos indispensables en los métodos anteriores. Este método de transformación ha sido ampliamente utilizado en plantas mono y dicotiledóneas.

La biobalística se basa en el "bombardeo" de células vegetales a alta velocidad con microproyectiles de oro o tungsteno recubiertos con ADN, acelerados por una descarga eléctrica o mediante helio presurizado.

Así como los métodos anteriores la biobalística tiene algunos inconvenientes, en algunos casos el número de copias y arreglos del ADN introducido es elevado, por lo que al traducir al transgen hay propensión a silenciar genes y causar cambios genómicos (no existe evidencia), también se pueden integrar multicopias en un sólo evento transgénico y el equipo tiene un costo elevado (Tyagi *et al.*, 1999; Walden *et al.*, 1995).

1.4. Transformación mediada por *Agrobacterium*

La bacteria común del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, ha despertado un interés especial debido a que inserta genes foráneos en plantas y consigue que se expresen en forma de proteínas.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria infectiva que porta una molécula circular de ADN el plásmido *Ti* (por *tumor-inducing*, inductor de tumores) que codifica para la biosíntesis de amino ácidos poco convencionales octopina y nopalina útiles para la proliferación de la bacteria. El denominado ADN-T (ADN transferido) es un segmento específico del plásmido *Ti*, que es introducido a la célula y que codifica para la tumoración.

La transformación mediada por *Agrobacterium* emplea el plasmido *Ti* como vector, este contiene el segmento ADN-T al que se han integrado previamente los genes de interés comercial lo que permite introducir nuevos genes a las células vegetales que al regenerarse producen plantas transgénicas con rasgos genéticos mejorados.

Esta técnica ofrece el potencial de generar células transgénicas sin que presenten rearrreglos importantes en el ADN transferido. Además en la mayoría de los casos el gen foráneo es integrado en una sola copia en el genoma hospedero. Es ampliamente utilizada para obtener plantas transgénicas dicotiledóneas y con menos éxito plantas monocotiledóneas (Tyagi *et al.*, 1999; Barea *et al.*, 1983).

Estos métodos en general requieren del uso de genes marcadores para permitir la selección de los eventos de transformación exitosa es decir, de las células que han adquirido el transgen y el marcador, y que por lo tanto son capaces de crecer en presencia de un antibiótico o herbicida (MacCormick *et al.*, 1997).

2. Organismos Modificados Genéticamente

Un organismo modificado genéticamente es un ser vivo, cuya composición genética ha sido alterada mediante ingeniería genética. La modificación usualmente implica la inserción en el genoma del organismo de una combinación de varias secuencias de ADN obtenida en laboratorio, mediante técnicas de ADN recombinante.

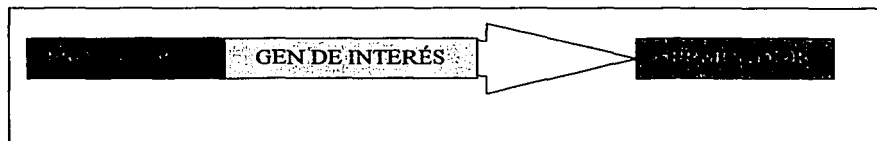


Figura 1. Esquema de un inserto típico. (Zimmermann *et al.*, 2000).

Estas secuencias de ADN son llamadas insertos o construcciones y por lo general se pueden distinguir tres elementos fundamentales (Figura 1) que son:

1. El elemento promotor que es indispensable para activar la transcripción del gen de interés.
2. El gen o transgen que codifica para una característica específica.
3. El elemento terminador que detiene la transcripción del gen de interés.

El transgen, el promotor y el terminador proceden de un organismo distinto en especie, género, familia o incluso Reino al organismo que lo recibe, un ejemplo de un transgen podría contener el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen bacteriano que codifica para la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) y el terminador T-NOS de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* todos ellos provenientes de un organismo distinto.

Además de estos elementos pueden estar presentes secuencias cuya función es usualmente controlar y estabilizar la expresión del nuevo gen o permitir la identificación del inserto. Un gen construido debe estar integrado en el genoma del organismo a modificar para que llegue a ser un elemento estable. (Zimmermann *et al.*, 1998; Jensen., 2001).

Debido a que la construcción de ADN se inserta en el genoma de la planta en principio es posible detectarlo por métodos moleculares o bien a su producto (proteína) por métodos inmunoquímicos.

3. Detección de organismos modificados genéticamente (OMG)

La detección de Organismos Modificados Genéticamente (OMG) puede realizarse mediante la detección de moléculas de proteína, ADN o ARN que estén asociados específicamente con la modificación genética de interés. Hasta hoy la mayoría de los métodos desarrollados para la detección de OMG se han enfocado en la detección de ADN, mientras que sólo unos cuantos se han desarrollado para la detección de proteína o ARN. Esto es porque el ADN es una molécula más estable, que el ARN y las proteínas, además de que la presencia de estas dos moléculas dependen de que ocurra la expresión genética. (Jensen, 2001; MacCormick *et al.*, 1997).

3.1. Métodos de detección de proteína

Los métodos de detección basados en proteínas realizan el reconocimiento específico de la proteína heteróloga, expresada por el organismo transgénico con un anticuerpo acoplado a una enzima. El anticuerpo detecta la proteína previamente extraída a partir del OMG, reconoce a la proteína, y se une a ella. El complejo es posteriormente detectado mediante una reacción enzimática cuyo producto es cromogénico.

Esta técnica es llamada ELISA por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo enzimático ligado a un inmunoabsorbente) (Jensen, 2001).

3.2. Método de detección de ARN

Los métodos basados en ARN realizan una unión específica entre la molécula de ARN de interés y una molécula sintética de ARN o ADN llamada *primer* o cebador que es una secuencia corta de ADN. El *primer* debe ser complementario a la secuencia de nucleótidos iniciales de la molécula de ARN mensajero. El resultado es una doble cadena similar al ADN. Usualmente la unión entre la molécula de ARN y el *primer* es seguida por una conversión del ARN en ADN mediante un proceso llamado transcripción reversa que es llevada a cabo por la polimerasa ARN-ADN también llamada transcriptasa reversa. Finalmente el ADN puede ser amplificado por una PCR. Los *primers* específicos que se necesitan para el procedimiento no pueden ser desarrollados si de antemano no se conoce la composición de la molécula de ARN que se desea detectar.

Este tipo de métodos casi no se usan debido a que la molécula de ARN es muy inestable, por lo que su manipulación y amplificación resulta un proceso complicado, especialmente en alimentos procesados (Jensen 2001).

3.3. Método de detección de ADN

El principio de esta técnica es la amplificación de secuencias específicas de ADN a partir de un par de *primers* o cebadores que delimitan la región que será amplificada. La PCR consta de tres etapas (Figura 2): **Desnaturalización.** La doble hélice del ADN es desapareada mediante un calentamiento a 94°C temperatura suficiente para romper los puentes de hidrógeno que unen a las cadenas. **Hibridación** ("Annealing"). Se disminuye la temperatura hasta aproximadamente 55°C, lo que permite que los *primers* o cebadores (aproximadamente 20-30 nucleótidos), que delimitan la región de interés se unan (hibridación) a su cadena complementaria. El molde de ADN, los cebadores, la ADN polimerasa y los nucleótidos son adicionadas desde el inicio de la reacción. **Extensión.** Finalmente, durante la etapa de extensión la ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena mediante la adición del nucleótido complementario de cada base. La etapa de polimerización se lleva a cabo a 72°C que es la

temperatura óptima de esta enzima purificada inicialmente de la bacteria *Thermus aquaticus*. Una vez que el ciclo es completado, puede ser repetido, y por cada ciclo el número de copias se duplicara, teniendo como resultado una amplificación exponencial 2^n (Gachet *et al.*, 1999).

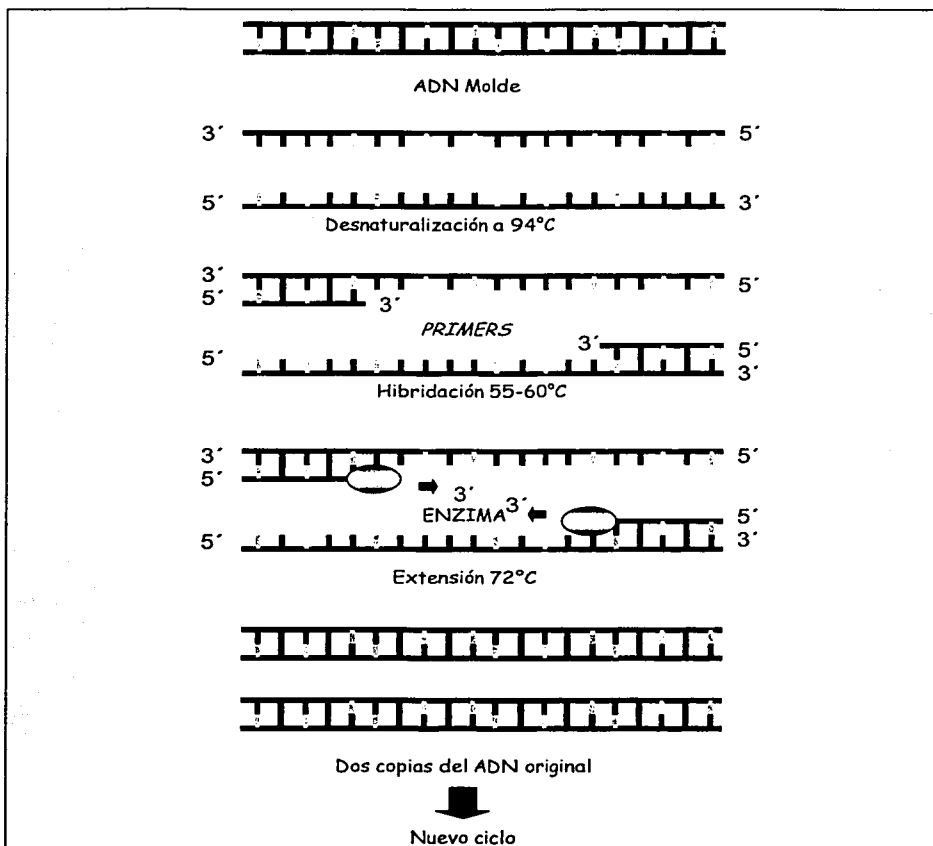


Figura 2. La reacción en cadena de la polimerasa. Esquema de amplificación de las cadenas de ADN (Gachet *et al.*, 1999).

La Transferencia de ADN o *Southern blotting* es otro método para identificar un fragmento de ADN. Mediante esta técnica un fragmento de ADN que contiene una determinada secuencia puede ser identificado hibridándolo con una hebra de ADN complementario marcado.

La mezcla de fragmentos de ADN se separa por electroforesis en gel de agarosa, se desnaturaliza para formar ADN de una hebra y se transfiere a una hoja de nitrocelulosa, donde son hibridados con una *sonda* de ADN de una hebra marcada con ^{32}P . A continuación se observa por autorradiografía la localización de los fragmentos de ADN que poseen una secuencia complementaria a la de la sonda. De esta manera se puede identificar un fragmento concreto de ADN.

4. Clasificación de métodos de detección de ADN en base a su especificidad

Los métodos basados en la detección de ADN disponibles pueden clasificarse en cuatro categorías de acuerdo al componente de la construcción o inserto que se pretende amplificar:

Clasificación 1. Métodos que detectan un elemento regulador promotor o terminador.

Elementos como el promotor del virus de mosaico de la coliflor (P-35S) o el terminador de la nopalina sintasa (T-NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* se encuentran en la mayoría de las plantas MG actualmente cultivadas. A pesar de que otros promotores y terminadores también han sido utilizados, actualmente casi todas las plantas MG comerciales contienen integrado a su genoma al menos una copia del P-35S, T-35S y/o el T-NOS como parte del gen insertado. Por consiguiente, los métodos para detectar alguno de estos elementos son los más utilizados ya que detectan un amplio rango de OMG aunque sin identificarlos (Figura 3). Un problema con estos métodos es que los elementos detectados podrían provenir de virus o bacterias que se encuentren como endófitos en los tejidos de la planta.

Clasificación 2. Métodos que detectan un gen insertado.

Los transgenes insertados en un OMG son varios y pueden caracterizar a un grupo de OMG, aunque no por ello puedan ser identificados. La detección del gen que codifica para la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) demuestra la presencia de maíz modificado genéticamente, pero este gen ha sido utilizado en la construcción de más de un OMG, por consiguiente la detección de este gen no puede identificar de forma específicamente el OMG (Figura 3).

Bacillus thuringiensis también es empleado como agente de control biológico contra muchas plagas de insectos por lo que se debe considerar si se ha usado en muestras de plantas que se van a analizar.

Clasificación 3. Métodos que detectan la región donde se fusionan gen y elemento regulador.

El gen CryIA(b) ha sido integrado en varios OMG con diferentes elementos reguladores (promotores y terminadores). Por lo tanto es posible identificar el OMG con un método que detecte la región específica de la secuencia donde el gen y el elemento regulador se fusionaron (Figura 3). No obstante, en el futuro, aun estas regiones podrían encontrarse en más de un OMG.

Clasificación 4. Métodos que detectan la región donde se fusionan inserto y genoma.

Con la tecnología disponible en la actualidad aun no ha sido posible controlar en que sitio, ni cuantas veces se integra el inserto en el genoma de la planta. Por lo tanto, el sitio de unión del inserto y el genoma de la planta sería un evento único para cada evento de transformación. Los métodos que detectan estas regiones continuarían siendo específicos para el evento de transformación aun cuando el mismo inserto hubiera sido integrado varias veces en la misma especie de plantas (Figura 3) (Jensen., 2001).

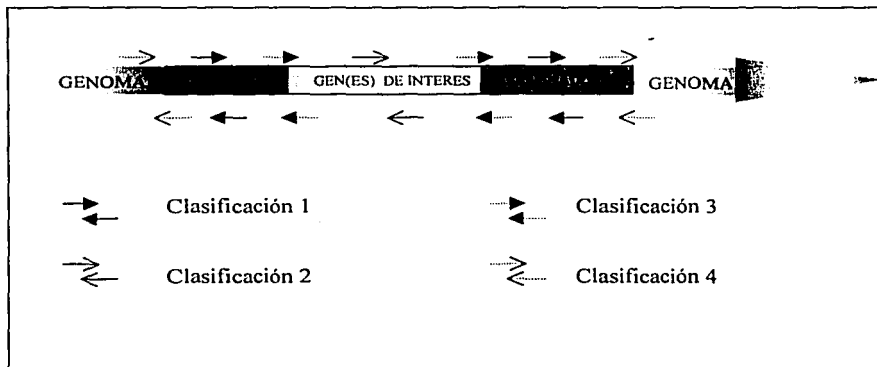


Figura 3. Esquema de la clasificación de los métodos de detección de ADN (MG). En esta figura se presentan los métodos de detección de ADN disponibles y se clasifican en 4 categorías: Clasificación 1. Métodos que detectan elementos reguladores; Clasificación 2. Métodos que detectan un gen insertado; Clasificación 3. Métodos que detectan la región donde se fusionan gen y elemento regulador; y Clasificación 4. Métodos que detectan la región donde se fusionan inserto y genoma.

5. Métodos cuantitativos usando PCR

Los métodos de cuantificación mediante PCR pueden llevarse a cabo después de la PCR (análisis punto-final), o durante la PCR (análisis en tiempo real).

Los análisis de punto-final se basan en la comparación de la cantidad final de ADN amplificado, de dos fragmentos de ADN. El primero corresponde al ADN que se desea cuantificar y el segundo al competidor que es una cantidad de ADN sintetizado de concentración conocida que se adiciona antes de la amplificación por PCR y que es coamplificado con la secuencia de interés que se desea cuantificar. Este método se conoce como PCR competitiva y requiere que ambos ADN sean amplificados con la misma eficiencia, de forma que haya correlación lineal entre la concentración de los productos y la del ADN molde inicial.

Los análisis en tiempo real permiten la cuantificación directa mediante la medición de fluorescencia generada por el producto sintetizado en presencia de sondas fluorescentes durante la reacción de PCR. Hay pruebas de hibridación que emiten la luz fluorescente correspondiente a la cantidad de ADN sintetizado permitiendo así su cuantificación. La cantidad de producto sintetizado también puede ser estimada con colorantes fluorescentes, e.g. SYBR Green I que se intercala en la doble cadena de ADN.

El método de PCR en tiempo real requiere un arreglo óptico que permite detectar fluorescencia, es más caro en comparación con el método de PCR competitiva, pero es más rápido, y en ocasiones, más específico (Meyer., 1999; Pauli, 2000).

6. Factores que limitan la reacción en cadena de la polimerasa PCR

La secuencia específica del gen insertado o la secuencia del elemento (e.g. promotor, gen estructural, terminador, gen marcador) de interés debe conocerse para poder diseñar los *primers* correspondientes para la detección del OMG. La especificidad del análisis de PCR está basada en el diseño adecuado de los *primers* así como de la optimización de los parámetros de la reacción de PCR. Para un diseño adecuado de *primers* pueden usarse programas tales como "OLIGO 5.0 Primer Analysis Software" (NBI, Plymouth, MN, USA) y "Primer 3 Web Site" (www-genome.wi.mit.edu/).

La cantidad, integridad y pureza del ADN aislado son puntos críticos en la preparación del ADN para un análisis de PCR. Normalmente se utilizan 50-100 ng de ADN por reacción de PCR. El ADN aislado de alimentos procesados está sumamente degradado (fragmentos menores a 400 bp) y debe ser purificado para eliminar proteínas, lípidos y polisacáridos. Los polisacáridos y polifenoles representan grandes problemas para algunos alimentos, porque es difícil separarlos del ADN y pueden interactuar con proteínas y ácidos nucleicos, los polisacáridos han sido reportados como inhibidores de la ADN polimerasa (Anklam, 1998).

La temperatura de hibridación es dependiente de la secuencia, longitud y composición del *primer*, para evaluar la temperatura óptima, se puede aplicar la regla de Wallace en la que la temperatura de fusión del un enlace A-T esta en el rango de 2°C y un enlace G-C esta en el rango de 4°C o se pueden utilizar programas que emplean otros algoritmos para su cálculo como "OLIGO 5.0 Primer Analysis Software" (NBI, Plymouth, MN, USA) y "Primer 3 Web Site" (www-genome.wi.mit.edu/).

La concentración óptima de magnesio debe determinarse experimentalmente o se puede utilizar la concentración estándar recomendada por el fabricante de la enzima. La concentración de iones libres de magnesio determinan la eficacia de la polimerización enzimática de ácidos nucleicos y puede influenciar el resultado de la amplificación. La concentración óptima de magnesio debe dar como resultado un rendimiento máximo de la PCR y debe evitar la presencia de bandas inespecíficas en el producto de amplificación.

Varios factores pueden dar como resultado falsos positivos en PCR e.g. contaminación accidental de muestras y reactivos. Los falsos negativos en PCR pueden ser resultado e.g. inhibidores, inapropiada temperatura de hibridación, inadecuada concentración de magnesio.

Se deben emplear controles tanto positivos como negativos para monitorear la amplificación de ADN por PCR, tales controles son necesarios para interpretar adecuadamente los resultados y sirven para evitar falsos positivos y falsos negativos. Los controles negativos son esencialmente para monitorear posibles contaminaciones con ADN o con productos de PCR. Los controles positivos aportan información sobre la actividad enzimática y sobre posibles inhibidores presentes en la muestra.

Los controles internos son controles positivos de la reacción de PCR necesarios para indicar la presencia de ADN amplificable o la presencia de inhibidores en la muestra, como controles internos se pueden usar secuencias de genes endógenos esenciales para la supervivencia del organismo en estudio. La amplificación por PCR de un segmento de este gen endógeno deberá ser exitosa en todas las muestras hayan sido modificadas genéticamente o no.

Los genes endógenos empleados comúnmente en la literatura como controles internos en maíz son:

La secuencia del gen endógeno que codifica para zeína fragmento de 485 pb o fragmento de 227 pb (Gatchet *et al.*, 1999).

La secuencia del gen endógeno que codifica para invertasa fragmento de 226 pb o fragmento de 122 pb (Gatchet *et al.*, 1999; Vollenhofer *et al.*, 1999; Hurst *et al.*, 1999).

Por razones prácticas se distinguen los siguientes tipos de contaminación: contaminación con fragmentos de PCR (contaminación por producto), contaminación con ADN genómico; contaminación de reactivos (soluciones stock o soluciones de trabajo) y contaminación cruzada (muestras positivas en contacto con negativas).

En todas las técnicas de amplificación, gran atención es dirigida hacia la prevención de cualquier contaminación porque localizar el agente contaminante en el laboratorio consume tiempo y es tedioso. Una vez que ha ocurrido la contaminación, la prueba debe detenerse hasta que el agente contaminante sea identificado. Sin excepción, los resultados de la prueba deben ser rechazados.

Como regla general, se debe dar prioridad a la prevención, las siguientes recomendaciones permiten prevenir posibles contaminaciones:

Descontaminar el área de trabajo antes y después del análisis, emplear lámparas de radiación UV durante la preparación de la muestra (extracción de ADN) y en la preparación de la reacción de PCR. Dividir las cajas de material destinado a la preparación de la muestra, la reacción y el análisis de los productos de amplificación, también se recomienda que las pipetas empleadas para la preparación de la reacción no sean las mismas para el análisis de los productos de PCR. Todos los reactivos deben alicuotarse y almacenarse en un área libre de productos de PCR para disminuir el riesgo de contaminación. El material que se utilice debe ser esterilizado antes y después de su uso (Neumaier *et al.*, 1998; Meyer, 1999).

7. Necesidades Futuras

Aun cuando se han desarrollado muchos métodos para el análisis y detección de OMG aun es indispensable diseñar métodos de PCR que permitan distinguir entre contaminación natural con CaMV o *Agrobacterium* de la presencia de estas secuencias en el genoma. Así mismo para el análisis de alimentos es determinante el número de análisis para definir cómo pueden efficientarse los análisis de rutina.

Una estrategia para aumentar la especificidad podría obtenerse con:

- Métodos de PCR que detecten la unión entre el inserto de ADN y el sitio de integración.
- Métodos de "huellas digitales" para OMG específicos, similares a los usados en las técnicas forenses.

La validación de un método es necesaria para que sea considerado confiable y preciso. Sólo unos cuantos de los métodos disponibles para materia prima (e.g. soya, maíz) han sido validados, de ahí que exista la necesidad de validar métodos para la detección de OMG en alimentos procesados que es la forma en que se encuentran comúnmente estos productos en el mercado.

Hasta ahora, ha sido difícil obtener las secuencias del material modificado genéticamente aprobado y no-aprobado. Dicha información es absolutamente necesaria para el desarrollo y validación de métodos de detección. La notificación y liberación de OMG de acuerdo con la Directiva revisada (EC/220/2001) pretende anexar la información relacionada con la planta modificada genéticamente lo que podría permitir un mejor acceso a la información de secuencias de OMG aceptados y no aceptados comercialmente

Los puntos críticos que se deben considerar para minimizar las probabilidades de tener falsos positivos o negativos son: un buen análisis estadístico, el muestreo apropiado del material, el manejo adecuado de alimentos. La rapidez, la exactitud y el costo de los análisis también es influenciada por estos aspectos.

Finalmente, los laboratorios de análisis deben participar en pruebas de capacidad organizadas por organismos independientes, para regular y demostrar que sus análisis son precisos y confiables. Preferiblemente, y si es posible, los métodos de análisis deberían ser estandarizados internacionalmente para evitar disputas entre las diferentes partes (Anklam., 1999; Meyer., 1999; Jensen., 2001).

8. Nixtamalización

El maíz fue un factor clave en el desarrollo de las culturas prehispánicas en Mesoamérica. En la actualidad y principalmente en segmentos poblacionales de menos recursos económicos, los productos nixtamalizados son todavía el principal sustento para las poblaciones mesoamericanas. Indudablemente, el principal producto nixtamalizado es la tortilla.

La nixtamalización es el proceso de cocer el cereal (maíz) en presencia de cal Ca(OH)_2 , para posteriormente molerlo y formar la masa. La masa es la materia prima que sirve para la elaboración de muchos productos típicos.

8.1. Proceso tradicional para elaborar tortillas

La tecnología para la elaboración de tortillas ha sido transmitida a través de las generaciones, siguiendo prácticamente los mismos pasos y procedimientos utilizados por los aztecas. En este proceso (Figura 4), el maíz es cocinado en exceso de agua con cal para formar nixtamal (del nahuatl *nixtli* = cenizas + *tamali* = masa). El nixtamal es lavado a mano con el objetivo de remover el exceso de cal y el pericarpio que se desprendió debido al efecto hidrolizante del álcali sobre la fibra. El nixtamal limpio es posteriormente molido o triturado a mano en un metate o en molinos de piedras. Al producto resultante de esta molienda se le denomina masa y es el ingrediente básico para la formulación de un gran número de productos tales como tortilla, tostadas, totopos, etc. El más popular de estos productos es la tortilla, la cual se puede definir como un pan no leudado elaborado a partir de maíz nixtamalizado. Para la elaboración de tortillas, el pedazo de masa (25-50g) se moldea a mano o con prensas manuales en un disco de aproximadamente 15 cm de diámetro y 2 mm de grosor, el cual se transforma en tortilla cuando se hornea sobre una superficie caliente o comal a 190-260°C por 1.5-4 min (Serna, 1996).

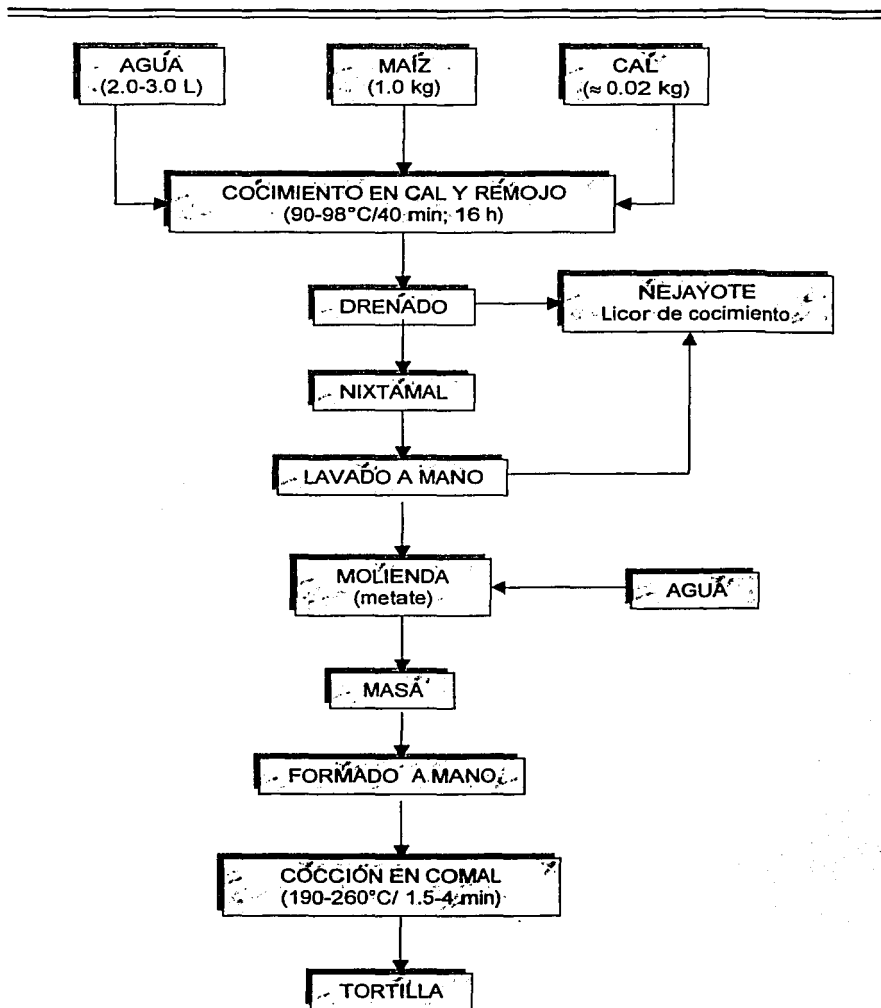


Figura 4 Elaboración de tortillas. Esquema del proceso tradicional utilizado para elaborar tortillas en Centroamérica (Serna, 1996).

8.2. Proceso industrial para elaborar productos nixtamalizados

La popularidad de las botanas nixtamalizadas prácticamente ha alcanzado todo el mundo. Básicamente existen dos tipos de botanas nixtamalizadas: Las manufacturadas a partir de masa y aquellas obtenidas a partir de tortillas (Figura 5). El proceso comienza con la nixtamalización del grano. El maíz se mezcla con tres partes de agua y 1% de cal (basado en el peso original del grano) para posteriormente ser cocido a temperaturas de 85-100°C, 40 min. Posteriormente el grano se deja reposar cuando menos 8 h. Después, el agua de cocimiento o nejayote es drenada y el nixtamal es lavado con agua limpia para remover el pericarpio y el exceso de cal. El nixtamal limpio es triturado para formar masa en un molido de piedras de lava o sintéticas (óxido de aluminio). Para la producción de fritos nixtamalizados, la masa resultante es formada en la configuración deseada por medio de un sistema de pistón hidráulico que opera como un extrusor, el cual fuerza la masa a través de un dado. Los pedazos de masa con 52-54% de humedad son freídos a temperaturas de 165-180°C por 50-70 s. Durante el freído, la masa pierde casi toda su humedad, solidifica y absorbe entre 34-38% de aceite. El producto finalmente es salado y, o saborizado, enfriado a temperatura ambiente e inmediatamente envasado en bolsas aluminizadas impermeables a la humedad y al oxígeno.

Para la producción de botanas a partir de tortillas, la masa con 54% de humedad es laminada y cortada en diferentes configuraciones (triángulos, tiras, pequeños círculos) para posteriormente circular a través de un horno a 280-300°C por 50-60 s para producir tortillas. Los pedazos de tortilla con aproximadamente 36-42% de humedad son enfriados, equilibrados y freídos. Esta última operación generalmente se realiza en freidores continuos, los cuales operan a temperaturas de 180°C y están regulados para dar un tiempo de residencia de aproximadamente un minuto. El producto final al igual que los fritos, son salados y, o saborizados inmediatamente después de ser freídos (Serna, 1996).

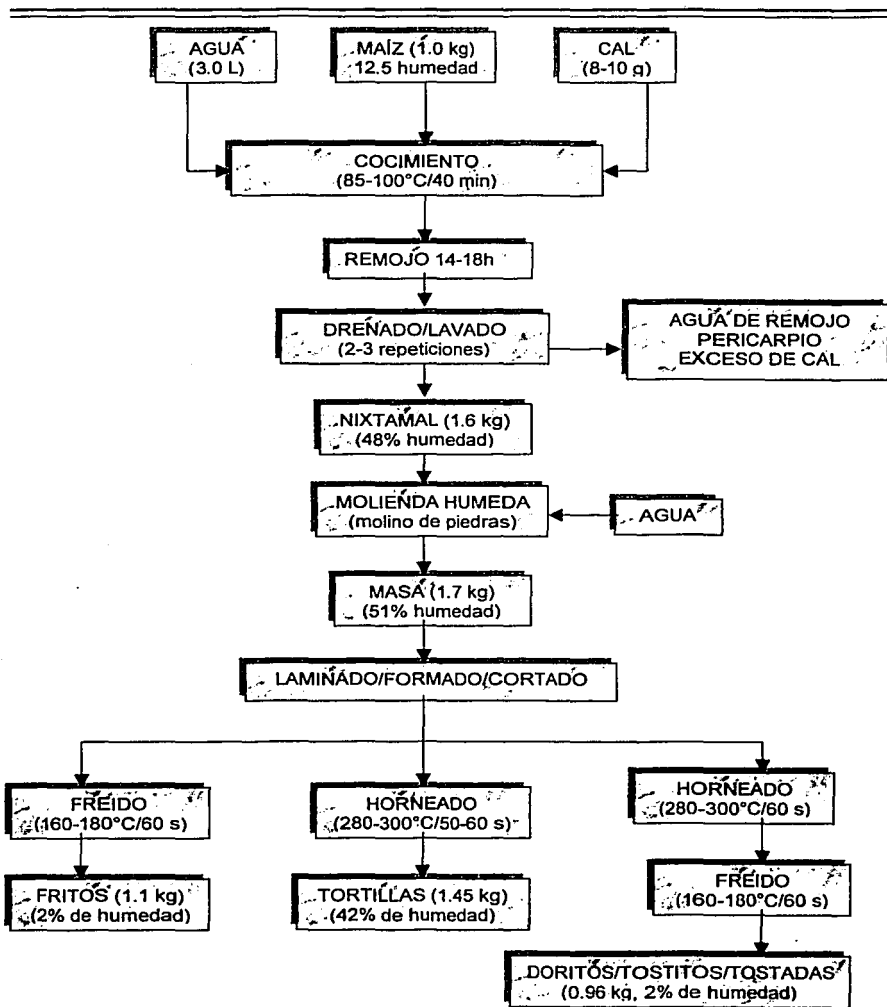


FIGURA 5 Elaboración de botanas. Esquema de la producción industrial de productos nixtamalizados (Serna, 1996).

8.3. Producción de harinas nixtamalizadas

La producción industrial de harinas nixtamalizadas es una adaptación del proceso tradicional de molienda húmeda practicado durante cientos de años en Mesoamérica .

El uso de harinas nixtamalizadas se ha incrementado notablemente debido a que tiene una vida de anaquel de hasta un año, requiere sólo agua y una mezcladora para regresar al estado de masa que puede fácilmente transformarse en tortillas o frituras. La adquisición de harina nixtamalizada ahorra en la compra de equipo necesario para cocinar y lavar el maíz, además del molino para producir la masa. Esto representa ahorro en energía, mano de obra y espacio en la planta. Las desventajas de utilizar la harina nixtamalizada es que los productos no tienen el mismo sabor que cuando se elaboran con masa fresca.

El proceso (Figura 6) empieza cuando el maíz previamente seleccionado y mezclado con otros lotes de grano (mezcla de maíz blanco y amarillo) se limpia cuidadosamente con aspiradores, mesas gravimétricas, mesas densimétricas para remover granos quebrados, dañados, piedras y contaminantes metálicos. Posteriormente, los granos seleccionados se cocinan en un reactor cerrado y continuo con aproximadamente 2.5 partes de agua y 1% de cal de acuerdo con el peso del grano. El grano reside en el reactor por aproximadamente 30-40 min a temperaturas de 70-95°C donde se cocina. Durante la etapa de cocción el grano absorbe agua terminando con una humedad de aproximadamente 36-38%. Posteriormente el nixtamal se trata con agua para remover el exceso de cal y los residuos de pericarpio. El nixtamal limpio se canaliza hacia un molino especial de martillos que muele el grano hasta formar masa. La masa se seca hasta llegar a una humedad final de 8-10% en túneles o torres de secado donde fluye aire caliente en contracorriente al flujo de las partículas de masa. Después de la operación de secado, las partículas se remuelen en un molino de martillo y se envían a un clasificador de partículas (tamices) para sacar varios flujos de producto seco nixtamalizado. Las harinas nixtamalizadas se envasan de 1-22.7 kg en paquetes de papel o papel con una cubierta interior de polietileno (Serna, 1996)

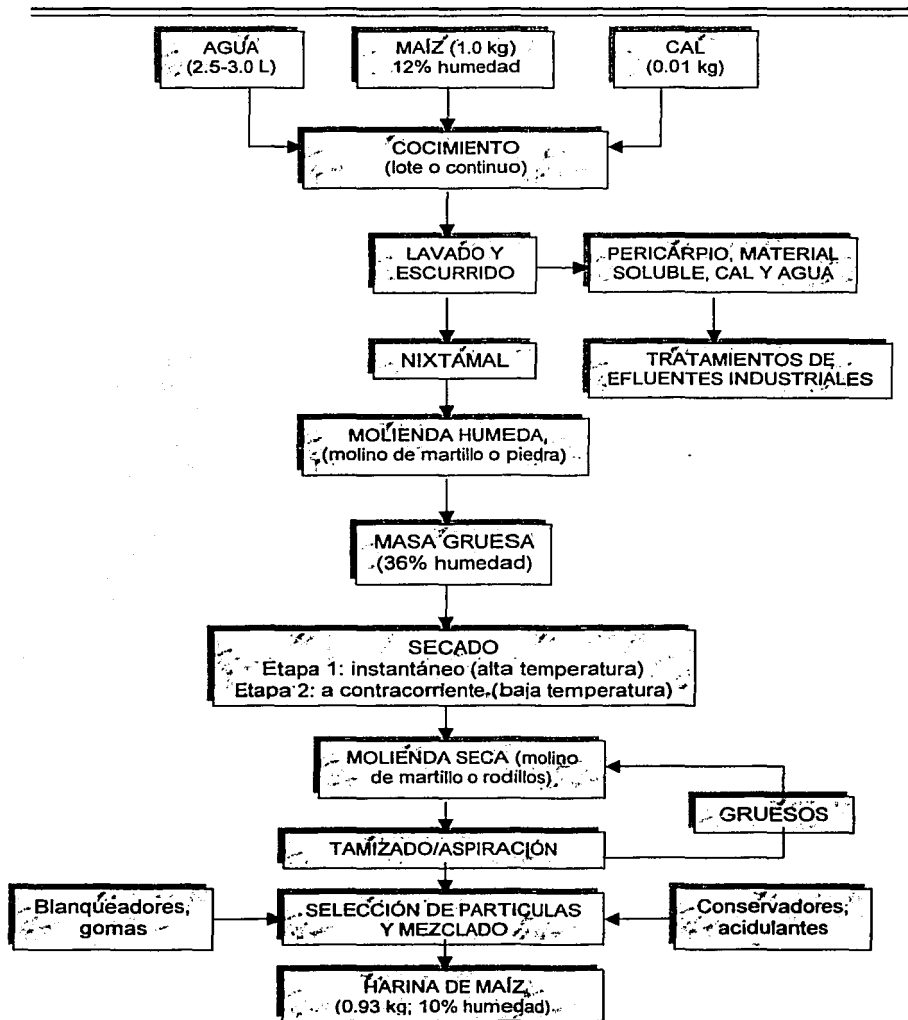


Figura 6. Elaboración de harinas nixtamalizadas. Esquema del proceso industrial de producción de harinas nixtamalizadas de maíz (Serna 1996).

8.4. Cambios en la estructura del maíz durante el cocimiento

Durante el cocimiento alcalino se modifica la estructura del endospermo del grano de maíz, los granulos de almidón se hinchan y gelatinizan, y algunas de las proteínas comienzan a hidratarse. Sin embargo, dentro del grano, algunas áreas no se cuecen totalmente. En general, el cocimiento ocurre primero en el pericarpio, germen y endospermo harinoso y después avanza gradualmente al endospermo periférico. El álcali solubiliza y debilita el pericarpio parcialmente, el cual es removido durante el lavado de los granos de maíz. El pericarpio por lo general se rompe debido a la solubilización de la hemicelulosa de la pared celular. El cocimiento apropiado de los granos de maíz produce granulos de almidón hinchados y gelatinizados, y proteínas hidratadas que producen la masa cuando son molidos. La amilosa, amilopectina y las proteínas forman un sistema continuo parecido al pegamento, que permite unir el almidón sin gelatinizar y las células de endospermo intactas formando una masa cohesiva. La compleja interacción entre amilosa, amilopectina, proteínas, granulos de almidón sin gelatinizar, y partículas de endospermo aún no se comprende (Rooney *et al.*, 1987; Arámbula *et al.*, 2001)

8.5. Efecto de la nixtamalización en el valor nutritivo

En términos generales, el cocimiento de los cereales reduce ligeramente la digestibilidad de la proteína. El cocimiento de maíz en agua alcalina tiene un efecto detrimental en la digestibilidad y en la calidad proteica, además disminuye la biodisponibilidad de la lisina (aminoácido esencial). Durante el cocimiento del maíz en presencia de cal, las albúminas, globulinas y prolaminas se insolubilizan incrementando la proporción de proteína residual o no extraíble. Estos cambios en solubilidad ocasionan que las tortillas se digieran aproximadamente 5% menos que el grano original.

El grano de maíz contiene cantidades insignificantes de calcio (18 mg/100 g). En el proceso de nixtamalización el contenido de este mineral se incrementa considerablemente a un nivel de aproximadamente 150 mg/100 g.

El proceso de cocción con cal también aumenta la biodisponibilidad de la niacina en el maíz. El maíz contiene a la niacina en forma ligada, como niacinógeno y niacitina. El maíz crudo contiene 2.6 mg de niacina/ kg, solamente 0.4 mg/ kg están en forma libre. El cocimiento alcalino rompe el enlace que liga a la niacina, aumentando la biodisponibilidad de esta vitamina (Serna, 1996).

IV. OBJETIVOS

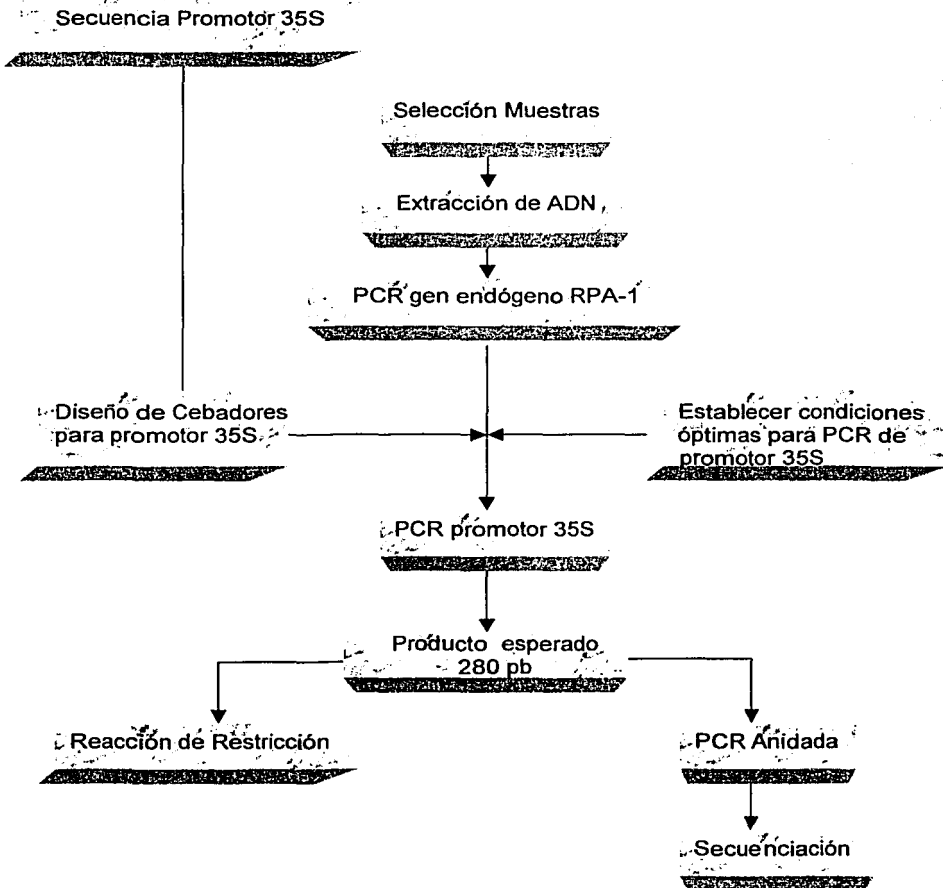
Objetivo General:

Desarrollar un método molecular para la detección del promotor 35S en granos y alimentos derivados de maíz.

Objetivos Específicos:

- Desarrollar una técnica para la extracción de ADN a partir de granos y de alimentos derivados de maíz.
- Utilizar un gen endógeno, presente en bajo número de copias en el genoma del maíz como control positivo de la reacción de PCR y así verificar la calidad del ADN extraído.
- A partir de la secuencia del promotor 35S. Diseñar cebadores apropiados para obtener productos de PCR de un tamaño detectable y que permitan obtener resultados confiables.
- Establecer las condiciones óptimas para la amplificación del promotor 35S, usando ADN extraído de distintos sustratos.
- Confirmar la identidad de la secuencia de ADN amplificada por PCR mediante un patrón de restricción, una PCR anidada y su secuenciación.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Extracción de ADN

1.1 Fundamento de la Extracción de ADN con DNAzol™ (GIBCO-BRL)

El reactivo DNAzol™ (GIBCO-BRL) es útil para el aislamiento de ADN genómico de muestras sólidas o líquidas de plantas, animales y bacterias, y está compuesto por una mezcla de guanidina-detergente, lo que permite la lisis de células y la solubilización del ADN, que posteriormente se precipita con isopropanol. El protocolo es rápido y permite la extracción del 70-100% del ADN presente en las muestras (DNAzol Reagent, Life Technologies Form #3819).

1.2 Extracción de ADN genómico de granos individuales de maíz y alimentos derivados de maíz con DNAzol™ (GIBCO-BRL)

El protocolo recomendado por el fabricante se modificó para la extracción de ADN a partir de granos y alimentos derivados de maíz:

Los pasos siguientes se siguieron para las muestras de maíz y alimentos derivados:

1. Pesar entre 40 y 50 mg de muestra.
2. Secar las muestras 24h a 50°C en caso de que sea necesario.
- Realizar únicamente en granos de maíz.

Separar el embrión del resto del grano para disminuir interferencias por carbohidratos.

Colocar el embrión en un tubo Ependorff de 1.5 mL y vaciar nitrógeno líquido dentro del tubo.

Esperar a que se evapore el nitrógeno y pulverizar el embrión con una punta de pipeta de 1 mL sellada. Se sella la apertura chica de la punta en el mechero.

- Realizar en muestras de botanas, tortillas, tostadas, etc.
 - Pulverizar con una punta de pipeta de 1 mL sellada.
-
-

3. Agregar al polvo 1 mL de DNAzol, y homogenizar agitando el tubo por inversión aproximadamente 10 veces. No es recomendable hacerlo muy vigorosamente ya que se puede dañar el ADN.
4. Centrifugar 10 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente para eliminar los restos de tejido.
5. Pasar el sobrenadante (aprox. 0.9 mL) a un tubo limpio usando una punta de pipeta de 1 mL ensanchada de la boca.
6. Agregar 0.5 mL de isopropanol (-20 °C) y mezclar por inversión.
7. Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
8. Centrifugar 10 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante por decantación.
9. Lavar con 1 mL de etanol (70%) y centrifugar (2 min/ 10,000 rpm T.A.) y eliminar el sobrenadante por decantación.
10. Dejar secar el precipitado dejando el tubo abierto por unos 15 minutos.
11. Disolver el ADN en 50 µL de NaOH 10 mM e incubar 15 min a 37°C para ayudar a disolverlo. Se observa un material blanco insoluble que esta formado principalmente por carbohidratos.
12. Centrifugar 5 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente para eliminar el material insoluble y tomar el sobrenadante con una punta de pipeta ensanchada para pasarlo a un tubo limpio.
13. Neutralizar con 1/20 del volumen de Tris 1M, pH 8.0.

Tabla 1. Reactivos empleados en la extracción

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Isopropanol	-20°C	R. A.	Mallickrodt
Etanol absoluto	70%	R. A.	J.T. Baker
NaOH	10 mM	R. A.	J.T. Baker
Tris Base	1 M, pH 8	R. A.	Research Organics
DNAzol	1 mL/muestra	B. M.	GIBCO BRL

Las muestras utilizadas se adquirieron en supermercados y mercados municipales, y se clasificaron de acuerdo al proceso de elaboración que se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de muestras

Clave	No. de muestras	Tipo de Muestra.	Procesamiento	Nación de origen
G _n	6	Grano de maíz enlatado	Cocción y esterilización comercial (115-120°C/10-15 min)	México
P _n	4	Grano de maíz cocido y congelado	Escaldado y congelación (ebullición unos minutos)	México
E _n	2	Mazorca de maíz cocido y congelada	Escaldado y congelación (ebullición unos minutos)	México y EUA
H _n	2	Harina de maíz nixtamalizada	Nixtamalización industrial, molienda y secado	México
O _n	5	Tortilla	Nixtamalización y cocción en comal (≈200°C)	México
T _n	5	Tostada	Nixtamalización y freído (≈165°C)	México
B _n	7	Botana	Nixtamalización y freído (≈165°C)	México

„ Número consecutivo con que se identifica a cada muestra

2. Concentración de extractos de ADN

La extracción se realiza a partir de 40-50 mg de muestra, el ADN obtenido se encuentra en baja concentración por lo que no es posible cuantificarlo por los métodos convencionales de tinción de ADN en gel con bromuro de etidio o espectroscopía cuyos límites de detección son 1-50 $\mu\text{g/mL}$ y 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Ausubel *et al.*, 2000).

Para verificar la presencia de ADN genómico en los extractos, se realizaron 10 extracciones y se procedió a concentrar los productos mediante el siguiente protocolo.

- 1.- Reunir los productos de las 10 extracciones (aproximadamente 400 μL) en tubo Ependorff limpio.
- 2.- Adicionar 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3 M (aproximadamente 40 μL).
- 3.- Adicionar isopropanol equivalente al volumen total (aproximadamente 440 μL).
- 4.- Mantener 1h a -70°C .
- 5.- Centrifugar 5 min a 10,000rpm
- 6.- Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Lavar con 1 mL etanol al 70%.
- 8.- Dejar secar
- 9.- Redisolver en la menor cantidad posible de agua desionizada estéril.
- 10.- Realizar un gel de agarosa al 0.8% (Ver Sección 5).

Tabla 3. Reactivos empleados en la concentración

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Isopropanol	-20°C	R. A.	Mallickrodt
Etanol absoluto	70%	R. A.	J.T. Baker
Acetato de sodio	3 M	R. A.	J.T. Baker

3. Diseño de cebadores (*primers*)

3.1 Diseño de cebadores para la amplificación de un fragmento del gen endógeno RPA-1

Los *primers* RPA-1 y RPA-2 empleados para la detección del gen endógeno RPA-1 amplifican una secuencia de 307 pb de la región 3' del gen de la proteína de replicación A-1 de maíz (Jaimes, 2001).

5' gctggtggtttcaagtccat 3' (sentido) *Primer* RPA-1 $T_m = 60$

5' atccagatccaaaagtttc 3' (antisentido) *Primer* RPA-2 $T_m = 50$

```
001 gctggtggtttcaagtccatgtattctgatagagtttttctgtctcacat
051 cacaagtgatcctgccatgggccaggaaaaggtactatcctgaatattca
101 ctgaaatatgacactgttcgtatctttaattgaagaattgcaaactctgga
151 gaagctccaattcgacttcgacttcttggttttcccttgccagcctgtttt
201 cttcagtttgtagccaccataagccacatcaagcctgaccagaacatgt
251 ggtaccgtgcttgcaagacctgcaacaagaaggtgactgaaacttttgga
301 tctggat
```

3.2 Diseño de cebadores para la amplificación de un fragmento del promotor 35S

Inicialmente se emplearon los *primers* 35S-R y 35S-F reportados en (Lipp, et al.,1999), pero no se obtuvieron los resultados esperados, no hubo amplificación, por lo que posteriormente nuestro equipo de trabajo decidió con base en la secuencia del promotor 35S diseñar un nuevo par de *primers* 35-DIR y 35-INV con los que se pretendía detectar el promotor 35S pero tampoco se tuvo éxito.

En un nuevo experimento se utilizaron ambos pares de *primers* para dar lugar a dos reacciones que se presentan posteriormente, en busca de las condiciones óptimas de amplificación.

Los *primers* 35S-R y 35S-F empleados sintetizaron a partir de las secuencias reportadas por (Lipp, et al.,1999) empleadas para la detección del promotor 35S en productos de soya y maíz.

5' gatagtgggattgtgcgctca 3' (antisentido) $T_m = 60^\circ\text{C}$ *Primer* 35S-R (Lipp, et al.,1999)

5' gctcctacaaatgccatca 3' (sentido) $T_m = 56^\circ\text{C}$ *Primer* 35S-F (Lipp, et al.,1999)

Los *primers* 35-DIR y 35-INV se diseñaron con la ayuda del programa Primer 3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/>) con las siguientes características :

5' caaagggtaatatccggaacc 3' (sentido) $T_m = 64^\circ\text{C}$ *Primer* 35-DIR

5' catcaatccacttgctttgaag 3' (antisentido) $T_m = 62^\circ\text{C}$ *Primer* 35-INV

El promotor del virus de mosaico de la coliflor (P-35S) se encuentran en las construcciones genéticas de la mayoría de las plantas MG actualmente aprobadas y que se hayan disponibles comercialmente. La secuencia del promotor 35S indispensable para el diseño adecuado de los *primers*, se obtuvo mediante la búsqueda en la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática con pagina web (<http://www.ebi.ac.uk/>) y se presenta a continuación.

35S larga

001 gaattcccatggagtc~~caaagatt~~caa~~atagagg~~acctaacagaactcgc
050 cgtaaagactggcgaa~~cagttc~~atacagag~~tctctt~~acgactcaatgac
099 aagaagaaaatc~~ttcgtc~~aacatg~~gtggag~~cacgacg~~cgtt~~gtctact
148 ccaaaaatata~~caaagata~~cag~~tctcaga~~agaccaa~~aggg~~caattgagac
197 ttttcaa~~caaagggt~~~~aatat~~~~tccggaaacc~~~~ctcctc~~ggattccattgcca
246 gctatctgtcactttattgtgaagatag~~tg~~gaaa~~agga~~aggtg~~gctcct~~
295 ~~acaaatg~~~~ccatc~~attg~~cgata~~aa~~aggaa~~aggccatc~~g~~ttgaagatg~~cctc~~
344 tgccgacag~~tgg~~tcc~~caa~~agatg~~gac~~cccc~~acc~~cacgaggag~~catc~~gtg
393 gaaaagaagac~~gttcca~~accac~~gtctt~~caa~~agca~~ag~~tg~~gat~~tgat~~gtg
442 atatctccactgac~~gta~~ag~~ggatg~~ac~~gcaca~~at~~ccc~~actat~~cctt~~cgca
491 agaccctt~~cctc~~tata~~ta~~agga~~agttc~~attt~~cattt~~ggagaggacag~~gg~~
540 ta

Los *primers* descritos están presentados sobre la secuencia 35S larga con diferente tipo de letra para su mejor visualización, aprovechando la ubicación de los mismos se realizaron las siguientes combinaciones de pares de *primers*.

Primers para detectar el promotor 35S

~~caaagggt~~~~aatat~~~~tccggaaacc~~ (sentido) $T_m = 64^\circ\text{C}$ *Primer* 35-DIR
~~gatag~~~~tg~~~~ggatt~~~~gtg~~~~cg~~~~ctca~~ (antisentido) $T_m = 60^\circ\text{C}$ *Primer* 35S-R
(Lipp, et al., 1999)
Fragmento esperado 280 pb

Primers para PCR anidada

~~cat~~~~caat~~~~cca~~~~ctt~~~~g~~~~c~~~~ttt~~~~gaag~~ (antisentido) $T_m = 62^\circ\text{C}$ *Primer* 35-INV
~~g~~~~ctc~~~~taca~~~~aat~~~~g~~~~ccat~~~~ca~~ (sentido) $T_m = 56^\circ\text{C}$ *Primer* 35S-F (Lipp, et al., 1999)
Fragmento esperado 151 pb

La ventaja de utilizarlos de esta forma es que puede obtenerse un producto de PCR interno en la secuencia del fragmento de 280 pb y de esta forma se obtiene una PCR "anidada" (Figura 7).

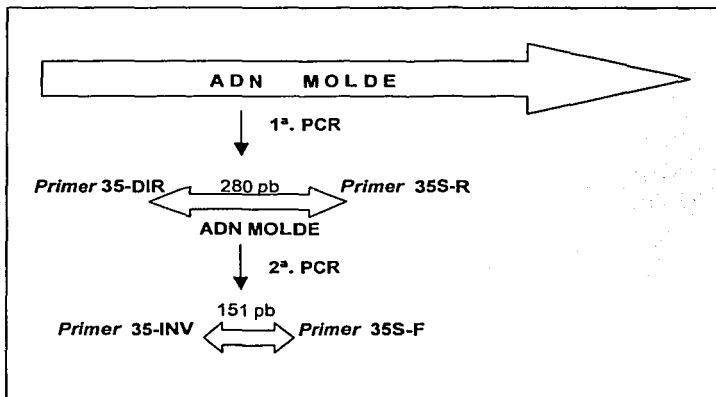


Figura 7. Esquema de una PCR anidada

En la Figura 7 se presenta de forma esquemática una PCR anidada. El ADN molde extraído de las muestras, se utiliza como templado y se somete a una 1ª. reacción de PCR con los *primers* 35-DIR y 35S-R que amplifican el fragmento deseado de 280 pb. Este producto es utilizado como ADN molde en una 2ª. reacción de PCR en la que se amplifica un fragmento interno de 151 pb con los *primers* 35-INV y 35S-F.

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.1 PCR PARA GEN ENDOGENO RPA-1

La reacción se llevó a cabo en un termociclador marca Perkin Elmer, Modelo 9700 con el siguiente programa de temperatura:

3 min. a 94°C	1 ciclo	
40 s a 94°C 40 s a 58°C 40 s a 72°C	} 35 ciclos	
7 min. a 72°C		1 ciclo

(tiempo total aproximado 2h)

Tabla 4. Reactivos empleados PCR gen endógeno.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	1X	B. M.	ROCHE
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	B. M.	ROCHE
dNTP's	10 mM	0.2 mM	B. M.	GIBCO BRL
Primer RPA-1	10 µM	0.5 µM	B. M.	GIBCO BRL
Primer RPA-2	10 µM	0.5 µM	B. M.	GIBCO BRL
Taq Pol	5 U/µL	1.0 U/reacción	B. M.	GIBCO BRL
ADN molde	El volumen	determinado	experimentalmente	como el óptimo
H ₂ O	c.b.p.	15 µL		

*El volumen determinado experimentalmente como el óptimo se presenta en la Tabla 13

4.2 PCR PARA PROMOTOR 35S

La búsqueda de condiciones óptimas de reacción se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación en el intervalo (58-60°C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND) de acuerdo al siguiente programa.

3 min. a 94°C	1 ciclo	
40 s a 94°C 40 s a 60, 59, 58 °C 40 s a 72°C	} 35 ciclos	
7 min. a 72°C		1 ciclo

(tiempo total aproximado 2h)

Tabla 5. Reactivos empleados en la PCR promotor 35S.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	1X	B. M.	GIBCO BRL
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	B. M.	GIBCO BRL
DNTP's	2.5 mM	0.2 mM	B. M.	GIBCO BRL
Primer 35-DIR	20 µM	0.5 µM	B. M.	GIBCO BRL
Primer 35S-R	20 µM	0.5 µM	B. M.	GIBCO BRL
Taq Pol	5 U/µL	1.0 U/reacción	B. M.	GIBCO BRL
ADN molde	El volumen	determinado	experimentalmente	como el óptimo
H ₂ O	c.b.p. 15 o	50 µL según	sea el caso	

*El volumen determinado experimentalmente como el óptimo se presenta en la Tabla 13

4.3 PCR ANIDADA

La búsqueda de condiciones óptimas de reacción, se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación en el intervalo (56-54°C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND) de acuerdo al siguiente programa.

3 min. a 94°C	1 ciclo
40 s a 94°C 40 s a 56, 55, 54 °C 40 s a 72°C	35 ciclos
7 min. a 72°C	1 ciclo

(tiempo total aproximado 2h)

Tabla 6. Reactivos empleados en la PCR anidada

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	1X	B. M.	GIBCO BRL
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	B. M.	GIBCO BRL
DNTP's	2.5 mM	0.2 mM	B. M.	GIBCO BRL
Primer 35-INV	20 µM	0.5 µM	B. M.	GIBCO BRL
Primer 35S-F	20 µM	0.5 µM	B. M.	GIBCO BRL
Taq Pol	5 U/µL	1.0 U/reacción	B. M.	GIBCO BRL
ADN molde	*El volumen	determinado	experimentalmente	como el óptimo
H ₂ O	c.b.p. 50 µL			

*El volumen determinado experimentalmente como el óptimo se presenta en la Tabla 13

5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

- 1.- Fundir agarosa al 0.8% ó 2% según sea el caso, utilizando TBE 1X (8.9 mM Tris, 8.9 mM ácido bórico, 0.2 mM EDTA a pH 8.3) como disolvente y amortiguador de corrida.
- 2.- A la agarosa fundida (45-55°C) adicionar bromuro de etidio (10 mg/mL) suficiente para concentración final de 1 µg/mL.
- 3.- Voltaje de la fuente de poder a 80-100 V y tiempo de corrida 0.45-1h
- 4.- Visualización utilizando un transiluminador de luz UV.

Tabla 7. Reactivos empleados en electroforesis

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Agarosa	2% y 1%	B. M.	Research Organics
Bromuro de Etidio	1 µg/mL	B. M.	ROCHE
TBE 10X	1X	B. M.	BIO-RAD
Marcador molecular DNA XIII	3 µL	B. M.	ROCHE

TBE 10X Amortiguador contiene 89 mM Tris, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA a pH 8.

6. Extracción de ADN de geles de agarosa

La extracción de ADN de geles de agarosa se realizó con el propósito de eliminar los restos de reactivos presentes en la reacción (agarosa, sales, enzima, etc.) y evitar interferencias al realizar la identificación mediante la digestión enzimática y la PCR Anidada, el fragmento de 280 pb producto de la PCR Promotor 35S se purificó mediante el método QIAQUICK (QIAGEN INC).

6.1 Fundamento

El sistema QIAquick permite la adsorción selectiva del ADN a través de una membrana de sílica gel contenida en una columna .

El amortiguador QG (tiocianato de guanidina) disuelve el fragmento de agarosa y provee las condiciones apropiadas para la unión del ADN a la membrana de sílica contenida en la columna, también contiene un indicador de pH que permite determinar el pH óptimo para la adsorción del ADN. La unión de ADN requiere $\text{pH} \leq 7.5$ en este rango el indicador de pH del amortiguador QG tiene color amarillo.

Durante la adsorción, las impurezas como sales, agarosa y bromuro de etidio, son eliminadas ya que fluyen a través de la columna pero no son adsorbidas por la membrana de sílica. Posteriormente las sales restantes son eliminadas mediante un lavado con amortiguador PE (etanol). Los residuos del amortiguador PE son removidos mediante centrifugación.

La eficiencia en la elución depende de la concentración de sales y del pH del amortiguador de elución. Contrario a la adsorción, la elución es más eficiente a baja concentración de sales y en condiciones básicas. El ADN es eluido con 50 o 30 μL de amortiguador EB (10 mM Tris.Cl, pH 8.5) que provee las condiciones apropiadas para una elución eficiente ([http:// www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

6.2 Método QIAQUICK (QIAGEN INC.)

- 1.- Correr un gel con las muestras que se deseen purificar de acuerdo a la técnica anterior.
- 2.- Pesar tubos Ependorff vacíos y registrar peso por separado.
- 3.- Seleccionar la(s) banda(s) de interés y cortarla(s)
- 4.- Colocar cada banda en un tubo Ependorff y pesar nuevamente. Al valor resultante restar el peso inicial del tubo, el resultado corresponde al peso del fragmento de agarosa con ADN.
- 5.- Adicionar el volumen equivalente a 3 veces el peso del fragmento de agarosa de amortiguador QG.
- 6.- Incubar a 50°C por aproximadamente 10 min hasta que la agarosa se disuelva
- 7.- Adicionar el volumen de isopropanol equivalente al peso de la banda de agarosa.
- 8.- Depositar el volumen del tubo en una columna etiquetada.
- 9.- Centrifugar por 1min a 13,000 rpm (eliminar el filtrado).
- 10.- Adicionar 0.75 mL de amortiguador PE y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm (descartar el filtrado).
- 11.- Centrifugar por 1 min más a 13,000 rpm.
- 12.- Colocar la columna (membrana de silica gel) en un tubo Ependorff de 1.5 mL limpio y adicionar 30 µL de amortiguador EB en el centro de la membrana
- 13.- Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm.
- 14.- Almacenar a -20°C.

Tabla 8. Reactivos empleados en la extracción de ADN de geles de agarosa

REACTIVO	COND. USO	GRADO	DESCRIPCIÓN	MARCA
Isopropanol	-20°C	R. A.		Mallickrodt
Etanol absoluto	100%	R. A.		J.T. Baker
Amortiguador QG	T. A.	B. M.	Contiene Tiocianato de guanidina	QIAGEN
Amortiguador PE	T. A.	B. M.	Etanol	QIAGEN
Amortiguador EB	T. A.	B. M.	Tris-Cl, pH 8.5	QIAGEN

7. Reacción de restricción

Con el propósito de corroborar indirectamente la identidad del fragmento de 280 pb obtenido con la PCR Promotor 35S se realizó la digestión enzimática del mismo y para lograrlo se procedió de la forma siguiente:

La secuencia del fragmento de 280 pb correspondiente al promotor 35S se introdujo a la pagina web <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> en la que se identificaron los posibles sitios de corte con enzimas de restricción siguientes:

PATRON DE RESTRICCIÓN DE UN FRAGMENTO DE 280 pb DEL PROMOTOR 35S

BCM Search Launcher query sequence 280 base pairs

Bsp13I
BspEI
MroI BsaWI BseRI BsrDI
caaagggtaatatccggaaacctcctcggtatccattgccagctatctgtcactttatgtgaagatagtgga base pairs
gttcccaattataggcctttggaggagcctaaggtaacgggtgalagacagtgaaataacactctatcacctt 1 to 75
Kpn2I BseAI
BsiMI
AccII

BsrDI PshAI
aaggaaggtggctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaggccatcgttgaagatgcctctgccgacagt base pairs
ttcctccaccggagatgittacggtagtaacgctatttcttccggtagcaactctacggagacggctgtca 76 to 150

Bbv16II
BseRI BbsI Bbv16II
BsiI Asp700I BbsI
ggtcccaaagatggacccccacccagaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaa base pairs
ccagggtttctacctgggggtggtgctcctcgtagcacctttttcttgcgaaggttggtgcagaagtttcgtt 151 to 225
BssSI XmnI BpiI
BpiI BpuAI
BpuAI

Eco32I
gtggattgatgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatc base pairs
cacctaactacactatagaggtgactgcattcccactactcgtgtaggggtgatag 226 to 280
EcoRV

Table by Enzyme Name
(Tabla por nombre de la enzima)

Enzyme name Nombre de la enzima	No. Positions cuts of sites No. cortes y posición	Recognition sequence Secuencia que reconoce
AccIII	1 13	t/ccgga
Asp700I	1 200	gaann/nnttc
BbsI	2 201 218	gaagac
Bbv16II	2 201 218	gaagac
BpI	2 201 218	gaagac
BpuAI	2 201 218	gaagac
BsaWI	1 13	w/ccggw
BseAI	1 13	t/ccgga
BseRI	2 27 182	gaggag
BsiI	1 179	ctcgtg
BsiMI	1 13	t/ccgga
Bsp13I	1 13	t/ccgga
BspEI	1 13	t/ccgga
BsrDI	2 39 108	gcaatg
BssSI	1 179	ctcgtg
Eco32I	1 240	gat/atc
EcoRV	1 240	gat/atc
Kpn2I	1 13	t/ccgga
MroI	1 13	t/ccgga
PshAI	1 149	gacnn/nngtc
XmnI	1 200	gaann/nnttc

Del listado se eligió al enzima *Asp700* que escinde en la secuencia **gaann/nnttc** y permite obtener dos fragmentos uno de 200 pb y otro de 80 pb.

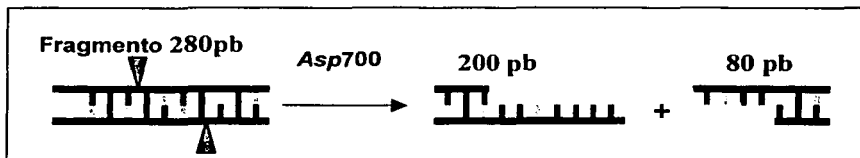


Figura 8. Reacción de restricción. La secuencia de nucleótidos **gaann/nnttc** es reconocida y cortada por la enzima *Asp700*

-
- 1.- Partir de muestras purificadas.
 - 2.- Determinar el volumen total de la reacción tomando en cuenta el volumen de ADN a cortar, el volumen de la enzima, que no debe exceder el 10% del volumen total y el volumen del amortiguador, si es necesario se adiciona agua desionizada estéril.
 - 3.- Descongelar las muestras y el amortiguador en hielo, la enzima debe permanecer en todo momento a -20°C .
 - 4.- Depositar en un tubo Ependorff limpio el agua necesaria para ajustar la reacción.
 - 5.- Adicionar el volumen necesario de amortiguador para concentración final 1X
 - 6.- Adicionar ADN
 - 7.- La enzima se adiciona al final 1 U por reacción.
 - 8.- Incubar por 4-6 h a 37°C .

Tabla 9. Reactivos empleados en la reacción de restricción

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Enzima <i>Asp700</i>	-20°C	B.M.	ROCHE
Amortiguador 10X	T. A.	B.M.	ROCHE
Agua	Desionizada	Estéril	

8. Secuenciación

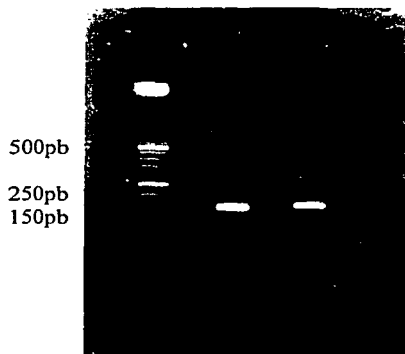
Con la finalidad de corroborar directamente la identidad del producto de la PCR anidada fragmento de 151 pb, se llevó a cabo la secuenciación en un equipo ABI PRISM Modelo 310 de Applied Biosystems en el IFICE (Instituto de Fisiología Celular) en el laboratorio 202-Sur a cargo de la Dra. Laura Ongay.

Tabla 10. Solicitud de secuenciación de productos de PCR

Muestra	Concentración de ADN	Volumen μL
G ₄ Grano de maíz enlatado	50 ng/ μL	15
HT Harina de maíz certificada Bt 176 Fluka	50 ng/ μL	15
Primers 35S F	20 pm/ μL	20

Secuencia de primers 35S F: GCT CCT ACA AAT GCC ATC A

MM G₄ HT



MM: Marcador de tamaño de ADN XIII Roche
(Escala de 50pb)

G₄ Grano de maíz enlatado

HT Harina de maíz certificada Bt176 Fluka

Tabla 11. Equipo empleado en las diferentes metodologías

EQUIPO	MARCA	MODELO	ORIGEN
Cámara de Electroforesis	GIBCO-BRL	58	Gaithersburg MD USA
Cámara Fotográfica	POLAROID	DS34	Inglaterra
Documentador de imágenes	BIO-RAD	Fluor-S	CA USA
Fuente de poder	BIO-RAD	1000/500	Richmond CA USA
Microcentrifuga	EPPENDORF	5415C	Alemania
Termoblock	THERMOLYNE	17600	Dubuque IA USA
Termociclador	PERKIN ELMER	9700	Norwalk CT USA
Termociclador	TECHGENE	FTGENE2D	Inglaterra
Transiluminador	COLE-PARMER	9814	Francia

VII. RESULTADOS

1. Análisis de ADN genómico

El análisis de ADN genómico de granos individuales de maíz y alimentos derivados de maíz extraídos con DNAzol™ (GIBCO-BRL) se llevó a cabo mediante electroforesis y el resultado se presenta en la Figura 9.

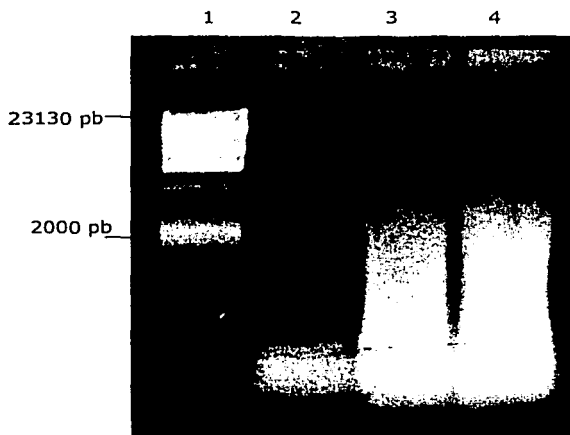


Figura 9. Análisis de ADN en un gel de agarosa (0.8%). ADN λ -HindIII (1), ADN Eje embrionario de maíz (2) ADN de tortilla de maíz (3 y 4).

El ADN extraído de productos de maíz nixtamalizados se encuentra visiblemente degradado en comparación con el ADN del embrión de maíz que se observa como una banda única parte superior del gel. También se observan bandas difusas de ARN en la parte inferior del gel (Figura 9). La siguiente etapa fue comprobar que los fragmentos generados por el proceso de nixtamalización y cocción aún se pueden utilizar como molde para la amplificación de una secuencia blanco por PCR.

Durante la extracción dependiendo del tipo de muestra que se maneje, pueden presentarse operaciones críticas y problemas que inciden directamente en la calidad del extracto final. En la Tabla 12, se presentan los problemas mas frecuentes y las soluciones recomendadas para las muestras analizadas.

Tabla 12. Problemas frecuentes y recomendaciones

PRODUCTO	PROBLEMA	RECOMENDACIÓN
Grano de maíz enlatado Grano de maíz cocido y congelado Mazorca de maíz cocida y congelada	Obtención del germen	Separar cuidadosamente el germen del grano y no reutilizar navajas para evitar contaminación.
Harina de maíz nixtamalizada	Hay gelificación durante la extracción.	Recuperar la mayor cantidad de DNAzol teniendo cuidado de no arrastrar el gel.
Tortilla	Presencia de un precipitado abundante de carbohidratos.	Recuperar la mayor cantidad de DNAzol teniendo cuidado de no llevarse el precipitado.
Tostada	Presencia de un precipitado abundante de carbohidratos. Se observa la presencia de grasa durante la extracción	Recuperar la mayor cantidad de DNAzol teniendo cuidado de no llevarse el precipitado ni la grasa.
Botana	Lavar las muestras para eliminar condimentos. Se observa la presencia de grasa durante la extracción	Recuperar únicamente el DNAzol que no contenga grasa y limpiar la punta antes de verter en un tubo limpio.

2. Amplificación de Gen Endógeno RPA-1

El gen que codifica para la proteína de replicación A-1 (RPA-1) presente en el genoma de maíz se empleó como control interno de la reacción debido a que se encuentra en bajo número de copias lo que es de gran utilidad para la amplificación ya que se espera que el promotor 35S también se encuentre en bajo número de copias.

En la reacción de amplificación del gen endógeno RPA-1, se utilizó como control positivo el maíz criollo Chalqueño, para verificar que el medio de reacción no tenía inhibidores.

La amplificación de este gen se llevó a cabo mediante PCR, se emplearon los *primers* RPA-1 y RPA-2 que flanquean un fragmento de 307 pb. La reacción se diseñó según las condiciones mencionadas en la Tabla 4.

La concentración y la integridad del ADN molde es un factor determinante para que se lleve a cabo la amplificación.

El ADN de los extractos de productos nixtamalizados, a pesar de encontrarse degradado, puede utilizarse como molde para llevar a cabo la amplificación. Es probable que el templado de ADN sea limitante pues una mayor concentración de extracto Figura 10(carril 2 y 3, carril 5 y 6) rinde una menor cantidad del producto amplificado de aproximadamente 300 pb. Esto puede deberse a que en ciertos productos (en este caso tostada y botana) al dosificar una mayor concentración de ADN molde se aumenta al mismo tiempo la concentración de impurezas o posibles inhibidores de la reacción.

El análisis electroforético de los productos de la amplificación del fragmento del gen endógeno por PCR se presenta en las Figuras 10, 11 y 12.

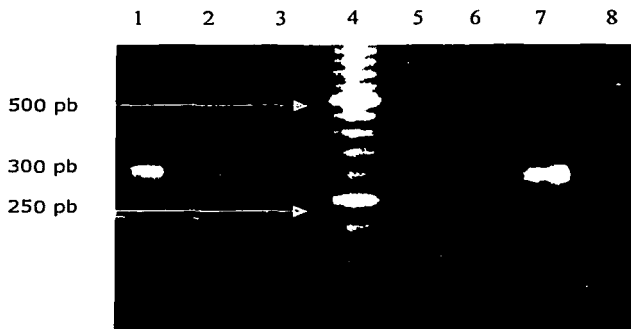


Figura 10. Análisis de los productos de amplificación de gen endógeno RPA-1 en un gel de agarosa (2%):Tortilla 5 μ L (1), Tostada industrializada 5 μ L (2) y 2 μ L (3), Botana 5 μ L (5) y 2 μ L (6), Eje embrionario de maíz criollo (7). Marcador de peso molecular 50 pb (4) y control negativo sin ADN (8). Se cargaron 7 μ L de cada

Se debe tomar en cuenta que las muestras analizadas provienen de alimentos comerciales y que han estado sometidos a diferentes procesos, por lo que la concentración e integridad de los extractos obtenidos no es constante, el ADN se encuentra fragmentado, en pequeñas cantidades y no se puede cuantificar por los métodos comunes. De ahí que fue necesario determinar a cada muestra el volumen de extracto óptimo para llevar a cabo la amplificación por PCR (Tabla13).

En las Figuras 11 y 12 se presentan ejemplos representativos de las muestras que se emplearon en este estudio. En estas reacciones se utilizó 1 μ L de extracto de cada muestra y como se puede observar en la fotografía esta cantidad fue suficiente para llevar a cabo en mayor o menor cantidad la amplificación de un fragmento de aproximadamente 300 pb esperado lo que ratifica al gen RPA-1 como un buen control de la reacción de PCR.

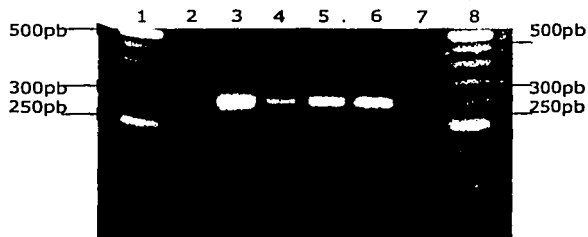


Figura 11. Análisis de los productos de amplificación de gen endógeno RPA-1 en un gel de agarosa (2%): En los extremos carriles (1 y 8) Marcador de peso molecular 50 pb, Grano congelado (2), Grano cocido enlatado (3), Mazorca congelada (4), Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (5), Eje embrionario de maíz criollo control positivo (6), Control negativo sin ADN (7). Se cargaron 7 μ L de cada muestra.

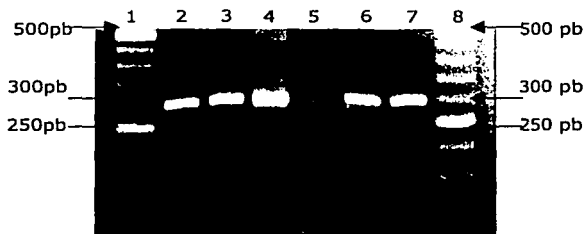


Figura 12. Análisis de los productos de amplificación del gen endógeno RPA-1 en un gel de agarosa (2%): En los extremos carriles (1 y 8) Marcador de peso molecular 50 pb, Harina nixtamalizada (2), Tortilla (3), Tostada (4), Botana (5), Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (6), Eje embrionario de maíz criollo control positivo (7). Se cargaron 7 μ L de cada muestra.

Todas las muestras analizadas presentaron el fragmento 300 pb correspondiente al gen RPA-1 (control interno). Esto indica que por el proceso de extracción con DNAzo1™ (GIBCO-BRL) se obtienen ADN en cantidad y calidad suficiente para lograr la amplificación del fragmento deseado.

3. Amplificación y Análisis de restricción de Promotor 35S

El promotor 35S (virus del mosaico de la coliflor) es un elemento usual en las construcciones genéticas (insertos), empleadas para modificar la composición genética de organismos vivos, e.g. maíz, que se encuentran disponibles en el mercado internacional. Las muestras en las que se obtenga el producto de amplificación esperado (280 pb) es probable que contengan ADN foráneo correspondiente al promotor 35S.

La amplificación del promotor 35S se llevó a cabo mediante PCR, se emplearon los *primers* 35-DIR y 35S-R que flanquean un fragmento de 280 pb. Las reacciones de prueba se diseñaron para un volumen de 15 μ L, mientras que las reacciones definitivas se escalaron a 50 μ L en las que se utilizó como templado el volumen restante (aproximadamente 8 μ L) de las reacciones de prueba para realizar la amplificación según las condiciones mencionadas en la Tabla 5.

La búsqueda de condiciones óptimas de amplificación se inició según las condiciones mencionadas en la Tabla 5 variando únicamente la temperatura de hibridación entre 60 y 58°C, empleando ADN genómico como molde. Para esta reacción se obtuvo un fragmento único de 280 pb a T_h de 59°C obteniéndose el siguiente programa como el más adecuado para los *primers* 35-DIR y 35S-R.

5' -caaagggtaatatccggaaacc-3' (sentido) $T_m = 64^\circ\text{C}$ *Primer* 35-DIR
5' -gatagtgggattgtgcgtca-3' (antisentido) $T_m = 60^\circ\text{C}$ *Primer* 35S-R
(Lipp, et al., 1999)

fragmento esperado 280 pb

3 min. a 94°C

40 s a 94°C }
40 s a 59°C } 35 ciclos
40 s a 72°C }

7 min. a 72°C

(tiempo total aproximado 2h)

El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del promotor 35S se presentan en la Figura 13.



Figura 13. Análisis de productos de amplificación del Promotor 35S utilizando en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50 pb. (1), Control negativo sin ADN (2), Eje embrionario de maíz criollo control negativo (3), Mazorca congelada (4), Grano cocido enlatado (5, 6, 7), Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (8). Se cargaron 7 μ L de cada muestra.

Del total de muestras analizadas, (10) presentaron el fragmento de 280 pb esperado dentro de las que se encuentran dos tostadas, cuatro de granos enlatados, una de mazorca congelada y tres de botanas, al igual que el control certificado harina de maíz Bt176 Fluka. En la Figura 13, se muestran ejemplos representativos de estos productos.

Tabla 13. Tabla de resultados y volumen óptimo de extracto para cada muestra

CLAVE	PRODUCTO	RESULTADO Gen Endógeno	VOL. EXTRACTO	RESULTADO Promotor 35S
T ₁	Tostada Ondulada	+	2µL	----
T ₂	Tostada Ondulada	++	1µL	----
T ₃	Tostada Ondulada	+	1µL	----
T ₄	Tostada	+++	1µL	+
T ₅	Tostada	+++	1µL	+
O ₁	Tortilla (comercial)	+++	1µL	----
O ₂	Tortilla (comercial)	+++	5µL	----
O ₃	Tortilla (azul)	+++	1µL	----
O ₄	Tortilla (mano)	+++	Dil.1:10	----
O ₅	Tortilla (tortillería)	++	Dil 1:5	----
G ₁	Granos enlatados	++	1µL	----
G ₂	Granos enlatados	++	1µL	+
G ₄	Granos enlatados	+++	1µL	+++
G ₅	Granos enlatados	+++	1µL	++
G ₆	Granos enlatados	+++	1µL	+
H ₁	Harina nixtamalizada	+++	Dil 1:10	----
H ₂	Harina nixtamalizada	+++	1µL	----
E ₁	Elote congelado	++	1µL	----
E ₂	Elote congelado	+++	1µL	+++
P ₁	Grano congelado	++	1µL	----
P ₂	Grano congelado	+++	1µL	----
P ₃	Grano congelado	++	1µL	----
P ₄	Grano congelado	+++	1µL	----
B ₁	Botana	++	1µL	----
B ₂	Botana	++	1µL	----
B ₃	Botana	+++	1µL	----
B ₄	Botana	+++	2.5µL	+
B ₅	Botana	+	5µL	----
B ₆	Botana	++	1µL	++
B ₇	Botana	++	1µL	+

Amplificación

+++ Muy bueno
++ Bueno
+ Regular
---- Sin amplificación

3.1. Pruebas Confirmativas

Los productos de amplificación del promotor 35S se purificaron por el Método QIAQUICK (QIAGEN INC.) y se sometieron a la acción del enzima *Asp700* durante 4-6h a 37°C según el protocolo descrito en metodología.

La enzima *Asp700* utilizada en la reacción de restricción escinde en la secuencia *gaan/nnttc*, generando dos fragmentos, uno de 200 pb y otro de 80 pb.

El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del promotor 35S y de los productos de restricción se presentan en las Figuras 14 y 15.

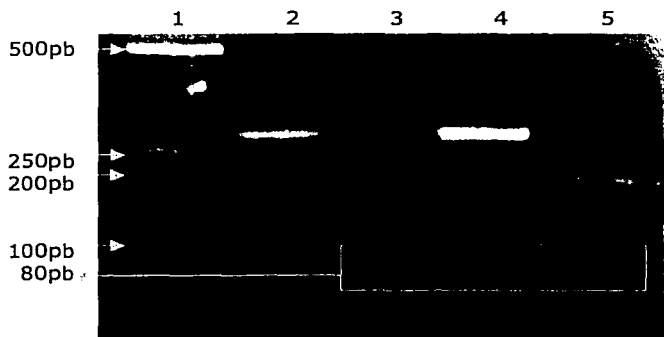


Figura 14. Productos de amplificación de Promotor 35S y efecto de la enzima de restricción *ASP700* en estos productos. Análisis en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50 pb (1) Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (2 y 3), Grano de maíz enlatado (4 y 5). Se cargaron 7 μ L de cada muestra.

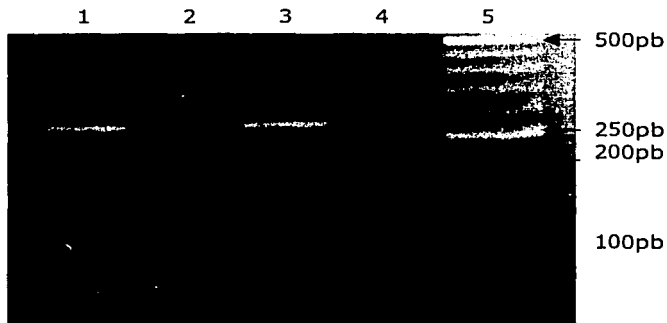


Figura 15. Productos de amplificación de Promotor 35S y efecto de la enzima de restricción *Asp700* en estos productos. Análisis en un gel de agarosa (2%): Tostada (1 y 2), Botana (3 y 4), Marcador de peso molecular 50 pb (5). Se cargaron 7 μ L de cada muestra.

En las Figuras 14 y 15 se pueden observar tanto los productos de amplificación sin cortar (carriles 2 y 4) como los productos de restricción (carriles 3 y 5) que fueron escindidos por el enzima lo que corrobora de forma indirecta la identidad del ADN amplificado.

El grado de procesamiento afecta de forma negativa la amplificación del fragmento deseado (280 pb) como se puede observar en las Figuras 14 y 15 ya que al aumentar el grado de procesamiento de la muestra hay menor amplificación, no obstante puede decirse que el ADN de los extractos a pesar de encontrarse degradado, puede utilizarse como molde para llevar a cabo la amplificación de un fragmento de 280 pb.

En este último gel Figura 15 es difícil visualizar la banda de 80 pb. Por lo anterior se decidió, también realizar otra prueba indirecta para corroborar la identidad del fragmento de 280 pb y realizar una PCR anidada, amplificar dentro de la secuencia del fragmento de 280 pb un segmento de 151 pb.

4. PCR Anidada.

La amplificación de un segmento interno de 151 pb, basada en la secuencia del fragmento de 280 pb, es otra forma de identificar indirectamente la secuencia del promotor 35S.

La búsqueda de condiciones óptimas de amplificación se inició según las condiciones mencionadas en la Tabla 6 variando únicamente la temperatura de hibridación entre 56 y 54°C, empleando ADN genómico como molde. Para esta reacción se obtuvo un fragmento único de aproximadamente 150 pb a T_h de 54°C obteniéndose el siguiente programa como el más adecuado para los *primers* 35-INV y 35S-F.

5' - catcaatccacttgctttgaag -3' (antisentido) $T_m=62^\circ\text{C}$ *Primer* 35-INV
5' - gctcotacaaatgccatca -3' (sentido) $T_m=56^\circ\text{C}$ *Primer* 35S-F (Lipp et al., 1999)

Fragmento esperado 151pb

3 min. a 94°C	1 ciclo
40 s a 94°C	} 35 ciclos
40 s a 54°C	
40 s a 72°C	
7 min. a 72°C	1 ciclo

(tiempo total aproximado 2h)

El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR se presentan en la Figura 16.

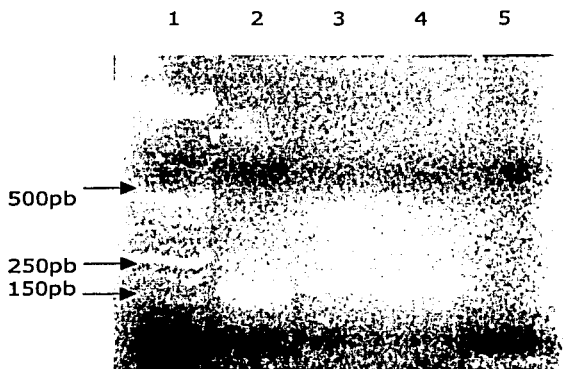


Figura 16. Análisis de los productos de amplificación anidada en un gel de agarosa (2%). Marcador de peso molecular 50pb (1), Mazorca congelada (2,3,4), Eje embrionario de maíz criollo control negativo (5). Se cargaron 7 μ L de cada muestra

La amplificación anidada se llevó a cabo mediante PCR, empleando los *primers* 35-INV y 35S-F que flanquean un fragmento de 151 pb. La reacción se diseñó según las condiciones mencionadas en la Tabla 6. Se realizó sobre el ADN del fragmento de 280 pb purificado, a partir de grano de: maíz enlatado (2 μ L) y del control certificado de Harina de maíz Bt176 Fluka (6 μ L).

El análisis de los productos obtenidos después de la amplificación por PCR se presenta en la Figura 17.

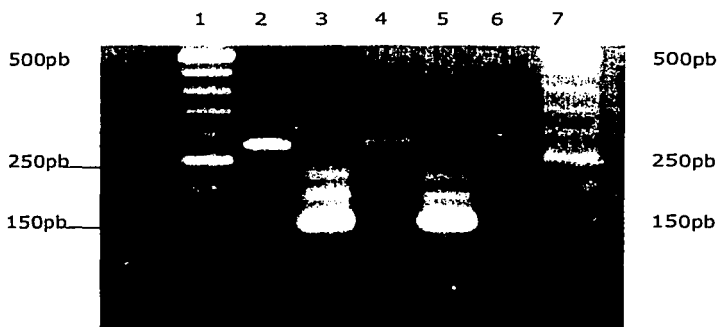


Figura 17. Análisis de los productos de amplificación de Promotor 35S y productos de amplificación anidada en un gel de agarosa (2%). Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (2 y 3), Grano de maíz enlatado (4 y 5), Control negativo sin ADN (6) y en los extremos carriles (1 y 7) Marcador de peso molecular 50 pb. Se cargaron 7 μ L de cada muestra

Como se puede observar en la Figura 17, se obtuvo el fragmento de 151 pb esperado pero también se obtienen bandas inespecíficas (carriles 3 y 5) muy probablemente debido a que se realizaron 35 ciclos de reacción lo que pudo ser excesivo tomando en cuenta que se partió de un fragmento de 280 pb ya purificado y no de ADN genómico. Sin embargo, haber obtenido el fragmento de 151 pb aumenta la probabilidad de que la secuencia amplificada coincida con la secuencia del promotor 35S publicada en bases de datos. Es necesario entonces buscar una confirmación directa de la identidad de los productos.

5. Secuenciación

Con la finalidad de corroborar directamente la identidad de los productos de la PCR anidada (fragmentos de 151 pb), se purificaron por el Método QIAQUICK (QIAGEN INC.) y de acuerdo con las especificaciones en la Tabla 10 se secuenciaron las muestras grano de maíz enlatado y control certificado de Harina de maíz Bt176 Fluka presentadas en la Figura 18.

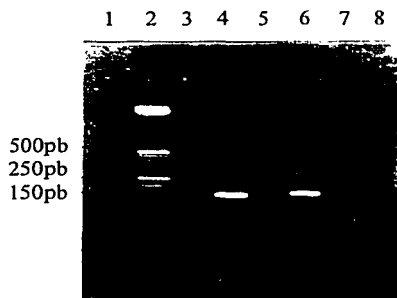


Figura 18. Productos de amplificación Anidada (purificados). Gel de agarosa (2%). Marcador de peso molecular 50 pb (2), Grano de maíz enlatado (4) y Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (6). Se cargaron 7 μ L de cada muestra.

Aquí se puede observar como coinciden en pares de bases, el producto de la muestra y el control, ya sin bandas inespecíficas después de la purificación. El resultado de la secuenciación de dichas muestras se presenta en la Figura 19.

5.1. Alineación de secuencia

35S1ar gctcctacaaatgccatcattgcgataaaaggaaaggccatcgttgaagat 50
Grano gctcctacaaatgccatcattgcg-taaaggaaaggccatcgttgaagat 49
Ctrl. gctcctacaaatgccatcattgcg-taaaggaaaggccatcgttgaagat 49

35S1ar gcctctgccgacagtggtcccaagatggacccccacccacgaggagcat 100
Grano gcctctgccgacagtggtcccaagatggacccccacccacgaggagcat 99
Ctrl. gcctctgccgacagtggtcccaagatggacccccacccacgaggagcat 99

35S1ar cgtggaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat 150
Grano cgtggaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat 149
Ctrl. cgtggaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat 149

35S1ar a----- 151
Grano a----- 150
Ctrl. a----- 150

Figura 20. Alineamiento de la secuenciación del promotor 35S (35S1ar), el resultado de la secuenciación de las muestras de grano de maíz enlatado (Grano) y control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (Ctrl.). El *primer* 35S-F a partir del cual se secuenciaron las muestras, se presenta con letras subrayadas.

En la alineación (Figura 20) se puede observar que en los productos obtenidos de la PCR anidada existe al parecer una delección en la base 25. Sin embargo, analizando la Figura 19 se puede observar que la señal de la Adenina esta "enmascarada" por la señal de la Timina que esta a continuación, al ser un fragmento muy pequeño, la definición es pobre.

En la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (pag. web <http://srs.ebi.ac.uk/>) en la opción "BlastN" se realizó el alineamiento del resultado de la secuenciación de las muestras y como resultado se obtuvieron 104 correspondencias, mismas que están relacionadas con el promotor 35S o el virus del mosaico de la coliflor en un 99% lo que identifica plenamente al fragmento como parte del promotor 35S.

En seguida se presentan las alineaciones de la secuencia obtenida para el producto de PCR anidada con una secuencia natural de 35S, genoma del virus del mosaico de la coliflor y una secuencia sintética.

EM_VI:CAMVG2 V00141 Cauliflower mosaic virus genome.

Length = 8024

Score = 283 bits (143), Expect = 6e-75

Identities = 150/151 (99%), Gaps = 1/151 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gctcctacaaatgccatcattgcg-taaaggaaaggccatcgttgaagatg 50

Sbjct:7190 gctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggccatcgttgaagatg7240

Query: 51 cctctgccgacagtggtcccaagatggacccccaccacgaggagcatc 100

Sbjct:7241 cctctgccgacagtggtcccaagatggacccccaccacgaggagcatc 7290

Query: 101 gtgaaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatg 150

Sbjct:7291 gtgaaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatg 7340

EM_VI:CMV762 AJ007626 Culiflower mosaic virus 35S promoter with artificial insert of 80 bp
Length = 423
Score = 283 bits (143), Expect = 6e-75
Identities = 150/151 (99%), Gaps = 1/151 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 gctcctacaaatgccatcattgcg-taaaggaaaggccatcgttgaagatg 50
Sbjct:348gctcctacaaatgccatcattgcgataaaaggaaaggccatcgttgaagatg 298
Query: 51 cctctgccgacagtgggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatc 100
Sbjct:348 cctctgccgacagtgggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatc 248
Query:101 gtggaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatg 150
Sbjct:249 gtggaaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatg 198

6. Análisis de costos

El costo es una variable limitante para determinar la viabilidad de un análisis.

Con la finalidad de conocer el costo aproximado del análisis por PCR de una muestra en el laboratorio, en la Tabla 14 se presentan enlistados los reactivos y materiales, así como las cantidades empleadas y el costo por reacción.

Es importante señalar que en este análisis no se contempló el IVA sobre el costo de los reactivos y para facilitar el cálculo del costo se presenta en USD (United States Dollars).

Tabla 14. Análisis de costos de los reactivos y materiales empleados en el análisis de una muestra

Reactivo	Presentación	Costo USD	Cantidad empleada por reacción	Costo por reacción USD
Agarosa	100 g	203.00	1.6 g	3.248000
Bromuro de etidio	10 ml (10 mg /mL)	53.00	8 µL	0.042400
DNAzol	100 mL	100.00	1 mL	1.000000
dNTP's	1000 µL (2.5mM)	114.00	9.2 µL	1.048800
Endonucleasa Asp700	50 µL (10 U/µL)	50.00	0.1 µL	0.098000
Etanol	500 mL	34.00	1.225 mL	0.083300
Harina de maíz certificada Bt176	1 g	50.00	0.05 g	2.500000
Hidroxido de sodio	2500 g	50.00	0.029 g	0.000006
Isopropanol	1000 mL	24.00	0.6 mL	0.014400
Marcado molecular XIII	100 µL	101.00	4 µL	4.040000
Primers	50nmol	30.00	5.75 µL (20 µM)	0.069000
Taq polimerasa	100 µL (5 U/µL)	150.00	0.6 µL	0.900000
TBE	4 L	106.00	48 mL	1.272000
Tris	100 g	71.00	0.242 mg	0.000200
Costo de reactivos				14.32

Material	Presentación	Costo USD	Cantidad empleada por reacción	Costo por reacción USD
Tubos 1.5 mL	500 pzas	15.00	6 pzas	0.180000
Tubos 0.2 mL	1000 pzas	58.00	3 pzas	0.174000
Puntas 1000 μ L	1000 pzas	34.00	7 pzas	0.238000
Puntas 200 μ L	1000 pzas	23.00	5 pzas	0.115000
Puntas 10 μ L	1000 pzas	18.00	37 pzas	0.666000
Costo de material				1.37
Secuenciación				25.000000
Costo total por reacción				40.69

VII. DISCUSIÓN.

El ADN es susceptible a degradarse por procesos físicos y químicos como el calentamiento y la presión entre otros, que suelen ser utilizados en el procesamiento de alimentos.

Los resultados obtenidos en el laboratorio muestran que el ADN extraído de los productos nixtamalizados (Figura 9) se encuentra degradado, cabe señalar que la nixtamalización implica un tratamiento térmico alcalino a temperaturas de 90-95°C por aproximadamente 40 min, después de moler el nixtamal para obtener la masa, y dependiendo el producto final deseado se pueden obtener tortillas después de hornear la masa moldeada a 280-300°C por 50-60 s, botanas al freír la masa laminada y cortada a 165-180°C por 50-70 s, tostadas al freír las tortillas a 180°C o harina nixtamalizada después de secar y moler las partículas de masa.

Los granos de maíz enlatados se someten a esterilización comercial, así se designa al proceso en que se trata térmicamente un alimento a temperaturas de 115-120°C por 10-15 min para eliminar microorganismos patógenos y evitar el deterioro durante las condiciones normales de almacenamiento en un recipiente hermético.

Los granos o mazorcas de maíz cocidos y congelados son escaldados. El escaldado es un tratamiento térmico a alta temperatura (ebullición) durante un periodo corto de tiempo (un par de minutos) que se aplica a los productos vegetales antes de que se aplique un tratamiento de conservación, como en este caso la congelación. El objetivo principal de este proceso es inactivar las enzimas que pueden deteriorar la calidad del producto durante su almacenamiento.

De acuerdo con la literatura (Chiter *et al.*, 2000) la molienda de granos de maíz no afecta de forma significativa el peso molecular del ADN. Sin embargo el procesamiento de granos de maíz a temperaturas de 95°C o mayores por 1-5 min son suficientes para producir la fragmentación del ADN, esto explica que el ADN de las muestras analizadas se encuentre degradado, ya que los métodos de procesamiento descritos se encuentran dentro de estos rangos de temperatura y tiempo.

En este contexto, se puede decir que el proceso de extracción con DNAzol permite obtener ADN (degradado) a partir de muestras comerciales de granos y alimentos derivados de maíz, en cantidad e integridad suficiente para lograr la amplificación de los fragmentos deseados 150-300 pb como se puede observar en los resultados (Figuras 11-18).

La amplificación del fragmento del gen endógeno RPA-1 como control positivo de la reacción de PCR permitió determinar la presencia de ADN amplificable (Figuras 10, 11 y 12) y optimizar la cantidad de ADN molde en todas las muestras analizadas (Tabla 13). De acuerdo con la literatura (Gatchet *et al.*, 1999; Vollenhofer *et al.*, 1999; Hurst *et al.*, 1999), los genes endógenos zeina e invertasa son empleados comúnmente como controles internos de maíz. Los resultados de este estudio muestran, al gen endógeno RPA-1 presente en el genoma de maíz en bajo número de copias, como una opción adecuada para ser empleado como control interno de la reacción de PCR en maíz.

Los resultados presentados (Figuras 12, 14 y 15) muestran que la amplificación por PCR se ve afectada por el grado de procesamiento de las muestras ya que al aumentar el grado de procesamiento de la muestra hay menor amplificación. Esto se puede atribuir a que a mayor procesamiento, se produce mayor fragmentación del ADN, lo que disminuye la disponibilidad de ADN de integridad suficiente (150-300 pb) que puede ser utilizado como molde durante la amplificación (Chiter *et al.*, 2000).

Los resultados (Tabla 13) muestran que de las 30 muestras de alimentos comerciales de maíz analizadas incluyendo granos enlatados, tostadas y botanas, 10 presentaron el fragmento de 280 pb esperado (promotor 35S).

En la reacción de restricción y la PCR anidada empleadas para identificar indirectamente el fragmento de 280 pb, los resultados fueron los siguientes: en la reacción de restricción con el enzima *Asp700* (Figuras 14 y 15) se observa claramente la banda de 200 pb, pero es difícil visualizar la banda de 80 pb, posiblemente debió emplearse un gel al 3% de agarosa para facilitar la visualización de los fragmentos menores de 100 pb.

La PCR anidada presenta el fragmento de 151 pb esperado (Figura 17), pero a pesar de que se determinaron las condiciones óptimas de amplificación (Carriles 3 y 5), también se obtienen bandas inespecíficas, probablemente debido a que se realizaron 35 ciclos de reacción, lo que pudo ser excesivo tomando en cuenta que se partió de un fragmento de 280 pb ya purificado y no de ADN genómico.

Debido a que los resultados de la identificación indirecta no son concluyentes, se buscó la confirmación directa mediante la secuenciación del fragmento de 151 pb obtenido en la PCR anidada (Figura 18 y 19). Se realizó el alineamiento del resultado de la secuenciación de las muestras y como resultado se obtuvieron 104 correspondencias, mismas que están relacionadas con el promotor 35S o el virus del mosaico de la coliflor en un 99%, lo que identifica plenamente al fragmento como parte del promotor 35S (Figura 20).

De acuerdo con la literatura (Magin *et al.*, 2000), los costos y la duración de los métodos para la detección de modificaciones genéticas son:

Método	Prueba para	Costo/ muestra USD	Duración
ELISA	Proteína	2	2-8 h
Tira de flujo lateral	Proteína	1-5	10-20 min
PCR	DNA	100-300	1-3 días
Southern Blot	DNA	100-300	4-6 días

Al comparar estos datos con el análisis por PCR de una muestra (Tabla 14) realizado en nuestro laboratorio, encontramos que los métodos de ELISA y Tira de flujo lateral que determinan proteína son los más económicos 2 y 1-5 USD respectivamente, en comparación con los 40.69 USD del análisis que proponemos, pero el análisis por PCR tiene la ventaja de identificar ADN que es una molécula más estable, lo que permite analizar un amplio rango de muestras tanto procesadas como no procesadas.

Los métodos que determinan ADN, Southern Blot y PCR oscilan entre los 100-300 USD, que es un costo más elevado en comparación con los 40.69 USD del análisis que proponemos que también identifica ADN por PCR, este análisis tiene la ventaja de que se realiza en menor tiempo 1 día contra los 4-6 días que requiere el Southern Blot, además de que en el costo aproximado de este análisis se contempló la secuenciación (corresponde al 61% del costo) que es un método directo de identificación del fragmento amplificado.

La sensibilidad de detección de OGM por PCR es muy alta, y se ha reportado (Hurst *et al.*, 1999; Vollenhofer *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1998) que mediante esta técnica se logra identificar 0.001% de ADN modificado del total de ADN presente.

En estudios posteriores se pretende determinar la sensibilidad de la técnica de PCR, para detectar el promotor 35S en muestras nixtamalizadas con distintos porcentajes de ADN modificado.

IX. CONCLUSIONES

- El método de extracción utilizado permitió obtener, a partir de una pequeña cantidad de muestra, ADN en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo las reacciones en cadena de la ADN polimerasa.
- Se logró optimizar la cantidad de ADN molde para cada tipo de alimento, para las reacciones de amplificación del gen endógeno RPA-1.
- Los *primers* utilizados permiten la amplificación de fragmentos desde 151pb hasta 300 pb como se esperaba, por lo que el ADN molde, a pesar de estar fraccionado, al menos tiene este tamaño.
- Los *primers* diseñados se pueden utilizar para la detección de ADN foráneo en alimentos con diverso grado de procesamiento.
- Las muestras que como producto de amplificación del promotor 35S presentan la banda de 280 pb prevista, es probable que contengan ADN foráneo.
- Los productos de amplificación del promotor 35S que presentaron una banda de 280 pb fueron escindidos por el enzima *Asp700* lo que corrobora de forma indirecta la identidad del fragmento.
- La amplificación de un segmento interno de 151 pb, basada en la secuencia del fragmento de 280 pb, fue otra forma indirecta de identificar el producto de amplificación, lo que incrementó la probabilidad de que la secuencia amplificada experimentalmente corresponda a la secuencia del promotor 35S.

Y La secuenciación del fragmento interno de 151 pb de las muestras Control certificado Harina de maíz Bt176 Fluka (HT) y Grano enlatado (G4), permitió identificar de forma directa el producto de amplificación con lo que se corroboró que la secuencia amplificada corresponde a la secuencia del promotor 35S.

BIBLIOGRAFÍA

Anklam E., The validation of methods based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organism in food, *Analytica Chimica Acta* 393 177-179 (1999).

Ausubel F.M., Brent R., Kingstor R.E., Mobre D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., Current protocols in molecular biology, Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. A.3.D.1, Eds. John Wiley & Sons Inc., (2000).

Barea J.M., Chilton M., Un vector para introducir genes en vegetales Cap. 14, *Biología Vegetal*, Ed. Prensa Científica, 135-145, (1983).

Besares M.A., Actual marco jurídico mexicano aplicable a los OGM, *El mercado de valores*, 39-51 (2000).

Brown K., Hopkin K., Horsch R., Mellon M., Genetically Modified Foods Are They Safe?. *Scientific American* 39-51, (2001).

Chiter A., Forbes M., Blair G.E., DNA stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food, *FEBS Letters* 481, 164-168, (2000).

Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, of 12 march 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, *Official Journal of the European Communities* (2001).

Gachet E., Martín G.G., Vigneau F. and Meyer G., Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology*. 9, 380-388 (1999).

Gálvez A., El Protocolo de bioseguridad y los compromisos internacionales que adquiere México, *El mercado de valores* 31-38, (2000).

Gálvez A., Protocolo de Cartagena: una perspectiva mexicana, *BioTecnología*. Vol. 6 No. 2 y 3, 30-35, (2001).

Jensen A. A review, with notes on future needs and directions. National Veterinary Institute, Section of Food & Feed Microbiology, Oslo Norway, Version June 22nd, 2001.

Hurst C.D., Knight A. and Bruce I.J., PCR detection of genetically modified soya and maize foodstuffs, *Molecular Breeding* 5, 579-586 (1999).

Jaimes-Miranda F., Caracterización y expresión del gen de la proteína de replicación A-1 de maíz, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, México, D. F. (2001).

James C., Global Status of Commercialized transgenic Crops, International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications, Briefs No. 21 (2000).

Lipp M., Pietsch K., Brodmann P., Pauwels J., Anklam E., IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder, *Journal of AOAC International* Vol. 82, No. 4, (1999).

Magin K., Mihaliak C., Somerville L., Privalle L., Charlton S., Porter L., Methods for detection of GMO in grain commerce, American Crop Protection Association, (2000).

McCormick C. A., Griffin H. G., Underwood H. M. and Gasson M. J., Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food, *Journal of Applied Microbiology*, 84, 969-980 (1998).

Meyer R., Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMO's in food, *Food Control*. 10, 391-399 (1999).

Neumaier M., Braun A., Wagener C., Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics, *Clinical Chemistry*, 44, 12-26 (1998).

Noteborn H., Lommen A., Van der Jagt R.C. and Waseman J.M., Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops, *Journal of Biotechnology* 77, 103-114 (2000).

Pauli U., Detection of genetically modified organism by quantitative PCR: Requirements and Experiences, AOACI Europe, Munich, Germany 22-28 (2000).

Porretta S., Poli G. and Minuti E., Tomato pulp quality from transgenic fruits with reduced polygalacturonase (PG), Food Chemistry, Vol. 62, No. 3, 283-290, (1998).

Serna S., Rooney L.W., Food uses of whole corn and dry-milled fractions. Chap. 4, Advances In Corn Chemistry and Technology, Ed. American Association of Cereal Chemists. St. Paul. MN. 399-429, (1990).

Serna S., Química almacenamiento e industrialización de los cereales, Ed. A.G.T. México, D.F., 299-303; 414-460, (1996).

Stave J. W., Magin K., Schimmel H., Lawruk T. S., Wehling P. and Bridges A., AACC Collaborative study of a protein method for detection of genetically modified corn, Cereal Foods World Vol. 45, No. 11, 497-501 (2000).

Tyagi A. K., Mohanty A., Bajaj S., Chaudhury A. and Maheshwari S.C. Transgenic Rice: A Valuable Monocot System for Crop Improvement and Gene Research. Critical Reviews in Biotechnology, 19(1); 41-76, (1999).

Van Hoef A. M. A., Kok E. J., Bouw E., Kuiper H. A., and Keijer J., Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products, Food Additives and Contaminants, Vol. 15, No. 7, 767-774 (1998).

Vollenhofer S., Burg K., Schmidt J., and Kroath H., Genetically Modified Organisms in Food-Screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction. J. Agric. Food Chem. 47,5038-5043, (1999).

Walden R. and Wingender R., Gene-transfer and plant-regeneration techniques, TIBTECH. Vol. 13, 324-33, (1995)

Zimmermann A., Hemmer W., Liniger M., Luthy J. and Pauli U., A sensitive detection method for genetically modified MaisGard corn using a nested PCR-system, Lebens.-Wiss.u.-Technol. 31, 664-667 (1998).

Zimmermann A., Luthy J. and Pauli U. Event Specific Transgene Detection in Bt 11 Corn By Quantitative PCR at the Integration Site. Lebensm.-Wiss u.-Technol., 33, 210-216, (2000).