



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Determinación del umbral de detección de los métodos
ELISA y PCR en harinas certificadas de maíz Bt.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CARMEN FONG CÁRDENAS



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

México, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Raúl Aguilar Caballero.
Vocal: Prof. Amanda Gálvez Mariscal
Secretario: Prof. Rogelio Rodríguez Sotres

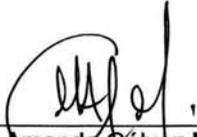
1er. Suplente: Arturo Navarro Ocaña
2º. Suplente: Francisco Ruíz Terán

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 312. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

Facultad de Química, UNAM.

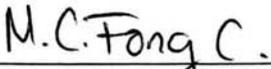
Asesora del Tema:


Dra. Amanda Gálvez Mariscal

SUPERVISOR Técnico:


Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Sustentante:


María del Carmen Fong Cárdenas.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Amanda Gálvez Mariscal en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.

Este trabajo de tesis fue financiado por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN218101. La tesista recibió una beca de Licenciatura por parte de DGAPA de Abril a Julio de 2002.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de ser parte de su casa.

A la Dra. Amanda Gálvez por la oportunidad que me dió de realizar mi tesis de Licenciatura, por su apoyo y por su paciencia.

Al Dr. Francisco Javier Plasencia por su apoyo técnico y sobre todo por sus enseñanzas.

A la Dra. Amelia Farrés por el préstamo del equipo de PCR para la realización de esta parte de la tesis y por sus consejos.

A la Dra. Maricarmen Quirasco por apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por el préstamo del lector de placas de ELISA.

A todos mis compañeros del laboratorio 312 en especial a Alejandra Barrios y Claudia Luis, por guiarme en este trabajo.

A Idalia por brindarme tu apoyo y consejos cuando más lo necesitaba.

GRACIAS:

A Dios, por todo.

A mis papás, por su apoyo que me brindaron desde el inicio de mi carrera, ya que son una parte importante de mí y que sin ustedes no hubiera logrado esta meta tan importante.

A mis hermanitos Toño y Francisco por todo su apoyo.

A Alejandra por tu amistad, consejos, por tu paciencia y comprensión que me has brindado.

A Diana, por tu amistad, apoyo en la carrera y sobre todo por los consejos que me has dado.

A Gaby por ser una amiga muy importante a lo largo de la carrera.

A mis papás,
los quiero mucho

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	11
1. Definición de términos importantes de acuerdo al Protocolo de Cartagena	11
2. Métodos para manipular genéticamente organismos	12
2.1 Bombardeo de Biopartículas	13
2.2 Electroporación	13
2.3 Transformación por protoplastos	14
2.4 Transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i>	14
3. Cultivos manipulados genéticamente	15
3.1 Primera generación	15
3.2 Segunda Generación	16
3.3 Tercera Generación	18
4. Maíz Genéticamente Modificado	20
5. Estrategias para mejorar características agrícolas	24
5.1 Resistencia a insectos	24
5.2 Tolerancia a Herbicidas	26
6. Estructura de un Organismos Genéticamente Manipulados	28
7. Métodos de Detección de OGM	30
7.1 Métodos basados en la detección de proteínas transgénicas	30
7.1.1 ELISA	31

7.1.2 Tiras reactivas	35
7.1.3 Futuro Potencial de los Inmunoensayos	35
7.2 Métodos basados en la identificación de ADN	36
7.2.1 PCR	36
7.2.2 Southern Blot	40
7.3 Comparación de los métodos de ELISA y PCR	40
IV. OBJETIVOS	43
V. MATERIALES Y MÉTODOS	44
1. Estrategia Experimental	44
2. Muestras de Harinas de maíz transgénico certificadas	45
3. Descripción de las variedades de maíz Bt	45
3.1 Gen <i>cry1Ab</i>	46
3.2 Gen <i>pat</i>	46
3.3 Gen <i>bar</i>	47
3.4 Gen <i>bla</i>	47
4. Muestras de Criollos	48
5. Preparación de muestras y diluciones a evaluar	48
6. Extracción de ADN	51
6.1 Fundamento de la extracción de ADN	51
6.2 Extracción de ADN en embriones de maíz y harina certificadas con DNazol	51
6.3 Concentración de extractos de ADN	53
7. Reacción en cadena de la Polimerasa	55
7.1 Cebadores (Primers)	55
7.1.1. Cebadores para gen endógeno	55
7.1.2. Cebadores para promotor 35S	56

7.2 Reacciones en Cadena de la Polimerasa	58
7.2.1. PCR para gen endógeno	58
7.2.2. PCR para promotor 35S	59
7.3 Electroforesis en geles de Agarosa	60
8. Análisis Inmunológicos	62
8.1 Preparación de reactivos	62
8.1.1 Buffer MEB	63
8.1.2 Buffer ECM	63
8.1.3 Controles positivos y negativos	64
8.1.4 Conjugado de la enzima	64
8.1.5 Solución del sustrato	65
8.2 Extracción de Proteína	65
8.2.1 Extracción de proteína de las muestras de maíces criollos y las harinas de maíz transgénicas	65
8.2.2 Preparación de la placa de ELISA	66
8.2.3 Preparación de la cámara húmeda	68
8.2.4 Reacción en la placa	69
8.3 Determinación de Proteína por Lowry modificado	70
8.3.1 Fundamento de la extracción de proteína por el método de Lowry	70
8.3.2 Reactivos empleados para la determinación	71
8.3.3 Determinación de proteína	71
VI. RESULTADOS	72
1. Análisis de ADN genómico	72
2. Amplificación del gen RPA-1	73
3. Detección de la secuencia de ADN del promotor 35-S	75

3.1 Para maíces criollos	75
3.2 Geles Bt-11	82
3.2 Geles Bt-176	84
3.3 Geles MON810	88
4. Detección de la proteína Cry1Ab	93
4.1 Determinación de Proteína por el método de Lowry	93
4.2 Primer Placa de ELISA	95
4.3 Segunda Placa de ELISA	98
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	101
VIII. CONCLUSIONES	106
IX. ANEXOS	108
ANEXO I	108
ANEXO II	115
ANEXO III	118
X. BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico	pb	Pares de bases
ARN	Ácido ribonucleico	Taq pol	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	ADN de transferencia	P-35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>	RPA-1	Proteína de Replicación A-1
TBE	Buffer Tris-Ácido bórico-EDTA	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
dNTP's	Desoxirribonucleótidos	T-NOS	Terminador de Nopalina sintasa
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas	HT	Tolerante a herbicidas
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	DGT	Transferencia Directa de genes
GM	Genéticamente modificado	UE	Unión Europea
R.A.	Grado Reactivo	UV	Ultravioleta
B.M.	Grado Biología Molecular	ZYMV	Virus del mosaico amarillo de la calabaza
ECB	Gusano Barrenador Europeo	CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
MG	Modificado Genéticamente	WMV	Virus del mosaico de la sandía
NOM	Norma Oficial Mexicana		
OGM	Organismo Genéticamente Modificado		
OV	Organismo Vivo		
OVM	Organismo Vivo Modificado		

I. RESUMEN.

En México, como en otros países, se discute aún la reglamentación, el etiquetado e identificación, así como la inocuidad de las proteínas que se producen con los cultivos manipulados genéticamente (MG). La detección de los alimentos transgénicos es posible gracias al método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), junto con un método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), método inmunológico desarrollado en los años 60's y que, actualmente, se utiliza para la detección de proteínas heterólogas en los alimentos mediante su reacción con anticuerpos específicos.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos para determinar el umbral de detección de ambos métodos.

Con respecto al método Reacción en Cadena de la Polimerasa se utilizó el gen RPA-1 como control positivo de la reacción y, para determinar el umbral en la detección del promotor 35S, se utilizaron las harinas de maíz transgénicas certificadas Bt-11, Bt-176 y MON810. Se amplificó primero un fragmento de 280pb con los primers 35-R y 35-DIR, pero después se amplificó un fragmento de 151pb con los primers 35-F y 35-INV, haciendo diluciones primero con maíz blanco y posteriormente con agua. Se determinó también la presencia de dicho promotor en muestras de maíces criollos provenientes de diferentes partes de la República, para explorar la posibilidad de que contuvieran transgenes.

Para el método de ELISA, se utilizó el kit Bt-Cry1Ab de Agdia, el cuál detecta la proteína Cry1Ab, que se expresa en plantas resistentes a insectos. Para este método se ocuparon las mismas muestras de harinas de maíz certificadas, pero sólo se utilizaron las diluciones hechas con maíz blanco. También se realizó este análisis en los maíces criollos.

Los límites de detección encontrados fueron:

- ❖ Para PCR 0.0002%
- ❖ Para ELISA 0.02% en la variedad de Bt-11 y 2% en la variedad MON810.

En los maíces criollos examinados por ambos métodos, no se detectó la presencia de secuencias transgénicas de 35S, ni de proteínas Cry1Ab.

II. INTRODUCCIÓN.

La producción de las plantas modificadas genéticamente ha avanzado dramáticamente gracias al desarrollo de técnicas de ingeniería genética que han permitido conocer la estructura y función de los genes, así como el desarrollo de técnicas para transformar plantas. Esto ha sido aplicado a nivel mundial con los objetivos de aumentar la producción agrícola, la resistencia a plagas y enfermedades, y la vida de anaquel de productos perecederos.

Con el rápido desarrollo de la biotecnología, la agricultura ha ido modificando sus recursos. Por ejemplo, se han desarrollado alimentos que se conservan mejor durante el transporte y almacenamiento, y otros que poseen una mayor calidad nutricional.

Los alimentos genéticamente modificados están apareciendo ahora en el mercado, por ejemplo, tomates de maduración retardada, soya tolerante a herbicidas, maíz resistente a insectos y muchos más, que se están produciendo como una opción moderna del fitomejoramiento de cultivos. Los aspectos de seguridad, regulación y etiquetado de estos alimentos todavía continúan discutiéndose en muchos países (McCormick et al, 1998), aunque hace una década, la discusión sobre la seguridad de los organismos genéticamente modificados se iniciaba apenas en la comunidad científica.

La aplicación de la ingeniería genética en cultivos se ha convertido en una de las principales líneas de investigación y de producción de la agroindustria. Debido a ello, el uso de los organismos genéticamente modificados como alimentos y aditivos alimentarios se está extendiendo cada vez más, lo cual está generando una cierta inquietud entre los consumidores. Para abordar este problema, la Unión

Europea (UE) ha adoptado una serie de medidas estrictas que regulan la producción y comercialización de los OGMs y productos que los contengan, con el objetivo de minimizar los posibles riesgos para la salud humana y el medio ambiente (www.bdbiosciences.com).

A nivel internacional existe una fuerte oposición de la UE en contra de la desinformación hacia el consumidor de los OGMs que contrasta con las políticas de los Estados Unidos de Norte América, sede de muchas de las compañías productoras de cultivos transgénicos.

El Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea han impuesto en la Directiva EC/18/2003 una norma nueva, clara y obligatoria, de etiquetado para los organismos genéticamente modificados (OGMs), exceptuando a los aditivos y saborizantes, donde el límite máximo permitido de éstos es de 0.9% o menos (<http://www.db.europarl.eu.int>).

Esto ha traído como consecuencia que, tanto las compañías productoras de alimentos como agencias regulatorias desarrollen y adapten métodos analíticos para detectar niveles bajos de OGMs.

La justificación que presenta la Unión Europea acerca de los posibles riesgos ambientales y a la salud, por las plantas transgénicas comestibles es:

- ❖ Toxicidad y/o alergenicidad de las proteínas expresadas en la planta GM.
- ❖ Reducción en los niveles de ciertos nutrientes, aumento en los niveles de factores antinutricionales o de compuestos tóxicos como algunos alcaloides.

- ❖ Incremento en la resistencia a antibióticos pues se utilizan como marcadores de selección que son parte de la construcción original y que se utilizan para identificar las plantas transformadas.
- ❖ Alteración del material genético en humanos por parte del gen de transferencia.
- ❖ Evolución de larvas y otras especies, que se vuelvan resistentes a los herbicidas y pesticidas (Traynor et al, 2002).

Estos efectos potenciales para el ambiente y a la salud arriba mencionados frecuentemente son tomados en cuenta por algunas instituciones regulatorias para determinar si un organismo GM es aprobado para su comercialización, e incluso, para su desarrollo.

Existen algunas instancias internacionales con la responsabilidad de atender las políticas internacionales de agricultura, biotecnología y bioseguridad, así como la realización de acuerdos internacionales. Una de esas instancias en materia de Bioseguridad es el Protocolo de Cartagena, tratado responsable de la vigilancia a nivel internacional de la bioseguridad, que está pendiente del desarrollo, manejo, uso, movimiento transfronterizo y liberación de organismos vivos modificados genéticamente (OVMs). Aplica también a cargamentos de granos a granel debido a su posibilidad de germinar y eventualmente de transferir su material genético.

México es uno de los países signatarios del Protocolo, por lo que el gobierno debe asumir ciertas responsabilidades con respecto al uso de estos organismos. Una de las obligaciones es el desarrollo e implementación de regulaciones para el uso

seguro de los OVMS. Principalmente en lo que se refiere a las exportaciones e importaciones, se deberá contar con la documentación en el cual se plantee la información requerida para este tipo de negociaciones, siempre y cuando se haya llegado a un acuerdo entre el importador y el exportador (Traynor et al, 2002).

El Codex Alimentarius es otra instancia internacional, que se encarga de establecer los estándares para los alimentos como son la seguridad, la calidad y principalmente en ella se discute la conveniencia y, en todo caso, la forma en que deberá manejarse el etiquetado (Traynor et al, 2002).

Una tercer instancia encargada de prevenir en forma efectiva y segura la introducción y difusión de los plaguicidas de las plantas y sus productos, así como promover medidas necesarias para su control es la Convención Internacional de Protección a Plantas IPPC; (Traynor et al, 2002).

Por lo menos estas tres instancias internacionales están pendientes del desarrollo biotecnológico y su comercialización. Este hecho indica que un amplio y complejo campo de regulaciones están asociados con el uso de la tecnología (Traynor et al, 2002).

En China se liberó el primer cultivo genéticamente modificado (GM) fue liberado entre los años de 1990 y 1995: el tabaco resistente a virus y, posteriormente, el tomate resistente a virus. La aprobación del uso de los cultivos genéticamente modificados se inició en Estados Unidos en 1994 con el tomate FlavrSavr®, de maduración retardada de la empresa Calgene. En 1996, se cultivaron aproximadamente 1.7 millones de hectáreas con cultivos transgénicos, los cuales

se incrementaron a 11 millones de hectáreas en el año de 1997. En el año de 1998 se llegó a un área de 27.8 y en 1999 aumentó a 39.9 millones de hectáreas. En el año 2000 esta cifra llegó a 44.2 millones de hectáreas. Así pues, durante el periodo de 1996 – 2000 el área global de cultivos transgénicos incrementó de 1.7 millones de hectáreas en 1996 a 44.2 millones de hectáreas en el 2000. Durante estos cinco años el número de países que cultivan estos productos, aumentó de seis en 1996, a nueve en 1998, a 12 países en 1999, para llegar a 13 en 2000. Los 13 países que en el año 2000 producen cultivos transgénicos son: los Estados Unidos con un 68%, Argentina con 23%, Canadá con 7%, China con 1% y Australia, Sudáfrica, Rumania, México, Bulgaria, España, Alemania, Francia, Portugal, Ucrania y Uruguay menos del 1 % del área total (James, 2001).

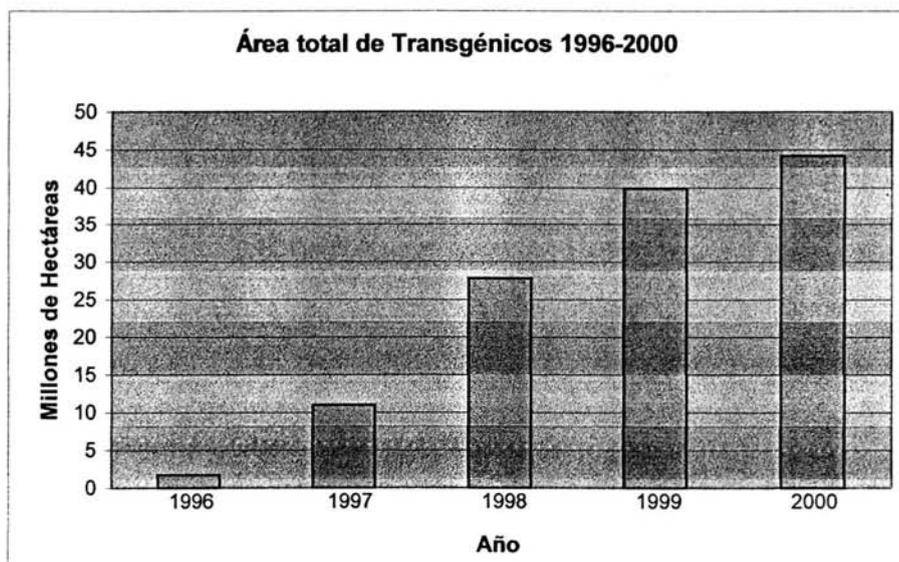


Figura 1. Área total de transgénicos del periodo de 1996-2000. Fuente: James, 2001

En 2001, el área total de cultivos GM aumentó a 52.6 millones de hectáreas. Así, durante éstos cinco años, periodo de 1996 a 2001, el total de hectáreas sembradas era de 175 millones.

En 2002, el área de cultivos GM continuaba creciendo, cubriendo un total de 58.7 millones de hectáreas, los países productores de estos cultivos aumentó a 16 con India, Colombia y Honduras que cultivan estos productos por primera vez.

Estados Unidos tuvo una ganancia neta de 3.3 millones de hectáreas en el 2002, resultado de un incremento significativo en el área de cultivo de maíz y soya, un aumento moderado en el área de cultivo de la canola, también tuvo una disminución en el área de cultivo de algodón transgénico, debido a que los precios internacionales de algodón disminuyeron, haciendo el cultivo menos rentable.

Canadá tuvo una ganancia neta estimada de 0.3 millones de hectáreas en los cultivos de soya y canola, el cultivo de maíz se mantuvo igual.

En la siguiente tabla se enlistan los 16 países productores.

Tabla 1. Área total de cultivos transgénicos en 2001 y 2002: por país.

País	2001	2002
	Millones de hectáreas	Millones de hectáreas
Estados Unidos	35.7 (68)	39.0 (66)
Argentina	11.8 (22)	13.5 (23)
Canadá	3.2 (6)	3.5 (6)
China	1.5 (3)	2.1 (4)
Sudáfrica	0.2 (<1)	0.3 (1)
Australia	0.2 (<1)	0.1 (<1)
India	--	<0.1 (<1)
Rumania	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)

España	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)
Uruguay	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)
México	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)
Bulgaria	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)
Indonesia	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)
Colombia	--	<0.1 (<1)
Honduras	--	<0.1 (<1)
Alemania	<0.1 (<1)	<0.1 (<1)
Total	52.6 (100)	58.7(100)

Fuente: James, 2003

México es centro de origen y diversidad de muchas especies de plantas silvestres, por lo que es posible que ocurra hibridación e introgresión de genes, así que es necesario que la importación, movilización y uso de plantas transgénicas se realice bajo medidas de bioseguridad, establecidas después de un cuidadoso análisis de riesgos.

Parte de estas medidas están contempladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-056-FITO-1995, "por la que se establecen los requisitos fitosanitarios para la movilización nacional, importación y establecimiento de pruebas de campo de organismos manipulados mediante la aplicación de ingeniería genética". Su aplicación ha permitido llevar a cabo experimentación en México con plantas transgénicas acotando los posibles riesgos ambientales de la liberación de estos organismos (NOM-056-FITO-1995).

Actualmente, se discute en los departamentos jurídicos de la SAGARPA y la SEMARNAT un proyecto de norma para regular las pruebas pre-comerciales y la

siembra comercial de plantas GM, para uso como forraje y para la alimentación humana. Sin embargo, las áreas de ambiente y salud, que deberían regular los posibles impactos en los ecosistemas y los posibles impactos a la salud humana y animal, respectivamente, sólo cuentan con las leyes correspondientes y sus reglamentos, pero no con las normas que permitan ejercerlas.

En este trabajo se determinaron los límites de sensibilidad de las técnicas de detección de ADN y proteínas recombinantes en harinas de maíz transgénicas certificadas. Dicha información puede ser de utilidad en la determinación de los niveles máximos de contenidos de OGM en alimentos, puesto que el establecer un límite en el uso de OGMs será una decisión que eventualmente tendrá que tomar las agencias gubernamentales como uno de los compromisos adquiridos al firmar y participar en el Protocolo de Cartagena. En cuanto a estos límites, hay una amplia diversidad pues mientras países como Japón establecen un 5% de ADN modificado genéticamente del ADN total (número de copias del transgén respecto al genoma total). En el caso que la medición sea de proteína heteróloga, el 5% corresponde a 5g de proteína por 100g de producto. Los países de la UE han fijado un 0.9%.

III. ANTECEDENTES.

1. Definición de términos de acuerdo al Protocolo de Cartagena.

De acuerdo con el lenguaje del Protocolo de Cartagena:

Un organismo vivo modificado (OVM) se entiende por cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna.

Un organismo vivo (OV) se entiende por cualquier entidad biológica capaz de transferir o replicar material genético, incluidos los organismos estériles, los virus y los viroides.

Biotecnología Moderna se entiende a la aplicación de:

- a. Técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos.
- b. La fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección natural (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000).

En términos más generales, un organismo genéticamente modificado (OGM) se entiende entonces por cualquier organismo cuyo material genético ha sido alterado, para eliminar genes, o para modificar la expresión de los mismos, o bien introducirlos, generalmente mediante la transferencia de genes por medio de técnicas de ADN recombinante.

La transferencia de genes es el proceso en el cual se transfiere un fragmento específico de ADN (usualmente un gen foráneo mediante el uso de plásmidos

generalmente provenientes de bacterias) al interior de otra célula de algún otro organismo. Las plantas transgénicas son plantas que adquieren entonces la característica que les confiere el o los gen(es) insertado(s) (www.bdbiosciences.com).

2. Métodos para manipular los organismos genéticamente.

En el comienzo de la agricultura, el hombre seleccionó y retuvo semillas o plantas de las especies que ofrecían una fuente segura de alimentos. Hacia fines del siglo XVIII, la manipulación genética en plantas ha sido practicada a través de cruza y selección. Ello originó el fitomejoramiento y las variedades actuales de plantas son el resultado de muchos años de selección sistemática. La esencia del fitomejoramiento es el descubrimiento o la creación de una variación genética de una especie vegetal y la selección, dentro de esa variación, de plantas con características deseables que pueden heredarse de manera estable (www.upov.com). Actualmente, el mejoramiento se ha revolucionado gracias a la ingeniería genética aplicada, a la introducción de material genético foráneo. Las técnicas de ADN recombinante han permitido a los genetistas identificar y clonar genes específicos para lograr algún beneficio, permitiendo así la expresión del gen seleccionado y, por lo tanto, mostrar ciertas características como la resistencia a insectos (Watson, 1992).

En el caso de los cereales, hay dos principales métodos de introducción de ADN: algunas de las técnicas de transferencia directa de genes (DGT); métodos físicos o químicos utilizados para introducir ADN a las células y el otro método es el de la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Un amplio rango de métodos DGT han sido utilizados para transferir genes a cereales y otros organismos y lograr por lo menos la expresión del gen. Algunos de estos métodos son: electroporación, bombardeo de partículas o biobalística y transformación por protoplastos, los cuales se describen a continuación (O'Brien et al, 2000).

2.1 Bombardeo de biopartículas o Biobalística.

Este método es el más utilizado de todos los métodos DGT. El principio del método es muy simple: partículas densas microscópicas de oro o tungsteno son aceleradas a través de las paredes de las células, permitiendo al ADN, el cual ha sido previamente precipitado sobre las partículas, ser liberado e introducido al genoma celular, es decir que se logra la introducción de sustancias dentro de células intactas y tejidos a través del uso de microproyectiles a una alta velocidad. El término "biolistic" (biological ballistics) fue acuñado para describir la forma en que se inserta el ADN en el interior de células vivas a través del "bombardeo" con una pistola de genes. El proceso es utilizado para la transformación de algunos cultivos cuando se tienen dificultades con otros métodos. Desde hace algunos años este método es utilizado para introducir y expresar genes en algunos cereales recalcitrantes a la transformación como el maíz y trigo (O'Brien, 2000).

2.2 Electroporación

En esta técnica, se utilizan pulsos eléctricos de alto voltaje para dar permeabilidad a las membranas celulares de tejidos o agregados celulares que permita el paso del ADN. Esta técnica ha sido utilizada en la mayoría de los cereales, pero sólo en

arroz y maíz ha tenido una eficiencia elevada, y siendo el método de transformación que se utiliza como método rutinario para la producción de líneas transgénicas (O'Brien, 2000).

2.3 Transformación por protoplastos.

La transformación por protoplastos fue el primer método utilizado para demostrar que los DGT podían ser aplicados en plantas y fue la primera técnica aplicada a los cereales transgénicos (O'Brien, 2000). Por las membranas de los protoplastos, es por donde se introduce el gen de transferencia, a través de la sonicación de los protoplastos. También está el uso de agentes químicos como el polietilenglicol (PEG), el cual implica la transferencia directa del ADN a los protoplastos facilitada por este agente.

2.4 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Es un método natural, fácil y eficiente de transformación porque es un método que utiliza un organismo vivo con la capacidad de transferir su propio material genético mediante el ADN de transferencia (T-DNA) al genoma de las células de las plantas.

Cuando esta bacteria infecta a una planta, transfiere el T-DNA que es un fragmento del plásmido Ti (inductor de tumores) a las células hospedadoras, el cual se integra al ADN de la planta. Este ADN codifica para enzimas de biosíntesis de hormonas y de aminoácidos provocando el crecimiento de un pequeño tumor. El resultado de la transformación de estas células de las plantas es la producción de nuevos azúcares y aminoácidos conjugados. Esta técnica ofrece el potencial de

generar células transgénicas sin que presenten rearrreglos importantes en el ADN. En la mayoría de los casos el gen que se inserta resulta en una sola copia en el genoma hospedero. Esta técnica tiene más eficiencia en cereales como el arroz que en el maíz y trigo (O'Brien, 2000).

3. Cultivos Manipulados Genéticamente.

El tiempo requerido para que se lleve a cabo el desarrollo de una nueva variedad de planta transgénica o cultivo modificado oscila entre 8 y 12 años. Las diferentes "generaciones" de plantas GM pueden describirse de acuerdo al siguiente esquema arbitrario:

3.1 Primera Generación: Que generalmente se refiere al mejoramiento de rasgos agronómicos, enfocados a un mejor rendimiento comercial.

- Tolerancia a herbicidas
- Resistencia a insectos
- Modificación de color
- Proceso de maduración modificado
- Esterilidad masculina
- Factores de rendimiento

(Fuente: Lheureux et al, 2003)

En los próximos 5 a 10 años los nuevos rasgos serán los siguientes:

3.2 Segunda Generación: Factores de Calidad

- Resistencia a otros patógenos
- Tolerancia a estrés abiótico (frío, sequía)
- Modificación de nutrientes
- Resistencia a hongos (para trigo, girasol y árboles frutales)
- Modificación de almidón en papas y maíz
- Modificación del contenido de proteínas en soya

(Fuente: Lheureux et al, 2003)

Los rasgos que han sido desarrollados para algunos de los cultivos GM que han sido comercializados y que están en espera de autorización por la Unión Europea son los siguientes:

Tabla 2. Cultivos Genéticamente Modificados, principales rasgos.

Cultivo	Modificación
Maíz	Resistencia a herbicidas (glufosinato)
	Resistencia a herbicidas (glifosato)
	Resistencia a antibióticos (marcador molecular)
	Resistencia a plagas (lepidópteros)
	Esterilidad masculina
	Tolerancia a herbicidas (ciclohexanona)
	Tolerancia a herbicidas (imidazolina)
Canola	Resistencia a herbicidas (glufosinato)
	Resistencia a herbicidas (glifosato)
	Resistencia a herbicidas (oxinilos)
	Niveles alterados de laurato y miristato
	Modificación
	Resistencia a antibióticos
	Esterilidad masculina

	Alto contenido de ácido oleico
Soya	Resistencia a herbicidas (glufosinato)
	Resistencia a herbicidas (glifosato)
	Niveles altos de ácido oleico
	Hidrólisis de azúcares glucorónidos (marcador molecular)
	Niveles altos de laurato
	Producción de ácido mirístico
	Esterilidad masculina
Tomate	Maduración retardada por disminución de producción de etileno
	Maduración retardada por disminución de degradación de pectinas
	Resistencia a plagas
	Resistencia a antibióticos
Papa	Resistencia a plagas
	Resistencia a herbicidas
	Resistencia al virus PLRV
	Resistencia al virus PVY
	Resistencia a antibióticos (marcador molecular)
	Con almidón modificado (libre de amilosa)
Algodón	Resistencia a herbicidas (sulfonil urea)
	Resistencia a herbicidas (glifosato)
	Resistencia a herbicidas (oxinilos)
	Resistencia a plagas (lepidópteros)
	Resistencia a antibióticos (marcador molecular)
Calabaza	Resistencia al virus CaMV (mosaico de la coliflor)
	Resistencia al virus WMV (mosaico de la sandía)
	Resistencia al virus ZYMV (mosaico amarillo de la calabaza)
Arroz	Tolerancia a herbicidas (fosfotricina PPT)
	Resistencia a herbicidas (glufosinato)
Remolacha azucarera	Tolerancia a herbicidas (fosfotricina PPT)
	Resistencia a herbicidas (glufosinato)
Melón	Maduración retardada por degradación de etileno
Papaya	Resistencia a infecciones virales (PRSV)

Tabaco	Resistencia a herbicidas (oxinilos)
Lino	Tolerancia a herbicidas
Achicoria	Esterilidad masculina

Fuente: www.agbios.com

3.3 Tercera Generación: en ella se incluye la utilización de las plantas transgénicas como reactores industriales, principalmente el maíz.

- Plantas productoras de compuestos farmacéuticos
- Plantas productoras de aceites lubricantes
- Plantas con ingredientes funcionales mejorados
- Árboles con lignina modificada
- Plantas hipoalergénicas

(Fuente: Lheureux et al, 2003)

Uno de los cultivos que se manipulan genéticamente en México es el algodón transgénico que se siembra en el Norte del país bajo la supervisión de la oficina estatal de Sanidad Vegetal, existen otros cultivos en proceso de experimentación, y cuyo objetivo final es llegar a la producción a través de procesos escalonados de evaluación monitoreo y manejo de riesgo, los cuales se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 3. Cultivos Genéticamente Modificados en México.

CULTIVO	MODIFICACIÓN
En estado comercial o precomercial	
Algodón	Resistencia a insectos
Algodón	Tolerancia a herbicidas
Tomate	Maduración retardada
En ensayos de campo	
Algodón	Tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos
Arroz	Gen SPS
Calabaza	Resistencia a virus
Chile	Maduración retardada
Clavel	Modificación de color
Colza	Tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos
Limón Mexicano	Cambios fisiológicos
Maíz	Resistencia a insectos
Maíz	Tolerancia a herbicidas
Maíz	Resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas
Papaya	Resistencia a virus
Papa	Resistencia a virus
Piña	Resistencia a virus
Plátano	Maduración retardada
Rhizobium	Maduración retardada
Soya	Manipulación intraespecífica
Tabaco	Tolerancia a herbicidas
Tomate	Tolerancia a herbicidas
Trigo	Gen DMRF

Fuente: James, 1997 y SAGAR, 2000.

En México, en los institutos de investigación como CINEVESTAV- Irapuato se están desarrollando plantas transgénicas con las siguientes características, de gran utilidad para los sistemas agrícolas mexicanos :

- Resistentes a estrés hídrico
- Resistentes a suelos alcalinos
- Tolerantes a aluminio
- Resistentes al calor
- Utilización de marcadores moleculares no relacionados con resistencia a antibióticos.

4. Maíz Genéticamente Modificado

El maíz ha sido uno de los cereales más estudiados genéticamente, por varias razones: por su importancia económica, porque se reproduce por polinización cruzada y porque produce grandes cantidades de semillas en cada polinización. El maíz es una especie diploide con un número pequeño ($n=10$) de cromosomas, que se distinguen fácilmente y, por lo tanto, se manipula con más facilidad que otros cereales (O'Brien, 2000).

En el 2000, la manipulación genética había sido aplicada comercialmente a varios cultivos como soya, la cual ocupa un 58% del área total sembrada de cultivos transgénicos, le sigue el maíz con un 23%, algodón con 12%, la canola con 7% y la papa, calabaza y papaya con menos de 1% (James, 2001).

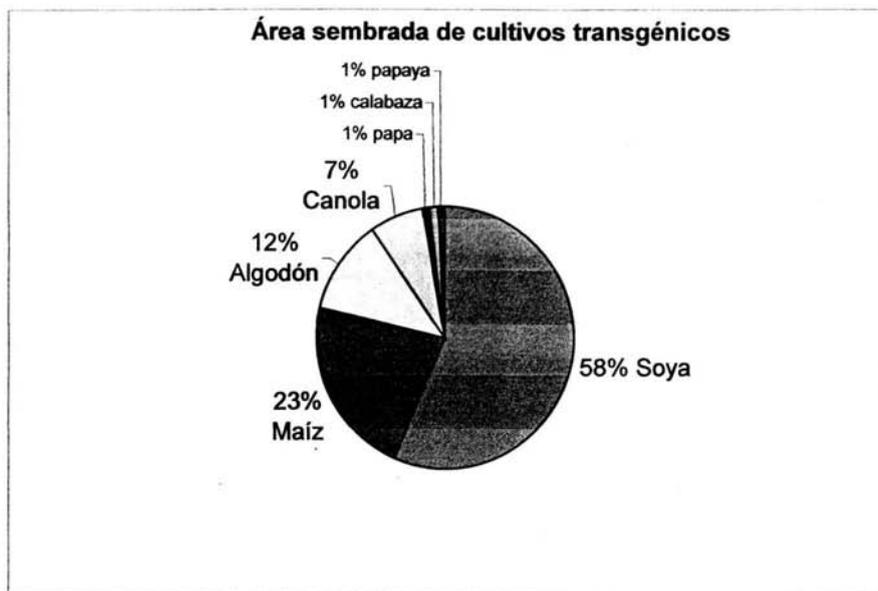


Figura 2. Distribución de cultivos transgénicos en el mundo en el 2000.

Fuente: James, 2001.

En el 2001 y 2002 el cultivo dominante siguió siendo la soya, en general siguió teniendo la misma tendencia que en el 2000.

En la tabla siguiente se muestran los porcentajes de los cultivos transgénicos en el 2001 y 2002.

Tabla 4. Cultivos transgénicos principales en el 2001 y 2002.

Cultivo	2001 Millones de hectáreas	Cultivo transgénico %	2002 Millones de hectáreas	Cultivo transgénico %
Soya	33.3	63	36.5	62
Maíz	9.8	19	12.4	21
Algodón	6.8	13	6.8	12
Canola	2.7	5	3.0	5
Calabaza	<0.1	<1	<0.1	<1
Papaya	<0.1	<1	<0.1	<1
Total	52.6	100	58.7	100

Fuente: James, 2003.

Viéndolo desde el punto de vista del tipo de característica transgénica adquirida, el cultivo dominante en el 2000 fue la soya tolerante a herbicida con 25.8 millones de hectáreas (58%), cultivándose comercialmente en seis países, Estados Unidos, Argentina, Canadá, México, Rumania y Uruguay. El maíz Bt ocupa la segunda posición con 6.8 millones de hectáreas (15%), el cual también es cultivado en seis países: Estados Unidos, Canadá, Sudáfrica, España y Francia. La canola tolerante a herbicidas ocupa 2.8 millones de hectáreas (6%), maíz tolerante a herbicidas y algodón tolerante a herbicidas ocupan 2.1 millones de hectáreas (5%) cada uno, algodón tolerante a herbicida / Bt con 1.7 millones de hectáreas (4%) y, finalmente, algodón Bt y maíz tolerante a herbicida/Bt ocupa un 1.4 millones de hectáreas (3%) cada uno cubriendo así el 100% de un total de 44.2 millones de hectáreas (James, 2001).

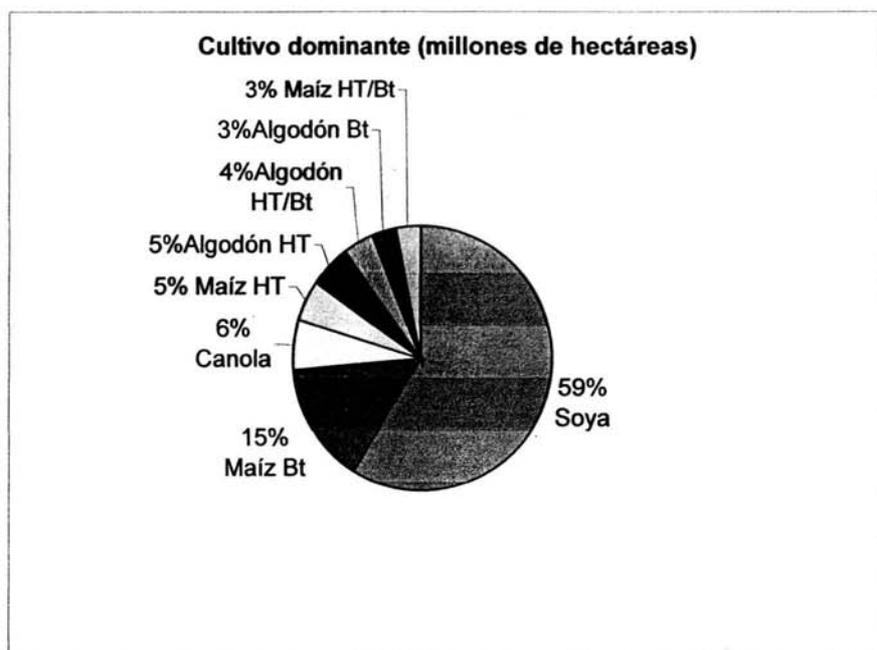


Figura 3. Cultivos transgénicos dominantes en el mundo en el 2000.

Fuente: James, 2001.

En 2001 y 2002 la soya tolerante a herbicidas continua siendo el cultivo dominante en Estados Unidos, Argentina, Canadá, México, Rumania Uruguay y Sudáfrica. Globalmente, la soya tolerante a herbicida ocupa 36.5 millones de hectáreas, representando el 62% de un área total de todos los cultivos transgénicos de 58.7 millones de hectáreas. El segundo cultivo dominante es el maíz Bt, el cual ocupa 7.7 millones de hectáreas, equivalentes a 13% del área total plantada de los siete países que lo cultivan: Estados Unidos, Canadá, Argentina, Sudáfrica, España, Honduras y Alemania. El tercero es la canola tolerante a herbicida que ocupa un 5% del área total sembrada en Canadá y Estados Unidos. Estos y otros cultivos se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 5. Cultivos transgénicos dominantes en el 2001 y 2002.

Cultivo	Millones de hectáreas	% Transgénico
Soya tolerante a herbicidas	36.5	62
Maíz Bt	7.7	13
Canola tolerante a herbicidas	3.0	5
Maíz tolerante a herbicidas	2.5	4
Algodón Bt	2.4	4
Algodón tolerante a herbicidas	2.2	4
Algodón Bt/HT	2.2	4
Maíz Bt/HT	2.2	4
Total	58.7	100

Fuente: James, 2003

5. Estrategias para mejorar características agrícolas.

5.1 Resistencia a insectos.

El maíz está sujeto al ataque de muchas plagas de insectos desde que es plantado hasta su manejo y almacenamiento previo a utilizarse, causando daño directo al grano. Además los insectos son vectores directos o indirectos de distintas enfermedades (O'Brien, 2000). El primer maíz resistente a insectos fue diseñado contra las plagas de lepidópteros, principalmente para el gusano europeo barrenador *Ostrinia nubilalis* (ECB por sus sigras en inglés). El ECB es una de las plagas más importantes de los Estados Unidos. Se han reportado pérdidas del 5 al 20% por los daños graves que causa, dado que las partes de la planta que ataca son hojas, tallos y espigas. Además la infestación con este gusano incrementa la podredumbre del tallo. Se ha observado que en maíz que ha sido atacado por insectos, ocurre una mayor incidencia de infección por hongos como *Fusarium moniliforme*.

La primera generación de maíz transgénico para controlar el ECB, se basó en la expresión de una proteína insecticida proveniente del *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt es una bacteria Gram-positiva que habita en el suelo, la cual durante la esporulación forma una proteína de inclusión cristalina, que se denomina proteína Cry. La endotoxina del Bt tiene un gran potencial para controlar insectos. Las endotoxinas Bt son proteínas letales para algunos tipos de insectos una vez que se consumen, propiedad que permite utilizarlas como insecticidas. Los genes de estas endotoxinas fueron aislados de la bacteria y fueron integrados dentro del genoma de la planta para hacerla resistente (O'Brien, 2000).

El gen *cry1A(b)*, ha sido integrado establemente en muchos cultivos diferentes, entre ellos maíz, para controlar a las larvas de lepidópteros.

Hasta el año 2000, cinco eventos de transformación distintos en maíz han sido comercializados, los cuales se presentan en la tabla 6.

Es importante mencionar que dichos granos se importan en mezcla con maíz no transgénico hacia México (Gálvez, 2001).

Tabla 6. Eventos de maíz Bt comercializados en los Estados Unidos.

Nombre del Evento	Compañía Productora	Nombre común	Gene	Promotor	Aprobación de la UE
176	Novartis	KnockOut®	<i>cry1A(b)</i>	PEPC	Sí
Bt-11	Novartis	YieldGuard®	<i>cry1A(b)</i>	CaMV35S	Si
MON810	Monsanto	YieldGuard®	<i>cry1A(b)</i>	CaMV35S	Si
DBT418	DEKALB	BTXtra™	<i>cry1A(c)</i>	CaMV35S	No
CBH351	AgrEvo	StarLink™	<i>cry9C</i>	CaMV35S	No

PEPC – Promotor del gen de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa del maíz

Fuente: (O'Brien, 2000)

5.2 Tolerancia a herbicidas.

El manejo de las malezas en la producción extensiva de maíz es esencial para poder incrementar al máximo la producción de este cereal. Aún con crecimiento discreto, las malezas pueden afectar significativamente el rendimiento de los cultivos de maíz, porque ambos están en una continua competencia por los nutrientes y el agua. Es por esto que se aplican herbicidas para un control más efectivo de las malezas. El maíz modificado para tolerar herbicidas, particularmente los de amplio espectro, le confieren la capacidad de resistir el uso de agroquímicos, que tienen características de ser de baja toxicidad para mamíferos y permanecer poco tiempo en el suelo (O'Brien, 2000).

Se han aprobado para la comercialización en los Estados Unidos una gran variedad de cultivos transgénicos y que se manejan extensivamente en ese país (tabla 7). Es por lo tanto probable, que éstas sean las variedades de maíces GM que hayan sido importadas mayoritariamente a México en diversas mezclas con maíz no transgénico (O'Brien, 2000).

Tabla 7. Listado de las variedades de maíces GM desreguladas de EUA.

Marca Comercial	Evento
	MON832
NaturGard™ KnockOut™	Event 176
LibertyLink	T14
LibertyLink	T25
Yieldgard®	MON810
	MON809
Roundup Ready®	GA21
	MON802
	DLL25 (B16)
	Bt11, (X47334CBR)
InVigor™	MS3
	676
	678
	680
StarLink™	CBH-351
InVigor™	MS6
Roundup Ready®	NK603
	MON863
Bt Xtra™	DBT418
	Bt11, (X4334CBR)

Fuente: Obtenida a partir de datos de <http://www.agbios.com>

6. Estructura de un organismo genéticamente modificado.

Es importante describir la estructura de un OGM para identificar las secuencias potencialmente importantes para su detección. Las secuencias de ADN foráneo son llamadas insertos o construcciones. Un inserto típico presenta tres elementos fundamentales:

- Elemento promotor, indispensable para activar la expresión del gen de interés.
- El gen estructural o transgen que codifica para una proteína que va a conferir una característica específica
- Elemento terminador, delimita el sitio final de la transcripción del gen de interés y facilita la traducción del ARN mensajero.

Una construcción típica se presenta en la siguiente figura:

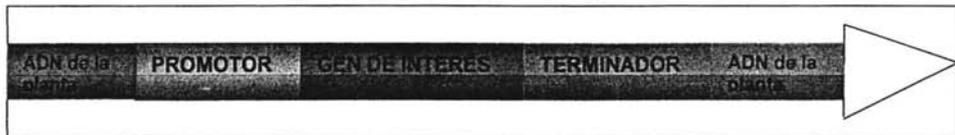


Figura 4. Esquema de una construcción genética convencional.

El elemento promotor, el transgén y el elemento terminador pueden proceder de un organismo diferente en especie, género y familia e, inclusive, diferente del reino del organismo hospedero.

Un ejemplo de la construcción genética Bt es la siguiente:



Figura 5. Ejemplo de los elementos más comunes de una construcción.

Esta construcción contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen que codifica para la endotoxina de Bt, el gen estructural Cry1Ab y el terminador NOS de la región 3'UTR del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Es decir, se tiene un promotor viral, un gen estructural de una bacteria Gram positiva y una secuencia terminadora aislada de una bacteria Gram negativa. Esta secuencia, aunque es de origen bacteriano, no es una "secuencia bacteriana" en el sentido de que su secuencia consenso está seleccionada por la naturaleza para ser reconocida por factores del aparato de transcripción eucariote vegetal (Zimmermann et al, 1998). Aparte de éstos pueden estar presentes otros elementos que se encargan de controlar y estabilizar la expresión del gen insertado, o bien, que permitan la identificación del inserto (Jensen, 2001).

El promotor CaMV35S es constitutivo y ha sido ampliamente utilizado, pero existen otras secuencias promotoras que se presentan a continuación.

Tabla 8. Promotores y terminadores más utilizados.

Promotores		Terminadores	
Siglas	Significado	Siglas	Significado
TR'1		nos	Nopalina sintasa
ocs	Octopina sintasa	ocs	Octopina sintasa
nos	Nopalina sintasa	CaMV 35S	virus del mosaico de la coliflor
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	EPSPS	5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa
Maize pollen – specific	promotor específico del polen		
CaMV 35S	virus del mosaico de la coliflor		

Fuente: MacCormick et al., 1998

En este caso, como se puede deducir de las tablas 8 y 10, el promotor mayormente utilizado comercialmente y en experimentación es el promotor CaMV35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. Además, ya que está presente en casi todos los maíces de la tabla 7, resulta un elemento útil en la detección de este tipo de organismos.

7. Métodos de detección de OGMs.

Comercialmente, hay dos formas más utilizadas para detectar modificaciones genéticas en cultivos. Un método involucra el análisis de la proteína expresada en el tejido y el otro método se basa en la detección de las secuencias específicas de ADN insertadas.

7.1 Métodos basados en la detección de proteínas transgénicas.

Las técnicas inmunoquímicas basadas en la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo permiten la detección de moléculas de distinta naturaleza química (James, 1995).

Los anticuerpos conocidos como inmunoglobulinas son proteínas de plasma producidas por los linfocitos como respuesta de la presencia de moléculas externas, mientras que los antígenos son los componentes extraños que inducen la formación de los anticuerpos. Los antígenos generalmente son macromoléculas como glicoproteínas, lipoproteínas o lipopolisacáridos (James, 1995). En 1959, inicia la era moderna de los inmunoensayos, cuando se utilizaron anticuerpos de alta afinidad contra la insulina, por su alta sensibilidad y especificidad (Brett et al.,

1999). Estos métodos se han aplicado principalmente en diagnóstico clínico pero su uso se ha extendido a las áreas agrícola y alimentaria. El sistema inmune es capaz de crear que anticuerpos que tienen diferente estructura, cada uno de estos anticuerpos es producido por diferentes células, por los que se les llama anticuerpos policlonales. Pero en 1975, se desarrollaron técnicas para fusionar linfocitos con células de mieloma de tal forma que cada hibridoma generado produce un tipo único de anticuerpo específico llamado monoclonal. El uso de este tipo de anticuerpos restringe la región reconocida y detectable, lo cual tiene una particular relevancia en los análisis de proteínas, ya que éstos anticuerpos son capaces de unirse en una forma extremadamente selectiva al antígeno (Brett et al., 1999).

La reacción entre el anticuerpo y el antígeno es altamente específica e involucra múltiples interacciones débiles entre el sitio de unión del antígeno conocido como epítipo o antígeno determinante y el anticuerpo (James, 1995).

7.1.1 ELISA

El método de ELISA se fundamenta en el uso de anticuerpos específicos para reconocer a la proteína de interés (Ausubel, et al., 1995). Este procedimiento es capaz de discriminar proteínas específicas presentes en el producto bajo análisis, de entre cientos y a veces miles de proteínas distintas presentes en la misma muestra (Brett et al., 1999).

El método de ELISA es extremadamente sensible, versátil y cuantitativo aunque, no necesariamente detecta a las proteínas que han sido modificadas o desnaturalizadas por algunos tratamientos. Por lo tanto, esta técnica, es más

conveniente para detecciones que se hagan directamente en las muestras sin tratamientos excesivos. El tiempo aproximado para realizar el análisis de ELISA puede variar de diez minutos a unas cuantas horas y no es recomendable aplicarlo en productos procesados a menos que se desee rastrear la proteína residual.

La técnica utiliza anticuerpos unidos covalentemente a las enzimas; de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos. Algunas enzimas de unión típicas utilizadas en los ELISAs son la peroxidasa, fosfatasa alcalina y β -galactosidasa, las cuales catalizan reacciones cuyos productos son coloridos y pueden medirse espectrofotométricamente en cantidades muy pequeñas (Madigan, 1998).

Existen varios tipos de ELISA el competitivo y el no competitivo. El competitivo utiliza dos antígenos y un anticuerpo. Los pozos de la placa son cubiertos con uno de los antígenos y con el anticuerpo conjugado a la enzima, entonces, se agregan las muestras y se deja incubando. Durante la incubación el anticuerpo puede unirse al antígeno de la placa o bien, al antígeno de las muestras. Mientras más antígeno exista en las muestras, el anticuerpo se unirá a éste y, habrá menor cantidad de anticuerpo unido al antígeno de la placa. Por el contrario, si la muestra contiene poco antígeno, entonces, el anticuerpo se unirá al antígeno de la placa. El color que se desarrolla es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

El no-competitivo se hace en forma de sándwich, en donde un anticuerpo está unido covalentemente a la placa y se emplea para "atrapar" al antígeno que se

encuentra en una mezcla compleja en solución. Después de lavar y eliminar los componentes no unidos, se agrega un segundo anticuerpo conjugado a una enzima. Este anticuerpo se une al antígeno atrapado y la reacción se completa por la adición del sustrato, que es modificado por la enzima generando un producto colorido. Si no hay antígeno, no se desarrolla el color (Ver figura 6) (James, 1995).

En la industria de los alimentos generalmente se utilizan los inmunoensayos para detecciones cualitativas de algunos componentes de los mismos o algunos contaminantes, también puede usarse para estimaciones cuantitativas como por ejemplo (James, 1995):

- ❖ Identificación de adulteración de carne de una especie con otra. (ELISA sándwich, cualitativo).
- ❖ Identificación de adulteración de leche.
- ❖ Identificación de proteínas en alimentos utilizando ELISA sándwich cuantitativa.
- ❖ Detección de aflatoxinas utilizando columnas de immuno-afinidad.
- ❖ Detección de productos veterinarios (ELISA competitiva) (James, 1995).

Para verificar la presencia de la toxina de Bt , se utilizan pruebas basadas en anticuerpos específicos para estas endotoxinas. La prueba de ELISA es, entre otras, utilizada para este propósito ya que es sensible y barata en comparación que otros métodos (<http://www.agdia.com>).

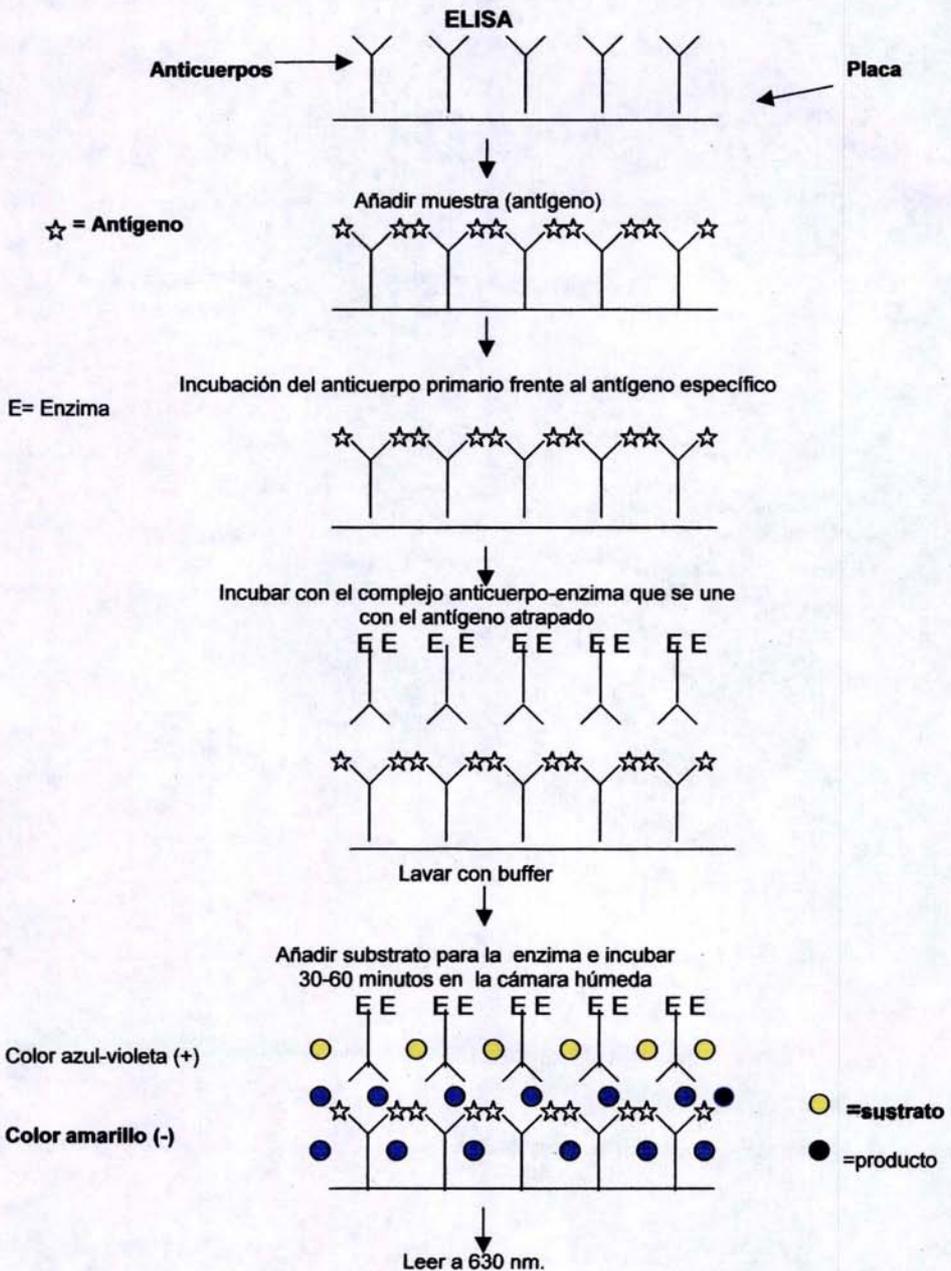


Figura 6. Esquematación de una reacción de ELISA (Madigan, 1998)

7.1.2 Tiras reactivas

La tira reactiva es una alternativa de la técnica de ELISA, también es llamada Banda de Flujo Lateral, la cual utiliza una combinación del anticuerpo específico para la proteína de interés (llamado anticuerpo de captura), con un anticuerpo conjugado que es capaz de generar una reacción colorimétrica (llamado anticuerpo de detección), el cual permite visualizar la presencia de la proteína deseada en la muestra analizada. Un diseño similar es utilizado en las pruebas de embarazo para uso doméstico que están disponibles comercialmente. Una banda colorida se formará en donde se acumule el anticuerpo. Si se forman las dos bandas coloridas quiere decir que es un resultado positivo, si sólo se forma una es un resultado negativo. Esto toma de 5 a 15 minutos para el desarrollo de color. Las tiras reactivas sólo indican la ausencia o presencia de la proteína (www.croplifeamerica.org).

7.1.3 Futuro potencial de los inmunoensayos para la detección de los OGMs.

Los inmunoensayos han resultado ser un método analítico, de detección específico y sensible de proteínas aún en mezclas complejas. La limitante en los inmunoensayos no es el crear anticuerpos que sean específicos para la proteína, sino que el anticuerpo creado sea capaz de reaccionar normalmente con la proteína en condiciones extremas de pH, o altas concentraciones de sal o disolventes (Brett, et al, 1999).

El método de PCR es más sensible, ya que puede amplificar unas cuantas moléculas de ADN, lo que le permite detectar a los OGMs aún en cantidades minúsculas. Es más caro y más laborioso que un ELISA (www.silliker.com).

También tiene el peligro de ser más susceptible de interferencias por contaminantes o mal tratamiento de la muestra.

7.2 Métodos basados en la identificación de ADN.

Para la detección de secuencias de ADN, las técnicas más utilizadas son la técnica de PCR y Southern Blot.

Puesto que las construcciones mencionadas en la tabla 7 frecuentemente contienen 35S y NOS, estos elementos son los más utilizados para detectar eventos de transformación comerciales. La detección de cualquiera de estos dos elementos no asegura la identificación del producto del OGM que se tiene, ya que ambos están incorporados en numerosos OGMs. Para poder ser identificados, las construcciones específicas, o los eventos específicos de transformación requerirían de sondas específicas para la secuencia del genoma que flanquea a la construcción transgénica. De esa forma es posible identificar inequívocamente la presencia de un evento comercial (Zimmermann et al., 2000).

7.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada a mediados de los años 80's por Kary Mullis y como consecuencia revolucionó la genética molecular, haciendo posible el estudio y análisis de genes (Watson, 1992).

La técnica de PCR puede tener muchas áreas de aplicación como son: biología molecular, secuenciación del ADN, estudios de evolución, investigaciones

forenses, análisis genéticos, diagnósticos médicos, biotecnología agronómica (Newton, 1995).

El principio de esta técnica es la amplificación de secuencias específicas de ADN a partir de un par de secuencias cortas de ADN de cadena sencilla, conocidas como "cebadores" que delimitan la región que será amplificada. La reacción tiene tres pasos (Ver figura 7).

1.-Desnaturalización. Las moléculas de ADN desapareadas se obtienen mediante un calentamiento de la solución de ADN a 94°C, temperatura suficiente para romper los puentes de hidrógeno que unen a las cadenas.

2.-Renaturalización ("Annealing"). Se disminuye la temperatura hasta aproximadamente 55°C. Los dos cebadores de aproximadamente 20-30 nucleótidos, que delimitan la región de interés, se unen por hibridación a su cadena complementaria, siempre y cuando esta secuencia se encuentre presente en el ADN molde. El molde de ADN, los cebadores, la ADN polimerasa y los nucleótidos son adicionadas desde el inicio reacción.

3.-Extensión. Finalmente, durante el paso catalizado por la ADN Polimerasa termoestable, se sintetiza la nueva cadena de ADN. El paso de polimerización se lleva a cabo a 72°C aproximadamente, gracias a que esta enzima es funcional a estas temperaturas, así como también soporta la temperatura de desnaturalización del ADN aplicada en el paso 1 de cada ciclo.

La PCR estándar se realiza generalmente en 20 a 50 ciclos constituidos por los pasos de desnaturalización, separación de las cadenas de ADN, unión de los cebadores y síntesis de ADN. El molde de la secuencia de ADN puede ser amplificado tantas veces como rondas de desnaturalización y polimerización se realicen. Tales ciclos repetitivos tienen como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico determinado por los extremos de los cebadores. Por lo tanto, 20 ciclos de PCR producen una amplificación de 2^{20} , es decir, aproximadamente, un millón de veces. Este método es altamente sensible y permite la rápida amplificación *in vitro*, partiendo de pequeñas cantidades de fragmentos de ADN, llamados también amplicones. Bajo condiciones ideales, son suficientes menos de 10 copias de una secuencia específica de ADN para amplificarlas por PCR y obtener una señal detectable, en esta cantidad, suficiente para realizar un análisis de ADN (Gachet, et al., 1999).

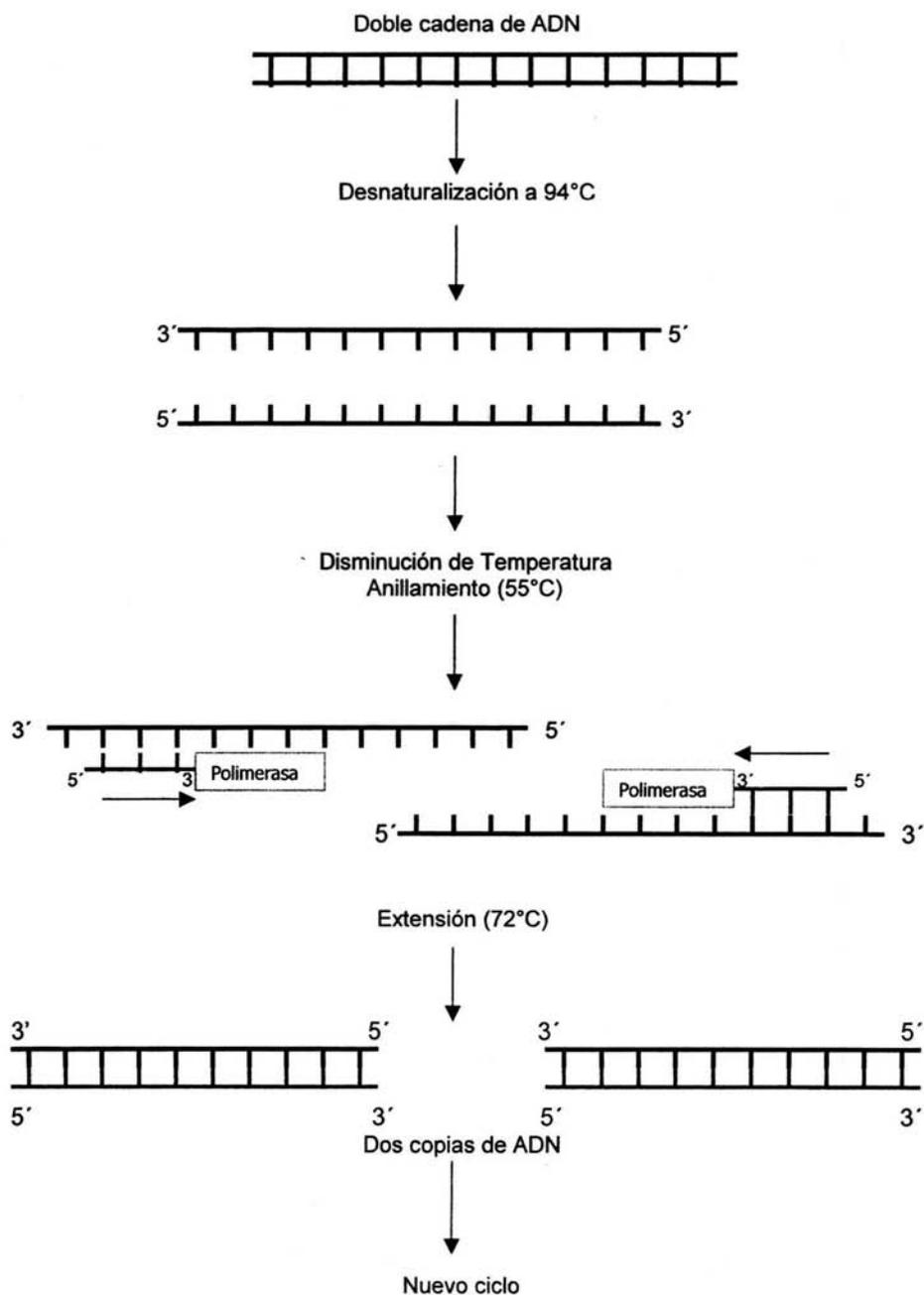


Figura 7. Esquemización de la reacción de PCR (Gachet, 1999)

7.2.2 Southern Blot

La hibridación permite la formación de complejos bicatenarios no naturales de ADN, ARN ó ADN:ARN. También permite la detección de fragmentos de ADN que son complementarios a fragmentos monocatenarios de secuencia conocida (sondas).

Cuando el procedimiento utiliza ADN como muestra se conoce como Southern Blot, en donde los fragmentos de ADN se separan por electroforesis, después se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, se añade la sonda radiactiva o químicamente marcada, que se une al fragmento con el que tenga complementariedad; entonces, se lava el material no hibridado y el fragmento complementado se detecta por autoradiografía (Madigan, 1998).

7.3 Comparación de los métodos de ELISA y PCR.

Sabiendo que los métodos más utilizados son el ELISA y PCR se decide comparar únicamente éstas dos técnicas.

La técnica de PCR requiere de personal y equipo especializado. Algunas características de esta técnica se mencionan a continuación.

- ❖ Puede ser extremadamente sensible, siendo capaz de detectar una o pocas copias del gen sin que necesariamente esté presente todo el material genético del organismo o su genoma.
- ❖ Como resultado de esta alta sensibilidad, muy bajos niveles de contaminación resultan en falsos positivos.

- ❖ Requiere de poco tiempo de desarrollo de los reactivos comparado con los ensayos inmunológicos (producción de cebadores vs producción de anticuerpos).
- ❖ Todos los reactivos están comercialmente disponibles y pueden ser adquiridos de casas comerciales.
- ❖ La PCR no está tan ampliamente validada como el ELISA, pero actualmente es el método que se utiliza en la Unión Europea.
- ❖ Es posible discriminar entre diferentes tipos de modificaciones genéticas, ya que distingue entre eventos específicos de transformación.
(www.croplifeamerica.org)

La técnica de ELISA al igual que la de PCR requiere de personal y equipo especializado. Algunas de sus características son las siguientes:

- ❖ Es menos sensible que el método de PCR, por lo tanto es menos susceptible que PCR a tener falsos positivos.
- ❖ Tiene un alto costo en el desarrollo y generación de los anticuerpos y los estándares de las proteínas.
- ❖ Pero por muestra el costo es menor que para PCR, una vez que los reactivos han sido desarrollados.
- ❖ Requiere de tiempo para el desarrollo de reactivos.
(www.croplifeamerica.org)

A continuación en la tabla 9, se presentan las diferentes características que presentan los métodos de ELISA y PCR, según la referencia marcada la PCR contempla la secuenciación.

Tabla 9. Características de los métodos de ELISA y PCR.

Método	Prueba para:	Costo/muestra	Duración	Facilidad de uso	Resultados
ELISA	Proteína	\$ 2 U.S.	2-8 horas	Moderado	Sensible
PCR	ADN	\$ 100-300 U.S.	1-3 días	Difícil	Muy sensible

Fuente: www.croplifeamerica.org

En nuestro grupo de laboratorio, en un reciente trabajo de tesis se propuso un análisis que también identifica ADN por PCR con un costo de \$35-45 U.S., contemplando también la secuenciación (correspondiendo a un 61% del costo) que es un método directo de identificación del fragmento amplificado (Luis, 2002).

IV. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Determinar el umbral de detección de los métodos de ELISA y PCR para proteínas y ADN, respectivamente, en harinas certificadas de maíz Bt.

Objetivos específicos:

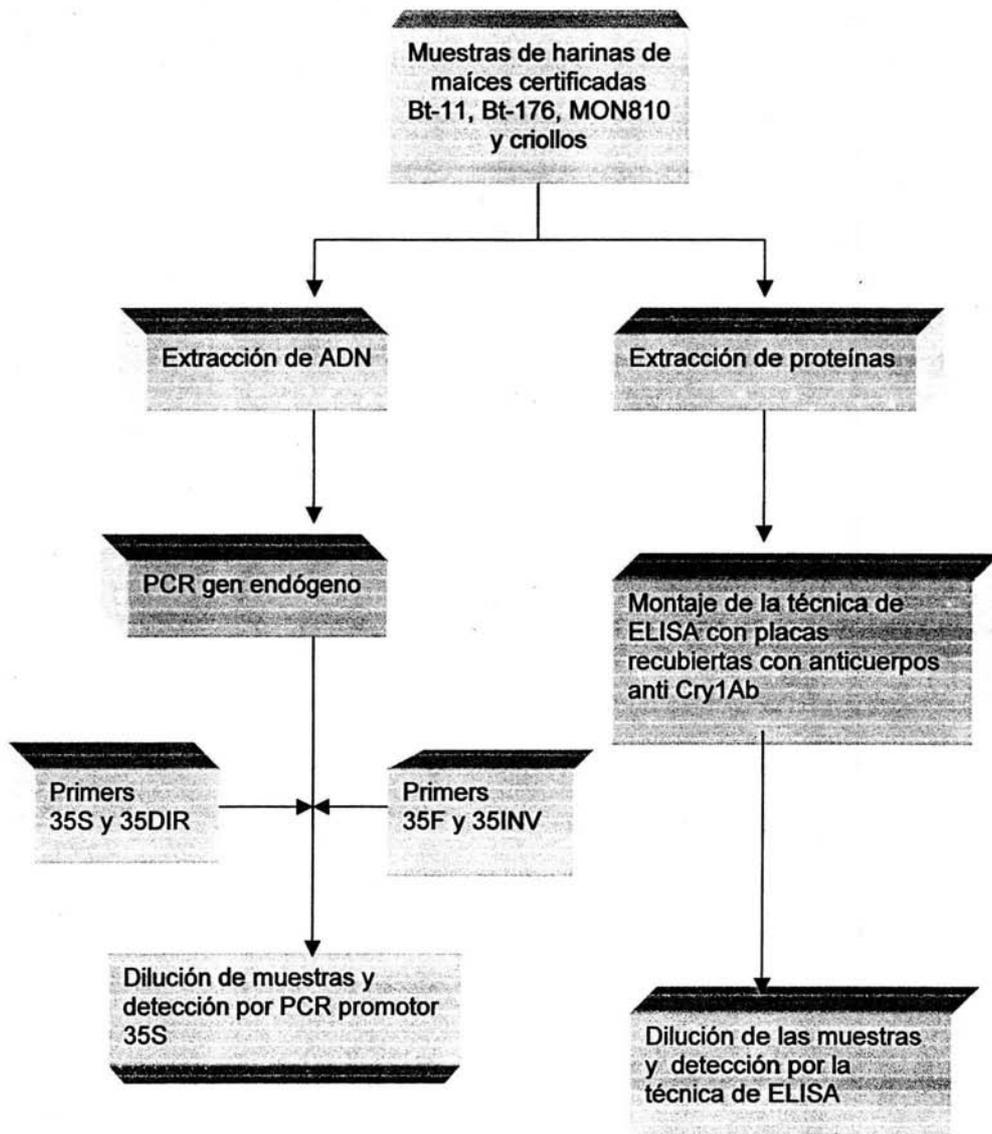
- ❖ Verificar la calidad del ADN extraído utilizando, como control de la reacción de PCR, un gen endógeno del maíz.

- ❖ Encontrar el umbral de detección para el método de PCR basado en la amplificación del ADN.

- ❖ Encontrar el umbral de detección para el método de ELISA en la determinación de la proteína heteróloga.

- ❖ Verificar la presencia o ausencia de secuencias transgénicas con la reacción de PCR, en harinas de algunos maíces criollos.

- ❖ Determinar si los maíces criollos expresan la proteína heteróloga correspondiente a la toxina Cry1Ab.

V. MATERIALES Y MÉTODOS**1. Estrategia experimental.**

2. Muestras de harinas de maíz transgénico certificadas:

Los controles positivos de las harinas de maíz transgénico certificadas que se utilizaron en el trabajo son los materiales certificados por el Institute for Reference of Materials and Methods (IRMM): Bt-11, Bt-176 y MON810. (FLUKA catálogo No. 09757, 17111 y 0221, respectivamente).

3. Descripción de las variedades de maíz Bt utilizadas en el estudio.

Las harinas Bt-11, Bt176 y MON810 fueron utilizadas en este estudio porque provienen de los eventos de transformación comerciales más vendidos frecuentemente, no sólo en Estados Unidos, sino en gran parte del mundo, las cuales fueron desarrolladas para conferirles resistencia al ataque del gusano barrenador europeo, conteniendo los siguientes elementos de construcción:

Tabla 10. Descripción de los eventos de OGMs utilizados en este estudio.

Nombre del Evento	Compañía Productora	Promotor	Gene	Terminador	Marcadores de resistencia
Bt-11	Novartis	CaMV35S CaMV35S	<i>cry1A(b)</i> <i>pat</i>	NOS NOS	<i>pat</i> , <i>bla</i> (no se incorporó)
Bt-176	Novartis	PEPC CaMV35S CDPK	<i>cry1A(b)</i> <i>bar</i> <i>cry1A(b)</i>	CaMV35S CaMV35S CaMV35S	<i>bar</i> , <i>bla</i>
MON810	Monsanto	CaMV35S	<i>cry1A(b)</i>	NOS	

Fuente: <http://www.agbios.com>

Los tres eventos de transformación contienen un transgén en común: *Cry1A(b)*, que se describe detalladamente a continuación. www.agbios.com

3.1 Gen *cry1A(b)*

El gen *cry1A(b)* utilizado para dar resistencia a estos maíces fue derivado de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* (BtK), cepa HD-1. Este gen codifica para la δ -endotoxina que actúa contra ciertas especies de insectos lepidópteros incluyendo al gusano europeo barrenador (ECB, *Ostrinia nubilalis*). La secuencia del gen *cry1A(b)* insertado en estos eventos de transformación utilizados en el estudio, entre otros, que codifica la región N-terminal de 648 aminoácidos de la proteína nativa total de 1155 aminoácidos, ha sido truncada en la posición 3'terminal y modificada para incrementar el nivel de expresión en maíz. Este péptido de 648 aminoácidos incluye la porción responsable de la actividad insecticida. www.agbios.com

3.2 Gen *pat*.

Se deriva del microorganismo del suelo *Streptomyces viridochromogenes* cadena Tu494. Este gen codifica para la enzima fosfonotricin-acetil transferasa (PAT), la cual modifica e inactiva al herbicida glufosinato de amonio. La secuencia de ADN del gen ha sido alterada para que pudiera expresarse en plantas, pero la secuencia de aminoácidos de la proteína PAT no ha sido alterada. www.agbios.com

3.3 Gen bar.

El gen bar se deriva del microorganismo *Streptomyces hygroscopicus* y confiere resistencia al herbicida fosfinotricina. El gen bar fue utilizado como marcador para poder distinguir las células del maíz transformado de las células que no fueron transformadas www.agbios.com.

3.4 Gen bla.

El gen bla fue utilizado también como marcador de selección de las células transformadas. Se deriva de *Escherichia coli* y codifica para la enzima β -lactamasa, la cual confiere resistencia a antibióticos de espectro moderado como la ampicilina y la penicilina. El gen bla es utilizado bajo control de un promotor bacterial www.agbios.com.

4. Muestras de Criollos:

Las muestras de maíces criollos fueron donadas por la Asociación de Productores Asistencia Social Productiva, A.C.

Tabla 11. Maíces criollos.

No. de muestras	Muestras de maíces criollos tipo:	Lugar de origen
1	Chalqueño	Edo. de México
2	Cacahuacintle	Edo. de México
3	Criollo Cremoso	Tlaxcala
4	Criollo Azul	Tlaxcala
5	Híbrido Blanco	Guanajuato
6	Criollo Blanco Jiquipilco	Edo. de México
7	Colorado Teremendo	Michoacán
8	Aceitero anaranjado	N.D.

N.D. No determinado

5. Preparación de las muestras y diluciones a evaluar.

Con el fin de determinar las cantidades mínimas posibles que los métodos de ELISA y PCR son capaces de determinar, se realizaron diluciones de las harinas certificadas de 2 y 5% de acuerdo con lo siguiente:

Procedimiento:

1. Pesar 50 mg de harina de maíz transgénico certificada de 2% (Bt-11 y MON810) y 5%(Bt-176).

2. Añadir 450 mg de harina de maíz blanco (no transgénico)^{ee}.
3. Mezclar hasta obtener homogeneidad en el polvo.
4. Para la dilución 0.02% se toman 50 mg de harina 0.2% y se añaden 450 mg de maíz blanco.
5. Para una dilución 0.002 % se toman 50 mg de harina 0.02% y se añaden 450 mg de harina de maíz blanco, y así sucesivamente para las demás diluciones.

Enseguida aparece la tabla 12 donde se muestran las diluciones de las tres variedades analizadas en el presente trabajo, así como las diluciones que con agua se hicieron sobre cada dilución previamente hecha con maíz. El propósito de diluir también con agua fue evaluar si hubiera alguna diferencia al diluir únicamente con maíz no-transgénico, pues podría esperarse que la matriz harinosa protegiera al ADN y en el caso de las diluciones acuosas, que el ADN fuera más lábil. Las diluciones practicadas aparecen en la tabla 12.

^e Este maíz es la raza Chalqueño que se sabía que no era transgénico y además fue sometido a las pruebas de amplificación de ADN y resultó negativo.

Tabla 12. Muestras de harinas de maíz certificadas y sus respectivas diluciones utilizadas.

No. de muestra	Muestra y diluciones con maíz blanco (no transgénico)	Diluciones con agua					
		1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
1	Bt-11 (2%)	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
2	0.2%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
3	0.02%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
4	0.002%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
5	0.0002%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
6	0.00002%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
7	Bt-176 (5%)	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
8	0.5%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
9	0.05%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
10	0.005%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
11	0.0005%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
12	0.00005%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
13	MON810 (2%)	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
14	0.2%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
15	0.02%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
16	0.002%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
17	0.0002%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
18	0.00002%	1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000

6. Extracción de ADN

6.1 Fundamento de la extracción de ADN con DNAzol (GIBCO-BRL).

El reactivo DNAzol (DNAzol Reagent, Life Technologies) (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, es precipitado con isopropanol. El método es rápido y permite la extracción de 70-100% del ADN presente en las muestras.

6.2 Extracción de ADN genómico de granos individuales de maíz y de harinas de maíz certificadas con DNAzol (GIBCO-BRL).

El método recomendado por el fabricante se modificó para la extracción de ADN a partir de granos y harinas de maíz, como se menciona a continuación.

Los pasos siguientes se aplicaron para las harinas y para las muestras de maíces criollos que fueron examinadas.

1. Pesar entre 40 y 60 mg de muestra.
2. Para granos de maíz:
 - a. Separar el embrión del resto del grano, haciendo los cortes necesarios con un bisturí para disminuir interferencias por la presencia de carbohidratos principalmente.
 - b. Colocar los embriones en un tubo eppendorf de 1.5 ml y vaciar nitrógeno líquido dentro del tubo.

c. Esperar a que se evapore el nitrógeno líquido y pulverizar el embrión con una punta de pipeta de 1 ml sellada, se sella la apertura chica de la punta en el mechero).

Para las muestras de harina se pesan 40 – 60 mg.

3. Agregar al polvo un mL de DNAzol y homogeneizar agitando el tubo por inversión aproximadamente 10 veces con movimientos suaves para evitar posibles daños al ADN.
4. Centrifugar 10 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente para separar 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 punta.
6. Agregar 0.5 mL de isopropanol frío (-20°C) y mezclar por inversión.
7. Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
8. Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante por decantación.
9. Lavar con 1 mL de etanol al 70% y centrifugar 2 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente, y eliminar el sobrenadante por decantación.
10. Dejar secar el precipitado dejando el tubo abierto por unos 15 minutos.
11. Disolver el DNA en 50 μ L de NaOH 10 mM e incubar 15 minutos a 37°C para ayudar a disolverlo. Se observa un material blanco insoluble que está formado principalmente por carbohidratos.

12. Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente para eliminar el material insoluble y tomar el sobrenadante con una punta de pipeta ensanchada de la punta para pasarlo a un tubo limpio.
13. Neutralizar con 1/20 del volumen de Tris 1M, pH 8.

En la tabla 13 se muestra los reactivos utilizados para la extracción, la cual se muestra en el anexo III.

6.3 Concentración de extractos de ADN.

En la extracción realizada a partir de 40-60 mg de muestra de eje embrionario de maíz chalqueño, 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 de agarosa con bromuro de etidio o bien por espectroscopía, cuyos límites de detección son 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (Ausubel et al., 2000).

Para visualizar la presencia de ADN genómico en los extractos, se realizaron 10 extracciones y se procedió a concentrarlas mediante el siguiente método:

- 1.- Reunir los productos de 10 extracciones sencillas (aproximadamente 400 μL) en un tubo eppendorf limpio.
- 2.- Adicionar 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M (aproximadamente 40 μL).
- 3.- Adicionar isopropanol equivalente al volumen total (aproximadamente 440 μL).
- 4.- Mantener 1h a -70°C .
- 5.- Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.

- 6.- Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Lavar con 1 mL de etanol al 70%
- 8.- Dejar secar.
- 9.- Redisolver en la menor cantidad posible de agua desionizada estéril.
- 10.- Cargar en un gel de agarosa al 0.8% y visualizar con bromuro de etidio.

En la tabla 14 se muestran los reactivos utilizados para la concentración, la cual está en el anexo III.

7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

7.1 Cebadores (Primers)

7.1.1 Cebadores para la amplificación de un fragmento del gen endógeno.

Los cebadores RPA-1 y RPA-2 fueron 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).

Enseguida se describe la secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación que se mencionó anteriormente, así como su temperatura de anillamiento.

5' gctggtggtttcaagtccat 3' (sentido) Primer RPA-1 Tm = 60

5' atccagaccctaaaagcttca 3' (antisentido) Primer RPA-2 Tm = 50

La secuencia del producto esperado se muestra a continuación:

001 gctggtggtttcaagtccatgtattctgatagagtttttctgtctccat
 051 cacaagtgatcctgccatgggccaggaaaaggtactatcctgaatattca
 101 ctgaaatatgacactgttcgtatctttaattgaagaattgcaaattctgga
 151 gaagctccaattcgacttcgacttcttgttttcccttgagcctgtttt
 201 cttcagtttgtatgccaccataagccacatcaagcctgaccagaacatgt
 251 ggtaccgtgcttgaagacctgcaacaagaaggtgacttgaagcttttgg
 301 gtctggat

7.1.2 Cebadores para la amplificación de un fragmento del promotor 35S.

En pruebas preliminares se emplearon los cebadores 35S-R y 35-DIR obteniendo un fragmento de 280pb, posteriormente se decidió emplear los cebadores 35-F y 35-INV, que amplificaban un fragmento de 151 pb para el resto de las reacciones (Luis, 2002).

Enseguida se describe la secuencia y temperaturas de anillamiento correspondientes de los cebadores.

35S-R y 35-DIR :

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

5' gatagtgggattgtgcgtca 3' (antisentido) $T_m=60^{\circ}\text{C}$ Primer 35S-R

35-F y 35-INV :

5' gctcctacaaatgcatca 3' (sentido) $T_m=56^{\circ}\text{C}$ Primer 35S-F

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

El promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S se encuentra en las construcciones genéticas de la mayoría de las plantas MG actualmente aprobadas para cultivo comercial. La secuencia para los cebadores requeridos se recuperó en la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática con página web (<http://www.ebi.ac.uk/>). Dicha secuencia se presenta a continuación y se indica el sitio en el cual se aparean los cebadores descritos anteriormente (Luis, 2002):

35S larga

001 gaattcccatggagtcaaagattcaaatagaggacctaacagaactcgc
050 cgtaaagactggcgaacagttcatacagagtctcttacgactcaatgac
099 aagaagaaaatcttctgtcaacatggtggagcacgacacgcttgtctact
148 caaaaaatatcaaagatacagtcctcagaagaccaaagggcaattgagac
197 ttttcaacaaagggtaatatccggaaacctcctcggattccattgcca
246 gctatctgtcactttattgtgaagatagtggaaaaggaaggtggctcct
295 acaaatgccatcattgcgataaaggaaaggccatcgttgaagatgcctc
344 tgccgacagtggccccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtg
393 gaaaagaagacggtccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtg
442 atatctcactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgca
491 agacccttcctctatataaggaagttcatttcatttgagaggacaggg
540 ta

7.2 Reacciones en Cadena de la Polimerasa.

Todas las Reacciones en Cadena de la Polimerasa se llevaron a cabo en un termociclador de la marca Techgene (Modelo FTGENE 2D, Inglaterra).

7.2.1 PCR para gen endógeno.

Se realizó con el siguiente programa de tiempos y temperaturas:

3 min a 94°C 1 ciclo

40 s a 94°C

40 s a 58°C 35 ciclos

40 s a 72°C

7 min a 72°C 1 ciclo

En la siguiente tabla se presentan los reactivos empleados para esta PCR.

En la siguiente tabla se presentan los reactivos utilizados para esta reacción.

Tabla 16. Reactivos empleados para la PCR del promotor 35S.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Buffer PCR	10X	1X	B. M	ROCHE
MgCl ₂	25mM	2.5mM	B. M	ROCHE
dNTP's	10mM	0.2mM	B. M	GIBCO BRL
Cebador 35S- R/35-S-F	20 μ M	0.5 μ M	B. M	GIBCO BRL
Cebador 35- DIR/35-INV	20 μ M	0.5 μ M	B. M	GIBCO BRL
Taq polimerasa	5U/ μ L	1 U/reacción	B. M	GIBCO BRL
ADN molde	1 μ L es el volumen determinado experimentalmente como el necesario para que se lleve a cabo la reacción.			
H ₂ O	c.b.p. 20 μ L			

7.3 Electroforesis en geles de agarosa.

1.- Preparar agarosa al 1.0% ó 2.0% según sea el caso, utilizando TBE 1X (8.9 mM Tris, 8.9mM ácido bórico, 0.2 mM EDTA a pH 8.3) como disolvente y buffer de corrida en el gel. Puede hacerse un "stock" y fundirse el volumen que se requiera, siempre que no se le haya añadido bromuro de etidio (10 mg/mL).

- 2.- A la agarosa fundida, se le adiciona bromuro de etidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- 3.-El voltaje de la fuente de poder debe ser de 80-100 V y el tiempo de corrida 45 minutos a 1 hora.
- 4.- La visualización se realiza utilizando un transiluminador de luz UV.
- 5.-Se corre un carril con marcadores moleculares de 50 pb
- 6.-Se carga de 6 a 7 μL de muestra por pozo.

En la tabla 17 se muestran los reactivos utilizados para un gel de electroforesis, la cual está en el anexo III.

8. ANÁLISIS INMUNOQUÍMICOS.

Actualmente existen en el mercado kits inmunológicos para ser aplicados directamente en un laboratorio, es decir, que ya contienen los anticuerpos específicos para el antígeno seleccionado, tal es el caso de la placa de ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) que se utilizaron en este caso, ya que es una prueba bien establecida para detectar la presencia de endotoxinas Bt.

Utilizando este sistema, se puede detectar la expresión de la proteína cry1Ab, de niveles tan bajos como 1 ng/mL de extracto, de acuerdo a lo que el fabricante indica. Y en este trabajo se trató de verificar su presencia en el tipo de muestras manejadas: granos y harinas.

El kit utilizado para este estudio cuenta con una placa de 96 pozos recubierta con anticuerpos anticry, específicos para la proteína Cry1Ab, los amortiguadores necesarios para la extracción y el lavado, el amortiguador para la enzima, el conjugado de la enzima fosfatasa, el sustrato para la enzima, y los controles positivo y negativo. www.agdia.com

8.1 Preparación de reactivos.

Para la preparación de la siguiente placa se prepararon todos los buffers y reactivos el mismo día que se utilizaron, los cuales se mencionan a continuación en la siguiente tabla (tabla 18).

Tabla 18. Reactivos empleados para ELISA.

REACTIVOS	DESCRIPCIÓN
Amortiguador PBS-T	Amortiguador de lavados
Amortiguador MEB	Amortiguador de extracción
Amortiguador ECM	Amortiguador del conjugado para la enzima
Conjugado de la enzima	Enzima fosfatasa alcalina conjugada a IgG anticonejo
Solución del sustrato BP-A	Sustrato para la enzima
Solución del sustrato BP-B	Sustrato para la enzima
Control positivo	Parte truncada de la endotoxina Cry1Ab purificada
Control negativo	

❖ **Amortiguador PBST (amortiguador de lavados).**

1. Diluir el amortiguador concentrado PBS-Tween (PBST) 20X con agua destilada para una concentración de 1X

❖ **Amortiguador MEB (amortiguador de extracción)**

Por cada 100mL que se vayan a preparar:

1. Pesar 0.4 g de la leche en polvo deshidratada y libre de grasas.
2. Pesar 0.5 g de Tween-20.
3. Se añaden 100mL del amortiguador PBST
4. Se disuelve a temperatura ambiente.

❖ **Amortiguador ECM (Conjugate buffer)**

Por cada 25mL de buffer a preparar se realiza lo siguiente:

1. Pesar 0.1 g de la leche en polvo deshidratada y libre de grasas en un recipiente limpio y seco.

2. Agregar 25 mL del amortiguador PBST.
3. Mezclar a temperatura ambiente.

❖ **Controles positivos y negativos.**

1. Reconstituir el liofilizado añadiendo 2.5 mL de buffer de extracción.

❖ **Conjugado de la enzima (ECM).**

Diluir la enzima fosfatasa alcalina conjugada en el amortiguador conjugado de la siguiente manera:

- a. El volumen del conjugado de la enzima requerida, depende del número de pozos que se vayan a utilizar.
- b. Se necesitan 100 μ L del conjugado de la enzima por cada pozo. Para estimar el volumen necesario se prepara 1 mL por cada ocho pozos.
- c. Por ejemplo, si la dilución requerida es 1:100 (enzima : conjugado de la enzima), y si se desearía preparar 10 mL del conjugado de la enzima, se debería colocar 10mL de amortiguador ECM y después añadir 100 μ L de la enzima fosfatasa alcalina.
- d. Por lo tanto, se utilizaron 54 pozos por 100 μ L del ECM, entonces se colocan 54 μ L del conjugado más 5.4 mL del buffer ECM.
- e. La dilución del conjugado enzimático se realiza 10 minutos antes de utilizarse.

❖ **Solución del sustrato.**

Aproximadamente 15 minutos antes de que termine la incubación se realiza lo siguiente:

1. Mezclar cantidades iguales del sustrato BP-A y el sustrato BP-B en un recipiente limpio.
2. Calcular la cantidad mínima necesaria por la siguiente fórmula: $0.1 \times$ [Número de pozos] (para cada una de las soluciones)
3. Se formará una solución color amarillo. No debe exponerse la solución a la luz.

8.2 Extracción de Proteína

8.2.1 Extracción de proteínas de las harinas de maíces criollos y las harinas de maíz transgénicas certificadas.

Los pasos siguientes se realizaron para las dos clases de harinas (de criollos y certificados):

1. Pesar entre 50 y 100mg de harina de maíz.
2. Agregar entre 500 y 1000 μ l de buffer de extracción MEB de acuerdo a la cantidad de muestra (relación 1:10)
3. Mezclar en el vórtex.
4. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
5. Colocar el sobrenadante en un tubo limpio.

Se utilizaron las mismas harinas de maíz de criollos y transgénicas certificadas para realizar las extracciones de proteína para ésta técnica. Se utilizaron las mismas diluciones que se mencionan en la tabla 12.

8.2.2 Preparación de la placa de ELISA Bt-Cry1Ab.

La placa se organizó de la siguiente manera:

En las primeras tres líneas se coloca la curva patrón en concentraciones crecientes para lo cual el control positivo (lío-filizado) se reconstituye con 2.5mL de buffer MEB, el cual tiene una concentración de 32ng/mL y a partir de esta concentración se realizan las diluciones necesarias para obtener la curva siguiente: 32, 16, 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.75, 0.5 y 0.25 ng/mL. El blanco de reactivos, primeros dos pozos: A1 y B1 utiliza el buffer de extracción.

El control negativo que es maíz no transgénico proporcionado por la empresa, al igual que el positivo se reconstituye con 2.5 mL del buffer MEB.

A continuación, se colocaron en los pozos los extractos de las harinas de maíz transgénicas Bt-176 y Bt-11 y sus diluciones, finalmente se colocaron los extractos de los maíces criollos. Cada muestra se vació en los pozos por duplicado.

La lectura se realizó en un lector de microplacas marca BIORAD (Benchmark).

Fig. 8. Esquema de la placa de ELISA 1.

	1	2	3	4	5	6	7
A	0	1.0	8.0	Bt-176 5%	Bt-11 2%	Criollos J	Ct
B	0	1.0	8.0	5%	2%	J	Ct
C	0.25	2.0	16.0	0.5%	0.2%	Cac	CC
D	0.25	2.0	16.0	0.5%	0.2%	Cac	CC
E	0.5	4.0	32.0	0.05%	0.02%	CA	CH
F	0.5	4.0	32.0	0.05%	0.02%	CA	CH
G	0.75	6.0	Control -	0.005%	0.002%	Hb	
H	0.75	6.0	Control -	0.005%	0.002%	Hb	

Las columnas 6 y 7 que llevan los extractos de maíces criollos con las siguientes claves que corresponden a las variedades criollas ensayadas:

- J Maíz Jiquipilco
- Cac Maíz Cacahuacintle
- CA Criollo Azul
- Hb Híbrido Blanco
- Ct Colorado Teremendo
- CC Criollo cremoso
- CH Chalqueño

En la segunda placa, que enseguida se describe, se consideró ya la muestra de MON810.

Fig. 9 Esquema de la placa de ELISA 2.

	1	2	3	4	5	6
A	0	1.0	8.0	MON 810 2%	Bt-11 2%	Bt-176 5%
B	0	1.0	8.0	2%	2%	5%
C	0.25	2.0	16.0	0.2%	0.2%	
D	0.25	2.0	16.0	0.2%	0.2%	
E	0.5	4.0	32.0	0.02%	0.02%	
F	0.5	4.0	32.0	0.02%	0.02%	
G	0.75	6.0	Control -	0.002%	0.002%	
H	0.75	6.0	Control -	0.002%	0.002%	

❖ **Preparación de la cámara húmeda.**

En una caja de plástico de cierre hermético se colocan varias toallitas de papel mojadas en el fondo, tapándose, para que se forme una atmósfera húmeda que impida la evaporación de las muestras.

a. Reacción en la placa

1. Colocar 100 μ L de cada muestra en su respectivo pozo.
2. Después se colocan 100 μ L de la enzima a cada una de las muestras anteriores.
3. Dejar incubando en la caja "húmeda" toda la noche a temperatura de 4°C.
4. Una vez lista la incubación vaciar el contenido volteando la placa rápidamente.
5. Lavar los pozos con buffer PBST 1X, llenando los pozos con el amortiguador de lavado PBST 1X y vaciar enseguida.
6. Repetir el lavado de 6 a 7 veces.
7. Realizar un último lavado con un tiempo de incubación de 3 minutos a temperatura ambiente en la caja "húmeda"
8. Vaciar el contenido y dejar escurrir en una hoja de papel; se sacude hasta que estén secos los pozos.
9. Colocar 200 μ L del sustrato BP-A + BP-B
10. Dejar incubando de 30 a 60 minutos en la caja "húmeda"
11. Se lee a 630 nm
12. Visualmente : un color azul indica reacción positiva y un color amarillo indica reacción negativa.

8.3 Determinación de Proteína por el método de Lowry modificado para detergentes.

Se realizó la determinación de proteína por Lowry para verificar que la cantidad de proteína que se extrajo es la máxima posible por el método de ELISA.

8.3.1 Fundamento del método de Lowry para la cuantificación de proteína.

El método de Bio-Rad DC Protein Assay es un método colorimétrico para medir la concentración de proteínas en presencia de una solución con detergentes. El método está basado en la reacción de la proteína con una solución alcalina de cobre y el reactivo de Folin, el cual se reduce con las proteínas formando un complejo de color azul. Por lo tanto, como en el método de Lowry convencional, hay dos pasos fundamentales para desarrollar el color: la reacción de la proteína con el cobre en un medio alcalino y la reducción del reactivo de Folin por el complejo cobre-proteína, dando un color azul con un máximo de absorbancia a 750 nm y un mínimo a 405 nm.

8.3.2 Reactivos empleados para la determinación.

Aparecen listados en la siguiente tabla:

Tabla 19. Reactivos empleados para la determinación de proteína por el método de Lowry modificado.

REACTIVO	DESCRIPCIÓN
Reactivo A	Solución de cobre alcalina
Reactivo B	Reactivo de Folin
Reactivo S	SDS

Para la utilización del reactivo S se realiza lo siguiente:

- a. Por cada mL que se vaya a utilizar del reactivo A se añaden 20 μ L del reactivo S. (Reactivo A + Reactivo S = Reactivo A')

8.3.3 Determinación de proteína

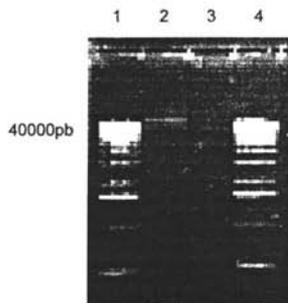
Preparar una curva estándar con el mismo buffer de la muestra, en este caso, el amortiguador MEB. La curva se prepara con albúmina sérica bovina con una concentración de 0 a 100 μ g proteína / mL.

1. Colocar 100 μ L del estándar o de las muestras en tubos limpios y secos.
2. Añadir 500 μ L del Reactivo A' a cada tubo.
3. Mezclar en un vortex.
4. Añadir 4.0 mL del reactivo B a cada tubo.
5. Mezclar en un vortex.
6. Después de 15 minutos, se pueden leer las absorbancias a 750 nm.

VI. RESULTADOS.

1. Análisis de ADN genómico.

La extracción que se llevó a cabo partiendo de 40 mg de embriones de maíz (extracción sencilla), permite obtener ADN que no se logra visualizar mediante electroforesis en gel, debido a su baja concentración, pero que sí es suficiente para llevar a cabo la técnica de PCR. Para poder visualizarlo se concentraron 10 extracciones sencillas con la finalidad de verificar la integridad del ADN genómico. Así que se cargó un gel de agarosa al 1%, junto con un marcador de 1 Kb. El ADN genómico extraído mostró tener un peso molecular superior a 40,000 pb, mostrando que la extracción no degrada al material y se espera que tenga la calidad suficiente para ser utilizado en una PCR, lo cual deberá demostrarse en las reacciones siguientes, ver figura 10.



2. Amplificación del gen RPA-1.

El gen endógeno RPA-1 se utilizó como control de la reacción de PCR, ya que se encuentra presente en bajo número de copias en el genoma del maíz, similar a lo que sucede con el transgén. Este gen codifica para la proteína de replicación A-1 (RPA-1) y, como es característico de cualquier maíz, se encuentra también en los productos transgénicos, así que se utilizó para verificar que el ADN extraído permite realizar las amplificaciones.

Para esta PCR se emplearon los cebadores RPA-1 y RPA-2 los cuales amplifican un fragmento de 307pb. Las condiciones se mencionan en la tabla 15 de materiales y métodos, y los resultados se visualizan en el gel de la figura 11.

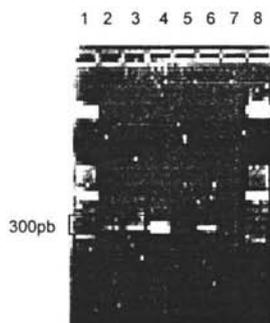


Fig. 11. Productos de amplificación del gen endógeno RPA-1 a partir de maíces criollos en un gel de Agarosa al 2%.

1 y 8: Marcador Molecular XIII
2: Maíz Chalqueño
3: Maíz Cacahuazintle
4: Maíz Aceitero anaranjado
5 y 7: Blancos
6: Muestra de Harina de maíz transgénica

En esta figura se observa una banda muy cercana a los 300 pb, que corresponde al producto de amplificación del gen endógeno del maíz RPA-1, encontrado en las muestras utilizadas en esta prueba preliminar que fueron: Chalqueño (carril 1),

Cacahuacintle (carril 2) y Aceitero anaranjado (carril 3) y la muestra de Harina transgénica certificada (carril 6). Así mismo se determinó también el volumen óptimo de extracto necesario en la reacción para llevar a cabo la amplificación correctamente, el cual fue de 1 μ L. Los carriles 5 y 7 corresponden a los blancos de la reacción.

Se corrió una segunda PCR para gen endógeno RPA-1, con el resto de los maíces criollos, obteniéndose el mismo resultado, es decir que se presenta la banda deseada, de 300 pb característica de este gen en todos los criollos.

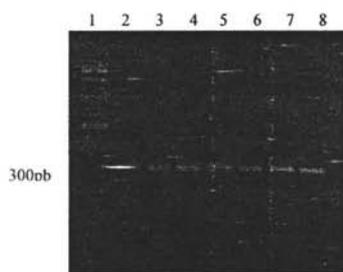


Fig 12. Productos de la amplificación del gen endógeno RPA-1 a partir de muestras de maíces criollos en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1 : Marcador Molecular XIII
 Carril 2 : Maíz criollo blanco Jiquipilco
 Carril 3 : Maíz Cacahuazintle
 Carril 4 : Maíz Híbrido blanco
 Carril 5 : Maíz Colorado Teremendo
 Carril 6 : Maíz Criollo Azul
 Carril 7 : Maíz criollo Cremoso
 Carril 8 : Marcador Molecular XIII

Nota: La última banda tiene el mismo PM que todas las demás, pero se distorsiona un poco por efecto de la foto.

3. Detección de la secuencia de ADN del promotor 35S.

3.1 Para maíces criollos.

En las estrategias para la búsqueda de materiales transgénicos es frecuente utilizar este promotor como la secuencia blanco ya que, como se mencionó anteriormente el promotor CaMV35S es uno de los más utilizados en las construcciones genéticas de variedades comercializadas (ver tabla 6).

Para la detección de los OGMs, en este estudio se realizó una PCR específica para detectar secuencias blanco provenientes del promotor 35S utilizando los cebadores 35-DIR y 35S-R, los cuales flanquean un fragmento de 280 pb. Las condiciones utilizadas para esta reacción se mencionan en la tabla 16 en materiales y métodos. El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR para el promotor 35S se presentan en la siguiente figura.

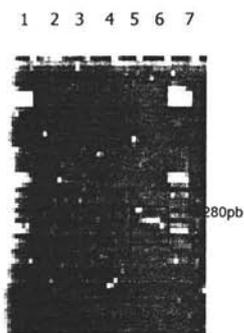


Fig 13. Análisis de los productos de amplificación del promotor 35S en un gel de Agarosa al 2% para tres variedades criollas y un control positivo de harina de maíz GM certificada.

- 1 y 7. Marcador Molecular XIII
- 2: Maíz Chalqueño
- 3: Maíz Cacahuacintle
- 4: Maíz Aceitero anaranjado
- 5: Blanco
- 6: Muestra de Harina de maíz transgénica certificada Bt-176

Es esta figura se obtuvo como único resultado una banda de 280pb en el carril número 6, que corresponde al control positivo.

En cualquiera de estos casos, la banda obtenida como producto de amplificación no es una evidencia concluyente si sólo se conoce su peso molecular. Generalmente, debe secuenciarse el ADN de esa banda y la secuencia obtenida debe alinear con la secuencia del molde. La secuenciación de los amplicones de 280 pb obtenidos con los primers 35R y 35DIR fue realizada en una investigación previa de nuestro grupo y se comprobó que en efecto se aparean en la zona esperada de la secuencia del promotor 35S (Luis, 2002).

En lo que respecta a las muestras utilizadas Chalqueño (carril 2), Cacahuacintle (carril 3) y Aceitero anaranjado (carril 4) no se observa dicha banda, lo que indica que no contienen secuencias que permitan el apareamiento con cebadores diseñados para el promotor 35S, por lo tanto no pueden ser molde para productos de la PCR de 280pb. En esta estrategia preliminar y considerando que el promotor 35S ha sido el promotor más comúnmente utilizado en los transgénicos comerciales de maíz, podría pensarse que no se trata de productos genéticamente modificados. En las figuras 14 y 15 se muestran los análisis electroforéticos de los productos de amplificación de todos los maíces criollos estudiados en esta tesis. En esta ocasión se realizó la PCR con los cebadores 35F y 35INV, que flanquean una región de 151pb y se utilizaron las condiciones específicas para los cebadores (ver pag 60 de Materiales y Métodos). A partir de este momento se decidió utilizar este par de cebadores que permitan obtener amplicones más pequeños como indicadores de la presencia de la secuencia del promotor 35S en las muestras.

Esto permite dar mayores oportunidades para detectar secuencias de ADN molde, en los casos en que se haya degradado el ADN.

Gel 1.

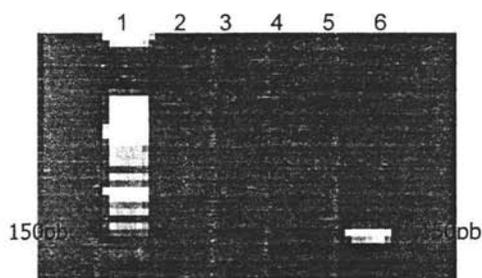


Fig. 14 Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de muestras de 4 variedades de maíces criollos en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1 : Marcador Molecular XIII
Carril 2 : Maíz Criollo Jiquipilco.
Carril 3 : Maíz Híbrido Blanco
Carril 4 : Maíz Criollo Cacahuacintle.
Carril 5 : Maíz Chalqueño.
Carril 6 : Harina de Maíz Bt-11.

No se observa ninguna banda de 150 pb en los carriles correspondientes a los maíces criollos, se observa una banda de 150 pb en el último carril, la cual corresponde al control positivo, es decir a la muestra de harina de maíz certificada Bt-11, tanto en el gel 1 como el que sigue a continuación gel 2.

Gel 2.



Fig. 15. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de las muestras de las variedades restantes de maíces criollos en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1 : Marcador Molecular XIII
Carril 2 : Maíz Colorado Teremendo
Carril 3 : Maíz Criollo Azul
Carril 4 : Maíz Criollo Cremoso
Carril 5 : Maíz Chalqueño.
Carril 6 : Harina de Maíz Bt-11.

Del total de muestras analizadas de los maíces criollos ninguna presentó el fragmento de 151 pb.

En la siguiente tabla se presentan los resultados generales.

Tabla 20 . Resultados generales de la PCR para gen endógeno y para los primers 35DIR y 35INV para la amplificación de 151pb en las muestras de harinas de maíces criollos.

No.	Muestra	Resultado Gen endógeno	Resultado Promotor 35S
1	Chalqueño	+	-
2	Cacahuacintle	+	-
3	Criollo Cremoso	+	-
4	Criollo Azul	+	-
5	Híbrido Blanco	+	-
6	Criollo Blanco Jiquipilco	+	-
7	Colorado teremendo	+	-
8	Aceitero anaranjado	+	-

+ Amplificación

- Sin amplificación

3.2. Amplificación del promotor 35S para las muestras de las harinas transgénicas certificadas y sus diluciones.

Para lograr el objetivo principal de la tesis que es conocer el umbral de detección de la PCR, se realizaron diluciones de las muestras de las harinas certificadas hechas con maíz no transgénico. Posteriormente, se realizaron diluciones todavía más altas, de cada una de las diluciones previamente hechas con maíz ahora hechas con agua (Ver tabla 12 en Materiales y Métodos).

Ambos resultados para las tres muestras de harinas de maíz certificadas se muestran en las tres tablas siguientes:

Tabla 21. Muestra de harina de maíz certificada Bt-11 y sus diluciones.

Muestra	Detección del promotor 35S en diluciones con maíz blanco	Detección del promotor 35S en diluciones con agua					
		1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
Bt-11 (2%)	+	+	+	+	+	+	-
0.2%	+	+	+	+	+	-	-
0.02%	+	+	+	+	-	-	-
0.002%	+	+	+	-	-	-	-
0.0002%	+	-	-	-	-	-	-
0.00002%	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 22. Muestra de harina de maíz certificada Bt-176 y sus diluciones

Muestra	Detección del promotor 35S en diluciones con maíz blanco	Detección del promotor 35S en diluciones con agua					
		1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
Bt-176	+	+	+	+	+	+	-
0.5%	+	+	+	+	+	-	-
0.05%	+	+	+	+	-	-	-
0.005%	+	+	+	-	-	-	-
0.0005%	+	-	-	-	-	-	-
0.00005%	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 23. Resultados de la muestra de harina de maíz certificada MON810 y sus diluciones.

Muestra	Detección del promotor 35S en diluciones con maíz blanco	Detección del promotor 35S en diluciones con agua					
		1/5	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
MON810 (2%)	+	+	+	+	+	+	-
0.2%	+	+	+	+	+	-	-
0.02%	+	+	+	+	-	-	-
0.002%	+	+	+	-	-	-	-
0.0002%	+	-	-	-	-	-	-
0.00002%	-	-	-	-	-	-	-

+ Si hubo amplificación

- No hubo amplificación

Enseguida aparecen algunos de los geles más representativos y que ilustran los resultados de la amplificación de las diluciones de la harina certificada de Bt-11.

Bt-11

El gel de electroforesis de la figura 16 corresponde al certificado de 2%, que ha sido sometido a una dilución máxima de 0.00002% hecha con maíz no transgénico. Para este análisis se utilizaron los cebadores 35-F y 35-INV, dando como resultado un fragmento de 151pb y el umbral encontrado fue de 0.0002% (carril 6).

Las condiciones utilizadas se mencionan en la tabla 5.

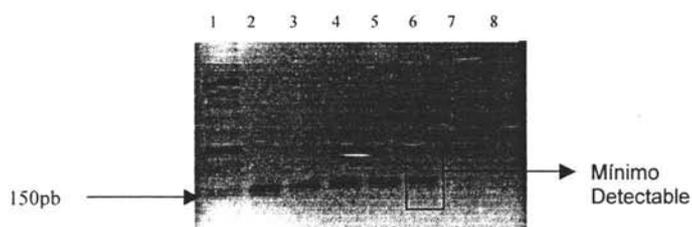


Figura 16. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de harinas de Bt-11 del 2% y sus diluciones con maíz no transgénico hasta un 0.00002%. Gel de Agarosa al 2%

- Carril 1: Marcador Molecular 50pb
- Carril 2: Harina de 2%
- Carril 3: Dilución al 0.2%
- Carril 4: Dilución al 0.02%
- Carril 5: Dilución al 0.002%
- Carril 6: Dilución al 0.0002%
- Carril 7: Dilución al 0.00002%
- Carril 8: Blanco (control negativo)

En el gel correspondiente a las diluciones de Bt-11 al 2% con agua se presenta en la siguiente figura.

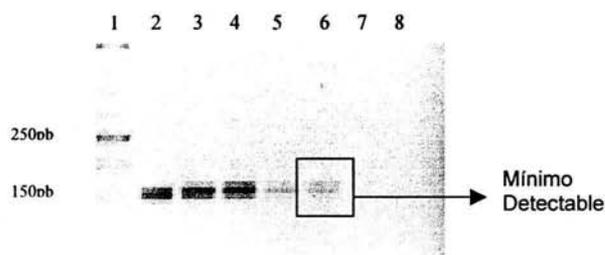


Figura 17. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la harina de *Bt-11* 2% y sus diluciones con agua, en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
 Carril 2: Dilución al 1/5
 Carril 3: Dilución al 1/10
 Carril 4: Dilución al 1/100
 Carril 5: Dilución al 1/1000
 Carril 6: Dilución al 1/10000
 Carril 7: Dilución al 1/100000
 Carril 8: Blanco

Esta técnica logra detectar el promotor 35S, aún en la dilución 1/10000.

Se siguieron realizando las demás diluciones, es decir, las de 0.2 % y 0.02% hechas con maíz y posteriormente con agua (ver tabla 12) las cuales se presentan en el anexo II.

Los resultados obtenidos para las diluciones con agua de Bt-11 al 0.002% se presentan en la figura 18. Se logran observar las bandas deseadas hasta la dilución 1/10. Se observan en el carril 4 correspondiente a la dilución 1/100, bandas inespecíficas, que se pueden atribuir a un exceso de oligonucleótidos, cebadores que forman productos de polimerización adicionales.



Figura 18. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la dilución de Bt-11 al 0.002% y sus diluciones con agua en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
Carril 2: Dilución 1/5
Carril 3: Dilución 1/10
Carril 4: Dilución 1/100
Carril 5: Dilución 1/1000
Carril 6: Blanco

Los gels correspondientes a las diluciones no mencionadas se encuentran en el anexo II.

Bt-176

Para la amplificación de la harina certificada Bt-176 al 5% se siguió el mismo patrón de diluciones, utilizando los mismos primers para la PCR.

El análisis electroforético para las diluciones del 5% al 0.00005% hechas con maíz chalqueño (no transgénico) se presentan a continuación:

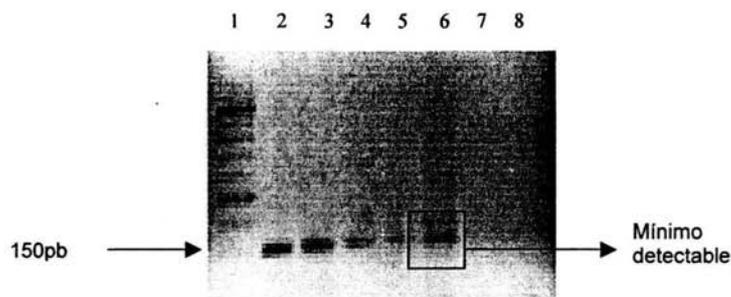


Figura 19. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de harinas de *Bt-176* del 5% al 0.00005% en un gel de Agarosa al 2% diluidas con maíz chalqueño no transgénico

Carril 1: Marcador Molecular 50pb

Carril 2: Harina al 5%

Carril 3: Dilución al 0.5%

Carril 4: Dilución al 0.05%

Carril 5: Dilución al 0.005%

Carril 6: Dilución al 0.0005%

Carril 7: Dilución al 0.00005%

El amplicón obtenido es de 151 pb y al igual que en la harina certificada Bt-11, esta técnica demuestra un límite de detección en el mismo orden de magnitud, de 0.0005%

En la siguiente figura se presenta el análisis electroforético con los resultados correspondientes a la muestra de harina de Bt-176 al 5% y sus respectivas diluciones con agua.

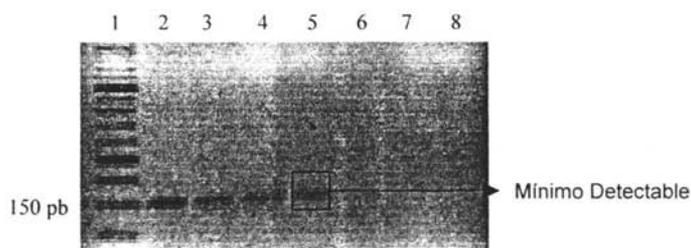


Figura 20. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la muestra de Bt-176 5% y sus diluciones a partir del extracto de ADN, con agua en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
 Carril 2: Dilución al 1/5
 Carril 3: Dilución al 1/10
 Carril 4: Dilución al 1/100
 Carril 5: Dilución al 1/1000
 Carril 6: Dilución al 1/10000
 Carril 7: Dilución al 1/100000
 Carril 8: Blanco

Se observa la presencia de la banda esperada. Los resultados correspondientes a las diluciones 0.5% y 0.05%, se encuentran en el anexo II.

Al igual que en la harina de Bt-11, aquí también se presenta el resultado de la dilución menor, en donde todavía se logra detectar la banda deseada: dilución 1/10000 a partir de 5% (ver tabla 12).

Se presentan a continuación los resultados correspondientes a la muestra de harina Bt-176 al 0.005% y de sus respectivas diluciones con agua, utilizándose las mismas condiciones de reacción de la tabla 16 y, también los mismos cebadores que para todas las anteriores.



Figura 21. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la dilución de Bt-176 0.005% y sus diluciones con agua en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
Carril 2: Dilución 1/5
Carril 3: Dilución 1/10
Carril 4: Dilución 1/100
Carril 5: Dilución 1/1000
Carril 6: Blanco

Se observa en los carriles 2 y 3, las diluciones de 1/5 y 1/10, donde aún se distingue el fragmento de 151 pb.

Por lo tanto para la harina de maíz certificada Bt-176 se encontró que la máxima dilución detectable es de 1/10 en la muestra 0.005%, es decir que tiene un umbral de 0.0005%.

MON 810

Enseguida se presenta el análisis electroforético de la muestra de la harina de maíz MON 810 y sus diluciones con maíz no transgénico (chalqueño) de 2% a 0.00002%

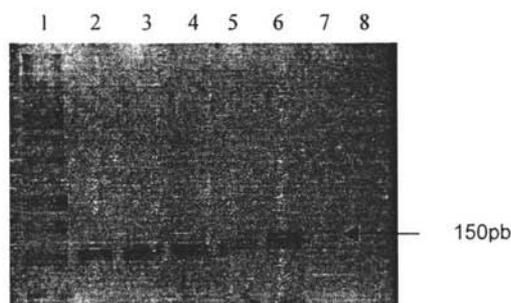


Figura 22. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de las muestras de MON-810 del 2% - 0.002% en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
 Carril 2: Muestra de 2%
 Carril 3: Dilución al 0.2%
 Carril 4: Dilución al 0.02%
 Carril 5: Dilución al 0.002%
 Carril 6: Dilución al 0.0002%
 Carril 7: Dilución al 0.00002%
 Carril 8: Blanco

Al igual que las demás muestras, es decir, las de Bt-11 y Bt-176 se logra detectar todos los fragmentos de 151 pb esperados hasta la dilución 0.0002% para estas diluciones que se hicieron con sólo maíz blanco.

Las diluciones con agua se presentan en la figura 23.

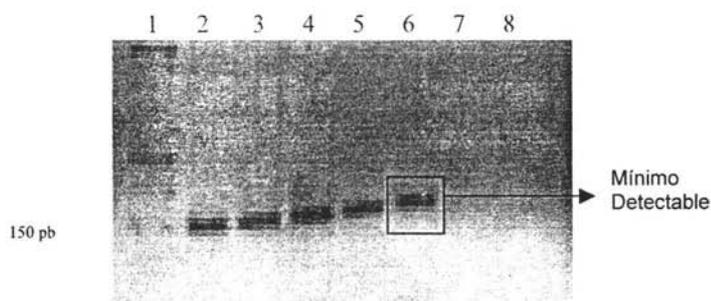


Figura 23. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la muestra de MON-810 al 2% y sus diluciones con agua en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
Carril 2: Dilución al 1/5
Carril 3: Dilución al 1/10
Carril 4: Dilución al 1/100
Carril 5: Dilución al 1/1000
Carril 6: Dilución al 1/10000
Carril 7: Dilución al 1/100000
Carril 8: Blanco

Al igual que en las muestras de Bt-11 se logró observar la banda, correspondiente a la dilución 1/10000.

Los resultados para el resto de las diluciones por análisis electroforético se presentan en el anexo II.

Se presenta a continuación el último análisis electroforético el de la muestra de 0.002% para poder determinar cual es la última dilución que se logra detectar en esta harina, ya que al igual que las otras la muestra de 0.0002% realizada con maíz ya no logra detectarse con diluciones con agua.

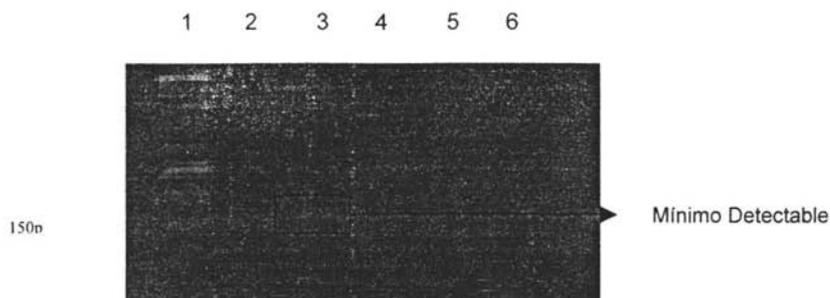


Figura 24. Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la muestra MON810 al 0.002% y sus diluciones con agua en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular

Carril 2: Dilución al 1/5

Carril 3: Dilución al 1/10

Carril 4: Dilución al 1/100

Carril 5: Dilución al 1/1000

Carril 6: Blanco

Se logra observar el fragmento hasta la dilución 1/10 en el carril 3, mostrando un umbral de 0.0002%.

Se presenta a continuación un resumen de lo que se obtuvo en los análisis electroforéticos anteriores de todas las harinas utilizadas.

Tablas del límite de detección de las harinas de maíz certificadas.

Tabla 24. Límite de detección de la muestra de Bt-11

Muestra Bt-11 (Diluciones con maíz)	Dilución máxima detectable con agua	Concentración mínima detectable
2%	1/10000	0.0002%
0.2%	1/1000	0.0002%
0.02%	1/100	0.0002%
0.002%	1/10	0.0002%
0.0002%	N.D	0.0002%
0.00002%	N.D	0.00002% N.D.

N.D. No detectable

Tabla 25. Límite de detección de la muestra de harina de maíz certificada Bt-176.

Muestra Bt-176 (Diluciones con maíz)	Dilución máxima detectable con agua	Concentración mínima detectable
5%	1/10000	0.0005%
0.5%	1/1000	0.0005%
0.05%	1/100	0.0005%
0.005%	1/10	0.0005%
0.0005%	ND	0.0005%
0.00005%	ND	0.00005% N.D.

N.D. No detectable

Tabla 26. Límite de detección de la muestra de harina de maíz certificada MON810.

Muestra MON810 (Diluciones con maíz)	Dilución máxima detectable con agua	Concentración máxima detectable
2%	1/10000	0.0002%
0.2%	1/1000	0.0002%
0.02%	1/100	0.0002%
0.002%	1/10	0.0002%
0.0002%	ND	0.0002%
0.00002%	ND	0.00002% N.D.

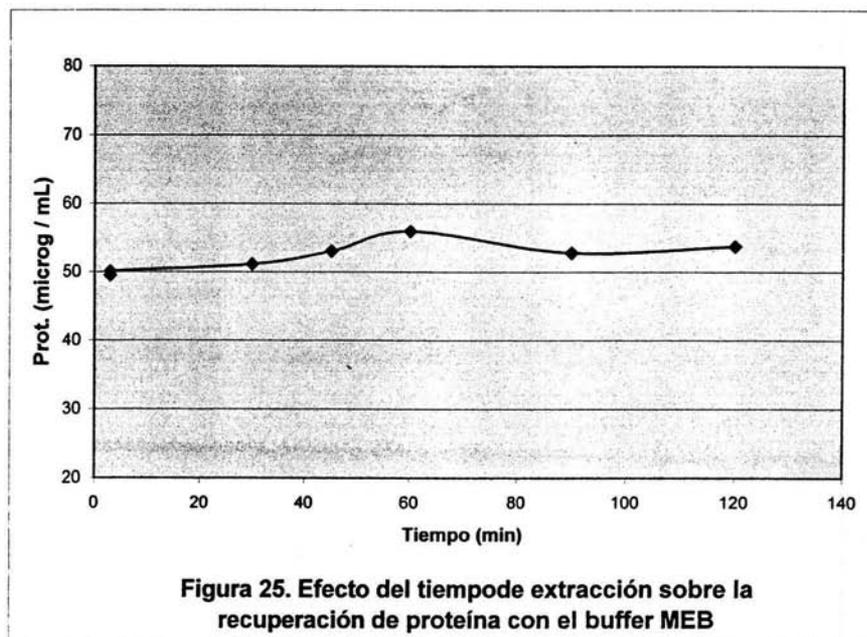
N.D. No detectable.

4. Detección de la proteína Cry1Ab.

1.1 Determinación de proteína por el Método de Lowry modificado para detergentes.

El reactivo de Folín que contiene ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico se reduce con las proteínas y forman un complejo de molibdeno color azul que constituye la base de la determinación de Lowry.

Este método se utilizó para determinar la concentración de proteína extraída por el buffer MEB utilizado en el kit de extracción para la placa de ELISA. La presencia de Tween 20 en el buffer de extracción puede afectar al método, por lo que se utilizó la versión modificada de BIORAD que considera la presencia de hasta 1% de Tween 20. Primero se realizó un ensayo para mostrar el efecto del tiempo de extracción con el buffer MEB. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:



Se observa en la gráfica que al incrementar el tiempo de la extracción no se aumentó significativamente la cantidad de proteína obtenido, por lo que se decidió trabajar con sólo 3 minutos.

Con estos resultados se realizó la cuantificación colorimétrica de proteína y en la figura 26 se observa la curva estándar. Los datos crudos de la curva se encuentran en el anexo III.

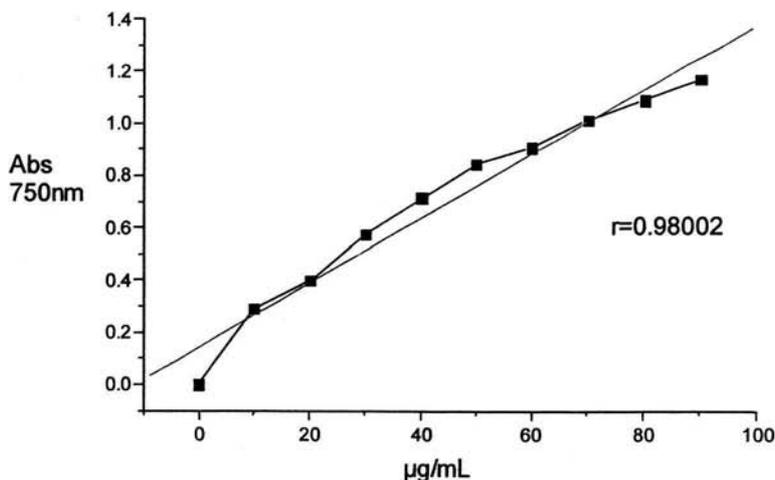


Figura 26. Curva estándar Lowry modificado.

Para el extracto de maíz chalqueño se obtuvo una absorbancia de 0.684 correspondiendo una concentración de proteína de 564.58 µg de proteína / mL. Para estimar el porcentaje de extracción se considera que el endospermo del maíz contiene de 7.5 – 8.5 % de proteína (Barrera et al., 2003) y se calcula lo siguiente:

$$\frac{7.5 \text{ g prot.} * 1 \times 10^6 \mu\text{g prot.} * 0.1 \text{ g muestra.}}{100 \text{ g muestra.} \quad 1 \text{ g prot.} \quad 1 \text{ mL}} = 7500 \mu\text{g/mL}$$

Lo que indica que al obtenerse 564.58 $\mu\text{g prot. / mL}$ se tiene un 7.79% de rendimiento de extracción. Esto significa que el buffer de extracción no es muy eficiente. Considerando que la proteína extraída fue la proteína total no puede estimarse de antemano con cuánta proteína heteróloga se lleva a cabo el ELISA.

4.2 Primera placa de ELISA

Enseguida se presentan las lecturas crudas de absorbancia a 630nm, correspondientes a la placa antes mencionada, leída en el lector marca BIORAD modelo Benchmark.

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.059	0.192	1.032	0.059	0.115	0.056	0.056
B	0.064	0.193	1.114	0.063	0.124	0.062	0.064
C	0.093	0.337	1.534	0.063	0.067	0.063	0.062
D	0.093	0.348	1.588	0.061	0.055	0.055	0.065
E	0.12	0.575	1.77	0.062	0.066	0.054	0.064
F	0.121	0.658	1.71	0.063	0.065	0.064	0.063
G	0.135	0.907	0.062	0.062	0.062	0.062	0.051
H	0.178	0.99	0.063	0.062	0.062	0.063	0.051

A partir de la curva patrón que se encuentra de los pozos A1 a 3F se tomaron los ocho primeros puntos que sí resultaron en una línea recta y la curva estándar aparece en la figura 27, que se presenta a continuación.

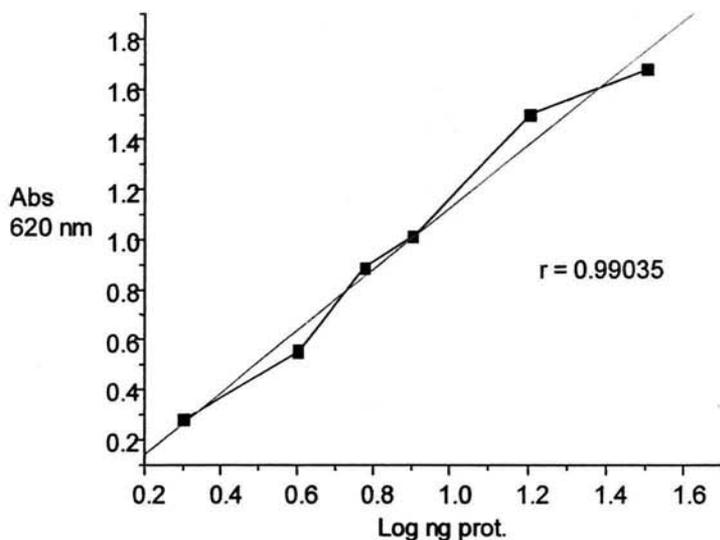


Figura 27. Curva estándar de proteínas Primer ELISA.

En la fotografía se observan las tres primeras columnas de la curva estándar, se observa como va aumentando el color azul, corroborando así que su intensidad es proporcional a la concentración. La única muestra positiva que se obtiene en la primera placa es la muestra correspondiente a Bt-11 2% que se encuentra en los pozos A5 y B5, mostrando una absorbancia de 0.119 y por interpolación se obtiene su concentración siendo 1.522 ng de proteína / mL. La detección se puede confirmar visualmente a partir de la siguiente fotografía en los pozos arriba mencionados (figura 28):

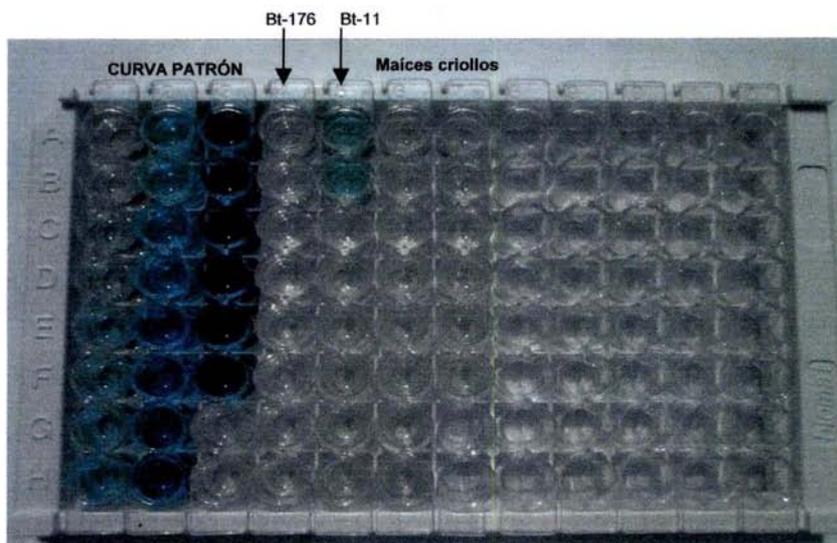
Fotografía Primera ELISA

Figura 28. Placa de ELISA con curva patrón, estándares positivos y maíces criollos.

Además es notorio que en la columna que sigue (4) no hubo desarrollo de color puesto que corresponde a las muestra de maíz Bt-176, 5% y sus diluciones con maíz blanco, las que pertenecen a un evento de transformación que sólo expresa la proteína heteróloga en tejido verde. En la siguiente columna (5) correspondiente a la muestra Bt- 11, 2% y sus respectivas diluciones 0.2, 0.02 y 0.002%, sólo se desarrolló color en los dos primeros pozos que corresponden a la muestra de 2%. En las diluciones ya no se logra detectar a la proteína. Los pozos restantes (columnas 6 y 7) corresponden a las muestras de maíces criollos, los cuales no desarrollaron color, lo que indica que no contienen la proteína heteróloga. El resultado negativo para la expresión de la proteína en el maíz Bt-176, concuerda con el hecho de que la proteína heteróloga no se expresa en esos granos.

4.3 Segundo ELISA

En esta segunda placa se cargaron las muestras Bt-11 (columna 4) en tres diferentes concentraciones: 2%, 0.2% y 0.002% así como la muestra MON810 (columna 5) en las mismas concentraciones.

	1	2	3	4	5	6
A	0.132	0.723	2.807	0.445	0.675	0.101
B	0.124	0.752	2.742	0.415	0.66	0.098
C	0.214	1.234	2.838	0.139	0.183	0.047
D	0.228	1.29	2.794	0.134	0.189	0.044
E	0.394	2.159	2.756	0.124	0.151	0.034
F	0.411	2.161	2.968	0.128	0.155	0.035
G	0.581	2.662	0.119	0.133	0.116	0.038
H	0.528	2.252	0.121	0.121	0.099	0.032

Se toman los puntos que resultaron en una línea recta para la gráfica que se muestra en la siguiente figura:

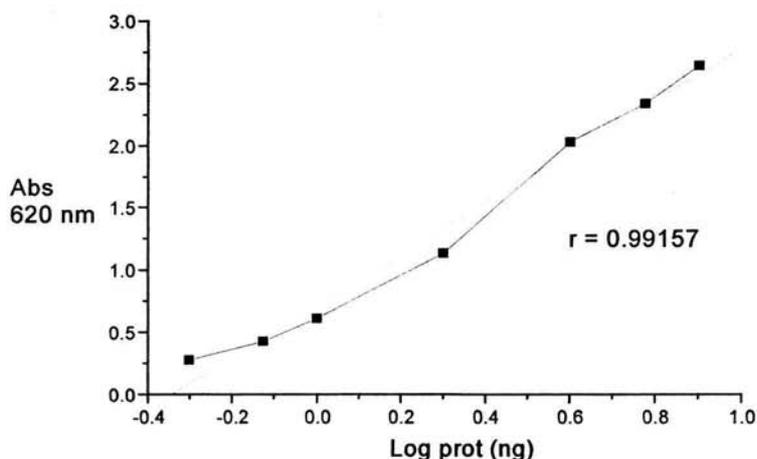


Figura 29. Curva estándar de proteínas. 2° ELISA.

Al igual que la primer placa de ELISA a partir de las absorbancias se calculó la concentración por interpolación. Se presenta a continuación la fotografía del segundo ELISA que se realizó. Las tres primeras columnas corresponden a la curva estándar, la cuarta corresponde a la muestra de Bt-11 que presentó lectura hasta la dilución de 0.02%. La quinta columna pertenece a la muestra de MON810 presentando coloración azul hasta la muestra correspondiente a 2%, la última columna corresponde nuevamente a la muestra de Bt-176 al 5%, por lo cual, una vez más no presenta ningún tipo de cambio en el color por las razones antes mencionadas.

Fotografía segundo ELISA:

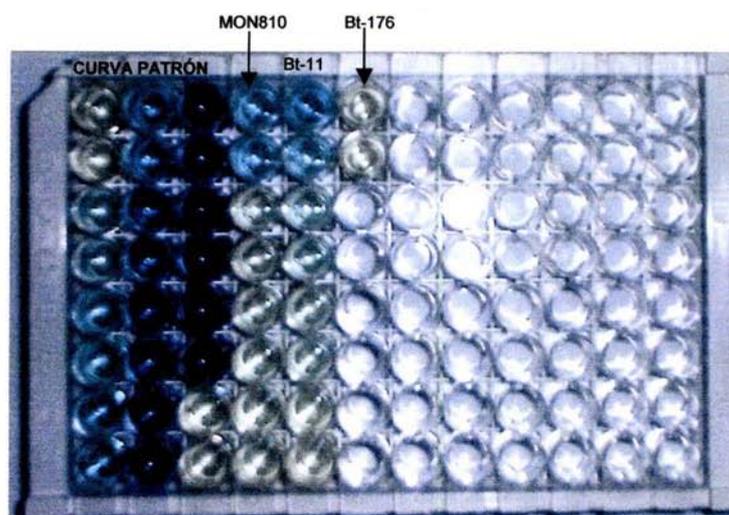


Figura 30. Segunda placa de ELISA con la curva estándar y los controles positivos.

Es importante mencionar que los pozos C4, D4, correspondiendo a la concentración de 0.2% y los pozos E4 y F4, correspondientes a la concentración de 0.02%, visualmente no se detecta color, pero sí hay lectura espectrofotométrica. Así que es importante no hacerlo sólo visualmente, ya que podría resultar en falsos negativos.

En resumen, para el análisis de proteína heteróloga Cry1Ab, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 27. Resultados de las dos placas de ELISA.

Muestra	Concentración de la muestra	Lectura de Absorbancia	ng de proteína/mL
Bt-11	2%	0.54	0.824
Bt-11	0.2%	0.058	0.4819
Bt-11	0.02%	0.025	0.4646
MON810	2%	0.302	0.6323

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

México es centro de origen y diversidad del maíz, por lo que es importante contar con métodos que puedan ser certificados, validados y aplicados por el gobierno para poder determinar la posible introgresión de transgenes de los maíces que son importados de Estados Unidos ya que éstos no son segregados. Para este trabajo se utilizaron las harinas de maíz certificadas por IRMM y comercializadas por FLUKA, Bt-11(2%), Bt-176(5%) y MON810(2%) que son preparadas específicamente para ser utilizadas como controles en este tipo de metodologías, en este caso determinando los límites de sensibilidad de las técnicas utilizadas en este estudio.

Se ha reportado que el gen endógeno *invertasa* es empleado comúnmente como control interno de maíz para la reacción de PCR (Hurst, 1999; Vollenhofer, 1999). Aquí se demuestra que la amplificación del gen RPA-1, resultó un control interno de la reacción adecuado para la reacción de PCR, además, indica que las condiciones de PCR empleadas, brindan una detección suficientemente sensible para las amplificaciones de ADN de maíz, ya que este gen se encuentra en un número bajo de copias en el genoma del maíz.

De acuerdo con la literatura (Vollenhofer, 1999) el límite de detección de la técnica de PCR para muestras de maíz es de 0.1% con determinadas condiciones de reacción. También se ha reportado que utilizando distintas condiciones de reacción a las mencionadas, el límite de detección de la técnica de PCR es 0.01% de ADN modificado del total de ADN presente en el genoma (Hurst, 1999). Otros

reportes han establecido que cuentan con un límite de detección de 0.001% (www.silliker.com). Sin embargo, con las condiciones del laboratorio utilizadas en este experimento, amplificando un fragmento de 151 pb del promotor 35S, se encontró con un límite de detección de 0.0002%. Esto se puede atribuir a que las condiciones de reacción son relevantes para establecer el límite de detección alcanzado. Por otro lado, el método de extracción utilizado, el cual se basa en el uso de un compuesto de guanidina-detergente, para la lisis de las células y la solubilización del ADN, logró extraer de un 70 al 100% de ADN, lo que facilita recuperar ADN en cantidad y con calidad suficiente para que se lleve a cabo la reacción de PCR adecuadamente.

Además de los diagnósticos clínicos, los ELISA's han sido utilizados para detectar proteínas de una gran variedad de número de muestras incluyendo alimentos. El ELISA tiene un límite de detección de 0.01% a 0.125% de acuerdo con la literatura (Trucksess, 2001). Esto depende de la matriz de donde se extraiga y la forma de obtención del extracto, ya que algunas proteínas requieren de procesos más drásticos (Stave, 1999).

De acuerdo con el fabricante de la placa de ELISA que se utilizó para detectar la expresión de la proteína (www.agdia.com), se pueden detectar niveles tan bajos como 1ng/mL. Los resultados de este estudio muestran que se puede detectar hasta un 0.02% equivalente a 0.46 ng/mL, esto se atribuye a que a pesar de la baja eficiencia de extracción por este método se cuenta con niveles suficientes de proteína heteróloga para ser detectada.

Para conocer con más detalle las cantidades de proteína involucradas en el ELISA, se realizó la determinación de proteína para verificar que tanta proteína era extraída con el buffer de extracción MEB, a diferentes tiempos de mezclado con el medio de extracción, con lo que se comprobó que el tiempo no importa ya que la cantidad extraída no varía drásticamente.

También, se realizó una extracción de harina de maíz no transgénica para ver la eficiencia de extracción y se observó que no era muy eficiente, ya sea por el efecto matriz, o por las condiciones de extracción. Se puede atribuir a que como el maíz posee bajo contenido proteico, a partir de esas pocas proteínas con las que se cuenta no todas se logran extraer, la mayoría de las proteínas que se extraen son las que se solubilizan en soluciones salinas, dado que la composición del amortiguador de extracción precisamente es una solución salina de NaCl.

En el método de ELISA, para el evento Bt-176 no se logró obtener ningún resultado de absorbancia debido a que, en este evento, la proteína sólo se expresa en tejido verde y no en granos (www.agbios.com), esto gracias al promotor presente de la PEPC de maíz, ya que si éste no es el promotor del gen que codifica a la proteína Cry1Ab. La presencia del promotor 35S se debe a que es el promotor del gen *bar*. Esto permitió que pudiera ser detectado por la técnica de PCR.

La aplicación de la PCR para la detección de ciertas especies transgénicas en la cadena alimentaria ha sido últimamente muy utilizada. Las ventajas de la PCR es

que puede ser establecida en un laboratorio para poder hacer análisis tanto de materiales degradados como de los no procesados (Hurst, 1999). Su costo a comparación de otros equipos es muy bajo.

Un factor limitante de la PCR es que en la detección del promotor CaMV35S no se puede identificar el evento, ya que dicho promotor se encuentra en muchas otras plantas transgénicas (Meyer, 1999).

Es importante que cuando se vaya a determinar la ausencia o presencia de algún tipo de secuencia transgénica en algún organismo, se tenga muy bien pensado y determinado, que tipo de método validado o acreditado es apropiado para el análisis de dicha muestra.

La técnica de ELISA es el más rápido y barato que la técnica de PCR, pero es menos sensible. Esta técnica es recomendable aplicarla en el campo directamente en granos y no es recomendada para análisis de productos terminados (www.silliker.com). Los resultados obtenidos muestran que es menos sensible que la técnica de PCR. Ésta técnica es altamente sensible y permite detectar OGM's de casi todas las matrices de los alimentos. Requiere de más tiempo y es más caro que la técnica de ELISA.

El uso de columnas de Inmunoabsorción combinadas con el ELISA permiten detectar la presencia de proteína muy diluida, ya que en esta técnica se utilizan anticuerpos específicos que están unidos a la matriz de la columna y, que se unen a la proteína de interés, posteriormente se recupera la proteína y se cuantifica por

ELISA, a nivel de laboratorio sería factible pero a nivel de aduana no sería muy recomendado.

De acuerdo con la literatura (Vollenhofer, 1999) el ELISA debe de ser utilizado para la detección de proteínas expresadas por los OGM's en los productos que no han sido procesados.

El método de PCR es un método sensible que ha sido muy aplicado para muestras de soya y maíz ya sean procesados o no.

Se considera que en términos de especificidad y sensibilidad, la técnica de PCR es mejor que la técnica de ELISA, basándose en los resultados obtenidos y también por reportes previos (Vollenhofer, 1999).

La aplicabilidad varía dependiendo el tipo de proceso que haya sufrido, generalmente se aplica PCR para productos ya procesados y ELISA para productos sin procesar.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Con las condiciones establecidas para la reacción de PCR se asume que fueron adecuadas para aprovechar el que esta técnica sea extremadamente sensible y permitiera identificar el promotor 35S en muestras muy diluidas.
- ❖ La calidad y cantidad de ADN extraído y utilizado en las reacciones de PCR son adecuadas para que se lleve a cabo la amplificación satisfactoriamente, lográndose detectar niveles más bajos de ADN (promotores) a los reportados en la literatura.
- ❖ Sería una opción adecuada el poder utilizar ambas técnicas ya que los datos obtenidos por ELISA complementan la información sobre la presencia de ADN transgénico con información sobre el nivel de expresión de la proteína.
- ❖ Al disminuir la cantidad de ADN molde, se corrobora la sensibilidad de la técnica. El límite de detección encontrado para la PCR fue de 0.0002%.
- ❖ La secuencia del promotor 35S no se detectó en los maíces criollos analizados, esto quiere decir que por lo menos los maíces de la parte central de nuestro país no han sido "contaminados" con transgénicos.

- ❖ El éxito en la detección si bien radica en la extracción de ADN, también un factor muy importante es saber qué es lo que se está buscando, conocer primero las construcciones genéticas de cada evento para poder así diseñar los cebadores más apropiados a dicho evento y además, esto proporciona elementos para decidir si es posible detectar también la proteína, en un cierto tejido.

IX. ANEXOS.**Anexo I.****Análisis de costos de una muestra analizada por PCR.****Reactivos.**❖ **Agarosa (ROCHE)**

Presentación: 100g	Costo: 203.00 USD
Cantidad empleada: 0.4 g de agarosa en 20 mL de buffer.	
Electroforesis de productos de PCR gen endógeno RPA-1	0.4 g
Electroforesis de productos de PCR promotor 35S	0.4 g
Total	0.8 g

100 g ——— 203.00 USD

0.8 g ——— X = 1.624 USD / reacción

❖ **Bromuro de etidio (BIORAD)**

Presentación: 10 mL (10 mg / mL)	Costo: 53.00 USD
Cantidad empleada: 1µg / mL en 20 mL de agarosa	
Electroforesis de productos de PCR gen endógeno RPA-1	20µL
Electroforesis de productos de PCR promotor 35S	20µL
Total	40µL

10 mL ——— 53.00 USD

40 µL ——— X = 0.0212 USD / reacción

❖ Marcador molecular DNA XIII (ROCHE)

Presentación: 100 µL Costo: 101.00 USD

Cantidad empleada:

Electroforesis de productos de PCR gen endógeno RPA-1 2µL

Electroforesis de productos de PCR promotor 35S 2µL

Total 4µL

100 µL ----- 101.00 USD

4 µL ----- X = 4.04 USD /reacción

❖ DNAzol (GIBCO BRL)

Presentación: 100 mL Costo: 100.00 USD

Cantidad empleada:

Extracción de ADN 1mL

Total 1mL

100 mL ----- 100.00 USD

1mL ----- X= 1.00 USD / reacción

❖ dNTP's (GIBCO BRL)

Presentación: 1 mL (2.5mM) Costo: 114 USD

Cantidad empleada:

	Concentración	Vol. Reacción	Vol. dNTP's
PCR gen endógeno	0.2 mM	15µL	1.2µL
PCR promotor 35 S	0.2 mM	50µL	4.0µL
Total			5.2µL

1mL ----- 114.00 USD

5.2µL ----- X = 0.5928 USD / reacción

❖ Etanol (J.T. Baker)

Presentación 500 mL Costo: 34.00 USD

Cantidad empleada:

Extracción de ADN 1mL

Total 1mL

500 mL ----- 34.00 USD

1.0mL ----- 0.068 USD / reacción

❖ Harina de maíz certificada (Fluka)

Presentación: 1g Costo: 50.00 USD

Cantidad empleada:

Extracción 0.05g

Total 0.05g

1 g ----- 50.00 USD

0.05g ----- X = 2.5 USD / reacción

❖ Hidróxido de sodio (J.T. Baker)

Presentación: 2500 g Costo: 50.00 USD

Cantidad empleada:

Extracción de ADN 50µL (10mM) 0.029 mg

Total 0.029 mg

2500 g ----- 50.00 USD

0.029 mg ----- X = 0.0000058 USD / reacción.

❖ Isopropanol (J.T. Baker)

Presentación 1000 mL	Costo: 24.00 USD
Cantidad empleada:	
Extracción de ADN	0.5 mL
Total	0.5 mL

1000 mL ----- 24 USD

0.5 mL ----- X = 0.012 USD / reacción

❖ Primers (GIBCO BRL)

Presentación 50nmol	Costo 30.00 USD	
Cantidad empleada:		
	Concentración:	Vol. Primers
PCR gen endógeno	20 μ M	0.75 μ L
PCR promotor 35S	20 μ M	2.5 μ L
Total		3.25 μ L

50 nmol ----- 30.00 USD

3.25 μ L (20 μ M) --- 0.039 USD / reacción

❖ Taq polimerasa (GIBCO BRL)

Presentación 100 μ L (5U / μ L)	Costo: 150.00 USD	
Cantidad empleada:		
PCR gen endógeno RPA-1	1U / reacción	0.2 μ L
PCR promotor 35S	1U / reacción	0.2 μ L
Total		0.4 μ L

100 μ L ----- 150 USD

0.4 μ L ----- X = 0.6 USD / reacción

❖ TBE (BIO RAD)

Presentación 4L (10X)	Costo 106.00 USD
Cantidad empleada:	
Electroforesis de productos de PCR gen endógeno RPA-1	12mL
Electroforesis de productos de PCR promotor 35S	12mL
Total	24mL

4000 mL ——— 106 USD
 24 mL ——— 0.636 USD / reacción

❖ Tris base (SIGMA) PM 121.14 g / mol

Presentación 100 g	Costo 71 USD
Cantidad empleada:	
Extracción de ADN	2 μ L (1M) 0.242 mg
Total	0.242 mg

100 g ——— 71 USD
 0.242 mg ——— X = 0.000172 USD / reacción

MATERIAL

❖ Tubos 1.7 mL (AXIGEN)

Presentación 500 piezas	Costo 15.00 USD
Cantidad empleada:	
Extracción de ADN	3 piezas
Total	3 piezas

500 piezas ——— 15 USD
 3 piezas ——— X = 0.09 USD / reacción

❖ Tubos 0.2 mL (AXIGEN)

Presentación 1000 piezas	Costo 58 USD
Cantidad empleada:	
PCR gen endógeno RPA-1	1 pieza
PCR promotor 35S	1 pieza
Total	2 piezas

1000 piezas ——— 58 USD
 2 piezas ——— 0.116 USD /reacción

❖ Puntas 1000 µL (AXIGEN)

Presentación 1000 piezas	Costo 34.00 USD
Cantidad empleada:	
Extracción de ADN	5 piezas

1000 piezas ——— 34.00 USD
 5 piezas ——— 0.17 USD / reacción

❖ Puntas 200 µL (AXIGEN)

Presentación: 1000 piezas	Costo 23.00 USD
Cantidad empleada:	
Extracción ADN	3 piezas
Total	3 piezas

1000 piezas ——— 23.00 USD

3 piezas ——— X = 0.069 USD / reacción

❖ Puntas 10 μ L (AXIGEN)

Presentación 1000 piezas

Costo 18.00 USD

Cantidad empleada:

Extracción de ADN	1 pieza
PCR gen endógeno RPA-1	8 piezas
PCR promotor 35S	8 piezas
Electroforesis	8 piezas
Total	25 piezas

1000 piezas — 18 USD

25 piezas — 0.45 USD / reacción

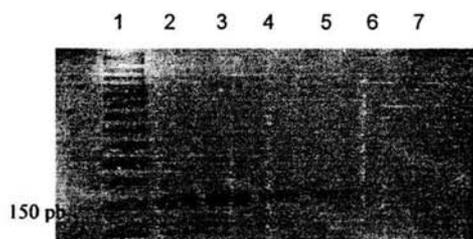
No se realizó secuenciación, por lo tanto el costo de una reacción de PCR es de 15.69 USD.

Anexo II.

A continuación se presentan las fotografías de las diluciones que no se habían mostrado anteriormente.

Bt-11

Muestra de 0.2% y sus diluciones con agua.



Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la harina de *Bt-11* 0.2% y sus diluciones con agua, en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
Carril 2: Dilución al 1/5
Carril 3: Dilución al 1/10
Carril 4: Dilución al 1/100
Carril 5: Dilución al 1/1000
Carril 6: Dilución al 1/10000
Carril 7: Blanco

Muestra de 0.02 %

1 2 3 4 5 6 7



Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la harina de *Bt-11* 0.2% y sus diluciones con agua, en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
 Carril 2: Dilución al 1/5
 Carril 3: Dilución al 1/10
 Carril 4: Dilución al 1/100
 Carril 5: Dilución al 1/1000
 Carril 6: Dilución al 1/10000
 Carril 7: Blanco

Bt-176

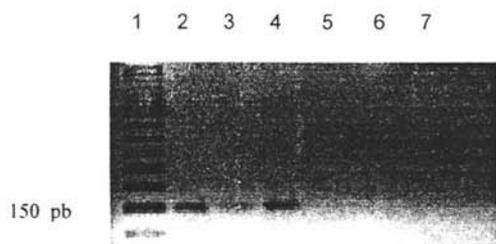
1 2 3 4 5 6 7



Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la harina de *Bt-11* 0.5% y sus diluciones con agua, en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
 Carril 2: Dilución al 1/5
 Carril 3: Dilución al 1/10
 Carril 4: Dilución al 1/100
 Carril 5: Dilución al 1/1000
 Carril 6: Dilución al 1/10000
 Carril 7: Blanco

Muestra de 0.05%

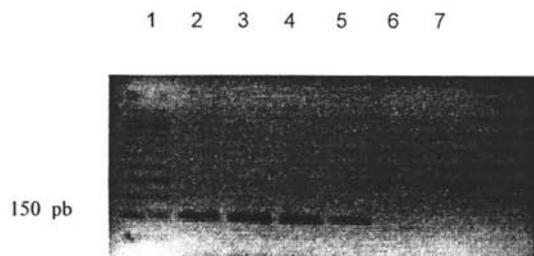


Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la harina de *Bt-11* 0.05% y sus diluciones con agua, en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
Carril 2: Dilución al 1/5
Carril 3: Dilución al 1/10
Carril 4: Dilución al 1/100
Carril 5: Dilución al 1/1000
Carril 6: Dilución al 1/10000
Carril 7: Blanco

MON810

Muestra de 0.2 %



Productos de la amplificación del promotor 35S a partir de la harina de *Bt-11* 0.2% y sus diluciones con agua, en un gel de agarosa al 2%.

Carril 1: Marcador Molecular XIII
Carril 2: Dilución al 1/5
Carril 3: Dilución al 1/10
Carril 4: Dilución al 1/100
Carril 5: Dilución al 1/1000
Carril 6: Dilución al 1/10000
Carril 7: Blanco

Anexo III**Lowry, grafica**

Tiempo (min)	[prot] µg / ml
3	49.49
3	50.103
30	51.148
45	53.06
60	55.94
90	52.8
120	53.76

Curva estándar

µg/ml	Abs
0	0
50	0.004
100	0.076
150	0.109
200	0.155
250	0.233
300	0.297
350	0.354
400	0.415
450	0.520
500	0.633
550	0.683
600	0.775

Primer placa de ELISA

Los ocho primeros en línea recta.

log ng prot.	Abs
0.30103	0.281
0.6020599	0.555
0.77815125	0.887
0.90308999	1.011
1.20411998	1.499
1.50514998	1.678

Resultados Curva

Datos gráfica

A	-0.10686	0.08362
B	1.23803	0.08663

R	SD	N	P
---	----	---	---

0.99035	0.08306	6	1.3929E-4
---------	---------	---	-----------

Segundo ELISA

Curva estándar, primeros puntos lineales.

Log ng	Abs
-0.30103	0.275
-0.12493874	0.427
0	0.61
0.30103	1.134
0.60205999	2.032
0.77815125	2.339
0.90308999	2.647

Resultados curva 2° ELISA

Datos gráfica

A	0.71392	0.06433
B	2.06941	0.12095

R	SD	N	P
---	----	---	---

0.99157 0.13869 7 <0.0001

Enseguida se detallan las soluciones utilizadas para la extracción:

Tabla 13. 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

En la siguiente tabla se detallan los reactivos utilizados para la concentración.

Tabla 14. 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	3M	R.A.	J.T. Baker

Tabla 17. Reactivos utilizados para un gel de electroforesis.

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Agarosa	1% y 2%	B.M.	Research Organics
Bromuro de Etidio	1µg/ml	B.M.	ROCHE
TBE 10X	1X	B.M.	BIO-RAD
Marcador Molecular DNA XIII	2.5 µL	B.M.	ROCHE

X. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Anklam E., The validation of methods based on Polymerase Chain Reaction for the detection of genetically modified organism in food, *Analítica 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).
- ❖ Barrera B., Herrera R. Caracterización de Maíces Criollos para Determinar su Aplicación Industrial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D. F. (2003).
- ❖ Brett G.M., Chambers S. J, Huang L., Morgan M. R. A., Design and development of immunoassays for detection of proteins, *Food control*. Vol.10, 401-406 (1999).
- ❖ Brown, K., Hopkin K., Horsch R., Mellon M., Genetically Modified Foods Are They safe?. *Scientific American* 39-51, (2001)
- ❖ Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados CIBIOGEM. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 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 organism, *Official Journal of the European Communities* (April 2001)
- ❖ Gachet E., Martín G. G., Vigneau F., 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., Protocolo de Cartagena: una perspectiva mexicana, *BioTecnología*. Vol. 6. No. 2 y 3, 30-35, (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. S. *Analytical Chemistry of Foods*. Published by Blackie Academic and Professional. Chapman and Hall. First Edition (1995).
 - ❖ James C. *Global Status of Transgenic Crops in 1997*. International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications. Briefs No. 5., ISAAA: Ithaca, NY, USA. (1997).
 - ❖ James C., *Global Status of Commercialized transgenic Crops*, International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications. Briefs No. 21 (2001).
 - ❖ James C., *Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2002*. International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications. Briefs No.27. ISAAA: Ithaca, NY, USA. (2002).
 - ❖ James C. *Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2002 Feature: Bt Maize*. International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications. Briefs No. 29. ISAAA: Ithaca, NY, USA. (2003)
 - ❖ 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).
 - ❖ Karcher J. *Molecular Biology. A Project Approach*. Academy Press. USA. (1995).
 - ❖ Lheureux, K., Libeau-Dulos M., Nilsagard H., Rodríguez E., Menrad K., Vorgrimler D. *Review of GMOs Under Research and Development and in the Pipeline in Europe*. European Science and Technology Observatory. Marzo, (2003).
 - ❖ 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).

-
- ❖ Luis C., La técnica de PCR aplicada a la detección del promotor 35S en granos y alimentos derivados de maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. (2001)
 - ❖ Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock *Biología de los Microorganismos*, Octava Edición. Prentice may. España (1998)
 - ❖ 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).
 - ❖ Nelson D., Cox M., *Lehninger Principios de Bioquímica*. Tercera Edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. (2001).
 - ❖ Newton C. R. *PCR Essential Data Series*. Published by John Wiley & sons. Zeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, UK (1995).
 - ❖ O'Brien L., Henry R. J. *Transgenic Cereals*. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA, (2000)
 - ❖ Secretariat of the Convention on Biological Diversity. *Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes*. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity. (2000)
 - ❖ Stave J. W. *Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs*. *Food Control* 10, 367-374, (1999)
 - ❖ Stave J. W. *Protein Immunoassay Methods for Detection of Biotech Crops: Applications, Limitations, and Practical Considerations*. *Journal of AOAC International* Vol.85, No. 3, (2002).
 - ❖ Traynor P. L., Frederick R. and Koch M. *Biosafety and Risk Assessment in Agricultural Biotechnology*. The Agricultural Biotechnology Support Project Institute of International Agriculture. Michigan State University, USA. (2002).

- ❖ Trucksess M. W. Determination of Cry9C Protein in Corn-Based Foods by enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. Vol. 84, No. 6, 1891-1901, (2001)
- ❖ Van Duijn G., Van Biert R., Bleeker-Marcelis H., Van Boeijen I., Jama Adan A., Jhakrie S. and Hessing M., Detection of Genetically Modified Organisms in foods by Protein and DNA-based Techniques: Bridging the methods, *Journal of AOAC International*, Vol. 85, No.3, (2002).
- ❖ 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, Austria, (1999).
- ❖ Watson J., Gilman M., Witkowski J. and Zoller M. Recombinant DNA. Second Edition. Scientific American Books. NY., USA. (1992).
- ❖ Zimmermann A., Hemmer W., Liniger M., Lüthy J. and Pauli U. A sensitive Detection Method For Genetically Modified MaisGard™ Corn Using a Nested PCR-system. *Lebensm. Wiss U. Technol.*, 31, 664-667, (1998)
- ❖ Zimmermann A., Lüthy J. and Pauli U. Even Specific Transgene Detection in Bt-11 Corn by Quantitative PCR at the Integration Site. *Lebensm. Wiss U. Technol.*, 33, 210-216, (2000)

Referencias electrónicas

- www.agbios.com (Noviembre, 2003)
- www.bdbiosciences.com (Abril, 2001)
- www.sargarpa.gob.mx
- www.croplifeamerica.org (Abril, 2001)
- www.biodiv.org (Octubre, 2003)
- www.genome.wi.mit.edu
- www.ebi.ac.uk
- www.silliker.com (Abril, 2001)
- www.upov.int (Noviembre, 2003)