



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE LA PCR DIGITAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADO**

TESIS

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

PRESENTA

LIZBETH ELENA, GUTIERREZ ANGOA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL: Profesor: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
SECRETARIO: Profesor: M. C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva
1er. SUPLENTE: Profesor: M. C. Verónica García Saturnino
2° SUPLENTE: Profesor: M. C. Verónica Hernández Briones

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

SUPERVISOR TÉCNICO

Q.F.B. Karina Montes Rodríguez

SUSTENTANTE (S):

Lizbeth Elena Gutiérrez Angoa

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar aquí, tan llena de salud y felicidad y por haberme dado una hermosa familia.

A la máxima casa de estudios, la UNAM, por la grata estancia en ella durante estos años y porque además de una formación profesional me regaló increíbles aprendizajes personales.

A mi asesor, Abraham Acatzi, por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su tutoría, por el apoyo, tiempo y asesoría brindado en la realización del proyecto.

A Karina por la capacitación inicial en el laboratorio y por sus asesorías.

A los chicos del CNRDOGM; Blanca y José Luis por su apoyo en el laboratorio.

A mis sinodales, por las correcciones realizadas al trabajo y por ayudarme a expresarlo.

A Daniel por su apoyo y cariño incondicional, por que juntos hemos aprendido a alcanzar nuestra metas.

Dedicatorias

A mis padres, por haberme dado la vida

Sobre todo a ti mamá, por enseñarnos a mis hermanos y a mí tantas cosas importantes de la vida, por tus esfuerzos y sacrificios, porque siempre podemos contar contigo. Gracias por creer en mí.

INDICE

1. Resumen	1
2. Marco teórico	3
2.1 Importancia del maíz en México	3
2.2 Características y descripción física del cultivo de maíz	4
2.3 Organismos Genéticamente Modificados	4
2.4 Detección y métodos de análisis de OGM.....	5
2.5 Maíz genéticamente modificado con el evento MON810.....	10
2.6 Legislación Mexicana e Internacional en materia de OGM.....	12
2.7 Cuantificación de OGM por qPCR.....	13
2.8 Cuantificación de OGM por dPCR.....	17
2.9 Validación de metodologías.....	22
2.10 Medición de la incertidumbre y trazabilidad.....	23
2.11 Materiales de referencia certificados	24
3. Objetivo	25
3.1 Objetivos particulares	25
3.2 Hipótesis.....	25
4. Metodología	26
4.1 Diagrama de estrategia experimental	26
4.2 Materiales y Métodos.....	28
4.2.1 Descripción del material de referencia ERM-AD-413.....	27
4.2.2 Diluciones del material EMR AD-4713	27
4.2.3 Digestión del plásmido y elaboración de diluciones.....	28
4.2.4 Descripción del material de referencia DMR-436IIa.....	28
4.2.5 Extracción de ADN del material de referencia certificado DMR-436IIa.....	29
4.2.6 Medición y estandarización de la concentración de ADN	30
4.2.7 Elaboración de diluciones del MRC DMR-436IIa.....	30
4.2.8 Cuantificación de material genéticamente modificado por dPCR .	30
4.2.9 Obtención de mezclas GM de hojas de maíz	35

4.2.10 Elaboración de diluciones de las mezclas GM para su cuantificación por dPCR	35
4.2.11 Análisis estadístico de los resultados por dPCR.....	36
4.2.12Cuantificación de la hoja GM y sus mezclas por PCR tiempo real	38
4.2.13Curva de calibración gravimétrica a partir del plásmido digerido para su uso en qPCR.....	39
4.2.14 Análisis estadístico de los resultados por qPCR.....	39

5. Resultados y discusión

5.1 Cuantificación de la secuencia E.E. MON810 en el plásmido EMR-AD413 sin digerir por dPCR.....	41
5.2 Cuantificación de la secuencia E.E. MON810 en el plásmido EMR-AD413 digerido por dPCR	44
5.3 Cuantificación del material de referencia DMR-436IIa por dPCR	47
5.4 Caracterización de la hoja GM y mezclas GM por dPCR	50
5.5 Caracterización de la hoja 100% GM por qPCR con plásmido digerido y sin digerir.....	56
5.5.1 Caracterización de la hoja y las mezclas GM por qPCR utilizando como calibrante ERM AD-413 sin digerir	63

6. Logros del trabajo 70

7. Conclusiones..... 70

8. Perspectivas 70

9. Bibliografía..... 71

Siglas y abreviaturas

ADN	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
CENAM	Centro Nacional de Metrología
CNRDOGM	Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados
Conc.	Concentración
CT	Ciclo de umbral de detección
dPCR	Reacción en cadena de la polimerasa digital
ELISA	Análisis de inmunoabsorción enzimática
E.E.	Evento específico
FAM	6-carboxilfluoresceína
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FD	Factor de dilución
<i>hmg</i>	Gen de grupo del alta movilidad endógeno de maíz (<i>high mobility group</i>)
ISO	Organización Internacional de Normalización
IRMM	Instituto de Materiales y Medidas de Referencia
LBOGM	Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados
MGB	Ligando de unión al surco menor
MRC	Material de referencia certificado
NTC	Control de reactivos (Sin adición de ADN)
NFQ	Apantallador no fluorescente
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
OGM	Organismo genéticamente modificado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
ROX	6-carboxi-X-rodamina
SEMARNAT	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales
	Por ciento en número de copias
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
TAMRA	6-carboxitetrametilrodamina
VIC	Fluoróforo de Applied Biosystem
%cp/cp	% copia/copia
µL	microlitro

1. Resumen

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante en México, tanto desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. En 2002 la participación del maíz en la producción de cereales en México alcanzó el 65% (SIAP, 2007).

En diferentes partes del mundo, instituciones y empresas dedicadas a la agrobiotecnología han buscado producir un maíz genéticamente modificado (GM) para obtener un mayor rendimiento y hacerlo resistente a plagas, enfermedades y pesticidas; problemas que repercuten en las actividades en los sectores agropecuario, alimentario e industrial, debido a que el maíz se utiliza en la alimentación de ganado, producción de harina, tortilla, aceite, almidón, edulcorantes y alcohol. Asimismo, del maíz se extraen diferentes sustancias que sirven para elaborar antibióticos, jabones, productos cosméticos, pegamentos y pintura (SIAP, 2007).

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) fue promulgada en México en marzo del 2005 y tiene por objeto “regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados (OGM), con el fin de prevenir, evitar o reducir los riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la salud animal, vegetal y acuícola”(LBOGM, 2005). En esta ley se establece que es responsabilidad de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) resolver y expedir permisos para la realización de actividades con Organismos Genéticamente Modificados (OGM), por ello se estableció a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM). Este tiene como misión: conducir las actividades operativas para la detección, identificación, cuantificación y la secuenciación de OGM de especies vegetales, animales, acuícolas y microorganismos, haciéndose valer de tecnología de punta. Entre otras, de la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés, en la modalidad de tiempo real cuantitativo y digital, para contribuir al diseño y validación de metodologías requeridas para el análisis de OGM.

En comparación con la técnica convencional de PCR tiempo real (qPCR), la PCR digital (dPCR) es una nueva tecnología que permite la cuantificación desde una sola molécula de ADN, a través de una respuesta lineal y sin necesidad de un calibrante como referencia.

Al contar con una técnica de cuantificación que no dependa de un calibrante y capaz de proporcionar el número de copias presentes en una muestra, se provee de una herramienta a los laboratorios nacionales de certificar sus propios materiales de referencia ya que, actualmente, son mínimos los patrones nacionales en materia de OGM que garanticen la calidad del resultado de la medición para la evaluación del contenido de eventos de modificación genética en las distintas matrices de interés nacional como el maíz.

Con este trabajo se evaluó la respuesta de cuantificación del dPCR en la plataforma Open Array a través de la cuantificación de materiales de referencia en número de copias y %copia/copia (%cp/cp) conocidos; para posteriormente cuantificar mezclas de hojas de maíz GM en distintas concentraciones, también como %cp/cp, todo esto con el objetivo de incorporar dicha técnica en los análisis de rutina del CNRDOGM.

De la cuantificación de materiales de referencia se obtuvieron resultados cercanos a los esperados, de acuerdo a lo reportados en sus respectivos certificados, y los obtenidos por la técnica de dPCR. En cuanto a la hoja GM y sus mezclas se obtuvieron valores comparables entre los obtenidos tras la cuantificación por qPCR y dPCR.

Por lo tanto, el presente estudio muestra el uso de la técnica de dPCR para realizar la cuantificación de material genético en tejido vegetal, específicamente en la hoja de maíz.

2. Marco teórico

2.1 Importancia del maíz en México

Analizando la participación del maíz en la producción de cereales (Fig. 1), para el año 2006 el maíz alcanzó un máximo del 65% de dicha producción en relación con los demás cereales que se producen en México, como trigo, sorgo, cebada, arroz y avena, principalmente.

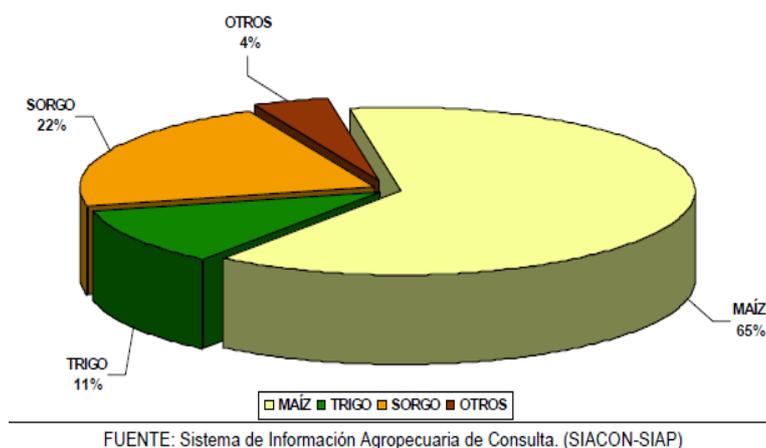


Figura 1. Participación del maíz en la producción de cereales en México de 1996 a 2006

Este grano se produce en dos ciclos productivos: primavera-verano y otoño-invierno, bajo las más diversas condiciones climáticas, de humedad, temporal y riego.

El cultivo de maíz en México se caracteriza por la producción de una amplia gama de variedades, por lo que es posible generar una gran cantidad de productos finales: tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, entre otros.

Los principales exportadores prácticamente son los mismos productores que ocupan los primeros cuatro lugares en términos de producción (Estados Unidos, China, Brasil y México), a excepción de México, el cual a pesar de ser el cuarto productor mundial sus requerimientos de maíz son superiores a los de su producción, por lo que es uno de los principales países importadores (SIAP, 2007).

2.2 Características y descripción física del cultivo de maíz

Nombre común: MAÍZ. El nombre proviene de las Antillas, pero en México, los nahuas lo denominaron *centli* (a la mazorca) o *tlaolli* (al grano).

Reino: Plantae

Familia: Gramíneas (Gramineae)

Clase: Angiosperma

Nombre Científico (género y especie): *Zea mays*

Subclase: Monocotiledónea

Orden: Cereales

La planta alcanza de medio metro a seis metros de alto. Las hojas forman una larga vaina enrollada al tallo y un limbo más ancho y alargado. Del tallo nacen dos o tres inflorescencias muy densas o mazorcas envueltas en espatas, en la axila de las hojas muy ceñidas. En cada mazorca se ven las filas de granos, cuyo número puede variar de ocho a treinta. A cada grano le corresponde un largo hilo sedoso que sobresale por el extremo de la mazorca. El tallo de la planta está rematado en el extremo por una gran panoja de pequeñas flores masculinas; cuando el polen ha sido aventado, se vuelven secas y parduscas.

La polinización de las plantas se realiza con ayuda de insectos y del viento, el cual transporta el polen de una planta a otra (polinización cruzada). El polen de la panícula masculina, arrastrado por el viento (polinización anemófila), cae sobre los estilos, donde germina y avanza hasta llegar al ovario; cada ovario fecundado crece hasta transformarse en un grano de maíz.

Después que el maíz emerge de los campos, el suelo debe mantenerse libre de malezas y hay que luchar contra los insectos plaga. Existen muchos insectos que atacan el maíz, entre ellos la oruga del insecto *agrostis* o trozador (que destruye las plantas jóvenes), el horador o talador de maíz, la larva del *blissus* y el gusano del maíz *heliathis*, que ataca la mazorca (SIAP, 2007).

2.3 Organismos Genéticamente Modificados

Históricamente, el mejoramiento de plantas y animales se ha llevado a cabo a través de la selección dirigida. En el caso de las plantas, esta selección artificial se basaba en la apariencia saludable, en el crecimiento vigoroso, en mayores rendimientos, y en la

aparición, aroma y sabor deseados para la parte comestible. Esta situación cambió hacia fines del siglo XIX y principios de XX cuando el mejoramiento vegetal evolucionó de arte cualitativo a ciencia cuantitativa (Cook, 1999).

En los últimos 20 años, la aplicación de herramientas de biología molecular ha permitido obtener plantas con caracteres que no podrían haber sido introducidos por técnicas de mejoramiento tradicional (NAS, 1987).

La LBOGM define, en su artículo 3 fracción XXI, a los OGM como “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, 2005).

2.4 Detección y métodos de análisis de OGM

Las plantas GM se caracterizan por la inserción de un nuevo gen (o de un nuevo conjunto de genes) en sus genomas. El nuevo gen o genes se traducen y la nueva proteína se expresa. Esto proporciona a la planta una característica nueva, como la resistencia a determinados insectos o la tolerancia a ciertos herbicidas. La base de todas las técnicas de detección de OGM consiste en explotar la diferencia entre la variedad no modificada y la planta GM. Esto puede hacerse detectando el nuevo ADN genéticamente modificado que se ha insertado, o la nueva proteína expresada, o si la proteína actúa como enzima, ensayando la actividad al detectar el producto de la reacción enzimática (Querci, M., Jermini, M. y Van den Eede, G., 2007).

Existen dos planteamientos tecnológicos que se utilizan generalmente para detectar modificaciones genéticas en plantas como la soya, el maíz, el algodón y otras. Los métodos basados en la detección de proteínas por ejemplo ELISA, Western Blot e isoelectroenfoque y los métodos de detección de ADN como Southern Blot y la PCR. ELISA y PCR son las más utilizadas.

El método de ensayo de proteínas utiliza anticuerpos específicos de la proteína de interés. La técnica ELISA detecta o mide la cantidad de proteína de interés en una muestra que puede contener otras muchas proteínas diferentes. Utiliza un anticuerpo para ligar la proteína específica, un segundo anticuerpo para amplificar la detección (fase optativa) y un conjugado de anticuerpo con una enzima (Fig. 2), cuyo producto genera una reacción

coloreada, que es fácil de observar y cuantificar comparando con una curva patrón de la proteína de interés.

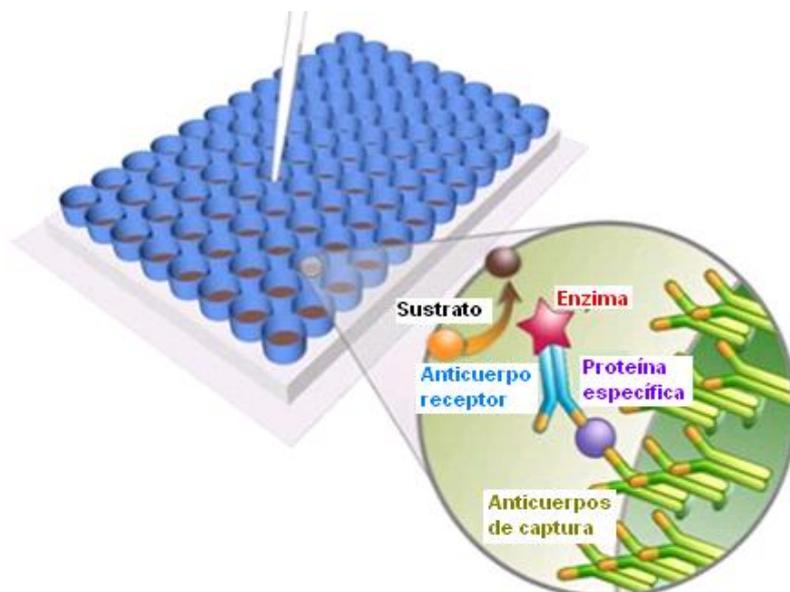


Figura 2. Representación de una reacción en un ensayo inmunoenzimático (GMO testing, 2012)

Por otra parte la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica para obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA en particular.

Los componentes involucrados en la reacción son:

1. DNA polimerasa que sea estable a temperaturas altas. La más común es la Taq polimerasa, la cual resiste los 100°C.
2. Mezcla de cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), que son los sustratos para polimerizar el nuevo DNA. (dATP, dTTP, dCTP y dGTP)
3. DNA molde con la región que se va a amplificar.
4. Dos cebadores complementarios al DNA molde. Son secuencias cortas, normalmente de 20 a 25 nucleótidos, que son reconocidos por la polimerasa para iniciar la reacción de elongación. Deben estar orientados correctamente (antiparalelos mostrándose uno hacia el otro) para que puedan amplificar exponencialmente.
5. Iones divalentes como el magnesio (Mg^{2+}). El magnesio se une a los nucleótidos estabilizando los enlaces diésteres de fosfato. Actúa como cofactor de la polimerasa.
6. Iones monovalentes, como el potasio.
7. Una solución amortiguadora que mantiene el pH 8-9.

8. Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

Otros componentes importantes son: un amortiguador de reacción, iones (magnesio, manganeso, potasio), los cuales son fundamentales para la optimización de la reacción, ya que promueven la estabilidad de la polimerasa, incrementan la hibridación y la especificidad de la reacción

Las etapas de la PCR (Figura 3) son las siguientes:

- 1. Inicialización.** Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 95°C, que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto es necesario para las ADN polimerasas que requieren activación por calor. Este paso también es útil cuando se está usando ADN genómico que requiere de más tiempo para desnaturalizarse completamente. Sin embargo, solamente es necesario agregar este paso de inicialización antes del primer ciclo.
- 2. Desnaturalización.** Este paso se realiza también por medio de calentamiento a 95°C. La alta temperatura (energía cinética molecular) rompe los enlaces de hidrógeno y hace que las dos hebras se separen (el ADN se desnaturaliza).
- 3. Unión del primer.** A continuación se producirá la hibridación del cebador. Este se une a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65°C (según el valor T_m de los cebadores) durante 20-40 segundos permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une al pedazo de doble cadena formado por el cebador y el ADN molde, y empieza a sintetizar la nueva hebra de ADN. Los cebadores definirán los límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.
- 4. Extensión/Elongación de la cadena.** En esta fase, la ADN polimerasa se une al fragmento de doble cadena que forma el ADN molde y el cebador e inicia la síntesis. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la DNA polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad es de

72°C. Como regla general se le da 1 min por cada mil bases de fragmento que se piensa amplificar.

- 5. Elongación final.** Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 72°C entre 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier DNA de cadena simple restante es totalmente amplificado.

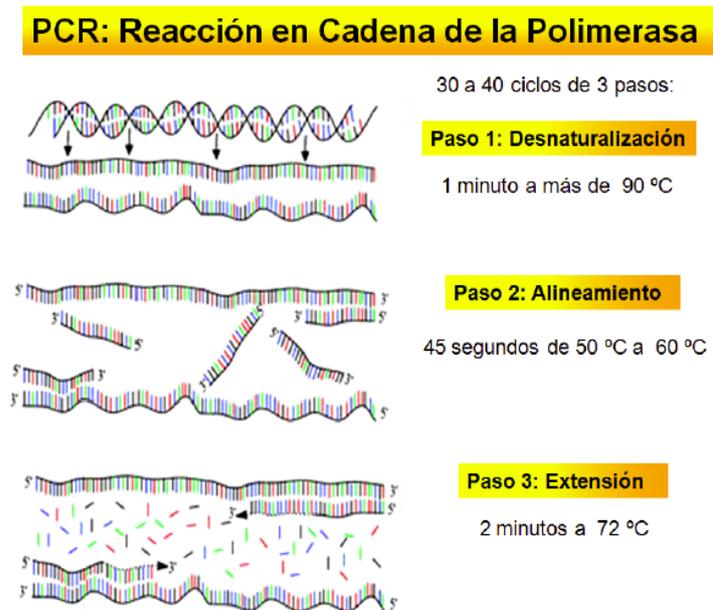


Figura 3. Representación gráfica de las etapas de amplificación por PCR. (Vierstraete A., 1999)

Debido a que ambas cadenas se copian durante la PCR, hay un aumento exponencial en la cantidad de secuencia amplificada (Figura 4).

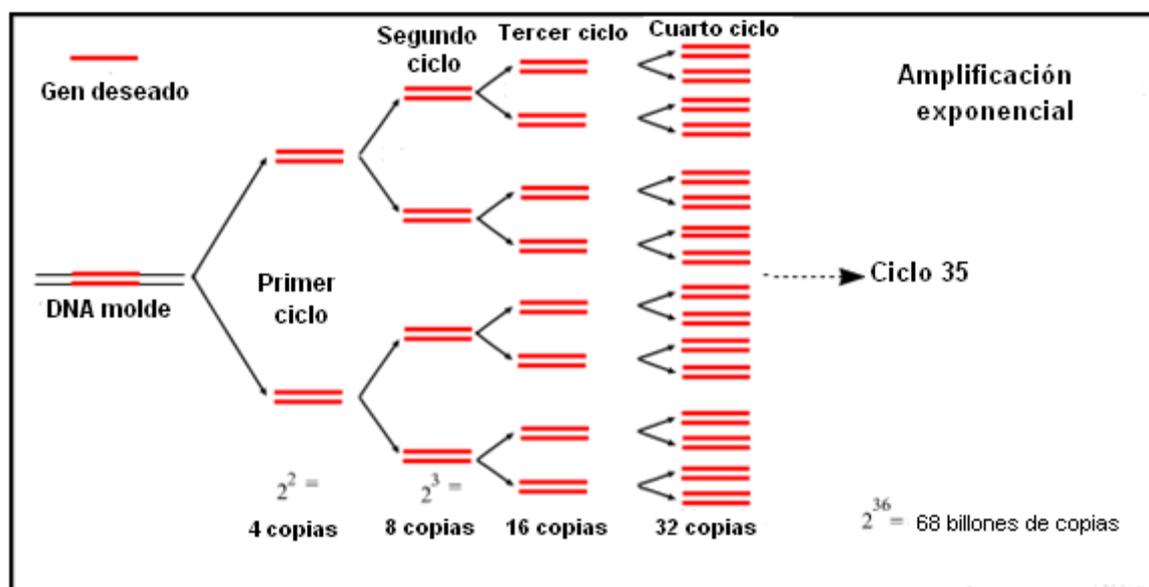


Figura 4. Representación de la generación exponencial de las secuencias amplificadas (Vierstraete A., 1999)

El ADN que ha sido introducido en el cultivo transgénico contiene tres elementos: El promotor, el gen que confiere el nuevo rasgo de interés agronómico y la señal de paro de transcripción de este gen. La PCR puede usarse para detectar a cualquiera de estos elementos, siempre y cuando el cebador utilizado (cuya secuencia se diseña a partir de una secuencia conocida de los elementos indicados) sea complementario a las secuencias buscadas, determinado por el nivel de análisis deseado. (Fig. 5) (Corona, B., *et al*, 2006).

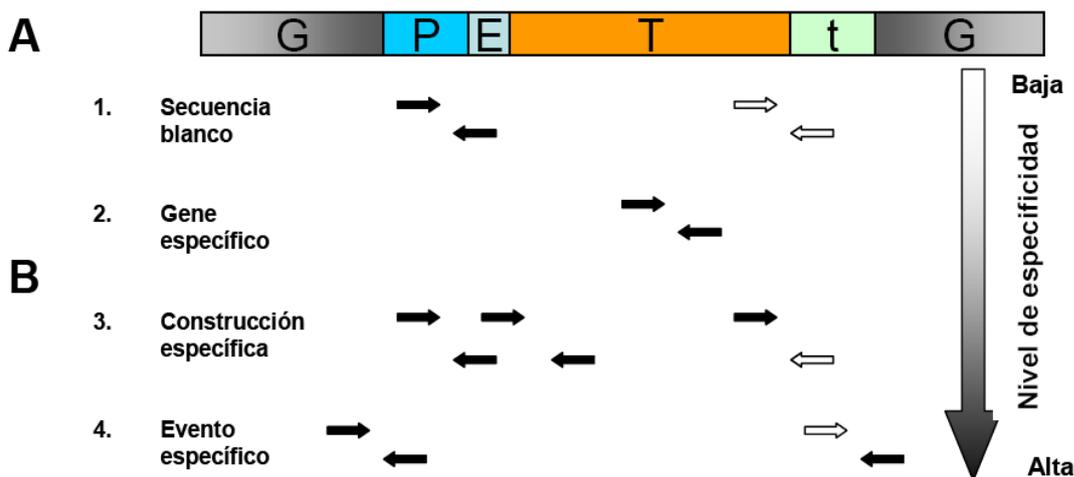


Figura 5. A. Representación esquemática (mapa) de la construcción de un gene. B. Niveles de especificidad en la identificación de elementos dentro de una construcción genética. Las letras son: G: genoma del organismo, P: promotor; E: potenciador de la transcripción (del inglés enhancer). T: Gen insertado (transgene); t: terminador.

En la Tabla 1. Se hace una comparación de las ventajas y limitaciones de los métodos de ELISA y PCR.

Tabla 1. Comparación de los métodos ELISA y PCR

(PCR) Ensayos basados en análisis de ADN	(ELISA) Ensayos basados en análisis de proteínas
Puede ser extremadamente sensible, capaz de detectar la presencia de unas pocas copias (e incluso de una sola copia) de un gen o secuencia diana de interés dentro de todo el material genético de un organismo (genoma). Como resultado de esta elevada sensibilidad, pueden obtenerse falsos positivos con niveles muy bajos de contaminación accidental. Por tanto, ha de extremarse la atención para evitar la contaminación cruzada.	Menor sensibilidad que la PCR, por lo que es más difícil que aparezcan «falsos positivos» debidos a pequeños niveles de contaminación.
Exige poco tiempo de elaboración de los	Elevados costos iniciales para el desarrollo

<p>reactivos comparando con los ensayos inmunológicos (síntesis de cebador frente a producción de anticuerpos).</p>	<p>del ensayo y la obtención de anticuerpos y patrones de proteínas. Reducidos costes por muestra, una vez elaborados los reactivos.</p>
<p>La PCR puede discriminar entre diferentes tipos de modificación genética (también denominados productos GM)</p> <p>Los métodos de diagnóstico para identificar productos GM específicos necesitan más tiempo de elaboración y actividades de validación.</p>	<p>No puede discriminar entre diferentes modos y modelos de expresión de diferentes productos GM que expresan características proteínicas similares.</p> <p>Los métodos de ensayo de proteínas son prácticos y eficaces cuando se produce una proteína detectable. Sin embargo, es posible que las proteínas exógenas se formen sólo durante ciertas fases del desarrollo o en determinadas partes de los vegetales, por lo que resultaría poco probable que tales productos fueran detectados sin problemas por la técnica ELISA. Por otra parte, las transformaciones industriales desnaturalizan fácilmente las proteínas, lo que plantea dificultades para el uso de métodos ELISA en alimentos procesados.</p>
<p>El análisis de las muestras lleva un día aproximadamente.</p> <p>Casi todos los reactivos necesarios están disponibles en el comercio y pueden obtenerse fácilmente de varias fuentes.</p>	<p>No todos los anticuerpos están disponibles para cada una de las proteínas a analizar.</p>

Teniendo todo esto en cuenta, ha de quedar claro que el ELISA y la PCR deben considerarse mutuamente complementarios y no se excluyen entre sí.

2.5 Maíz genéticamente modificado con el evento MON810

Ostrinia nubilalis es una plaga del maíz que se alimenta de los tejidos de la planta dañándolos. Los tejidos atacados varían según el número de generaciones de dicha plaga. Las larvas pueden dañar las hojas de las que se alimentan, los tallos en los que cavan túneles, la vaina foliar y el cuello de los que se alimentan y la mazorca o choclo. *Ostrinia nubilalis* altera la translocación de nutrientes y de agua, provoca la aparición de enfermedades infecciosas secundarias, causa el vuelco de los tallos, la caída de la

mazorca y daños al grano. Las pérdidas anuales de rendimiento del cultivo se estiman entre un 5 y un 10% (FAO, 2009).

Por otra parte *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* (B.t.k.) es una bacteria gram-positiva formadora de esporas y proteínas cristalinas, que ha sido utilizada comercialmente durante los últimos 30 años para controlar insectos plaga. Estos microbios se encuentran naturalmente en el suelo en todas partes del mundo. Esta cepa controla insectos plaga por medio de la producción de proteínas insecticidas cristalinas conocidas como delta-endotoxinas. Para ejercer su actividad, la proteína debe ser ingerida por el insecto. En su intestino la proteína se une a receptores específicos del intestino medio, se inserta en la membrana de las células intestinales y forma poros permeables específicamente a iones. Este evento interrumpe el proceso digestivo y causa la muerte del insecto. (AGBIOS, 2006)

Usando biotecnología moderna, la compañía Monsanto ha desarrollado maíz genéticamente modificado, el evento MON810, cuya construcción genética se muestra en la Figura 6. Este fue producido por la inserción de una forma truncada del gen *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1* que provee al maíz de resistencia a insectos, específicamente *Ostrinia nubilalis*, por la generación de la toxina, consecuencia de la expresión del gen *Cry1Ab*.



Figura 6. Representación esquemática de la construcción genética CryIA(b), que incluye el promotor CAMV 35s, el intrón de hsp70 del maíz y el gen sintético de la δ -endotoxina CryIA(b) seguido por el terminador nos (M. Querci, M. Jermini y G. Van den Eede, 2007).

La proteína *cryIAb* en su forma cristalina es insoluble en soluciones acuosas a pH neutro o ácido. Sin embargo, se solubiliza en el medio básico del estómago de las larvas donde las proteasas la activan. La proteína activada penetra por difusión a través de la membrana peritrófica del epitelio del intestino medio. Se une a receptores de superficie de alta afinidad causando cambios en los contenidos de electrolitos y en el pH que paralizan el estómago. El insecto deja de alimentarse y muere (FAO, 2009).

La superficie de las células intestinales de los mamíferos no contiene receptores similares para las endotoxinas delta de las especies de *Bacillus thuringiensis*. Los mamíferos, por lo

tanto, no son susceptibles a estas proteínas. Por otra parte, varios estudios de inocuidad de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* indican que no poseen efectos nocivos para el ser humano (FAO, 2009).

Además de reducir la cantidad de insecticidas liberados al medio ambiente, este material no ha mostrado ningún efecto negativo para los seres humanos, insectos benéficos, vida acuática o animal. Por lo que preservar esta valiosa tecnología es muy importante para el beneficio del productor y del medio ambiente (Serratos, J. *et al* 2000)

La compañía Monsanto ha desarrollado técnicas de manejo de resistencia para sus diferentes materiales GM en los Estados Unidos y, de acuerdo a las experiencias en los campos de dicho país, las bases de un adecuado manejo de la resistencia. Estas incluyen; expresión de una dosis efectiva de proteína Bt, mantener áreas de refugio, capacitar a productores y entomólogos y monitorear el componente del cultivo y susceptibilidad de las poblaciones de insectos (Serratos, J. *et al.* 2000)

2.6 Legislación Mexicana e Internacional en materia de OGM

Las plantas genéticamente modificadas se han desarrollado con el objeto de resolver una gran diversidad de problemas, como la tolerancia a factores ambientales, el aumento en la calidad nutricional de los cultivos, la producción de materiales industriales o de vacunas y, muy significativamente, la resistencia a plagas y enfermedades. Sin embargo, su desarrollo tecnológico y su eficiencia en el campo no son suficiente razón para que una planta genéticamente modificada sea liberada al campo, sin antes pasar por una serie de requerimientos de seguridad (Ibarra, J. y Del Rincón Ma. 2009).

La LBOGM tiene como antecedente el marco jurídico internacional de la Convención de Río sobre la diversidad biológica (1992) y el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología que entró en vigor el 11 de septiembre de 2003 y del cual México forma parte (SIAP, 2007).

Con base en el Artículo 10 de la LBOGM, las autoridades competentes en materia de bioseguridad son la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la SAGARPA y la Secretaría de Salud (SSA). De acuerdo al Artículo 12 de la misma ley, corresponde a la SAGARPA el ejercicio de las facultades que se le confiere, cuando se

trate de actividades con vegetales GM que se consideren especies agrícolas (LBOGM, 2005).

En el ámbito internacional, por ejemplo en los Estados Unidos y Canadá, el etiquetado de productos GM es voluntaria, no obligatoria. Sin embargo, en muchos otros países, existen límites para que los cultivos modificados genéticamente sean etiquetados como GM. El etiquetado es esencial, porque todo el mundo tiene el derecho de consumir o no alimentos que contengan OGM. Del mismo modo, cada país tiene el derecho a plantar o no plantar los cultivos transgénicos.

El Artículo 101 de la LBOGM establece que “El etiquetado de OGM que sean semillas o material vegetativo destinado a siembra, cultivo y producción agrícola, quedará sujeto a las normas oficiales mexicanas que expida la SAGARPA con la participación de la Secretaría de Economía. Respecto de este tipo de OGM, será obligatorio consignar en la etiqueta que se trata de OGM, las características de la combinación genética adquirida y sus implicaciones relativas a condiciones especiales y requerimientos de cultivo, así como los cambios en las características reproductivas y productivas” (LBOGM, 2005).

En particular en la Unión Europea, se tienen estrictos requerimientos para su etiquetado. La normativa de etiquetado que rige desde el 2004, establece el etiquetado obligatorio de los alimentos derivados de un OGM, independientemente de la detectabilidad de ADN o proteínas y sólo admite la presencia accidental de hasta un 0.9% de OGM aprobado o de un 0.5%, en el caso de eventos aún no aprobados pero con un dictamen de Bioseguridad favorable y valores de 0.3-0.5-0.7% para semillas. Este límite de 0.9% tiene como objetivo excluir la presencia accidental de ingredientes transgénicos en alimentos convencionales debido a una contaminación involuntaria.

2.7 Cuantificación de OGM por qPCR

Derivado de la implementación de normatividad asociada a los OGM es necesario contar con una herramienta para detectar, identificar y cuantificar dichos organismos.

La qPCR usa cebadores y sondas gen-específicos para amplificar secuencias de interés de ADN, también llamada secuencia blanco. En la Figura 7 se representan las etapas de la amplificación de una secuencia de interés por medio de la técnica de qPCR;1) La sonda

TaqMan-MGB se une específicamente a una secuencia complementaria entre los sitios de los cebadores (sentido y antisentido), 2) Cuando la sonda está intacta la proximidad del reportero (R) al quencher (NFQ-MGB) suprime la fluorescencia del reportero, 3) La ADN polimerasa escinde sólo las sondas que se hibridan a la diana, 4) La escisión del reportero del quencher permite la fluorescencia del reportero, resultando una acumulación neta de la respuesta fluorescente de la sonda marcada en un número fijo de ciclos, la cual es proporcional a la cantidad de productos de PCR formados en el tiempo y, por lo tanto, a la cantidad original del analito blanco.

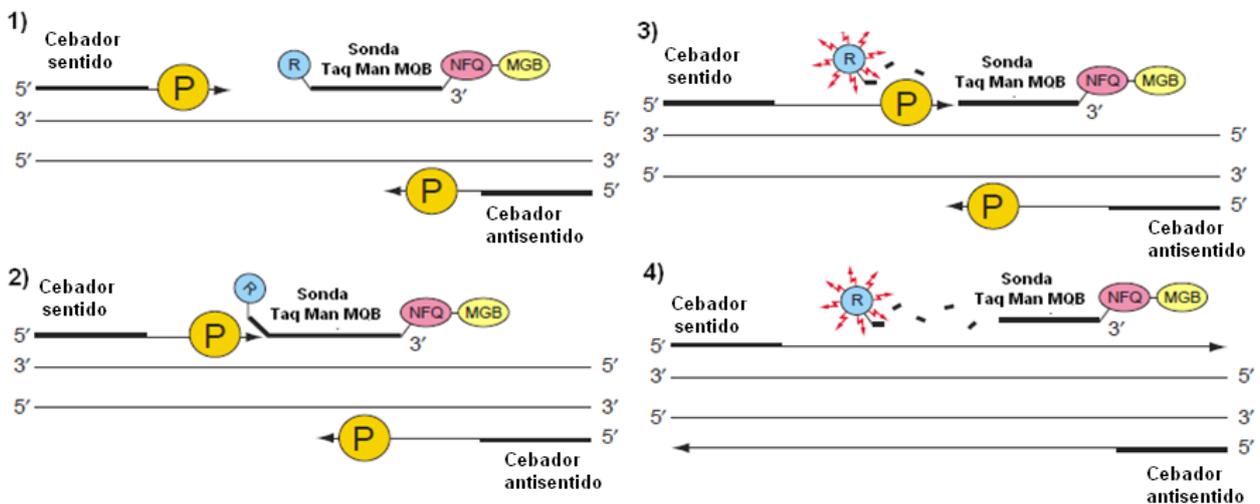


Figura 7. Representación gráfica de la qPCR; donde las leyendas representan; (NFQ) = Apantallador no fluorescente (MGB) = Ligando de unión a surco menor (R) = Reportero (P) = DNA polimerasa (Applied Biosystems. 2010)

En la Figura 6 se observa una amplificación típica en qPCR, en el eje de las “x” se observan los ciclos, mientras que en el de las “y” los valores de fluorescencia. En azul se observa la fluorescencia obtenida únicamente por el producto de amplificación, en rojo se denota la señal de controles, llamado NTC por sus siglas en inglés: not template control, en el cual no se adiciona la cadena molde. La línea basal abarca típicamente los ciclos 5 al 15 (flecha ↔). El umbral (Thershold) se establece con base en los valores de la línea base, aquí se representa con una línea punteada.

Durante el proceso de amplificación de la qPCR se distinguen tres fases (Fig. 8); la fase geométrica, donde la eficiencia de amplificación es cercana al 100%, la fase lineal, donde se va perdiendo la eficiencia y la fase estacionaria donde se detiene la amplificación.

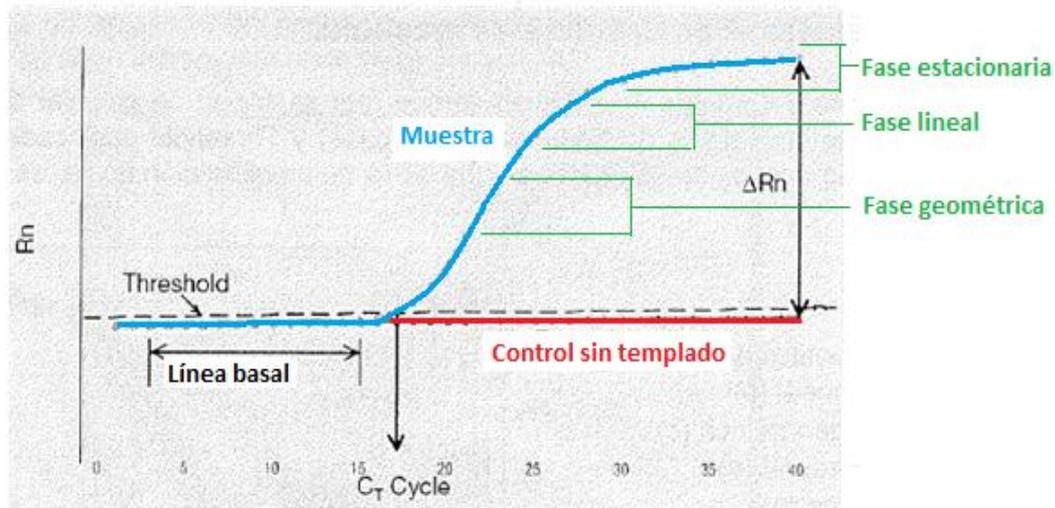


Figura 8. Características de una gráfica de amplificación en tiempo real (Applied Biosystem. 2011)

Durante la fase geométrica, la eficiencia de amplificación es cercana al 100% y por lo tanto es posible predecir la cinética de amplificación mediante una ecuación matemática (Ecuación 1) que evalúe la cantidad de cadena molde inicial.

Ecuación 1

$$P = T(1 + E)^n$$

Donde:

- P: Cantidad de producto generado a n ciclos
- T: Cantidad de cadena molde inicial
- E: Eficiencia de la amplificación
- n: Número de ciclos

Considerando que la fase geométrica se mantiene la eficiencia de amplificación de 100%, se convierte la variable E a una constante=1. La Ecuación 1 se reduce a la Ecuación 2:

$$P = T(2)^n$$

Sin embargo, lo que se quiere obtener no es la cantidad de producto final, si no la cantidad de cadena molde inicial, así que despejando la variable T obtenemos la Ecuación 3;

$$T = \frac{P}{2^n}$$

Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar al umbral de detección, se le conoce como C_T (cycle threshold: ciclo de umbral de detección). De esta forma, el C_T es un número fraccional que indica cuantos ciclos tomó a cada muestra generar una cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección, por lo que el valor de C_T es directamente proporcional a la cantidad de ADN molde.

La qPCR utiliza curvas de calibración para calcular el contenido GM de muestras desconocidas. Las curvas de calibración son construidas usando estándares de concentración conocida (como los MRC) mediante la elaboración de diluciones seriales con dichos materiales. Dentro de la curva estándar generada por el software se interpolan los valores de C_T de muestras desconocidas y esto refleja automáticamente la cantidad o concentración inicial de la cadena molde (Fig. 9).

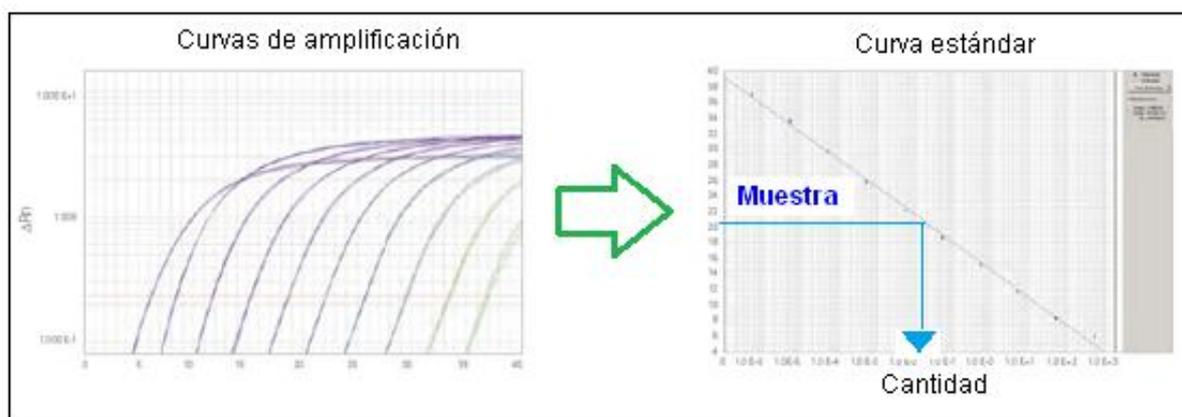


Figura 9. Representación de la elaboración de una curva estándar tomando los valores de C_T de muestras conocidas, sobre la que se interpolan las muestras desconocidas tomando el valor de C_T obtenido. (Applied Biosystem. 2011)

Sin embargo, el uso de curvas de calibración significa que la qPCR cuantitativa debe ser considerada como una aproximación relativa, ya que la respuesta medida será comparada con la curva de calibración para estimar el contenido GM de la muestra (por ejemplo en términos de contenido GM en porcentaje o número de copias). Esta aproximación relativa depende de la disponibilidad de los materiales de referencia para el uso en las curvas de calibración, lo que usualmente significa que la evaluación del contenido GM de la muestra desconocida está sujeta a “efectos de la matriz”. Esto ocurre cuando la matriz de fondo entre el estándar y la muestra para evaluación difiere substancialmente y, por lo tanto, afecta a la eficiencia de la qPCR y la respuesta medida.

Para la cuantificación de OGM, en la técnica de qPCR los ciclos iniciales de amplificación no son exponenciales, por lo que bajas concentraciones de una secuencia blanco no pueden ser detectadas y, después de cierto número de ciclos, se presentan mesetas. El resultado de la cuantificación por dicho método resulta relativo por la comparación de las amplificaciones obtenidas con las de una curva estándar (Burns, M. y Burrel, A., 2010).

2.8 Cuantificación de OGM por dPCR

Las limitaciones de la qPCR para detectar un bajo número de copias de ADN ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías tal como la dPCR, basada en el concepto de diluciones límite, utilizada para enriquecer secuencias minoritarias por un proceso de partición.

La dPCR permite medir con precisión el número de copias de ADN sin la necesidad de un calibrante de referencia, por lo que no tendrá diferencias potenciales por efectos de la matriz entre el estándar y la muestra bajo investigación (Corbiser, *et al.*, 2010).

La dPCR es una nueva tecnología utilizada para cuantificar la cantidad de ADN en una muestra contando amplificaciones desde una sola copia de ADN por la división de la muestra en arreglos digitales, tal que se obtengan moléculas individuales de ADN en cada uno de los cientos de pequeños pozos donde se llevará a cabo la qPCR. La concentración de la secuencia de ADN en la solución es estimada utilizando la aproximación binomial de Poisson, basada en el número de particiones que contienen productos amplificados y el número total de particiones analizadas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$M = \frac{\left(\log\left(1 - \frac{H}{C}\right)\right)}{\left(\log\left(1 - \frac{1}{C}\right)\right)}$$

Donde:
M: número de moléculas por panel
H: número de particiones que contienen producto amplificado
C: número total de particiones analizadas

Al momento de la realización del presente estudio en el mercado mexicano se pueden encontrar dos plataformas para realizar la dPCR, uno de ellos es el sistema Biomark que permite integrar el termociclado y la detección de la fluorescencia en los Arreglos Digitales, los cuales se basan en la tecnología de Circuitos Integrados de Fluidos (IFC) que son cargados con un controlador (Fig. 10). Los arreglos digitales aceptan diluciones seriales de muestras mezcladas con reactivos de la PCR que son distribuidas por válvulas en finas particiones sobre las redes de chips de las cámaras de reacción (Fluidigim. 2010).

Tipos de matrices digitales

-Arreglo Digital 12.765. Las válvulas dividen las muestras en las 765 cámaras en cada uno de los doce paneles (765cámaras x 12 paneles = 9,180 reacciones por chip).

-Arreglo Digital 48.770. Las válvulas dividen las muestras en las 770 cámaras en cada uno de los 48 paneles (770 cámaras x 48 paneles = 36,960 reacciones por chip).

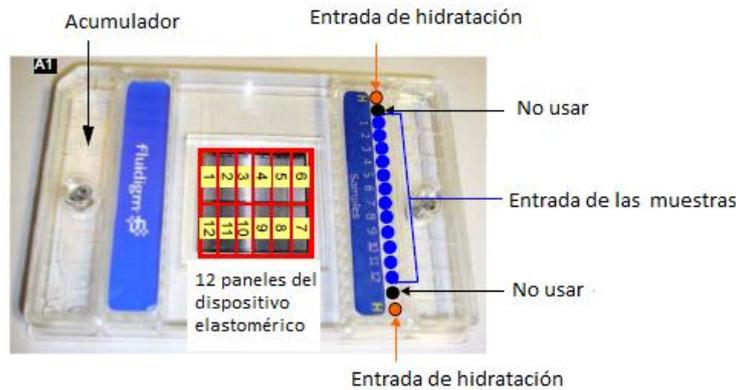


Figura 10. Controlador (Fluidigm. 2010).

El arreglo digital se coloca directamente en el termociclador.

El arreglo digital 12.765 permite obtener una cuantificación absoluta y relativa de fragmentos moleculares usando reactivos que se utilizan en la plataforma de qPCR. El arreglo digital IFC divide la muestra en las 765 reacciones independientes de 6nL. Los datos arrojados por el software están disponibles para cada reacción. Para cada panel se generan respuestas, ya sean positivas o negativas, posteriormente cuantificados por el software.

Cuando una sola molécula de ADN es repartida al azar en las cámaras, es posible que dos o más moléculas estén presentes en una misma cámara. La probabilidad se incrementa a medida que el número de moléculas por panel (o concentración de ADN) aumenta. Por lo tanto, es requerida una corrección matemática. El número de cámaras es el suficientemente grande para usar el análisis probabilístico de Poisson. El cálculo es derivado del número total de cámaras en el panel y el número de pozos positivos detectados.

La segunda plataforma encontrada en el mercado mexicano es sistema Open Array®, el cual es una plataforma de PCR tiempo real masiva, que requiere de dos placas. La placa

de 384 pozos, donde se distribuye la mezcla de reacción; muestra y reactivos para llevar a cabo la PCR, quedando en cada pozo un volumen total de 5 μ L. Esta placa sirve para cargar 8 chips o placas Open Array™ (Fig. 11).

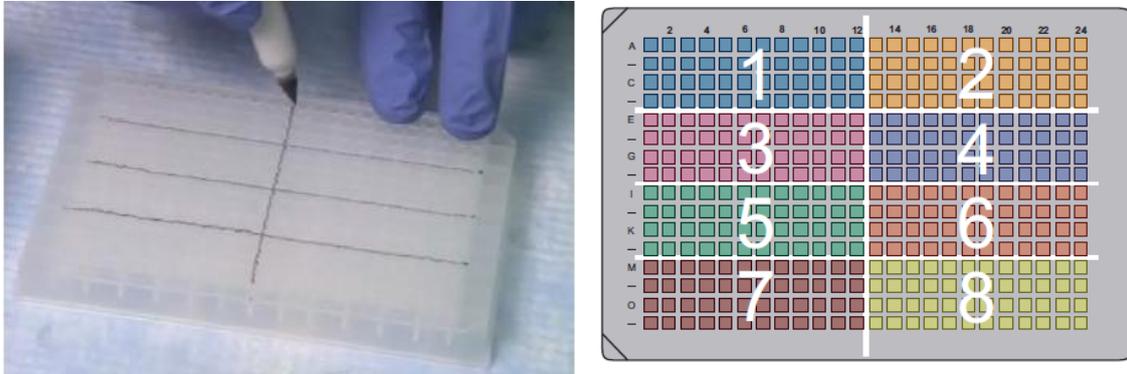


Figura 11. Placa de 384 pozos. Sirve para distribuir la mezcla de reacción de 8 placas Open Array™

Cada placa Open Array™ consiste de 3072 perforaciones, las cuales se encuentran acomodadas en 48 subarreglos de 64 perforaciones. Este acomodo permite la localización de cada reacción con un sistema de Coordenadas. Ejemplo: Localización del pozo o perforación B7e8 (Fig. 12)

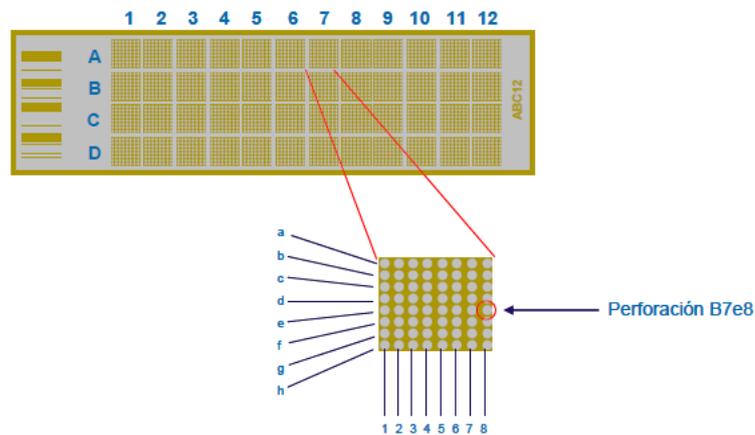


Figura 12. Arquitectura de la placa Open Array™ (Applied Biosystem. 2012)

Las perforaciones de las placas Open Array™ poseen un tratamiento que fomenta la retención de los líquidos en el interior de la perforación. Cada perforación se llena con aproximadamente 33 nL (Fig. 13).

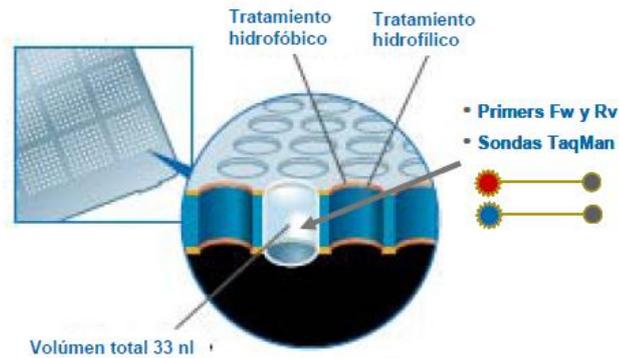


Figura 13. Representación de un pozo de la placa Open Array™ (Applied Biosystem. 2012)

El instrumento Accufill (Figura 14) realiza el cargado automatizado de las placas Open Array™.

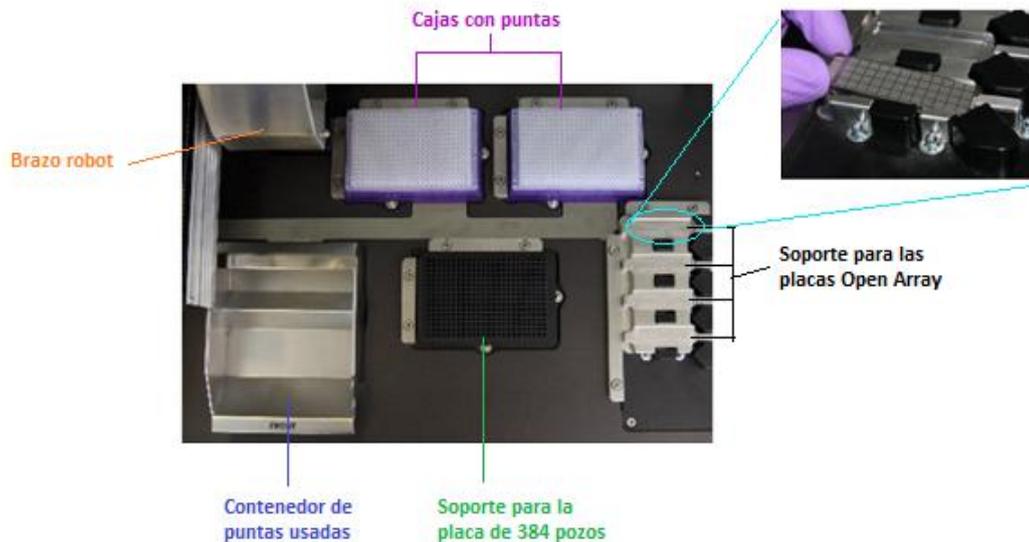


Figura 14. Sistema Accufill

El sistema accufill toma la cantidad suficiente de mezcla de reacción de cada pozo de la placa de 384 pozos y transfiere 33 nL a cada pozo del subarreglo correspondiente de la placa Open Array™. Es decir; simultáneamente se cargan los 48 subarreglos de la placa Open Array™ quedando 33 nL como volumen final de reacción en cada pozo del subarreglo en la placa Open Array™. En la Figura 15 se representa el paso de la solución desde la placa de 384 pozos a la placa Open Array™, hecho por el sistema Accufill.

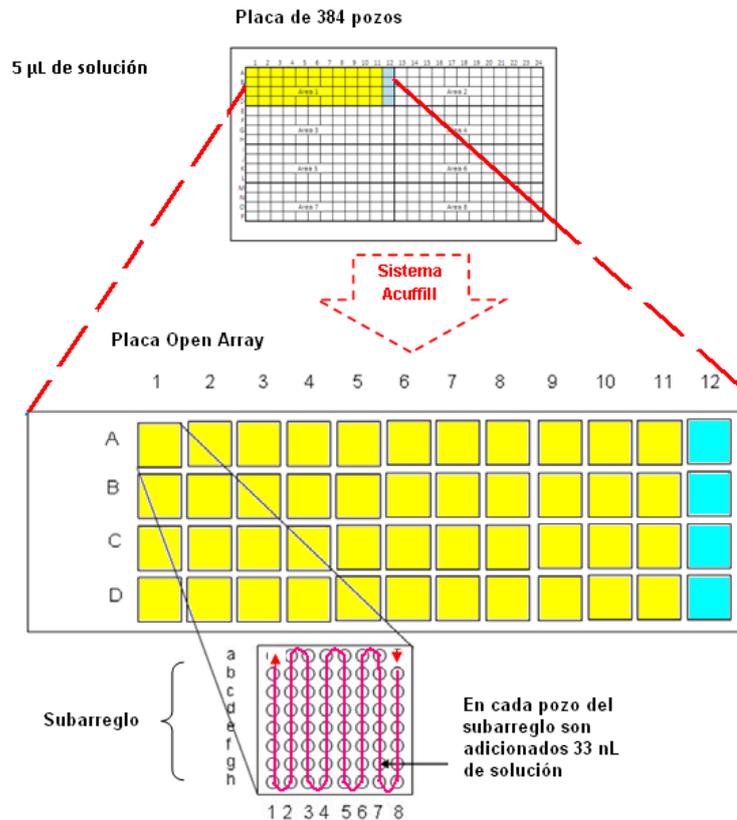


Figura 15. Representación de el paso de la solución de la placa de 384 pozos a la placa Open array TM

Para termociclar las placas Open Array™ es necesario guardarlas en un cassette que resiste la temperatura del programa de termociclado y al mismo tiempo tiene las características ópticas necesarias para permitir la captura de datos. En el cassette es colocado líquido de inmersión, el cual provee de las condiciones óptimas para contener las nanoreacciones. Posteriormente el cassette es sellado con un polímero sensible a luz UV.

La estación de sellado (Fig. 16) permite el sellado de las placas OpenArray™ por la aplicación de luz UV al polímero que será solidificado para evitar el riesgo de evaporación de la muestra y los reactivos.

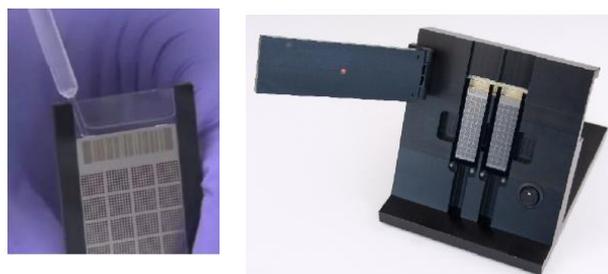


Figura 16. Estación de sellado (Applied Biosystem. 2012)

En el NT Cyclor (Fig. 17) se lleva a cabo el termociclado y la lectura de las placas. Este instrumento cuenta con tres filtros para la captura de los fluoróforos FAM (6-carboxilfluoresceína), VIC y ROX (6-carboxi-x-rodamina)

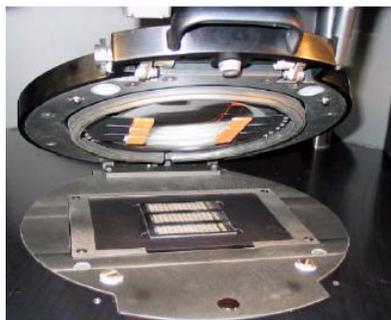


Figura 17. NT Cyclor (Applied Biosystem. 2012)

El Dual Flat Block 9700 Thermocycler es un termociclador 9700 de Applied Biosystems, adaptado con un bloque plano especial para las placas Open Array™.

Después de los ciclos térmicos, el Software Open Array® utiliza un algoritmo para calcular un ciclo umbral (C_T) para cada reacción en la placa de OpenArray® Digital PCR. Durante una segunda fase de análisis el software Open Array® Digital PCR usa el C_T calculado para asignar a cada reacción ya sea positiva (1) si el C_T está dentro del rango aceptable, o un negativa (0) si está fuera.

Durante la fase final del análisis, el Software del Open Array ® Digital PCR genera valores de número de copias y los datos del intervalo de confianza (cota inferior y cota superior) para cada muestra (subarrgelo) en la placa Open Array ® Digital PCR. Para cada muestra, el software comienza el cálculo de un valor de número de copias para cada subarreglo contando el número de pozos positivos. Utilizando dichos datos, el software Open Array ® digital PCR calcula entonces los valores de número de copias para todas las muestras presentes en la placa y genera intervalos con un 95% de confianza de acuerdo al algoritmo de Poisson (Applied Biosystem. 2010).

2.9 Validación de metodologías

La Comisión del Codex Alimentarios hace especial hincapié en la aceptación de métodos de análisis que hayan sido validados mediante un ensayo en colaboración que sea conforme a un protocolo aceptado internacionalmente con arreglo a la norma ISO 5725:1994 o al protocolo armonizado AOAC/UIQPA. En esta área, podría surgir la

necesidad de adoptar una validación formal por parte de un laboratorio único como medida provisional en caso de no que no existieran datos de ensayos en colaboración. Sin embargo, los métodos utilizados para el análisis de secuencias y proteínas de ADN deben poderse aplicar en muchos laboratorios.

De acuerdo a la NMX-EC-17025-IMNC-2006 (punto 5.4.5) la validación es la confirmación, a través del examen y aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

La validación formal de un método representa la conclusión de un proceso largo que comprende los siguientes pasos principales:

-Validación previa del método. La validación previa debería realizarse caso por caso, en función de las necesidades. La validación previa debe garantizar que un método tiene un rendimiento que permite alcanzar el éxito, es decir, la validación previa debe proporcionar pruebas de que el método resulta adecuado para la finalidad prevista. La validación previa debe realizarse de preferencia con la participación de 2-4 laboratorios. Deben realizarse análisis estadísticos (por ejemplo, de la “repetibilidad” y la “reproductibilidad”) en función del procedimiento de validación que vaya a utilizarse posteriormente.

-Validación del método. La validación mediante un ensayo en colaboración es una tarea cara y, normalmente, sólo se realiza una vez que el método ha demostrado tener un rendimiento aceptable en un único laboratorio y en un estudio de validación previa.

2.10 Medición de la incertidumbre y trazabilidad

Para el análisis de OGM, tanto en semillas como en matrices alimenticias, últimamente la atención se ha ido enfocando en los ensayos de trazabilidad basados en el ADN. Éstos presentan varias ventajas respecto a aquellos basados en la identificación de proteínas, debido principalmente a la mayor estabilidad estructural del ADN a altas temperaturas (el ADN permanece normalmente estable en el rango de temperaturas utilizado para procesar los alimentos, y suele obtenerse en cantidad y calidad suficientes como para ser analizado posteriormente), y a la posibilidad de permitir una identificación absolutamente precisa mediante el secuenciado nucleotídico (Lockley, A. and Bardsley, R. , 2000).

El conocimiento y la expresión de la incertidumbre de mediciones constituyen una parte indisoluble de los resultados de las mediciones y es un elemento indispensable en la

trazabilidad de las mediciones. La incertidumbre medida se define como un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se considera. (NMX-Z005-IMNC-2009).

2.11 Materiales de referencia certificados

Los materiales de referencia certificados (MRC) son materiales con una o más propiedades que han sido suficientemente cuantificadas para que puedan utilizarse en la calibración de métodos de análisis (FAO. 2012) emitidos por dependencias metrológicas que proveen de trazabilidad en las mediciones.

La disponibilidad de adecuados materiales de referencia certificados adecuados es un requisito fundamental para cada método de detección. Cada OGM requiere material de referencia específica. Materiales de referencia apropiados para los controles positivos y negativos constituyen la base para la validación de procedimientos analíticos y de evaluación de la eficacia de los métodos y laboratorios. El gen de referencia es preferiblemente un gen con una copia única conocida y una secuencia de ADN estable en todas las variedades de la especie (Miraglia *et al* 2004). Los materiales de referencia deben ser independientes de los métodos analíticos utilizados y deben centrarse en las materias primas o ingredientes de base y no en los productos finales (Demandas del sector 2011-9).

Actualmente no existen patrones nacionales que garanticen la calidad del resultado de medición para la evaluación del contenido de eventos de modificación genética en las distintas matrices de interés nacional como el maíz e incluso a nivel internacional la disponibilidad es limitada y altamente costosa. Aunado a lo anterior, existen en nuestro país desarrollos biotecnológicos propios que no están disponibles comercialmente en el extranjero como es el caso del trigo OGM y para cuales se requerirá desarrollar los correspondientes patrones nacionales.

Uno de los proveedores más importantes en el extranjero de algunos MRC en materia de OGM es el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) de la Comunidad Europea, motivo por el cual se demanda contar con esta capacidad nacional, con la finalidad de que los laboratorios de la red de medición y monitoreo de OGM cuenten con los MRC que necesitan, ya que los MRC actualmente disponibles están acordes con la normatividad Europea (Demandas del sector 2011-9)

3. Objetivo general

Cuantificar mezclas del material GM con el evento MON810 en tejido vegetal (hoja de maíz) por medio de la técnica de dPCR.

3.1 Objetivos particulares

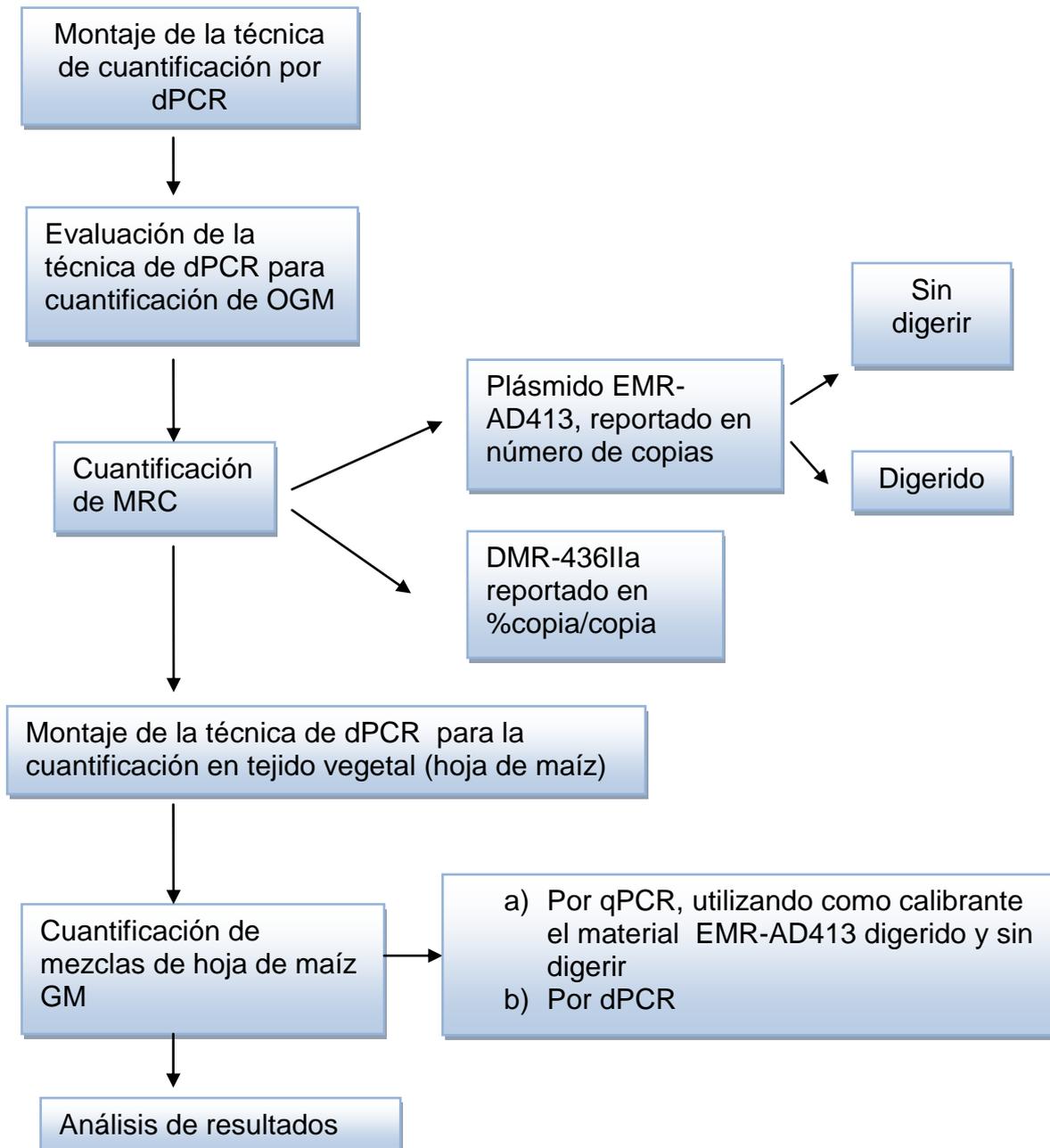
- Montar la técnica de dPCR en la plataforma Open Array
- Evaluar los resultados de la cuantificación de materiales de referencia certificados (MRC); ERM-AD413 y DMR-436IIa, a través de la técnica de dPCR y compararlos con lo reportado en el certificado de dichos materiales.
- Montar la técnica de cuantificación de OGM en tejido vegetal por dPCR.
- Cuantificar mezclas GM en %cp/cp con el evento MON810 con respecto a *hmg* de tejido vegetal (hoja de maíz) por medio de la técnica de dPCR.
- Comparar los resultados obtenidos de la cuantificación del evento MON810 de mezclas GM a partir de la técnica de qPCR y d PCR.

3.2 Hipótesis

La cuantificación de mezclas de material GM por dPCR reportará un valor comparable al obtenido por qPCR

4. Metodología

4.1 Diagrama de estrategia experimental



4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Descripción del material de referencia ERM-AD413

El material de referencia certificado EMR-AD413 consiste de un plásmido que contiene un fragmento de 170pb de MON810 5' unido al promotor 35s y un fragmento de 351pb del gen endógeno de maíz *high mobility group (hmg)* con relación 1:1 de ambas secuencias. En la Figura 18 se observa que el plásmido contiene dos sitios de restricción para EcoRI.

Este material fue certificado por; Joint Research Centre (JRC) –IRMM. La solución stock tiene una concentración de 2×10^6 copias/ μ L (IRMM, 2007)

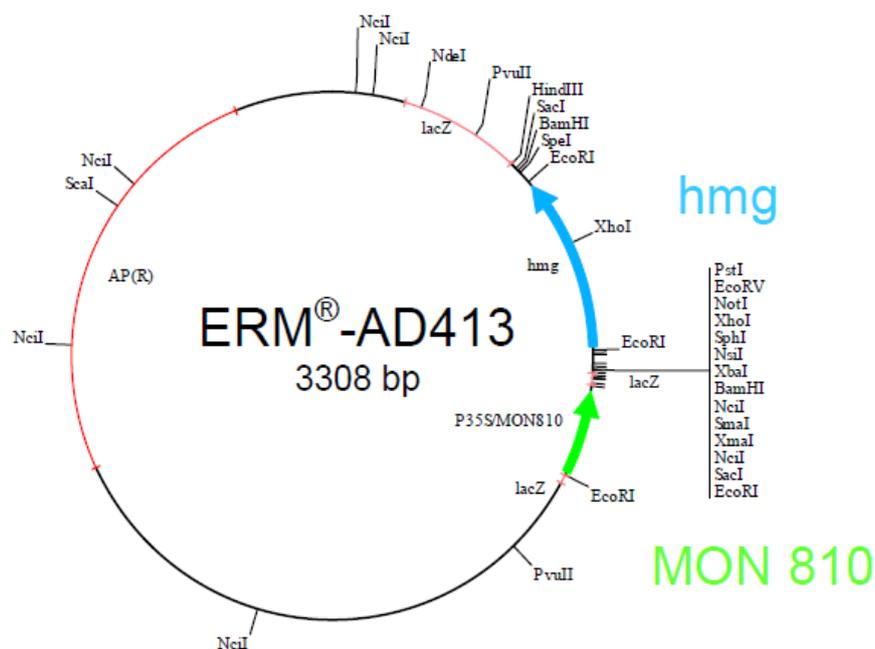


Figura 18. Mapa circular de ERM-AD413 representando en color verde a un fragmento de 170pb de la secuencia MON810 unido al promotor 35S y un fragmento de 351 pb del gen endógeno de maíz (*hmg*) (IRMM, 2007)

4.2.2 Diluciones del material ERM-AD-4713

Se realizaron diluciones, de acuerdo al protocolo de dilución del plásmido (IRMM, Certificado de análisis ERM-AD413) seguido por diluciones, con factor de 1:10, tal que se obtuviera la concentración requerida en los ensayos (qPCR o dPCR), y como se muestra en la Figura 19.

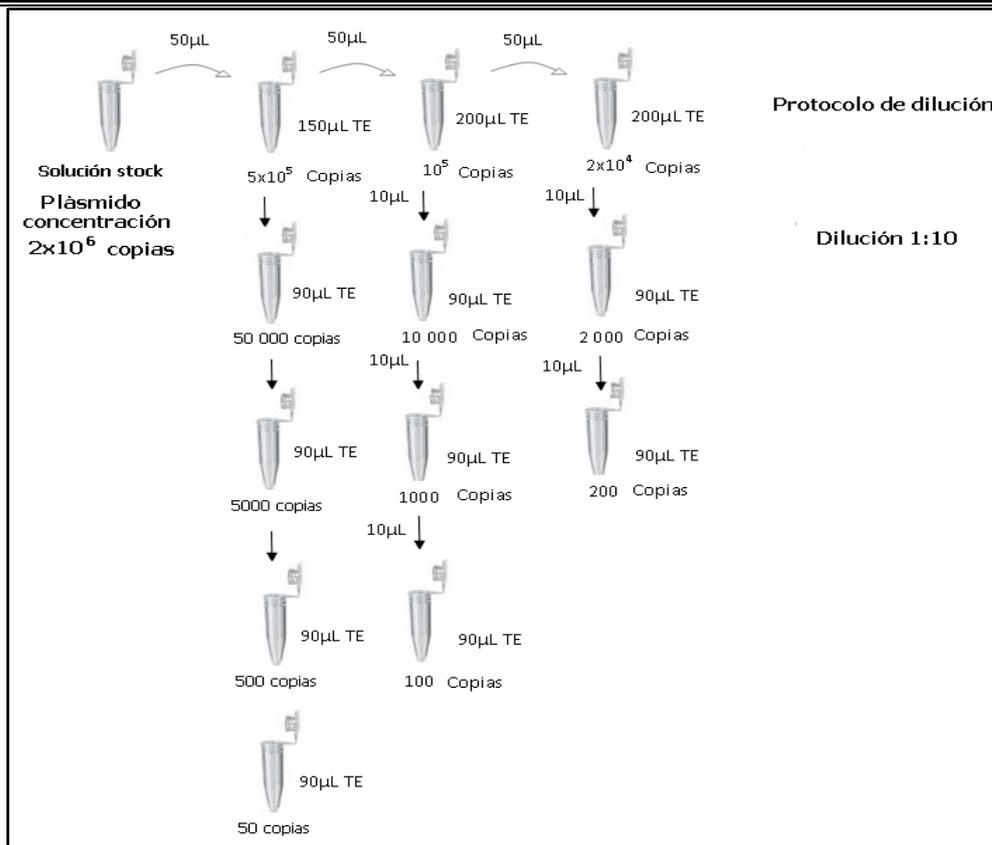


Figura 19. Diagrama de diluciones volumétricas realizadas para obtener las concentraciones nominales deseadas a partir de la solución stock del material ERM-AD413.

4.2.3 Digestión del plásmido y elaboración de diluciones

Una cantidad de 50.2 mg de la solución stock del plásmido EMR-AD413 fue digerida con 1.1 mg de la enzima de restricción EcoR1 de la marca Fermentas, 18.5 mg de buffer y 133.3 mg de H₂O libre de nucleasas, incubada en un termoblock a 65°C/10min e inactivada por incubación a 80°C/10min.

La solución digerida representa la primera dilución de acuerdo al protocolo del plásmido. Se elaboraron diluciones de acuerdo al punto 4.2.2 para obtener concentraciones nominales de 100 y 200 copias.

4.2.4 Descripción del material de referencia DMR-436IIa

Es una harina de maíz utilizado como control positivo del evento MON810, con una concentración de 37.35 %copia/copia del evento MON810 con respecto a la secuencia endógena de maíz (*hmg*). Este material fue certificado por el Centro Nacional de Metrología (CENAM) de México (CENAM. 2011).

4.2.5 Extracción de ADN del material de referencia certificado DMR-436IIa.

La extracción del MRC DMR-436IIa, la cual es una harina, fue realizada por duplicado con el Kit de extracción comercial de Genetic ID, basado en la ruptura celular con detergentes iónicos, la purificación se da por unión específica del ADN a una membrana de sílica.

Se pesaron 200 mg de la harina y se colocaron en un microtubo de 2 mL, se agregó 1 mL de solución de lisis el cual contiene SDS (dodecil sulfato sódico) como principal componente, el cual lisa las células y solubiliza las proteínas, y 10 μ L de solución de proteínasa K con el objetivo de digerir las proteínas presentes en la muestra. Se mezcló en vortex hasta obtener una solución homogénea y se incubó a 65°C por 1 hora, para alcanzar la temperatura óptima para la acción de la proteínasa K.

Se centrifugó a 10000 rpm por 5 min en microcentrífuga, se tomaron aproximadamente 1000 μ L de sobrenadante y se colocó en un nuevo microtubo con un volumen igual de cloroformo con el fin de desnaturalizar las proteínas presentes, se mezcló en vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min.

Posteriormente se tomaron aproximadamente 1000 μ L del sobrenadante y se colocó en nuevos microtubos con un volumen igual de buffer de unión para permitir al ADN tener mayor afinidad por la columna de sílica, se mezcló en vortex brevemente y 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 para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR, posteriormente se realizaron tres lavados con 800 μ L 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 μ L de buffer 1x TE, el cual permite la liberación del ADN de la columna, se incubó por 15 min a 65°C. Se centrifugó a 10000 rpm por 3 min y se repitió la adición de 50 μ L de buffer 1x TE y la incubación. Tras la centrifugación final, se obtuvo un volumen de 100 μ L de solución (ADN en buffer 1xTE).

4.2.6 Medición y estandarización de la concentración de ADN

Para conocer la concentración de ADN se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) el cual registra la concentración de las mismas en ng/ μ L.

Aquellas muestras con una concentración menor a 50 ng/ μ L se concentraron utilizando el concentrador de ADN (Genevac), basado en la evaporación de agua de las muestras y aquellas que resultaron una concentración mayor se les adicionó la cantidad de agua suficiente, de acuerdo a la formula $C_1V_1=C_2V_2$, para obtener la concentración deseada (50 ng/ μ L).

4.2.7 Elaboración de diluciones del MRC DMR-436IIa

Se realizaron diluciones seriales del DMR-436IIa y de la muestra de ADN hoja de maíz, tal como se muestra en la Figura 20, para obtener la concentración de 0.5 y 0.05 ng/ μ L, y debido a que se colocan 2 μ L de la solución de ADN genómico finalmente se cargaron 0.1 y 1 ng por subarreglo de la placa Open Array de dPCR.

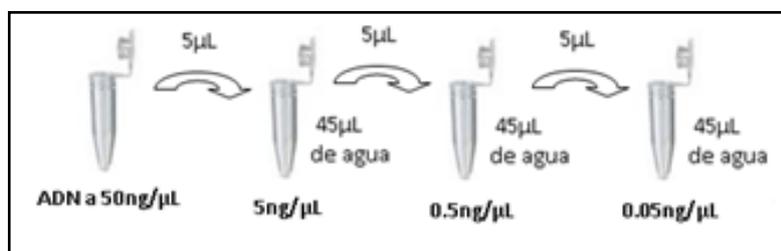


Figura 20. Diagrama de cantidades volumétricas añadidas para obtener las cantidad deseada de ADN a partir de la solución a 50ng/ μ L

4.2.8 Cuantificación de material genéticamente modificado por dPCR

El fabricante del equipo Open Array ha establecido que la cantidad óptima por reacción a cuantificar en el equipo es de 0.6 a 1.6 copias (por reacción, en 33nL) de la secuencia blanco, por lo que se realizaron los siguientes cálculos para determinar el número de copias esperadas por reacción para los Materiales de Referencia Certificados (MRC), los cuales se presentan en dos casos.

❖ Caso 1

Material DMR AD-413, del cual, al ser DNA plasmídico, se conoce directamente el número de copias totales de la secuencia a cuantificar (MON810), reportado en su respectivo certificado.

Se coloca 1 µL de solución con una concentración nominal de 100 copias de la secuencia MON810 en volumen total de 5 µL por subarreglo (Tabla 3) y el equipo Accuffil carga 33 nL de la solución a cada pozo del subarreglo en la placa Open Array™, se esperan 0.66 copias de MON810 por cada reacción, es decir, en 33 nL (Ecuación 1).

Ecuación 1

$$33\text{nL de solución} \left(\frac{100 \text{ copias de MON810}}{5000\text{nL de solución}} \right) = 0.66 \text{ copias de MON810 en 33 nL}$$

❖ Caso 2

Para el material DMR-436IIa, el cual contiene material genómico, se tomaron en cuenta los siguientes datos y cálculos:

-Tamaño del genoma del maíz= 2046.34 Mb (NCBI. 2012)

-Factor de equivalencia universal 1 pg de ADN= 978 Mb

- Se coloca 2 µL de solución de ADN

1. Conociendo el tamaño del genoma en Megabases (Mb) de la especie a analizar, se convierte el dato a pg de ADN y posteriormente a ng de ADN.

Ecuación 2

$$2046.34 \text{ Mb} \left(\frac{1 \text{ pg de ADN}}{978 \text{ Mb}} \right) = 2.09 \text{ pg de ADN por genoma}$$

Ecuación 3

$$2.09\text{pg de ADN} \left(\frac{1 \times 10^{-3} \text{ ng}}{1 \text{ pg}} \right) = 2.09 \times 10^{-3} \text{ ng de ADN por genoma}$$

-
2. Se toma en cuenta la cantidad de ADN colocada por pozo (5 μL de solución) en la placa de 384 pozos, por ejemplo 1 ng, y considerando que hay una copia del gen endógeno de la especie por genoma, en este caso *hmg*, se realiza el siguiente cálculo:

Ecuación 4

$$1 \text{ ng} \left(\frac{1 \text{ copia de } hmg}{2.09 \times 10^{-3} \text{ ng}} \right) = 477.93 \text{ copias de } hmg \text{ por ng de ADN}$$

3. Las copias calculadas se encuentran en 5 μL (5000 nL) de solución o mezcla de reacción. Sin embargo en cada pozo de la placa Open Array™ se cargan 33 nL (una reacción) , por lo que se esperan 3.15 copias por reacción, tal como se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 5

$$33 \text{ nL de solución} \left(\frac{477.93 \text{ copias de } hmg}{5000 \text{ nL de solución}} \right) = 3.15 \text{ copias de } hmg \text{ en } 33 \text{ nL}$$

4. Considerando que la concentración de la secuencia transgénica, en este caso MON810, con respecto a la secuencia endógena (*hmg*) en el material es del 37.37%, se realiza el siguiente cálculo:

Ecuación 6

$$37.37\% \left(\frac{3.15 \text{ copias}}{100\%} \right) = 1.18 \text{ copias de MON810 en } 33 \text{ nL}$$

De acuerdo al cálculo anterior, para la solución con una concentración de 0.1 ng/ μL se esperan 0.32 copias de *hmg* y 0.12 copias de MON810 por reacción.

La cuantificación se llevó a cabo en la plataforma Open Array de Applied Biosystems, utilizando mezcla de enzima, amortiguador y nucleótidos, también llamada master mix, cebadores y sondas TaqMan®. En la Tabla 2, se muestra la secuencia de la sonda y los iniciadores utilizados en las reacciones de dPCR. (European Commission, 2006) con la concentración que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores y sondas para las secuencias a cuantificar

Secuencia blanco	Nombre del Iniciador o Sonda	Secuencia de oligonucleótido ADN
Gen endógeno de maíz (<i>hmg</i>)	IF: (ZM1-F)	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'
	IR: (ZM1-R)	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'
	S: (ZM1)	5'-FAM*—CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-TAMRA**-3'
Secuencia E.E. (MON810)	IF: (Mail-F1)	5'-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT-3'
	IR: (Mail-R1)	5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'
	S: (Mail-S2)	5'-FAM*-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-TAMRA** P-3'

*FAM: 6-carboxilfluoresceína

**TAMRA: 6-carboxitetrametilrodamina

En la Tabla 3 se muestran los volúmenes utilizados para la elaboración de las diferentes soluciones conteniendo; DNA plasmídico, DNA genómico o un NTC (Not Template Control, con la adición de agua reemplazando al ADN), este último servirá para eliminar sospecha de contaminación y, por lo tanto, descartar la sobreestimación de los resultados emitidos por dPCR.

Tabla 3. Volumen y concentración de reactivos de dPCR

Reactivo	Conc. Inicial	Vol. por sub-arreglo	Vol. para 12 subarreglos		Vol. para 5 sub-arreglos (Ntc)
			DNA genómico	DNA plasmídico	
Agua	-	-	-	12	10
Master Mix	2x	2.5	30	30	12.5
Cebador sentido	10nM	0.15	1.8	1.8	0.75
Cebador antisentido	10nM	0.15	1.8	1.8	0.75
Sonda	5nM	0.2	2.4	2.4	1
ADN	-	Cbp para la reacción	24	12	-
Vol. total		5	60	60	25

Se distribuyeron 5 µL de la mezcla de reacción (mezcla con ADN) en 11 pozos de la fila A de la placa de 384 pozos y en el último pozo por fila se coloca la mezcla con agua como se muestra en la Figura 13, lo mismo se hizo para las siguientes tres filas.

Con ayuda del sistema Accufill™, se trasladó la mezcla de reacción contenida en cada pozo de la placa de 384 pozos a la placa Open Array previamente atemperada (4°C), colocando aproximadamente 33 nL de la solución en cada pozo de la placa Open Array™.

Una vez cargadas, se guardaron en un cassette, previamente llenado con líquido de inmersión hasta las tres cuartas partes de la capacidad del mismo.

Se aseguró que el líquido de inmersión cubriera el chip, el resto del cassette fue llenado con un polímero sellador que posteriormente se solidificó poniendo en luz ultravioleta 3 minutos por cada lado del cassette.

Se creó el archivo de cada placa (plate setup file) con extensión tpf y un archivo en formato cvs, los cuales permiten identificar a las muestras en las placas Open Array™, se colocaron las placas en el termociclador y se procedió a comenzar la corrida de acuerdo al manual de entrenamiento Open Array®. El termociclado se llevó por 40 ciclos con el tiempo y temperaturas mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de termociclado para los equipos de Applied Biosystems

	Tiempo	Temperatura	Repeticiones
Pre-calentamiento	94°C	9 min	1
Amplificación	95°C	20 seg	40
	60°C	60 seg	
	72°C	30seg	

Para la obtención de datos se exportó el archivo de cada corrida desde el software Open Array® Real-Time PCR System al software del Open Array® Digital PCR de acuerdo al manual de entrenamiento del Open Array. El software despliega los resultados analizados, los cuales incluyen:

-Heat Map Tab (Mapas de amplificación): Despliega los datos analizados de las placas Open Array cargadas para el análisis.

-Results Tab: Despliega los datos analizados de los archivos cargados, incluye; Promedio de copias por reacción, cota inferior y superior atribuido al resultado con un nivel de confianza del 95%, total de replicas (reacciones que fueron tomadas en cuenta para el análisis), total de reacciones negativas (reacciones donde no hubo amplificación) y total de reacciones omitidas (reacciones que el equipo consideró omitir por cuestiones de cargado.

4.2.9 Obtención de mezclas GM de hojas de maíz

A partir del permiso de liberación al ambiente 094/2010, se recolectaron aleatoriamente 51 hojas de maíz del cultivo GM, el cual se describe a continuación:

Solicitud: 094/2010	Municipios: campos de agricultores cooperantes del estado de Chihuahua
Fecha de solicitud: 23/11/2010	Sitio de liberación: Regiones de Ahumada y Cuauhtémoc
Promovente: PHI México, S.A. de C.V.	Extensión autorizada (hectáreas): 0.0384
Evento: MON-00810-6	Fecha de resolución: 11/05/2011
Organismo: <i>Zea mays</i> L.	Tipo de liberación: Experimental
Nombre: Maíz	Ciclo agrícola: primavera-verano 2011
Fenotipo adquirido: para la protección contra algunos insectos Lepidópteros	Superficie sembrada (hectáreas): 0.018
Estado: Chihuahua	

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

Las hojas de maíz fueron analizadas una a una para ser clasificadas como GM o no GM (convencionales). Se realizó el corte de cada una de las puntas de las hojas recolectadas para posteriormente realizar su análisis por qPCR para la identificación de la presencia o ausencia del evento MON810 en cada una de ellas.

Se liofilizaron y elaboraron mezclas gravimétricas con concentraciones de 100%, 10%, 1% y 0.1% en relación al contenido de hoja GM.

Las mezclas fueron extraídas utilizando el Kit de extracción Genetic ID (punto 4.2.5). Se midió y estandarizó la concentración de ADN de acuerdo al punto 4.2.6.

Los resultados de la identificación de las hojas GM y no GM, así como de las mezclas realizadas, no se muestran en el presente trabajo debido que fueron realizadas en paralelo con otro estudio de Tesis en el CNRDOGM.

4.2.10 Elaboración de diluciones de las mezclas GM para su cuantificación por dPCR

Para la hoja convencional y las mezclas GM se realizaron diluciones seriales con factor de dilución 1:10 a partir de la solución estandarizada a 50 ng/ μ L hasta llegar a las

concentraciones requeridas (Tabla 5) para obtener un número de copias aproximado al que establece el fabricante del equipo Open Array, el cual es de 0.6 a 1.6 copias.

Tabla5. Concentraciones de las soluciones a cuantificar para hoja GM y la mezcla 10%GM

Material	Concentración requerida (ng/μL) de la secuencia cuantificada	
	<i>hmg</i>	MON 810
Hoja de maíz	0.5	0.5
Mezcla 10%GM		5
Mezcla 1%		50 (sin dilución)
Mezcla 0.1%		50 (sin dilución)

4.2.11 Análisis estadístico de los resultados por dPCR

-Para el MRC ERM AD-413 (plásmido)

El equipo Open Array, una vez terminada la corrida de termociclado, proporciona el promedio de copias por reacción en cada subarreglo (compuesto por 64 reacciones) y de igual forma el intervalo de confianza (cotas) de dichos resultados. Se procedió a calcular el promedio de copias y de los intervalos de confianza en el total de subarreglos destinados a la cuantificación de la secuencia blanco, en este caso 44 subarreglos.

-Para el MRC DMR-436IIa (harina de maíz)

Se calculó el promedio de copias por reacción de los 22 subarreglos destinados a la cuantificación de la secuencia blanco.

Se procedió a aplicar la siguiente ecuación

Ecuación 7

$$\%OGM = \frac{\text{numero de copias de MON810}}{\text{numero de copias de } hmg} \times 100$$

El resultado de la ecuación anterior permite comparar el resultado con el reportado en su respectivo Certificado de Referencia.

-Para la hoja GM y las mezclas GM (tejido vegetal)

Se calculó el promedio del número de copias por fila (11 subarreglos) de las placas Open array, se realizó el cociente expresado en la Ecuación 1 entre la primera fila de la placa con el evento MON810 y la primera fila de la placa con la secuencia endógena *hmg*. Para

las mezclas 10% y 1% en las que fue necesario cuantificar las secuencias en diferente dilución, se aplicó el factor de dilución correspondiente para realizar el cociente a la misma concentración de ADN.

La estimación de la incertidumbre asociada al mensurando se obtuvo a partir de la distribución estadística de los resultados, esta se caracteriza mediante la desviación estándar de los resultados, haciendo uso de las siguientes ecuaciones:

Ecuación 8

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

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 y reproducibilidad

Al no ser necesario el uso de un material de referencia para la cuantificación $u(C_{ref})^2$ no contribuye al cálculo, por lo que:

Ecuación 9

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

Donde:

u(RSD_{IP}): Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

SD: promedio de la desviación estándar de la medición

n: número de repeticiones a la medición

Para obtener la incertidumbre expandida se hace uso de la siguiente ecuación.

Ecuación 10

$$U = (uc)k$$

Donde:

U : Incertidumbre expandida

uc : Incertidumbre típica combinada

k : factor de cobertura (igual a 2 representado por un intervalo de confianza del 95%)

Por último, la incertidumbre relativa es obtenida del cociente entre la incertidumbre expandida y el promedio en porcentaje de OGM, como se muestra en la Ecuación 11.

Ecuación 11

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

Donde:

$-U_{\text{Relativa}}$: es la incertidumbre relativa de la medición

$-U$: Incertidumbre expandida

$-x$: es el promedio en % de OGM de cada medición

4.2.12 Cuantificación de la hoja GM y sus mezclas por PCR tiempo real

Se construyó una curva de calibración con concentraciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 y 100 copias a partir de la solución stock del MRC ERM-AD413 tanto para la secuencia endógena (*hmg*) como para la secuencia transgénica (MON810), primero por volumetría, partiendo del plásmido sin digerir y en un segundo ensayo por gravimetría a partir del plásmido digerido. Se realizó la corrección en la concentración por gravimetría tomando en cuenta los valores reales de DNA y la solución diluyente (solución amortiguadora TE) añadidos a cada dilución para obtener el número de copias reales. A partir de estas curvas se cuantificó el porcentaje de secuencia transgénica en relación con la secuencia endógena en la mezcla de maíz denominada 100%.

La cuantificación se realizó en un equipo de PCR tiempo real ViiATM7 de Applied Biosystems usando mezcla de enzima, amortiguador y nucleótidos, cebadores y sondas TaqMan®, cada muestra se analizó por cuadruplicado para cuantificación de las secuencias de interés (evento específico MON 810 y el gen endógeno *hmg*), cada celda

contenía los reactivos necesarios para una reacción mostrados en la Tabla 6, llegando a un volumen final de 20 µL. Se incluyeron controles negativos que incluían una secuencia de otra planta diferente a *Zea mays* y un NTC

Tabla 6. Concentración de los componentes para las reacciones de PCR en tiempo real

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Volumen para 20 µL
Agua	--	--	6.1 µL
Master mix	2X	1X	10 µL
Cebador sentido	10 µM	300 nM	0.6 µL
Cebador antisentido	10 µM	300 nM	0.6 µL
Sonda	5 µM	180 nM	0.7 µL
ADN molde	--	100 ng	2 µL
Volumen Final			20 µL

Las condiciones de termociclado fueron las presentadas en la Tabla 4 por 40 ciclos.

4.2.13 Curva de calibración gravimétrica a partir del plásmido digerido para su uso en qPCR

Para la curva de calibración realizada gravimétricamente, se cálculo del número de copias reales en cada dilución de la siguiente manera:

Factor de dilución (FD): de acuerdo al protocolo de dilución del plásmido: (mg buffer/mg ADN+1), para el resto de las diluciones: (mg buffer/mg ADN)

Copias en la dilución: Concentración precedente/FD

Copias en la reacción de PCR: ((concentración de la dilución*mg de DNA añadidos a la reacción)/6)

4.2.14 Análisis estadístico de los resultados por qPCR

Para obtener la concentración de OGM de las mezclas de hoja en porcentaje se aplicó la siguiente ecuación a partir de los resultados obtenidos.

Ecuación 12

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

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.

Tomando en consideración que esta técnica utiliza como calibrante el EMR AD-413, el cual reporta en su certificado de referencia una incertidumbre expandida de 0.06, se hizo uso de la Ecuación 11 para determinar la incertidumbre relativa asociada a las mediciones.

5. Resultados y discusión

5.1 Cuantificación de la secuencia E.E. MON810 en el plásmido EMR-AD413 sin digerir por dPCR

Para evaluar la respuesta de la técnica de dPCR en la cuantificación de secuencias GM, se realizó la evaluación de materiales cuya concentración tanto de secuencias GM, como de secuencias endógenas, fueron certificadas por una institución metrológica, se cuantificó el evento MON810 en el material EMR-AD413, expresado en número de copias.

Como ya se mencionó en el apartado de metodología (punto 4.2.8), el fabricante del equipo Open Array ha establecido que la cantidad óptima por reacción (33nL) a cuantificar en dicho equipo es de 0.6 a 1.6 copias de la secuencia blanco, por lo que se realizaron diluciones seriales a partir de la solución stock del plásmido, con una concentración nominal de 2×10^6 copias de la secuencia MON810, para que el número de copias a cuantificar se encontraran cercanas del rango óptimo establecido por el fabricante; se cuantificaron soluciones con concentraciones nominales de 100, 200 y 400 copias de la secuencia MON810.

En la Figura 21, se ilustra gráficamente la amplificación de la secuencia E.E. (evento específico) MON810 contenida en el plásmido, en la cual se observa que a mayor concentración nominal, es mayor número de particiones (reacciones) con amplificación positiva (representada en color naranja), así mismo en la cantidad de curvas de amplificación generadas.

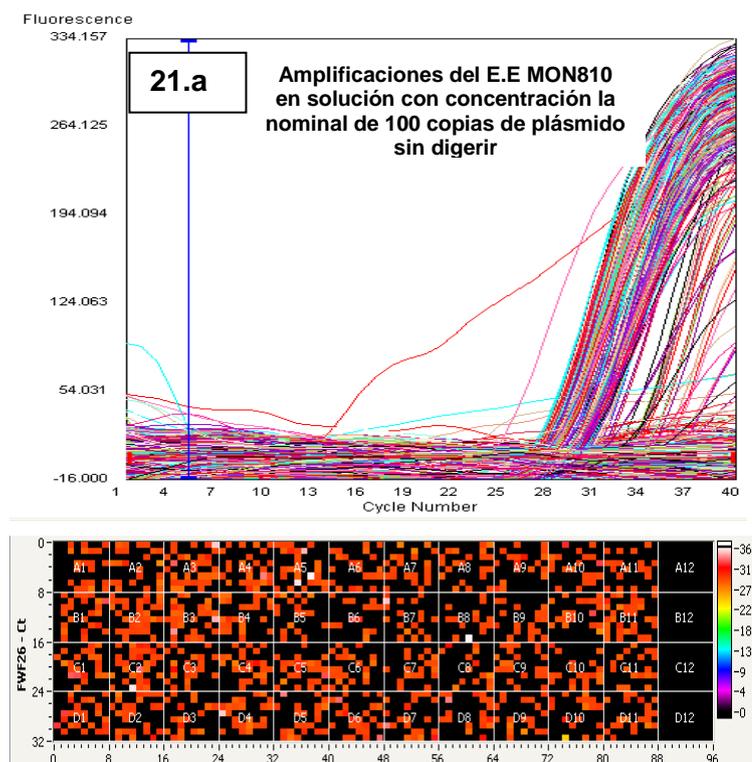


Figura 21. Curvas y mapas de amplificación de la secuencia E.E. MON810 a partir del plásmido sin digerir, con concentraciones nominales de 100 copias (21.a), 200 copias (21.b), y 400 copias (21.c)

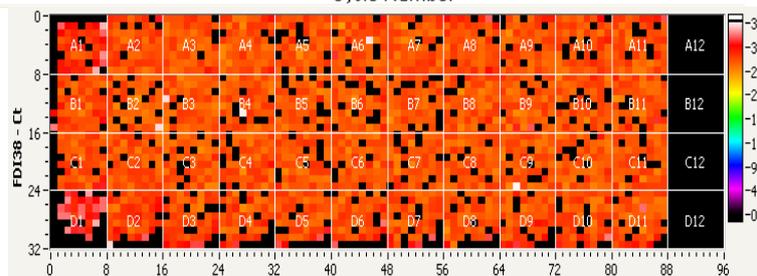
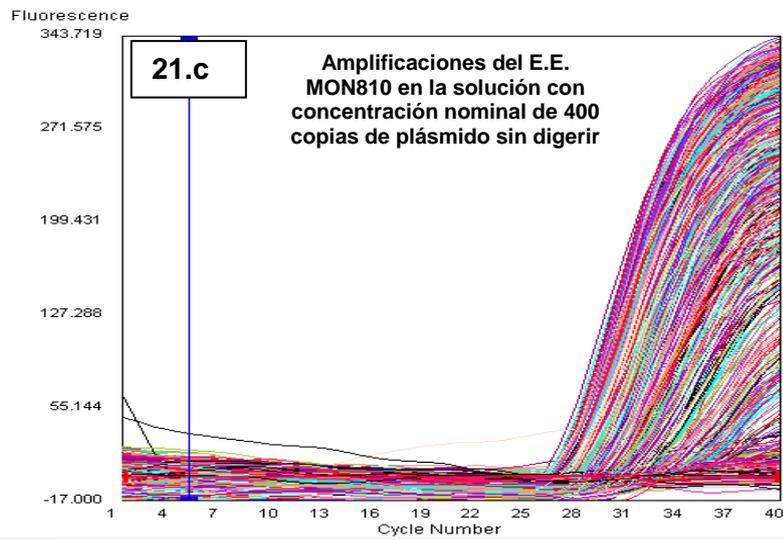
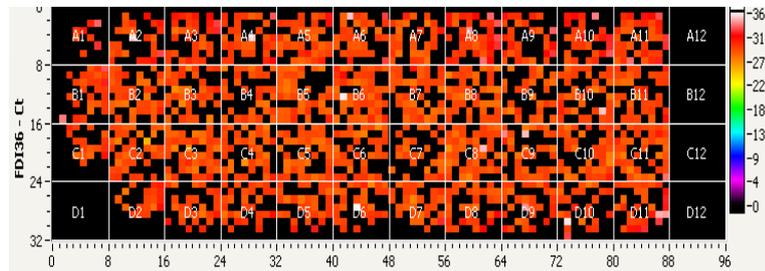
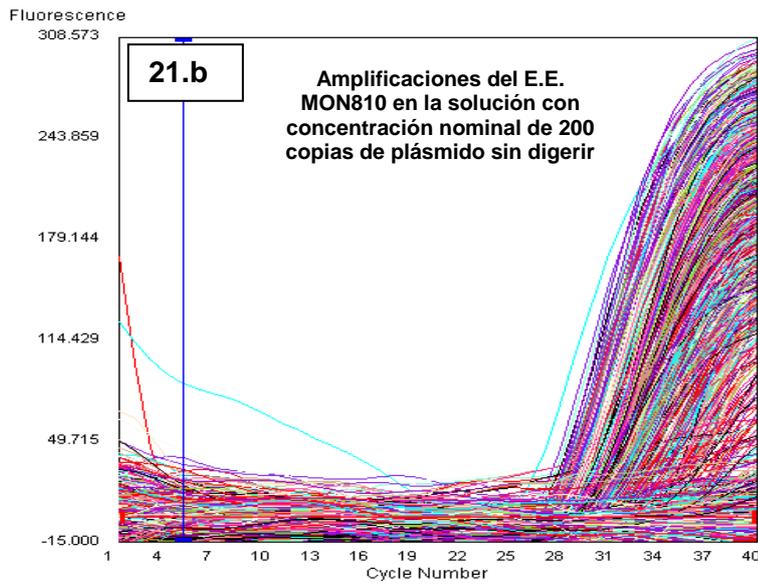


Figura 21 (continuación). Curvas y mapas de amplificación de la secuencia E.E. MON810 a partir del plásmido sin digerir, con concentraciones nominales de 100 copias (21.a), 200 copias (21.b) y 400 copias (21.c)

Los NTC son un control de reactivos para descartar la contaminación de los mismos, y sirven para descartar la posibilidad de la sobreestimación de los resultados obtenidos. La última columna de cada subarreglo fue destinada a dicho control. Se observa que todos ellos están libres de amplificaciones, por lo tanto no existe contaminación de los reactivos ni sobreestimación del número de copias obtenidas por esta causa.

Se observa en el mapa de amplificación de la Figura 21.b que en la primera columna y última fila hay un subarreglo donde no hay amplificaciones positivas y este era un subarreglo destinado para la cuantificación, posiblemente debido a que no se colocó mezcla de reacción en la placa de 384 pozos o a que el sistema accuffil no la cargó en la placa Open Array, por lo que, fue omitido en el cálculo.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de las soluciones con concentraciones nominales de 100, 200 y 400 copias en el quipo Open Array, se muestran en la Tabla 7, donde se puede observar que a una mayor concentración nominal, se obtuvo un mayor número de copias por reacción. Debido a que la cuantificación por dPCR es resultado del cálculo por una aproximación estadística de Poisson, significa que, con un 95% de confianza, el valor medido se encuentra entre las cotas inferior y superior del resultado obtenido.

Tabla 7. Promedio del número de copias por reacción (33nL) obtenidas de la cuantificación de la secuencia E.E.MON810, en el plásmido sin digerir con concentraciones nominales de 100, 200 y 400 copias.

Conc. nominal (# de copias)	Material	No. de copias esperadas	No. de copias obtenidas	Cota inferior	Cota superior	No. de subarreglos considerados
100	EMR-AD413 sin digerir	0.66	0.44	0.29	0.67	44
200		1.32	0.76	0.54	1.07	44
400		2.64	1.96	1.43	2.68	44

De acuerdo a los resultados reportados en la Tabla 7 para la solución con concentración nominal de 100 copias se esperaban 0.66 copias por reacción y el resultado obtenido es de 0.44 copias con una cota inferior de 0.29 copias y una cota superior de 0.67 copias, por lo que el valor esperado se encuentra por debajo de este último valor. Lo mismo sucede para la solución con concentración nominal de 400 copias, es decir, el valor esperado es de 2.64 copias y el obtenido de 1.96 con una cota inferior de 1.96 y una cota superior de 2.68.

Por lo que, de la cuantificación de las soluciones de 100 y 400 copias, se obtienen resultados satisfactorios

Para la solución con concentración nominal de 200 copias, el número de copias esperadas es de 1.32 copias por reacción y el valor obtenido fue de 0.76 con una cota inferior de 0.54 y una cota superior de 1.07, por lo que, el valor obtenido no involucra al valor esperado dentro de las cotas del resultado obtenido. En este ensayo se aprecia la subestimación del número de copias presentes en la solución, sin embargo el número de copias esperadas esta dentro del rango optimo a cuantificar establecido, por lo que, el resultado se podría atribuir a errores de pipeteo o a condiciones ambientales que pudieran afectar el experimento, tales como: temperatura, ya que al trabajar con volúmenes muy pequeños el tener una alta temperatura podría favorecer la evaporación de la muestra, esto mismo podría suceder si el tiempo de guardado de a placa Open Array en el cassette es muy prolongado (mayor a 90 segundos). Debido a lo anterior, se recomienda que al realizar este tipo de ensayos se tenga especial cuidado en las condiciones en las que se realiza el experimento.

Publicaciones anteriores sugieren que para el uso de material plasmídico y genómico en dPCR, la eficiencia de amplificación es mejorada tras la digestión del DNA en fragmentos intactos más pequeños (Burns, M. y Burrell, A., 2010). Por ello, se procedió a digerir el DNA plasmídico EMR-AD413 con la enzima de restricción EcoR1, ya que de acuerdo a la Figura 18, presentada en la sección de marco teórico punto 4.2.1, el plásmido posee dos sitios de restricción para dicha enzima. Se obtuvieron dos fragmentos de interés; uno de 170pb de MON810 5' unido al promotor 35S y un fragmento de 351pb del gen endógeno de maíz *hmg*. No existe resultado gráfico de la digestión ya que la concentración del plásmido digerido es muy pequeña y, por ello, no es posible observarlo en un gel de agarosa.

5.2 Cuantificación de la secuencia E.E. MON810 en el plásmido EMR-AD413 digerido por dPCR

Se elaboraron las diluciones descritas en el apartado de metodología, hasta obtener concentraciones nominales de 50, 100 y 200 copias de la secuencia de interés a partir del plásmido digerido.

En la Figura 22 se puede observar gráficamente la amplificación de las reacciones de dPCR para el E.E. MON810 en el plásmido tras su digestión con EcoR1, con las

concentraciones nominales de 50 copias (22.a), 100 copias (22.b) y 200 copias (22.c). Se puede observar que la cantidad de pozos con amplificación positiva es directamente proporcional a la concentración nominal de las soluciones. También se puede observar la no amplificación de los subarreglos control (NTC), asegurando la no sobreestimación del resultado obtenido

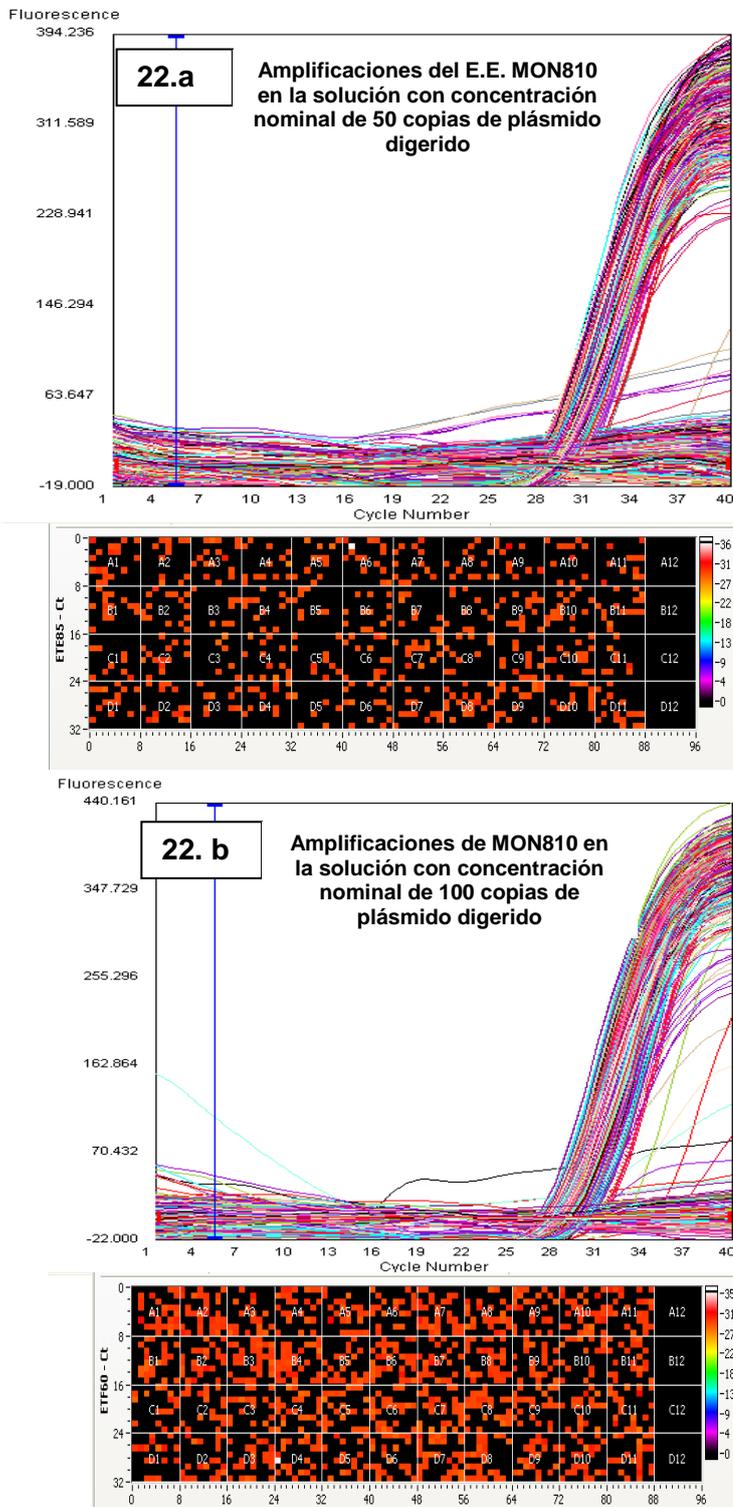


Figura 22. Mapas de amplificación del E.E. MON810 a partir del plásmido digerido con la enzima Eco R1, con concentraciones nominales de 50 copias (22.a) 100 copias (22.b) y 200 copias (22.c).

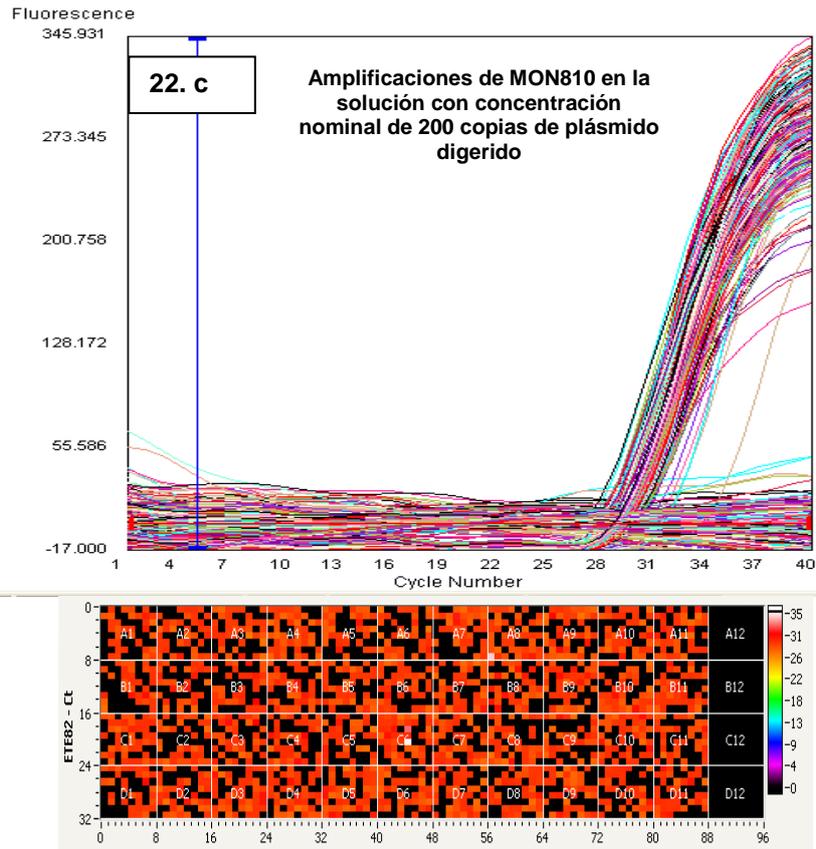


Figura 22 (continuación). Mapas de amplificación del E.E. MON810 a partir del plásmido digerido con la enzima Eco R1, con concentraciones nominales de 50 copias (22.a) 100 copias (22.b) y 200 copias (22.c).

La cuantificación de una concentración nominal de 50 copias se realizó con el propósito de observar si el resultado de cuantificación mejoraba con un menor número de copias esperadas por reacción. Sin embargo, al igual que en las cuantificaciones anteriores solo se obtuvo el valor esperado dentro de la cota superior del resultado obtenido (Tabla 8).

Para la solución son una concentración nominal de 100 copias se obtuvo un número de copias por reacción de 0.46 copias con una cota inferior de 0.31 copias y una cota superior de 0.69 copias, el valor esperado se encuentra debajo de la cota superior del resultado obtenido.

Para la solución con concentración nominal de 200 copias no se llega al valor esperado (1.32 copias), el cual está por encima de la cota superior (1.23 copias) del resultado obtenido. Sin embargo este resultado se acerca más al valor esperado que el obtenido tras la cuantificación con plásmido sin digerir.

Al comparar los resultados obtenidos en la cuantificación del plásmido digerido y sin digerir (Tabla 7 y Tabla 8), con ambos tratamientos de la muestra, se obtuvieron valores por debajo de los valores esperados, por lo que el tratamiento de digestión no contribuyó de forma significativa a los resultados obtenidos de la cuantificación de la secuencia E.E. MON810 en estudio.

Tabla 8. Promedio del número de copias por reacción (33nL) obtenidas de la cuantificación de la secuencia MON810 en el plásmido digerido con concentraciones nominales de 50, 100 y 200 copias

Conc. nominal (#de copias)	Material	No. de copias esperadas	No. de copias obtenidas	Cota inferior	Cota superior	No. de subarreglos considerados
50	EMR-AD413 digerido	0.33	0.22	0.13	0.38	44
100		0.66	0.46	0.31	0.69	44
200		1.32	0.89	0.63	1.23	44

5.3 Cuantificación del material de referencia DMR-436IIa por dPCR

Para evaluar la respuesta de la cuantificación de secuencias de interés en DNA genómico por la técnica de dPCR se cuantificó tanto la secuencia GM (E.E. MON810) como la secuencia endógena (*hmg*) del material DMR-436IIa, el cual fue descrito en el apartado de marco teórico en el punto 4.2.4 y reporta una concentración nominal de $37.35\% \pm 1.87\%$ de la secuencia E.E. MON810 con respecto a *hmg*.

Tras la dilución del material DMR-436IIa descrita en el apartado de metodología, punto 4.2.7, se cargaron dos placas Open array con 0.1 y 1 ng de ADN, respectivamente por subarreglo. En una misma placa se cuantificó tanto la secuencia MON810 como *hmg*; 22 subarreglos para cada secuencia blanco y dos subarreglos como control (NTC) con las sondas y cebadores correspondientes a cada secuencia de interés.

En la Figura 23 se puede observar gráficamente la diferencia en la cantidad de pozos positivos para las secuencias amplificadas. Se observa que la cantidad de amplificaciones de la secuencia *hmg* es mayor con respecto a la de MON810, ya que *hmg* representa la secuencia endógena de la especie, en este caso una copia por genoma de maíz. Además de coincidir con lo reportado en el certificado del material. En la placa, para ambas secuencias, no se observa amplificaciones en los subarreglos destinados como controles de reactivos, sin ADN (NTC), asegurando la no sobreestimación de los resultados.

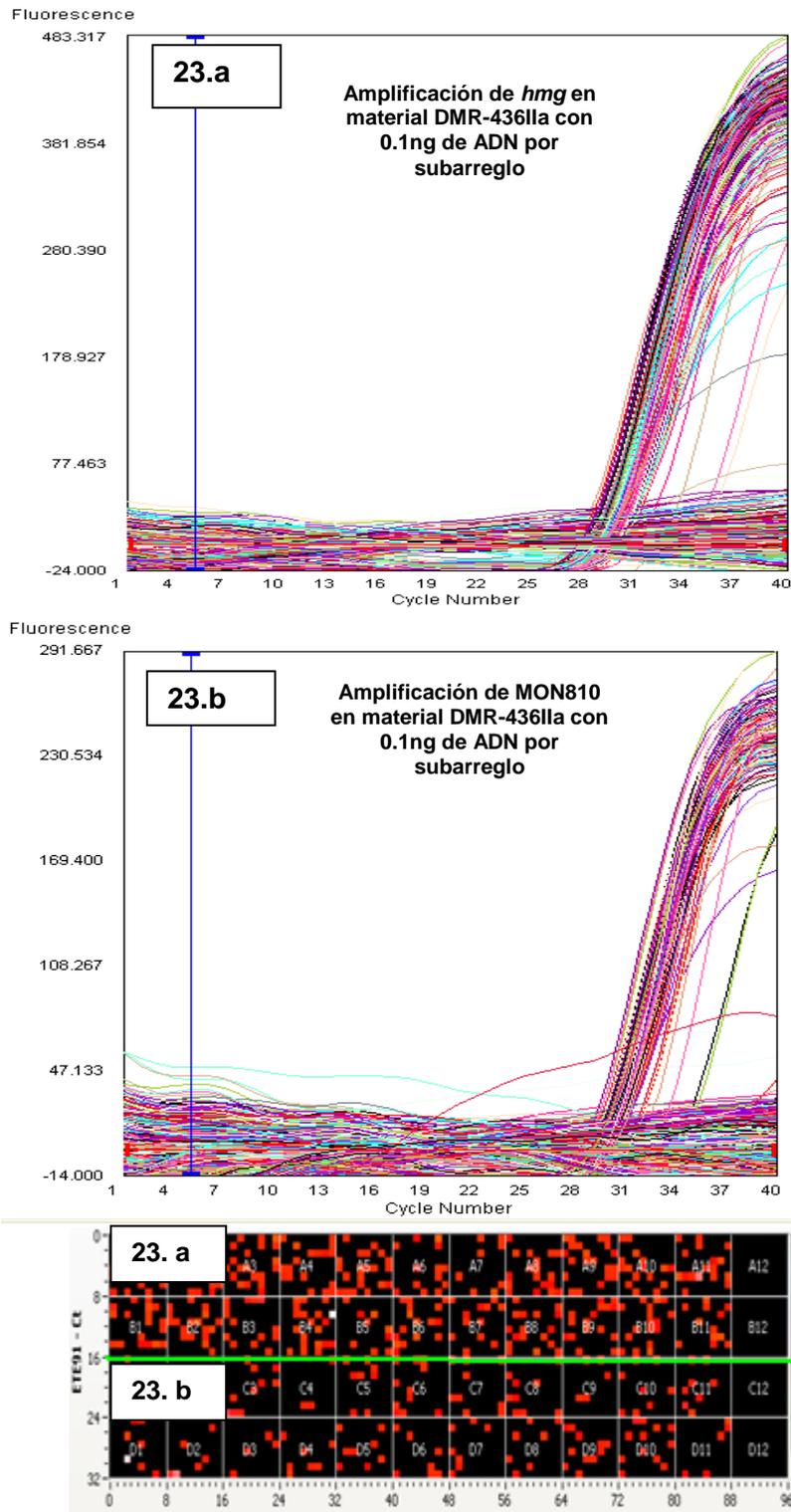


Figura 23. Mapas de amplificación de las secuencias *hmg* (23.a) y MON810 (23.b) del material DMR436IIa, con una concentración de 0.1 ng por subarreglo.

En la Figura 24 se observa el mismo comportamiento que en la placa cargada con una concentración de 0.1 ng por subarreglo (Figura 23); una mayor cantidad de pozos positivos de la secuencia *hmg* en comparación con la secuencia E.E. MON810.

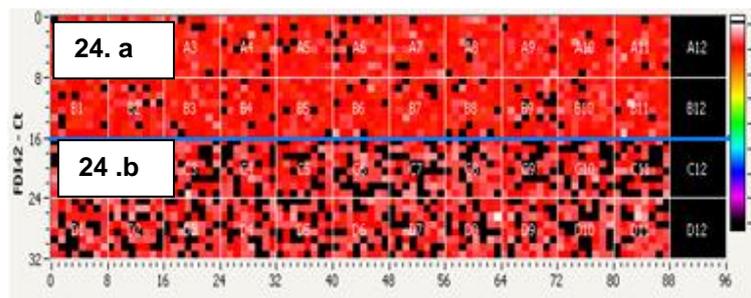
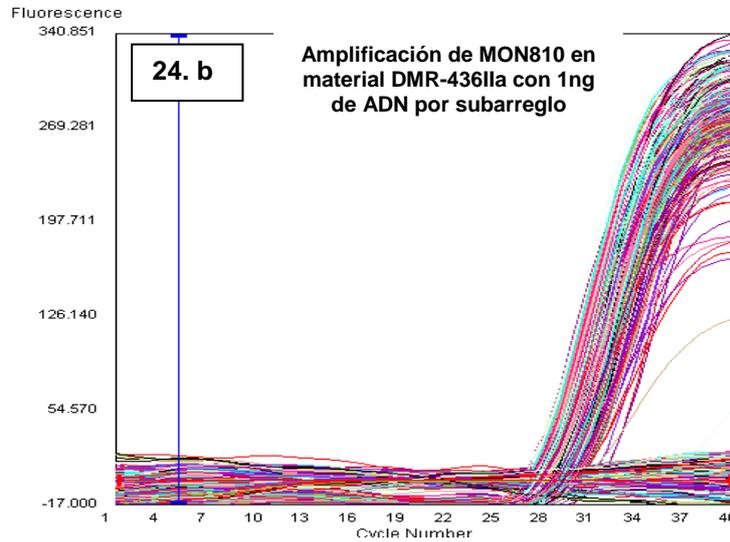
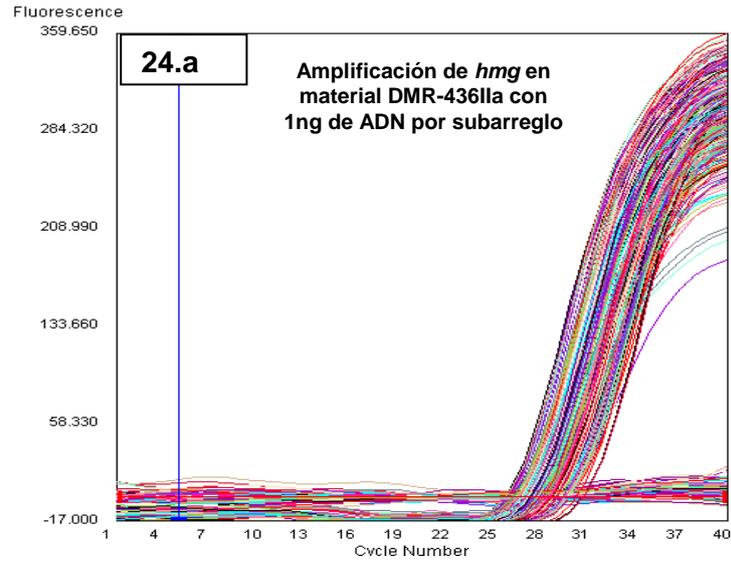


Figura 24. Mapas de amplificación de las secuencias *hmg* (24.a) y MON810 (24.b) del material DMR436IIa, con una concentración de 1 ng por subarreglo.

Se observa mayor cantidad de amplificaciones en la placa con 1 ng de ADN (Figura 24) ya que es diez veces más cantidad del mismo material que en la placa cargada con 0.1 ng de ADN (Figura 25).

En la Tabla 9 se puede observar que se obtuvieron valores de cuantificación, en porcentaje GM muy similares tras cargar la cantidad de 0.1 y 1 ng de ADN por subarreglo para cada secuencia, siendo de 44.75% y 43.17% respectivamente. El resultado obtenido del ensayo con 0.1 ng de ADN presenta una cota inferior, encima de la cual se encuentra el valor de reportado por el certificado de referencia del material.

Como se puede observar en la Figura 24, al utilizar la solución con una concentración de 1ng de ADN, se obtiene un mayor número de reacciones con amplificaciones positivas, esto da la posibilidad de tener más de una copia por pozo (reacción) y por lo tanto tener una subestimación del resultado. Por lo que la cuantificación con una cantidad menor de ADN proporciona mejores resultados.

Tabla 9. Comparación de la concentración copia/copia de la secuencia MON810 con respecto a la de *hmg*, del material DMR-436IIa colocando dos cantidades diferentes de ADN; 1 y 0.1ng.

Material/ Conc. nominal (%cp/cp)	Conc. de ADN por subarreglo (ng)	Secuencia blanco	No. de copias esperadas	No. de copias obtenidas	%cp/cp obteni- do	Cota inferior (%)	Cota superior (%)	No. de subarreglos considera- dos
DMR-436IIa 37.35%	0.1	<i>hmg</i>	0.24	0.30	44.75	36.51	55.54	22
		MON810	0.09	0.12				22
	1	<i>hmg</i>	2.42	2.68	43.17	41.80	44.55	22
		MON810	0.90	1.15				22

5.4 Caracterización de la hoja GM y mezclas GM por dPCR

Se evaluó la concentración del material 100% GM (hoja del cultivo MON810) y de las mezclas en concentraciones de 10, 1 y 0.1% de OGM.

La cuantificación de la secuencia *hmg* en la hoja 100% GM y en las mezclas GM se realizó a partir de 1ng de ADN por subarreglo, en tanto que para la secuencia E.E. MON810 se cargaron diferentes cantidades en ng de ADN (Tabla 10), debido que al ser mezclas con menor porcentaje del E.E. MON810, se espera un menor número de copias y buscamos éstas puedan ser cuantificadas alrededor del rango óptimo establecido por el fabricante del equipo.

En la Figura 25 a la 28 se muestran los mapas de amplificación para cada una de las mezclas, tanto para la secuencia endógena de maíz *hmg* como para la secuencia E.E. MON810, donde se observa que la cantidad de amplificaciones positivas para la secuencia

hmg en todos los materiales es parecida. Para la secuencia MON810 se observa algo similar, sin embargo, esto se debe a que para la cuantificación de esta secuencia, cada mezcla está cargada a diferentes concentraciones de ADN.

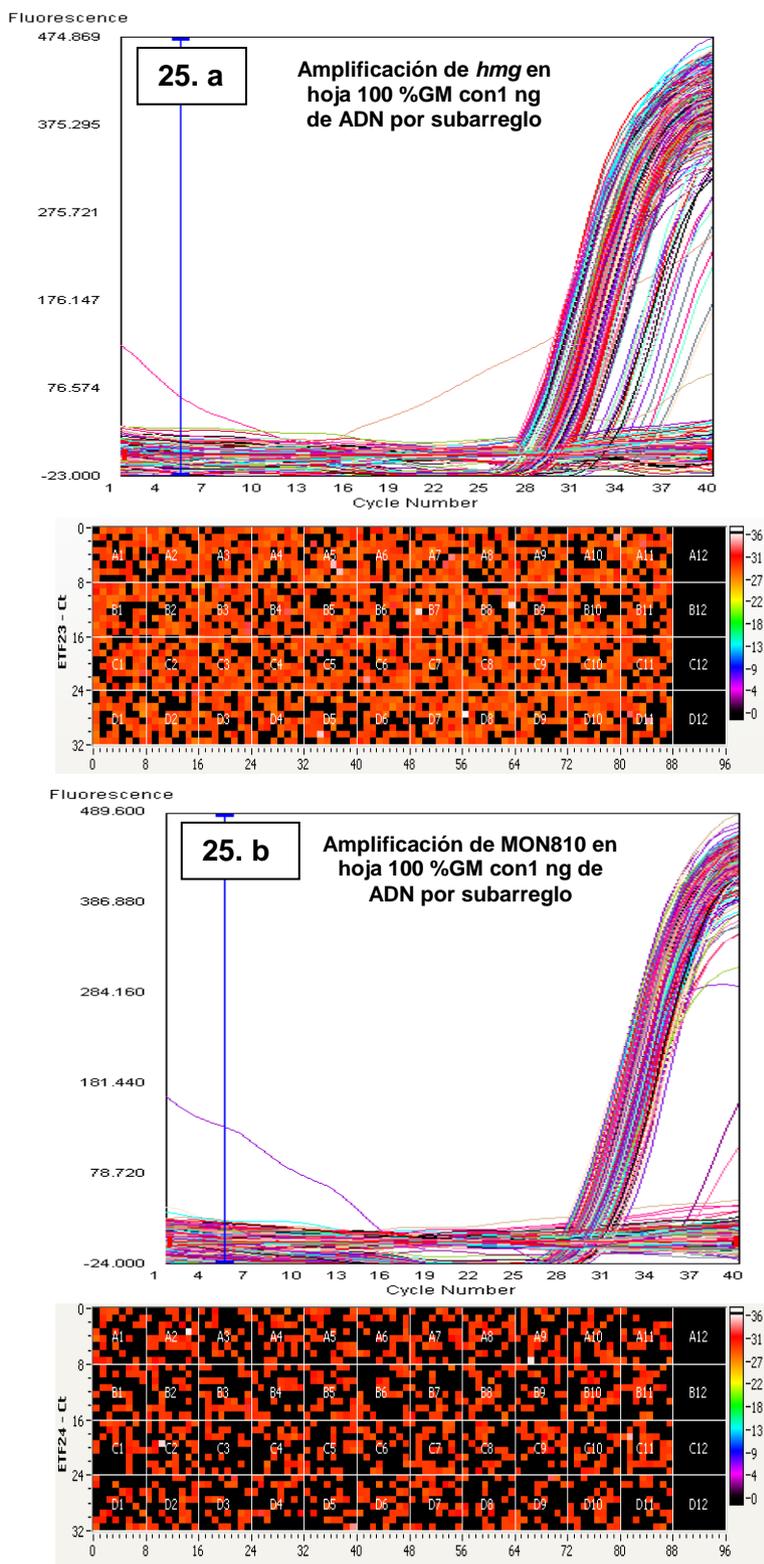


Figura 25. Mapas de amplificación de las secuencias *hmg* (25.a) y MON810 (25.b) de la hoja 100 %GM

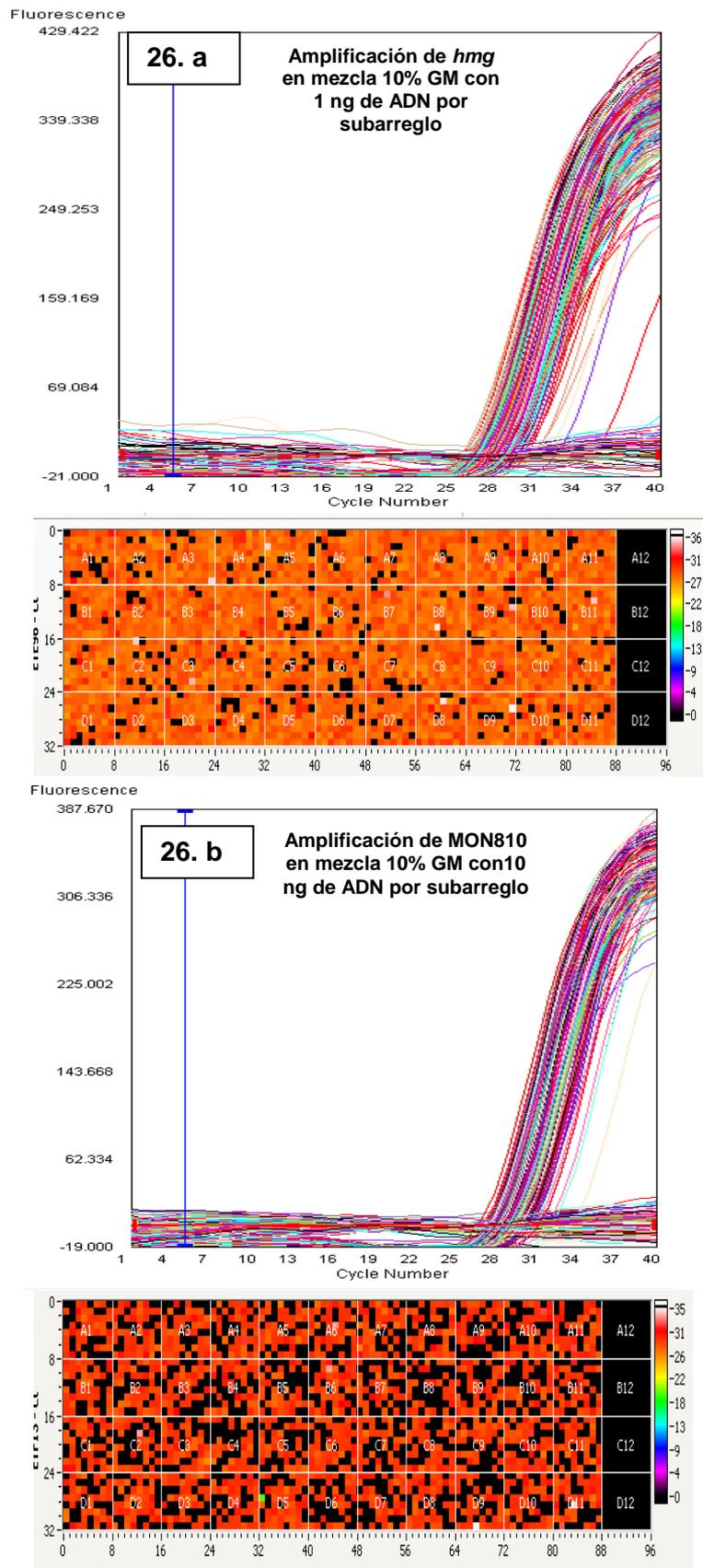


Figura 26. Mapas de amplificación de las secuencias *hmg* (26.a) y MON810 (26.b) de la hoja 10 %GM

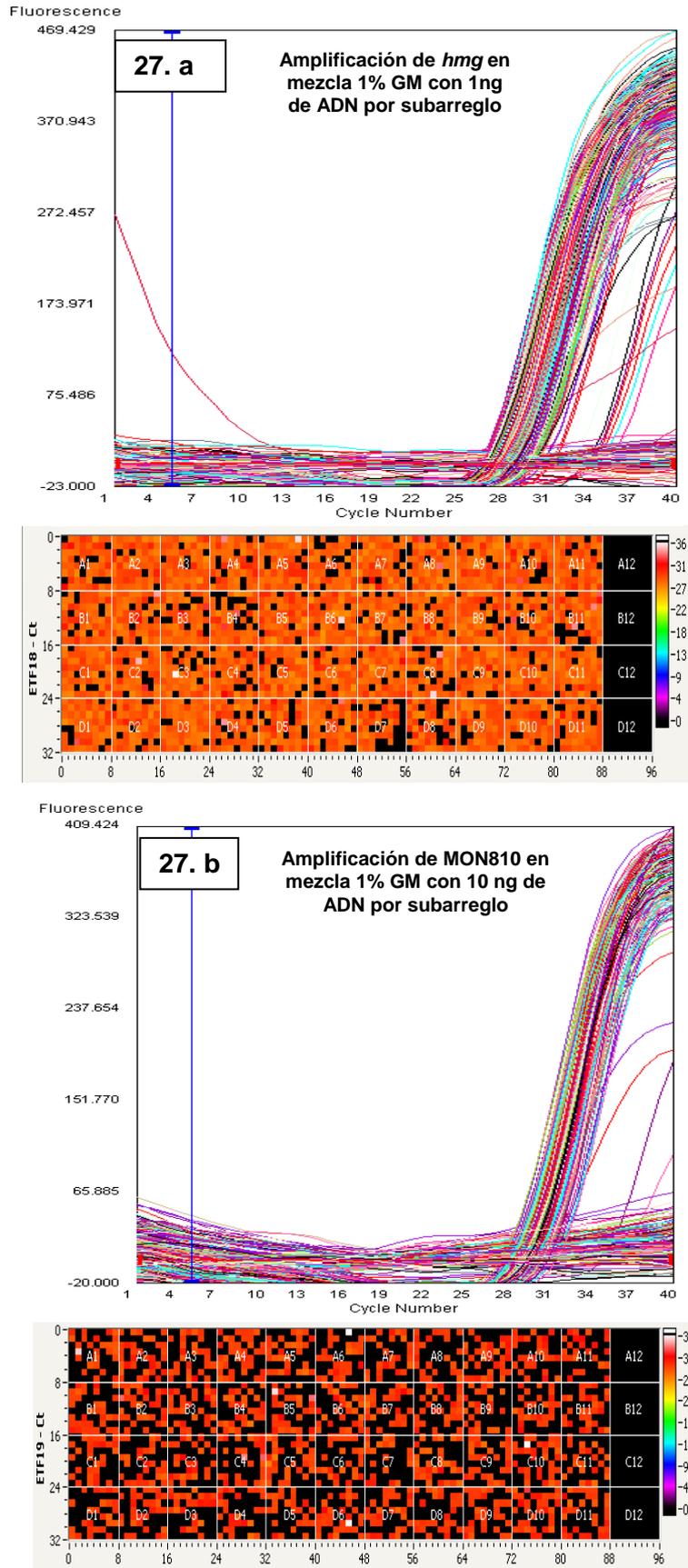


Figura 27. Mapas de amplificación de las secuencias *hmg* (27.a) y MON810 (27.b) de la hoja 1 %GM

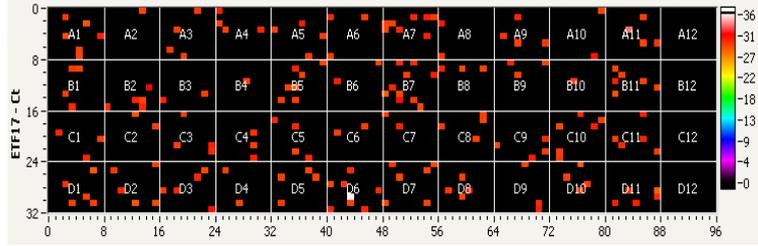
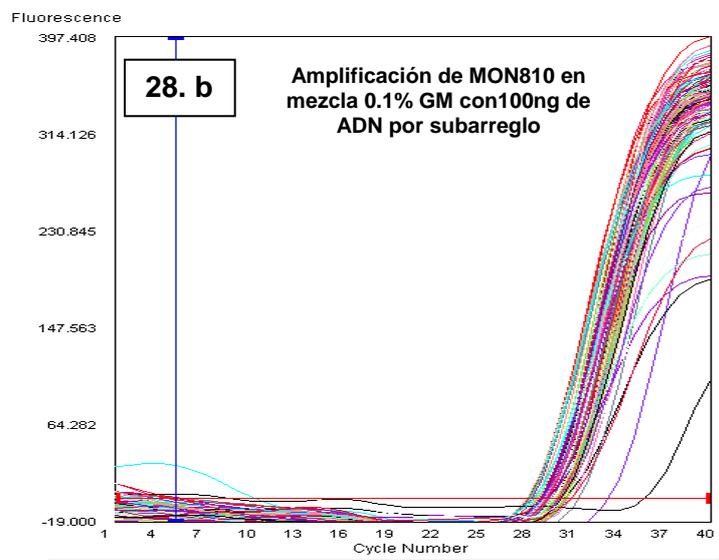
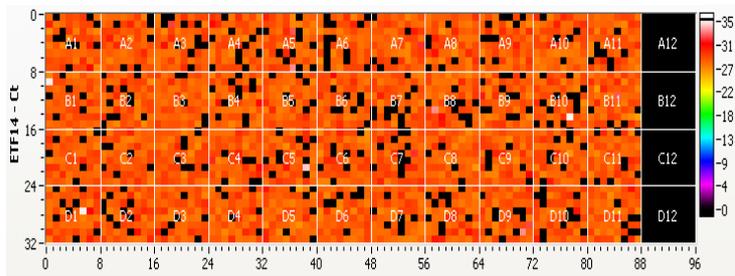
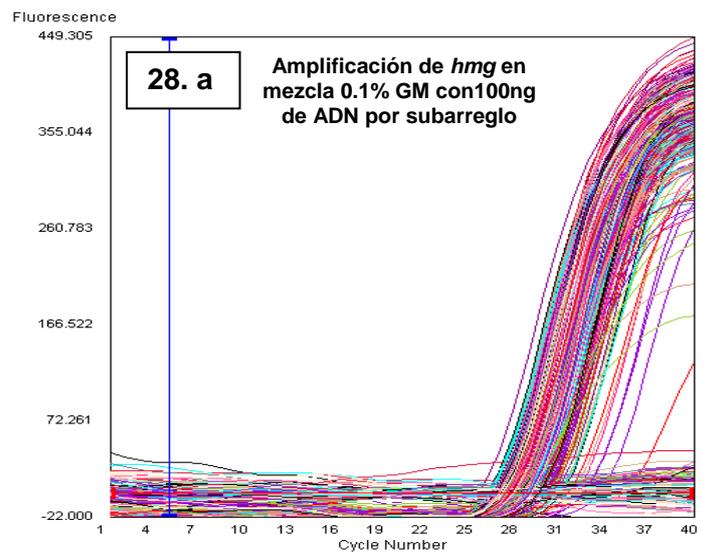


Figura 28. Mapas de amplificación de las secuencias *hmg* (28.a) y MON810 (28.b) de la hoja 0.1 %GM

Como se puede observar en las Figuras 26 a la 28, en la fila extrema derecha de cada subarreglo, no hay amplificaciones de los controles de reactivos (NTC), garantizando la no sobrestimación en la medición.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la caracterización de la hoja y las mezclas GM, cuyos valores son cercanos a los esperados. Lo anterior al considerar que debido a que la fisiología de la hoja de maíz tiene una contribución genética paterna y materna del 50% y que sólo uno de los dos tiene la modificación genética, el porcentaje GM esperado debe ser cercano a la mitad de los valores teóricos de las mezclas gravimétricas, es decir, 50, 5, 0.5 y 0.05% respectivamente.

Tabla 10. Resultados de la caracterización de la hoja 100% GM y las mezclas 10%, 1% y 0.1%GM

Material	Secuencia cuantificada				% GM	SD	U relativa (%)	%GM ± Urelativa
	<i>hmg</i>		MON810					
	Conc. ADN	Promedio de copias por reacción	Conc. ADN	Promedio de copias por reacción				
Hoja GM	1ng	1.09	1ng	0.46	41.87	1.03	2.45	41.87±1.03
Mezcla 10% GM		2.54	10ng	0.93	3.69	0.38	10.39	3.69±0.38
Mezcla 1% GM		2.00	100ng	0.59	0.30	0.02	7.70	0.30±0.02
Mezcla 0.1% GM		2.09	100ng	0.07	0.03	0.004	12.98	0.03±0.004

En la Tabla 10 se puede observar los resultados obtenidos tras la cuantificación de la hoja y las mezclas GM. Para la hoja GM se obtuvo un valor de 41.87% GM, el cual es un valor cercano al esperado con base en la fisiología de la hoja de maíz. Para las mezclas se obtuvo un resultado cercano al esperado con respecto a la concentración de la hoja a partir de la cual se obtuvieron, es decir, se observa un factor de dilución cercano a 10 entre los valores obtenidos para las muestras.

De acuerdo a la NMX-Z005-IMNC-2009, los resultados de cuantificación deben ser expresados junto con un valor de incertidumbre, el cual es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando.

La incertidumbre relativa se calculó a partir de la incertidumbre expandida, para la cual se utilizó un factor de cobertura de 2, lo cual da una probabilidad de cobertura del 95%,

asumiendo una distribución normal, que hay un 95% de nivel de confianza de que el valor medido esté dentro de los límites de \pm la incertidumbre del valor promedio.

En la Tabla 10 se muestra la incertidumbre relativa expresada en %, la cual permite denotar que la incertidumbre asociada a la medición es mayor para menores concentraciones cuantificadas. Posteriormente se presenta el valor de OGM para cada muestra con sus respectivos límites asociados a la incertidumbre para permitir observar entre que valores se encuentra el resultado obtenido, por ejemplo, para la mezcla 10% GM podemos decir que con un 95% de nivel de confianza la cantidad genéticamente modificada de la muestra está entre 3.31 y 4.08%.

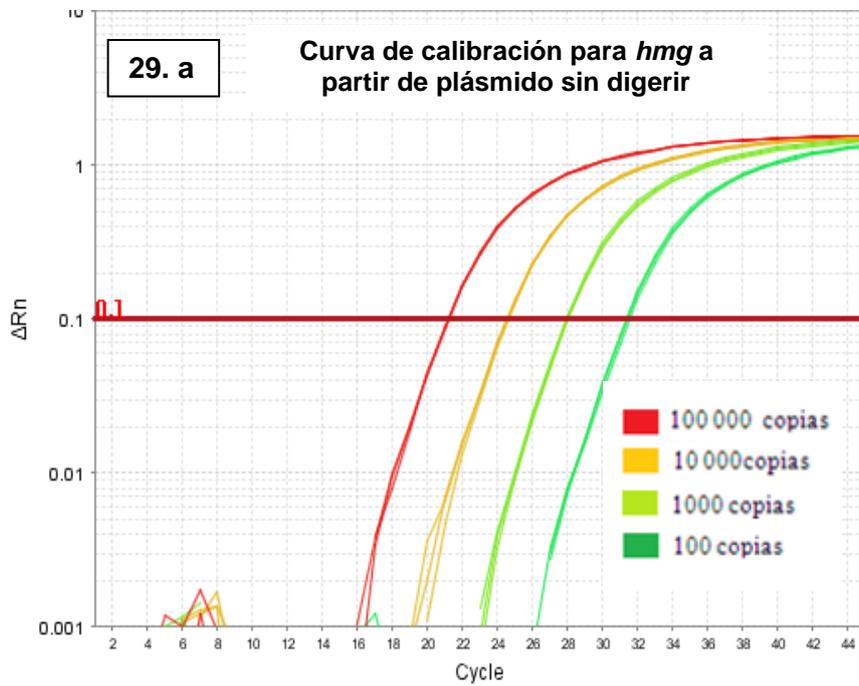
5.5 Caracterización de la hoja 100% GM qPCR con plásmido digerido y sin digerir

Para caracterizar la hoja 100% y las mezclas elaboradas a partir de esta por la técnica de qPCR, se elaboró una curva de calibración para cada secuencia a cuantificar (*hmg* y MON810) a partir del plásmido DMR-AD413 sin digerir.

En un primer ensayo la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración se calculó de acuerdo a las cantidades volumétricas tomadas para elaborar la solución.

En la Figura 29 se muestra las amplificaciones de cada punto de la curva de calibración de la secuencia *hmg* (29.a) y su respectiva curva estándar resultante (29.b) a partir del plásmido sin digerir. Se puede observar que las curvas que corresponden a una solución con un mayor número de copias aparecen en ciclos más tempranos en comparación con los que tienen una concentración menor. Además se observa que las amplificaciones de las tres repeticiones de cada punto se perciben como una sola. Lo mismo se observa para la curva de calibración para MON810 en la Figura 30.

Curvas de amplificación



Curva estándar

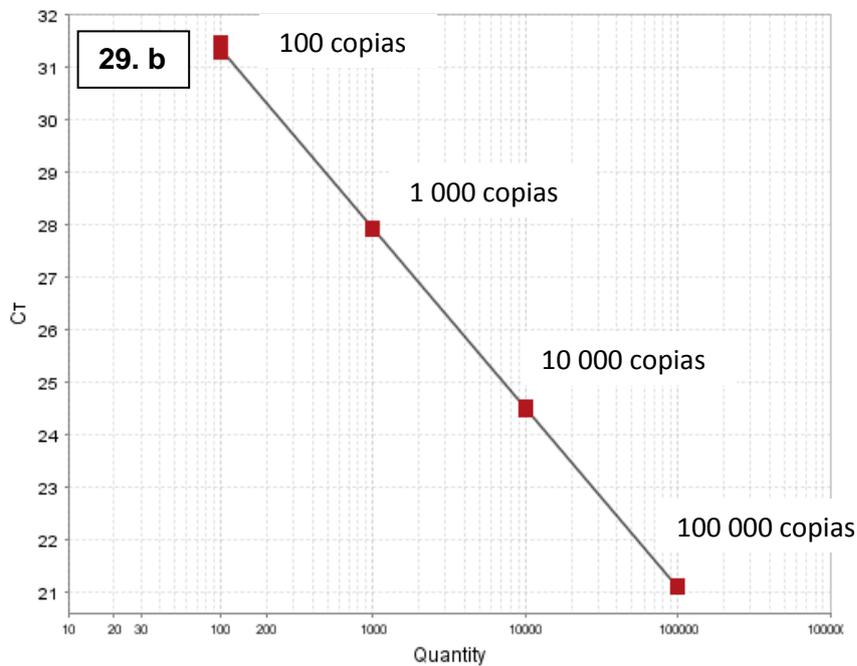
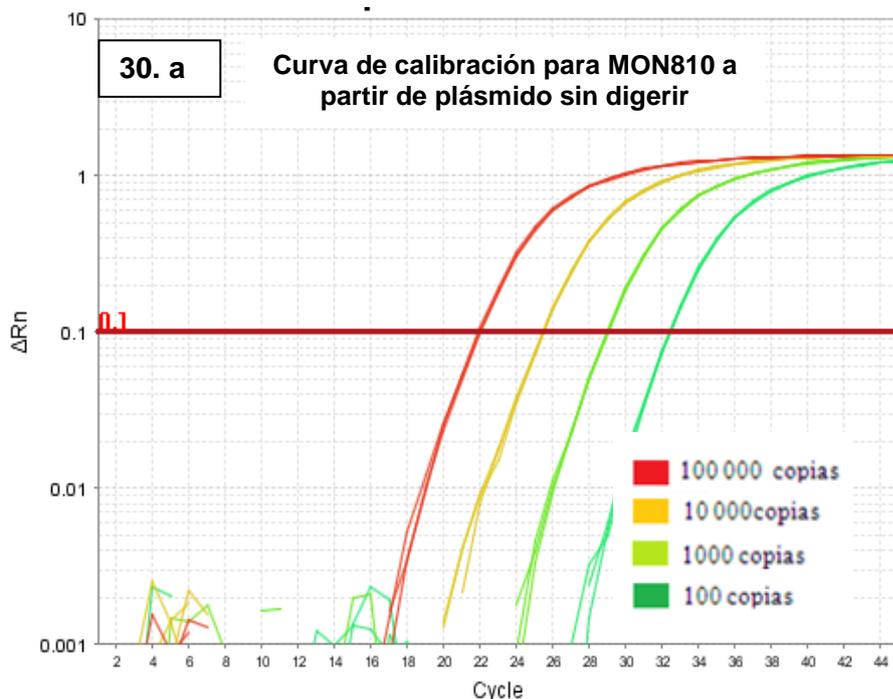


Figura 29. Curvas de amplificación de la secuencia *hmg* a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (29.a) y curva estándar de *hmg* (29.b). Elaborado con plásmido sin digerir

Curvas de amplificación



Curva estándar

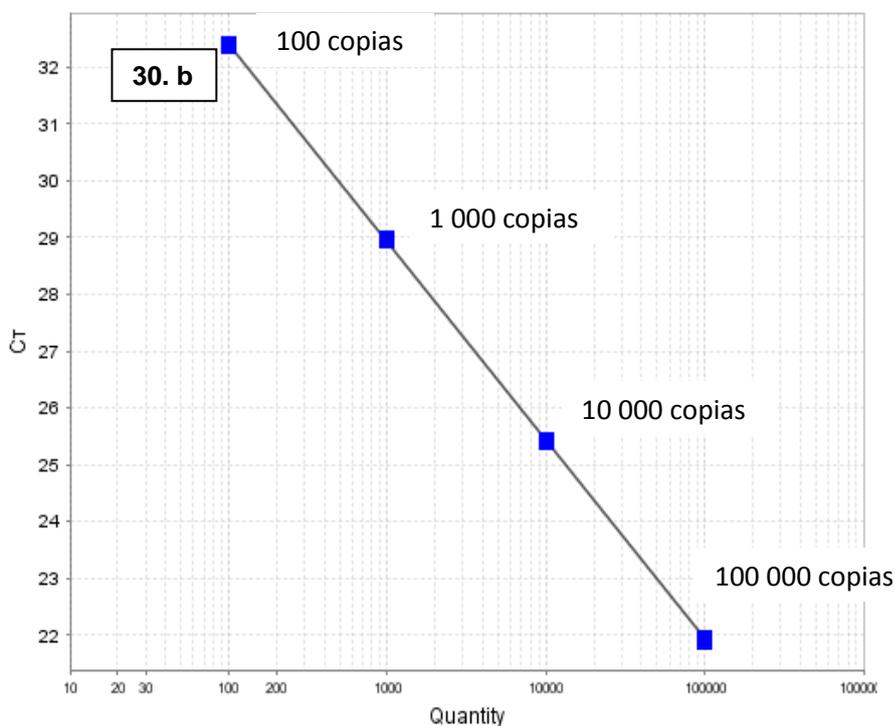


Figura 30. Curvas de amplificación de la secuencia MON810 a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (30.a) y curva estándar de MON810 (30.b). Elaborado con plásmido sin digerir

En la Tabla 11 se muestra los resultados de los parámetros evaluados en una curva de calibración para ambas secuencias. Se puede observar que ambas curvas están dentro de los parámetros de aceptación establecidos por la Unión Europea en materia de análisis de OGM por qPCR (EUR 24790 EN – 2011).

Tabla 11. Resultados de los parámetros evaluados de las curvas de calibración para las secuencias *hmg* y MON810 a partir de plásmido sin digerir

Parámetro de aceptación	<i>hmg</i>	MON810
Pendiente(-3.1 a -3.6)	-3.414	-3.488
$R^2 \geq 0.98$	1	1
%Eficiencia (90-110%)	96.281	93.504
Error	0.014	0.009
Hoja 100%GM	41.289% cp/cp	

A partir de las curvas elaboradas se cuantificó la hoja 100%GM, de la cual se obtuvo un 41.289 % copia/copia de contenido genéticamente modificado.

Reportes preliminares muestran que a fin de obtener el número real de copias en una dilución, se realizan diluciones gravimétricas (Corbiser, P., *et al.*, 2010).

Por lo cual se realizó el cálculo descrito en la sección de metodología, punto 4.2.13 para conocer la concentración real de las diluciones empleadas en la elaboración de la curva de calibración. En la Tabla 12 se presentan las cantidades adicionadas para elaborar cada punto de la curva de calibración y su correspondiente concentración (en número de copias) en cada reacción de qPCR.

Cada punto de la curva se realizó por triplicado con la concentración presentada en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la medición gravimétrica de la cantidad de ADN plasmídico (DMR AD-413) sin digerir, utilizado para la elaboración de una curva estándar evaluada po qPCR

Conc. nominal	Cantidades utilizadas para la elaboración de las diluciones y la concentración resultante					No. de copias del plásmido sin digerir en cada reacción de PCR			
	Buffer TE	DNA	Conc. (mgADN/mg Buffer)	FD	Conc. real de copias	<i>hmg</i>		MON 810	
						DNA (mg)	No. de copias	DNA (mg)	No. de copias
500000	152.8	50.2	0.3	4.0	494581.3				
100000	197.9	48	0.2	5.1	96542.9	5.9	94933.9	5.8	93324.8
10000	89.3	10	0.1	8.9	10811.1	6.2	11171.4	6.2	11171.4
1000	88.4	10	0.1	8.8	1223.0	5.9	1202.6	6.3	1284.1
100	88.4	9.9	0.1	8.9	137.0	6	137.0	6	137.0

En las Figuras 31 se muestra las amplificaciones de cada punto de la curva de calibración de la secuencia *hmg* (32.a) y su respectiva curva estándar resultante (32.b) a partir del

plásmido digerido. Se observa que las curvas que corresponden a una solución con un mayor número de copias aparecen en ciclos más tempranos en comparación con los que tienen una concentración menor. Además se observa que las amplificaciones de las tres repeticiones de cada punto se perciben como una sola. Lo mismo se observa para la curva de calibración para MON810 en la Figura 27.

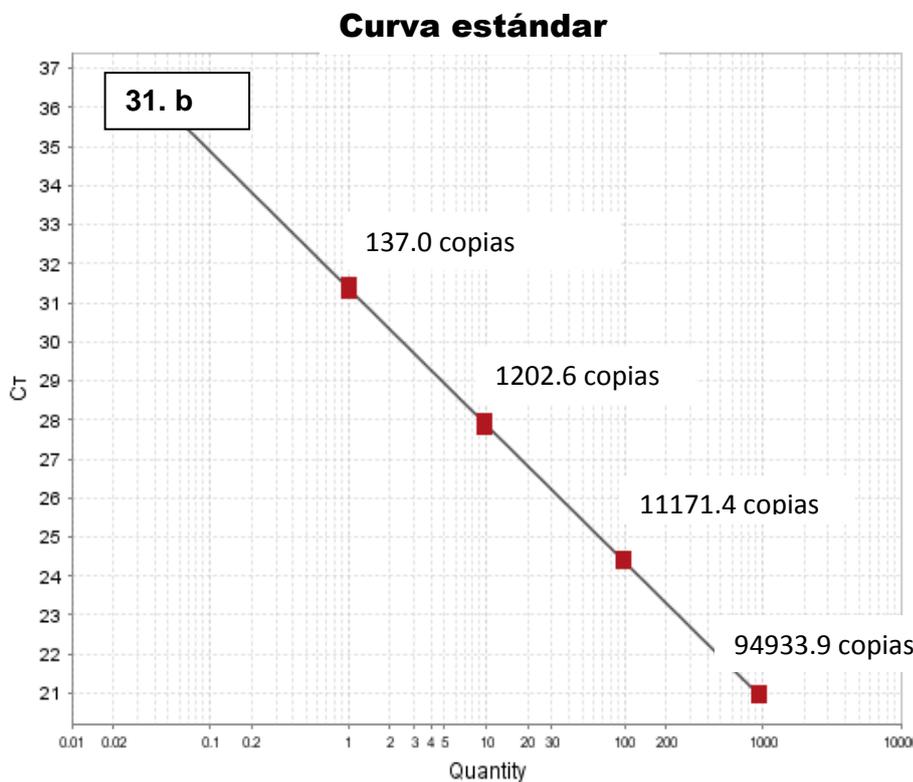
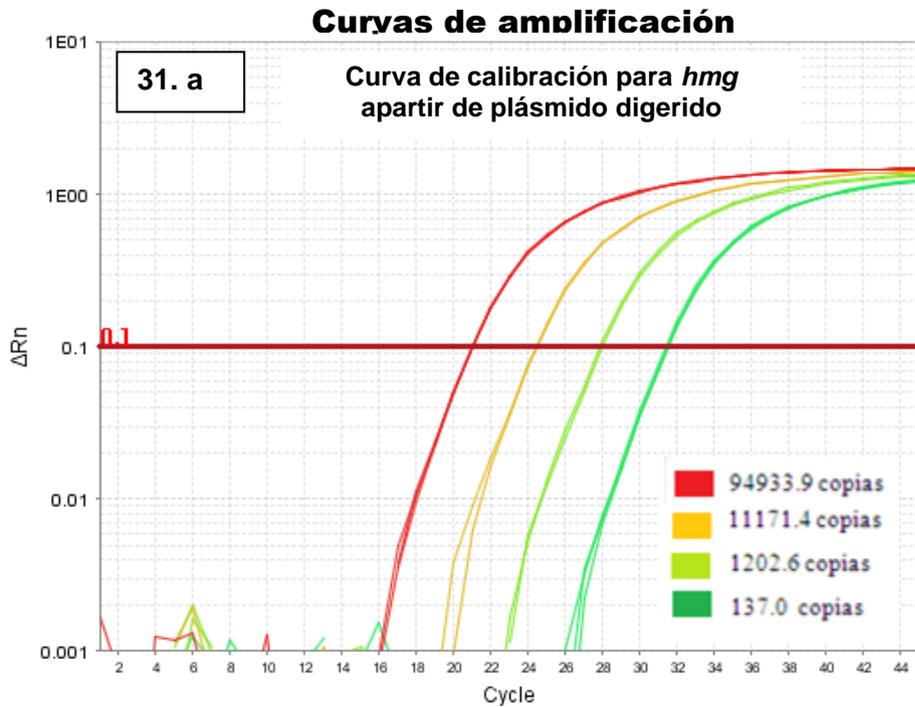
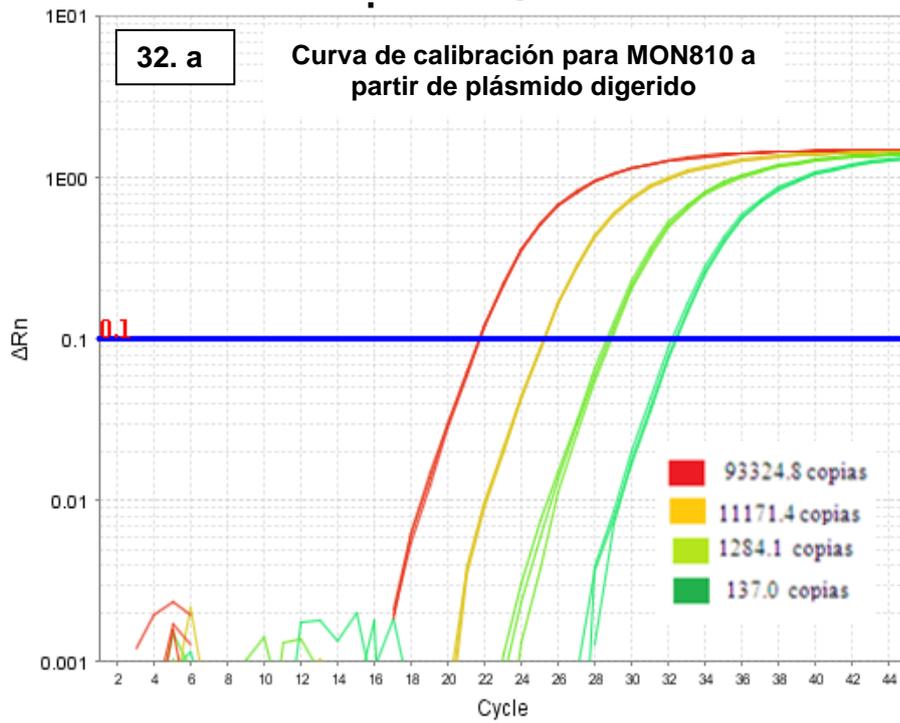


Figura 31. Curvas de amplificación de la secuencia *hmg* a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (31.a) y curva estándar de *hmg* (31.b). Elaborado con plásmido digerido.

Curvas de amplificación



Curva estándar

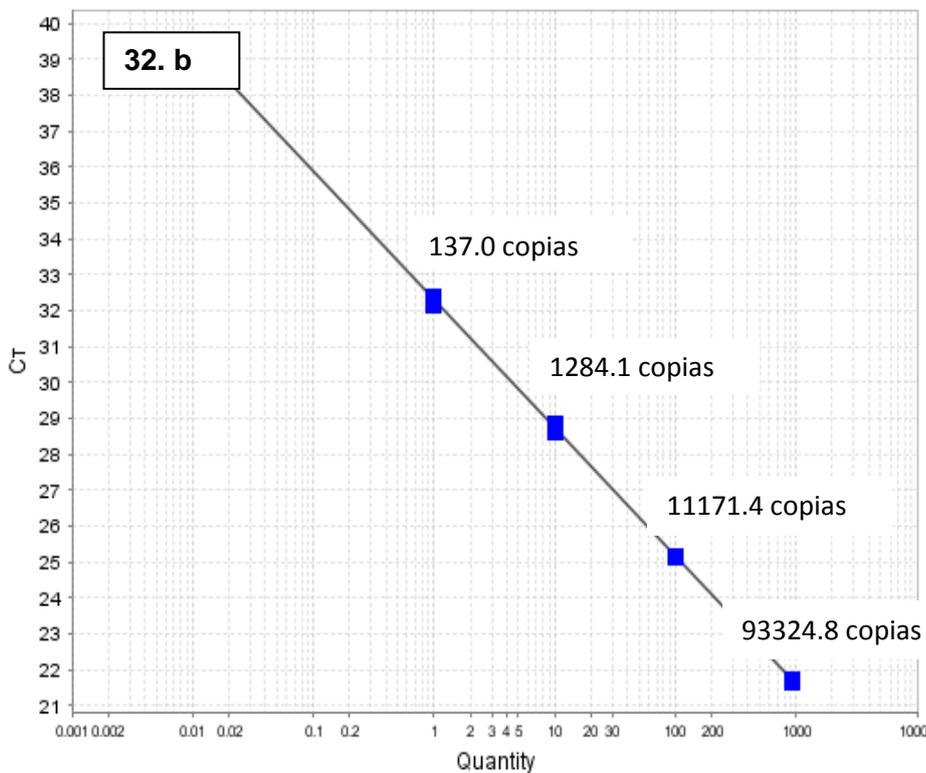


Figura 32. Curvas de amplificación de la secuencia MON810 a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (32.a) y curva estándar de MON810 (32.b). Elaborado con plásmido digerido

En la Tabla 13 se muestran el resultado de los parámetros evaluados de las curvas de calibración realizadas a partir de plásmido digerido. Para las curvas de ambas secuencias se puede observar que los valores obtenidos están dentro de los parámetros de aceptación establecidos por la Unión Europea en materia de análisis de OGM por qPCR (EUR 24790 EN – 2011)

Tabla 13. Resultados de los parámetros evaluados de las curvas de calibración para las secuencias *hmg* y MON810 a partir de plásmido sin digerir

Parámetro de aceptación	<i>hmg</i>	MON810
Pendiente(-3.1 a -3.6)	-3.504	-3.583
$R^2 \geq 0.98$	1	1
%Eficiencia (90-110%)	92.921	90.15
Error	0.014	0.02
% cp/cp GM	44.73	

A partir de las curvas de calibración realizadas se realizó la cuantificación de la hoja denominada 100%GM y se obtuvo 44.73 %copia/copia en contenido GM.

En la Tabla 14 se comparan los valores de los parámetros de aceptación de las curvas de calibración realizadas con plásmido digerido y sin digerir obtenidos anteriormente. Se puede observar que como ya se mencionó ambas curvas de calibración cumplen con los parámetros de eficiencia y coeficiente de correlación, sin embargo, el porcentaje de OGM en la hoja de maíz resulta mayor con el plásmido digerido que sin digerir, de 44.73% cp/cp y 41.28% cp/cp respectivamente.

Tabla 14. Resultados de los parámetros de aceptación para las curvas de calibración con plásmido digerido y sin digerir por qPCR.

Parámetro de aceptación	Calibrante			
	Plásmido sin digerir		Plásmido digerido	
	<i>hmg</i>	MON810	<i>hmg</i>	MON810
Pendiente(-3.1 a -3.6)	-3.414	-3.488	-3.504	-3.583
$R^2 \geq 0.98$	1	1	1	1
%Eficiencia (90-110%)	96.281	93.504	92.921	90.15
Error	0.014	0.009	0.014	0.02
% cp/cp GM	41.289		44.73	

Tras la elaboración de una curva volumétrica y una gravimétrica (y con DNA digerido), se observó que la diferencia en los resultados obtenidos es muy poca, con respecto a los parámetros de aceptación para una curva de calibración y a los resultados obtenidos tras la cuantificación de la hoja 100% GM con ambas curvas, por lo que se procedió a cuantificar las mezclas GM y nuevamente la hoja 100% GM con la elaboración de una curva volumétrica y con DNA plasmídico sin digerir; ya que permiten una mayor rapidez y menor costo en el proceso de análisis

5.5.1 Caracterización de la hoja y las mezclas GM por qPCR utilizando como calibrante ERM AD-413 sin digerir

A fin de realizar la trazabilidad de las mediciones al Sistema Internacional y con base a la normativa ISO/IEC 17511:2005 para la trazabilidad en las mediciones, se evaluó la concentración de las mismas mezclas a partir de la técnica de qPCR y con el uso del material EMR AD-413 al construir una curva de calibración con concentraciones nominales de 10^5 , 10^4 , 1000 y 100 copias.

En la Figura 33 y 34 se ilustra la amplificación de la secuencia *hmg* y eI.E.MON810, donde se observa que las amplificaciones de ambas secuencias en las diferentes concentraciones nominales conservan una distancia proporcional, ya que ambas fueron elaboradas con un factor de dilución 1:10.

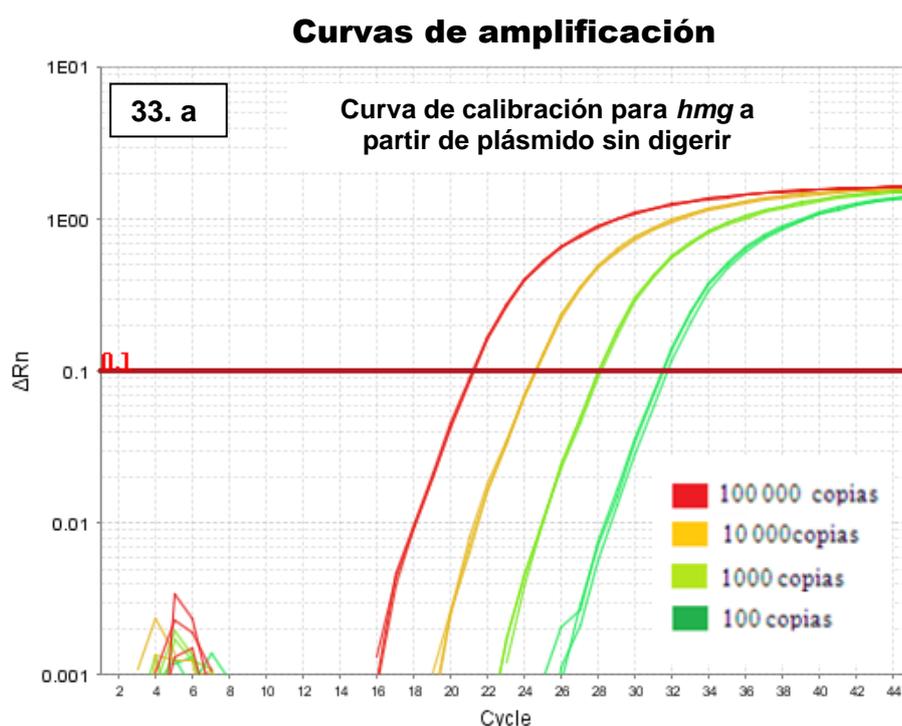


Figura 33. Curvas de amplificación de la secuencia *hmg* a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (32.a) y curva estándar de *hmg* (32.b). Elaborado con plásmido sin digerir

Curva estándar

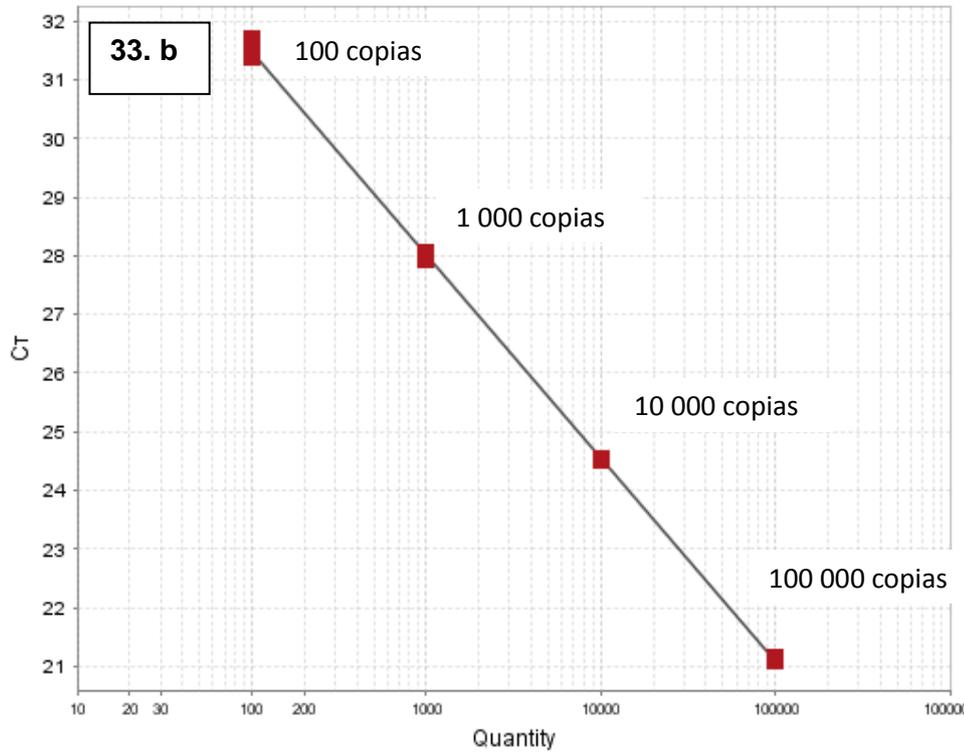


Figura 33 (continuación). Curvas de amplificación de la secuencia *hmg* a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (32.a) y curva estándar de *hmg* (32.b). Elaborado con plásmido sin digerir

Curvas de amplificación

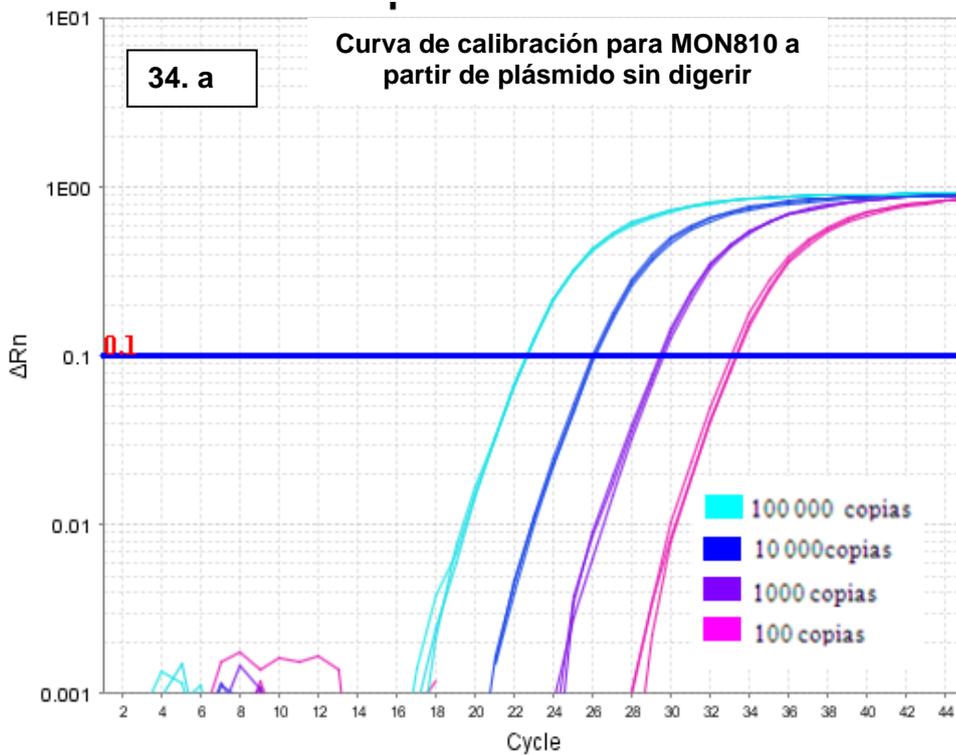


Figura 34. Curvas de amplificación de la secuencia MON810 a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (34.a) y curva estándar de MON810 (34.b). Elaborado con plásmido sin digerir

Curva estándar

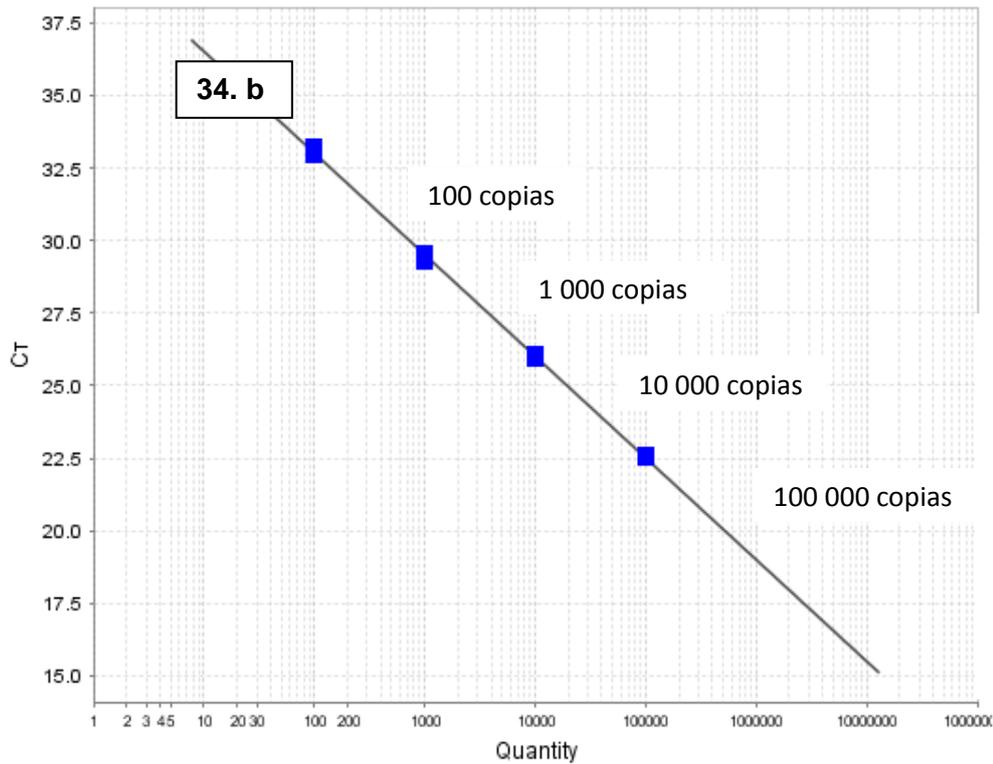
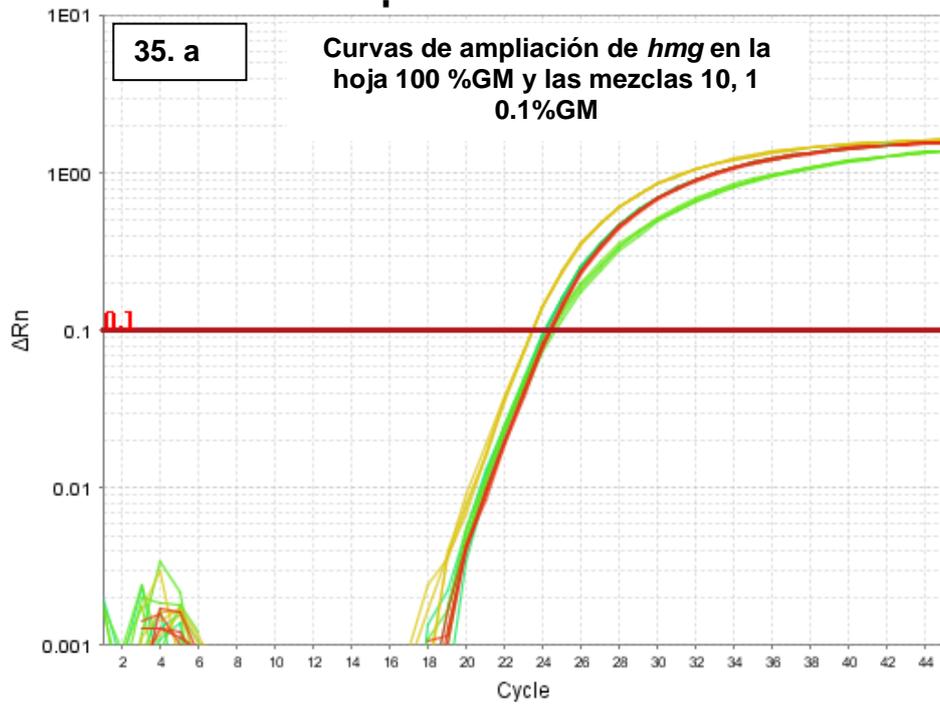


Figura 34 (continuación). Curva de amplificación de la secuencia MON810 a las concentraciones establecidas para los cuatro puntos de la curva estándar (34.a) y curva estándar de MON810 (34.b). Elaborado con plásmido sin digerir

Para el caso de las mezclas (Figura 35), la amplificación de la secuencia endógena (Figura 35.a) es como se esperaba debido a que amplifican en el mismo ciclo, es decir, la secuencia endógena es independiente de la concentración de la secuencia genéticamente modificada, mientras que para las amplificaciones de la secuencia MON810 (Figura 35.b) se observa una amplificación proporcional en función de la concentración nominal.

Curvas de ampliación



Curvas de ampliación

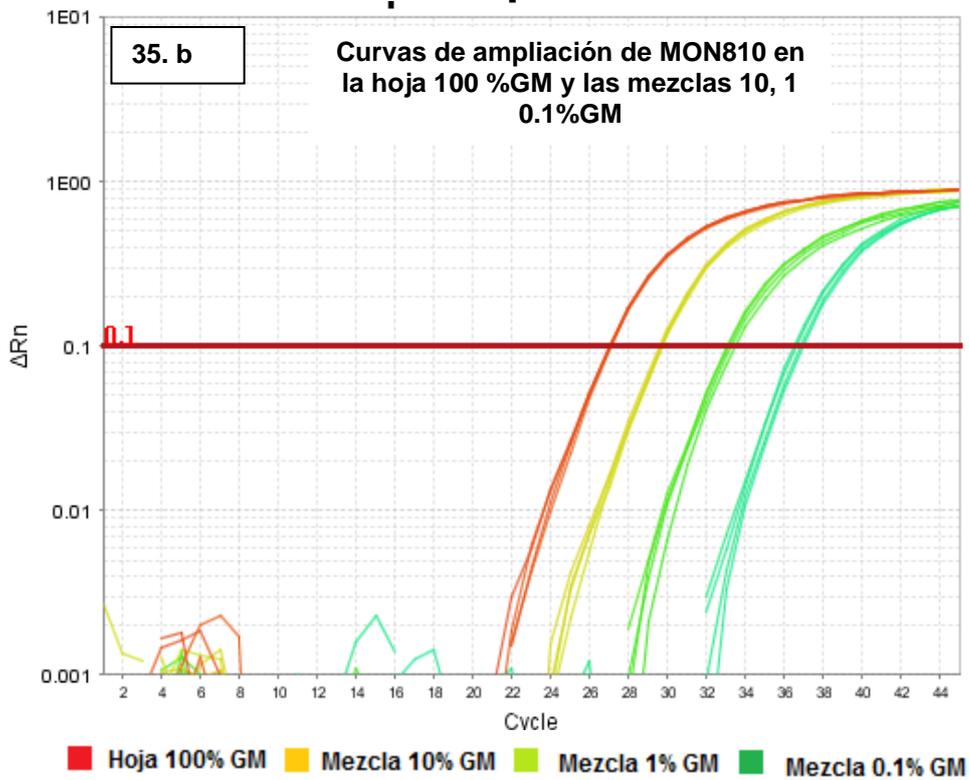


Figura 35. Amplificación de la secuencia *hmg* de la hoja GM y mezclas 10%, 1% y 0.1% GM (34.a)
Amplificación de MON810 de la hoja GM y mezclas (34.b)

En la Tabla 15, se presenta la comparación de los valores obtenidos de la caracterización de las mezclas las curvas estándar de las secuencias cuantificadas. Ambas curvas cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 15. Resultados y parámetros de aceptación de las curvas estándar para la secuencia *hmg* y MON810 elaboradas a partir del material ERM AD-413 (plásmido sin digerir) por qPCR.

Parámetro de aceptación	Secuencia blanco	
	<i>hmg</i>	MON810
Eficiencia (90-110%)	94.574	92.593
Pendiente (-3.1 a -3.6)	-3.459	-3.513
$R^2 \geq 0.98$	1	0.999
Error	0.024	0.032

En la Tabla 16 se presenta la comparación de los valores obtenidos de la caracterización de las mezclas por qPCR y dPCR con el correspondiente resultado de la estimación de la incertidumbre relativa, ya que esta incertidumbre nos permite comparar la magnitud de la incertidumbre asociada a las mediciones por ambas técnicas.

Tabla 16. Comparación de los resultados obtenidos de la cuantificación de la hoja 100%, 10%, 1% y 0.1%GM por las técnica qPCR y dPCR

Muestra	dPCR		qPCR	
	%GM	$U_{relativa}$	%GM	$U_{relativa}$
Hoja GM	41.87	2.45	45,45	0.13
Mezcla 10%	3,69	10.39	4,29	1.39
Mezcla 1%	0.30	7.70	0,86	7.01
Mezcla 0.1%	0.031	12.98	0,07	89.13

De la Tabla 16, se concluye que los valores obtenidos por dPCR son más precisos, ya que se observa una relación proporcional entre el porcentaje GM obtenido para la hoja denominada 100% GM y las mezclas elaboradas a partir de ella, es decir, entre 41.87, 3.69, 0.3 y 0.031% se denota un factor de dilución cercano a 1:10, correspondiente al factor de dilución utilizado en la elaboración de las mezclas de manera gravimétrica. Además reporta una incertidumbre menor para la mezcla con concentración más pequeña en comparación con la incertidumbre obtenida por qPCR. Sin embargo, los resultados de la cuantificación de la hoja 100% GM y la mezcla 10% GM por qPCR, se acerca más al valor esperado, resultando una cuantificación más exacta para esos dos materiales.

Como se puede observar en la Tabla 16 los resultados de cuantificación obtenidos por dPCR y qPCR para la hoja 100%GM son 41.87% y 45.45% respectivamente, los cuales

son resultados próximos entre ellos y por lo tanto resultan comparables. En este caso la medición se realizó a partir del ADN obtenido de una sola hoja, a la cual se le había determinado previamente la presencia de la modificación genética de MON810. Por lo cual los valores de 41.87 y 45.45 % muestran que en ninguno de los casos se logró alcanzar el valor de 50% teórico esperado. Esto puede atribuirse al ensayo para la amplificación de la secuencia evento específica de MON810, debido a que como se puede observar en la Figura 36, la diferencia entre el ciclo de amplificación (C_T) para la secuencia *hmg* y MON810 es de 2.66 ciclos, ambos conteniendo la misma cantidad de ADN (100 ng por reacción), es decir, el ensayo de amplificación para MON810 podría afectar la eficiencia requerida y generar una amplificación tal que el C_T no se presente exactamente un ciclo después que el de la secuencia endógena, esto de acuerdo a la relación que guarda el C_T con el factor de dilución, como se muestra en la siguiente ecuación

$$2^n = \text{Factor de dilución}$$

Donde n es la diferencia de C_T

De acuerdo al valor teórico del 50% GM para la hoja de maíz, el factor de dilución entre la secuencia *hmg* y MON810 es de 0.5, sustituyendo en la ecuación anterior, la diferencia de C_T esperada es de 1.

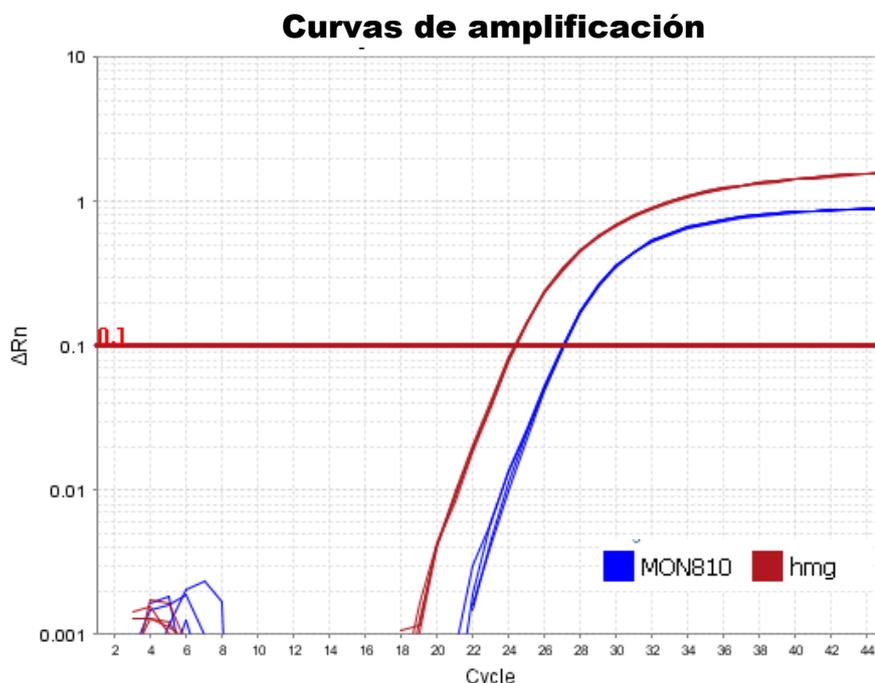


Figura 36. Amplificación de las secuencias MON810 y *hmg* en la hoja 100%GM

El mismo fenómeno se observa en la elaboración de las curvas de calibración a partir de plásmido, ya que, como se puede observar en la Figura 33 el C_T no es el mismo para la secuencia *hmg* y MON810 ($\Delta C_T = 1.4$), ambos con una concentración nominal de 100 000 copias, en este caso el C_T debería ser el mismo, ya que el plásmido contiene una copia de *hmg* y una de MON810. Por lo tanto, el ensayo no permite llegar a los valores esperados.

A partir de la cuantificación de materiales de referencia certificados por un organismo de metrología nacional (CENAM) e internacional (IRMM) por dPCR se encontró resultados cercanos a los esperados de acuerdo a los datos emitidos por dichas dependencias, siendo posible la expresión de los resultados tanto en número de copias para el material ARM-AD413 como en porcentaje GM para el material DMR-436IIa, contribuyendo en la validación de la técnica con una primera evaluación de la técnica en la cuantificación de secuencias transgénicas.

De la caracterización de la hoja denominada 100 %GM y las mezclas elaboradas a partir de ella que se realizó por qPCR utilizando como calibrante el material ERM-AD413 y por dPCR, se obtuvo resultados cercanos entre ambas técnicas, siendo los resultados obtenidos por dPCR los más próximos a los valores esperados, por lo que se propone que la técnica de dPCR es válida y permite proponer a la hoja GM como un candidato a material de referencia.

6. Logros del trabajo

- Se logró montar la técnica de dPCR para la cuantificación de secuencias genéticamente modificadas en hoja vegetal de maíz y secuencias de interés en plásmido.
- Se cuantificó el plásmido ERM-AD413 con el fragmento MON810, en número de copias por PCR digital con valores, que de acuerdo a las cotas del resultado abarcan al valor esperado.
- Se cuantificó el material de referencia DMR-436IIa, obteniendo valores muy similares entre ellos; utilizando 0.1 ng y 1 ng de ADN por subarreglo, siendo de 44.75% y 43.17% respectivamente.
- De la cuantificación de la hoja de maíz denominada 100%GM y las mezclas de 10%, 1% y 0.1% con el evento específico MON810 por medio de la técnica de PCR digital se obtuvieron valores cercanos a los obtenidos por PCR tiempo real utilizando como calibrante el plásmido ERM-AD413 sin digerir. Siendo los valores obtenidos por dPCR los más aproximados a los valores esperados

7. Conclusiones

- Los resultados obtenidos permiten considerar a la técnica de dPCR como apropiada y válida para la cuantificación de material genéticamente modificado.

8. Perspectivas

Este trabajo es un primer acercamiento a la cuantificación directa de secuencias genéticamente modificados sin el uso de un calibrante.

Con el objetivo de hacer de esta técnica una herramienta de los análisis en el CNRDOGM se deberá establecer y evaluar cada uno parámetros requeridos para su validación, como lo es su límite de detección y el límite de cuantificación por mencionar un ejemplo.

9. Bibliografía

Artículos

- Burns, M. y Burrel, A., 2010. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *European Food Research and Technology*. Vol. 231. Num. 3. pp. 353-362.
- Corbiser, P., Bhat, S., Partis, Lina., 2010. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays L.*) by digital polymerase chain reaction. Vol. 396, pp. 2143-2146
- Corona, B., Uffo, O., Martínez, S., 2006. Detección de OGM en la cadena alimentaria. *Revista de Salud Animal*. Vol. 28 No. 2, pp. 69-78
- Lockley, A., and Bardsley, R., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* , Num.11 Vo. 2, pp. 67-77

Guía de uso de equipos

- Applied Biosystems. 2012. Manual de entrenamiento del sistema Open Array™. pp. 3-14
- Applied Biosystems. 2010. Open Array Real Time PCR system Digital PCR experiment User Guide. pp. 58-60
- Fluidigm. 2010. Digital PCR Analysis Software User Guide. South San Francisco. pp. 10-14
- Applied Biosystem. 2011. Introducción a la PCR en tiempo real. Sistema ViiA™7.. Curso teórico-práctico de PCR tiempo real y sus aplicaciones. pp. 8

Libros

- Serratos, J., López, H., y Carrillo, C., 2000. Taller de maíz transgénico. Memoria. NAPPO, DGSV, NCBA. Cd de México 13-16 octubre de 1997. pp. 120

Certificados de Materiales de referencia

- Centro Nacional de Metrología, 2011. Certificado del Material de referencia DMR436IIa; CNN_MR-630-455/2011. No. De certificado 17221.
- Institute for Reference Materials and Measurements. 2007. Certificado de análisis ERM-AD413

-
- Institute for Reference Materials and Measurements. 2007. CERTIFICATION REPORT, Certification of plasmidic DNA containing MON 810 maize DNA fragments, Certified Reference Materials ERM®-AD413. p. 9 y25

Páginas electrónicas

- Food and Agriculture Organization. 2012. *Quality Assurance in the food control chemical laboratory. Deposito de documentos de la Fao.* [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/T0845S/t0845s0c.htm> [Última fecha de acceso el 30 de mayo del 2012]
- National Center for Biotechnology Information. 2012. *Genome Zea Mays* [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Zea%20Mays> [Última fecha de acceso el 30 de mayo del 2012]
- Viarstraete Andy, 1999, Principle of the PCR. [En línea]. Disponible en <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> [Última fecha de acceso el 6 de Octubre del 2012]
- GMO testing. 2012. Testing options. Inmuno-analysis. [En línea]. Disponible en <http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Immuno-analysis/Elisa.aspx>. [Última fecha de acceso 15 de octubre del 2012]

Otros documentos

- Cook, R.J. (1999). Science-based risk assessment for the approval and use of plants in agricultural and other environments. *In: Agricultural Biotechnology and the Poor: Proceedings of an International Conference.* Persley, G.J., Lantin, M.M. (eds.). Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), Washington. pp. 123-130.
- Demandas del sector 2011-9. ÚNICA: Desarrollo de materiales de referencia certificados, validación de métodos y fortalecimiento de la infraestructura de soporte de las redes de laboratorios para la inocuidad y calidad agroalimentaria.
- European Commission. 2006. Biotechnology & GMOs Unit Institute for Health and Consumer Protection DG Joint Research Centre. CRL assessment on the validation of an event specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR as carried out by Federal Institute for Risk Assessment (BfR). pp. 7-8

-
- Food and Agriculture Organization, 2009. Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados. Instrumento para capacitore. Italia. pp. 4-7
 - Ibarra, J. y Del Rincon Ma., 2009. Análisis e integración de la información sobre OGMs con eventos *Bt.*: Reporte final sobre el análisis de riesgo por su liberación. México. pp. 3-4
 - Ley Mexicana de Bioseguridad en Organismos Genéticamente Modificados, 2005
 - NAS (1987). Introduction of recombinant DNA-engineered organisms into the environment: Key issues. National Academy of Sciences, Washington, D.C. pp. 24.
 - Norma Oficial Mexicana NMX-Z005-IMNC-2009 Metrología – Vocabulario internacional de metrología-Conceptos fundamentales y generales, términos asociados (VIM)
 - Norma Oficial Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
 - Querci, M., Jermini, M. y Van den Eede G., 2007. Curso de Formación Sobre Análisis de La Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos - Manual del Participante. 2007. Sesión 2. Luxemburgo. pp.3-6
 - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2007. Situación actual y perspectivas del maíz en México (1996-2012), México, pp. 13-16, 77-78

ANEXO I

 <small>Institute for Reference Materials and Measurements</small>	 <small>European Reference Materials</small>														
<h3 style="margin: 0;">CERTIFICATE OF ANALYSIS</h3> <p style="margin: 0;">ERM® - AD413</p>															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="3" style="padding: 5px;">PLASMID DNA CONTAINING MON 810 MAIZE DNA FRAGMENTS</th> </tr> <tr> <th rowspan="2" style="width: 70%;"></th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Number</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">Certified value</th> <th style="text-align: center;">Uncertainty ²⁾</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Fragment of 5' <i>plant-P35S</i> junction DNA / plasmid ¹⁾</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">negligible</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Fragment of <i>hmg</i> DNA / plasmid ¹⁾</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">negligible</td> </tr> </table>		PLASMID DNA CONTAINING MON 810 MAIZE DNA FRAGMENTS				Number		Certified value	Uncertainty ²⁾	Fragment of 5' <i>plant-P35S</i> junction DNA / plasmid ¹⁾	1	negligible	Fragment of <i>hmg</i> DNA / plasmid ¹⁾	1	negligible
PLASMID DNA CONTAINING MON 810 MAIZE DNA FRAGMENTS															
	Number														
	Certified value	Uncertainty ²⁾													
Fragment of 5' <i>plant-P35S</i> junction DNA / plasmid ¹⁾	1	negligible													
Fragment of <i>hmg</i> DNA / plasmid ¹⁾	1	negligible													
<p>1) The sequence identity has been confirmed by dye terminator cycle sequencing of the <i>hmg</i> and 5' <i>plant-P35S</i> junction fragments present in <i>Zea mays</i> MON-02810-6.</p> <p>2) The uncertainty related to the sequencing method applied is negligible.</p>															

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

Following the dilution protocol given in Table 1, the minimum sample intake is 50 µL to perform the dilution series. In the PCR tubes 5 µL are used per PCR reaction.

NOTE

European Reference Material ERM®-AD413 was produced and certified under the responsibility of the IRMM according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials® co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-cm.org>).

Accepted as an ERM®, Geel, November 2007

Signed: 

Prof. Dr. Hendrik Emons
Unit for Reference Materials
EC-JRC-IRMM
Retsieseweg 111
2440 Geel, Belgium

All following pages are an integral part of the certificate.
Page 1 of 3

 <small>European Reference Materials</small>		
Indicative Values		
	Number ratio	
	Indicative value	Uncertainty ³⁾
Ratio between the number of 5' <i>plant-P35S</i> junction and <i>hmg</i> fragments in the plasmid	1.00 ¹⁾	0.06
	1.04 ²⁾	0.06

1) Measured in 1 laboratory by duplex rt-PCR and traceable to the specific procedure as described in the certification report.

2) Measured in 10 laboratories by simplex rt-PCR and traceable to the specific procedure as described in the certification report.

3) The uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement with a coverage factor $k = 2$, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The sample is composed of a solution of DNA containing a plasmid in which a 170 base pair (bp) fragment of the MON 810 5' *plant-P35S* junction as well as a 351 bp fragment of the maize endogenous high mobility group gene (*hmg*) have been inserted. The solution is made of 1 mmol/L TRIS, 0.01 mmol/L EDTA pH 7.0 and supplemented with 1 ng/µL of Col E1 plasmid DNA.

ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

Dye terminator sequencing.
Quantitative simplex and duplex real-time PCR.

PARTICIPANTS

Behörde für Umwelt und Gesundheit, Hamburg (DE) *
BioGEVES, Surgeres (FR) *
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin (DE) *
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Freiburg (DE) *
DEFRA - Central Science Laboratory, York (GB) *
EC-JRC Institute for reference Materials and Measurements (IRMM), Geel (BE) *
EC-JRC Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), Ispra (IT) *
Eurofins/WEJ Dept Biology 135, Hamburg (DE) *
Institut National de la Recherche Agronomique - Centre de Versailles – Laboratoire de Phytopathologie et Méthodologie de la Détection Végétale, Versailles (FR)
Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Melle (BE) *
Laboratoire National de la Protection des Végétaux d'Orléans, Flery les Aubrais (FR)
Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, FG13 Gentechnisches Überwachungslabor, Halle/Saale (DE) *
Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Dresden (DE) *
LGC Ltd, Teddington Middlesex (GB)
National Food Administration, Uppsala (SE) *
National Food Research Institute, Tsukuba (JP)
Nestlé Research Center Lausanne, Lausanne (CH) *
Scottish Agricultural Science Agency, Edinburgh, (GB)
TNO Nutrition and Food Research, Zeist (NL) *

* Measurements within the scope of accreditation to ISO 17025.

SAFETY INFORMATION

The usual laboratory safety precautions apply. Special care should be taken to avoid aerosol formation when preparing dilutions of the plasmid calibrant.

ERM®-AD413
Page 2 of 3

INSTRUCTIONS FOR USE

The ERM-AD413 calibrant is intended to be used exclusively with the quantification method ISO 21570:2005(E) D2 as carried out by the German Federal Institute for Risk Assessment (Berlin, DE) and assessed by the GMFF CRL (14/03/2006). The tube should be opened and the content diluted under a laminar flow to reduce the risk of contamination. It contains approximately 2×10^5 cp/μL. To prepare the calibration curve, label 9 empty tubes from 5×10^5 cp/μL to 5 cp/μL. 1 mmol/L Tris, 0.01 mmol/L EDTA pH 8.0 buffer should be used as plasmid dilution buffer. Proceed with the dilution series as described in Table 1. The dilution series should always be prepared freshly prior to a run. Each ERM-AD413 calibrant is sufficient to prepare 10 calibration curves for each target.

Table 1: Preparation of two calibration curves for the endogeneous and transgenic targets.

Starting concentration cp / μL	Resulting concentration cp / μL	¹⁾	²⁾	Dilution factor	DNA [μL]	Plasmid dilution buffer [μL]
2×10^5	5×10^3	E		4	50	150
5×10^3	10^3	E		5	50	200
10^5	2×10^4	E		5	50	200
2×10^4	10^4		T	2	100	100
10^4	2000	E	T	5	50	200
2000	1000	E		2	100	100
1000	200	E	T	5	50	200
200	20		T	10	50	450
20	5		T	50	50	150

¹⁾ "E" refers to the concentrations of the pDNA calibrant that will be used in rt-PCR for the detection of the endogenous target (namely 100000 cp / μL, 20000 cp / μL, 2000 cp / μL, 1000 cp / μL and 200 cp / μL).

²⁾ "T" refers to the concentrations of the pDNA calibrant that will be used in rt-PCR for the detection of the transgenic target (namely 10000 cp / μL, 2000 cp / μL, 200 cp / μL, 20 cp / μL and 5 cp / μL).

STORAGE

The sample should be kept at - 20°C prior to use. However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

LEGAL NOTICE

Neither IRMM, its contractors nor any person acting on their behalf:

- (a) make any warranty or representation, express or implied, that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights; or
- (b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from, the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for lost or damage arising solely and directly from the negligence of IRMM.

NOTE

A detailed technical report is available on www.em-crm.org. A paper copy can be obtained from IRMM on request.

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, B - 2440 Geel (Belgium)
Telephone: +32-(0)14-571.722 - Telefax: +32-(0)14-590.406

ANEXO II



9. UNCERTAINTY BUDGET AND CERTIFIED UNCERTAINTY

9.1. UNCERTAINTY EVALUATION

9.1.1. Conceptual considerations

The plasmidic calibrant is characterised for two properties, the number of each specific fragment per plasmid and the ratio between the number of those two fragments. Based on the sequence analyses, it can be concluded that the MON 810 event and the *hmg* DNA fragments are present as a single copy per plasmid. Three independent laboratories provided exactly the same sequence which was also the expected sequences as published in the NIH genetic sequence database (GenBank®). The DNA sequencing performed by forward and backward sequencing (on both strands) generated the correct sequence for the 3308 bp analysed. The uncertainty on the sequencing under those conditions can be considered as negligible. The number ratio between the 2 fragments is also 1 as only 1 copy of each target was cloned and found in the plasmid ERM-AD413. This ratio could be measured experimentally by simplex and duplex real-time PCR. As the calibrant will be used for the calibration of PCR measurement, the experimental proof that an effective ratio of 1 can be measured is provided in this report. There is a marginal uncertainty on this ratio which does not depend on the nature of the calibrant itself but on the experimental procedure used for the measurement. This uncertainty on the ratio has been calculated and is reported in this Section.

9.1.2. Uncertainty source "homogeneity"

In order to verify a Gaussian distribution, normal probability plots were prepared of the homogeneity data versus their quantile values (data not shown). The straight lines obtained in these plots were an indication of a Gaussian distribution of the data.

The relative maximum hidden heterogeneity (u_{re}^* , bb) did not vary considerably across the calibration curves and varied in a similar way for both analysed targets (Table 1). The relative between tube heterogeneity ($S_{bet, re}$) was higher than the relative maximum hidden heterogeneity and therefore also taken to determine the uncertainty of the homogeneity. Individual heterogeneity was determined separately for both sequences as well as the ratio heterogeneity of the ratio between the two targets. The relative between tube heterogeneity of that ratio was taken into consideration for the calculation and represented 0.0072 expressed in number fraction.

9.1.3. Uncertainty source "stability"

The material can be stored at -20 °C or below with a shelf life of 40 months. The calculated uncertainty associated to this shelf life is 0.025 expressed in number fraction. ERM-AD413 will be submitted to intensive stability monitoring, the shelf life may be extended as further evidence of stability becomes available.

9.1.4. Uncertainty source "batch characterisation"

An average ratio ($\bar{x} \pm s$) of 1.004 ± 0.014 ($N = 20$, $n = 24$) was obtained during the characterisation of the batch by duplex real time PCR. The uncertainty of this ratio was $u_{char} = [0.014/\sqrt{480}] = 0.0007$. The batch was further characterised during the commutability study by simplex PCR. An average ratio ($\bar{x} \pm s$) of 1.037 ± 0.007 ($N = 51$, $n = 2$) was then obtained with an uncertainty $u_{char} = [0.007/\sqrt{102}] = 0.0007$. The uncertainties associated to the two PCR methods applied were identical.

9.1.5. Uncertainty budget

The combined standard uncertainty of the indicative value comprises contributions from the between-tubes inhomogeneity at the recommended sample intake of 5 µL, from the long-term stability of the material (calculated for 6 months) and the batch characterisation (Table 5). To calculate the expanded uncertainty corresponding to a 95 % level of confidence a coverage factor of 2 was used.

Table 5: Uncertainty budget for the number fraction of maize event MON 810 in ERM-AD413

CRM	Standard uncertainty contribution Number fraction			Expanded uncertainty <i>U</i> (<i>k</i> = 2) Number fraction
	<i>u</i> ₁ ^{a)}	<i>u</i> ₂ ^{b)}	<i>u</i> _s ^{c)}	
ERM-AD413	0.0072	0.0251	0.0007	0.06

^{a)} standard uncertainty contribution resulting from the homogeneity assessment.

^{b)} standard uncertainty resulting from the stability of frozen plasmid during storage, extrapolated to 40 months.

^{c)} standard uncertainty resulting from the characterisation measured either by simplex or duplex PCR.

9.2. CERTIFIED VALUES

The cloned DNA sequences are certified to be identical to the respective *hmg* and MON 810 PCR targets from the method validated by the GMFF CRL and to be present each as one single copy per plasmid. Based on the sequence and purity assessment the theoretical number ratio between the two targets is equal to 1.

When measured by rt-PCR and taking into account the PCR efficiency of both reactions it can be verified to be equal to 1.00 in duplex rt-PCR and to 1.04 in simplex rt-PCR. The uncertainty on that value depending mainly from the uncertainty component of the long-term stability is given in Table 5.

ANEXO III



CENAM CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA

*Certificado de
Material de Referencia*

HARINA DE MAÍZ
CONTROL POSITIVO MON 810

DMR-436IIa

220
222
225

Clave única de identificación del certificado: CNM-MR-630-0455/2011

Valores Certificados.

Analito	Fración de número de copias, % copias/copias	Fración de número de copias, Incertidumbre (\pm) % copias/copias
Evento de modificación genética MON 810	37.35	1.87

La incertidumbre es la expandida con un factor de cobertura de $k = 2$, que define un nivel de confianza de aproximadamente el 95 %

Los números de las unidades amparadas por el presente certificado son: 002, 121, 171

Emitido por:


Q. en A. Judith Sáinz Uribe
Coordinador del programa MRTC

Aprobado por:


Dra. Mariana Arce Osuna
Jefe de la División de Materiales Orgánicos

Fecha de emisión: 30/05/2011

km 4,5 Carretera a Los Cués, El Marqués, Qro., C.P. 76246, México.
Apdo. Postal 1-100 Centro, Querétaro, Qro., C.P. 76000, México.
Tels.: 01 (442) 211.05.00 al 04, Fax: 211.05.28
130-AC-F0022



No. 17221

ANEXO IV

Resultados de la cuantificación de la secuencia MON810 en el material EMR-AD-413 sin digerir con una concentración nominal de 100 copias

Equipo: Open Array

Corrida 2

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
NTC	NaN	NaN	NaN	512	512	0	NaN - NaN
A1	0.481	0.3123	0.7407	55	34	9	0.3123 - 0.7407
A2	0.494	0.3269	0.7465	59	36	5	0.3269 - 0.7465
A3	0.7091	0.4978	1.0101	63	31	1	0.4978 - 1.0101
A4	0.5845	0.3987	0.8569	61	34	3	0.3987 - 0.8569
A5	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
A6	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
A7	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
A8	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
A9	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
A10	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
A11	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
B1	0.5341	0.3563	0.8006	58	34	6	0.3563 - 0.8006
B2	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
B3	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
B4	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
B5	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
B6	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
B7	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
B8	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
B9	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
B10	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
B11	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
C1	0.4877	0.3198	0.7438	57	35	7	0.3198 - 0.7438
C2	0.7259	0.5094	1.0344	62	30	2	0.5094 - 1.0344
C3	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
C4	0.4895	0.3268	0.7333	62	38	2	0.3268 - 0.7333
C5	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
C6	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
C7	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
C8	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
C9	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
C10	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
C11	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
D1	0.5222	0.3484	0.7826	59	35	5	0.3484 - 0.7826
D2	0.5914	0.3973	0.8802	56	31	8	0.3973 - 0.8802
D3	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
D4	0.4895	0.3268	0.7333	62	38	2	0.3268 - 0.7333
D5	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
D6	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
D7	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D8	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
D9	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
D10	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
D11	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
Promedio	0.44	0.29	0.67				

ANEXO V

Resultados de la cuantificación de la secuencia MON810 en el material EMR-AD-413 sin digerir con una concentración nominal de 200 copias

Equipo: Open Array

Corrida 5

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
A2	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
A3	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
A4	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
A5	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A6	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
A7	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
A8	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A9	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
A10	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
A11	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B1	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
B2	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B3	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B4	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
B5	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
B6	1.3863	1.0207	1.8828	64	16	0	1.0207 - 1.8828
B7	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
B8	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
B9	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
B10	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
B11	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
C1	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
C2	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
C3	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C4	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
C5	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
C6	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
C7	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
C8	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
C9	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
C10	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
C11	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
D1	NaN	NaN	NaN	0	0	64	NaN - NaN
D2	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
D3	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
D4	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
D5	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
D6	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
D7	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
D8	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
D9	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
D10	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
D11	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
NTC200	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
Promedio	0.76	0.54	1.07				

ANEXO VI

**Resultados de la cuantificación de la secuencia MON810 material EMR-AD-413 sin digerir
con una concentración nominal de 400 copias**

Equipo: Open Array

Corrida 5

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
A2	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A3	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
A4	3.0603	2.133	4.3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
A5	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
A6	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A7	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A8	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A9	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
A10	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
A11	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
B1	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
B2	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B3	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
B4	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
B5	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B6	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B7	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
B8	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B9	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
B10	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
B11	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C1	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
C2	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
C3	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
C4	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C5	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
C6	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C7	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
C8	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
C9	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
C10	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C11	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
D1	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
D2	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
D3	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
D4	1.3257	0.9749	1.8026	64	17	0	0.9749 - 1.8026
D5	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
D6	1.4508	1.0692	1.9686	64	15	0	1.0692 - 1.9686
D7	1.5198	1.1207	2.0611	64	14	0	1.1207 - 2.0611
D8	1.5198	1.1207	2.0611	64	14	0	1.1207 - 2.0611
D9	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
D10	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
D11	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
NTC400	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
Promedio	1.96	1.43	2.68				

ANEXO VII

Resultados de la cuantificación del material EMR-AD-413 digerido con una concentración nominal de 50 copias

Equipo: Open Array

Corrida 14

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1	0,3302	0,2076	0,5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
A2	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
A3	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
A4	0,2271	0,1317	0,3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
A5	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
A6	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
A7	0,2271	0,1317	0,3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
A8	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
A9	0,1886	0,1044	0,3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
A10	0,1886	0,1044	0,3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
A11	0,1886	0,1044	0,3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
B1	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
B2	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
B3	0,1158	0,0552	0,2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
B4	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
B5	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
B6	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
B7	0,1515	0,0788	0,2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
B8	0,1699	0,0913	0,316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
B9	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
B10	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
B11	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
C1	0,1515	0,0788	0,2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
C2	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
C3	0,0984	0,0442	0,2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
C4	0,2271	0,1317	0,3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
C5	0,1699	0,0913	0,316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
C6	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
C7	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
C8	0,1699	0,0913	0,316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
C9	0,2271	0,1317	0,3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
C10	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
C11	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
D1	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
D2	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
D3	0,1515	0,0788	0,2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
D4	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
D5	0,0984	0,0442	0,2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
D6	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
D7	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
D8	0,3522	0,2241	0,5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
D9	0,3087	0,1916	0,4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
D10	0,2271	0,1317	0,3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
D11	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
NTC50	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
Promedio	0,22	0,13	0,38				

ANEXO IX

Resultados de la cuantificación del material EMR-AD-413 digerido con una concentración nominal de 100 copias

Equipo: Open Array

Corrida 13

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1	0,5213	0,3534	0,769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
A2	0,6624	0,4628	0,948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
A3	0,3522	0,2241	0,5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
A4	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
A5	0,4212	0,2765	0,6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
A6	0,3747	0,2411	0,5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
A7	0,6035	0,4171	0,8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
A8	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
A9	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
A10	0,6035	0,4171	0,8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
A11	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
B1	0,4212	0,2765	0,6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
B2	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
B3	0,6624	0,4628	0,948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
B4	0,6931	0,4868	0,987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
B5	0,3977	0,2586	0,6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
B6	0,6931	0,4868	0,987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
B7	0,4212	0,2765	0,6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
B8	0,6035	0,4171	0,8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
B9	0,3977	0,2586	0,6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
B10	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
B11	0,3977	0,2586	0,6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
C1	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
C2	0,3522	0,2241	0,5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
C3	0,3302	0,2076	0,5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
C4	0,4453	0,2949	0,6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
C5	0,4453	0,2949	0,6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
C6	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
C7	0,5213	0,3534	0,769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
C8	0,4953	0,3334	0,736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
C9	0,4453	0,2949	0,6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
C10	0,3302	0,2076	0,5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
C11	0,3977	0,2586	0,6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D1	0,293	0,1792	0,4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
D2	0,3977	0,2586	0,6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D3	0,47	0,3139	0,7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
D4	0,4212	0,2765	0,6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
D5	0,3302	0,2076	0,5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
D6	0,4212	0,2765	0,6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
D7	0,6624	0,4628	0,948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
D8	0,5213	0,3534	0,769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
D9	0,3747	0,2411	0,5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
D10	0,4453	0,2949	0,6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
D11	0,4212	0,2765	0,6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
Promedio	0,46	0,31	0,69				

ANEXO VIII

Resultados de la cuantificación del material EMR-AD-413 digerido con una concentración nominal de 200 copias

Equipo: Open Array

Corrida 13

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
ntc 200	0,1546	0,1282	0,1864	768	658	0	0.1282 - 0.1864
A1	0,3037	0,2156	0,4277	126	93	2	0.2156 - 0.4277
A2	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A3	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
A4	1,0678	0,7777	1,4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A5	0,7249	0,5115	1,0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
A6	0,7916	0,5634	1,1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
A7	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
A8	1,1144	0,8136	1,5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
A9	1,0678	0,7777	1,4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A10	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A11	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B1	0,6624	0,4628	0,948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
B2	0,6325	0,4396	0,9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
B3	0,6931	0,4868	0,987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
B4	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
B5	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B6	0,8267	0,5907	1,1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
B7	0,94	0,6788	1,3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B8	0,7577	0,537	1,069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
B9	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
B10	0,94	0,6788	1,3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B11	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
C1	1,1632	0,8511	1,5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C2	0,7577	0,537	1,069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
C3	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
C4	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
C5	0,7249	0,5115	1,0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
C6	1,2685	0,9315	1,7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
C7	0,94	0,6788	1,3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
C8	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
C9	0,7249	0,5115	1,0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
C10	1,0678	0,7777	1,4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
C11	0,7916	0,5634	1,1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
D1	0,8473	0,593	1,2107	56	24	8	0.5930 - 1.2107
D2	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D3	1,0678	0,7777	1,4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
D4	1,0678	0,7777	1,4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
D5	1,1632	0,8511	1,5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
D6	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
D7	0,9808	0,7105	1,3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
D8	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D9	0,8267	0,5907	1,1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
D10	0,7249	0,5115	1,0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
D11	0,9008	0,6484	1,2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
Promedio	0,89	0,64	1,25				

ANEXO IX

Resultados de la cuantificación del material DMA-436IIa

Cuantificación con 0.1 ng por subareglo

Corrida 28

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
NTC,hmg	NaN	NaN	NaN	0	0	128	NaN - NaN
A1hmg	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
A2hmg	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
A3hmg	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
A4hmg	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
A5hmg	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
A6hmg	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
A7hmg	0,3087	0,1916	0,4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
A8hmg	0,3977	0,2586	0,6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
A9hmg	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
A10hmg	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
A11hmg	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
B1 hmg	0,3522	0,2241	0,5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
B2 hmg	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
B3 hmg	0,3302	0,2076	0,5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
B4 hmg	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
B5 hmg	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
B6 hmg	0,2671	0,1608	0,4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
B7 hmg	0,3522	0,2241	0,5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
B8 hmg	0,2469	0,146	0,4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
B9 hmg	0,3522	0,2241	0,5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
B10 hmg	0,2877	0,1759	0,4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
B11 hmg	0,1886	0,1044	0,3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
Promedio	0,28	0,17	0,46				
NTC,MON810	NaN	NaN	NaN	0	0	128	NaN - NaN
C1 MON810	0,1515	0,0788	0,2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
C2 MON810	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
C3 MON810	0,1699	0,0913	0,316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
C4 MON810	0,0645	0,0242	0,172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
C5 MON810	0,0813	0,0339	0,1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
C6 MON810	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
C7 MON810	0,1699	0,0913	0,316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
C8 MON810	0,1158	0,0552	0,2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
C9 MON810	0,1158	0,0552	0,2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
C10 MON810	0,1886	0,1044	0,3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
C11 MON810	0,0813	0,0339	0,1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
D1 MON810	0,1158	0,0552	0,2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
D2 MON810	0,1699	0,0913	0,316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
D3 MON810	0,048	0,0155	0,1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
D4 MON810	0,0813	0,0339	0,1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
D5 MON810	0,1515	0,0788	0,2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
D6 MON810	0,0984	0,0442	0,2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
D7 MON810	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
D8 MON810	0,2076	0,1178	0,366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
D9 MON810	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
D10 MON810	0,0645	0,0242	0,172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
D11 MON810	0,1335	0,0667	0,2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
Promedio	0,12	0,06	0,25				
Porcentaje	44,75	36,51	55,54				

Cuantificación con 1 ng por subarreglo

Corrida 7

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1 hmg	2,5494	1,8327	3,5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A2 hmg	2,3671	1,7158	3,2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
A3 hmg	2,7726	1,9691	3,904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
A4 hmg	2,213	1,6135	3,0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A5 hmg	2,5494	1,8327	3,5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A6 hmg	2,0794	1,5225	2,84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
A7 hmg	2,7726	1,9691	3,904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
A8 hmg	3,0603	2,133	4,3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
A9 hmg	3,4657	2,3381	5,1372	64	2	0	2.3381 - 5.1372
A10 hmg	3,0603	2,133	4,3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
A11 hmg	3,0603	2,133	4,3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
B1 hmg	2,3671	1,7158	3,2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B2 hmg	2,3671	1,7158	3,2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B3 hmg	3,4657	2,3381	5,1372	64	2	0	2.3381 - 5.1372
B4 hmg	2,3671	1,7158	3,2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B5 hmg	3,0603	2,133	4,3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
B6 hmg	2,5494	1,8327	3,5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
B7 hmg	2,5494	1,8327	3,5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
B8 hmg	2,0794	1,5225	2,84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B9 hmg	1,8563	1,366	2,5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
B10 hmg	2,7726	1,9691	3,904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
B11 hmg	3,4657	2,3381	5,1372	64	2	0	2.3381 - 5.1372
Promedio	2,68	1,89	3,78				
C1 MON810	1,0678	0,7777	1,4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
C2 MON810	1,3257	0,9749	1,8026	64	17	0	0.9749 - 1.8026
C3 MON810	1,2144	0,8903	1,6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
C4 MON810	1,1632	0,8511	1,5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C5 MON810	1,2685	0,9315	1,7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
C6 MON810	0,94	0,6788	1,3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
C7 MON810	0,863	0,619	1,2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
C8 MON810	1,3257	0,9749	1,8026	64	17	0	0.9749 - 1.8026
C9 MON810	1,1632	0,8511	1,5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C10 MON810	0,9808	0,7105	1,3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
C11 MON810	0,8267	0,5907	1,1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
D1 MON810	1,1632	0,8511	1,5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
D2 MON810	1,1632	0,8511	1,5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
D3 MON810	1,1144	0,8136	1,5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
D4 MON810	1,2685	0,9315	1,7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
D5 MON810	0,9808	0,7105	1,3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
D6 MON810	1,4508	1,0692	1,9686	64	15	0	1.0692 - 1.9686
D7 MON810	1,1144	0,8136	1,5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
D8 MON810	1,2144	0,8903	1,6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
D9 MON810	1,3863	1,0207	1,8828	64	16	0	1.0207 - 1.8828
D10 MON810	1,0234	0,7434	1,4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
D11 MON810	1,3863	1,0207	1,8828	64	16	0	1.0207 - 1.8828
Promedio	1,15	0,84	1,58				
Porcentaje	43,17	44,55	41,80				

ANEXO X

Resultados de la cuantificación de la hoja GM y sus mezclas; 10, 1 y 0.1%

Equipo: Open Array, Corrida: 20

Material: Hoja GM

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1 hmg	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A2 hmg	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
A3 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
A4 hmg	1.3863	1.0207	1.8828	64	16	0	1.0207 - 1.8828
A5 hmg	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A6 hmg	1.2685	0.9315	1.7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
A7 hmg	1.3257	0.9749	1.8026	64	17	0	0.9749 - 1.8026
A8 hmg	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A9 hmg	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A10 hmg	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A11 hmg	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
B1 hmg	1.3863	1.0207	1.8828	64	16	0	1.0207 - 1.8828
B2 hmg	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B3 hmg	1.3863	1.0207	1.8828	64	16	0	1.0207 - 1.8828
B4 hmg	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B5 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
B6 hmg	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B7 hmg	1.4508	1.0692	1.9686	64	15	0	1.0692 - 1.9686
B8 hmg	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
B9 hmg	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B10 hmg	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B11 hmg	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
C1 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
C2 hmg	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C3 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
C4 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
C5 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
C6 hmg	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
C7 hmg	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
C8 hmg	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
C9 hmg	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
C10 hmg	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
C11 hmg	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
D1 hmg	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D2 hmg	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
D3 hmg	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
D4 hmg	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
D5 hmg	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
D6 hmg	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D7 hmg	1.2685	0.9315	1.7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
D8 hmg	1.2685	0.9315	1.7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
D9 hmg	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D10 hmg	1.3257	0.9749	1.8026	64	17	0	0.9749 - 1.8026
D11 hmg	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
NTC	NaN	NaN	NaN	512	512	0	NaN - NaN
A1 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A2 MON810	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
A3 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A4 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
A5 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A6 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A7 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
A8 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A9 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
A10 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A11 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
B1 MON810	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
B2 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
B3 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
B4 MON810	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B5 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
B6 MON810	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
B7 MON810	0.5777	0.537	1.069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
B8 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
B9 MON810	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B10 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
B11 MON810	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
C1 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
C2 MON810	0.7577	0.537	1.069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
C3 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
C4 MON810	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
C5 MON810	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
C6 MON810	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C7 MON810	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
C8 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
C9 MON810	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
C10 MON810	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C11 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D1 MON810	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
D2 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
D3 MON810	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D4 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
D5 MON810	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
D6 MON810	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
D7 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D8 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
D9 MON810	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
D10 MON810	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D11 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088

Cálculos

Subarreglos considerados	Promedio de copias para cada secuencia		
	<i>hmg</i>	MON810	%GM
A1-A11	1.13	0.49	43.36
B1-B11	1.09	0.45	41.36
C1-C11	1.15	0.48	41.71
D1-C11	1.00	0.41	41.07
	PROMEDIO		41.87
	SD		1.03
	U (RSDIP)		0.51
	U Expandida		1.03
	U Relativa		2.45
	Raíz n		2.00

Mezcla 10% GM

Corrida: 18

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
A2 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A3 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
A4 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
A5 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A6 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A7 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A8 <i>hmg</i>	3.4657	2.3381	5.1372	64	2	0	2.3381 - 5.1372
A9 <i>hmg</i>	3.0603	2.133	4.3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
A10 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
A11 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
B1 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
B2 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
B3 <i>hmg</i>	3.4657	2.3381	5.1372	64	2	0	2.3381 - 5.1372
B5 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
B6 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B7 <i>hmg</i>	3.0603	2.133	4.3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
B8 <i>hmg</i>	3.0603	2.133	4.3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
B9 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
B10 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B11 <i>hmg</i>	4.1589	2.6056	6.6381	64	1	0	2.6056 - 6.6381
C1 <i>hmg</i>	3.0603	2.133	4.3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
C2 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C3 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C4 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C5 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
C6 <i>hmg</i>	1.8405	1.3515	2.5066	63	10	1	1.3515 - 2.5066
C7 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
C8 <i>hmg</i>	3.4657	2.3381	5.1372	64	2	0	2.3381 - 5.1372
C9 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
C10 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
C11 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
D1 <i>hmg</i>	2.7408	1.9395	3.8732	62	4	2	1.9395 - 3.8732
D2 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657

D3 hmg	3.0603	2.133	4.3907	64	3	0	2.1330 - 4.3907
D4 hmg	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
D5 hmg	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
D6 hmg	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D7 hmg	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
D8 hmg	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
D9 hmg	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D10 hmg	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D11 hmg	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
NTC	NaN	NaN	NaN	512	512	0	NaN - NaN
A1 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A2 MON810	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
A3 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A4 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
A5 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A6 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
A7 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
A8 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A9 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
A10 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
A11 MON810	0.9808	0.7105	1.3541	64	24	0	0.7105 - 1.3541
B1 MON810	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
B2 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
B3 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
B4 MON810	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
B5 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
B6 MON810	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
B7 MON810	0.7577	0.537	1.069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
B8 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
B9 MON810	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
B10 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
B11 MON810	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
C1 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
C2 MON810	0.7577	0.537	1.069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
C3 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
C4 MON810	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
C5 MON810	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
C6 MON810	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C7 MON810	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
C8 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
C9 MON810	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
C10 MON810	1.1632	0.8511	1.5897	64	20	0	0.8511 - 1.5897
C11 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D1 MON810	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
D2 MON810	1.0678	0.7777	1.4662	64	22	0	0.7777 - 1.4662
D3 MON810	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D4 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
D5 MON810	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
D6 MON810	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
D7 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
D8 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088
D9 MON810	0.8267	0.5907	1.1569	64	28	0	0.5907 - 1.1569
D10 MON810	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D11 MON810	1.0234	0.7434	1.4088	64	23	0	0.7434 - 1.4088

Cálculos

	Promedio de copias para cada secuencia en 100ng de ADN		
Subarreglos considerados	<i>hmg</i>	MON810	%GM
A1-A11	24.54	0.98	4.00
B1-B11	27.94	0.88	3.14
C1-C11	24.47	0.92	3.77
D1-C11	24.74	0.96	3.86
	PROMEDIO		3.69
	SD		0.38
	U (RSDIP)		0.19
	U Expandida		0.38
	U Relativa		10.39
	raiz n		2.00

Mezcla 1%

Corrida: 22

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
A2 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
A3 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A4 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
A5 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
A6 <i>hmg</i>	1.5198	1.1207	2.0611	64	14	0	1.1207 - 2.0611
A7 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
A8 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
A9 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
A10 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
A11 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B1 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
B2 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B3 <i>hmg</i>	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B4 <i>hmg</i>	1.3257	0.9749	1.8026	64	17	0	0.9749 - 1.8026
B5 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B6 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
B7 <i>hmg</i>	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
B8 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B9 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B10 <i>hmg</i>	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B11 <i>hmg</i>	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
C1 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C2 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
C3 <i>hmg</i>	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
C4 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
C5 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C6 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C7 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
C8 <i>hmg</i>	1.4508	1.0692	1.9686	64	15	0	1.0692 - 1.9686
C9 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
C10 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C11 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
D1 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
D2 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
D3 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466

D4 hmg	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
D5 hmg	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
D6 hmg	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
D7 hmg	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
D8 hmg	1.4508	1.0692	1.9686	64	15	0	1.0692 - 1.9686
D9 hmg	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D10 hmg	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
D11 hmg	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
NTC	NaN	NaN	NaN	768	768	0	NaN - NaN
A1 MON810	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
A2 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
A3 MON810	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
A4 MON810	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
A5 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
A6 MON810	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
A7 MON810	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
A8 MON810	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
A9 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
A10 MON810	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
A11 MON810	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
B1 MON810	0.7577	0.537	1.069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
B2 MON810	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
B3 MON810	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
B4 MON810	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
B5 MON810	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
B6 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
B7 MON810	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
B8 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
B9 MON810	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
B10 MON810	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
B11 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
C1 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
C2 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
C3 MON810	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
C4 MON810	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
C5 MON810	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
C6 MON810	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
C7 MON810	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
C8 MON810	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
C9 MON810	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
C10 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
C11 MON810	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
D1 MON810	0.5162	0.3473	0.7673	62	37	2	0.3473 - 0.7673
D2 MON810	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
D3 MON810	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
D4 MON810	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
D5 MON810	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
D6 MON810	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
D7 MON810	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
D8 MON810	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
D9 MON810	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
D10 MON810	0.7249	0.5115	1.0273	64	31	0	0.5115 - 1.0273
D11 MON810	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870

Cálculos

	Promedio de copias de cada secuencia en 100ng de ADN		
Subarreglos considerados	<i>hmg</i>	MON810	%GM
A1-A11	215.63	0.60	0.28
B1-B11	190.71	0.60	0.31
C1-C11	207.32	0.57	0.27
D1-C11	187.40	0.59	0.32
	PROMEDIO		0.30
	SD		0.02
	U (RSDIP)		0.01
	U Expandida		0.02
	U Relativa		7.70
	raiz n		2.00

Mezcla 0.1%

Corrida: 21

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
A1 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
A2 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
A3 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
A4 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
A5 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
A6 <i>hmg</i>	1.5198	1.1207	2.0611	64	14	0	1.1207 - 2.0611
A7 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A8 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
A9 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
A10 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
A11 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B1 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
B2 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
B3 <i>hmg</i>	2.5494	1.8327	3.5466	64	5	0	1.8327 - 3.5466
B4 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
B5 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
B6 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
B7 <i>hmg</i>	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B8 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
B9 <i>hmg</i>	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
B10 <i>hmg</i>	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
B11 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
C1 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C2 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
C3 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
C4 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C5 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
C6 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
C7 <i>hmg</i>	1.761	1.2976	2.3899	64	11	0	1.2976 - 2.3899
C8 <i>hmg</i>	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
C9 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
C10 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
C11 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
D1 <i>hmg</i>	2.0794	1.5225	2.84	64	8	0	1.5225 - 2.8400
D2 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226
D3 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D4 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D5 <i>hmg</i>	2.3671	1.7158	3.2657	64	6	0	1.7158 - 3.2657
D6 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
D7 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
D8 <i>hmg</i>	1.8563	1.366	2.5226	64	10	0	1.3660 - 2.5226

D9 <i>hmg</i>	1.9617	1.4406	2.6712	64	9	0	1.4406 - 2.6712
D10 <i>hmg</i>	1.674	1.2343	2.2702	64	12	0	1.2343 - 2.2702
D11 <i>hmg</i>	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351

Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
NTC	NaN	NaN	NaN	511	511	1	NaN - NaN
A1 MON810	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
A2 MON810	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
A3 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
A4 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
A5 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
A6 MON810	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
A7 MON810	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
A8 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
A9 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
A10 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
A11 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
B1 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
B2 MON810	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
B3 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
B4 MON810	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
B5 MON810	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
B6 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
B7 MON810	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
B8 MON810	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
B9 MON810	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
B10 MON810	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
B11 MON810	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
C1 MON810	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
C2 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
C3 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
C4 MON810	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
C5 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
C6 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
C7 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
C8 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
C9 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
C10 MON810	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
C11 MON810	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
D1 MON810	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
D2 MON810	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
D3 MON810	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
D4 MON810	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
D5 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
D6 MON810	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
D7 MON810	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
D8 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
D9 MON810	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
D10 MON810	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
D11 MON810	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955

Cálculos

	Copias por reacción de cada secuencia en 100ng de ADN		
Subarreglos considerados	<i>hmg</i>	MON810	%GM
A1-A11	204.755	0.062	0.030
B1-B11	202.743	0.066	0.032
C1-C11	218.525	0.057	0.026
D1-C11	210.618	0.075	0.036
		PROMEDIO	0.031
		SD	0.004
		U (RSDIP)	0.002
		U Expandida	0.004
		U Relativa	12.983
		raiz n	2.000

ANEXO XI

Cuantificación de la hoja GM por qPCR con plásmido sin digerir

Equipo: ViiA7

Corrida 1017

Well Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean
A1		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	21,110	21,123	0,012	100000	100000
A2		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	21,126	21,123	0,012	100000	100000
A3		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	21,132	21,123	0,012	100000	100000
A4		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	21,891	21,934	0,038	100000	100000
A5		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	21,959	21,934	0,038	100000	100000
A6		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	21,954	21,934	0,038	100000	100000
A7						Undetermined				
A8						Undetermined				
A9						Undetermined				
A10		hmg	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
A11		hmg	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
A12		MON810	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
B1		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,524	24,520	0,036	10000	10000
B2		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,554	24,520	0,036	10000	10000
B3		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,482	24,520	0,036	10000	10000
B4		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,446	25,427	0,021	10000	10000
B5		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,405	25,427	0,021	10000	10000
B6		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,430	25,427	0,021	10000	10000
B7						Undetermined				
B8						Undetermined				
B9						Undetermined				
B10	C- MR 185	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined				
B11	C- MR 185	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined				
B12	C-MR100	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined				
C1		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,955	27,938	0,023	1000	1000
C2		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,948	27,938	0,023	1000	1000
C3		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,911	27,938	0,023	1000	1000
C4		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	28,971	28,957	0,016	1000	1000
C5		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	28,959	28,957	0,016	1000	1000
C6		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	28,940	28,957	0,016	1000	1000
C7						Undetermined				
C8						Undetermined				
C9						Undetermined				
C10						Undetermined				
C11		MON810	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
C12	C-MR100	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined				
D1		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,330	31,365	0,107	100	100
D2		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,485	31,365	0,107	100	100
D3		hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,279	31,365	0,107	100	100
D4		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,413	32,385	0,024	100	100
D5		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,368	32,385	0,024	100	100
D6		MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,374	32,385	0,024	100	100

D7						Undetermined					
D8						Undetermined					
D9						Undetermined					
D10						Undetermined					
D11						Undetermined					
D12						Undetermined					
E1	MR275	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,965	22,952	0,028	28717,1	28983,97266	
E2	MR275	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,983	22,952	0,028	28373,72	28983,97266	
E3	MR275	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,938	22,952	0,028	29238,76	28983,97266	
E4	MR275	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,920	22,952	0,028	29606,31	28983,97266	
E5	MR275	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	31,956	31,858	0,170	134,7724	144,5076294	
E6	MR275	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	31,621	31,858	0,170	168,1406	144,5076294	
E7	MR275	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	32,003	31,858	0,170	130,6697	144,5076294	
E8	MR275	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	31,851	31,858	0,170	144,4478	144,5076294	
E9						Undetermined					
E10						Undetermined					
E11						Undetermined					
E12						Undetermined					
F1	MR222	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,940	22,945	0,003	29200,61	29109,57031	
F2	MR222	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,948	22,945	0,003	29044,93	29109,57031	
F3	MR222	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,946	22,945	0,003	29082,91	29109,57031	
F4	MR222	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22,945	22,945	0,003	29109,82	29109,57031	
F5	MR222	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,140	25,106	0,027	12131,18	12404,40234	
F6	MR222	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,098	25,106	0,027	12468,94	12404,40234	
F7	MR222	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,112	25,106	0,027	12349,82	12404,40234	
F8	MR222	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,074	25,106	0,027	12667,67	12404,40234	
F9						Undetermined					
F10						Undetermined					
F11						Undetermined					
F12						Undetermined					
G1	MR130	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,298	24,301	0,014	11685,76	11666,41113	
G2	MR130	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,285	24,301	0,014	11794,42	11666,41113	
G3	MR130	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,301	24,301	0,014	11662,74	11666,41113	
G4	MR130	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,319	24,301	0,014	11522,72	11666,41113	
G5	MR130	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,510	26,477	0,035	4909,715	5019,127441	
G6	MR130	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,492	26,477	0,035	4966,386	5019,127441	
G7	MR130	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,477	26,477	0,035	5018,705	5019,127441	
G8	MR130	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,428	26,477	0,035	5181,704	5019,127441	
G9						Undetermined					
G10						Undetermined					
G11						Undetermined					
G12						Undetermined					
H1	maiz 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,138	24,106	0,029	13015,42	13301,85156	
H2	maiz 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,083	24,106	0,029	13515,9	13301,85156	
H3	maiz 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,124	24,106	0,029	13147,28	13301,85156	
H4	maiz 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,081	24,106	0,029	13528,81	13301,85156	
H5	maiz 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,339	26,340	0,009	5494,58	5492,210938	
H6	maiz 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,350	26,340	0,009	5457,644	5492,210938	
H7	maiz 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,331	26,340	0,009	5524,409	5492,210938	
H8						Undetermined					
H9						Undetermined					
H10						Undetermined					
H11						Undetermined					
H12						Undetermined					

ANEXO XII

Cuantificación de la hoja GM por qPCR con plásmido digerido

Equipo: ViiA7

Corrida 1078

Well Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean
A1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	20,980	20,972	0,008	935,300	
A2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	20,964	20,972	0,008	935,300	
A3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	20,973	20,972	0,008	935,300	
A4	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	21,698	21,683	0,013	919,500	
A5	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	21,674	21,683	0,013	919,500	
A6	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	21,678	21,683	0,013	919,500	
A7						Undetermined				
A8						Undetermined				
A9		hmg	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
A10		hmg	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
A11		MON810	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
A12		MON810	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
B1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,423	24,409	0,021	99,000	
B2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,394	24,409	0,021	99,000	
B3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	Undetermined			99,000	
B4	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,144	25,146	0,012	99,000	
B5	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,159	25,146	0,012	99,000	
B6	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,136	25,146	0,012	99,000	
B7						Undetermined				
B8						Undetermined				
B9	C-MR184	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	36,419	36,507	0,124	0,037	0,035
B10	C-MR184	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	36,594	36,507	0,124	0,033	0,035
B11	C-MR100	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	39,464	39,146	0,450	0,010	0,013
B12	C-MR100	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	38,827	39,146	0,450	0,015	0,013
C1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,959	27,901	0,081	9,600	
C2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,844	27,901	0,081	9,600	
C3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	Undetermined			9,600	
C4	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	28,838	28,722	0,118	10,200	
C5	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	28,725	28,722	0,118	10,200	
C6	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	28,603	28,722	0,118	10,200	
C7						Undetermined				
C8						Undetermined				
C9						Undetermined				
C10						Undetermined				
C11						Undetermined				
C12						Undetermined				
D1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,414	31,396	0,072	1,000	
D2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,457	31,396	0,072	1,000	
D3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,317	31,396	0,072	1,000	
D4	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,387	32,289	0,117	1,000	
D5	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,321	32,289	0,117	1,000	
D6	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,160	32,289	0,117	1,000	

D7						Undetermined					
D8						Undetermined					
D9						Undetermined					
D10						Undetermined					
D11						Undetermined					
D12						Undetermined					
E1						Undetermined					
E2						Undetermined					
E3						Undetermined					
E4						Undetermined					
E5						Undetermined					
E6						Undetermined					
E7						Undetermined					
E8						Undetermined					
E9						Undetermined					
E10						Undetermined					
E11						Undetermined					
E12						Undetermined					
F1						Undetermined					
F2						Undetermined					
F3						Undetermined					
F4						Undetermined					
F5						Undetermined					
F6						Undetermined					
F7						Undetermined					
F8						Undetermined					
F9						Undetermined					
F10						Undetermined					
F11						Undetermined					
F12						Undetermined					
G1	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,008	24,028	0,030	127,228	125,613	
G2	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,079	24,028	0,030	121,441	125,613	
G3	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,074	24,028	0,030	121,810	125,613	
G4	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,029	24,028	0,030	125,476	125,613	
G5	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,045	24,028	0,030	124,189	125,613	
G6	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,000	24,028	0,030	127,929	125,613	
G7	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,035	24,028	0,030	124,978	125,613	
G8	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,006	24,028	0,030	127,434	125,613	
G9	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,008	24,028	0,030	127,266	125,613	
G10	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23,994	24,028	0,030	128,385	125,613	
G11						Undetermined					
G12						Undetermined					
H1	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,995	26,038	0,069	57,719	56,186	
H2	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,025	26,038	0,069	56,626	56,186	
H3	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,022	26,038	0,069	56,730	56,186	
H4	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,077	26,038	0,069	54,754	56,186	
H5	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,977	26,038	0,069	58,394	56,186	
H6	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,208	26,038	0,069	50,344	56,186	
H7	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,038	26,038	0,069	56,159	56,186	
H8	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,027	26,038	0,069	56,535	56,186	
H9	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25,960	26,038	0,069	59,042	56,186	
H10	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,055	26,038	0,069	55,556	56,186	
H11						Undetermined					
H12						Undetermined					

ANEXO XIII

Cuantificación de la hoja GM y mezclas 10, 1 y 0.1% GM por qpcr con plásmido sin digerir

Equipo: ViiA7

Corrida 1122

Well Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean
A1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	21,108	21,135	0,031	100.000,000	100.000,000
A2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	21,129	21,135	0,031	100.000,000	100.000,000
A3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	21,169	21,135	0,031	100.000,000	100.000,000
A4	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,264	24,317	0,041	12.185,383	11.765,566
A5	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,347	24,317	0,041	11.528,254	11.765,566
A6	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,304	24,317	0,041	11.862,201	11.765,566
A7	hoja 100%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,352	24,317	0,041	11.486,427	11.765,566
A8	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,981	26,981	0,019	5.348,300	5.347,593
A9	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,968	26,981	0,019	5.395,259	5.347,593
A10	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	26,969	26,981	0,019	5.391,369	5.347,593
A11	hoja 100%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	27,008	26,981	0,019	5.255,446	5.347,593
A12						Undetermined				
B1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,554	24,529	0,024	10.000,000	10.000,000
B2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,506	24,529	0,024	10.000,000	10.000,000
B3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	24,525	24,529	0,024	10.000,000	10.000,000
B4	mezcla10%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23,397	23,387	0,018	21.697,639	21.840,750
B5	mezcla10%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23,371	23,387	0,018	22.066,264	21.840,750
B6	mezcla10%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23,373	23,387	0,018	22.048,117	21.840,750
B7	mezcla10%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23,407	23,387	0,018	21.550,979	21.840,750
B8	mezcla10%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	29,636	29,639	0,062	938,880	937,464
B9	mezcla10%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	29,558	29,639	0,062	988,216	937,464
B10	mezcla10%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	29,655	29,639	0,062	926,868	937,464
B11	mezcla10%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	29,707	29,639	0,062	895,893	937,464
B12						Undetermined				
C1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,939	27,980	0,072	1.000,000	1.000,000
C2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	27,938	27,980	0,072	1.000,000	1.000,000
C3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	28,063	27,980	0,072	1.000,000	1.000,000
C4	mezcla 1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,286	24,436	0,148	12.006,232	10.899,619
C5	mezcla 1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,468	24,436	0,148	10.638,374	10.899,619
C6	mezcla 1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,365	24,436	0,148	11.391,461	10.899,619
C7	mezcla 1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,628	24,436	0,148	9.562,407	10.899,619
C8	mezcla 1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	32,992	33,168	0,200	104,058	93,296
C9	mezcla 1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	33,042	33,168	0,200	100,695	93,296
C10	mezcla 1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	33,202	33,168	0,200	90,686	93,296
C11	mezcla 1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	33,437	33,168	0,200	77,745	93,296
C12						Undetermined				
D1	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,384	31,516	0,173	100,000	100,000
D2	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,712	31,516	0,173	100,000	100,000
D3	plasmido	hmg	STANDARD	FAM	TAMRA	31,451	31,516	0,173	100,000	100,000
D4	mezcla 0.1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,094	24,071	0,022	13.644,378	13.849,757
D5	mezcla 0.1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,041	24,071	0,022	14.132,854	13.849,757

D6	mezcla 0.1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,073	24,071	0,022	13.837,656	13.849,757
D7	mezcla 0.1%	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24,078	24,071	0,022	13.784,142	13.849,757
D8	mezcla 0.1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	36,557	36,686	0,216	10,058	9,313
D9	mezcla 0.1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	36,793	36,686	0,216	8,619	9,313
D10	mezcla 0.1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	36,934	36,686	0,216	7,857	9,313
D11	mezcla 0.1%	MON810	UNKNOWN	FAM	TAMRA	36,460	36,686	0,216	10,719	9,313
D12						Undetermined				
E1	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	22,553	22,564	0,012	100.000,000	100.000,000
E2	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	22,562	22,564	0,012	100.000,000	100.000,000
E3	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	22,577	22,564	0,012	100.000,000	100.000,000
E4						Undetermined				
E5						Undetermined				
E6						Undetermined				
E7						Undetermined				
E8						Undetermined				
E9						Undetermined				
E10						Undetermined				
E11						Undetermined				
E12						Undetermined				
F1	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	26,068	26,005	0,070	10.000,000	10.000,000
F2	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	26,018	26,005	0,070	10.000,000	10.000,000
F3	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	25,929	26,005	0,070	10.000,000	10.000,000
F4						Undetermined				
F5						Undetermined				
F6						Undetermined				
F7						Undetermined				
F8						Undetermined				
F11	ntc	MON810	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
F12	ntc	MON810	NTC	FAM	TAMRA	Undetermined				
G1	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	29,330	29,430	0,117	1.000,000	1.000,000
G2	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	29,559	29,430	0,117	1.000,000	1.000,000
G3	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	29,400	29,430	0,117	1.000,000	1.000,000
G4						Undetermined				
G5						Undetermined				
G6						Undetermined				
G7						Undetermined				
G8						Undetermined				
G9	C-MR185	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined				
G10	C-MR185	hmg	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined				
H1	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	33,243	33,133	0,153	100,000	100,000
H2	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	32,958	33,133	0,153	100,000	100,000
H3	plasmido	MON810	STANDARD	FAM	TAMRA	33,199	33,133	0,153	100,000	100,000
H4						Undetermined				
H5						Undetermined				
H6						Undetermined				
H7						Undetermined				
H8						Undetermined				
H9						Undetermined				
H10						Undetermined				
H11						Undetermined				
H12						Undetermined				