



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL USO DE HOJA DE MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADO
COMO MATERIAL DE REFERENCIA EN ENSAYOS CUANTITATIVOS MEDIANTE LA
TÉCNICA DE PCR TIEMPO REAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

LUIS CÉSAR CASTILLO DURÁN



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Sobeida Sánchez Nieto
VOCAL: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
SECRETARIO: M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva
1er. SUPLENTE: Q.A. Aleida Mina Cetina
2° SUPLENTE: M. en C. Verónica García Saturnino

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS SAGARPA/SENASICA. KM 37.5 CARRETERA FEDERAL MÉXICO-PACHUCA, COL. CENTRO, TECÁMAC DE FELIPE VILLANUEVA, ESTADO DE MÉXICO, C.P. 55740

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva



SUSTENTANTE:

Luis César Castillo Durán



Índice

	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Técnicas de análisis de OGM	4
2.2 PCR tiempo real	7
2.2.1 Químicas para la detección de productos de PCR.....	8
2.2.2 Cuantificación de ADN por qPCR	11
2.2.3 Gen de referencia en qPCR.....	12
2.3 Enfoque Modular en el análisis de OGM.....	13
2.3.1 Módulo especie/taxón específico.....	13
2.3.2 Módulo elemento específico	14
2.3.3 Módulo construcción específica	14
2.3.4 Módulo evento específico	15
2.4 Evento MON810	16
2.5 Validación de un método analítico para la cuantificación de OGM	16
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos particulares.....	20
4. Metodología	21
4.1 Diagrama de bloques de la estrategia experimental.....	21
4.2 Toma de muestras	22
4.3 Recepción y registro de muestras	23
4.4 Distribución hoja por hoja	23
4.5 Acondicionamiento y extracción de ADN de puntas de hoja de maíz	23
4.6 Identificación de evento específico MON810 por la técnica de qPCR	24
4.7 Preparación de mezclas en distintos porcentajes en fracción masa.....	26
4.8 Acondicionamiento y extracción de ADN de mezclas	26

4.9 Cuantificación de mezclas GM.....	27
4.10 Liofilización de muestras	28
4.11 Preparación de mezclas con material liofilizado, en distintos porcentajes fracción masa.....	29
4.12 Acondicionamiento y extracción de ADN de mezclas con material liofilizado	29
4.13 Cuantificación de mezclas GM con material liofilizado.....	29
4.14 Análisis estadístico de datos.....	30
5. Resultados y discusión.....	34
5.1 Identificación de evento específico MON810	34
5.2 Preparación de mezclas en distintos porcentajes (m/m) 10, 1 y 0.1% con material GM y convencional. Y extracción del ADN.....	37
5.3 Cuantificación de mezclas con contenido conocido de evento específico MON810 por la técnica de qPCR	38
5.4 Resultados de la liofilización de las muestras	43
5.5 Preparación de mezclas en distintos porcentajes (m/m) 10, 1 y 0.1% con material GM y convencional liofilizado. Y extracción del ADN	44
5.6 Cuantificación de mezclas con contenido conocido de evento específico MON810 por la técnica de qPCR	44
6. Conclusiones.....	50
7. Bibliografía.....	51
8. Apéndice.....	53

1. Resumen

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México; sin embargo, recientemente su producción se ha visto afectada, en los años 2002 y 2005 la producción de maíz tuvo un decremento de 4.1 y 10.9%, respectivamente, por problemas causados por fenómenos naturales, plagas, uso de herbicidas inadecuados o una combinación de los anteriores (SAGARPA, 2006).

Actualmente la biotecnología ha permitido el mejoramiento del maíz con el desarrollo de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), haciendo posible la obtención de maíz resistente a condiciones adversas como plagas o enfermedades, el mejoramiento de los rendimientos de cultivo e incluso de su calidad nutricional. El comportamiento de los OGM liberados al ambiente aún es difícil de predecir, por lo tanto en México se han establecido regulaciones que permiten controlar el cultivo a nivel experimental, y su producción comercial. En 2005, se publicó en México la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), en donde en el Artículo 13 fracción III de la LBOGM menciona que “Es competencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) resolver y expedir permisos para realizar actividades con OGM, así como establecer y dar seguimiento a las condicionantes y medidas de bioseguridad a las que se deben sujetar los permisionarios...” (LBOGM, 2005a), para ejecutar la LBOGM, la SAGARPA, a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), estableció al Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), como la entidad encargada de proveer resultados técnico-científicos que coadyuven con la toma de decisiones en materia de Bioseguridad de OGM. De esta manera el CNRDOGM diseña y valida metodologías que serán referencia para otros laboratorios de coadyuvancia para la detección, identificación y cuantificación de OGM, así como los materiales de referencia para dichas pruebas.

En México, la autoridad competente realiza el análisis de maíz GM principalmente a partir del tejido vegetal (hoja verde) de los cultivos producidos en el país, por lo cual es necesario, diseñar y validar metodologías, con las que se puedan obtener resultados confiables.

El presente estudio para la cuantificación de mezclas de hojas GM provee al país de confianza en las mediciones en materia de inocuidad de alimentos que se realizan en beneficio de los productores, consumidores e industria. El aseguramiento de la calidad en el análisis molecular de muestras genéticamente modificadas se llevo a cabo bajo una trazabilidad verificada al Sistema Internacional (SI) con el uso de técnicas de vanguardia y del mayor nivel metrológico en el área de análisis molecular como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual ofrece una alta especificidad en sus determinaciones y la sensibilidad necesaria para detectar hasta una molécula de ADN genéticamente modificada. Todas las características de calidad en el análisis de OGM toman mayor relevancia cuando se considera la necesidad de demostrar y garantizar la libre presencia o en su caso el tipo y cantidad de las modificaciones genéticas presentes.

La caracterización del tejido vegetal permitirá la producción de materiales de referencia (MR) que cumplan con la normatividad nacional e internacional. Todo el estudio se realizó bajo un riguroso sistema de gestión de calidad y conforme a la normatividad internacional ISO/IEC 17025:2005, a fin de garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos y para asegurar que cualquier laboratorio con fines de diagnóstico molecular pueda reproducir el método de análisis propuesto. Se logro la identificación de la modificación genética (MON810) en las muestras provenientes del cultivo con permiso de liberación al ambiente y posterior acondicionamiento y generación de mezclas en fracción masa para los ensayos de cuantificación en los cuales se obtuvieron resultados satisfactorios.

2. Antecedentes

Los OGM, son cultivados con fines comerciales desde 1994, cuando Estados Unidos aprobó el uso y liberación al ambiente de un tipo de tomate denominado “FlavSavr®”, el cual tenía la cualidad de madurar tardíamente. En el año 2010 aproximadamente 10% de la superficie total mundial de cultivos fue plantada con OGM (James, 2011). Actualmente más de 30 países cultivan OGM con fines comerciales, y muchos otros realizan o han realizado pruebas de campo para su liberación al medio ambiente. El número de OGM aumenta rápidamente gracias a la diversidad de nuevos elementos genéticos disponibles, en el mercado mundial se pueden encontrar más de 130 cultivos GM representando a 22 especies diferentes (Ramessar *et al.*, 2008). Todos estos factores favorecen el incremento en la necesidad y complejidad de realizar la detección, identificación y cuantificación de OGM.

Según la LBOGM, un OGM es “cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna que se define en esta Ley, siempre que se utilicen técnicas que se establezcan en esta Ley o en las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma” (LBOGM, 2005b). Si todo el ADN añadido se deriva de la especie receptora o una especie con la que naturalmente puede intercambiar genes, el OGM resultante se clasificará como cisgénico. Si una parte o todo el ADN añadido se deriva de otra especie con la que la especie receptora no intercambia naturalmente genes, el OGM resultante es clasificado como transgénico.

El procedimiento de análisis de un OGM se lleva a cabo en una serie completa de pasos llamados “módulos”, para determinar primero la presencia del OGM y posteriormente identificar y cuantificar el OGM en productos tales como alimentos, tejido vegetal o semillas, hasta que finalmente el resultado de la medida es proporcionado (Fig. 1).

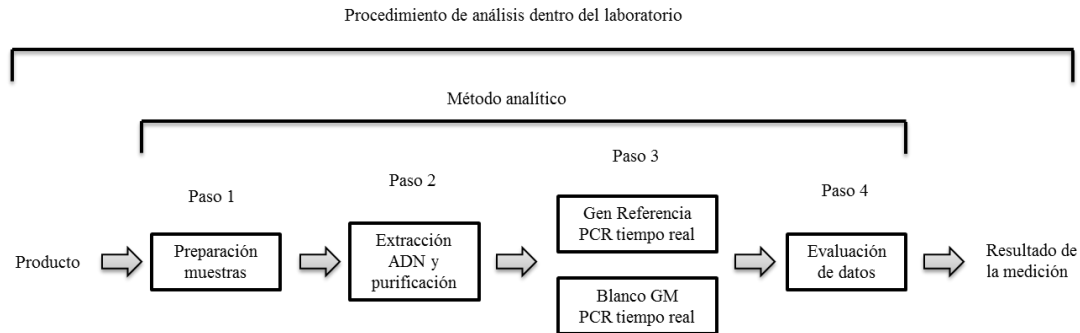


Figura 1. Enfoque modular en el análisis de OGM. Procedimiento de análisis en el laboratorio, el procedimiento analítico también incluye la toma de muestra que tendrá lugar antes de la preparación. El método analítico es un elemento central en el procedimiento y se considera como una serie de pasos que implican el uso de módulos. Cada módulo es una herramienta distinta u operación. Para un solo paso a veces hay varios módulos alternativos disponibles, lo que permite una mayor flexibilidad, (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

2.1 Técnicas de análisis de OGM

Las técnicas más utilizadas en el análisis de OGM se agrupan en dos, los ensayos inmunológicos en los cuales se detecta una proteína que proviene de una modificación genética y los ensayos moleculares que involucran el análisis de secuencias de ADN en busca de modificaciones genéticas (ISO 24276, 2006; Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G., 2007; *Codex Alimentarius*, 2010):

- Técnicas inmunológicas
 - Dispositivos de flujo lateral (*LFDs/Strips*). Membrana de flujo lateral que detecta una proteína específica. Esta técnica consiste en la inmovilización doble de anticuerpos. En la membrana de flujo lateral el anticuerpo de captura está unido directamente a uno de los extremos de la membrana, mientras que el anticuerpo detector se encuentra sobre el extremo opuesto. En este último extremo se adiciona la muestra de interés, la cual fluye por capilaridad con el anticuerpo detector en la dirección contraria. Si la proteína a la cual reconoce de manera específica el anticuerpo de captura, se encuentra presente, los tres elementos reaccionan entre sí (el anticuerpo de captura con la proteína de interés y con el anticuerpo detector) formándose una banda colorida donde el anticuerpo detector se acumula.

- Análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Uso de anticuerpos unidos de manera covalente a una “enzima reportera” como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano, cuyos productos se detectan por lo general mediante absorbancia de luz o por fluorescencia. La proteína primero se inmoviliza y después se hacen reaccionar con los anticuerpos, a continuación se determina la presencia y cantidad de anticuerpo unido al añadir el sustrato para la enzima reportera.
- Análisis de proteínas en “tercera dimensión” (*Western blot*). Las proteínas son separadas mediante electroforesis en gel. Una vez separadas, las proteínas se transfieren a una membrana, la cual luego se incuba con anticuerpos capaces de reconocer la proteína de interés. En sí, la unión del anticuerpo no es visible, pero aportando un anticuerpo secundario generado contra el anticuerpo primario se muestra la banda de la proteína: el anticuerpo secundario tiene unida a una enzima que cataliza una reacción colorida.
- Técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares de análisis de OGM se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). La PCR permite copiar masivamente secuencias específicas de ADN mediante una serie de reacciones *in vitro*, puede multiplicar secuencias específicas de ADN presentes en cantidades infinitesimales entre una población de moléculas de ADN. Uno de los prerrequisitos para la PCR es que precisa de alguna información sobre la secuencia nucleotídica del ADN a amplificar. La información de la secuencia se utiliza para sintetizar dos oligonucleótidos o cebadores: uno para el extremo 5' y otro para el extremo 3' de la secuencia que se copiará. Los cebadores se unen a una muestra de ADN cuyas moléculas se han separado en cadenas sencillas. Los cebadores se unen a los nucleótidos complementarios que flanquean la secuencia a amplificar. Después de la hibridación (unión complementaria) se añade una

ADN polimerasa que sea resistente a altas temperaturas, y ésta sintetiza una segunda cadena de ADN. La repetición de estos pasos genera más copias del ADN.

- Reacción en cadena de la polimerasa – punto final (PCR-PF). La reacción de PCR implica tres pasos, la cantidad de ADN amplificado que se produce está en función del número de veces que se repiten estos pasos; desnaturalización del ADN de doble cadena, hibridación de los cebadores, y extensión por la polimerasa. Cada grupo de estos tres pasos, es un ciclo. Cada ciclo, que dura unos 5 minutos, puede repetirse, y en menos de 3 horas, en unos 25-30 ciclos, la cantidad de ADN aumenta más de un millón de veces. La detección del tamaño de los productos generados por la PCR, se realiza a través de un análisis electroforético por comparación con patrones moleculares conocidos (marcadores de masa molecular conocida). Sin embargo, este tipo de análisis tiene sus limitaciones ya que es inespecífico cuando hay diferentes moléculas de aproximadamente la misma masa molecular.
- Técnicas de hibridación, *Southern blot* y *dot blot*. La identidad de los productos de PCR puede ser confirmada mediante la hibridación con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de bases esté contenida en el fragmento de interés. En este caso se procede así: el ADN fraccionado por electroforesis es transferido a una membrana que actúa como soporte sólido (técnica *Southern blot*) que luego se incuba para hibridarla con una sonda radioactiva. Ésta quedará fijada donde se encuentre el segmento de ADN de interés y su presencia se revelará a través de una autorradiografía (placa fotográfica sensible a la emisión radiactiva de la sonda). La técnica de *dot blot* es un método análogo al anterior, excepto que el ADN no es transferido a la membrana a partir de un gel, sino que es absorbido a la membrana a distancias conocidas, los fragmentos de ADN previamente desnaturalizados son depositados sobre la membrana en forma de puntos.

- Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR). Los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR. Está basada en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto amplificado en la reacción. La detección y cuantificación del reportero se da gracias al empleo de un equipo termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar las señales emitidas por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.

2.2 PCR tiempo real ventajas

Los beneficios del uso de la tecnología de qPCR para la cuantificación de secuencias de ADN modificado son:

- Alta flexibilidad y disponibilidad de instrumentos (termocicladores para qPCR) y sistemas de sondas y cebadores (“químicas” para qPCR).
- Las reacciones de amplificación por qPCR se realizan en un tiempo muy reducido, comparando con la técnica de PCR-PF.
- No se requiere manipulación post-amplificación de secuencias.
- La identificación de los productos de amplificación es muy precisa gracias a sondas y cebadores más específicos.
- Es una técnica que puede utilizarse para cuantificar secuencias de ADN.

La técnica de qPCR no sólo automatiza tanto la amplificación y la detección de ADN, sino que integra ambas para que se produzcan al mismo tiempo. El tiempo, temperatura y fluorescencia son monitoreados durante la PCR en instrumentos de tiempo real.

La qPCR ha sido destinada a ser una técnica cuantitativa, que teóricamente y de forma práctica puede duplicar la cantidad de producto en cada ciclo durante muchos ciclos, cuando esta ha sido bien optimizada.

Los equipos para qPCR simplifican la cuantificación de secuencias de ADN, gracias al monitoreo del cambio en la fluorescencia durante cada ciclo, la fluorescencia reporta de manera directamente proporcional el incremento de la cantidad de producto de PCR y su aumento puede ser graficado contra el número de ciclo en el cual se lleva a cabo la detección. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN a amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula emisora fluorescente y otra molécula que inhibe o apaga esta fluorescencia ("*quencher*"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio, por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del "*quencher*" y emite fluorescencia. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. Se pueden usar distintas combinaciones de fluoróforos emisores (FAM, TET, TAMRA, HEX, JOE, ROX, CY5 y Texas Red) y *quenchers* (TAMRA, DABCYL y Methyl Red), los cuales poseen distintos espectros de emisión y absorción.

2.2.1 Químicas para la de detección de productos de qPCR

Existen generalmente dos opciones utilizadas para obtener una señal de fluorescencia proveniente de la síntesis de productos de PCR. La primera opción depende de la propiedad de que la molécula SYBR Green® pueda unirse a ADN de doble cadena y así someterlas a un cambio conformacional que resulte en el aumento de la fluorescencia. La segunda opción utiliza la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), estos métodos (Hidrólisis de sondas e Hibridación de sondas, Sondas *Hairpin* y cebadores *Scorpion*) utilizan una variedad de medios para alterar la disposición espacial relativa de los fotones donadores y de las moléculas receptoras. Estas moléculas están unidas a sondas, cebadores o en los productos de PCR y generalmente se seleccionan de manera que la amplificación de secuencias específicas de ADN tengan un incremento en su fluorescencia a una longitud de onda particular.

- Agentes intercalantes fluorescentes (SYBR Green®)
 - Es un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Es simple y económico, fácil de usar, sensible, versátil y no se necesitan sondas específicas. Sin embargo, durante la PCR puede unirse a dímeros de cebadores y a otros productos inespecíficos, resultado en una sobrestimación de la concentración del ADN blanco.
- Hidrólisis de sondas (TaqMan®)
 - Se emplea una sonda específica para el gen de interés que tiene unidos un fluoróforo reportero y un fluoróforo *quencher*. Cuando ambos fluoróforos están unidos a la sonda, el reportero no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa corta al fluoróforo reportero del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente. Se monitorea la señal fluorescente del reportero que se va acumulando en los sucesivos ciclos de PCR.

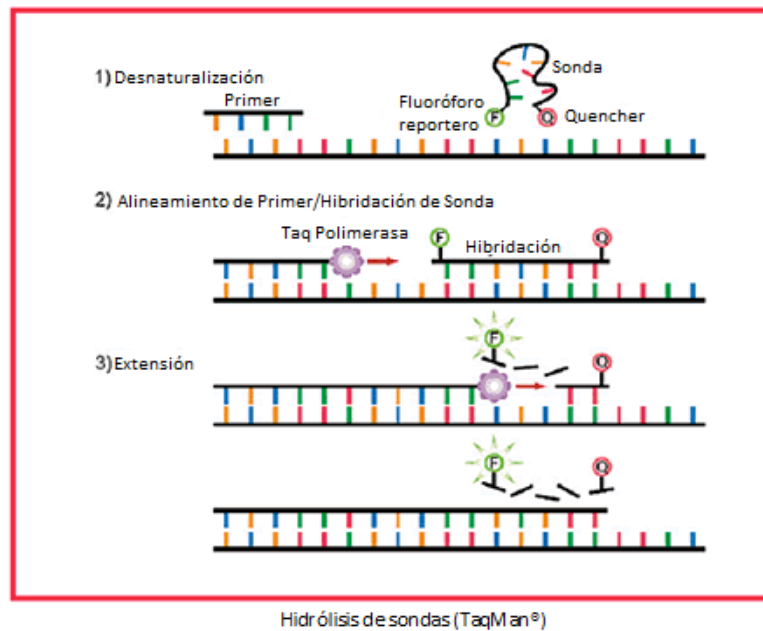


Figura 2. Representación esquemática de un ensayo de qPCR por el método de Hidrólisis de sondas (TaqMan®) (Rodríguez, M., Rodríguez, W., 2006).

- Sondas *Hairpin* (Molecular Beacons®)
 - Estas sondas poseen secuencias repetidas invertidas (ITR) en sus extremos 5' y 3'. Este diseño permite que se forme una estructura de horquilla (*hairpin*) por complementariedad de las dos regiones ITR, en ausencia de la secuencia blanco. La secuencia interna de la sonda es complementaria al blanco, dirigiendo así la hibridación específica, resultando en una eficiente separación del *quencher* y del reportero y la consecuente emisión de este último. Entre sus ventajas están que son más específicas que las sondas TaqMan® (deben tener un cambio conformacional para hibridar con el blanco), permiten distinguir dos secuencias blanco muy similares entre sí y que se pueden combinar varias Molecular Beacons® en una única reacción empleando diferentes compuestos fluorescentes para identificar distintas secuencias blanco específicas.

- Cebadores *Scorpion*
 - Los *scorpions* son cebadores de PCR con una cola tallo y asa ("*Stem-Loop*") que contiene un fluoróforo y un *quencher*. La estructura de tallo y asa se separa de la secuencia del cebador de PCR por una modificación química que evita que se copie la secuencia de tallo y asa del *scorpion*. Durante la PCR, los cebadores *scorpions* se amplifican para formar productos de PCR. En la etapa apropiada del ciclo de PCR (fase de alineamiento), la secuencia del cebador *scorpion* se enrosca para hibridarse a la secuencia blanco en el producto de PCR. Como la cola del *scorpion* y del producto de PCR es ahora parte de la misma hebra de ADN, la interacción es intermolecular. La secuencia blanco se elige típicamente para estar tres bases dentro del extremo 3' del cebador *scorpion*.

- Hibridación de sondas
 - El diseño implica el uso de dos secuencias de oligonucleótidos específicos como sondas, cada una marcada con un fluoróforo diferente, comúnmente, el

extremo 3' de la sonda donadora con fluoresceína y el extremo 5' de la sonda con aceptor con fluoróforos llamados LC Red 460 o LC Red 705. Las dos sondas están diseñadas para hibridar en sus blancos específicos en un arreglo cabeza-cola que permite que ambos fluoróforos estén en estrecha proximidad entre sí. Así, la transferencia de energía de resonancia sólo ocurre cuando ambas sondas se hibridan al blanco y se encuentran muy próximas entre sí, siendo la distancia óptima de uno a cinco bases entre las sondas.

2.2.2 Cuantificación de ADN por qPCR

Los equipos para qPCR miden la cinética de acumulación de producto de PCR por celda de reacción. Una gráfica de amplificación muestra el cambio de la señal de fluorescencia contra el número de ciclos. Generalmente, cuando la señal de fluorescencia es menor al umbral del instrumento y durante los primeros ciclos de reacción no se detectan productos. Gracias a la combinación de la capacidad técnica del equipo y de los fluoróforos reporteros utilizados se determina la línea de fondo para el diagrama de amplificación, línea que indica el comienzo de los cambios en la señal de fluorescencia. El aumento de la fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR (Cortazar *et al.*, 2004), por esta razón es que a menor concentración de ADN molde, se requiere un mayor número de ciclos para que el producto acumulado de PCR pueda ser detectado. La amplificación de cualquier ADN molde es definida por 4 fases: 1-línea base, 2-exponencial; 3-lineal y 4-plana. El ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (*background*) se llama ciclo umbral (Ct: *threshold cycle*), el Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y se calcula durante la fase exponencial. Durante este tiempo la eficiencia de la PCR es cercana al 100% ya que se obtiene el doble de producto durante cada ciclo. Cuando la concentración de productos se acerca al nanogramo por microlitro (ng/ μ L) la eficiencia de la amplificación decae debido primordialmente a que los productos se re-asocian durante la fase de alineamiento. Esto conlleva a una fase en donde la acumulación de producto que se vuelve aproximadamente lineal con un nivel constante de síntesis de

producto de reacción durante cada ciclo de esta fase. Finalmente se alcanza una fase estacionaria cuando la síntesis de producto se aproxima a cero. La cuantificación por qPCR se da midiendo el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia alcance el nivel del umbral o el máximo de la segunda derivada de la curva de fluorescencia contra los ciclos de amplificación. El número de ciclos es proporcional al número de copias presentes en la muestra analizada. El uso de una curva estándar generada a partir de la construcción de una gráfica del logaritmo de la concentración para un sistema de estándares contra el Ct, permite la cuantificación de ADN objetivo en muestras.

La fase 1 o de línea base contiene toda la amplificación que está por debajo del nivel de detección del equipo de qPCR. En la fase plana es donde la amplificación rápidamente cesa para el resto de los ciclos del experimento (Tevfik, 2007). Los datos con los que se trabajan, se adquieren cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial.

2.2.3 *Gen referencia en qPCR*

Para que un gen sea considerado como de referencia o estándar debe tener un nivel de expresión genética constante y contar con las siguientes características:

- El gen de referencia debe tener el mismo número de copias en todas las células.
- Debe expresarse en todas las células (para cuantificación de RNA).
- Debe ser endógeno de la especie en estudio.
- Tener un número de copias bajo.

No es posible encontrar un estándar perfecto, pero si es posible validar una estándar o estándares para la muestra en análisis. En qPCR el gen de referencia es utilizado como control de la calidad de los productos de PCR debido a que este no modifica el ciclo de amplificación, el gen de referencia debe ser constante y repetible entre diferentes muestras de un mismo tejido y entre las evaluaciones en diferentes equipos termocicladores a una concentración determinada.

2.3 Enfoque Modular en el análisis de OGM

Un gran número de factores analíticos (tratamiento físico de matrices, tamaño de partícula, calidad del ADN, analistas, reactivos químicos, equipos, etc.) y factores biológicos, pueden influir en los resultados de la cuantificación de ADN, además de contribuir en la incertidumbre del análisis por qPCR (Zhang *et al.*, 2007).

El enfoque modular como medio para disminuir la incertidumbre en la detección, identificación y cuantificación de muestras de ADN ofrece como principal ventaja flexibilidad en el diseño de las validaciones y la creación de estrategias de prueba con la posibilidad de adecuarse a los productos estudiados. El enfoque de análisis modular se ha aplicado principalmente en el análisis de ADN a través de la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa. En el contexto del análisis de OGM cada módulo se caracteriza por su especificidad, para los módulos de PCR es común discriminar entre cuatro niveles de especificidad (Fig. 3).

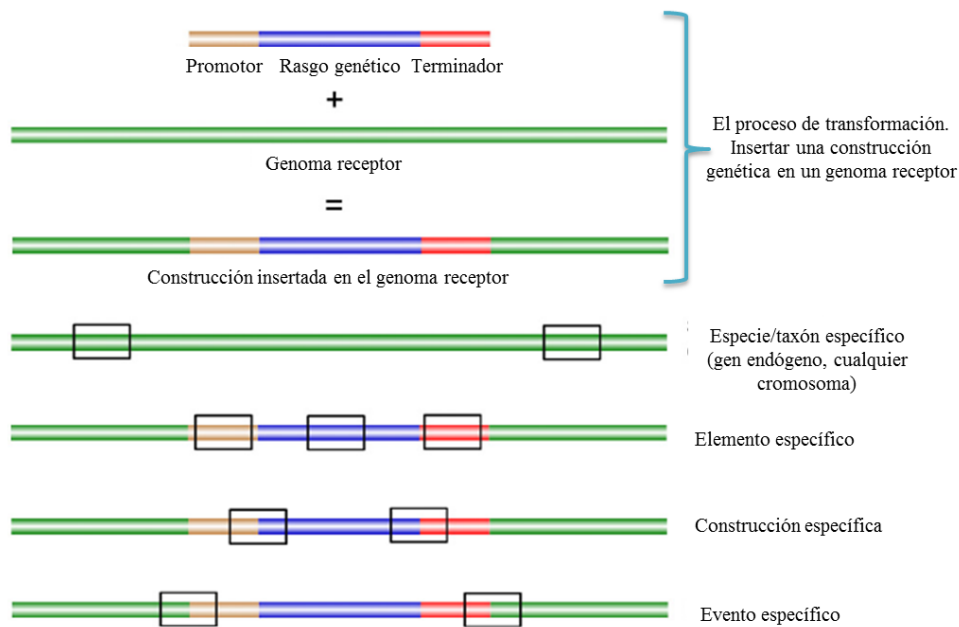


Figura 3. Proceso de transformaciones y los cuatro niveles de especificidad de los módulos de análisis dirigidos a secuencias de ADN, (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

2.3.1 Módulo especie/taxón específico

Se realiza la detección de una secuencia específica que sea característica de la especie/taxón (gen endógeno de la especie/taxón). Idealmente la secuencia objetivo está constantemente presente en la especie/taxón de estudio y ausente en otras especies o taxones. Es por eso que dicha secuencia no exhibe variación alélica (Hernandez *et al.*, 2004; Papazova *et al.*, 2010). Cuando este tipo de módulo es utilizado para propósitos cuantitativos, se prefiere que la presencia de secuencia endógena se encuentre como una sola copia en el genoma haploide de la especie/taxón seleccionado. La cuantificación de la secuencia endógena de la especie/taxón en una muestra proporciona la base para el cálculo del contenido relativo de OGM, como por ejemplo se requiere en los reglamentos de la Comisión Europea (European Commission, 2003a).

2.3.2 *Módulo elemento específico*

Se tiene como objetivo un pequeño inserto de una secuencia motivo de ADN. Esta secuencia puede ser por ejemplo un promotor, un terminador, un intrón o la parte codificante de un gen. El uso del módulo elemento específico es adecuado cuando sólo se quiere determinar si es probable o no la presencia de un OGM. Este tipo de análisis puede limitar la lista de OGM candidatos presentes en una muestra y provee pistas para la identificación del OGM presente.

2.3.3 *Módulo construcción específica*

El objetivo en un módulo de PCR construcción específica, es un inserto de una secuencia motivo de ADN que está compuesta por lo menos de dos elementos que no se encuentran naturalmente coexistiendo entre sí. En otras palabras, la construcción específica contiene una secuencia quimérica en donde los extremos 5' y 3' derivan en dos elementos separados o diferentes. Para un módulo construcción específica es necesario contar con dos cebadores de oligonucleótidos diferentes que habrán de hibridarse cada uno con los extremos de la secuencia quimérica. El uso de los módulos construcción específica es adecuado para la detección y cuantificación de OGM, ya que cuando los resultados son positivos proporcionan pruebas irrefutables de la presencia de OGM. Los módulos

construcción específica se limitan para la identificación de OGM, ya que más de un OGM puede tener la misma construcción.

2.3.4 *Módulo evento específico*

El objetivo en un módulo de PCR evento específico es una secuencia motivo perteneciente a un solo OGM. La secuencia motivo es la firma inequívoca o una etiqueta de un determinado OGM. En la mayoría de los casos el evento específico se crea de *novo* cuando la construcción es agregada en el genoma receptor. Las secuencias evento específico son usualmente, pero no siempre, la integración de regiones fronterizas, es decir la fusión de los pares de bases terminales de la secuencia de ADN a insertar con los pares de bases adyacentes del genoma huésped receptor ya sea la región 5' o 3'. Una construcción específica no puede ser considerada como evento específica, ya que la misma construcción puede ser usada varias veces para desarrollar un OGM. Los módulos de PCR evento específico son especialmente adecuados para la identificación y cuantificación de OGM y representa la base jurídica en la autorización de un OGM para su uso comercial como alimento en la mayoría de las naciones. Para autorizar el uso comercial de un OGM, la Unión Europea (UE) pide al promovente proporcionar un método de detección específico al OGM así como sus materiales de referencia control (European Commission, 2003b). En México el personal oficial de la SAGARPA toma una muestra de tejido vegetal del cultivo y mediante una prueba inmunológica en campo se determina la presencia o ausencia de proteínas características de materiales genéticamente modificados. La muestra colectada es enviada al CNRDOGM para su análisis correspondiente mediante el uso de técnicas moleculares.

Actualmente no existen métodos validados reportados en el mundo basados en el análisis de muestra de tejido vegetal GM, únicamente se reportan para mezclas de harina de diferentes especies como soya, algodón y maíz, motivo por el cual el presente estudio utiliza muestras de tejido vegetal con modificación genética (Fig. 4) para validación de los ensayos en este tipo de material GM.

2.4 Evento MON810

La bacteria *Bacillus thuringiensis* produce grandes cantidades de diversas proteínas durante su última fase de crecimiento, las cuales conforman un cristal dentro de sus células. Estas endotoxinas, llamadas Cry, rompen el intestino de los insectos susceptibles que las ingieren, causándoles la muerte. Su especificidad es tan alta, que sólo atacan a un grupo específico de insectos, como por ejemplo las orugas de los lepidópteros. Todas estas toxinas son el producto directo de la expresión de genes contenidos en la bacteria, de ahí su importancia en la transferencia de estos genes a las plantas. Es decir, cuando estos genes son integrados al genoma de las plantas, éstas producen la toxina como cualquier otra proteína de sus tejidos. Si una plaga susceptible ingiere el tejido de la planta transgénica, la plaga se intoxicará y morirá sin siquiera haber causado un daño perceptible a la planta.

El maíz MON810 alberga el gen *cry1 A(b)* y está bajo la regulación del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), dicho gen produce una versión truncada de la proteína Cry1 A(b), la cual funciona como insecticida en contra de insectos lepidópteros teniendo como blanco especial a las orugas del taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*).

En la Figura 4 se muestran los tres componentes principales de evento específico MON810: 1) Promotor CaMV 35S, 2) Gen *hsp 70* y 3) Gen *cry1 A(b)*. La secuencia completa del evento está conformada por 4983 pares de bases (GMDD, 2008).

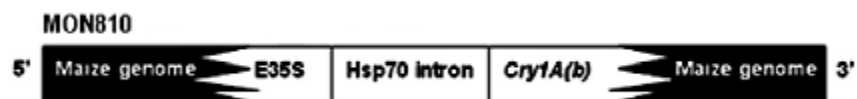


Figura 4. Evento específico MON810, contiene el gen *cry1 A(b)* de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, (GMDD, 2008).

2.5 Validación de un método analítico para la cuantificación de OGM

Cualquier diagnóstico o ensayo debe validarse conforme a una norma nacional e internacional ISO/IEC 17025:2005 que de certeza de que el laboratorio y personal involucrados proveen de evidencia objetiva de resultados y que se cuenta con un sistema

metrológico que asegura que los equipos utilizados están calibrados de acuerdo a sus características.

Una acreditación bajo la ISO/IEC 17025:2005 implica que “el laboratorio en cuestión debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de realizar ensayos”.

Un nuevo método analítico se desarrolla a través de una serie de pasos. Después de las fases de desarrollo y optimización, el laboratorio que elabora el método debe realizar una validación interna del nuevo método, para asegurarse que éste sea apto para el propósito previsto. La validación de los métodos es una parte esencial de los procesos regulatorios de introducción de nuevos alimentos modificados genéticamente en el mercado internacional.

La validación del método analítico, garantiza la calidad del sistema utilizado y resultados confiables, así mismo es necesaria para proporcionar un alto grado de confianza, seguridad en el método y en la calidad de los resultados, también permite un conocimiento profundo del método, así como de las características de su funcionamiento, con la finalidad de disminuir el número de variables, fallas y repeticiones, ahorrando costos asociados y consecuentemente cumplir con los plazos previstos de análisis.

Las características de desempeño de este nuevo método analítico se expresa en función de los siguientes requerimientos y criterios de validación, de acuerdo al documento “*Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*” emitido por la JRC (*Joint Research Centre*) de la Comisión Europea (ENGL, 2008):

- Extracción de ADN.
 - Concentración de ADN. Es la cantidad de analito por unidad de disolución.

Criterio de aplicación. El método de extracción de ADN empleado será el apropiado para obtener una cantidad de ADN requerido para los análisis. La concentración de ADN será medida como peso de analito por volumen de

disolución y tendrá que ser igual a la que indique el protocolo de análisis. Esto es, si el protocolo para qPCR indica 50 ng/μL como la concentración de la disolución de ADN que será adicionada a la mezcla de reacción, la concentración final de la extracción de ADN, después de la estandarización (si es necesaria), tendrá que ser igual a 50 ng/μL.

- Eficiencia de amplificación.

El valor teórico de la pendiente en una curva estándar es de -3.32 lo cual resulta en un valor del 100% de eficiencia de amplificación. La eficiencia de amplificación en porcentaje puede ser calculada con la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = \left(10^{-\frac{1}{m}} - 1\right) \times 100$$

Donde: m es la pendiente de la curva estándar.

Criterio de aplicación. Se aceptara una curva estándar cuando los valores promedio de la pendiente de la curva estándar estén en el rango de $-3.6 < m < -3.1$, correspondientes a una eficiencia de amplificación de 90 a 110% respectivamente.

- Coeficiente R^2

R^2 es el coeficiente de correlación, el cual es calculado como el cuadrado del coeficiente de correlación (entre el valor de C_t - experimental y el logaritmo de la concentración) de la curva estándar obtenido mediante un análisis de regresión lineal.

Criterio de aplicación. El valor del coeficiente R^2 será ≥ 0.98 .

- Precisión: Desviación Estándar de la Repetibilidad relativa (RSDr)

Se refiere al grado de concordancia existente entre los propios resultados obtenidos. La precisión del método de medición se expresa en términos de la desviación estándar relativa obtenida bajo condiciones de repetibilidad:

Repetibilidad: proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mensurando, con las mediciones realizadas con la aplicación de la totalidad de las siguientes condiciones:

- Mismo mensurando
- Mismo lugar
- Mismo analista
- Mismo procedimiento de medición
- Misma matriz vegetal
- Mismos instrumentos de medición
- La repetición dentro de un periodo corto de tiempo

Criterio de aplicación. La desviación estándar obtenida bajo condiciones de repetibilidad tendrá que ser $\leq 25\%$ en todo el intervalo dinámico del método (un estimado de la desviación estándar obtenida bajo condiciones de repetibilidad tiene que ser obtenido a partir de un número suficiente de pruebas, al menos 10).

- Incertidumbre (U)

Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.

Criterio de aplicación. De acuerdo a estudios previos en el CNRDOGM se ha encontrado que la incertidumbre tendrá que ser $\leq 50\%$ cuando la concentración de material GM se encuentre entre 0.1 – 0.9% y $\leq 30\%$ cuando la concentración de material GM se encuentre entre 1 – 100%.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

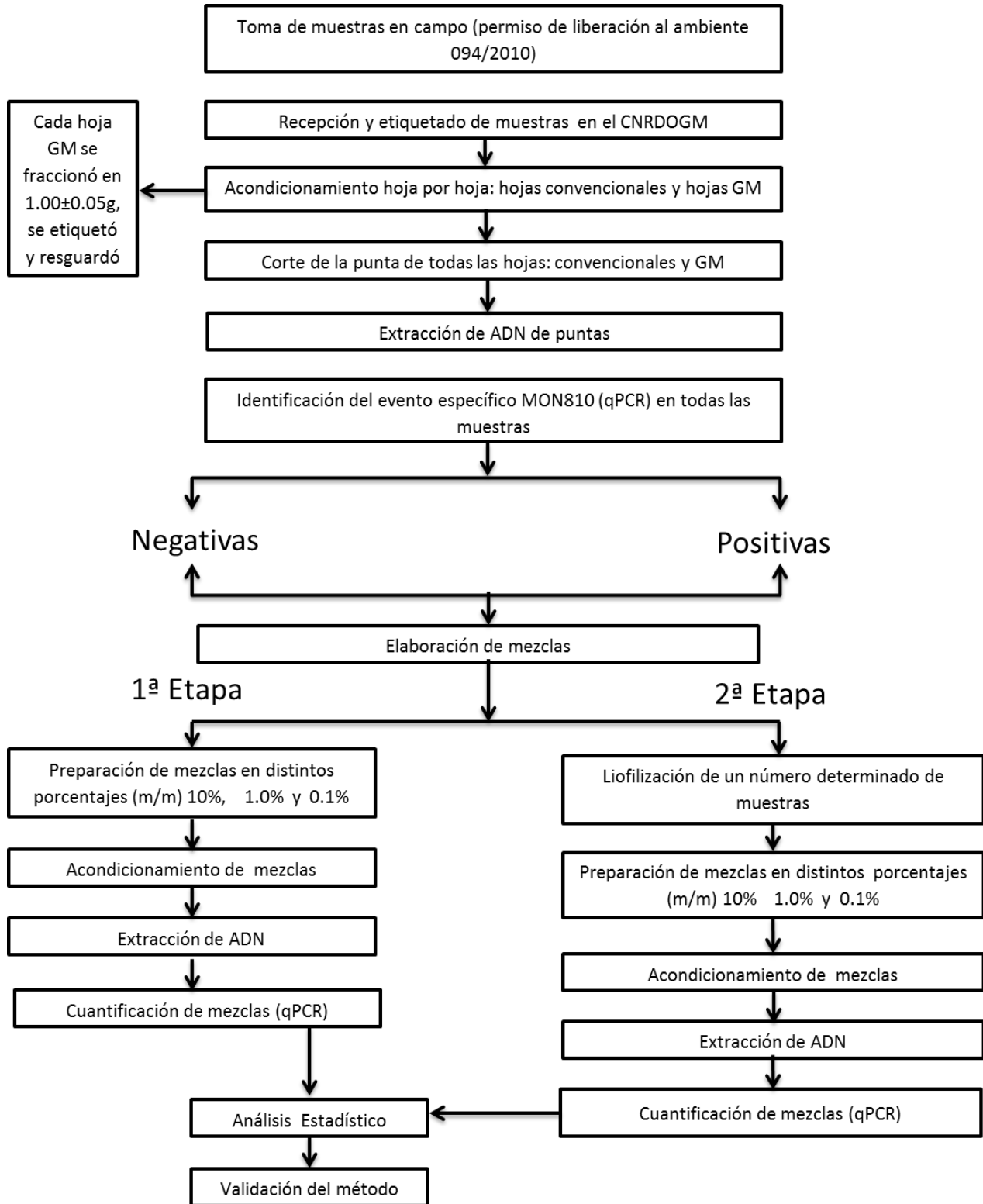
- Realizar la validación de la metodología para la cuantificación de OGM en tejido vegetal (hoja verde) por medio de la técnica de qPCR.

3.2 Objetivos particulares

- Identificar la modificación genética en maíz de cada una de las muestras colectadas.
- Realizar mezclas en fracción masa con material GM y no GM.
- Realizar la cuantificación de material (GM) en muestras con diferentes concentraciones fracción masa de tejido vegetal (hojas de maíz con evento específico MON810) a través de la técnica de qPCR.
- Generar los valores estadísticos para validar la metodología propuesta.

4. Metodología

4.1 Diagrama de bloques de la estrategia experimental



4.2 Toma de muestras

A partir del permiso de liberación al ambiente 094/2010, se recolectaron aleatoriamente 51 hojas de maíz del cultivo GM, conteniendo el evento MON810 y cuya información es la siguiente:

Solicitud: 094/2010

Fecha de solicitud: 23/11/2010

Promovente: PHI México, S.A. de C.V.

Evento: MON-00810-6

Organismo: *Zea mays* L.

Nombre: Maíz

Fenotipo adquirido: para la protección contra algunos insectos Lepidópteros

Estado: Chihuahua

Municipios: campos de agricultores cooperantes del estado de Chihuahua

Sitio de liberación: Regiones de Ahumada y Cuauhtémoc

Extensión autorizada (hectáreas): 0.0384

Fecha de resolución: 11/05/2011

Tipo de liberación: Experimental

Ciclo agrícola: primavera-verano 2011

Superficie sembrada (hectáreas): 0.018

4.3 *Recepción y registro de muestras*

Para asegurar la trazabilidad de las muestras, a cada hoja (convencional y GM) se le asignó un código con el cual se identificaron las hojas durante todo el experimento.

4.4 *Distribución hoja por hoja*

Cada hoja convencional y GM se colocó individualmente en una bolsa con el código previamente asignado. Cada hoja GM se fraccionó en lotes de 1.00 ± 0.05 g, se etiquetaron y almacenaron a -20 °C. Los lotes obtenidos se realizaron para poder elaborar las mezclas (%m/m) de forma más sencilla, las hojas completas pesaban en promedio de 2 a 6 g.

4.5 *Acondicionamiento y extracción de ADN de puntas de hoja de maíz*

Utilizando material de corte nuevo entre cada muestra, se cortó la punta de todas las hojas (convencionales y GM), procurando que el corte no excediera 3 cm de hoja.

Se realizó el acondicionamiento de las muestras de la siguiente manera: reducción de tamaño de partícula agregando a la muestra en un mortero la cantidad necesaria de nitrógeno y macerándola con un pistilo hasta que el tamaño de partícula fuera homogéneo, la cantidad de nitrógeno dependía del tamaño de la muestra.

La extracción de ADN se realizó inmediatamente después del acondicionamiento y por medio del sistema comercial de Genetic ID. En resumen, la muestra se mezcló con 2 mL de buffer de lisis y se homogenizó, se colocó en un microtubo de 2 mL y se agregaron 10 μ L de proteinasa K, se mezcló en vortex brevemente hasta obtener una solución homogénea y se incubó a 65°C por 1 hora. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min en centrífuga para microtubos. Se recolectó 1 mL de sobrenadante en un nuevo microtubo de cada muestra por duplicado y se agregó un volumen igual de cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Se recolectaron entre 900 y 1000 μ L de la fase acuosa nuevos microtubos y se agregó un volumen igual de buffer de unión y se agitó en vortex brevemente. Se centrifugó a 10000 rpm por 3 min. El sobrenadante se pasó a través de una columna de unión de ADN en una bomba de vacío especial para columnas de unión a ADN, en el mismo equipo las columnas se lavaron con 800 μ L de buffer de

lavado y posteriormente se realizaron tres lavados con 800 µL de etanol al 75%, se realizó una última centrifugación a 10000 rpm por 3 min. Se transfirió la columna a microtubos de 1.6 mL y se agregaron 50 µL de buffer 1x TE, se incubó por 5 min a 65°C, pasados los 5 min se centrifugó a 10000 rpm por 3 min y se repitió una vez más el procedimiento comenzando con 50 µL de buffer 1x TE, para obtener un volumen final de 100 µL de buffer 1xTE con ADN en suspensión.

La pureza y concentración se analizaron midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, por medio del espectrofotómetro NanoDrop® 2000. Posterior a la cuantificación de las muestras se estandarizaron a 50 ng/µL utilizando como disolvente agua estéril. Cuando la concentración fue menor a 50 ng/µL se utilizó un concentrador de ADN (miVac DNA concentrator®) para alcanzar la concentración deseada, una vez estandarizadas las muestras se almacenaron a -20 °C. Se utilizó la siguiente ecuación para estandarizar:

Ecuación 1

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

- C_1 : Concentración inicial
- V_1 : Volumen inicial
- C_2 : Concentración final
- V_2 : Volumen final

4.6 Identificación de evento específico MON810 por la técnica de qPCR

La identificación del evento específico se realizó en un equipo de PCR tiempo real Applied Biosystems 7500 (ABI 7500), usando Universal PCR Master Mix, cebadores y sondas TaqMan® (Applied Biosystems), cada muestra se analizó por duplicado para identificación del evento específico MON810 y un duplicado para el gen endógeno *hmg*, cada celda contenía los reactivos necesarios para una reacción mostrados en la Tabla 1, llegando a un

volumen final de 20 μ L. Para cada análisis por PCR se incluyeron controles negativos que contenían una secuencia de otra planta diferente a *Zea mays* L. y un NTC (Not Template Control, sin adición de ADN o control de reactivos), ambas por duplicado.

Tabla 1. Concentración de los componentes para las reacciones de qPCR

No.	Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción de 20 μ L
1	Agua	--	--	6.1 μ L
2	Master mix	2X	1X	10 μ L
3	Cebador Forward (Sentido)	10 μ M	300 nM	0.6 μ L
4	Cebador Reverse (Antisentido)	10 μ M	300 nM	0.6 μ L
5	Sonda	5 μ M	180 nM	0.7 μ L
6	ADN molde	--	100 ng	2 μ L
Volumen Final				20 μ L

Los siguientes cebadores y sondas TaqMan[®] mostrados en Tabla 2 (European Commission, 2006), se utilizaron en todas las reacciones del experimento cuando se utilizó la técnica de qPCR para identificación o cuantificación del evento específico MON810 y el gen endógeno del maíz *hmg*.

Tabla 2. Secuencias de cebadores y sondas

Nombre	Secuencia de oligonucleótido ADN
Secuencia objetivo gen de referencia (<i>hmg</i>)	
Cebador Forward (Sentido)(ZM1-F)	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'
Cebador Reverse (Antisentido)(ZM1-R)	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'
Sonda (ZM1)	5'-FAM—CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-TAMRA-3'
Secuencia objetivo OGM (MON810)	
Cebador Forward (Sentido)(Mail-F1)	5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT-3'
Cebador Reverse (Antisentido)(Mail-R1)	5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'
Sonda (Mail-S2)	5'-FAM-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-TAMRA -3'
FAM: 6-carboxylfluorecina, TAMRA: 6-carboxyltetrametilrodamina	

El equipo ABI 7500 fue programado con el protocolo de tiempo-temperatura tal como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Procedimiento – condiciones de qPCR para el equipo ABI 7500.

	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Incremento de Temperatura (°C/s)
Pre-PCR (1 ciclo por etapa)			
Pre-PCR activación ADN polimerasa	120	50	1.6
Pre-PCR desnaturalización del ADN molde	600	95	1.6
PCR (45 ciclos)			
Desnaturalización	15	95	1.6
Alineamiento y elongación	60	60	1.6

4.7 Preparación de mezclas en distintos porcentajes en fracción masa

Se prepararon mezclas al 10, 1 y 0.1% con las hojas que previamente fueron identificadas como positivas a la presencia del evento específico MON810 (GM) y negativas a la presencia del evento específico MON810 (convencionales), y se realizaron de la siguiente forma: las hojas se colocaron en un mortero, se trituraron agregando suficiente nitrógeno líquido hasta que el tamaño de partícula fuera homogéneo. A continuación se pesó la cantidad de hoja transgénica correspondiente al porcentaje masa y se agregó hoja convencional hasta completar 10 g totales. Los 10 g totales de mezcla se dividieron en cuatro muestras de 2 ± 0.2 g y cada fracción se colocó en un mortero limpio, el resto de los 10 g se desechó.

Nota: Para evitar contaminación de las mezclas el material se renovó y las mesas de laboratorio se limpiaron y sanitizaron después de realizar cada mezcla o cualquier operación que involucrara el procesamiento de hojas. Las mezclas se realizaron en un porcentaje a la vez.

4.8 Acondicionamiento y extracción de ADN de mezclas

Las mezclas se sometieron a un nuevo proceso de reducción de partícula con nitrógeno líquido en el mortero donde se colocó la mezcla de hojas, se agregó el nitrógeno líquido y

con un pistilo de cerámica se pulverizo hasta que el tamaño de partícula fuera el más pequeño posible.

La extracción de ADN se realizó inmediatamente después del acondicionamiento utilizando el sistema comercial de extracción y de la misma forma que en el apartado 4.5 de metodología, con la consideración de que se utilizaron 5 mL de buffer de lisis, tubos falcon de 15 mL y 30 μ L de proteinasa K. Adicional al acondicionamiento y extracción de las mezclas se extrajeron dos muestras de diferentes hojas GM, por duplicado, bajo el mismo procedimiento antes descrito.

La pureza y concentración se analizaron de la misma forma que en el apartado 4.5 de metodología.

4.9 Cuantificación de mezclas GM

La cuantificación de las mezclas se realizó en un sistema Light Cycler® 480 de Roche (LC 480), usando Light Cycler® 480 Probes Master de Roche, cebadores y sondas TaqMan® (Applied Biosystems), cada extracción se cuantificó por duplicado, dando un total de dieciséis repeticiones por mezcla para cumplir con el parámetro de repetibilidad, cada celda contenía los reactivos necesarios para una reacción mostrados en la Tabla 1, llegando a un volumen final de 20 μ L. Para cada análisis por PCR se incluyeron controles negativos que contenían una secuencia de otra planta diferente a *Zea mays* L. y un NTC (Not Template Control, sin adición de ADN o control de reactivos), ambas por duplicado.

Se utilizaron los cebadores y sondas TaqMan® mostrados en Tabla 2.

El equipo LC 480 fue programado con el protocolo de tiempo-temperatura tal como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Procedimiento – condiciones de qPCR para el equipo LC 480.

	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Incremento de Temperatura (°C/s)
Pre-PCR (1 ciclo)			
Activación ADN polimerasa y desnaturalización del ADN molde	600	95	4.4
PCR (45 ciclos)			
Desnaturalización	10	95	4.4
Alineamiento	30	60	2.2
Elongación	1	72	4.4
Enfriamiento (1 ciclo)			
Enfriamiento	30	40	2.2

La construcción de la curva estándar se elaboró de la siguiente forma: cuatro diluciones seriales de ADN genómico proveniente de la hoja de maíz modificada genéticamente la cual contenía el evento específico MON810, utilizando éste como el material de referencia que contenía la secuencia diana esperada. El ADN genómico que previamente fue aislado y estandarizado a una concentración de 50 ng/μL se diluyó en serie para alcanzar concentraciones finales equivalentes a 100, 10, 1 y 0.1 ng/μL por reacción.

4.10 *Liofilización de muestras*

Las hojas convencionales se colocaron dentro de un tubo falcon de 50 mL sin que éstas excedieran el 30% del volumen total del tubo. Las fracciones de las hojas con el evento MON810 se colocaron en tubos falcon de 50 mL de forma individual.

Cuando las muestras convencionales y GM se encontraban distribuidas y etiquetadas se almacenaron a -70 °C durante 48 h, se encendió la liofilizadora hasta que la temperatura del colector alcanzara los -52 °C y esta se mantuviera constante. Se colocaron las muestras en la liofilizadora y se activó el vacío (presión 0.22 mBar). Cuando el equipo llegó a las condiciones de trabajo (-52 °C y 0.22 mBar de presión) comenzó el registro de tiempo, las muestras se pesaron 3 veces (a las 6, 24 y 48 h) hasta que su peso fuera constante. Una vez que el peso fue constante las muestras se almacenaron a -20 °C.

4.11 *Preparación de mezclas con material liofilizado, en distintos porcentajes fracción masa*

Se prepararon mezclas al 10, 1 y 0.1% con las hojas previamente liofilizadas de la siguiente forma: las hojas previamente liofilizadas se colocaron en un mortero, se trituraron agregando suficiente nitrógeno líquido hasta que el tamaño de partícula fuera homogéneo. A continuación se pesó la cantidad de hoja transgénica correspondiente al porcentaje masa y se agregó hoja convencional hasta completar 2 g totales. Las mezclas se colocaron en un tubo falcon de 50 mL.

4.12 *Acondicionamiento y extracción de ADN de mezclas con material liofilizado*

Las mezclas se sometieron a un nuevo proceso de reducción de partícula con nitrógeno líquido, en el mismo tubo falcon de 50 mL se agregó el nitrógeno líquido y con un pistilo de cerámica se pulverizó hasta que el tamaño de partícula fuera el más pequeño posible.

La extracción de ADN se realizó inmediatamente después del acondicionamiento utilizando el sistema comercial de extracción y de la misma forma que en el apartado 4.5 de metodología, con la consideración de que se utilizaron 10 mL de buffer de lisis, tubos falcon de 15 mL y 60 μ L de proteinasa K. Adicional al acondicionamiento y extracción de las mezclas se acondicionaron y extrajeron dos muestras de diferentes hojas GM que también fueron liofilizadas, por duplicado, bajo el mismo procedimiento antes descrito.

La pureza y concentración se analizaron de la misma forma que en el apartado 4.5 de metodología.

4.13 *Cuantificación de mezclas GM con material liofilizado*

La cuantificación de las mezclas se realizó en un sistema ViiA 7 de Applied Biosystems, usando Universal PCR Master Mix, cebadores y sondas TaqMan® (Applied Biosystems), cada extracción se cuantificó por triplicado, dando un total de diez repeticiones por mezcla para cumplir con el parámetro de repetibilidad, cada celda contenía los reactivos necesarios para una reacción mostrados en la Tabla 1, llegando a un volumen final de 20 μ L. Para cada análisis por PCR se incluyeron controles negativos que contenían una

secuencia de otra planta diferente a *Zea mays* L. y un NTC (Not Template Control, sin adición de ADN o control de reactivos), ambas por duplicado.

Se utilizaron los cebadores y sondas TaqMan® mostrados en Tabla 2.

El equipo ViiA 7 fue programado con el protocolo de tiempo-temperatura tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Procedimiento – condiciones de qPCR para el equipo ViiA 7.

	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Incremento de Temperatura (°C/s)
Pre-PCR (1 ciclo por etapa)			
Pre-PCR activación ADN polimerasa	120	50	1.6
Pre-PCR desnaturalización del ADN molde	600	95	1.6
PCR (45 ciclos)			
Desnaturalización	15	95	1.6
Alineamiento y elongación	60	60	1.6

La construcción de la curva estándar se elaboró de la siguiente forma: cuatro diluciones seriales de ADN genómico proveniente de la hoja de maíz modificada genéticamente la cual contenía el evento específico MON810, utilizando éste como el material de referencia que contenía la secuencia diana esperada. El ADN genómico que previamente fue aislado y estandarizado a una concentración de 50 ng/μL se diluyó en serie para alcanzar concentraciones finales equivalentes a 100, 10, 1 y 0.1 ng/μL por reacción.

4.14 *Análisis estadístico de datos*

El porcentaje de OGM fue obtenido a partir de la siguiente ecuación (CNRDOGM, 2011):

Ecuación 2

$$\%OGM = \frac{\text{cantidad de secuencia GM}}{\text{cantidad del gen de referencia}} \times 100$$

Donde:

- %OGM: es el porcentaje de la secuencia diana a analizada
- GM: es la cantidad obtenida a partir de la interpolación de la curva estándar de la secuencia GM
- Referencia: es la cantidad de la secuencia de referencia obtenida a partir de la interpolación de la curva de calibración de la secuencia referida.

Una vez calculado el porcentaje de OGM de cada extracción de ADN y las replicas de cada una de las mezclas, se calcularon los parámetros estadísticos (CNRDOGM, 2011) como el promedio de cada mezcla GM del número de cada medición de las mezclas y la desviación estándar (calculada con la ecuación 4).

Posterior al cálculo de la $u(\text{RSD}_p)$: incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad (ecuación 4) se realizó la suma de cuadrados (ecuación 3) con los valores obtenidos de la ecuación 4 y con el valor de incertidumbre del componente o material de referencia [$u(\text{Cref})$] para calcular el valor de la incertidumbre combinada.

Posterior al cálculo de incertidumbre combinada (ecuación 3), se logró obtener el valor de la incertidumbre expandida (ecuación 5). El valor en la ecuación 5 se sustituyó en la ecuación 6 para obtener finalmente el valor de incertidumbre relativa de la medición para la cuantificación de OGM por la técnica qPCR, ya que este valor es diferenciado y se asignó un valor de incertidumbre en dos rangos respecto a la concentración de las mezclas GM realizadas.

La estimación de la incertidumbre asociada al mensurando de cuantificación de OGM, se obtuvo a partir de la distribución estadística de los resultados analíticos cuantitativos de una serie de mediciones experimentales y se caracteriza mediante desviaciones estándar.

La estimación de la incertidumbre de la medición de los ensayos de cuantificación de secuencias GM por la técnica de PCR se calculó haciendo uso de las siguientes ecuaciones:

Ecuación 3

$$uc = \sqrt{u(C_{ref})^2 + u(RSD_{IP})^2}$$

Donde:

- uc : Incertidumbre típica combinada
- $u(C_{ref})$: Incertidumbre del componente o material de referencia
- $u(RSD_{IP})$: Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad

Ecuación 4

$$u(RSD_{IP}) = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

- $u(RSD_{IP})$: Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad
- S : Desviación promedio de la serie de datos de cada medición
- n : Número de repeticiones de cada medición

Ecuación 5

$$U = (uc)k$$

Donde:

- U : Incertidumbre expandida
- uc : Incertidumbre típica combinada

- k : Factor de cobertura (igual a 2 representado por un intervalo de confianza del 95.45%)

Ecuación 6

$$U_{Relativa} = \frac{U}{x} (100)$$

Donde:

- $U_{Relativa}$: es la incertidumbre relativa de la medición
- U : Incertidumbre expandida
- x : es el promedio en % de OGM de cada medición

Ecuación 7

$$RSDr = \frac{RSD_{IP}}{X} (100)$$

Donde:

- $RSDr$: desviación estándar relativa a la repetibilidad
- RSD_{IP} : desviación estándar del componente de medición en condiciones de repetibilidad
- X : Promedio de contenido GM (%OGM)

5. Resultados y discusión

5.1 Identificación de evento específico MON810

Cada muestra de hoja del presente estudio fue evaluada para la presencia del evento específico MON810, los resultados de la identificación (Apéndice A, B, C, D Y E) del evento específico en las hojas GM y convencionales se muestra en la Tabla 6. Con base en estos resultados se logró descartar aquellas hojas que no contenían la secuencia objetivo y que por lo tanto no cumplían con las características necesarias que las hicieran aptas para el estudio. En la Figura 5a se observa la gráfica de amplificación de las muestras positivas a la presencia del evento específico MON810, en la Figura 5b se observa la amplificación del gen endógeno del maíz (*hmg*). En las 83 muestras analizadas se observó dicha amplificación por lo que todas tienen el mismo comportamiento en la curva. En la Figura 5c se observa la comparación entre las gráficas de amplificación del gen endógeno y el evento específico MON810, se observa que la secuencia endógena del maíz se encuentra en una mayor proporción de número de copias que la secuencia del evento específico.

Tabla 6. Resultados presencia de evento específico MON810 en hojas GM y convencionales

Hojas	Número de hojas analizadas	Hojas con evento específico MON810	% Muestras Positivas a presencia E.E. MON810
GM	51	47	92
Convencionales	32	0	0

En las curvas de amplificación se muestra gráficamente la señal de fluorescencia contra el número de ciclos, se observa que en los ciclos iniciales hay un pequeño cambio en la señal de fluorescencia, esto define la línea de fondo para la gráfica de amplificación. Los gráficos de amplificación muestran el aumento de los productos de reacción detectables por el equipo termociclador, las muestras en donde se identificó la presencia de la secuencia GM se comportan como la Figura 5a. El análisis de la curva de amplificación permite establecer el umbral en donde la señal de fluorescencia indica el comienzo de la fase exponencial de la curva de amplificación. El valor de Ct experimental será proporcional al número de copias presentes en la muestra, la aparición a ciclos más tempranos corresponderá a un

mayor número de copias inicial de la secuencia que se amplifique. En el presente estudio la secuencia constitutiva es el gen *hmg* y por lo tanto es el que se encontrará en mayor proporción que la secuencia GM (MON810). En la Figura 5c se muestra la comparación entre la amplificación de la secuencia endógena y la secuencia GM para la misma muestra, se observa una marcada diferencia en el número de ciclo en el cual comienza la fase exponencial de la PCR, para este ejemplo la muestra positiva a la presencia del evento específico MON810 tienen un valor experimental de $Ct_{MON810} = 25.21$ y $Ct_{hmg} = 22.11$, alrededor de 3.1 ciclos de diferencia entre la secuencia endógena y la GM, la ecuación básica para el cálculo de número de copias en una PCR es 2^n donde “n” es el número de ciclos de amplificación por lo tanto una diferencia de 3.1 ciclos representa aproximadamente diez veces menos copias de la secuencia GM en comparación a la secuencia endógena.

Sin embargo, se observó un comportamiento inesperado en los ciclos de amplificación de la secuencia *hmg* y GM, esto debido a que de acuerdo a la fisiología de una hoja de maíz de un cultivo transgénico, el 50% del material genético proviene de un padre transgénico por lo que se espera que el número de copias de la modificación genética en el tejido vegetal se encuentre en esa proporción, en el caso de que el comportamiento fuera ideal esta proporción se observaría en una reacción de qPCR que el valor de Ct de amplificación del gen endógeno aparezca un ciclo antes que el Ct de la secuencia GM, dado que la presencia en número de copias se esperaba que fuera la mitad. Sin embargo, el resultado promedio de amplificación entre ambos genes (Tabla 7) mostró una diferencia de casi 3 ciclos de amplificación en el valor de Ct medido, lo cual muestra evidencia inicial de que las mezclas a realizar para su posterior cuantificación pueden no presentar un comportamiento típico y que el valor teórico esperado no corresponda al 50% del valor teórico esperado de las mezclas en fracción masa.

Por lo tanto, los resultados de identificación permitieron asegurar que la cantidad de material GM es suficiente para realizar el estudio, además se establece que al realizar las mezclas en fracción masa el porcentaje de OGM proviene sólo de las hojas ahora identificadas como GM.

Tabla 7. Valores de amplificación (Ct) para muestras GM.

	<i>hmg</i>	MON810		<i>hmg</i>	MON810
Muestra	Ct	Ct	Muestra	Ct	Ct
M, I, 1	24.18	27.13	M, I, 11	24.78	28.35
M, I, 2	23.99	27.03	M, I, 12	24.79	28.03
M, I, 3	23.21	25.72	M, I, 14	24.08	27.13
M, I, 4	23.76	26.20	M, I, 16	23.96	27.28
M, I, 5	24.93	28.13	M, I, 17	24.02	27.09
M, I, 6	24.78	27.65	M, I, 18	24.79	27.93
M, I, 7	23.70	26.66	M, I, 19	25.03	28.13
M, I, 8	24.76	28.44	M, II, 1	22.58	25.02
M, I, 9	24.03	26.34	M, II, 2	23.17	25.51
M, I, 10	24.64	27.50	M, II, 3	22.31	25.32
M, II, 4	23.43	25.68	M, IV, 3	22.75	25.95
M, II, 5	23.65	25.98	M, IV, 4	22.67	25.84
M, II, 6	23.96	26.74	M, IV, 5	22.87	26.05
M, II, 7	24.10	26.81	M, IV, 6	22.63	25.56
M, III, 1	23.38	26.24	M, IV, 7	24.29	26.90
M, III, 2	22.53	25.27	M, IV, 8	23.41	25.66
M, III, 3	23.32	25.30	M, IV, 9	22.41	25.42
M, III, 4	22.26	25.10	M, V, 1	24.30	25.44
M, III, 5	23.14	26.08	M, V, 2	23.21	25.71
M, III, 6	22.40	25.15	M, V, 3	24.26	25.97
M, III, 7	23.16	25.89	M, V, 4	22.40	25.24
M, IV, 1	22.26	25.25	M, V, 5	22.15	25.58
M, IV, 2	22.88	26.30	M, V, 6	22.81	25.69
			M, V, 7	22.21	25.44
Promedio	<i>hmg</i>		MON810		
	23.50		26.31		
ΔCt	2.82				

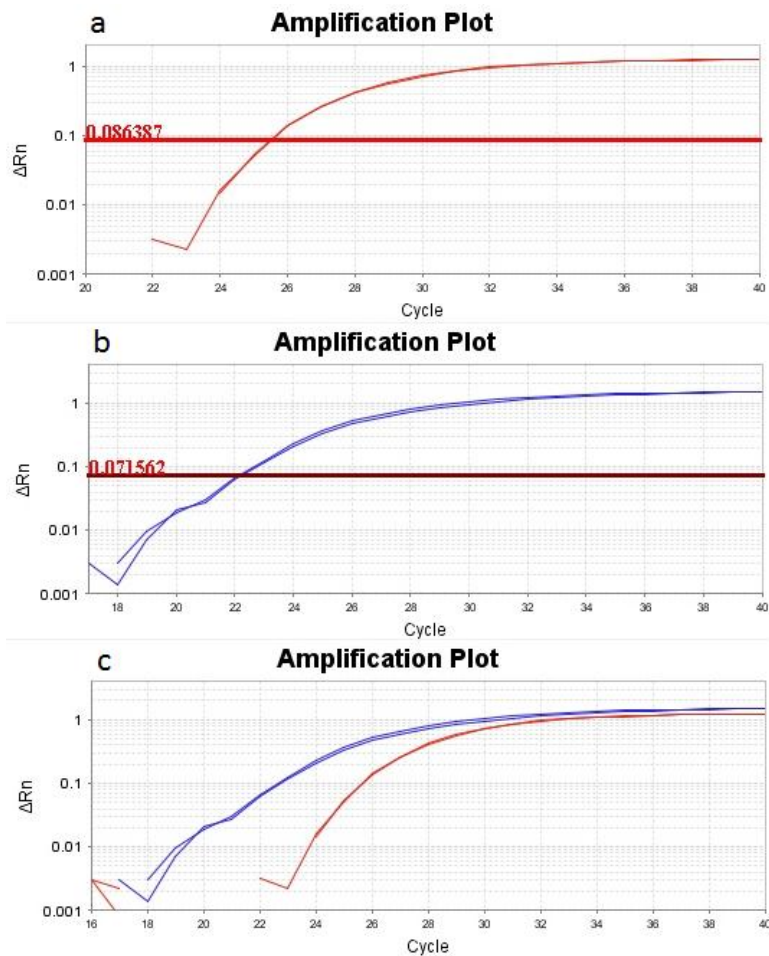


Figura 5. Amplificación de secuencias MON810 y *hmg*. a) Gráfica de amplificación en ensayo PCR para el evento específico MON810, la línea horizontal indica el umbral y el valor inicial de fluorescencia. b) Gráfica de amplificación en ensayo PCR para el gen endógeno *hmg*, la línea horizontal indica el umbral y el valor inicial de fluorescencia. c) Comparación entre gráficos de amplificación en ensayo PCR para el gen endógeno *hmg* y para el evento específico MON810.

5.2 Preparación de mezclas en distintos porcentajes (m/m) 10, 1 y 0.1% con material GM y convencional. Y extracción del ADN.

En la Tabla 8 se muestra los pesos obtenidos para realizar las mezclas al 10, 1 y 0.1% m/m.

Tabla 8. Mezclas en diferentes porcentajes de material GM

% m/m A preparar	Masa hoja GM (g)	Masa hoja convencional (g)	Masa total mezcla (g)	% m/m Teórico Mezcla
10 %	1.0486	9.0429	10.0915	10.39
1 %	0.1031	9.9320	10.0351	1.03
0.1 %	0.0100	9.9860	9.9996	0.10

En la Tabla 9 se presentan los resultados de extracción de ADN obtenida a partir de las mezclas elaboradas.

Tabla 9. Evaluación de la concentración de ADN.

Muestra	Réplica	10.39%		1.03%		0.10%	
		Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)	Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)	Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)
1	A	79.9	50	55.1	50	50	50
	B	62.2	50	81.2	50	44.4	50
2	A	75.6	50	89.8	50	34.8	50
	B	50	50	50	50	50	50
3	A	50	50	50	50	50	50
	B	94.4	50	64.6	50	20	50
4	A	50	50	57.1	50	32	50
	B	72	50	50	50	45	50
Promedio		66.8		62.2		40.8	
D.S.		16.5		15.4		10.9	
C.V.		24.7		24.7		26.7	

Se observa que con el sistema de extracción utilizado en todas las muestras es posible cumplir con el requerimiento de concentración (50 ng/μL) para operar las reacciones de amplificación en qPCR.

5.3 Cuantificación de mezclas con contenido conocido de evento específico MON810 por la técnica de qPCR

Las gráficas de la curva estándar para la cuantificación de las mezclas (Fig. 6 y 7) muestran el logaritmo de la cantidad de secuencia diana objetivo contra el valor de Ct experimental, estos gráficos son el principio de la cuantificación por la técnica de qPCR, los valores de cuantificación obtenidos en las reacciones de PCR de las mezclas generadas se interpolan a la curva estándar para obtener una medida de la cantidad de secuencia diana objetivo presente. Después de haber interpolado el resultado de cada mezcla en ambas curvas (MON810 y *hmg*) se establece una relación entre la cantidad de secuencia GM y la cantidad de la secuencia de referencia, esta relación se expresa en porcentaje. Dentro de las imágenes de curva estándar (Fig. 6 y 7) se encuentran la eficiencia de amplificación y la pendiente de la curva estándar, ambos parámetros deben de entrar en un rango determinado para que se consideren válidas las reacciones de PCR, por lo cual dichas curvas fueron aceptadas para los ensayos cuantitativos realizados en este estudio.

Tres mezclas en diferentes porcentajes m/m (0.10, 1.03 y 10.39%) de hojas de maíz GM con hojas de maíz convencionales fueron cuantificadas por la técnica de qPCR (Apéndice F

y G), un total de 100 ng de ADN extraído de cada mezcla se utilizó como templado en cada reacción. Los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 10. Con base en la curva estándar representada en la Figura 6 se obtuvo el siguiente porcentaje promedio de OGM (MON810) 16.49% para la mezcla que teóricamente contenía 10.39%. Para las mezclas que teóricamente contenían 0.10 y 1.03% se obtuvieron promedios de 0.42 y 2.19% de OGM (MON810), respectivamente. Los resultados obtenidos son con base en la curva estándar representada en la Figura 7.

Tabla 10. Resultados cuantificación de mezclas realizadas con hojas de maíz GM y no GM.

%OGM Teórico		0.10%	1.03%	10.39%
Extracción	Replica	%OGM	%OGM	%OGM
1	A	0.328	3.057	17.143
	B	0.403	3.198	21.151
2	A	0.256	3.228	22.520
	B	0.330	3.364	19.268
3	A	0.486	1.680	11.176
	B	0.613	1.918	13.717
4	A	0.474	1.651	11.178
	B	0.484	1.727	10.357
5	A	0.398	1.912	14.376
	B	0.584	2.402	13.103
6	A	0.315	1.903	18.866
	B	0.275	2.389	17.238
7	A	0.314	1.381	17.245
	B	0.441	1.899	17.161
8	A	0.528	1.608	18.640
	B	0.556	1.792	20.793
Promedio		0.424	2.194	16.496
S		0.105	0.662	3.660
U(RSD _{ip})		0.026	0.165	0.915
U _{combinada} (uc)		0.026	0.165	0.915
U _{expandida}		0.052	0.331	1.830
U _{relativa}		12.322	15.088	11.092

El resultado de la cuantificación de OGM se completó con el cálculo de la incertidumbre que acompaña al resultado de la medición. La caracterización de la dispersión de los

valores que pueden ser razonablemente atribuidos al mensurando representaran la incertidumbre que puede ser asociada al resultado de la medición (CNRDOGM, 2011b).

Para determinar la incertidumbre relativa ($U_{relativa}$), que compara el valor de la incertidumbre absoluta con el valor de la medida, se debe tener en cuenta el valor de la o las incertidumbre(s) que se incorporan a la medición y que provienen de fuentes externas, en el caso de la cuantificación de OGM la incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad $u(RSD_{IP})$ que relaciona la desviación estándar promedio de la serie de datos con el número de repeticiones de la medición, el valor de la incertidumbre $u(RSD_{IP})$ representa la concordancia que hay entre los resultados de la cuantificación bajo las condiciones de repetibilidad. Los valores de $u(RSD_{IP})$ se reducen cuando las condiciones de repetibilidad (Apartado 2.5 – Precisión) no afectan la precisión del resultado de medición. Los valores obtenidos reflejan un aumento de la $u(RSD_{IP})$ conforme aumenta el porcentaje de OGM de las mezclas, esto es una mayor desviación de las condiciones de repetibilidad acorde hay aumento en la concentración de OGM.

La incertidumbre combinada (uc) es el resultado de la suma cuadrática de las varianzas de los factores que afectan el resultado de un mensurando, de acuerdo a estudios previos realizados en el CNRDOGM, para estimar la incertidumbre relativa de un resultado se debe hacer uso de la incertidumbre del material de referencia $u(C_{ref})$ utilizado y la incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad $u(RSD_{IP})$ (CNRDOGM, 2011b), la forma de relacionar las incertidumbres de los componentes externos será a través de la incertidumbre combinada. En el presente estudio el tejido vegetal (hoja verde) se caracterizó para su uso como referencia, por lo que la $u(RSD_{IP})$ será igual a uc , ya que no habrá una incertidumbre que se asocie a un material de referencia certificado (MRC). De acuerdo al Centro Nacional de Metrología un MRC deben contar con un certificado el cual reporte la incertidumbre que aporta el uso del mismo (CENAM, 2010).

La incertidumbre expandida ($U_{\text{expandida}}$) es la magnitud que define el intervalo alrededor del resultado de medida que puede esperarse que contenga una gran fracción de la distribución de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mesurando, el valor de $U_{\text{expandida}}$ se obtiene al multiplicar uc por un factor de cobertura $k = 2$, que representa al intervalo de apertura en donde existe un 95.45% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero de la medición. La U_{relativa} es una desviación estándar relativa de la muestra, está indica la proporción en porcentaje, respecto de la media aritmética de la muestra. En la sección 5.4.6.2 de la NMX-EC-17025-IMNC-2006 se describe que en algunos casos la naturaleza del método de ensayo puede excluir un cálculo riguroso, metrológicamente y estadísticamente válido de la incertidumbre de la medición. En estos casos el laboratorio debe por lo menos tratar de identificar los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable y debe de asegurarse de que la forma de informar el resultado no de una impresión equivocada de la incertidumbre.

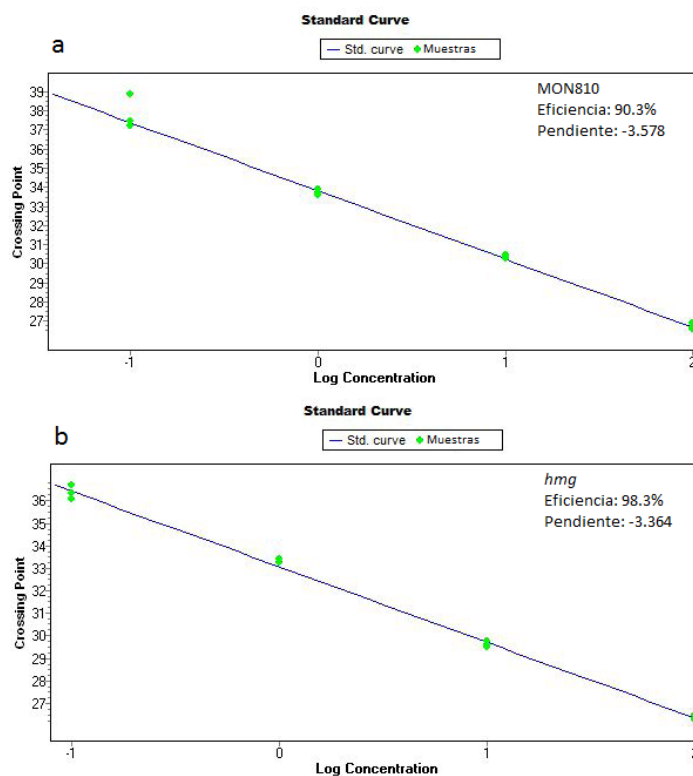


Figura 6. Curva estándar (1) del equipo LC480. a) Curva estándar para el evento específico MON810. b) Curva estándar para el gen de referencia *hmg*. Los puntos corresponden a las diluciones generadas con concentraciones de ADN finales equivalentes a 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL y 0.1 ng/μL.

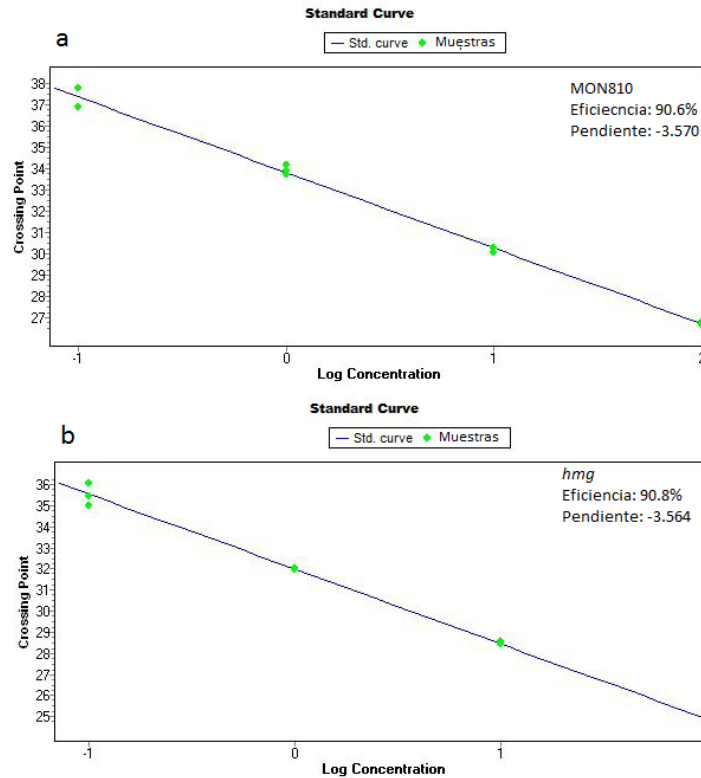


Figura 7. Curva estándar (2) del equipo LC480. a) Curva estándar para el evento específico MON810. b) Curva estándar para el gen de referencia *hmg*. Los puntos corresponden a las diluciones generadas con concentraciones de ADN finales equivalentes a 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL y 0.1 ng/μL.

Los valores para la evaluación del criterio eficiencia de amplificación se presentan en la Tabla 11. De acuerdo a los criterios de aceptación la pendiente de la curva estándar y por lo tanto la eficiencia de amplificación de las reacciones de qPCR es la adecuada y cumple como requerimiento para la validación del método propuesto. De acuerdo al principio de operación del software del equipo LC 480 y en acuerdo a los criterios preestablecidos del CNRDOGM el valor de R^2 en curvas estándar obtenidas de este equipo no se considera. La correlación lineal se observa sólo de manera gráfica, los puntos correspondientes a las diluciones seriales deben estar lo más cercano a la línea de tendencia.

Tabla 11. Eficiencia de amplificación para ensayos de cuantificación.

Curva estándar	Target	Pendiente	Eficiencia de amplificación (%)
1	<i>hmg</i>	-3.364	98.3
	MON810	-3.578	90.3
2	<i>hmg</i>	-3.564	90.8
	MON810	-3.570	90.6

En la Tabla 12 se muestran los valores calculados de desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad (RSDr), resultados calculados con la ecuación 7. De acuerdo con el criterio de aplicación el método es preciso pues cumple con al menos diez repeticiones (dieciséis totales) y todas las desviaciones son menores al 25%. Esto significa que hay concordancia entre los resultados de las repeticiones obtenidas de la cuantificación a través de qPCR. La precisión del método implica que se consiguió cuantificar el mismo mensurando bajo las condiciones establecidas en el apartado 2.5 Validación de un método analítico (Precisión), por lo tanto los resultados pueden ser considerados como evidencia objetiva del método.

Tabla 12. Resultados de desviación estándar bajo condiciones de Repetibilidad.

% OGM	Desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad (RSDr)
0.424	6.16%
2.194	7.54%
16.496	5.55%

En la Tabla 10 se muestran los valores de incertidumbre relativa, para las mezclas 0.424, 2.194 y 16.496% los valores de incertidumbre son ± 13.322 , ± 15.088 y $\pm 11.092\%$ respectivamente, ya que la incertidumbre es un parámetro que depende del método aplicado y de los componentes asociados a la contribución de la estimación de la incertidumbre, la incertidumbre relativa será aplicable sólo a la cuantificación experimental. De acuerdo al criterio de validación las incertidumbres relativas para la cuantificación de las mezclas GM son aceptables y con base en los estudios previos realizados en el CNRDOGM.

Sin embargo, aun cuando los requerimientos y criterios de validación para el método analítico propuesto son aceptables y cumplen con los parámetros establecidos, los resultados de la cuantificación de mezclas GM no resultaron estar cercanos a los teóricamente esperados, inclusive considerando la incertidumbre relativa asociada a los valores, éstos no fueron los esperados. Se observa una tendencia de sobre estimación en la cantidad de OGM en relación a los valores teóricos, los resultados de cuantificación para la mezcla de 0.1% se sobre estima hasta cuatro veces el valor teórico. Estas variaciones en los resultados se pueden asociar a factores analíticos (tratamientos físicos de matrices, tamaño de partícula de las muestras, calidad de ADN, los analistas, los reactivos químicos, equipos, etc.) y a factores biológicos los cuales pueden influir en la cuantificación de ADN genéticamente modificado basada en la técnica de qPCR (Zhang *et al.* 2008).

Con la aceptación de los criterios de aplicación, se descartó que los factores analíticos pudieran ser los causantes de la desviación en los resultados de cuantificación de ADN GM. El factor biológico (agua) que por sus interacciones naturales con todas las biomoléculas (en este caso el ADN) influye en la estabilización y mantenimiento de la estructura de la cadena de ADN y por lo tanto generando un efecto matriz muy pronunciado, que puede afectar la cuantificación del evento específico MON810, por esta razón se decidió someter a las hojas a un proceso de liofilización (eliminación de humedad) y volver a realizar las mezclas con material GM liofilizado y cuantificar estas mezclas por medio de la técnica de qPCR.

5.4 Resultados de la liofilización de las muestras

Los resultados de la liofilización de las muestras GM y convencionales se muestran en la Tabla 13 y 14, respectivamente, se tomaron 3 muestras representativas de hojas convencionales y hojas GM en periodos de 6, 24 y 48 h hasta alcanzar un peso constante (resultados no mostrados).

Tabla 13. Porcentaje de humedad en las hojas GM

Hoja GM	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% Humedad
I	1.0037	0.1999	80.08
II	1.0161	0.2231	78.04
III	1.0310	0.2320	77.50
IV	1.0373	0.2114	79.62
V	1.0238	0.2718	73.45
VI	1.0306	0.2136	79.27
VII	1.0099	0.2237	77.85
VIII	1.0465	0.2069	80.23
IX	1.0347	0.2128	79.43
Promedio			78.39

Tabla 14. Porcentaje de humedad en las hojas convencionales

Hoja convencional	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% Humedad
I	2.4452	0.6103	75.04
II	9.5117	2.2457	76.39
III	8.2871	1.8861	77.24
IV	6.9869	1.4805	78.81
V	4.0786	1.0144	75.13
VI	4.7508	1.0486	77.93
VII	5.6100	1.0959	80.47
VIII	2.7068	0.6963	74.28
IX	8.5253	1.8183	78.67
X	1.5898	0.3756	76.37
XI	3.7088	0.7780	79.02
XII	1.9848	0.4294	78.37
XIII	2.6703	0.4378	83.60
XIV	3.2952	0.8328	74.73
Promedio			77.57

5.5 *Preparación de mezclas en distintos porcentajes (m/m) 10, 1 y 0.1% con material GM y convencional liofilizado. Y extracción del ADN.*

La Tabla 15 muestra las características de las mezclas 10, 1 y 0.1 % m/m.

Tabla 15. Preparación de mezclas en diferentes porcentajes m/m

% m/m A preparar	Masa hoja GM (g)	Masa hoja convencional (g)	Masa total mezcla (g)	% m/m Teórico Mezcla
10 %	0.2010	1.7957	1.9967	10.07
1 %	0.0260	1.9759	2.0019	1.30
0.1 %	0.0024	1.9993	2.0017	0.12

En la Tabla 16 se presentan los resultados de extracción de ADN obtenida a partir de las mezclas elaboradas.

Tabla 16. Evaluación de la concentración de ADN.

10.07%		1.30%		0.12%	
Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)	Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)	Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)
57.6	50	58.2	50	47.7	50

Se observa que con el sistema de extracción utilizado en todas las muestras es posible cumplir con el requerimiento de concentración (50 ng/μL) para operar las reacciones de amplificación en qPCR. Para validar la metodología el volumen total de la extracción de ADN era $\geq 50 \mu\text{L}$ para cada muestra, esto para poder llevar a cabo el número de pruebas suficientes para tener una precisión adecuada (diez repeticiones).

5.6 Cuantificación de mezclas con contenido conocido de evento específico MON810 por la técnica de qPCR

Tres mezclas en diferentes porcentajes fracción masa (0.12, 1.30 y 10.07%) de hojas de maíz GM con hojas de maíz no GM liofilizadas fueron cuantificadas por la técnica de qPCR (Apéndice H), un total de 100 ng de ADN extraído de cada mezcla se utilizó como templado en cada reacción. Los resultados de la cuantificación con base en la curva estándar (Fig. 8) son 0.083, 1.01 y 11.31%, respectivamente de OGM (MON810) para las mezclas que teóricamente contenían 0.12, 1.30 y 10.07% de material GM (Tabla17).

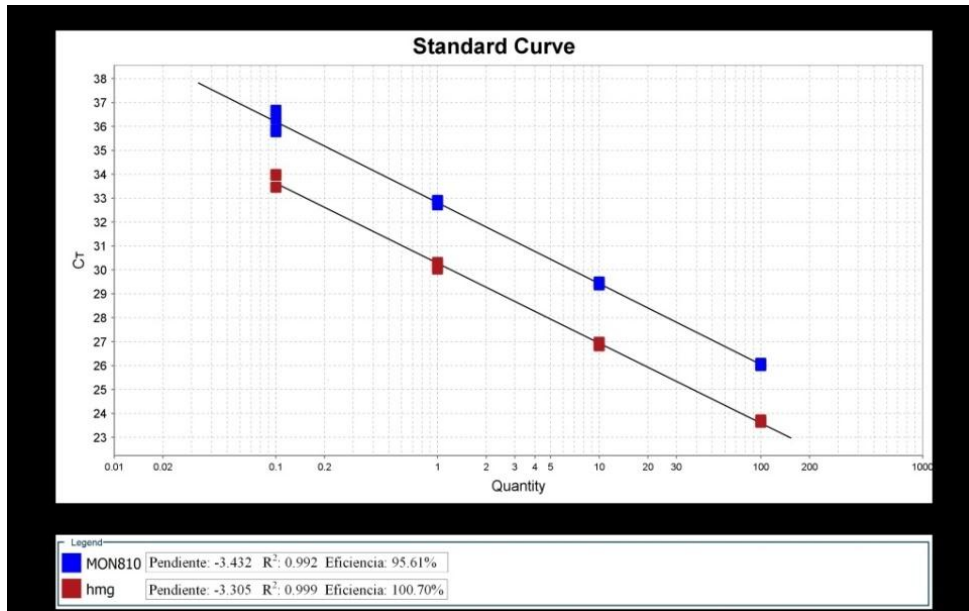


Figura 8. Curva estándar del equipo Vii A 7 para el evento específico MON810 y el gen de referencia *hmg*. Los puntos corresponden a las diluciones generadas con concentraciones de ADN finales equivalentes a 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL y 0.1 ng/μL

Los valores para la evaluación de los criterios de eficiencia de amplificación y coeficiente R^2 se presentan en la Figura 8. De acuerdo a los criterios de aceptación la eficiencia de amplificación y el coeficiente R^2 para la curva estándar de las reacciones de qPCR es la adecuada y cumple como requerimiento para la validación del método.

Tabla 17. Resultados cuantificación mezclas realizadas con hojas de maíz GM y hojas de maíz no GM.

Replica	%OGM (0.12%) esperado	%OGM (1.30%) esperado	%OGM (10.07%) Esperado
1	0.13	0.96	11.14
2	0.07	1.00	11.52
3	0.09	0.85	11.34
4	0.07	1.13	11.9
5	0.10	1.23	11.43
6	0.04	1.19	10.91
7	0.08	0.91	11.63
8	0.11	0.88	12.17
9	0.07	1.04	12.14
10	0.07	0.86	8.95
Promedio	0.083	1.01	11.31
S	0.025	0.139	0.925
$U(RSD_{IP})$	0.008	0.044	0.292
$U_{combinada} (uc)$	0.008	0.044	0.292
$U_{expandida}$	0.016	0.088	0.585
$U_{relativa}$	18.94	8.80	5.17

Los resultados de cuantificación de las mezclas en relación con los valores teóricos, mostraron resultados satisfactorios a partir de las mezclas generadas, debido a que los resultados esperados y obtenidos son comparables. Los resultados mantienen las características de ser precisos y repetibles, ya que la incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad $u(RSD_{IP})$ se redujo, acercándose a él valor mínimo (acercándose a cero, pero nunca llegado al él) y aumentando proporcionalmente al incremento del porcentaje de OGM presente en la mezcla. Que la $u(RSD_{IP})$ disminuya expone que las condiciones de repetibilidad no afectan la precisión del resultado de la medición. Al igual que en la cuantificación de mezclas en fracción masa de OGM generadas con material vegetal no liofilizado la incertidumbre es un parámetro que se asociará al resultado de la medida y que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse al mensurando.

La cantidad de ADN en las mezclas generadas es repetible y precisa hacia los valores esperados, esto se demuestra en la Figura 9, donde la amplificación de las muestras al umbral= 0.086387 en la fase exponencial se observa un aumento comparable de los productos de reacción entre las muestras (azul) y los estándares (rosa), en esta fase los componentes de la reacción no están limitados y las reacciones de replicación exhiben resultados repetibles y uniformes (Cortazar *et al*, 2004).

En la Tabla 18 se muestran los valores calculados de desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad (RSDr), resultados calculados con la ecuación 7. De acuerdo con el criterio de aplicación el método es preciso pues cumple con al menos diez repeticiones y todas las RSDr < 25%.

Tabla 18. Resultados de desviación estándar bajo condiciones de Repetibilidad.

% OGM	Desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad (RSDr)
0.083	9.64
1.01	4.36
11.31	2.58

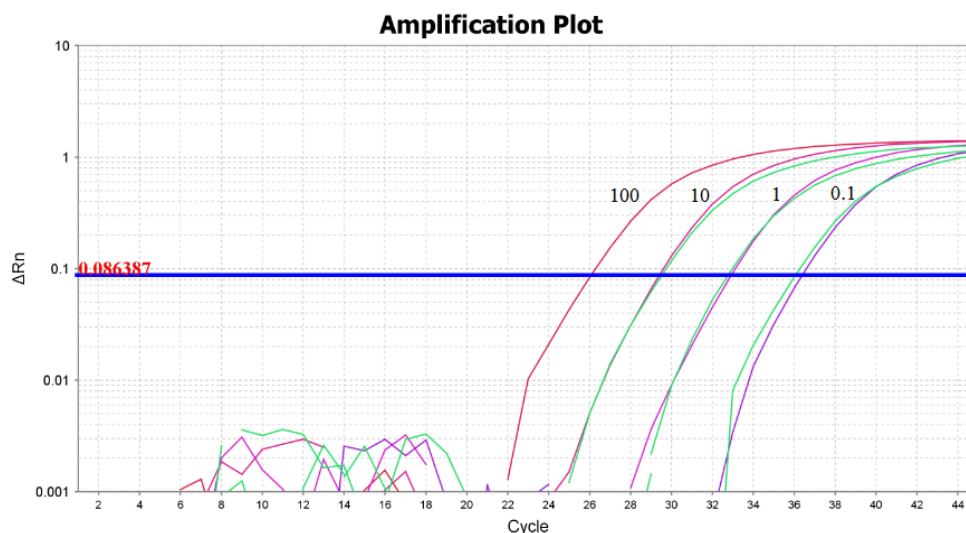


Figura 9. Gráfica de amplificación en ensayo PCR del equipo Vii A 7 para el evento específico MON810, la línea horizontal indica el umbral y el valor inicial de fluorescencia. Las curvas de amplificación provienen de las mezclas 10, 1 y 0.1% (azul). La curva estándar se obtuvo con datos provenientes de este gráfico de amplificación (rosa).

Para cumplir con los requerimientos y criterios de validación del método se evaluó la repetibilidad a través de la cuantificación de las mezclas GM en dos equipos diferentes de qPCR (Vii A7 y LC480, Apéndice H e I respectivamente) para evaluar la proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mensurando. El criterio de aplicación para la validación de la metodología debe ser $RSD_r \leq 25\%$ en todo el intervalo dinámico del método (ENGL, 2008). En la Tabla 19 y 20 se observan los resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre del porcentaje de los valores de cuantificación del evento específico MON810 de las diferentes mezclas de hoja en fracción masa. Con los cuales se evaluó la precisión de los datos y concluyendo la existencia de concordancia entre los resultados esperados y obtenidos. La desviación estándar bajo condiciones de repetibilidad para las tres mezclas en los dos diferentes equipos es $< 25\%$ por lo que se cumple con el criterio de precisión en los resultados de cuantificación utilizando dos equipos termocicladores para qPCR. Los valores de la estimación de la incertidumbre en la cuantificación de mezclas bajo condiciones de repetibilidad (RSD_{IP}) son comparables entre los equipos utilizados (ViiA 7 y LC480), sin embargo los porcentajes promedio para la cuantificación de ADN son más precisos para los resultados obtenidos en el equipo ViiA 7 que los obtenidos en el equipo LC480, debido a la concordancia de los resultados obtenidos con los valores esperados.

Tabla 19. Resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre en la cuantificación de mezclas bajo condiciones de repetibilidad, equipo ViiA 7.

Equipo	% OGM Teórico Réplica	%OGM (0.12%) esperado	%OGM (1.30%) esperado	%OGM (10.07%) esperado
ViiA 7	1	0.13	0.96	11.14
	2	0.07	1.00	11.52
	3	0.09	0.85	11.34
	4	0.07	1.13	11.90
	5	0.1	1.23	11.43
	6	0.04	1.19	10.91
	7	0.08	0.91	11.63
	8	0.11	0.88	12.17
	9	0.07	1.04	12.14
	10	0.07	0.86	8.95
Promedio		0.083	1.01	11.31
S		0.025	0.139	0.925
U(RSD _{IP})		0.008	0.044	0.292
RSDr		9.68	4.37	2.58

Tabla 20. Resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre en la cuantificación de mezclas bajo condiciones de repetibilidad, equipo LC 480.

Equipo	% OGM Teórico Replica	%OGM (0.12%) esperado	%OGM (1.30%) esperado	%OGM (10.07%) esperado
LC 480	1	0.11	0.46	8.22
	2	0.13	0.53	7.67
	3	0.16	0.61	7.96
	4	0.06	0.65	8.49
	5	0.04	0.77	7.76
	6	0.10	0.52	7.69
	7	0.07	0.55	7.99
	8	0.08	0.56	7.39
	9	0.09	0.82	7.36
	10	0.05	0.60	7.26
Promedio		0.089	0.61	7.78
S		0.037	0.113	0.394
U(RSD _{IP})		0.012	0.036	0.124
RSDr		13.24	5.87	1.60

El proceso de liofilización permitió ajustar a una misma concentración uno de los factores biológicos que influyen en la variación de la cuantificación de OGM por la técnica de qPCR, las moléculas de agua contribuyen al efecto de matriz que se define como “el efecto combinado de todos los componentes de la muestra que no sean el analito en la medición de cantidad” (IUPAC, 1997). El proceso de liofilización se realizó como una alternativa para la medición cuantitativa de las mezclas de hoja GM elaboradas a fin de lograr obtener resultados más cercanos a los valores esperados en fracción masa.

Dado los resultados anteriores se logró realizar la validación de la metodología para la cuantificación de mezclas en porcentaje masa/masa con hojas de maíz GM con evento específico MON810 y hojas de maíz no GM. Se definió el porcentaje de tres mezclas 0.12, 1.30 y 10.07% los resultados obtenidos de la cuantificación por la técnica de PCR tiempo real son 0.083, 1.01 y 11.31% de OGM, con una incertidumbre relativa de ± 18.94 , ± 8.80 y $\pm 5.17\%$ respectivamente. Cuando se considera la estimación de la medición de la incertidumbre relativa aplicada a los valores obtenidos experimentalmente se obtienen valores equivalentes en relación a los esperados.

6. Conclusiones

Se logró realizar la validación de la metodología para la cuantificación de mezclas en fracción masa con hojas de maíz GM con el evento específico MON810 y hojas de maíz no GM o convencionales. Se definió el porcentaje de tres mezclas 0.12, 1.30 y 10.07% los resultados obtenidos de la cuantificación por la técnica de qPCR son 0.083, 1.01 y 11.31% de OGM, con una incertidumbre relativa de ± 18.94 , ± 8.80 y $\pm 5.17\%$ respectivamente. Cuando se considera la incertidumbre relativa aplicada a los valores obtenidos experimentalmente se obtienen los valores teóricos esperados. Estos resultados cumplen con los criterios de aplicación en el CNRDOGM, donde la incertidumbre relativa debe ser $< 50\%$ en mezclas cuyo porcentaje de OGM es < 0.9 y $< 30\%$ en mezclas cuyo porcentaje de OGM es $> 1\%$. Para obtener estos resultados se debe trabajar con muestras libres de humedad a fin de garantizar resultados confiables durante los ensayos de rutina que realice el CNRDOGM.

La metodología propuesta podrá ser utilizada por el CNRDOGM para el diagnóstico de muestras GM de tejido vegetal (hoja de maíz).

Los resultados encontrados muestran que una hoja transgénica que contenga la secuencia del evento específico en estudio puede ser utilizada como estándar para determinar la concentración de otras hojas o mezclas de hojas que contengan el mismo evento específico dentro de su genoma, siempre y cuando el estándar se establezca como la concentración en porcentaje masa más alta.

Los resultados experimentales ponen en evidencia el impacto de los factores biológicos en la cuantificación de OGM, estos factores impiden la generación de métodos simples y rápidos que puedan ser utilizados para regular el contenido de OGM en alimentos, la metodología generada contribuye en el análisis cuantitativo de muestras de hojas de maíz con presencia de material GM en las que no se cuente con los materiales de referencia adecuados o en los casos en los que sólo se cuente con tejido vegetal (hoja) como muestra de análisis.

7. Bibliografía

- Centro Nacional de Metrología (CENAM), 2010. *Vocabulario Internacional de Metrología (VIM)*. [Documento en línea] (Actualizado 11 de Noviembre de 2010) Disponible en:

<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/VIM3aTRA2009.pdf>

[Último acceso el 21 de Octubre de 2012]
- Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), 2011. Validación de la metodología de análisis de OGM por PCR, (Anexo Q). *Documento de uso interno CNRDOGM*.
- Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), 2011b. Estimación de la incertidumbre (PRO-21). *Documento de uso interno CNRDOGM*.
- Codex Alimentarius, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling CAC/GL 74-2010. *Directrices sobre criterios de rendimiento y validación de los métodos de detección, identificación y cuantificación de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas en los alimentos*. [Documento en línea] (Actualizado 2010) Disponible en:

<http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas/es/>

[Último acceso el 19 de Octubre de 2012]
- Corbisier, P., Somanath, B., Lina, P., Dan Xie, V., Emslie, K., 2010. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, pp. 2143-2150.

- Cortazar, A., Silva, P., 2004. Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. [Documento en línea] (Actualizado: Junio 2004). Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf> [Último acceso el 31 de Mayo de 2012]
- Edwards, K., Logan, J., Sanders, N., 2004. *Real – Time PCR an essential Guide*. Norfolk, U.K., Horizon Bioscience.
- European Commission, 2003a. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council. Concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive. *Official Journal of the European Union*. L/268, pp. 24–28.
- European Commission, 2003b. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council. On genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union*. L/268, pp. 1–23.
- European Commission, 2006. Community Reference Laboratory (CRL) for GM food and feed assessment on the validation of an event specific method for the relative quantitation of maize line MON810 DNA using real-time PCR as carried out by Federal Institute for Risk Assessment (BfR). *Biotechnology & GMOs Unit, Institute for Health and Consumer Protection DG Joint Research Centre*.
- European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2008. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. *Joint Research Centre*, European Commission.
- Hernandez, M., Duplan, M., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., *et al.*, 2004. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 52, pp. 4632–4637.

- Holst-Jensen A., *et al.*, 2012. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials, *Journal of Biotechnology Advances*, 10, pp. 1016-1034.
- International Organization for Standardization (ISO), 2006. ISO 24276. Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Compiled by McNaught, A., Wilkinson, A., 1997. *Compendium of Chemical Terminology*, (the “Gold Book”), 2nd Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- James, C., 2011. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. *ISAAA Briefs—Executive summary*. Report: 42.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C., 2008. Tecnología del DNA recombinante. *Conceptos de Genética*. Madrid. Prentice Hall. Capítulo 19.
- Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM). Texto Vigente. Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de Marzo de 2005.
 - a) Artículo 13, fracción III. Página 11.
 - b) Artículo 3, fracción XXI. Página 4.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., 2005. Molecular Genetic Techniques and Genomics. W. H. Freeman. *Molecular Cell Biology*. Chapter 9.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., Weil, P., 2010. *Harper, Bioquímica Ilustrada*. 28^a Edición. México, D.F. Ed. Mc Graw Hill, pp. 57.
- Norma Mexicana, NMX-EC-17025-IMNC-2006. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*.

- Papazova, N., Zhang, D., Gruden, K., Vojvoda, J., Yang, L., Buh, M., et al. 2010. Evaluation of the reliability of maize reference assays for GMO quantification. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, pp. 2189–2201.
- Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G., 2007. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos (Manual del Participante). *Joint Research Centre*, Comisión Europea. Manual del Participante, pp. 1 – 249.
- Ramessar, K., Capell T, Twyman R.M., Quemada, H., Christou, P., 2008. Trace and traceability-a call for regulatory harmony. *Nature Biotechnology*, 26, pp. 975-978.
- Rodríguez, M., Rodríguez, W., 2006. Métodos físico-químicos en Biotecnología (2006-II). *PCR TIEMPO REAL*, IBT-UNAM.
- SGARPA, Servicio de Información, Agroalimentaria y Pesquera (SiAP), 2006. *Índice de Maíz, Importancia del Maíz en el Sector Agropecuario Nacional*. [Documento en línea] (Actualizado: 2007). Disponible en:

http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Maiz/Descripci%C3%B3n.pdf

[Último acceso el 19 de Octubre 2012].
- Shan, G., 2011. *Immunoassays in Agricultural Biotechnology*. Hoboken, New Jersey. John Wiley and Sons Inc., pp. 91-93.
- Tevfik, M. 2007. *An Introduction to real time PCR*. En: M. Tevfik ed. Real Time PCR. UK: Taylor & Francis, pp. 1-37.
- Zhang, D., et al., 2008. GMDD: a database of GMO detection methods. [En línea] (18 Junio 2008). Disponible en:

<http://gmdd.shgmo.org/event/view/81> [Último acceso el 31 de Mayo de 2012].

- Zhang, D., Corlet, A., Fouilloux, S., 2007. Impact of genetic structures on haploid genome-based quantification of genetically modified DNA: theoretical considerations, experimental data in MON810 maize kernels (*Zea mays* L.) and some practical applications. *Transgenic Research*, 17, pp. 393-402.

8. Apéndice

A	
Block Type	96well
Chemistry	TAQMAN
Experiment File Name	Corrida 515 Identificación EE MON810 en hoja 2011-08-15
Experiment Run End Time	2011-08-15 16:10:44 PM CDT
Instrument Type	sds7500
Passive Reference	ROX

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Ct	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold
A7	M, I, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	24.181	24.181	0.001	0.072
A8	M, I, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	24.182	24.181	0.001	0.072
A9	M, I, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	24.059	24.032	0.038	0.072
A10	M, I, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	24.005	24.032	0.038	0.072
A11	M, I, 17	hmg	UNKNOWN	FAM	24.022	24.020	0.003	0.072
A12	M, I, 17	hmg	UNKNOWN	FAM	24.018	24.020	0.003	0.072
B7	M, I, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.987	23.994	0.011	0.072
B8	M, I, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	24.001	23.994	0.011	0.072
B9	M, I, 10	hmg	UNKNOWN	FAM	24.773	24.642	0.185	0.072
B10	M, I, 10	hmg	UNKNOWN	FAM	24.512	24.642	0.185	0.072
B11	M, I, 18	hmg	UNKNOWN	FAM	24.852	24.794	0.082	0.072
B12	M, I, 18	hmg	UNKNOWN	FAM	24.735	24.794	0.082	0.072
C7	M, I, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.219	23.208	0.016	0.072
C8	M, I, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.197	23.208	0.016	0.072
C9	M, I, 11	hmg	UNKNOWN	FAM	24.782	24.777	0.007	0.072
C10	M, I, 11	hmg	UNKNOWN	FAM	24.772	24.777	0.007	0.072
C11	M, I, 19	hmg	UNKNOWN	FAM	25.062	25.030	0.046	0.072
C12	M, I, 19	hmg	UNKNOWN	FAM	24.997	25.030	0.046	0.072
D7	M, I, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	23.694	23.757	0.089	0.072
D8	M, I, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	23.820	23.757	0.089	0.072
D9	M, I, 12	hmg	UNKNOWN	FAM	24.884	24.791	0.132	0.072
D10	M, I, 12	hmg	UNKNOWN	FAM	24.697	24.791	0.132	0.072
D11	M, I, 20	hmg	UNKNOWN	FAM	23.516	23.436	0.113	0.072
D12	M, I, 20	hmg	UNKNOWN	FAM	23.356	23.436	0.113	0.072
E7	M, I, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	24.990	24.927	0.089	0.072
E8	M, I, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	24.865	24.927	0.089	0.072
E9	M, I, 13	hmg	UNKNOWN	FAM	23.654	23.788	0.189	0.072
E10	M, I, 13	hmg	UNKNOWN	FAM	23.921	23.788	0.189	0.072
E11	M, I, 21	hmg	UNKNOWN	FAM	23.570	23.549	0.030	0.072
E12	M, I, 21	hmg	UNKNOWN	FAM	23.528	23.549	0.030	0.072

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Ct	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold
A1	M, I, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	27.101	27.126	0.036	0.086
A2	M, I, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	27.151	27.126	0.036	0.086
A3	M, I, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	26.342	26.342	0.000	0.086
A4	M, I, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	26.342	26.342	0.000	0.086
A5	M, I, 17	MON810	UNKNOWN	FAM	27.087	27.090	0.003	0.086
A6	M, I, 17	MON810	UNKNOWN	FAM	27.092	27.090	0.003	0.086
B1	M, I, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	27.111	27.030	0.114	0.086
B2	M, I, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	26.950	27.030	0.114	0.086
B3	M, I, 10	MON810	UNKNOWN	FAM	27.440	27.504	0.090	0.086
B4	M, I, 10	MON810	UNKNOWN	FAM	27.568	27.504	0.090	0.086
B5	M, I, 18	MON810	UNKNOWN	FAM	28.369	27.926	0.627	0.086
B6	M, I, 18	MON810	UNKNOWN	FAM	27.482	27.926	0.627	0.086
C1	M, I, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.798	25.720	0.110	0.086
C2	M, I, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.643	25.720	0.110	0.086
C3	M, I, 11	MON810	UNKNOWN	FAM	28.612	28.348	0.373	0.086
C4	M, I, 11	MON810	UNKNOWN	FAM	28.084	28.348	0.373	0.086
C5	M, I, 19	MON810	UNKNOWN	FAM	28.031	28.133	0.144	0.086
C6	M, I, 19	MON810	UNKNOWN	FAM	28.234	28.133	0.144	0.086
D1	M, I, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	26.316	26.199	0.165	0.086
D2	M, I, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	26.083	26.199	0.165	0.086
D3	M, I, 12	MON810	UNKNOWN	FAM	28.366	28.033	0.471	0.086
D4	M, I, 12	MON810	UNKNOWN	FAM	27.700	28.033	0.471	0.086
D5	M, I, 20	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
D6	M, I, 20	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
E1	M, I, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	28.160	28.128	0.045	0.086
E2	M, I, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	28.097	28.128	0.045	0.086
E3	M, I, 13	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
E4	M, I, 13	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
E5	M, I, 21	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
E6	M, I, 21	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086

F7	M, I, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	24.830	24.785	0.065	0.072
F8	M, I, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	24.739	24.785	0.065	0.072
F9	M, I, 14	hmg	UNKNOWN	FAM	24.173	24.076	0.137	0.072
F10	M, I, 14	hmg	UNKNOWN	FAM	23.979	24.076	0.137	0.072
F11	NTC	hmg	NTC	FAM	Undetermined			0.072
F12	NTC	hmg	NTC	FAM	Undetermined			0.072
G7	M, I, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	23.671	23.699	0.039	0.072
G8	M, I, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	23.726	23.699	0.039	0.072
G9	M, I, 15	hmg	UNKNOWN	FAM	23.807	23.809	0.003	0.072
G10	M, I, 15	hmg	UNKNOWN	FAM	23.811	23.809	0.003	0.072
G11	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined	36.828		0.072
G12	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	36.828	36.828		0.072
H7	M, I, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	24.777	24.759	0.024	0.072
H8	M, I, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	24.742	24.759	0.024	0.072
H9	M, I, 16	hmg	UNKNOWN	FAM	24.026	23.959	0.095	0.072
H10	M, I, 16	hmg	UNKNOWN	FAM	23.891	23.959	0.095	0.072
H11	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	21.519	22.157	0.902	0.072
H12	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	22.795	22.157	0.902	0.072

F1	M, I, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	27.794	27.653	0.200	0.086
F2	M, I, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	27.512	27.653	0.200	0.086
F3	M, I, 14	MON810	UNKNOWN	FAM	27.203	27.125	0.109	0.086
F4	M, I, 14	MON810	UNKNOWN	FAM	27.048	27.125	0.109	0.086
F5	NTC	MON810	NTC	FAM	Undetermined			0.086
F6	NTC	MON810	NTC	FAM	Undetermined			0.086
G1	M, I, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	26.706	26.663	0.062	0.086
G2	M, I, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	26.619	26.663	0.062	0.086
G3	M, I, 15	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
G4	M, I, 15	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
G5	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
G6	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
H1	M, I, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	28.435	28.437	0.003	0.086
H2	M, I, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	28.439	28.437	0.003	0.086
H3	M, I, 16	MON810	UNKNOWN	FAM	27.574	27.281	0.415	0.086
H4	M, I, 16	MON810	UNKNOWN	FAM	26.987	27.281	0.415	0.086
H5	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	23.621	23.712	0.129	0.086
H6	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	23.803	23.712	0.129	0.086

B	
Block Type	96well
Chemistry	TAQMAN
Experiment File Name	Corrida 565 Identificación EE MON810 en hoja 2011-08-15
Experiment Run End Time	2011-08-29 17:23:21 PM CDT
Instrument Type	sds7500
Passive Reference	ROX

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Cr	Cr Mean	Cr SD	Ct Threshold
B9	M, III, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	25.875	25.886	0.015	0.086
B10	M, III, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	25.896	25.886	0.015	0.086
B11	M, II, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	26.827	26.805	0.031	0.086
B12	M, II, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	26.783	26.805	0.031	0.086
C9	M, III, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	25.148	25.154	0.008	0.086
C10	M, III, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	25.159	25.154	0.008	0.086
C11	M, II, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	26.777	26.737	0.056	0.086
C12	M, II, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	26.698	26.737	0.056	0.086
D9	M, III, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	26.082	26.075	0.009	0.086
D10	M, III, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	26.069	26.075	0.009	0.086
D11	M, II, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	26.000	25.975	0.035	0.086

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Cr	Cr Mean	Cr SD	Ct Threshold
B3	M, III, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	23.152	23.162	0.014	0.072
B4	M, III, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	23.172	23.162	0.014	0.072
B5	M, II, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	24.122	24.101	0.029	0.072
B6	M, II, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	24.081	24.101	0.029	0.072
C3	M, III, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	22.413	22.404	0.012	0.072
C4	M, III, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	22.396	22.404	0.012	0.072
C5	M, II, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	23.981	23.959	0.031	0.072
C6	M, II, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	23.937	23.959	0.031	0.072
D3	M, III, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.159	23.138	0.029	0.072
D4	M, III, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.118	23.138	0.029	0.072
D5	M, II, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.704	23.649	0.078	0.072

D12	M, II, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	25.951	25.975	0.035	0.086
E9	M, III, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.218	25.103	0.163	0.086
E10	M, III, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	24.987	25.103	0.163	0.086
E11	M, II, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.705	25.675	0.042	0.086
E12	M, II, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.645	25.675	0.042	0.086
F7	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	24.493	24.526	0.047	0.086
F8	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	24.559	24.526	0.047	0.086
F9	M, III, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.315	25.304	0.016	0.086
F10	M, III, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.293	25.304	0.016	0.086
F11	M, II, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.312	25.323	0.015	0.086
F12	M, II, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.333	25.323	0.015	0.086
G7	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
G8	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
G9	M, III, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	25.271	25.269	0.003	0.086
G10	M, III, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	25.267	25.269	0.003	0.086
G11	M, II, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	25.579	25.510	0.097	0.086
G12	M, II, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	25.442	25.510	0.097	0.086
H7	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
H8	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
H9	M, III, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	26.220	26.237	0.025	0.086
H10	M, III, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	26.254	26.237	0.025	0.086
H11	M, II, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	25.014	25.016	0.002	0.086
H12	M, II, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	25.017	25.016	0.002	0.086

D6	M, II, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.593	23.649	0.078	0.072
E3	M, III, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	22.269	22.258	0.016	0.072
E4	M, III, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	22.247	22.258	0.016	0.072
E5	M, II, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	23.396	23.430	0.048	0.072
E6	M, II, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	23.464	23.430	0.048	0.072
F1	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	22.038	22.051	0.018	0.072
F2	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	22.063	22.051	0.018	0.072
F3	M, III, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.126	23.322	0.276	0.072
F4	M, III, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.517	23.322	0.276	0.072
F5	M, II, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	22.309	22.313	0.005	0.072
F6	M, II, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	22.317	22.313	0.005	0.072
G1	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined	37.313		0.072
G2	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	37.313	37.313		0.072
G3	M, III, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	22.532	22.528	0.007	0.072
G4	M, III, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	22.523	22.528	0.007	0.072
G5	M, II, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.196	23.173	0.034	0.072
G6	M, II, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.149	23.173	0.034	0.072
H1	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	36.989	36.989		0.072
H2	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined	36.989		0.072
H3	M, III, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	23.381	23.377	0.005	0.072
H4	M, III, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	23.374	23.377	0.005	0.072
H5	M, II, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	22.591	22.582	0.013	0.072
H6	M, II, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	22.572	22.582	0.013	0.072

C	
Block Type	96well
Chemistry	TAQMAN
Experiment File Name	Corrida 566 Identificación EE MON810 en hoja 2011-08-30
Experiment Run End Time	2011-08-30 12:11:18 PM CDT
Instrument Type	sds7500
Passive Reference	ROX

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Ct	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold
A1	M, IV, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	25.265	25.247	0.026	0.086
A2	M, IV, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	25.229	25.247	0.026	0.086
A3	M, IV, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	25.421	25.418	0.005	0.086
A4	M, IV, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	25.414	25.418	0.005	0.086
A5	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
A6	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Ct	Ct Mean	Ct SD	Ct Threshold
A7	M, IV, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	22.244	22.261	0.024	0.072
A8	M, IV, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	22.278	22.261	0.024	0.072
A9	M, IV, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	22.401	22.411	0.015	0.072
A10	M, IV, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	22.421	22.411	0.015	0.072
A11	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.072
A12	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.072

B1	M, IV, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	26.090	26.303	0.300	0.086
B2	M, IV, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	26.515	26.303	0.300	0.086
B3	M, V, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	25.409	25.438	0.041	0.086
B4	M, V, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	25.467	25.438	0.041	0.086
B5	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
B6	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.086
C1	M, IV, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.962	25.947	0.021	0.086
C2	M, IV, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.932	25.947	0.021	0.086
C3	M, V, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	25.772	25.715	0.081	0.086
C4	M, V, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	25.657	25.715	0.081	0.086
C5	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	25.089	26.971	2.661	0.086
C6	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	28.852	26.971	2.661	0.086
D1	M, IV, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.861	25.840	0.029	0.086
D2	M, IV, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.820	25.840	0.029	0.086
D3	M, V, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.999	25.968	0.045	0.086
D4	M, V, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	25.936	25.968	0.045	0.086
E1	M, IV, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	26.085	26.053	0.044	0.086
E2	M, IV, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	26.022	26.053	0.044	0.086
E3	M, V, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.271	25.241	0.043	0.086
E4	M, V, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	25.210	25.241	0.043	0.086
F1	M, IV, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	25.618	25.561	0.081	0.086
F2	M, IV, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	25.504	25.561	0.081	0.086
F3	M, V, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	25.437	25.575	0.196	0.086
F4	M, V, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	25.714	25.575	0.196	0.086
G1	M, IV, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	26.982	26.900	0.116	0.086
G2	M, IV, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	26.819	26.900	0.116	0.086
G3	M, V, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	25.670	25.688	0.025	0.086
G4	M, V, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	25.705	25.688	0.025	0.086
H1	M, IV, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	25.665	25.659	0.008	0.086
H2	M, IV, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	25.654	25.659	0.008	0.086
H3	M, V, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	25.486	25.435	0.072	0.086
H4	M, V, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	25.384	25.435	0.072	0.086

B7	M, IV, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	22.816	22.882	0.094	0.072
B8	M, IV, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	22.948	22.882	0.094	0.072
B9	M, V, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	25.740	24.303	2.033	0.072
B10	M, V, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	22.865	24.303	2.033	0.072
B11	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	36.772	37.263	0.694	0.072
B12	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	37.754	37.263	0.694	0.072
C7	M, IV, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	22.559	22.754	0.276	0.072
C8	M, IV, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	22.949	22.754	0.276	0.072
C9	M, V, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.381	23.207	0.246	0.072
C10	M, V, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.033	23.207	0.246	0.072
C11	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	21.898	21.843	0.078	0.072
C12	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	21.788	21.843	0.078	0.072
D7	M, IV, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	22.556	22.667	0.157	0.072
D8	M, IV, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	22.778	22.667	0.157	0.072
D9	M, V, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined	24.263		0.072
D10	M, V, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	24.263	24.263		0.072
E7	M, IV, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	22.865	22.871	0.009	0.072
E8	M, IV, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	22.877	22.871	0.009	0.072
E9	M, V, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	22.480	22.398	0.115	0.072
E10	M, V, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	22.317	22.398	0.115	0.072
F7	M, IV, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	22.624	22.627	0.005	0.072
F8	M, IV, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	22.631	22.627	0.005	0.072
F9	M, V, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	22.111	22.152	0.058	0.072
F10	M, V, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	22.192	22.152	0.058	0.072
G7	M, IV, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	23.888	24.292	0.572	0.072
G8	M, IV, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	24.697	24.292	0.572	0.072
G9	M, V, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	22.769	22.808	0.055	0.072
G10	M, V, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	22.847	22.808	0.055	0.072
H7	M, IV, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	22.176	23.410	1.745	0.072
H8	M, IV, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	24.644	23.410	1.745	0.072
H9	M, V, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	22.302	22.213	0.126	0.072
H10	M, V, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	22.124	22.213	0.126	0.072

D	
Block Type	96well
Chemistry	TAQMAN
Experiment File Name	Corrida 604 Identificación EE MON810 en hoja 2011-09-23
Experiment Run End Time	2011-09-23 18:55:01 PM CDT
Instrument Type	sds7500
Passive Reference	ROX

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Cr	Ct Threshold
A1	C, I, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
A2	C, I, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
A3	C, I, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
A4	C, I, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B1	C, I, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B2	C, I, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B3	C, I, 10	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B4	C, I, 10	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C1	C, I, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C2	C, I, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C3	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C4	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D1	C, I, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D2	C, I, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D3	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D4	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
E1	C, I, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
E2	C, I, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
E3	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	25.020	0.086
E4	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	24.945	0.086
F1	C, I, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
F2	C, I, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
G1	C, I, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
G2	C, I, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
H1	C, I, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
H2	C, I, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Cr	Cr Mean	Cr SD	Ct Threshold
A5	C, I, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	24.279	24.111	0.239	0.072
A6	C, I, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	23.942	24.111	0.239	0.072
A7	C, I, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	24.890	24.219	0.949	0.072
A8	C, I, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	23.548	24.219	0.949	0.072
B5	C, I, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	25.220	25.183	0.053	0.072
B6	C, I, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	25.145	25.183	0.053	0.072
B7	C, I, 10	hmg	UNKNOWN	FAM	24.512	24.538	0.037	0.072
B8	C, I, 10	hmg	UNKNOWN	FAM	24.563	24.538	0.037	0.072
C5	C, I, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	24.036	23.948	0.125	0.072
C6	C, I, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.860	23.948	0.125	0.072
C7	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.072
C8	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.072
D5	C, I, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	24.680	24.056	0.882	0.072
D6	C, I, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	23.433	24.056	0.882	0.072
D7	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined	37.340		0.072
D8	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	37.340	37.340		0.072
E5	C, I, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.726	23.531	0.276	0.072
E6	C, I, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.335	23.531	0.276	0.072
E7	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	22.040	21.714	0.460	0.072
E8	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	21.389	21.714	0.460	0.072
F5	C, I, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	24.402	23.963	0.622	0.072
F6	C, I, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	23.523	23.963	0.622	0.072
G5	C, I, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	24.320	24.329	0.012	0.072
G6	C, I, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	24.337	24.329	0.012	0.072
H5	C, I, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	23.215	23.215	0.000	0.072
H6	C, I, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	23.215	23.215	0.000	0.072

E	
Block Type	96well
Chemistry	TAQMAN
Experiment File Name	Corrida 607 Identificación EE MON810 en hoja 2011-09-26
Experiment Run End Time	2011-09-26 12:35:26 PM CDT
Instrument Type	sds7500
Passive Reference	ROX

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Cr	Ct Threshold
A1	C, II, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Cr	Cr Mean	Cr SD	Ct Threshold
A5	C, II, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	23.342	23.389	0.067	0.072

A2	C, II, 1	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
A3	C, II, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
A4	C, II, 9	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B1	C, II, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B2	C, II, 2	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B3	C, II,10	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
B4	C, II,10	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C1	C, II, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C2	C, II, 3	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C3	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
C4	NTC	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D1	C, II, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D2	C, II, 4	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D3	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
D4	C-	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
E1	C, II, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
E2	C, II, 5	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
E3	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	24.690	0.086
E4	C+	MON810	UNKNOWN	FAM	24.553	0.086
F1	C, II, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
F2	C, II, 6	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
G1	C, II, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	18.297	0.086
G2	C, II, 7	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
H1	C, II, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086
H2	C, II, 8	MON810	UNKNOWN	FAM	Undetermined	0.086

A6	C, II, 1	hmg	UNKNOWN	FAM	23.437	23.389	0.067	0.072
A7	C, II, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	33.464	29.636	5.415	0.072
A8	C, II, 9	hmg	UNKNOWN	FAM	25.807	29.636	5.415	0.072
B5	C, II, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.653	23.748	0.134	0.072
B6	C, II, 2	hmg	UNKNOWN	FAM	23.843	23.748	0.134	0.072
B7	C, II,10	hmg	UNKNOWN	FAM	25.643	25.554	0.126	0.072
B8	C, II,10	hmg	UNKNOWN	FAM	25.465	25.554	0.126	0.072
C5	C, II, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.117	23.135	0.026	0.072
C6	C, II, 3	hmg	UNKNOWN	FAM	23.154	23.135	0.026	0.072
C7	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.072
C8	NTC	hmg	UNKNOWN	FAM	Undetermined			0.072
D5	C, II, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	24.579	24.602	0.032	0.072
D6	C, II, 4	hmg	UNKNOWN	FAM	24.625	24.602	0.032	0.072
D7	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	36.568	37.204	0.900	0.072
D8	C-	hmg	UNKNOWN	FAM	37.840	37.204	0.900	0.072
E5	C, II, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.423	23.435	0.016	0.072
E6	C, II, 5	hmg	UNKNOWN	FAM	23.446	23.435	0.016	0.072
E7	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	21.767	21.848	0.114	0.072
E8	C+	hmg	UNKNOWN	FAM	21.928	21.848	0.114	0.072
F5	C, II, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	25.692	25.715	0.033	0.072
F6	C, II, 6	hmg	UNKNOWN	FAM	25.738	25.715	0.033	0.072
G5	C, II, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	24.934	24.985	0.072	0.072
G6	C, II, 7	hmg	UNKNOWN	FAM	25.037	24.985	0.072	0.072
H5	C, II, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	24.922	24.917	0.008	0.072
H6	C, II, 8	hmg	UNKNOWN	FAM	24.911	24.917	0.008	0.072

F				
Experiment name: Corrida 988 Cuantificación mezclas MON810/Convencional 0.1 y 1.0% 2012_03_23 (%d)				
Created on: 3/23/2012 12:43:58 PM				
Software version: LCS480 1.5.0.39				
Applied templates:				1: Mono Color Hydrolysis Probe - UPL Probe 96-II
Run: Started at 3/23/2012 12:50:05 PM and completed at 3/23/2012 2:06:56 PM.				
Block type: 96 wells				
Filter combinations:				
Active	Name	Melt factor	Quant factor	Max integration time
Yes	FAM	1.000	10.000	2 second(s)

MON810					
Include	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard

hmg					
Include	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard

True	A4	I A 0.1%	35.510	0.338	0.000
True	A5	I A 0.1%	35.160	0.423	0.000
True	A8	I A 1%	32.540	2.290	0.000
True	A9	I A 1%	32.490	2.360	0.000
True	B4	I B 0.1%	36.630	0.164	0.000
True	B5	I B 0.1%	36.150	0.224	0.000
True	B8	I B 1%	32.250	2.770	0.000
True	B9	I B 1%	32.150	2.950	0.000
True	C4	II A 1 %	35.570	0.324	0.000
True	C5	II A 1 %	35.220	0.407	0.000
True	C8	II A 1%	33.500	1.230	0.000
True	C9	II A 1%	33.460	1.270	0.000
True	D4	II B 0.1%	35.290	0.389	0.000
True	D5	II B 0.1%	35.260	0.397	0.000
True	D8	II B 1%	33.310	1.400	0.000
True	D9	II B 1%	33.180	1.520	0.000
True	E4	III A 0.1%	35.830	0.276	0.000
True	E5	III A 0.1%	35.230	0.404	0.000
True	E8	III A 1%	33.320	1.390	0.000
True	E9	III A 1%	32.940	1.780	0.000
True	F4	III B 0.1%	35.620	0.315	0.000
True	F5	III B 0.1%	35.830	0.274	0.000
True	F8	III B 1%	33.280	1.420	0.000
True	F9	III B 1%	32.990	1.720	0.000
True	G4	IV A 0.1%	36.260	0.208	0.000
True	G5	IV A 0.1%	35.740	0.291	0.000
True	G8	IV A 1%	33.540	1.210	0.000
True	G9	IV A 1%	33.050	1.650	0.000
True	H4	IV B 0.1%	35.570	0.325	0.000
True	H5	IV B 0.1%	35.560	0.328	0.000
True	H8	IV B 1%	33.430	1.290	0.000
True	H9	IV B 1%	33.260	1.450	0.000
True	A12	NTC	41.440	0.007	0.000
True	B12	NTC	40.110	0.017	0.000
True	C12	C- MR 100	42.120	0.005	0.000
True	D12	C- MR 100	42.450	0.004	0.000
True	A1	100.000	26.740	96.900	100.000
True	A2	100.000	26.660	102.000	100.000
True	A3	100.000	26.650	103.000	100.000
True	B1	10.000	30.290	9.780	10.000
True	B2	10.000	30.260	9.950	10.000
True	B3	10.000	30.060	11.300	10.000
True	C1	1.000	33.880	0.964	1.000

True	A6	I A 0.1%	24.820	103.000	0.000
True	A7	I A 0.1%	24.790	105.000	0.000
True	A10	I A 1%	25.320	74.900	0.000
True	A11	I A 1%	25.340	73.800	0.000
True	B6	I B 0.1%	25.560	64.000	0.000
True	B7	I B 0.1%	25.470	67.800	0.000
True	B10	I B 1%	25.110	85.800	0.000
True	B11	I B 1%	25.070	87.700	0.000
True	C6	II A 1 %	25.500	66.700	0.000
True	C7	II A 1 %	25.500	66.400	0.000
True	C10	II A 1%	25.350	73.200	0.000
True	C11	II A 1%	25.510	66.200	0.000
True	D6	II B 0.1%	25.170	82.100	0.000
True	D7	II B 0.1%	25.180	82.000	0.000
True	D10	II B 1%	25.120	84.800	0.000
True	D11	II B 1%	25.070	88.000	0.000
True	E6	III A 0.1%	25.440	69.300	0.000
True	E7	III A 0.1%	25.440	69.200	0.000
True	E10	III A 1%	25.360	72.700	0.000
True	E11	III A 1%	25.330	74.100	0.000
True	F6	III B 0.1%	24.870	100.000	0.000
True	F7	III B 0.1%	24.870	99.700	0.000
True	F10	III B 1%	25.320	74.600	0.000
True	F11	III B 1%	25.380	72.000	0.000
True	G6	IV A 0.1%	25.510	66.200	0.000
True	G7	IV A 0.1%	25.510	66.000	0.000
True	G10	IV A 1%	25.070	87.600	0.000
True	G11	IV A 1%	25.090	86.900	0.000
True	H6	IV B 0.1%	25.620	61.500	0.000
True	H7	IV B 0.1%	25.690	59.000	0.000
True	H10	IV B 1%	25.210	80.200	0.000
True	H11	IV B 1%	25.200	80.900	0.000
True	E12	NTC			0.000
True	F12	NTC			0.000
True	G12	C- MR 189			0.000
True	H12	C- MR 189			0.000
True	E1	100.000	24.840	102.000	100.000
True	E2	100.000	24.860	100.000	100.000
True	E3	100.000	24.850	101.000	100.000
True	F1	10.000	28.540	9.320	10.000
True	F2	10.000	28.450	9.880	10.000
True	F3	10.000	28.470	9.760	10.000
True	G1	1.000	31.950	1.030	1.000

True	C2	1.000	33.750	1.050	1.000	True	G2	1.000	31.980	1.010	1.000
True	C3	1.000	34.160	0.808	1.000	True	G3	1.000	32.010	0.991	1.000
True	D1	0.100	37.800	0.077	0.100	True	H1	0.100	35.470	0.106	0.100
True	D2	0.100	36.910	0.137	0.100	True	H2	0.100	36.060	0.072	0.100
False	D3	0.100			0.100	True	H3	0.100	34.990	0.145	0.100

G

Experiment name: Corrida 989 Cuantificación mezclas MON810/Convencional 10% 2012_03_23 (%d)

Created on: 3/23/2012 2:20:29 PM

Software version: LCS480 1.5.0.39

Applied templates:

1: Mono Color Hydrolysis Probe - UPL Probe 96-II

Run: Started at 3/23/2012 2:23:34 PM and completed at 3/23/2012 3:40:26 PM.

Block type: 96 wells

Filter combinations:

Active	Name	Melt factor	Quant factor	Max integration time
Yes	FAM	1.000	10.000	2 second(s)

MON810					
Include	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
True	A1	100.000	26.920	85.200	100.000
True	A2	100.000	26.650	101.000	100.000
True	A3	100.000	26.590	105.000	100.000
True	A4	I A 10%	30.630	7.800	0.000
True	A5	I A 10%	30.540	8.270	0.000
True	A11	NTC	38.150	0.062	0.000
True	A12	NTC	37.790	0.078	0.000
True	B1	10.000	30.470	8.640	10.000
True	B2	10.000	30.320	9.500	10.000
True	B3	10.000	30.290	9.730	10.000
True	B4	I B 10%	30.520	8.400	0.000
True	B5	I B 10%	30.670	7.630	0.000
True	B11	C- MR 100	39.500	0.026	0.000
True	B12	C- MR 100	40.880	0.011	0.000
True	C1	1.000	33.930	0.935	1.000
True	C2	1.000	33.610	1.150	1.000
True	C3	1.000	33.720	1.070	1.000
True	C4	II A 10%	31.830	3.610	0.000
True	C5	II A 10%	31.600	4.170	0.000
True	D1	0.100	37.200	0.114	0.100
True	D2	0.100	38.870	0.039	0.100
True	D3	0.100	37.440	0.097	0.100
True	D4	II B 10%	31.440	4.650	0.000

hmg					
Include	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
True	A6	I A 10%	27.490	45.500	0.000
True	A7	I A 10%	27.710	39.100	0.000
True	B6	I B 10%	27.780	37.300	0.000
True	B7	I B 10%	27.690	39.600	0.000
True	C6	II A 10%	27.980	32.300	0.000
True	C7	II A 10%	28.070	30.400	0.000
True	D6	II B 10%	27.610	41.600	0.000
True	D7	II B 10%	27.700	39.200	0.000
True	E1	100.000	26.450	92.100	100.000
True	E2	100.000	26.330	100.000	100.000
True	E3	100.000	26.260	105.000	100.000
True	E6	III A 10%	27.590	42.500	0.000
True	E7	III A 10%	27.550	43.500	0.000
True	F1	10.000	29.600	10.700	10.000
True	F2	10.000	29.770	9.490	10.000
True	F3	10.000	29.490	11.500	10.000
True	F6	III B 10%	27.680	39.700	0.000
True	F7	III B 10%	27.710	39.100	0.000
True	G1	1.000	33.440	0.774	1.000
True	G2	1.000	33.260	0.873	1.000
True	G3	1.000	33.270	0.869	1.000
True	G6	IV A 10%	27.700	39.200	0.000
True	G7	IV A 10%	27.730	38.400	0.000

True	D5	II B 10%	31.650	4.060	0.000
True	E4	III A 10%	31.010	6.110	0.000
True	E5	III A 10%	31.120	5.700	0.000
True	F4	III B 10%	30.690	7.490	0.000
True	F5	III B 10%	30.860	6.740	0.000
True	G4	IV A 10%	30.850	6.760	0.000
True	G5	IV A 10%	30.890	6.590	0.000
True	H4	IV B 10%	30.800	6.990	0.000
True	H5	IV B 10%	30.840	6.820	0.000

True	G11	NTC			0.000
True	G12	NTC			0.000
True	H1	0.100	36.700	0.083	0.100
True	H2	0.100	36.070	0.127	0.100
True	H3	0.100	36.320	0.107	0.100
True	H6	IV B 10%	27.770	37.500	0.000
True	H7	IV B 10%	27.960	32.800	0.000
True	H11	C- MR 189			0.000
True	H12	C- MR 189			0.000

H	
Block Type	384-Well Block
Chemistry	TAQMAN
Experiment Name	Corrida 1090 Cuantificación mezclas liofilizadas 0.1 1 y 10% 2012-05-23
Experiment Run End Time	2012-05-23 18:59:43 PM CDT
Experiment Type	Standard Curve
Instrument Name	ViiA7
Instrument Type	ViiA 7
Passive Reference	ROX
Quantification Cycle Method	Ct

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Quantity	Quantity Mean	Ct Threshold
11	A11	I 0.1%	MON810	33.123	33.123	0.871	0.871	0.086
13	A13	I 0.1%	hmg	23.782	23.782	90.475	90.475	0.064
35	B11	Sample 1	MON810	33.094	33.094	0.888	0.888	0.086
37	B13	Sample 1	hmg	23.807	23.807	88.863	88.863	0.064
59	C11	Sample 2	MON810	33.304	33.304	0.771	0.771	0.086
61	C13	Sample 2	hmg	23.771	23.771	91.171	91.171	0.064
83	D11	Sample 3	MON810	33.573	33.573	0.644	0.644	0.086
85	D13	Sample 3	hmg	23.785	23.785	90.268	90.268	0.064
107	E11	Sample 4	MON810	33.279	33.279	0.784	0.784	0.086
109	E13	Sample 4	hmg	23.758	23.758	92.000	92.000	0.064
131	F11	Sample 5	MON810	32.882	32.882	1.024	1.024	0.086
133	F13	Sample 5	hmg	23.774	23.774	90.927	90.927	0.064
155	G11	Sample 6	MON810	32.723	32.723	1.140	1.140	0.086
157	G13	Sample 6	hmg	23.752	23.752	92.342	92.342	0.064
179	H11	Sample 7	MON810	32.841	32.841	1.052	1.052	0.086
181	H13	Sample 7	hmg	23.815	23.815	88.389	88.389	0.064
203	I11	Sample 8	MON810	33.270	33.270	0.789	0.789	0.086

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Quantity	Quantity Mean	Ct Threshold
12	A12	II 0.1%	MON810	36.080	36.080	0.120	0.120	0.086
14	A14	II 0.1%	hmg	23.748	23.748	92.630	92.630	0.064
36	B12	Sample 12	MON810	36.903	36.903	0.069	0.069	0.086
38	B14	Sample 12	hmg	23.741	23.741	93.068	93.068	0.064
60	C12	Sample 13	MON810	36.568	36.568	0.086	0.086	0.086
62	C14	Sample 13	hmg	23.725	23.725	94.092	94.092	0.064
84	D12	Sample 14	MON810	36.970	36.970	0.066	0.066	0.086
86	D14	Sample 14	hmg	23.724	23.724	94.155	94.155	0.064
108	E12	Sample 15	MON810	36.517	36.517	0.089	0.089	0.086
110	E14	Sample 15	hmg	23.727	23.727	93.949	93.949	0.064
132	F12	Sample 16	MON810	37.806	37.806	0.038	0.038	0.086
134	F14	Sample 16	hmg	23.772	23.772	91.083	91.083	0.064
156	G12	Sample 17	MON810	35.997	35.997	0.127	0.127	0.086
158	G14	Sample 17	hmg	23.033	23.033	152.422	152.422	0.064
180	H12	Sample 18	MON810	35.682	35.682	0.156	0.156	0.086
182	H14	Sample 18	hmg	23.126	23.126	142.878	142.878	0.064
204	I12	Sample 19	MON810	36.373	36.373	0.098	0.098	0.086

205	I13	Sample 8	hmg	23.837	23.837	87.073	87.073	0.064
227	J11	Sample 9	MON810	33.335	33.335	0.755	0.755	0.086
229	J13	Sample 9	hmg	23.853	23.853	86.095	86.095	0.064
251	K11	Sample 10	MON810	33.090	33.090	0.891	0.891	0.086
253	K13	Sample 10	hmg	23.865	23.865	85.359	85.359	0.064
275	L11	Sample 11	MON810	33.290	33.290	0.779	0.779	0.086
277	L13	Sample 11	hmg	23.776	23.776	90.836	90.836	0.064

206	I14	Sample 19	hmg	23.080	23.080	147.541	147.541	0.064
228	J12	Sample 20	MON810	36.268	36.268	0.106	0.106	0.086
230	J14	Sample 20	hmg	23.006	23.006	155.254	155.254	0.064
252	K12	Sample 21	MON810	37.340	37.340	0.051	0.051	0.086
254	K14	Sample 21	hmg	23.055	23.055	150.076	150.076	0.064
276	L12	Sample 22	MON810	37.388	37.388	0.050	0.050	0.086
278	L14	Sample 22	hmg	23.068	23.068	148.789	148.789	0.064

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Quantity	Quantity Mean	Ct Threshold
15	A15	I 1%	MON810	29.165	29.165	12.395	12.395	0.086
17	A17	I 1%	hmg	23.484	23.484	111.314	111.314	0.064
39	B15	Sample 23	MON810	29.145	29.145	12.564	12.564	0.086
41	B17	Sample 23	hmg	23.514	23.514	109.028	109.028	0.064
63	C15	Sample 24	MON810	29.146	29.146	12.562	12.562	0.086
65	C17	Sample 24	hmg	23.491	23.491	110.788	110.788	0.064
87	D15	Sample 25	MON810	29.133	29.133	12.670	12.670	0.086
89	D17	Sample 25	hmg	23.547	23.547	106.512	106.512	0.064
111	E15	Sample 26	MON810	29.151	29.151	12.516	12.516	0.086
113	E17	Sample 26	hmg	23.507	23.507	109.519	109.519	0.064
135	F15	Sample 27	MON810	29.188	29.188	12.210	12.210	0.086
137	F17	Sample 27	hmg	23.477	23.477	111.896	111.896	0.064
159	G15	Sample 28	MON810	29.469	29.469	10.115	10.115	0.086
161	G17	Sample 28	hmg	23.838	23.838	86.997	86.997	0.064
183	H15	Sample 29	MON810	29.358	29.358	10.896	10.896	0.086
185	H17	Sample 29	hmg	23.797	23.797	89.522	89.522	0.064
207	I15	Sample 30	MON810	29.418	29.418	10.465	10.465	0.086
209	I17	Sample 30	hmg	23.878	23.878	84.613	84.613	0.064
231	J15	Sample 31	MON810	29.490	29.490	9.972	9.972	0.086
233	J17	Sample 31	hmg	23.921	23.921	82.120	82.120	0.064
255	K15	Sample 32	MON810	29.502	29.502	9.892	9.892	0.086
257	K17	Sample 32	hmg	23.946	23.946	80.677	80.677	0.064
279	L15	Sample 33	MON810	29.483	29.483	10.015	10.015	0.086
281	L17	Sample 33	hmg	23.477	23.477	111.892	111.892	0.064

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Quantity	Quantity Mean	Ct Threshold
16	A16	II 1%	MON810	29.898	29.898	7.581	7.581	0.086
18	A18	II 1%	hmg	23.264	23.264	129.727	129.727	0.064
40	B16	Sample 34	MON810	29.717	29.717	8.560	8.560	0.086
42	B18	Sample 34	hmg	23.299	23.299	126.606	126.606	0.064
64	C16	Sample 35	MON810	29.772	29.772	8.253	8.253	0.086
66	C18	Sample 35	hmg	23.309	23.309	125.751	125.751	0.064
88	D16	Sample 36	MON810	29.826	29.826	7.955	7.955	0.086
90	D18	Sample 36	hmg	23.275	23.275	128.736	128.736	0.064
112	E16	Sample 37	MON810	29.910	29.910	7.522	7.522	0.086
114	E18	Sample 37	hmg	23.227	23.227	133.112	133.112	0.064
136	F16	Sample 38	MON810	29.728	29.728	8.496	8.496	0.086
138	F18	Sample 38	hmg	23.221	23.221	133.674	133.674	0.064
160	G16	Sample 39	MON810	30.024	30.024	6.966	6.966	0.086
162	G18	Sample 39	hmg	23.805	23.805	89.013	89.013	0.064
184	H16	Sample 40	MON810	30.036	30.036	6.910	6.910	0.086
186	H18	Sample 40	hmg	23.786	23.786	90.166	90.166	0.064
208	I16	Sample 41	MON810	29.900	29.900	7.572	7.572	0.086
210	I18	Sample 41	hmg	23.872	23.872	84.957	84.957	0.064
232	J16	Sample 42	MON810	29.939	29.939	7.376	7.376	0.086
234	J18	Sample 42	hmg	23.767	23.767	91.418	91.418	0.064
256	K16	Sample 43	MON810	30.004	30.004	7.062	7.062	0.086
258	K18	Sample 43	hmg	23.831	23.831	87.413	87.413	0.064
280	L16	Sample 44	MON810	30.144	30.144	6.426	6.426	0.086
282	L18	Sample 44	hmg	23.825	23.825	87.761	87.761	0.064

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Quantity	Quantity Mean	Ct Threshold
19	A19	I 10%	MON810	31.364	31.364	2.836	2.836	0.086
21	A21	I 10%	hmg	23.128	23.128	142.628	142.628	0.064
43	B19	Sample 45	MON810	31.106	31.106	3.372	3.372	0.086
45	B21	Sample 45	hmg	23.065	23.065	149.089	149.089	0.064
67	C19	Sample 46	MON810	31.077	31.077	3.437	3.437	0.086
69	C21	Sample 46	hmg	23.011	23.011	154.743	154.743	0.064
91	D19	Sample 47	MON810	30.980	30.980	3.668	3.668	0.086

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Quantity	Quantity Mean	Ct Threshold
20	A20	II 10%	MON810	29.988	29.988	7.140	7.140	0.086
22	A22	II 10%	hmg	23.258	23.258	130.262	130.262	0.064
44	B20	Sample 56	MON810	30.009	30.009	7.038	7.038	0.086
46	B22	Sample 56	hmg	23.224	23.224	133.378	133.378	0.064
68	C20	Sample 57	MON810	29.924	29.924	7.450	7.450	0.086
70	C22	Sample 57	hmg	23.293	23.293	127.186	127.186	0.064
92	D20	Sample 58	MON810	30.054	30.054	6.828	6.828	0.086

93	D21	Sample 47	hmg	23.031	23.031	152.630	152.630	0.064
115	E19	Sample 48	MON810	30.970	30.970	3.693	3.693	0.086
117	E21	Sample 48	hmg	22.981	22.981	157.979	157.979	0.064
139	F19	Sample 49	MON810	31.059	31.059	3.478	3.478	0.086
141	F21	Sample 49	hmg	23.123	23.123	143.185	143.185	0.064
163	G19	Sample 50	MON810	31.046	31.046	3.510	3.510	0.086
165	G21	Sample 50	hmg	23.523	23.523	108.365	108.365	0.064
187	H19	Sample 51	MON810	30.964	30.964	3.708	3.708	0.086
189	H21	Sample 51	hmg	23.410	23.410	117.241	117.241	0.064
211	I19	Sample 52	MON810	30.925	30.925	3.806	3.806	0.086
213	I21	Sample 52	hmg	23.495	23.495	110.480	110.480	0.064
235	J19	Sample 53	MON810	30.843	30.843	4.021	4.021	0.086
237	J21	Sample 53	hmg	23.518	23.518	108.719	108.719	0.064
259	K19	Sample 54	MON810	30.902	30.902	3.867	3.867	0.086
261	K21	Sample 54	hmg	23.498	23.498	110.263	110.263	0.064
283	L19	Sample 55	MON810	30.946	30.946	3.752	3.752	0.086
285	L21	Sample 55	hmg	23.444	23.444	114.446	114.446	0.064

94	D22	Sample 58	hmg	23.181	23.181	137.518	137.518	0.064
116	E20	Sample 59	MON810	29.991	29.991	7.124	7.124	0.086
118	E22	Sample 59	hmg	23.283	23.283	128.043	128.043	0.064
140	F20	Sample 60	MON810	29.814	29.814	8.021	8.021	0.086
142	F22	Sample 60	hmg	23.238	23.238	132.144	132.144	0.064
164	G20	Sample 61	MON810	30.080	30.080	6.712	6.712	0.086
166	G22	Sample 61	hmg	23.389	23.389	118.957	118.957	0.064
188	H20	Sample 62	MON810	30.102	30.102	6.612	6.612	0.086
190	H22	Sample 62	hmg	23.439	23.439	114.898	114.898	0.064
212	I20	Sample 63	MON810	30.156	30.156	6.375	6.375	0.086
214	I22	Sample 63	hmg	23.403	23.403	117.750	117.750	0.064
236	J20	Sample 64	MON810	30.115	30.115	6.553	6.553	0.086
238	J22	Sample 64	hmg	23.423	23.423	116.118	116.118	0.064
260	K20	Sample 65	MON810	30.118	30.118	6.541	6.541	0.086
262	K22	Sample 65	hmg	23.458	23.458	113.316	113.316	0.064
284	L20	Sample 66	MON810	30.196	30.196	6.206	6.206	0.086
286	L22	Sample 66	hmg	23.406	23.406	117.497	117.497	0.064

I				
Experiment name: Corrida 1102 Cuantificación mezclas liofilizadas 0.1, 1 y 10% 2012_06_12				
Created on: 6/12/2012 11:14:53 AM				
Software version: LCS480 1.5.0.39				
Applied templates:				1: Mono Color Hydrolysis Probe - UPL Probe 96-II
Run: Started at 6/12/2012 11:17:59 AM and completed at 6/12/2012 12:28:10 PM.				
Block type: 96 wells				
Filter combinations:				
Active	Name	Melt factor	Quant factor	Max integration time
Yes	FAM	1.000	10.000	2 second(s)

MON810					
Include	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
True	A1	100.000	26.910	93.900	100.000
True	A2	100.000	26.770	103.000	100.000
True	A3	100.000	26.700	108.000	100.000
True	A4	10.1%	36.440	0.147	0.000
True	A5	10.1%	36.210	0.172	0.000
True	A8	11%	34.040	0.748	0.000
True	A9	11%	33.850	0.851	0.000
True	A12	NTC			0.000

hmg					
Include	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
True	A6	10.1%	25.030	130.000	0.000
True	A7	10.1%	24.980	134.000	0.000
True	A10	11%	24.700	163.000	0.000
True	A11	11%	24.720	162.000	0.000
True	B6	10.1%	25.000	133.000	0.000
True	B7	10.1%	24.990	134.000	0.000
True	B10	11%	24.760	157.000	0.000
True	B11	11%	24.700	164.000	0.000

True	B1	10.000	30.260	9.720	10.000
True	B2	10.000	30.210	10.100	10.000
True	B3	10.000	30.160	10.400	10.000
True	B4	10.1%	35.910	0.211	0.000
True	B5	10.1%	37.310	0.082	0.000
True	B8	11%	33.680	0.956	0.000
True	B9	11%	33.540	1.060	0.000
True	B12	NTC			0.000
True	C1	1.000	33.760	0.906	1.000
True	C2	1.000	33.980	0.782	1.000
True	C3	1.000	33.650	0.980	1.000
True	C4	10.1%	37.920	0.054	0.000
True	C5	10.1%	36.670	0.126	0.000
True	C8	11%	33.360	1.190	0.000
True	C9	11%	33.920	0.813	0.000
True	C12	C- MR100	37.620	0.066	0.000
True	D1	0.100	36.920	0.107	0.100
True	D2	0.100	37.410	0.076	0.100
True	D3	0.100	36.010	0.198	0.100
True	D4	10.1%	37.110	0.094	0.000
True	D5	10.1%	36.950	0.104	0.000
True	D8	11%	33.800	0.885	0.000
True	D9	11%	33.800	0.885	0.000
True	D12	C- MR100	37.160	0.091	0.000
True	E4	10.1%	36.690	0.124	0.000
True	E5	10.1%	37.620	0.066	0.000
True	E8	11%	33.220	1.310	0.000
True	E9	11%	33.610	1.000	0.000
True	F4	110%	29.950	12.000	0.000
True	F5	110%	30.050	11.200	0.000
True	F6	110%	30.040	11.300	0.000
True	F7	110%	29.970	11.800	0.000
True	G4	110%	30.060	11.100	0.000
True	G5	110%	30.070	11.000	0.000
True	G6	110%	30.010	11.500	0.000
True	G7	110%	30.180	10.200	0.000
True	H4	110%	30.140	10.600	0.000
True	H5	110%	30.130	10.600	0.000

True	C6	10.1%	25.030	130.000	0.000
True	C7	10.1%	25.040	129.000	0.000
True	C10	11%	24.770	155.000	0.000
True	C11	11%	24.770	156.000	0.000
True	D6	10.1%	24.980	134.000	0.000
True	D7	10.1%	24.960	136.000	0.000
True	D10	11%	24.730	161.000	0.000
True	D11	11%	24.760	157.000	0.000
True	E1	100.000	25.330	105.000	100.000
True	E2	100.000	25.350	104.000	100.000
True	E3	100.000	25.350	104.000	100.000
True	E6	10.1%	24.950	138.000	0.000
True	E7	10.1%	25.020	131.000	0.000
True	E10	11%	24.730	160.000	0.000
True	E11	11%	24.680	166.000	0.000
True	E12	NTC			0.000
True	F1	10.000	28.840	9.200	10.000
True	F2	10.000	28.850	9.160	10.000
True	F3	10.000	28.910	8.800	10.000
True	F8	110%	24.870	146.000	0.000
True	F9	110%	24.870	146.000	0.000
True	F10	110%	24.910	142.000	0.000
True	F11	110%	24.930	139.000	0.000
True	F12	NTC	40.000	0.005	0.000
True	G1	1.000	31.970	1.050	1.000
True	G2	1.000	31.930	1.080	1.000
True	G3	1.000	32.060	0.981	1.000
True	G8	110%	24.890	143.000	0.000
True	G9	110%	24.890	143.000	0.000
True	G10	110%	24.890	144.000	0.000
True	G11	110%	24.940	138.000	0.000
True	G12	C- MR189			0.000
True	H1	0.100	35.280	0.111	0.100
True	H2	0.100	35.430	0.100	0.100
True	H3	0.100	35.490	0.096	0.100
True	H8	110%	24.880	144.000	0.000
True	H9	110%	24.860	146.000	0.000
True	H12	C- MR189			0.000