



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Generación y comparación de plásmidos calibrantes para la detección cuantitativa del maíz genéticamente modificado T25

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Macías Hidalgo Víctor Francisco

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Facultad de Química

Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez
Facultad de Ciencias

Ciudad de México Septiembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A mis padres

Por haberme apoyado más que nadie durante todo este proceso, además de haberme guiado durante todo el camino que culmina en la finalización de este trabajo. Porque sin ustedes no estaría donde estoy ni sería quien soy ahora, han sido y serán la máxima fuente de sabiduría para mí.

A mi Tutora

Por haberme dado la confianza de formar parte de su equipo de trabajo. Sin su paciencia, guía y apoyo, la conclusión de este trabajo no podría ser tan satisfactorio como lo es. Gracias.

A todos aquellos con quienes compartí el tiempo y el espacio durante este proceso

PAIP-500-9006 de la Facultad de Química, UNAM por financiamiento recibido para desarrollo del proyecto.

ÍNDICE

1.-RESUMEN.....	9
2.- INTRODUCCIÓN.....	11
2.1.-Maíz Amarillo en México.....	11
2.2.-Importación de Maíz en México y su Relación Con la Presencia de Maíz GM.....	12
2.3.-Maíz T25.....	13
2.4.- Presencia de Polen GM (T25) en Miel Mexicana.....	15
3.-Justificación.....	17
4.- Antecedentes.....	19
4.1.-Materiales de Referencia Convencionales y Alternativos.....	19
4.2.- Plásmidos Calibrantes para T25.....	20
5.- Hipótesis.....	22
6.- Objetivo General.....	22
7.- Objetivos Particulares.....	23
8.- Diagrama Experimental.....	24
9.- Estrategia Experimental.....	25
10.- Metodología.....	27
10.1.- Selección de Secuencias Blanco.....	27
10.2.- Generación de Primers para Amplificación de Secuencia Blanco.....	30
10.3.- Pretratamiento de muestras	32
10.4.- Clonación de Secuencias.....	34
10.5.- Purificación de Amplicones Generados.....	35

10.6.- Ligación al Vector pJet1.2/Blunt Cloning Vector.....	35
10.7.- Generación de Bacterias Competentes <i>DH5α</i>	36
10.8.- Transformación de Bacterias Competentes <i>DH5α</i>	37
10.9.- Purificación de Plásmido.....	38
10.10.- Amplificaciones Confirmativas.....	39
10.11.- PCR Cross-Over.....	40
10.12.- Preparación de Curvas de Calibración.....	43
10.13.- Comparación de Eficiencias de Amplificación.....	46
10.14.- Determinación de LOD y LOQ.....	47
10.15.- Detección y cuantificación de muestras de maíz.....	48
11.-Resultados.....	49
11.1.- Determinación de pureza y calidad de amplificación en muestras de maíz T25 y Chalqueño.....	49
11.2.- Secuencias clonadas.....	51
11.3.- Identidad de Fragmentos Clonados.....	55
11.4.- Preparación de Calibrantes.....	60
11.5.-Eficiencias de Amplificación.....	62
11.6.-LOD Y LOQ.....	63
11.7.-Análisis de Muestras Problema.....	70
12.-Discusión.....	76
13.-Conclusiones.....	80
14.- Referencias.....	81
15.- Anexo.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Niveles de producción y consumo del maíz amarillo en México (2009 a 2015).....	11
Figura 2.- Mecanismo de acción de la fosfinotricina acetil transferasa.....	14
Figura 3.- Diagrama de la construcción genética integrada en la línea de maíz T25.....	14
Figura 4.- Detección de eventos no autorizados 2012.....	15
Figura 5.- Mapa del plásmido para la cuantificación de T25 generado por Kuribara.....	20
Figura 6.- Esquema de niveles de detección para una construcción genética.....	21
Figura 7.- Fragmento de la secuencia de la construcción del maíz T25.....	28
Figura 8.- Fragmento I de la secuenciación para pVHMG.....	43
Figura 9.- Evaluación de la calidad del DNA de maíz Chalqueño y T25.....	50
Figura 10.- Secuencia clonada del evento T25.....	51
Figura 11.- Secuencias clonadas de los genes endógenos.....	52
Figura 12.- Amplificación de los fragmentos <i>HMG</i> , <i>ADH</i> , <i>SSiib</i> y <i>T25</i>	53
Figura 13.- Fragmentos obtenidos mediante PCR Cross-Over.....	54
Figura 14.- PCR de confirmación en plásmidos finales.....	55
Figura 15.- Mapa del plásmido calibrante pVADH.....	57
Figura 16.- Mapa del plásmido calibrante pVSSIb.....	58
Figura 17.- Mapa del plásmido calibrante pVHMG.....	59
Figura 18.- Curva de calibración a partir de pVADH.....	61
Figura 19.- Amplificación de los fragmentos HMG y T25 de las muestras problema.....	71
Figura 20.- Cuantificación a muestra con 5% de Valor Teórico m/m.....	73
Figura 21.- Cuantificación a muestra con 2% de Valor Teórico m/m.....	74
Figura 22.- Cuantificación a muestra con 1% de Valor Teórico m/m.....	74
Figura 23.- Comparación gráfica de curvas de calibración.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Cebadores y sondas aprobadas y validadas.....	29
Tabla 2.- Cebadores generados para clonación de fragmentos endógenos y T25.....	31
Tabla 3.- Condiciones de reacción PCR para la amplificación de las secuencias blanco.....	34
Tabla 4.- Condiciones de Reacción en la ligación de los fragmentos a clonar en pJET1.2.....	36
Tabla 5.- Mezclas de digestión.....	40
Tabla 6.- Condiciones de ligación de fragmentos para PCR Cross-Over.....	41
Tabla 7.- Mezclas de ligación y par de cebadores utilizados en el PCR Cross-Over.....	42
Tabla 8.- Longitud (pares de bases) y peso molecular de los plásmidos calibrantes.....	44
Tabla 9.- Concentración en número de copias de los stocks generados con los plásmidos calibrantes.....	45
Tabla 10.- Concentración en número de copias de los puntos de calibración generados.....	45
Tabla 11.- Cantidades y niveles de concentración final de las muestras generadas.....	48
Tabla 12.- Valores de concentración y pureza de gDNA del maíz Chalqueño y T25.....	49
Tabla 13.- Identidad de los genes.....	56
Tabla 14.- Concentraciones de los materiales de calibración.....	60
Tabla 15.- Eficiencias de amplificación y coeficientes de correlación (R2).....	63
Tabla 16.- LOD para plásmido pVHMG.....	64
Tabla 17.- LOD para plásmido pVADH.....	64
Tabla 18.- LOD para material de referencia AOCS 0306-H6.....	65
Tabla 19.- Ensayo LOQ con pVHMG (5 copias).....	66
Tabla 20.- Ensayo LOQ con pVADH (5 copias).....	66
Tabla 21.- Ensayo LOQ con AOCS 0306-H6 (5 copias).....	67
Tabla 22.- Ensayo LOQ con pVHMG (10 copias).....	68
Tabla 23.- Ensayo LOQ con pVADH (10 copias).....	68
Tabla 24.- Ensayo LOQ con AOCS 0306-H6 (10 copias).....	69
Tabla 25.- Valores de % GM cuantificados con pVHMG.....	72
Tabla 26.- Valores de % GM cuantificados con AOCS 0306-H6.....	72

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
<i>ADH</i>	Alcohol Deshidrogenasa
AOCS	American Oil Chemist's Society
bp	Pares de bases
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor
CERA	Center for Environmental Risk Assessment
CIBIOGEM	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
cp	Número de copias
Ct	Cycle Treshold
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos de América
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
gDNA	Ácido Desoxirribonucleico Genómico
GM	Genéticamente Modificado
GMDD	GMO Detection Database
<i>HMG</i>	Grupo de alta Movilidad
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
ISIS	Institute of Science in Society
JRC	Joint Research Center
kb	Kilobases
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	Luria Bertani
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
m	Pendiente de la recta

m/m	Masa/masa
MCS	Sitio de Clonación Múltiple
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Millilitros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NOS	Nopalina Sintetasa
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
<i>PAT</i>	Fosfinotricina Acetil Transferasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
<i>P35S</i>	Promotor Constitutivo del Virus del Mosaico de la Coliflor
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Coficiente de Desviación Estándar Relativo
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SD	Desviación Estándar
seg	Segundos
<i>SSIb</i>	Almidón Sintetasa
TAE	Tris-acetato-EDTA
TLCAN	Tratado de Libre Comercio de América del Norte
<i>T35S</i>	Terminador Constitutivo del Virus del Mosaico de la Coliflor
T7	Terminador T7
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTR	Untranslated Region
V	Voltios

1.- RESUMEN

México es considerado el centro de origen y diversificación del maíz, teniendo este cultivo un papel central en el origen y diversificación de la agricultura entre las civilizaciones indígenas mesoamericanas. En la actualidad, el maíz sigue teniendo un papel central en la alimentación y agricultura mexicanas, y el país cuenta con alrededor de 60 razas nativas conocidas (Kato et al., 2009), representando esto una gran diversidad genética la cual debe ser protegida y aprovechada.

Dada la gran importancia histórica de este cultivo, México es uno de los mayores productores de maíz a nivel mundial, sin embargo es a su vez un país que importa una gran cantidad de este grano debido a que los Estados Unidos de América (EUA) son el mayor productor de maíz en el mundo y a que México sostiene el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) con este país. Alrededor del 90% de la importación de maíz que se realiza en México proviene de EUA, en donde una gran mayoría de la producción se trata de semillas genéticamente modificadas (GM).

Este gran intercambio de semillas entre México y EUA, así como el complejo manejo del maíz en nuestro país, complica el monitoreo de las variedades GM que ingresan a nuestra frontera, por lo que la presencia no autorizada de plantas GM en el ambiente es una posibilidad latente. Un ejemplo de esto fue la aparición de polen de la variedad T25 en mieles de Yucatán reportado por la empresa Intertek en 2012 en un lote de mieles con destino a ser exportado a Europa. La península

de Yucatán representa el 40% de la producción de miel a nivel nacional y tiene como mercado principal a Europa, por lo que eventos como el mencionado representan una gran pérdida económica para los apicultores y para el país.

Al ser el T25 una variedad no autorizada para su liberación en México, el material de referencia necesario para realizar cuantificaciones evento específicas es costoso y de difícil obtención, por lo que la generación de un material de referencia alternativo propio fue algo necesario y de gran importancia.

Basados en desarrollos anteriores, se logró obtener un material de referencia (plásmido) con el cual es posible realizar detecciones cuantitativas específicas con un desempeño comparable al obtenido con un material de referencia convencional.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- MAÍZ AMARILLO EN MÉXICO

En México, el maíz es el cultivo que forma la base para la alimentación y es uno de los principales países consumidores a nivel mundial sin embargo, a pesar de ser el cuarto productor a nivel mundial, una gran cantidad de maíz debe ser importado; 10.33 millones de toneladas en 2014 (SAGARPA, 2016). Este fenómeno ocurre debido a que la mayor parte de la producción nacional consiste en maíz blanco, el cual está destinado para el consumo directo humano. Es el caso del maíz para forraje y usos industriales, conocido como maíz amarillo o maíz forrajero (destinado en 74% a usos pecuarios y 19.5% a la industria almidonera), en donde la producción nacional solo cubre un 18.47% de las cantidades requeridas para la industria productora de carne, leche, huevo y almidonera (Figura 1).

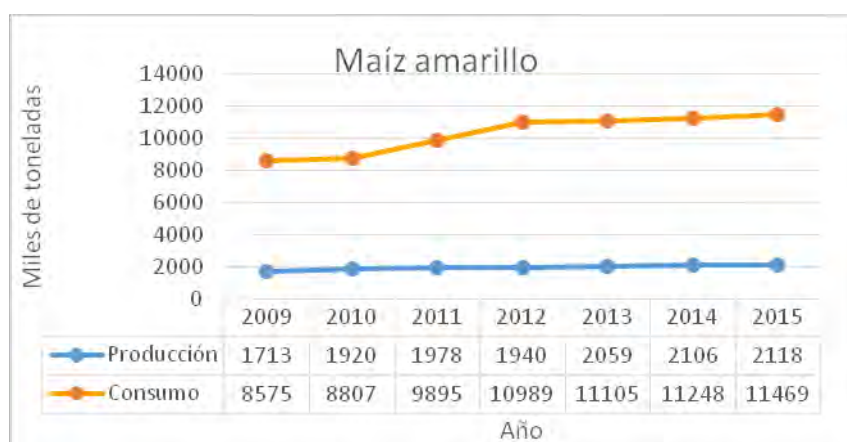


Figura 1.- Niveles de producción y consumo del maíz amarillo en México (2009 a 2015). Se puede observar que se tiene un déficit de la producción de maíz amarillo, siendo del 81.53% para el año 2015 (SAGARPA, 2016)

2.2.- IMPORTACIÓN DE MAÍZ EN MÉXICO Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE MAÍZ GM.

A partir de la entrada del TLCAN el 1º de Enero de 1994, México ha ido aumentando la importación de maíz amarillo de los Estados Unidos (Comisión de Agricultura, 2000) hasta un porcentaje actual de aproximadamente el 88.7% del total que se importa (FIRA, 2015). Los Estados Unidos han apoyado el desarrollo de OGMs con propósitos de investigación, aplicaciones prácticas y comerciales. Una de estas aplicaciones es la generación de cultivos GM, dentro de la cual este país es líder en su producción mundial (ISAAA ,20016). En el caso del maíz un 90% son GM ya para el año 2012 (González, 2014).

Esta es la razón de que un alto porcentaje del maíz amarillo importado en México corresponda a variedades GM, siendo un panorama difícil de modificar dado que los Estados Unidos son el mayor productor mundial de maíz y socio mayoritario de México en el TLCAN.

2.3.- MAÍZ T25

Dentro de las diversas variedades de maíces GM en el mundo se encuentra la del maíz T25, también conocido con el código internacional como ACS-ZMOO3-2. Dicha variedad de maíz fue desarrollada por Bayer CropScience en 1995, a partir de maíces de variedad diente amarillo que fue modificado genéticamente para expresar tolerancia a glufosinato de amonio, el ingrediente activo en los herbicidas de fosfinotricina (Basta®, Rely®, Finale® y Liberty®). El glufosinato es químicamente parecido al glutamato y actúa inhibiendo a la enzima glutamina sintetasa, la cual está involucrada en la síntesis de glutamina, por lo que hay un incremento en la concentración de amoniaco en los tejidos de la planta lo que eventualmente produce la muerte celular.

El gen *pat* introducido en esta variedad de maíz, se deriva de la cepa Tu494 de *Streptomyces viridochromogenes*, y codifica la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) la cual modifica e inactiva al glufosinato de amonio por medio de una acetilación lo que confiere a la planta la resistencia al mismo. Este gen se encuentra ligado a un promotor y terminador constitutivos (35-S) derivados del virus de mosaico de la coliflor (CaMV), con lo cual se tiene una expresión de la proteína en todos los tejidos de la planta (Figura 2).

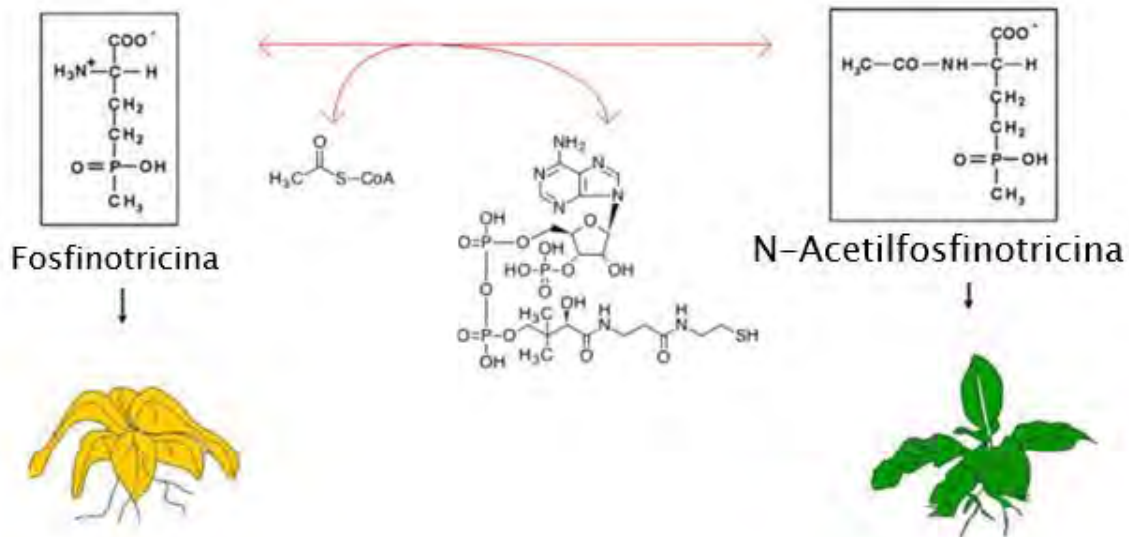


Figura 2.- **Mecanismo de acción de la fosfinitricina acetyl transferasa.** La enzima cataliza la adición de un grupo acetilo a partir de Acetil Coenzima A a la fosfinitricina con lo cual este compuesto deja de tener su actividad de inhibidor (KEGG, 2016).

Los análisis moleculares realizados al T25, muestran que esta variedad de maíz contiene sólo una copia de la construcción insertada de DNA. La construcción se compone de una copia truncada del gen *bla*; β-lactamasa, un sitio Ori-pUC intacto y el casete P-35S-*pat*-T-35S. (CERA ,2016) (Figura 3).

Plant DNA	CaMV Fragment	pUC18	P-35S	G	pUC18	pat	linker	pUC18	C	T-35S	pUC18
-----------	---------------	-------	-------	---	-------	-----	--------	-------	---	-------	-------

Figura 3.- **Diagrama de la construcción genética integrada en la línea de maíz T25.** Se observa que se compone de un fragmento trunco de la región promotora 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV), 4 fragmentos del plásmido pUC18, el promotor 35S (P-35S), el gen *pat* (*pat*), y el terminador T-35S (T-35S), todo esto flanqueado por el DNA genómico del maíz transformado. La G y la C representan bases nitrogenadas intercaladas (GMDD, 2016).

Dado que la producción y viabilidad del polen no fueron afectadas por la modificación genética, la dispersión del mismo y el potencial de cruce no deben diferir de otras variedades. El intercambio de genes entre esta variedad y otros maíces cultivados debe ser similar al que ocurre de manera natural (CERA, 2016).

En México, la importación para el uso de esta variedad de maíz se aprobó el 27 de Abril de 2007, para ser utilizado como alimento humano o animal y para el procesamiento industrial; sin embargo su liberación al medio ambiente mediante siembra no ha sido autorizada (CIBIOGEM, 2016).

2.4.- PRESENCIA DE POLEN GM (T25) EN MIEL MEXICANA

En el año 2012, una empresa Alemana; Intertek, en su trabajo Annual Report Honey Analysis, menciona que tras un análisis por triplicado realizado entre Enero y Diciembre del mismo año a diversas mieles importadas se encontró una serie de muestras positivas al promotor 35S (originaria del virus del mosaico de la coliflor) y el terminador NOS (proveniente de la nopalina sintetasa), secuencias ampliamente utilizadas en la generación de plantas GM e indicativas de su presencia. Se procedió entonces a hacer un análisis específico a GMs no autorizados en Europa, lugar donde al momento del análisis la variedad T25 no estaba autorizada, y entre éstos se encontró el maíz T25 (Figura 4). Dicha miel tenía como procedencia La Península de Yucatán en México.

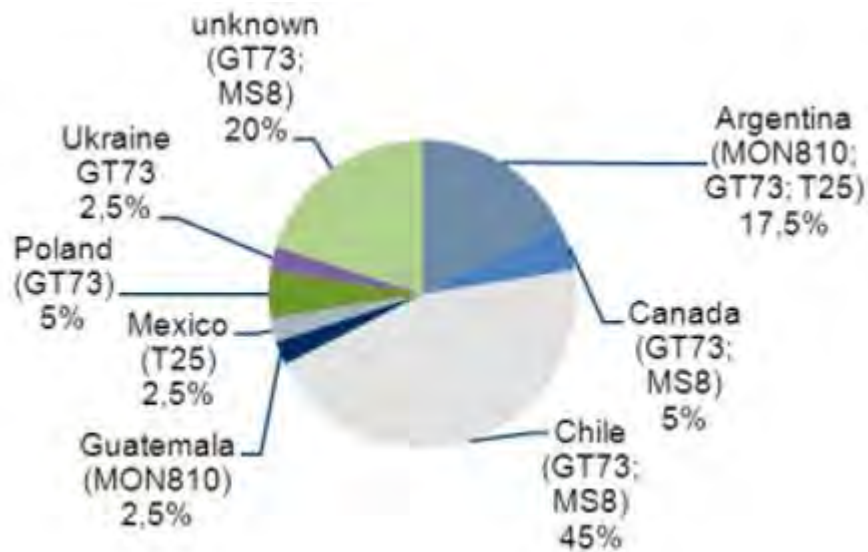


Figura 4.- **Detección de eventos no autorizados 2012.** En esta gráfica tomada del Annual Report Honey Analysis se puede observar que uno de los orígenes de la miel reportada como contaminada por T25 es México (Intertek, 2012)

Actualmente el grupo de trabajo de las Dras. Amanda Gálvez y Maricarmen Quirasco ha detectado polen GM en muestras de miel de la Península de Yucatán colectada en 2012, mediante un proyecto comisionado por CONABIO. Los resultados publicados hasta ahora (Gálvez y Quirasco, 2013) muestran la presencia de una cantidad importante de polen de maíz y también de soya convencional y GM en algunos casos.

Además de esto se encontraron en dichas mieles señales positivas para el promotor 35S y el terminador *NOS* en cantidades variables (Comunicación personal Gálvez A. 2016, resultados no publicados), lo que podría confirmar la aseveración de la empresa Intertek acerca de la presencia de polen de maíz T25.

Las repercusiones que podría tener el que se confirmara este hecho son importantes, ya que se comprobaría que una variedad de maíz ha sido sembrada de manera ilegal en México, además de poner en duda las medidas de contención que se han tomado en el país para el uso confinado y la capacidad de controlar la presencia de maíz GM en el ambiente.

3.- JUSTIFICACIÓN

La presencia de polen transgénico en las mieles de la Península de Yucatán representa un preocupante. La variedad reportada en el análisis de 2012 (T25) no se encuentra permitida para su siembra en México, sin embargo, su presencia es plausible dado que dicha variedad se encuentra autorizada en los Estados Unidos desde 1995 (CERA, 2016) país del cuál México importa alrededor de 10 millones de toneladas anualmente (González et al., 2014) y donde a partir de 1993, una semilla GM puede ser tratada como convencional con respecto a su seguridad alimenticia (ISIS, 2014), aunado al hecho de que México firmó un acuerdo trilateral en octubre de 2003 en el marco del TLCAN respecto del artículo 18.2 (a) del Protocolo de Cartagena (CONACYT, 2017) podría explicar la presencia de variedades no aprobadas para siembra en el campo. Dicho acuerdo en su anexo técnico indica que el nivel de mezcla de granos transgénicos considerado como no intencional o adventicio es de un 5%, y que los porcentajes menores hallados en los cargamentos no necesitan ser etiquetados como “puede contener OGM” (may contain GMO) en la documentación del cargamento (Gutiérrez, 2010).

México es el quinto productor de miel a nivel mundial, y la producción de miel en la Península de Yucatán representa un 40% del total de la misma a nivel nacional. Esta es una actividad productiva que sostiene a alrededor de 40,000 trabajadores y sus familias con una derrama económica de unos 400 millones de pesos al año (Claridades Agropecuarias, 2010).

El 95% de esta producción es exportada, siendo su principal mercado la Unión Europea donde la presencia de ciertos eventos GM autorizadas en México no son tolerados, teniendo como resultado el rechazo total de un lote. También está el caso de las mieles comercializadas como orgánicas donde la simple presencia de un OGM aun siendo autorizado por ambas jurisdicciones, repercute en el valor comercial del producto. Es por esto que una contaminación de polen transgénico en la miel resulta una seria preocupación para los apicultores y el campo mexicano.

Para que sea posible monitorear y cuantificar la presencia de un OGM, es necesario contar con el material de referencia apropiado, sin embargo, en el caso del maíz T25 en México esto resulta complicado debido a que al no ser permitida su siembra en México, no se cuenta con este material. Actualmente el material de referencia se comercializa a través de la American Oil Chemist's Society (AOCS) y consta de DNA extraído de las hojas del maíz, razón que lo convierte en un material costoso y escaso, además de que la complicada situación legal del maíz GM en México lo vuelve de difícil importación. El hecho de contar con un material de referencia alternativo propio sería muy valioso para nuestro país.

Por tratarse de un material de fácil producción y manejo, se decidió generar un plásmido calibrante en el cual era necesario clonar una secuencia única para T25 y una endógena de maíz para poder realizar ensayos cuantitativos.

4.- ANTECEDENTES

4.1.- MATERIALES DE REFERENCIA CONVENCIONALES Y ALTERNATIVOS

Los materiales de referencia en la detección de OGMs sirven como controles positivos y negativos para análisis cuantitativos. En la mayoría de los casos se usan harinas y granos GM como materiales de referencia (mezclados o no con harinas o granos convencionales), sin embargo, este tipo de materiales presenta una serie de desventajas como el requerir una fuente constante de material derivado de plantas, el costo y el hecho de que la cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) de una muestra suele variar dependiendo del tejido, la variedad y factores ambientales (Holst-Jensen et al, 2012).

Hay materiales de referencia alternativos como los oligonucleótidos sintéticos o fragmentos clonados con la misma secuencia de DNA que el blanco presente en un material de referencia convencional. Para este fin se utiliza el DNA genómico purificado como fuente de la secuencia, a partir de la cual ésta se puede copiar y amplificar utilizando algún vector de clonación (plásmidos). Este tipo de material de referencia tiene la ventaja de ser fácilmente distribuido, purificado y producido en grandes cantidades.

4.2.- PLÁSMIDOS CALIBRANTES PARA T25

Previamente se generó un plásmido que se suponía específico en la detección y cuantificación de T25 (Kuribara, 2002), sin embargo resultó que comparte la secuencia blanco con las variedades de maíz GM T14 así como la soya Liberty Link y la colza T45 ya que utilizaron una región común en su construcción por lo que entonces aún no se tiene un plásmido evento específico para T25 (Figura 5).

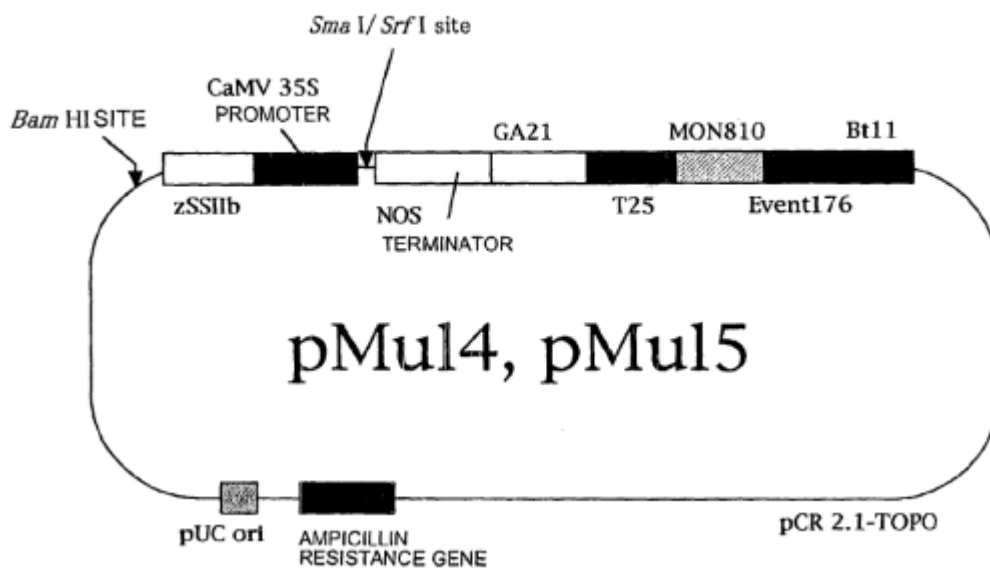


Figura 5.- **Mapa del plásmido para la cuantificación de T25 generado por Kuribara.** En este plásmido la secuencia blanco es una región de unión entre el promotor 35-S y el gen pat, secuencia que es compartida por el maíz T14, la soya Liberty Link y la colza T45 (Kuribara, 2002).

Adicionalmente se conoce, que al usar como blanco las secuencias correspondientes a las regiones de integración, es decir las secuencias compuestas de las bases terminales del DNA insertado y las bases adyacentes del genoma del hospedero en el locus de inserción, se consigue justo el tipo de análisis más adecuado para la identificación y cuantificación de un OGM de

manera específica; evento específico, (Holst-Jensen, 2012). En la Fig. 5 aparece un esquema que indica la posible especificidad para el diseño de cebadores y sondas, aclarando lo anterior.

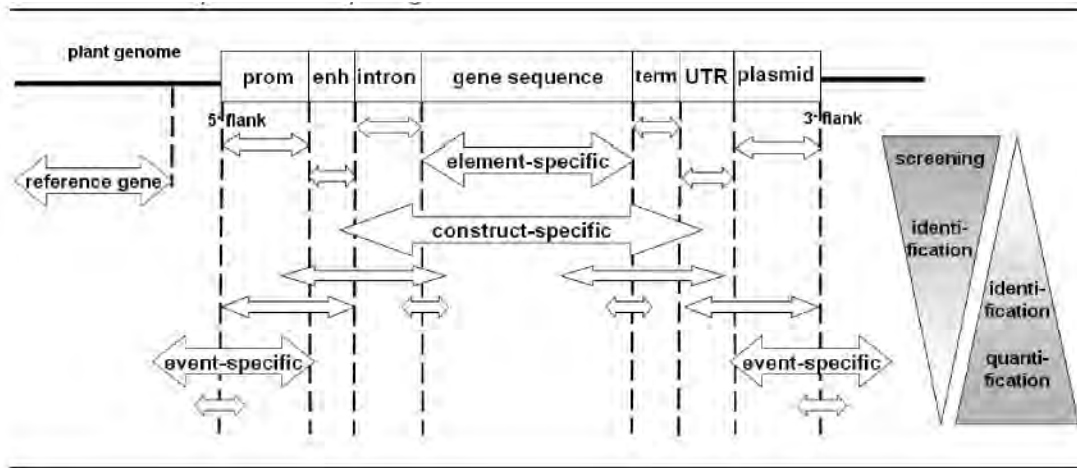


Figura 6.- Esquema de niveles de detección para una construcción genética.

La integración de una construcción genética comprende siete elementos insertados en el genoma de una planta (promotor, enhancer, intrones, secuencia del gen introducido, terminador, región UTR y fragmentos del plásmido usado para la construcción) a través de cierto evento de transformación y por lo tanto flanqueado por secuencias de DNA específicas. Los distintos niveles de especificidad que tiene un análisis dependen de cual sea la secuencia blanco. En el caso de un análisis evento específico, la secuencia blanco que se busca es la región de unión entre el genoma de la planta y el extremo ya sea 5' o 3' de toda la construcción insertada (Holst-Jensen A., 2012)

5.- HIPÓTESIS

Es posible generar al menos un plásmido calibrante específico para T25 con un desempeño comparable al obtenido usando el material de referencia convencional (DNA genómico).

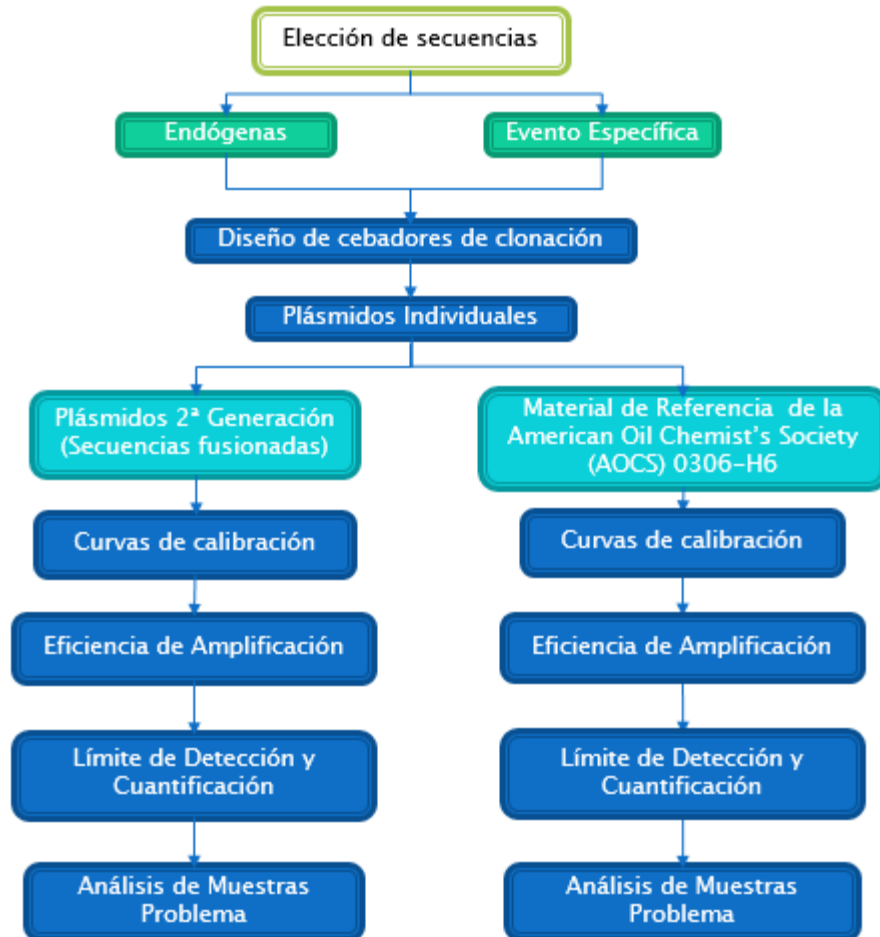
6.- OBJETIVO GENERAL

Generar y comparar 3 plásmidos calibrantes con genes endógenos distintos y una secuencia para la detección evento específica de maíz T25.

7.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar las secuencias de tres genes endógenos propuestos; el grupo de alta movilidad (*hmg*), la alcohol deshidrogenasa (*adh1*) y la sintetasa de almidón (*ssIIb*).
- Clonar una secuencia que sirva para la detección evento específica de la línea de maíz T25.
- Generar tres plásmidos que contengan una de las secuencias endógenas elegidas además de la secuencia evento específica T25.
- Comparar la eficiencia de amplificación en reacciones de qPCR de los tres fragmentos endógenos elegidos y la secuencia evento específica, amplificándolos a partir de un material de referencia certificado (gDNA) y de los plásmidos generados.
- Determinar el Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ) con los plásmidos calibrantes y comparar con el material de referencia convencional (gDNA de T25).
- Utilizar el plásmido con el mejor desempeño para realizar análisis en muestras problema y comparar con el material de referencia convencional.

8.- DIAGRAMA EXPERIMENTAL



9.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se decidió generar tres plásmidos calibrantes distintos, con el propósito de utilizar un gen endógeno de referencia diferente en cada uno de ellos y de este modo poder evaluar su desempeño en la cuantificación de T25. La decisión de qué genes utilizar se basó en resultados de análisis previos realizados a los genes endógenos más comúnmente usados (Tandance, A. 2009). Además de las secuencias endógenas era necesario contar con una secuencia única (evento específico) para el maíz que se pretende cuantificar (T25). La elección de dicha secuencia se basó en lo reportado por la literatura y el propio fabricante del evento (European Commission, 2005).

Para generar un plásmido calibrante único para T25, era necesario que la secuencia evento específica y la endógena se encontrasen ambas contenidas en un solo plásmido, a modo de obtener una relación 1:1 que es lo que se tiene en el DNA genómico de esta variedad de maíz, por lo que se decidió realizar la construcción de los tres plásmidos calibrantes en dos etapas. En la primera etapa las secuencias endógenas (*hmg*, *adh* y *ssiib*) y la secuencia específica (T25) fueron clonadas por separado en plásmidos individuales, de modo tal que se tenía un total de 4 plásmidos a partir de los cuales las secuencias fueron amplificadas vía replicación bacteriana. Una vez que se tuvo con suficiente material plasmídico, las secuencias seleccionadas fueron escindidas mediante reacciones de digestión, el DNA digerido fue ligado (un gen endógeno ligado a la secuencia evento específica) y posteriormente amplificado mediante la técnica de "PCR-Crossover" y usado para generar los tres plásmidos calibrantes finales en donde se

encuentran fusionadas las secuencias endógeno y evento específica. Estos plásmidos fueron concentrados para generar lotes de los cuales tomar las alícuotas para trabajar. A partir de las alícuotas se generaron distintos niveles de concentración (dilución logarítmica) con los cuales generar las curvas de calibración. Todos los lotes, alícuotas y diluciones se guardaron a -20°C hasta su uso. Se obtuvo un material de referencia certificado (DNA genómico) de T25 comprándolo a la American Oil Chemist's Society en cuyo catálogo se denomina como AOCS 0306-H6. Este material fue tratado de la misma forma que los plásmidos calibrantes e igualmente resguardado a -20 °C.

Los plásmidos y material de referencia fueron entonces sometidos a las pruebas de eficiencia de amplificación, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Se realizó una prueba final seleccionando el plásmido con el mejor desempeño, en donde se comparó con el material de referencia certificado a través de la cuantificación de una muestra problema.

10.- METODOLOGÍA

10.1- SELECCIÓN DE SECUENCIAS BLANCO

Basados en el trabajo de Tandance y colaboradores (2009) en donde reportan la eficiencia, precisión y exactitud de varios genes endógenos frecuentemente utilizados, se decidió utilizar los tres que mostraron los mejores resultados: la alcohol deshidrogenasa (*ADH*), la almidón sintasa (*SSI**b***) y el grupo de alta movilidad (*HMGA1*).

Después se procedió a ingresar al banco de datos “GMO Detection Method Database” del “Shangai GMO Platform”, de donde se obtuvieron las secuencias de los genes endógenos así como la construcción del maíz T25. En la Figura 7 aparece la secuencia obtenida para T25.

Complete Sequence [Design PCR Primers]

```
1 CGCCGACATT TGGCGGCCA GGTAGGGCC TGCCGCGTGT TGACGAACAG
51 CTTCCCGTCA AGCTCCAGAT GGGCAGTCTC CAGCAACCTC TCCAGCCCGG
101 GACGGTGCTC CGTTTCGGGA GTCTTGAGTT CATGTCCCTC GACGGCAGCT
151 ACGACATGAT ACTCCTTCCA CCGCCGTGCG ACAGCGACAA TGGCGGAACG
201 ACTCAATGAC AAGAAATATC AAAGATACAG TCTCAGAAGA CCAAAGGGCA
251 ATTGAGACTT TTCAAGAAAA TCTTCGTCAA CATGGTGGAG CACGACACGC
301 TTGTCTACTC CAAAACAAGG GGAATATCC GGAAACCTCC TCGGATTCCA
351 TTGCCAGCT ATCTGTCACT TTATTGTGAA GATAGTGGAA AAGGAAGGTG
401 GCTCCTACAA ATGCCATCAT TGCGATAAAG GAAAGGCCAT CGTTGAAGAT
451 GCCTCTGCCG ACAGTGGTCC CAAAGATGGA CCCCCACCCA CGAGGAGCAT
501 CGTGAAAAA GAAGACGTTT CAACCACGTC TTCAAAGCAA GTGGATGATG
551 AGCACTTTTA AAGTTCGTCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC
601 CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG
651 TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA
701 AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA
751 CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACG GCTTTTTTGC
801 ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCTTGG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG
851 AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT
901 GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT
951 CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA
1001 CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG
1051 AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG
1101 GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT
1151 ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA
1201 GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT
1251 TAAACTTCA TTTTAAATT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT
1301 AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC
1351 AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTT TTAGATCCT TTTTTTCTGC
1401 GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAATAAAC CACCGCTACC AGCGTGGTT
1451 TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAAGTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT
1501 CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCTT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG
```

Figura 7.- Fragmento de la secuencia de la construcción del maíz T25.

La construcción de T25 (KJ608129.1) tiene una secuencia que consta de un total de 3740pb de donde se eligió un fragmento de las primeras 350pb, dado que es en esta región donde se encuentra el sitio de fusión entre el DNA genómico del maíz y el sitio 5' del inserto, con lo cual se pretende realizar un ensayo que sea evento específico para esta variedad de maíz.

En el Anexo 1 aparecen las secuencias utilizadas de los genes endógenos Adh (X04050), Hmg (AJ131373.1) y SSIib (AF019297).

Debido a que se requería de secuencias cortas, 100pb aproximadamente, para realizar la PCR cuantitativa (qPCR), era necesario acotar los fragmentos a clonar y a su vez asegurar su validez en un análisis de qPCR. Por lo que se recurrió entonces al Compendium of Reference Methods for GMO Analysis del Joint Research Center (JRC) de la Unión Europea, de donde se obtuvieron las secuencias de cebadores y sondas aprobados y validados para la cuantificación de OGM's cuyos blancos fueran las secuencias elegidas (Tabla 1)

Tabla 1.- Cebadores y sondas aprobadas y validadas.

Fragmento	Cebador	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)
ADH	Sentido	5'-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CCT-3'	135
	Antisentido	5'-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3'	
	Sonda	5'-FAM-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-TAMRA-3'	
HMG	Sentido	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'	79
	Antisentido	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'	
	Sonda	5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-TAMRA-3'	
SSIIb	Sentido	5'-CTC CCA ATC CTT TGA CAT CTG C-3'	154
	Antisentido	5'-TCG ATT TCT CTC TTG GTG ACA GG-3'	
	Sonda	5'-FAM-AGC AAA GTC AGA GCG CTG CAA TGC A-TAMRA-3'	
T25	Sentido	5'- ACA AGC GTG TCG TGC TCC AC-3'	102
	Antisentido	5'-GAC ATG ATA CTC CTT CCA CCG-3'	
	Sonda	5'-HEX-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-Blackhole-3'	

Las secuencias mostradas son las recomendadas por el Compendium of Reference Methods for GMO Analysis del JRC para el evento T25 y los distintos genes endógenos elegidos a evaluar

Estas secuencias de cebadores y sondas fueron usadas para generar una hibridación *in silico* sobre las secuencias completas de los genes (*ADH*, *HMG* y *SSiib*) y de este modo acotar los fragmentos a modo tal que al clonar sólo se encuentren las secuencias necesarias para que hibriden los oligonucleótidos.

10.2.- GENERACIÓN DE CEBADORES PARA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS BLANCO

Se diseñaron los cebadores necesarios para la clonación con la ayuda del programa Custom Primers-OligoPerfect Designer (<https://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>), buscando que se ajustaran a los siguientes parámetros:

- Una longitud de entre 18-30 nucleótidos.
- Una T_m de entre 60-75°C y con menos de 5°C de diferencia entre el cebador sentido y antisentido.
- Un contenido de GC de entre 40-60%.

Además de esto también se le pidió al programa agregar sitios de restricción en los extremos del cebador sentido (*Xba I* en los genes endógenos y *NcoI* en la secuencia T25) y antisentido (*Xho I* para *Adh* y *SSiib*, *Kpn2* para *Hmg* y *XbaI* para la secuencia T25) para facilitar su posterior ligación (Tabla 2), así como la fusión de los amplicones evento específico y endógenos para generar tres plásmidos calibrantes.

Tabla 2.- Cebadores generados para clonación de fragmentos endógenos y T25

Gen	Cebadores
T25	T25FWD 5'-CCA TGG TTC CCG TCA AGC TCC AGA T-3'
	T25REV 5'-CCT CTA GAC GAG GAG GTT TCC GGA TAT T-3'
Hmg	hmgFWD 5'-GCT CTA GAC CCT CTC CTG GTC GAA CT-3'
	hmgREV 5'-TCC GGA CGA TGG CCT TGT TGT ACT C-3'
Adh1	adhFWD 5'-GCT CTA GAC ACG GCT ATG TTC CAC TCC-3'
	adhREV 5'-CTC GAG CAG AAT CCC AAA TCA TCC ACT-3'
Ssiib	ssiibFWD 5'-CCT CTA GAT TCT GCT TCA CCT CCC AAT C-3'
	ssiibREV 5'-GCT CGA GGG TTC ATT ATC CTC CCT GTC ATA A-3'

Las regiones señaladas en verde corresponden al Sitio de restricción *XbaI*. Las secuencias en azul corresponden al sitio *XhoI* en el caso de *Adh* y *SSiib* y *Kpn2* en el caso de *Hmg* y *NcoI* en el caso de T25.

Para la amplificación de los fragmentos, se utilizó DNA genómico (gDNA) procedente de dos fuentes; en el caso de los genes endógenos, se utilizó como molde el gDNA de maíz Chalqueño el cual fue proporcionado por el Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química (UNAM). Como molde para la amplificación del fragmento evento específico, se utilizó gDNA extraído a partir de una muestra de maíz T25 donada por el Dr. Bernd Schoel (G-ID, Iowa, USA).

10.3.- PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de maíz chalqueño, fueron molidas con el molino Half-gallon High power blender (XTREME, E.U.A.), hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo. Una vez hecho esto, se tomó la muestra y se le realizó una extracción de DNA con el kit FAST ID Genomic DNA Extraction Kit (Genetic ID, E.U.A.). Dicha extracción se realizó por triplicado, siguiendo el protocolo mencionado por el fabricante.

Las distintas muestras de gDNA fueron cuantificadas con el equipo Epoch de (Biotek, E.U.A) y utilizando el software Gen51.0 por triplicado.

De estas muestras, se eligió la que presentó la mejor calidad tras la extracción del DNA midiendo su concentración y la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm para determinar su pureza.

Se procedió a realizar una electroforesis de las muestras de DNA con el equipo 1000/500 Power Supply (BIO RAD/ E.U.A) y He 33 (Hoefer, Alemania) en gel de agarosa al 0.8% la separación se realizó a 90 V durante 40 min en buffer TAE para visualizar la integridad del DNA. Se corroboró la calidad del DNA, mediante una amplificación en la que se buscó la presencia del gen *HMG* (maíz genérico) y el promotor 35S (maíz transgénico) mediante una PCR punto final con cebadores previamente generados en el laboratorio. Ambas muestras arrojaron los resultados esperados: en el caso del maíz chalqueño, se obtuvo una banda de 100 pb correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen *HMG*, mientras que no se produjo la amplificación con los cebadores que alinean con la secuencia del promotor 35S. Para el caso del maíz T25, se obtuvieron bandas de amplicones para *HMG* y 35S como era esperado.

Habiendo confirmado la calidad de amplificación del DNA, se procedió entonces a realizar la amplificación de las secuencias seleccionadas de genes endógenos y el gen evento específico, para ser introducidas posteriormente en los vectores calibrantes.

10.4.- CLONACIÓN DE SECUENCIAS

A partir del DNA molde se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar el fragmento evento específico utilizando la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Thermo Scientific, E.U.A), los cebadores generados (IDT, E.U.A.) a una concentración de 100ng/mL, el buffer de reacción Pfu 10X Buffer (Thermo Scientific, E.U.A.) y el DNA molde en concentración de 50 ng/mL utilizando el termociclador MAXYGENE (AXYGEN, E.U.A) siguiendo los parámetros descritos a continuación (Tabla 3)

Tabla 3.- Condiciones de reacción PCR para la amplificación de las secuencias blanco

Reactivo	Cantidad (µL)	Condiciones de Reacción	
		Temperatura (°C)	Tiempo
Pfu 10X Buffer (Mg ²⁺ + 20 mM)	5	95	3 min
dNTP's (10 mM mix)	1	95	30 seg
DNA (50 ng/mL aprox)	2	60	1 min
Cebador sentido (100 ng/mL)	1	72	2 min
Cebador antisentido (100 ng/mL)	1	72	10 min
Pfu DNA polimerasa (2.5 U/mL)	0.5	4	X
H2O grado molecular	39.5		
Volument Total	50		

Este procedimiento se repitió utilizando el gDNA extraído a partir de maíz Chalqueño para amplificar los fragmentos de los tres genes endógenos a probar.

10.5.- PURIFICACIÓN DE AMPLICONES GENERADOS

Los amplicones fueron purificados utilizando el GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, E.U.A), se cortó la banda perteneciente al fragmento deseado directamente del gel con ayuda de un transiluminador de luz UV Mighty Bright (Hoefer, E.U.A) en modo de baja intensidad para no dañar a la molécula de DNA. Se purificó siguiendo el protocolo del kit que consiste en disolver primero el gel en presencia de isotiocianato de guanidina (Membrane Binding Solution). Posteriormente el DNA se aisló mediante centrifugación haciendo que el gel disuelto pasase a través de una membrana de sílica quedando el DNA adherido a ésta. Se hicieron un par de lavados a los fragmentos de DNA unidos a la membrana con la solución Membrane Wash Solution y finalmente se eluyó el DNA en agua.

10.6.- LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS PURIFICADOS EN VECTOR DE CLONACIÓN.

Los fragmentos purificados fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, E.U.A) el cual es un plásmido linearizado, que acepta insertos de hasta 10kb. El extremo 5' del sitio de clonación contiene grupos fosfato por lo que no es necesaria la fosforilación de productos de PCR para su ligación. El vector recircularizado expresa una enzima de restricción letal cuya secuencia se ve interrumpida al ser ligado un inserto, con lo cual se aumenta la probabilidad de

que las bacterias transformantes sean aquellas que tienen el inserto. Además de esto, el plásmido confiere resistencia a ampicilina como marcador de selección.

Los fragmentos amplificados vía PCR fueron ligados siguiendo la mezcla de reacción sugerida por el CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, E.U.A) utilizando el amortiguador 2X Reaction Buffer y la T4 DNA ligasa incluidos en dicho kit y usados en las siguientes proporciones (Tabla 4)

Tabla 4.- **Condiciones de Reacción en la ligación de los fragmentos a clonar en pJET1.2**

Reactivo	Cantidad	Condiciones de Reacción	
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
2X Reaction Buffer	10 µL	22	30
DNA a ligar	25 ng aprox	75	5
pJET1.2 (50 ng/µL)	1 µL		
Agua libre de nucleasas	aforo 20µL		
T4 DNA ligasa (5U/µL)	1 µL		
Volument Total	20 µL		

Dicha ligación se realizó en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN, E.U.A). Una vez realizado este procedimiento, se utilizó la mezcla para transformar bacterias competentes mediante el método químico.

10.7- GENERACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES *E. coli* DH5α

Se realizó un preinóculo en 5 mL de medio LB (Becton Dickinson and Company, E.U.A) en el que se sembró una colonia de bacterias DH5α (Invitrogen, E.U.A), dejándolas crecer durante toda una noche. A partir de este preinóculo, se sembraron 500 µL en un nuevo medio de 50 mL LB, dejándole crecer a 37°C

hasta tener una densidad óptica de 0.4-0.5 a 600 nm, después se enfrió el cultivo por 10 minutos en hielo. A continuación se transfirió a un tubo falcon de 50 mL estéril para centrifugar el cultivo en el equipo Biofuge Primo R (Heraeus, Alemania) durante 10 minutos a 3500 rpm habiendo enfriado previamente la centrifuga a 4°C. La pastilla de células resultante se resuspendió en 33 mL de una solución de CaCl₂ 0.1M (SIGMA, E.U.A) estéril y enfriada a 4°C. Esta mezcla se incubó durante una hora en hielo. Posteriormente se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 3500 rpm. El pellet se resuspendió en 2 mL de solución CaCl₂ 0.1M y glicerol al 17%. Esta mezcla se transfirió a tubos eppendorf estériles y previamente enfriados en hielo, en alícuotas de 100 µL. Los tubos con las células competentes se guardaron a -70°C hasta su uso.

10.8- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES *E. coli* DH5α.

Las células competentes son muy sensibles a cambios en la temperatura o a ruptura mecánica causada por el pipeteo, por lo tanto es muy importante trabajar delicadamente con estas bacterias. Las bacterias competentes previamente congeladas, se descongelaron en un baño de mezcla hielo-agua y se tomaron alícuotas de 100 µL de las mismas por cada transformación que se realizó. Se mezclaron con el DNA plasmídico a transformar (10 µL de mezcla de ligación) y se incubaron en un baño de hielo-agua por 30 minutos para que ocurriera interacción con la membrana permeable de las células competentes y de esta forma el ADN plasmídico pudiera entrar a la célula. Pasado el tiempo, se llevó a cabo un choque

térmico de la mezcla durante exactamente 45 segundos a 42°C para favorecer la entrada del DNA plasmídico debido a que a esta temperatura la membrana de la célula se vuelve más permeable. Se transfirieron de nuevo al baño de hielo-agua durante 2 minutos, de esta forma se retorna la estabilidad a la membrana quedando en el interior de las bacterias competentes el DNA plasmídico que logró introducirse en la célula. Posteriormente, se agregaron a cada transformación 800 µL de medio LB y se incubaron a 37°C, durante 1 hora en agitación para que se recuperaran las bacterias del tratamiento térmico. A continuación, se centrifugaron por 5 min a 3,500 rpm, se eliminó el exceso de medio LB y se resuspendió el pellet con la punta de la pipeta. Finalmente se sembraron 100 µL de bacterias en cajas de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) como antibiótico para la selección de colonias transformantes.

10.9.- PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO

Las colonias que resultaron positivas en la transformación se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron durante toda una noche a 37°C en agitación 300 rpm. Al día siguiente se centrifugaron las células a 3500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se continuó el protocolo para purificar el plásmido con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, E.U.A). Este sistema de purificación utiliza como base una membrana de sílica en donde se retiene el DNA obteniendo DNA plasmídico altamente puro. El proceso comienza al resuspender el botón de células con la solución para resuspensión la

cual es una solución isotónica que se utiliza para este fin, posteriormente se rompen las células con la solución de lisis, se dejan incubar durante cinco minutos y se tratan con la solución de neutralización. Se centrifugan y se recupera el sobrenadante el cual contiene al plásmido, se hacen dos lavados con la solución de lavado y finalmente se eluye la columna con agua libre de nucleasas para recuperar el DNA

plasmídico que fue retenido en la membrana para depositarlo diluido en el agua dentro de un tubo de microfuga.

10.10.- AMPLIFICACIONES CONFIRMATIVAS

Era importante asegurarse de la identidad del gen que se introdujo en el plásmido, para lo cual realizaron reacciones de PCR que dieran patrones específicos de bandeo los cuales concordaran con lo esperado para cada gen. Para cada reacción se utilizó una cantidad de DNA plasmídico purificado (50 ng) que sirvió como molde para la reacción. El protocolo de PCR fue similar al realizado para amplificar los fragmentos a partir del DNA de maíz.

10.11.-PCR CROSS-OVER

Hasta este punto se contaba con 4 plásmidos distintos cada uno conteniendo de forma independiente alguno de los fragmentos amplificados, por lo tanto era necesario realizar una “fusión” de los amplicones (cada uno de los tres genes endógenos con el fragmento transgénico) para de este modo generar tres plásmidos finales, a ser utilizados como calibrantes.

Los plásmidos que contenían sólo un fragmento fueron sometidos a reacciones de digestión para escindir el amplicón de interés usando los amortiguadores de reacción CutSmart y NE Buffer 3.1 (New England Biolabs, Reino Unido) de la siguiente manera (Tabla 5)

Tabla 5.- Mezclas de digestión

Plásmido	Enzimas Utilizadas	Buffer
(1) ADH	XbaI + Xho I	CutSmart
(2) SSIIb	XbaI + Xho I	CutSmart
(3) HMG	XbaI + Kpn2	NE Buffer 3.1
(4) T25	NcoI+XbaI	CutSmart

Plásmidos señalados por los insertos y sus correspondientes combinaciones de enzimas y buffer utilizados para la digestión.

Estas mezclas de digestión, fueron incubadas a 37°C durante una noche y posteriormente sometidas a 65°C para ser utilizadas en una reacción de ligación que fusionara ambos insertos (un inserto de gen endógeno con el de T25) de modo tal que se generaran tres fragmentos donde cada uno de ellos contuviera un gen endógeno (*ADH*, *SSIIb* o *HMG*) y el fragmento transgénico. Para fusionar los fragmentos, se tomó ventaja del diseño de la construcción ya que a todos los

amplicones de los genes endógenos se les insertó el sitio de restricción XbaI en su extremo 5', el cual comparten con el amplicón transgénico que lo contiene en su extremo 3', de modo tal que se generara un fragmento entre los dos (transgénico+endógeno) gracias a sus extremos cohesivos, esta técnica de fusión de amplicones es conocida como PCR Cross- Over.

La reacción de ligación para la PCR Cross-Over se realizó usando la siguiente mezcla utilizando los reactivos del CloneJET PCR Cloning Kit

Tabla 6.- Condiciones de ligación de fragmentos para PCR Cross-Over

Reactivo	Cantidad (µL)	Condiciones de Reacción	
		Temperatura (°C)	Tiempo
2X Reaction Buffer	10	22	2 hrs
Mezcla de digestsión inserto 1	5	75	5 min
Mezcla de digestsión inserto 2	5		
Agua libre de nucleasas	1		
Volumen Total	21		

A partir de estas ligaciones se procedió a realizar una PCR utilizando una combinación de cebadores de modo que se amplificasen aquellos fragmentos con la conformación deseada (Tabla 7)

Tabla 7.- Mezclas de ligación y par de cebadores utilizados en el PCR Cross-Over

Mezcla	Cebadores	
	Sentido	Antisentido
(1) T25 + ADH	T25FWD-5' CCA TGG TTC CCG TCA AGC TCC AGA T-3'	ADHREV-5' CTC GAG CAG AAT CCC AAA TCA TCC ACT-3'
(2) T25 + HMG	T25FWD-5' CCA TGG TTC CCG TCA AGC TCC AGA T-3'	HMGREV-5' TCC GGA CGA TGG CCT TGT TGT ACT C-3'
(3) T25 + SSIIb	T25FWD-5' CCA TGG TTC CCG TCA AGC TCC AGA T-3'	SSIIbREV-5' GCT CGA GGG TTC ATT ATC CTC CCT GTC ATA A-3'

A partir de los PCR crossover, se purificaron las bandas correspondientes para ser utilizadas en una nueva reacción de ligación y de este modo generar los plásmidos calibrantes finales.

Los nuevos plásmidos generados fueron entonces utilizados para transformar bacterias competentes y fueron extraídos siguiendo la metodología antes descrita. A partir de estos nuevos plásmidos, extraídos del cultivo, se realizó una PCR de confirmación para verificar la identidad del inserto.

Se enviaron las muestras para analizar los amplicones mediante una secuenciación capilar automatizada (Sanger) realizada por la empresa MacroGen (Figura 8) y Anexo 1, utilizando los cebadores universales T7 ya que el plásmido pJET1.2 con el que se realizaron las clonaciones contiene dichos sitios flanqueando al sitio de clonación múltiple (MCS).

```

>150306-12_G02_V1_VF.ab1      829
GAAACTTCGGGAGGCTCGAGTTTTAGCACGATCCTTGGTCCCGTCACGC
TCCATATGGTTCCTCCGTTCTCCATCCGGCCCCGGACCCGAGCTTCCTTT
GCCGAAATTCCTTTCAACATTTGGAAAACAACAACCCCCCGATCATCCT
CGGCCCCCGGGGCGAGCGGGGGGACCCCCACCGACTCAGTGCCTTGAGG
AAATTCTCCCCGATATGGTGGAGCCCGGAGAGGTGTGCCTCCGAAAATC
CCCCAAACCAACCCCGAGGTTTCTTCCCGGGATGAGGGGGCAAAAAG
GGCAATACCCCAACCTCCTAGCCTAGGATCTAGACACCGCGTTGTCCT
GCTCCAGGTGTAAGATGCAGCCCCGTTTCGCAAGCCGCGCCGTGGTTT
GCTTGCCACAGGCGGCCAAACCGCACCTCCTTCCCGTCGTTTCCCATC
TCTTCTCCTTTAGAGCTACCACTATATAAATCAGGGCTCATTTTCTCGC
TCCTCACAGGCTCATCTCGCTTTGGATCGATTGGTTTCGTAACGGTGAG
GGACTGAGGCTCTCGGAGTGGATGATTGGGATTCTGCTCGAGATCTTTCT
AGAAGATCTCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTC
TTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGCTGTATATAAACTTATATTAAGAAC
TATGCTAACCACTCATCNNAACGTTGTAGTGGCGTGGGGTTTTCTGGC
ATCGACTCTCATGAACTACGAGCTAATATTCATATGTTCTCTTGACCAA
CTTTAATTCNGCATTTTTTTTTTTGAACGA

```

Figura 8.- **Fragmento I de la secuenciación para pVHMG**. La secuencia representa una parte del fragmento HMG en el plásmido.

10.12.- PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN A PARTIR DE PLASMIDOS Y gDNA

Con base en lo reportado por Tandance en 2009, se consideró que 2.75 pg de DNA genómico de maíz equivalen a un genoma haploide del mismo, por lo que podemos decir que en esta cantidad de DNA de maíz T25 tenemos una copia del inserto transgénico y una copia del gen endógeno *hmg*, *adh* o *ssIIb*. Conociendo estos datos se generaron una serie de diluciones del material de referencia AOCS 0306-H6 adquirido a la American Oil Chemists Society y el cual consiste en DNA genómico extraído de hojas del evento T25 en una concentración de 20 ng/ μ L (7272.73 copias/ μ L).

A partir de esta muestra se generaron una serie de diluciones que cubren los puntos de (aproximadamente) 14545.43, 1454.54, 145.45, 14.54 y 1.45 copias.

A su vez se realizaron una serie de diluciones con los plásmidos, pero estas basadas en el hecho de que el plásmido en el que se ligaron los insertos (pJet1.2) tiene 2975bp y considerando el tamaño de los fragmentos insertados se calcularon los pesos moleculares (Tabla 8)

Tabla 8.- Longitud (pares de bases) y peso molecular de los plásmidos calibrantes

Plásmido	Pares de bases	Peso Molecular (g/mol)
pVADH	3534	1,718,839.9
pVHMG	3508	1,706,865.6
pVSSIb	3596	1,749,770.2

Usando la siguiente fórmula propuesta en el reporte de certificación de un plásmido generado anteriormente por la IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) de la Unión Europea:

$$\text{Concentración en número de copias (cp/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Concentración de ADN (g/}\mu\text{L)} * \text{Número Avogadro (bp/mol)}}{2 * M \text{ (g/mol)} * \text{tamaño del plásmido (pb)}}$$

Se calculó la concentración de los plásmidos en términos de número de copias/ μL a partir de las extracciones iniciales de los mismos, y así generar un stock de 50ng/ μL (aprox.) en el cual la concentración de copias es la siguiente (Tabla 9)

Tabla 9.- Concentración en número de copias de los stocks generados con los plásmidos calibrantes

Plásmido	Concentración (copias/ μ l)
pVADH	9.08x10 ⁹
pVHMG	9.65x10 ⁹
pVSSIIb	9.66x10 ⁹

A partir de estos stocks, se realizaron las series de diluciones con las que se generaron las curvas patrón de los plásmidos; dichas diluciones se hicieron para tener un orden de magnitud similar al del material de referencia convencional (Tabla 10).

Tabla 10.- Concentración en número de copias de los puntos de calibración generados.

CALIBRANTE	CURVA DE DILUCIÓN (copias/ μ L)				
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5
AOCS 0306-H6 (T25 gDNA)	14,545	1,454	145.4	14.5	1.45
Plásmido Calibrante pVHMG	19,300	1,930	193	19.3	1.93
Plásmido Calibrante pVADH	18,160	1,816	181.6	18.1	1.81
Plásmido Calibrante pVSSIIb	19,320	1,932	193.2	19.3	1.93

Cada uno de los puntos de las curvas fueron utilizados para realizar la PCR cuantitativa utilizando el equipo ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, E.U.A), el análisis se realizó por triplicado y las curvas de amplificación fueron utilizadas para generar las curvas de calibración a partir de las cuales se determinaron las eficiencias de amplificación de cada fragmento en el plásmido y para comparar a su vez con la eficiencia de amplificación del material de referencia certificado.

10.13 - COMPARACIÓN DE EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN

A partir de los puntos de dilución generados con los distintos materiales (plásmidos y gDNA) se realizaron ensayos de amplificación por PCR en tiempo real, utilizando las sondas validadas y recomendadas por el JRC para la cuantificación de los diversos fragmentos (genes endógenos y secuencia transgénica). Con dicho ensayo se evaluó la eficiencia de amplificación al calcular la pendiente de una regresión lineal creada a partir de los valores de Ct y fluorescencia de la gráfica de amplificación. El valor de la pendiente fue entonces utilizado para calcular la eficiencia con la ayuda del programa qPCR Efficiency Calculator de Thermofisher Scientific y el cual se basa en la siguiente ecuación

$$\text{Eficiencia de amplificación} = 10^{-1/m (\text{Pendiente})} - 1$$

Se esperaba que los valores de eficiencia se encontraran entre el 90 y 110% para ser aceptados.

10.14 – DETERMINACIÓN DE LOD Y LOQ

Era importante además, reportar los límites de detección y cuantificación del método utilizando como materiales de referencia los plásmidos calibrantes.

A partir de las curvas de amplificación generadas, se obtuvo un rango en el que, a ciertos niveles de dilución, se comenzaban a tener mediciones inconsistentes (LOQ) o inexistentes (LOD).

El LOD se define como la concentración más baja que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificable. Experimentalmente se determinó como la dilución de una muestra positiva donde se detectara su presencia en un 95% de los ensayos.

El LOQ se define como la concentración más baja en la que una muestra pueda ser cuantificada de manera confiable y se determinó realizando una serie de diluciones cubriendo el último punto con una cuantificación aceptable. A estos puntos se les hizo un ensayo cuantitativo de diez repeticiones por punto y se determinó el LOQ como el último punto donde la cuantificación no mostró una Desviación Estándar Relativa (RSD) mayor al 25 %.

Los puntos utilizados para el análisis del LOD y LOQ fueron (aproximadamente) 20, 10, 5 y 1 copias.

10.15.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE MAÍZ

Por último, se realizó la detección y cuantificación de una serie de muestras con distintos niveles de concentración de maíz transgénico (0, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 %) las cuales se generaron mezclando harinas de maíz T25 proporcionada por Genetic ID y maíz chalqueño en los porcentajes peso/peso señalados y fueron sometidas a un cribado general detectando los genes de HMG y el promotor 35S para corroborar que cada una de las diluciones presentara efectivamente una concentración distinta de harina procedente de T25. En la tabla 11 se presentan las diluciones generadas de la harina de T25 para el análisis de concentración:

Tabla 11.- Cantidades y niveles de concentración final de las muestras generadas

Muestras problema		
Harina Chalqueño (mg)	Harina T25 (mg)	% GM
950	50	5
980	20	2
990	10	1
995	5	0.5
1000	0	0

Se muestran los porcentajes de concentración de harina transgénica en harina convencional en una relación masa/masa como %GM

Dichas muestras fueron utilizadas para realizar extracciones de DNA por triplicado siguiendo la metodología antes descrita mediante el uso del kit Fast ID Genomic DNA Extraction Kit de Genetic ID. De estas muestras, se eligió analizar las correspondientes a 5, 2 y 1 % de concentración m/m de maíz T25 y se procedió a cuantificar su contenido utilizando por un lado el plásmido obtenido en este proyecto, nombrado pVHMG, y el material de referencia AOCS 0306-H6.

11.- RESULTADOS

11.1.- DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CALIDAD DE AMPLIFICACIÓN EN MUESTRAS DE MAÍZ T25 Y CHALQUEÑO

Concentración y relación de absorbancia a 260 y 280nm a partir de las extracciones de DNA realizadas a las harinas de maíz chalqueño y T25

Tabla12.- Valores de concentración y pureza de gDNA del maíz Chalqueño y T25.

Concentración de DNA		
Muestra	Concentración ng/ μ L (Promedio)	Relación 260/280 (Promedio)
Maíz Chalqueño	145.80 \pm 0.13	2.00
Maíz T25	70.65 \pm 0.06	2.02

Se puede observar que la pureza del DNA extraído es aceptable pues la relación entre las absorbancias a 260/280nm está dentro del rango 1.8-2.0

La calidad amplificable del DNA se corroboró mediante una PCR punto final utilizando al gen *HMG* y el promotor *35S* como secuencias blanco (Figura 9)

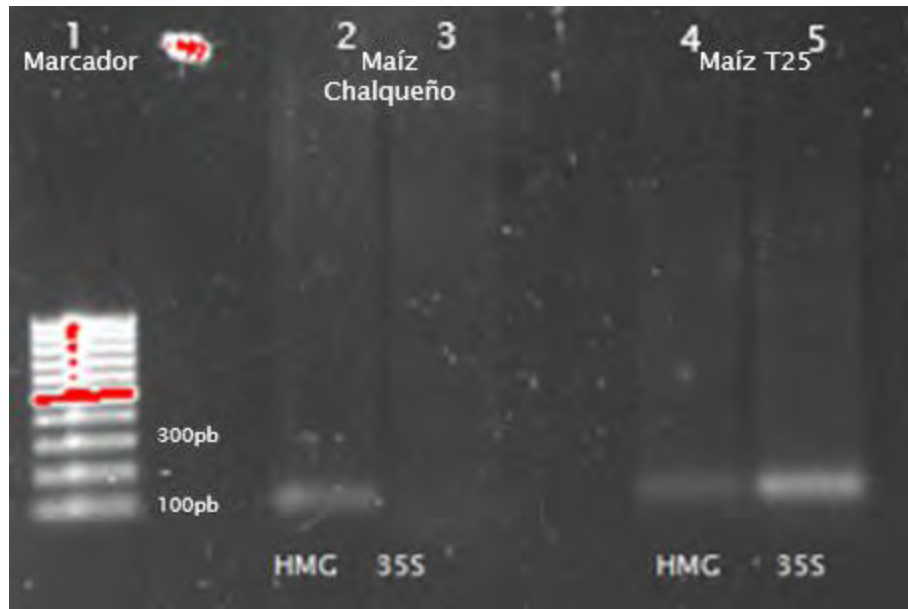


Figura 9.- **Evaluación de la calidad del DNA de maíz Chalqueño y T25.** Electroforesis en gel de agarosa, se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder Plus), en los carriles 2 y 3 las reacciones de PCR con 50 ng de gDNA de maíz chalqueño amplificando el gen *hmg* y el promotor 35S CaMV. En los carriles 4 y 5, las reacciones de PCR con 50 ng de gDNA de maíz T25 para el gen *hmg* y el promotor 35S CaMV. Los pesos esperados para todos los amplicones eran de 120 pb aproximadamente.

Ambas muestras arrojaron los resultados esperados: en el caso del maíz chalqueño, se obtuvo una banda de 100 pb correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen *HMG*, mientras que no se produjo la amplificación con los cebadores que alinean con la secuencia del promotor 35S. Para el caso del maíz T25, se obtuvieron bandas de amplicones para *HMG* y 35S como era esperado.

11.2.- SECUENCIAS CLONADAS

Como se había mencionado anteriormente, para el caso de las secuencias endógenas se decidió probar los genes de la *ADH1*, *SSI1b* y *HMG*. En el caso de la secuencia transgénica, se eligió un fragmento en la zona de inserción del evento T25.

Los amplicones que se decidieron clonar a partir de la amplificación de dichas secuencias son las que se muestran a continuación (Figuras 10 y 11)

T25

CCA TGG TTC CCG TCA AGC TCC AGA TGG GCA GTC TCC AGC AAC CTC TCC AGC CCG GGA CGG TGC
TCC GTT TCG GGA GTC TTG AGT TCA TGT TCC CTC GAC GGC AGC TAC GAC ATG ATA CTC CTT CCA
CCG CCG TGC GAC CGC GAC AAT GGC GGA ACG ACT CAA TGA CAA GAA GAA AAT CTT CGT CAA
CAT GGT GGA GCA CGA CAC GCT TGT CTA CTC CAA AAA TAT CAA AGA TAC AGT CTC AGA AGA
CCA AAG GGC AAT TGA GAC TTT TCA ACA AAG GGT AAT ATC CGG AAA CCT CCT CGT CTA GA

SITIO DE RESTRICCIÓN

CEBADOR

SONDA

GENOMA MAÍZ

REGIÓN PROMOTORA 35S

Figura 10.- **Secuencia clonada del evento T25**. En amarillo se muestra la región perteneciente al genoma de maíz adyacente al inserto en el evento T25. En verde oscuro se muestra la región perteneciente al extremo 5' de la construcción insertada en el evento T25. En verde claro se muestran los sitios de alineamiento de los cebadores sentido y antisentido para qPCR. En azul con rojo se muestra el sitio de unión de la sonda para qPCR donde la zona en azul hibrida en el genoma de maíz y la zona roja hibrida en la región 5' del inserto.

▶ **HMG** 223pb
 GenBank: [AJ131373.1](#)

HMG
 TCT AGA CCC TCT CCT GGT CGA ACT TTT CAG GTG GGG AAA GCT GCT GGC
 GAC AGG TGG AAA TCC CTG AGC GAG TCG GTA AGC TCC ATC TTC TGT ACT
 AAA GTA GTA GTT GAT TGG ACT AGA AAT CTC GTG CTS ATT AAT TGT TTT
 ACG CGT GCG TTT GTG TGG ATT GTA GGA CAA GGC TCC CTA TGT AGC CAA
 GGC TAA CAA GCT CAA GCT CGA GTA CAA CAA GGC CAT CGT CCG GA

▶ **ADH** 245pb
 Genbank : [X04050](#)

ADH
 TCT AGA CAC GGC TAT GTT CCA CTC CAG GTG GAG CTG CAG CCC CGG TTT
 CGC AAG CCG CGC ACG TGG TTT GCT TGC CCA CAG GCG GCC AAA CCG CAC
 CGT CCT TCC GGT GGT TTC GGA TGT GTT GGT GGT TTA GAG CTA CCA GTA
 TAT AAA TCA GGG CTC ATT TTC TGG CTC CTC ACA GGC TCA TCT CGC TTT
 GGA TCG ATT GGT TTC GTA ACT GGT GAG GGA CTC AGG GTT TCC GAG TCG
 ATG ATT TGG GAT TCT GCT CGAG

▶ **SSI**i**b** 313pb
 Genbank : [AF019297](#)

SSIi**b**
 TCT AGA TTC TGC TTC ACC TCC CAA TCC TTT GAC ATC TCC TCC GAA GCA
 AAG TCA GAG CCG TGC AAT GCA AAA CGG AAC GAG TGG GGG CAG CAG CGC
 GAA ATG CAC CGC CGC GCC GGT GTC CGG ACC CAA AGC TGA TCA TCC ATC
 AGC TCC TGT CAC CAA GAG AGA AAT CCA TGC CAG TGC GGT GAA GCC AGA
 GCC CGC AGG TGA TGA TGC TAG ACC GGT GGA AAG CAT AGG CAT CGC TGA
 ACC GGT GGA TGC TAA GGC TGA TGC AGC TCC GGC TAC AGA TGC GGC GGC
 GAG TGC TCC TTA TGA CAG GGA GGA TAA TGA ACC CTC GAG

Sitio de Restricción

Cebador

Sonda

Figura 11.- **Secuencias clonadas de los genes endógenos.** Los sitios en verde señalan secuencias de restricción en el extremo 5' y 3' de cada amplicón. Los sitios en azul oscuro señalan los lugares donde hibridan los cebadores para qPCR. Los sitios en azul claro muestran la hibridación de la sonda.

A continuación se muestran los amplicones generados por PCR amplificando los genes *HMG*, *ADH*, *SSI**i**b* y el fragmento transgénico (T25) a partir de las bacterias transformadas con los primeros plásmidos generados.

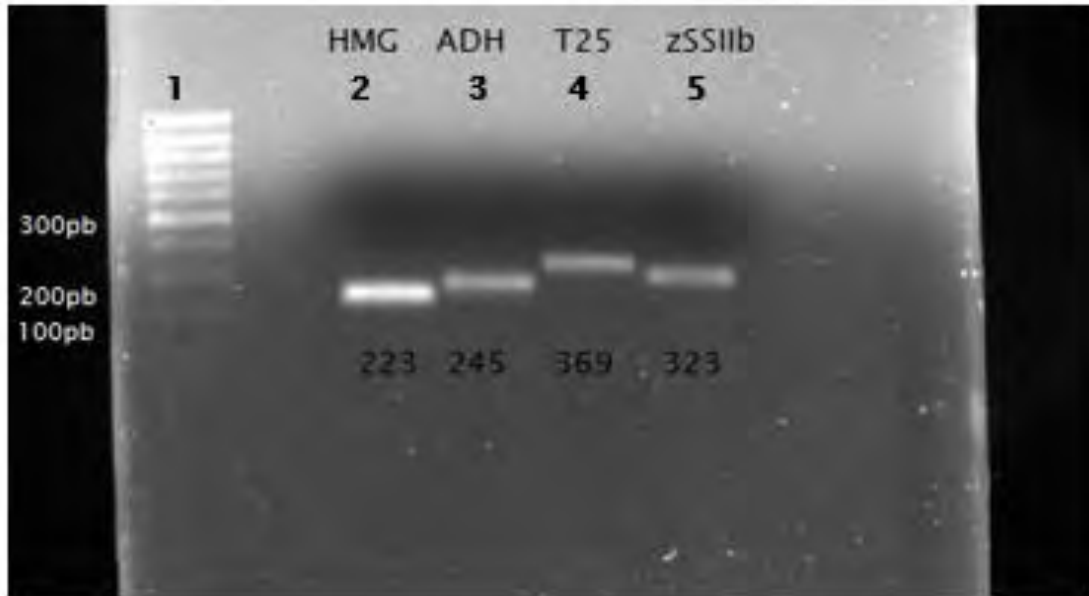


Figura 12.- **Amplificación de los fragmentos *HMG*, *ADH*, *SSIIb* y *T25*.** Gel de agarosa donde se muestra la reacción de PCR a partir de las clonas positivas. Marcador en carril 1. *HMG* en el carril 2, *ADH* en el carril 3 y *SSIIb* en el carril 4, todos ellos a partir de maíz chalqueño. Secuencia evento específica en el carril 5 a partir de maíz T25.

Teniendo una prueba confirmativa de la identidad de los genes, se realizó el PCR Cross-Over para pasar de 4 a 3 plásmidos calibrantes finales en donde el fragmento transgénico (*T25*) se encontrara unido a alguno de los tres genes endógenos (*HMG*, *ADH* y *SSIIb*). A continuación se muestra el tamaño final de cada uno de los amplicones insertados en los plásmidos finales.

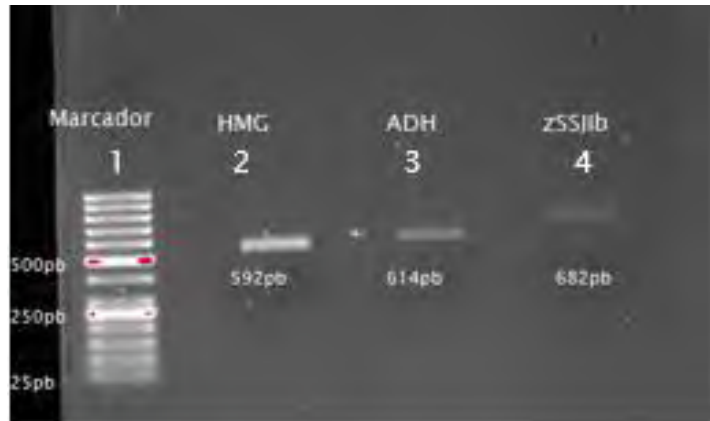


Figura 13.-**Fragmentos obtenidos mediante PCR Cross-Over.** En este gel de agarosa se muestran los resultados de un análisis de restricción realizado a plásmidos en los que se ligaron los amplicones obtenidos por el PCR Cross-Over. En el carril 1 se ve el marcador de peso molecular. Carril 2 muestra el fragmento resultante de fusionar HMG con T25. Carril 3 muestra el fragmento generado de fusionar ADH con T25. Carril 4 muestra el fragmento generado de fusionar SSIIb con T25.

Dichos plásmidos fueron utilizados para generar una nueva colección de bacterias en las cuales se verificó la identidad de las construcciones introducidas mediante una PCR.

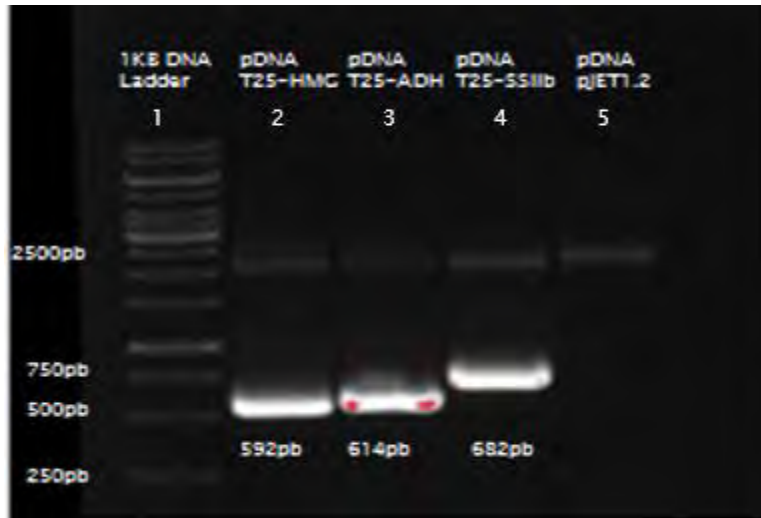


Figura 14.- **PCR de confirmación en plásmidos finales.** Gel de agarosa que muestra los amplicones generados a partir de los plásmidos que contienen los insertos finales. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1Kb de Life Techonologies. Carril 2 muestra el amplicón de 592 pb generado de la fusión del fragmento T25 y HMG. Carril 3 muestra el amplicón de 614 pb generado de la fusión del fragmento T25 y ADH. Carril 4 muestra el amplicón de 682 pb generado de la fusión del fragmento T25 y SSIIb. Carril 5 muestra el control negativo de plásmido Pjet1.2 con los cebadores sentido T25 y antisentido HMG, ADH o SSIIb.

11.3.-IDENTIDAD DE FRAGMENTOS CLONADOS

Una vez que se tuvieron los fragmentos insertados en la conformación deseada en el plásmido final, se enviaron a secuenciar para corroborar su identidad. Las secuencias obtenidas fueron entonces sometidas a una comparación por BLAST y se corroboró la identidad de cada gen (Tabla 13).

Tabla13.- Identidad de los genes

Alineamientos			
Muestra	Secuencias	Expectancia (E)	Identidad
pVAdh	Maize alcohol dehydrogenase 1 Gene ID: X04050	8.00E-128	100%
	Zea mays 3525 transgenic line T25 promoter region Sequence ID: KJ608129.1	7.00E-69	100%
pVHmg	Zea mays hmgA gene exons 1-7 Sequence ID: AJ131373.1	2.00E-112	100%
	Zea mays 3525 transgenic line T25 promoter region Sequence ID: KJ608129.1	7.00E-69	100%
pVSSIIb	Zea mays starch syntase homolog1 mRNA Sequence ID: NM_001111410.1	9.00E-158	99%
	Zea mays 3525 transgenic line T25 promoter region Sequence ID: KJ608129.1	7.00E-69	100%

Se muestran los genes con los cuales se obtuvo resultado en el BLAST, el número de acceso de cada uno, así como su valor de expectancia (probabilidad de que esta secuencia se repita en la naturaleza por azar) y porcentaje de Identidad.

A partir de las secuencias obtenidas, se generaron mapas de los plásmidos calibrantes mediante el programa SnapGene y a su vez se realizó un análisis *in silico* para predecir el comportamiento de las sondas y cebadores que serían utilizados para el análisis de qPCR (Figuras 15, 16 y 17).

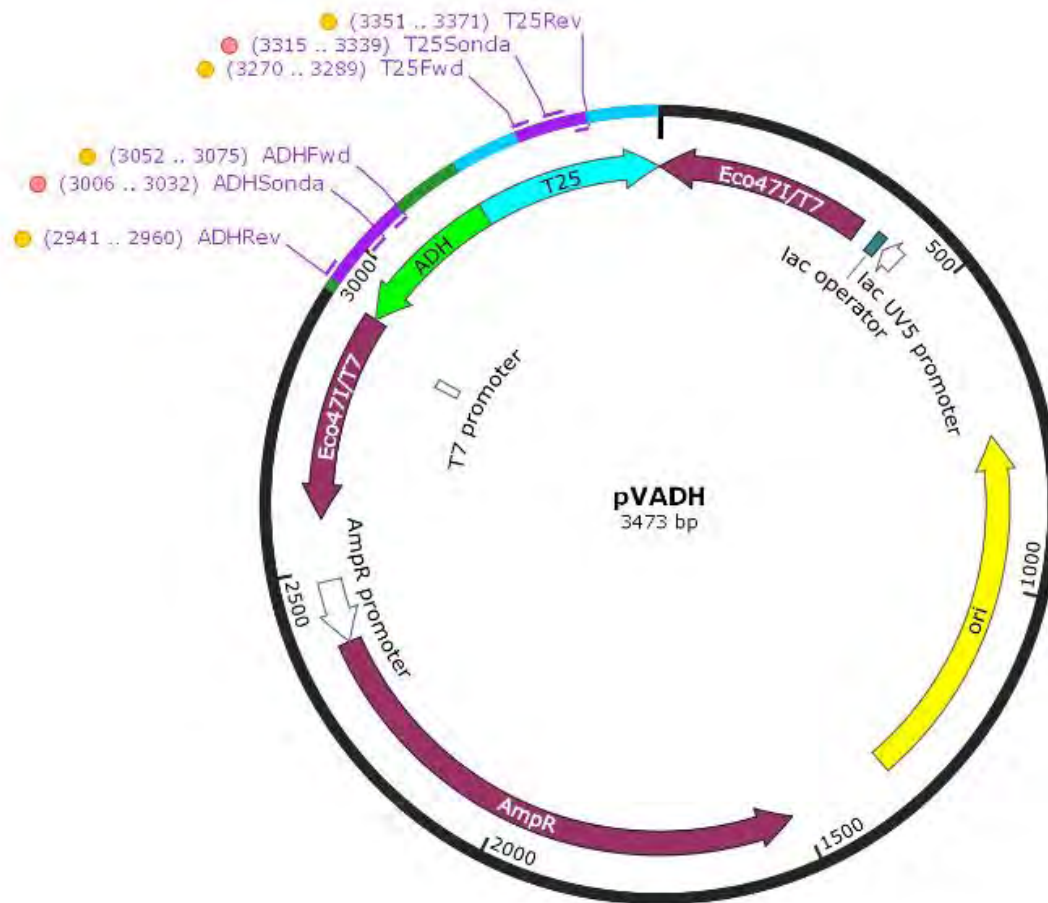


Figura 15.- **Mapa del plásmido calibrante pVADH.** Se muestra la composición del plásmido calibrante pVHMG el cual contiene un origen de replicación bacteriana pMBI de alto número de copias (Amarillo), así como un marcador de selección con el gen de la beta lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina. Se muestran los fragmentos de los amplicones híbridos que fueron insertados a partir de los resultados obtenidos de la secuenciación Sanger para el fragmento de ADH (Verde) y T25 (Azul) así como los sitios de unión predichos por el programa SnapGene para los cebadores y sondas cuantitativos (Morado) los cuales tienen una hibridación completa.

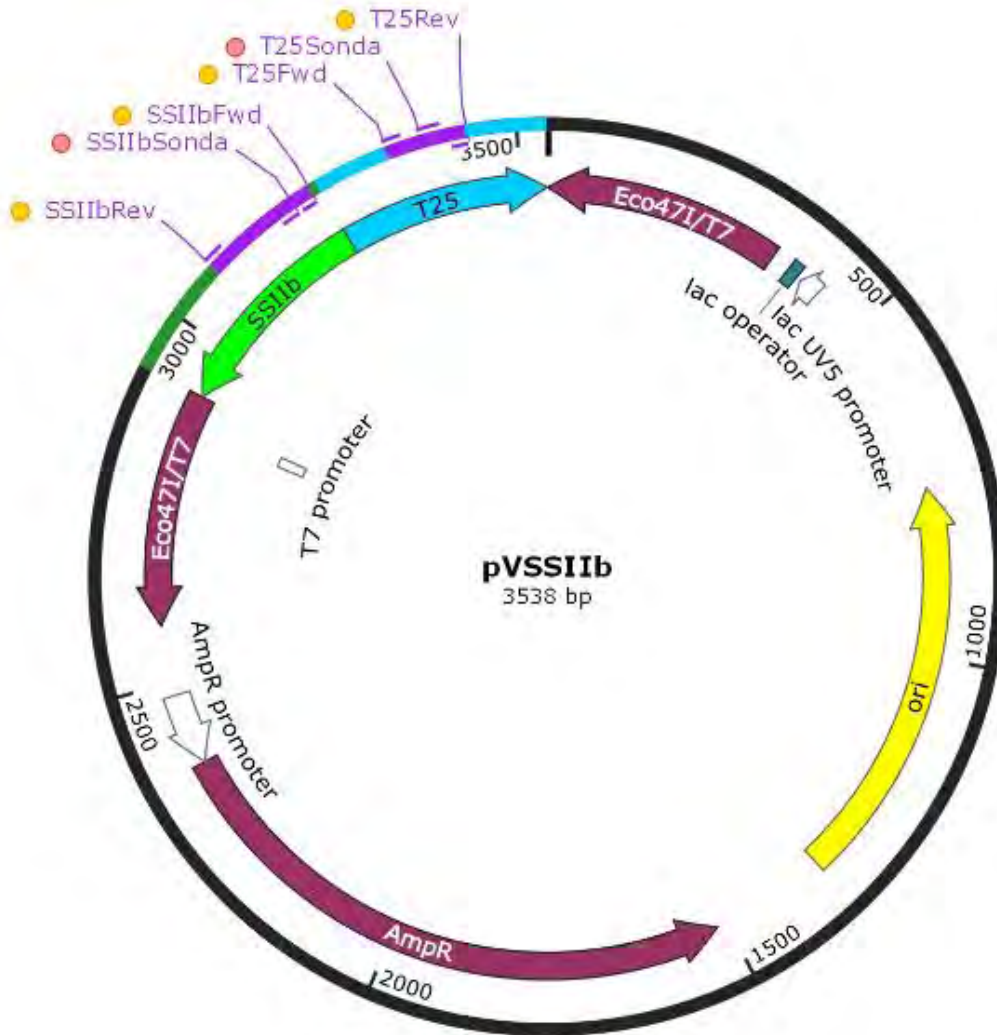


Figura 16. - **Mapa del plásmido calibrante pVSSIb.** Se muestra la composición del plásmido calibrante pVHMG el cual contiene un origen de replicación bacteriana pMB1 de alto número de copias (Amarillo), así como un marcador de selección con el gen de la beta lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina. Se muestran los fragmentos de los amplicones híbridos que fueron insertados a partir de los resultados obtenidos de la secuenciación Sanger para el fragmento de SSIb (Verde) y T25 (Azul) así como los sitios de unión predichos por el programa SnapGene para los primers y sondas cuantitativos (Morado) y se los cuales tienen un hibridación completa.

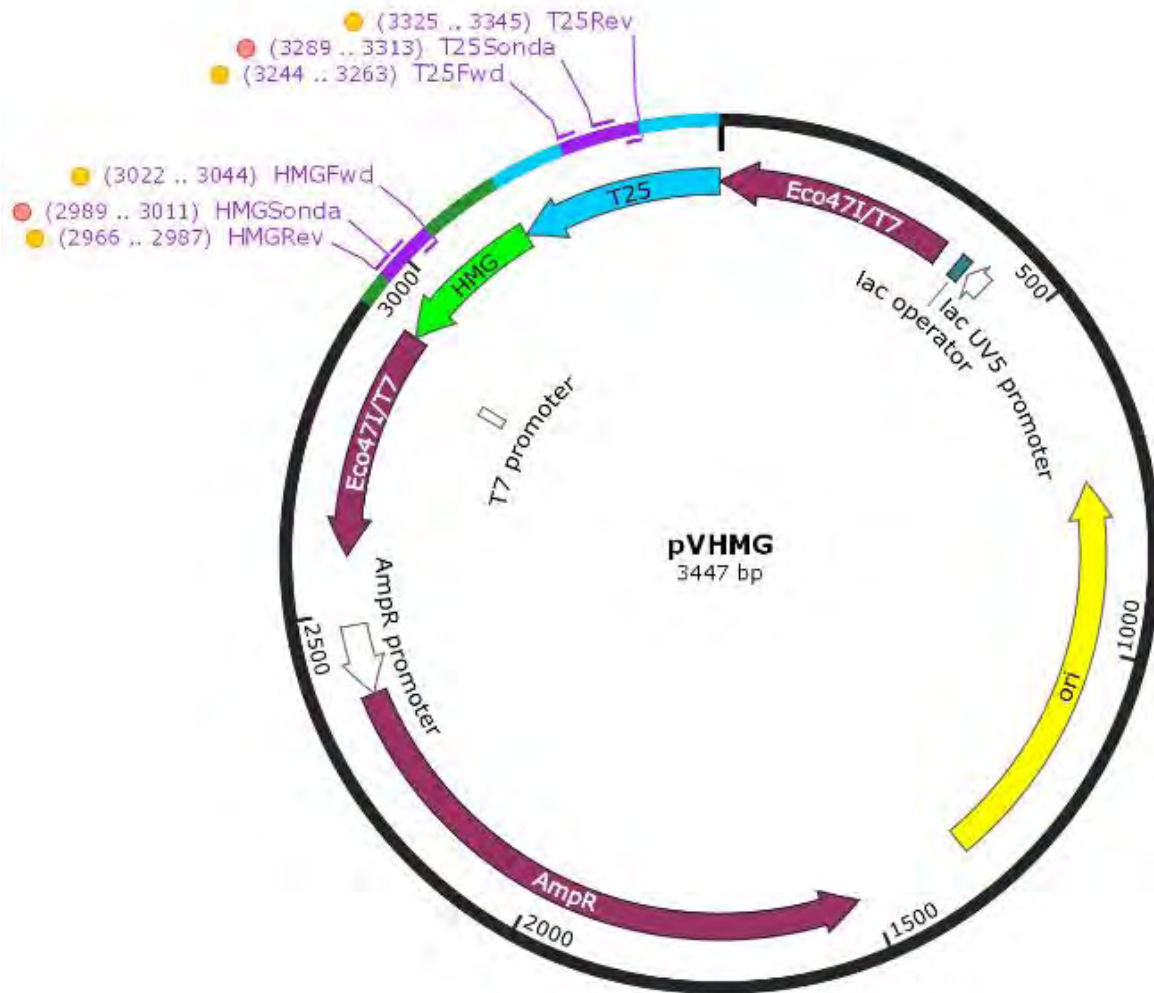


Figura 17.- **Mapa del plásmido calibrante pVHMG.** Se muestra la composición del plásmido calibrante pVHMG el cual contiene un origen de replicación bacteriana pMB1 de alto número de copias (Amarillo), así como un marcador de selección con el gen de la beta lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina. Se muestran los fragmentos de los amplicones híbridos que fueron insertados a partir de los resultados obtenidos de la secuenciación Sanger para el fragmento de HMG (Verde) y T25 (Azul) así como los sitios de unión predichos por el programa SnapGene para los cebadores y sondas cuantitativos (Morado) y los cuales tienen una hibridación completa.

11.4.- PREPARACIÓN DE CALIBRANTES

Conociendo la identidad de los plásmidos, y habiendo hecho un análisis *in silico*, se procedió entonces a realizar las diluciones para la construcción de la curva de calibración que se usará en la qPCR. Primeramente, se determinaron las cantidades de DNA, en el equipo Epoch, de los materiales calibrantes y se concentraron las muestras para tener un mejor control y número de copias más uniforme.

Tabla 14.- Concentraciones de los materiales de calibración.

Concentraciones Stock		
Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Abs 260/290
gDNA Chalqueño	55.7 +/- 0.5	1.98 +/- 0.00
gDNA T25	20.5 +/- 0.2	1.98 +/- 0.02
pVADH	51.9 +/- 0.1	1.99 +/- 0.01
pVHMG	56.2 +/- 1.1	2.00 +/- 0.02
pVSSIb	54.8 +/- 0.6	1.98 +/- 0.01

Mediciones de concentración de ADN obtenidas por la lectura de absorbancia a 260nm en el espectrofotómetro Epoch 3 (Biotek, EUA).

A partir de estos materiales de referencia concentrados y basados en el número de copias, se generaron las diluciones para las curvas de calibración (Figura 18 y Anexo II) con los que se realizaron las determinaciones de eficiencia.

ADH en pVADH



T25 en pVADH



Figura 18.-**Curva de calibración a partir de pVADH.** Ejemplo del tipo de gráfica obtenida a partir de los puntos de calibración analizados. Se muestran las señales de amplificación del PCR, se observa que cada punto de calibración tiene un conjunto de curvas asociadas (réplicas) en un ciclo de amplificación distinto, entre más concentrado el ADN blanco, la señal surge en un ciclo más temprano (más a la izquierda). En este caso se muestra lo obtenido con plásmido pVADH amplificando las secuencias de adh y T25.

11.5.- EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN

Con las gráficas anteriores, se produjeron los datos para el cálculo de la eficiencia de amplificación. En este punto, mediante una regresión lineal de dichas gráficas, se obtuvieron las pendientes de cada ensayo, lo cual está directamente relacionado con la eficiencia de la reacción de amplificación. Para que una secuencia sea útil como material de referencia, se requiere que su pendiente tenga un valor entre -3.3 y -3.6 lo cual representa una eficiencia de amplificación de este DNA entre el 90 y 110%. Para el caso de los ensayos realizados con los plásmidos pVADH, pVHMG así como el material certificado AOCS 0306-H6, es decir, la amplificación de los fragmentos correspondientes a *ADH*, *HMG* y *T25*, se obtuvieron valores de eficiencia de amplificación dentro del rango de lo esperado. En el caso del plásmido pVSSIIb así como en el material AOCS 0306-H6, el fragmento de *SSIIb* obtuvo un valor por debajo de la eficiencia esperada (Tabla 15).

Tabla 15.- Eficiencias de amplificación y coeficientes de correlación (R²)

Standard		Pendiente	R ²	Eficiencia %
pVADH	Endógeno (ADH)	-3.16	0.944	107.23
	Transgénico (T25)	-3.24	0.965	102.65
pVHMG	Endógeno (HMG)	-3.11	0.953	109.67
	Transgénico (T25)	-3.24	0.952	103.54
pVSSiib	Endógeno (SSiib)	-4.73	0.986	62.71
	Transgénico (T25)	-3.44	0.997	95.34
AOCS 0306-H6 (T25 gDNA)	Endógeno (ADH)	-3.35	0.989	98.44
	Endógeno (HMG)	-3.28	0.964	100.5
	Endógeno (SSiib)	-4.37	0.999	69.37
	Transgénico (T25)	-3.46	0.976	98.84

11.6.- LOD Y LOQ

A continuación, se procedió a determinar los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) para los plásmidos calibrantes así como para el material de referencia certificado de maíz T25 (gDNA).

Para determinar el LOD se realizaron 4 puntos de dilución de cada plásmido en 10 repeticiones cada uno, dichos puntos incluían el punto más bajo de la curva de calibración donde fue posible detectar la presencia del plásmido en los ensayos de eficiencia (gen endógeno y fragmento transgénico).

El punto elegido para determinar el LOD fue aquel en el cual el ensayo no mostrara un falso negativo. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 16,17 y 18.

Tabla 16. - LOD para plásmido pVHMG

LOD pVHMG		
Número de copias	Detecciones Positivas (HMG)	Detecciones Positivas (T25)
20	10 10	10 10
10	10 10	10 10
5	10 10	10 10
1	2 10	0 10

Tabla 17. - LOD para plásmido pVADH

LOD pVADH		
Número de copias	Detecciones Positivas (HMG)	Detecciones Positivas (T25)
20	10 10	10 10
10	10 10	10 10
5	10 10	10 10
1	0 10	1 10

Tabla 18. - LOD para material de referencia AOCS 0306-H6

LOD AOCS 0306-H6 (gDNA)			
Número de copias	Detecciones Positivas (HMG)	Detecciones Positivas (ADH)	Detecciones Positivas (T25)
20	10 10	10 10	10 10
10	10 10	10 10	10 10
5	10 10	10 10	10 10
1	1 10	2 10	0 10

Como se puede observar en las tablas, tanto los plásmidos como el material de referencia pudieron ser detectados más del 95% de las repeticiones (LOD) a partir de 5 copias. Se decidió determinar el Límite de Cuantificación (LOQ) a partir de este punto.

El LOQ se determinó como el punto de dilución en el que en una serie de 10 repeticiones, no ocurriera ningún falso negativo y el Coeficiente de Desviación estándar Relativa (RSD) además de la desviación de la medición en comparación con el valor real de la dilución, no fuera superior al 25%.

Se comenzó probando con la concentración de 5 copias, pero se encontró que tanto los plásmidos como el material de referencia obtenían coeficientes de RSD y valores de medición por encima del límite del 25% (Tablas 19, 20 y 21).

Tabla 19. – Ensayo LOQ con pVHMG (5 copias)

pVHMG			
Secuencia Blanco	Copias Teóricas	Copias Cuantificadas (Promedio)	RSD
HMG	5	3.97	22.66
T25	5	6.32	18.06

Se marca con naranja el valor arrojado en el ensayo fuera del límite de $\pm 25\%$

Tabla 20. – Ensayo LOQ con pVADH (5 copias)

pVADH			
Secuencia Blanco	Copias Teóricas	Copias Cuantificadas (Promedio)	RSD
ADH	5	1.46	19.86
T25	5	8.77	8.81

Se marcan con naranja los valores arrojados en el ensayo fuera del límite de $\pm 25\%$

Tabla 21. – Ensayo LOQ con AOCS 0306-H6 (5 copias)

AOCS 0306-H6 (gDNA)			
Secuencia Blanco	Copias Teóricas	Copias Cuantificadas (Promedio)	RSD
HMG	5	2.4	30.32
ADH	5	2.16	24.33
T25	5	6.56	35.65

Se marcan con naranja los valores arrojados en el ensayo fuera del límite de $\pm 25\%$

Se probó entonces a realizar el ensayo de LOQ con la dilución de 10 copias. Para el caso del plásmido pVHMG, y del material de referencia AOCS 0306-H6 usando el gen *HMG* como endógeno se obtuvieron valores de cuantificación y RSD aceptables, mientras que para el plásmido pVADH y el material de referencia usando como endógeno al gen *ADH* no (Tablas 22, 23 y 24).

Tabla 22.– Ensayo LOQ con pVHMG (10 copias)

Calibrante	Valor de Ct	Concentración (no. de copias)	Ct promedio	Concentración promedio (no. de copias)	SD	RSD
pVHMG (HMG)	30.5352	9.9424	30.5973	9.66039	2.010308356	20.8098054
	30.7523	8.4661				
	30.811	8.1061				
	30.5799	9.6188				
	30.4525	10.572				
	30.9858	7.122				
	30.6414	9.196				
	30.012	14.6461				
	30.585	9.5825				
	30.6179	9.3519				
pVHMG (T25)	29.7771	14.9277	30.002	12.49266	1.692903333	13.2749037
	30.0403	12.2999				
	29.8208	14.4555				
	29.7766	14.9332				
	30.1559	11.2972				
	30.2803	10.3092				
	30.1593	11.2689				
	30.138	11.447				
	29.9929	12.7364				
	29.8788	13.8516				

Tabla 23.– Ensayo LOQ con pVADH (10 copias)

Calibrante	Valor de Ct	Concentración (no. de copias)	SD	Concentración promedio (no. de copias)	RSD
pVADH (ADH)	32.7032	16.66	2.91339912	13.155	22.1467056
	33.1811	11.76			
	33.3488	10.4			
	33.1867	11.71			
	33.1051	12.42			
	33.0091	13.32			
	33.4189	9.88			
	32.9933	13.48			
	32.4852	19.52			
	33.108	12.4			
pVADH (T25)	32.0131	17.2	2.806807	19.421	14.452433
	32.1566	15.54			
	31.8529	19.26			
	32.1665	15.43			
	31.7473	20.75			
	31.7981	20.02			
	31.7558	20.62			
	31.5167	24.9			
	31.788	20.16			
	31.776	20.33			

Tabla 24.– Ensayo LOQ con AOCs 0306-H6 (10 copias)

Calibrante	Valor de Ct	Concentración (no. de copias)	Ct promedio	Concentración promedio (no. de copias)	SD	RSD
gDNA (HMG)	30.6898	8.6	30.48933	9.099	1.74091579	19.1330452
	30.0277	12.2				
	30.3772	9.57				
	30.5774	8.32				
	30.3898	9.48				
	30.5275	8.62				
	30.7157	7.56				
	31.0251	6.09				
	30.4229	9.27				
	30.1402	11.28				
gDNA (T25)	29.9113	13.83	30.30547	10.816	2.3648688	21.8645414
	29.9947	13.06				
	30.2853	10.69				
	30.1319	11.88				
	30.5716	8.78				
	30.1513	11.73				
	31.0885	6.16				
	30.1618	11.64				
	30.6481	8.33				
	30.1102	12.06				
gDNA (ADH)	31.0136	7.03	31.22253	6.196	1.23325405	19.9040357
	31.4413	5.24				
	31.4829	5.1				
	31.1025	6.61				
	31.1645	6.34				
	30.8893	7.65				
	30.7562	8.38				
	31.5967	4.71				
31.52	4.96					
	31.2583	5.94				

Se puede observar que los valores de RSD para el plásmido pVHMG y el material de referencia AOCs 0306-H6 usando el endógeno *HMG* son menores al límite de 25 %, además, el valor de concentración medido por ambos materiales se encuentra dentro del margen del +/- 25% de error en relación con el valor teórico del punto de calibración medido. Sin embargo en el caso del plásmido pVADH así como del material de referencia AOCs 0306-H6 pero usando el gen *ADH* como gen endógeno se encontró que a esta misma dilución si bien los valores de RSD fueron aceptables, las mediciones de la concentración cuantificada se obtuvieron fuera del límite de $\pm 25\%$ razón por la que se decidió descartar a este gen, y por lo tanto al plásmido pVADH.

Habiendo descartado dos de los tres plásmidos generados, y siendo el desempeño equivalente entre el plásmido elegido (pVHMG) y el material de referencia convencional hasta este punto, se procedió a realizar un último ensayo analizando muestras problema para comparar los resultados arrojados por ambos calibrantes; el plásmido diseñado y el material certificado.

11.7.- ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA

Se generaron una serie de muestras problema combinando harina de maíz chalqueño y harina de maíz T25 de manera tal que se obtuvieran mezclas con concentraciones de 5, 2 y 1% en contenido m/m de maíz GM. A estas muestras se les cuantificó la concentración del fragmento T25 y HMG (Figura 19) usando las curvas de calibración generadas a partir de los datos mostrados en la tabla 15.

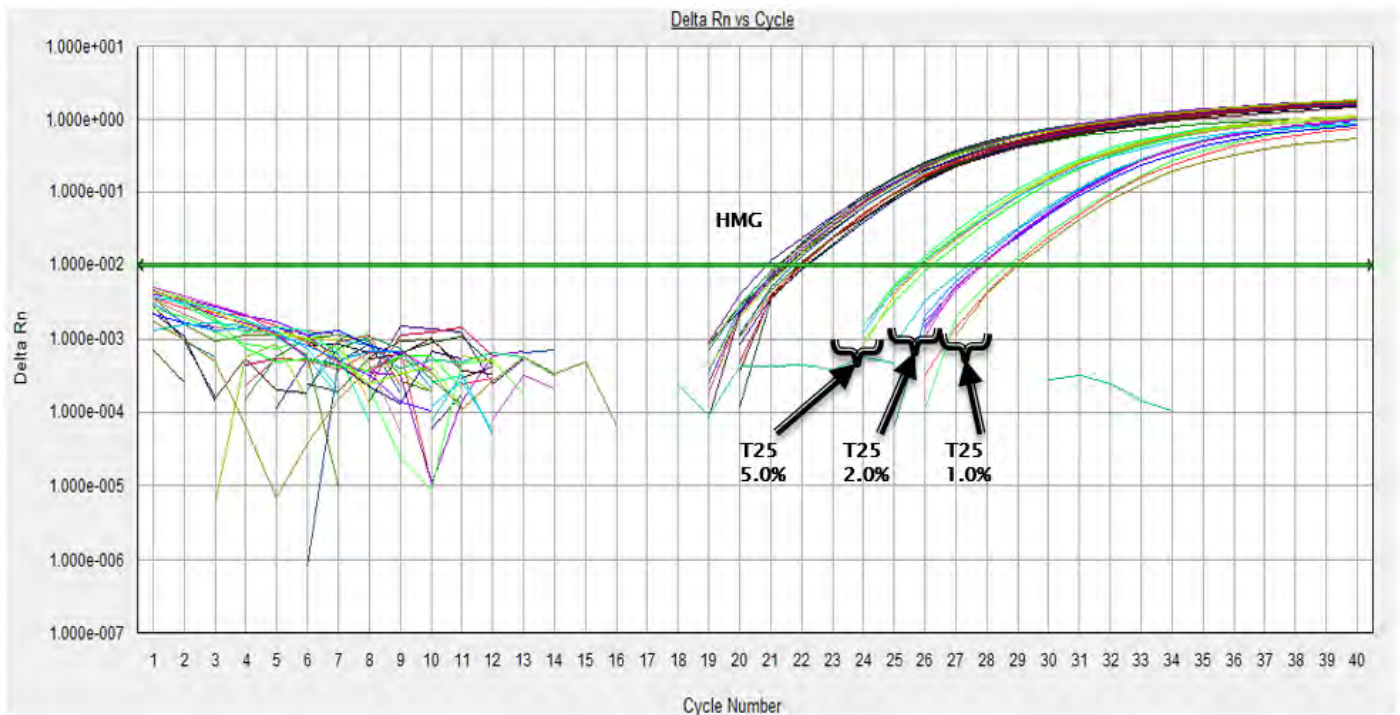


Figura 19.– Amplificación de los fragmentos HMG y T25 de las muestras problema.

Se muestran las amplificaciones realizadas a los fragmentos en las muestras analizadas con concentraciones de 5,2 y 1% m/m, se puede observar que la amplificación del gen HMG es uniforme mientras que la del fragmento T25 se puede ver dividida en tres grupos correspondientes a los distintos niveles de concentración como lo esperado. Los resultados obtenidos tras cuantificar con las distintas curvas de calibración se muestran en las tablas 25 y 26.

Tabla 25.- Valores de % GM cuantificados con pVHMG

pVHMG					
Muestra	%GM	%GM Promedio	SD	RSD	% GM Teórico
M1.1	4.88	5.93	0.95	16.05	5 ± 1.25
M1.2	6.73				
M1.3	6.18				
M2.1	2.53	2.08	0.42	20.20	2 ± 0.5
M2.2	2.03				
M2.3	1.70				
M3.1	1.12	1.21	0.20	17.08	1 ± 0.25
M3.2	1.06				
M3.3	1.44				

Tabla 26.- Valores de % GM cuantificados con AOCS 0306-H6

gDNA T25					
Muestra	%GM	%GM Promedio	SD	RSD	% GM Teórico
M1.1	3.47	4.24	0.88	20.75	5 ± 1.25
M1.2	4.73				
M1.3	4.54				
M2.1	1.98	1.62	0.39	24.03	2 ± 0.5
M2.2	1.54				
M2.3	1.35				
M3.1	0.92	0.99	0.24	24.4	1 ± 0.25
M3.2	0.87				
M3.3	1.17				

En ambas cuantificaciones (usando pVHMG y AOCS 0306-H6), para las tres diluciones (5, 2 y 1%) se obtuvieron valores que se encuentran dentro del valor esperado, es decir, dentro del límite de tolerancia permitido en este tipo de ensayos del $\pm 25\%$ del valor teórico en % m/m (Figuras 20, 21 y 22). Por otro lado, en todas las mediciones el valor del coeficiente RSD fue inferior al 25%, lo que indica que las mediciones realizadas con los dos materiales de referencia son confiables.

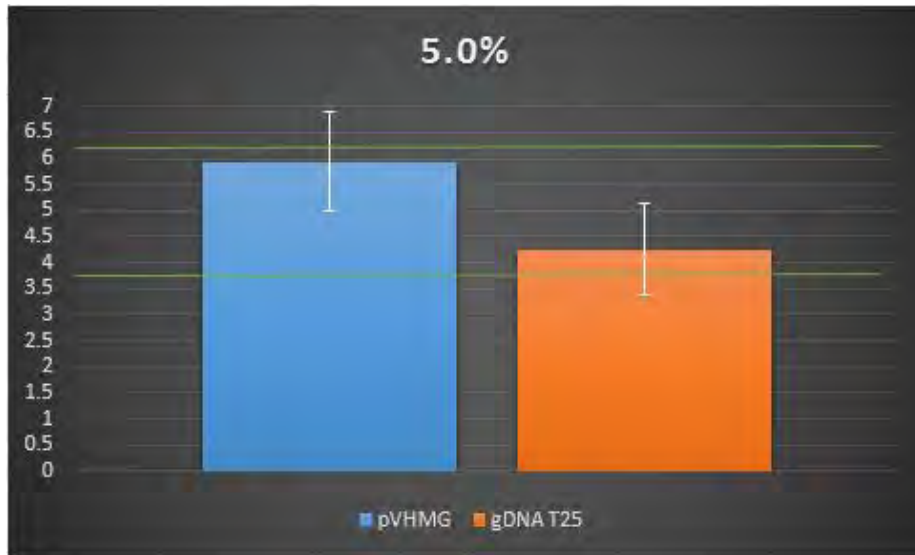


Figura 20.- **Cuantificación a muestra con 5% de Valor Teórico m/m.** Se muestra el promedio de %GM obtenido, usando como material de referencia pVHMG y AOCS 0306-H6 para el nivel de dilución de 5%, así como las barras de error mostrando la desviación estándar. Las líneas verdes superior e inferior muestran el máximo y mínimo %GM permitido para ser reportado tomando en cuenta un intervalo de $5\% \pm 1.25$.

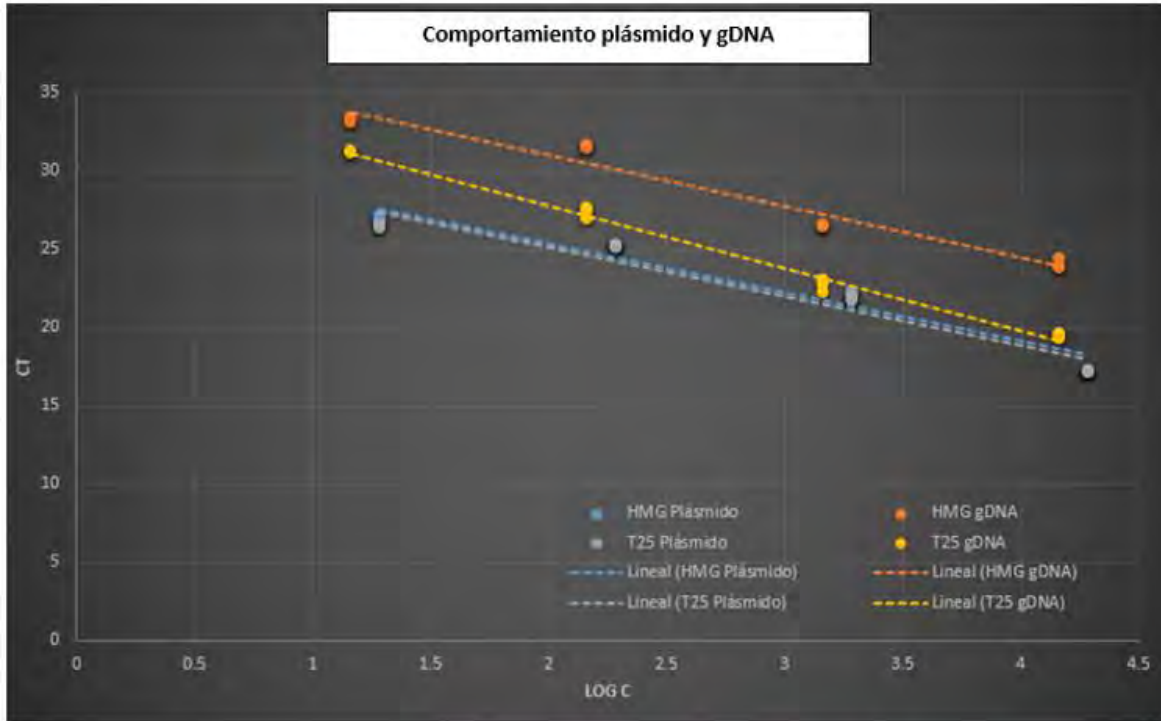


Figura 21.- **Cuantificación a muestra con 2% de Valor Teórico m/m.** Se muestra el promedio de %GM obtenido usando como material de referencia pVHMG y AOCS 0306-H6 para el nivel de dilución de 2%, así como las barras de error mostrando la desviación estándar y las líneas verdes superior e inferior muestran el máximo y mínimo %GM permitido para ser reportado tomando en cuenta un intervalo de $2\% \pm 0.5$.



Figura 22.- **Cuantificación a muestra con 1% de Valor Teórico m/m.** Se muestra el promedio de %GM obtenido usando como material de referencia pVHMG y AOCS 0306-H6 para el nivel de fortificación de 2%, así como las barras de error mostrando la desviación estándar y las líneas verdes superior e inferior muestran el máximo y mínimo %GM permitido para ser reportado tomando cuenta un intervalo de $1\% \pm 0.25$.

Dado que ambos materiales dieron buenos resultados se realizó un último análisis al comportamiento de amplificación de cada material mediante una gráfica comparativa de las curvas de calibración obtenidas con ambos materiales de referencia (Figura 23)



Plásmido (pVHMG)	
Secuencia blanco	Pendiente (m)
HMG	-3.11
T25	-3.24

gDNA (AOCs 0306-H6)	
Secuencia blanco	Pendiente (m)
HMG	-3.28
T25	-3.46

Figura 23.- **Comparación gráfica de curvas de calibración.** Se muestran los puntos correspondientes a las curvas de calibración generados por el plásmido pVHMG y por el material AOCs 0306-H6. En gris (T25) y azul (HMG) generados por la amplificación del plásmido, así como la tendencia lineal de los mismos, en naranja (T25) y rojo (HMG) los generados por la amplificación del gDNA. En la parte inferior se muestran las pendientes.

Al comparar las curvas de calibración realizadas con ambos materiales, se puede observar que el desempeño de las curvas generadas utilizando al plásmido calibrante pVHMG es más uniforme que aquel del material ACOS 0306-H6. Al ver las rectas que describen los fragmentos para T25 y para HMG en el caso del plásmido, ambas tienen un comportamiento similar con pendientes más cercanas mientras que en el caso del material AOCs 0306-H6 se observa un comportamiento distinto debido a la mayor diferencia en sus pendientes.

12.- DISCUSIÓN

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de eficiencia de amplificación, se decidió seguir adelante con la evaluación de los plásmidos pVHMG y pVADH dejando de lado al plásmido pVSSIIb, esto debido a que dicho plásmido presentó una eficiencia de amplificación muy por debajo de lo esperado para poder ser utilizado como material de referencia. Ya que la secuenciación arrojó un 99% de identidad con la secuencia reportada en GenBank, se pensó que esto podría ser una explicación, sin embargo, al hacer el ensayo in silico de alineamiento de los cebadores y sonda para qPCR, se encontró que estos acoplaban al 100%. Al realizar los ensayos en qPCR, se utilizó la temperatura de alineamiento recomendada en el compendio del JRC, quienes fueron los desarrolladores del método, pero es posible que se pueda mejorar la eficiencia de amplificación probando temperaturas distintas.

A continuación en los ensayos de LOD y LOQ, se observó que la cuantificación de maíz T25 resultó ser más sensible; mejor LOQ, al utilizar la secuencia del gen *hmg* como referencia endógena. Este comportamiento resulta difícil de explicar ya que el gen *adh* es uno de los más utilizados en este tipo de ensayos con otras variedades de maíz, sin embargo resulta plausible ya que en los métodos reportados y validados para la cuantificación del T25 el gen endógeno sugerido es el *hmg* (Collonier, 2005).

Este resultado no indica que el gen *adh* no sea adecuado para realizar ensayos cuantitativos en el maíz T25, simplemente manifiesta que las mediciones realizadas con este gen no son confiables a concentraciones cercanas a las 10 copias/ μ L. Es necesario realizar ensayos a mayores diluciones para determinar el LOQ y a su vez es posible que si se prueban distintas temperaturas de alineamiento para la reacción de qPCR, se pueda optimizar un poco más la reacción y obtener un mejor desempeño.

Debido a que el gen *hmg* resultó tener los mejores resultados en los parámetros analizados además de ser aquel que se utiliza en todos los métodos reportados y validados (Collonier, 2005; JRC, 2005; Kuribara, 2002; Tandance, 2009) es que se decidió hacer la comparación final solo con el plásmido calibrante que lo contiene (pVHMG). Al realizar la comparación del plásmido con el material de referencia certificado, se observó un comportamiento de amplificación más dispar entre el gen de referencia y la secuencia transgénica en el material AOCS 0306-H6. Es probable que esto se deba a la matriz en donde se encuentran las secuencia blanco. Por una parte el DNA genómico resulta una matriz compleja donde pudiera ser más complicado para la polimerasa tener acceso a la secuencia, cosa que no ocurre en el caso del plásmido, ya que su carácter circular y mucho más corto, facilita la acción de la enzima, por otro lado, es posible que haya ocurrido degradación en el gDNA por ser menos estable y que esto repercutiera en la amplificación de las secuencias blanco de manera distinta.

Una tercera explicación es las diferencias en ploidia de los distintos tejidos de maíz. Se sabe que dependiendo del tejido vegetal que se analice, se pueden encontrar distintos números de copias de los cromosomas (Trifa, Y; 2004) lo cual puede afectar las mediciones debido a la relación inserto/endógeno. En el caso del material AOCS 0306-H6 sabemos que su origen es DNA extraído a partir de hojas de la variedad T25, en donde teóricamente la relación en cuanto al inserto T25 y el gen HMG es 1:1 por estar presente el inserto sólo una vez por genoma total, pero en el caso de las muestras que se generaron, no se sabe el tejido de origen de la harina de T25 obtenida aunque se presume que provenga de granos, tejido en el cual se pueden encontrar diferentes ploidías que se reflejan en el proporción en que se encuentra el inserto.

Debido a que la cuantificación de OGM's es relativa, este tipo de dificultades con materiales de referencia convencionales ya se conocía y justamente es la razón por la cual se ha propuesto como alternativa la generación de materiales calibrantes plasmídicos, sin embargo, se ha demostrado que los mejores resultados en cuanto a la cuantificación de un tejido cualquiera de OGM, son aquellos en los que las mediciones se realizaron utilizando un material de referencia que proceda de exactamente el mismo tejido que se analiza (Chaouchi M, 2013).

En comparación al único plásmido desarrollado para detectar T25 que se tenía a la fecha (Kuribara, 2002), se puede observar que el desempeño de nuestro plásmido final es superior ya que como se había mencionado anteriormente, se trata de un plásmido que no es específico para T25, por lo que en este trabajo se obtuvo el único material de referencia plasmídico específico para T25.

13.- CONCLUSIONES

Se generaron tres plásmidos calibrantes distintos (pVHMG, pVADH y pVSSIb).

Se determinó que el gen endógeno *HMG* es el más apropiado para la cuantificación de T25.

Se determinó que el plásmido con el mayor potencial para ser utilizado como material de referencia fue aquel con un fragmento del gen *HMG* (pVHMG).

Se determinó que la eficiencia de amplificación, Límite de Detección (5 copias) y Límite de Cuantificación (10 copias) del material de referencia generado es comparable al de un material de referencia certificado (AOCS 0306-H6) para la cuantificación específica de T25.

Las mediciones realizadas con el plásmido calibrante (pVHMG) a muestras problema generadas en el laboratorio, fueron comparables con aquellas realizadas utilizando el material de referencia certificado (AOCS 0306-H6).

Al comparar las curvas de calibración generadas se encontró que el comportamiento de amplificación de un material de referencia sintético (pVHMG) es más uniforme que el de un material de referencia convencional (gDNA)

14.- REFERENCIAS

Literatura Consultada

- Burns M., et al; (2006) "Comparison of plasmid and genomic DNA calibrants for the quantification of genetically modified ingredients" *European Journal of Food Research and Technology*
- Bautista E., (2000) "¿Cuánta Liberación Aguanta la Agricultura? Impacto del TLCAN en el sector agroalimentario" *Cámara de Diputados LVXII Legislatura. Comisión de Agricultura*
- Chaouchi M., et al; (2013) "Relative quantification in seed GMO analysis: state of art and bottlenecks" *Transgenic Research*
- Collonier C., et al; (2005) "Characterization and Event Specific-Detection by Quantitative Real-Time PCR of T25 Maize" *Journal of AOAC International*
- European Commission. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and the Council of March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing. Official journal of the European Communities.
- European Commission. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, European Network of GMO Laboratories; (2011) "Compendium of reference methods for GMO analysis" *JRC REFERENCE REPORTS*.
- European Commission. Joint Research Centre; (2011) "Certification of Plasmid DNA containing NK603 Maize DNA Fragments" *Certification Report*.
- European Commission. Joint Research Centre; (2011) "Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods" *JRC Scientific and Technical Reports*.
- European Commission. Joint Research Centre; (2005) "Event-specific method for the quantitation of maize line T25 using real-time PCR" *Validation Report*.

- Fideicomisos Intsituidos en Relación con la Agricultura; (2015) “Panorama Agroalimentario. Maíz 2015” Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial.
- Gálvez A., Quirasco, M; (2013) “Detección de polen de plantas Genéticamente Modificadas en miel Fase I” *Reporte Técnico*.
- González A., Ávila J.F.; (2014) “Impactos sociales, económicos y culturales de la posible introducción de maíz genéticamente modificado en México” *Proyecto CIBIOGEM*.
- González A., Ávila J.F.; (2014) “El maíz en Estados Unidos y en México. Hegemonía en la producción de un cultivo” *Argumentos UAM Xochimilco*
- Gutiérrez, A.; (2010) “The Protection of Maize Under the Mexican Bioafety Law: Environment and Trade” *Universitätsdrucke Göttingen*
- Holst-Jensen A., et al; (2012) “Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials” *Biotechnology Advances*.
- Ingerborg A., Traavik T.; (2003) “Genetically Modified (GM) Crops: Precautionary Science and Conflicts of Interests” *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*.
- Intertek Food Service GmbH (2012) “Annual Report 2012 Honey Analysis” *Bremen Germany p58*
- James,C. (2010) “Global status of commercialized biotech/GM crops” *ISAAA Briefs*. Executive Summary
- Kuribara et al; (2002) “Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean” *Journal of AOAC International*
- Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, 18 Marzo 2005

- Lusser M., et al; (2011) “New Plant Breeding Techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development” *European Commission JRC Scientific and Technical Reports*. Luxembourg
- Mathur J, et al; (1998) “PEG-Mediated Protoplast Transformation with naked DNA” *Arabidopsis protocols*
- Shindo Y., et al; (2002) “Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules” *Journal of AOAC International*
- Tandance A., et al; (2009) “Evaluating Precision and Accuracy When Quantifying Different Endogenous Control Reference Genes in Maize Using Real Time PCR” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- Taverniers I., et al; (2001) “Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products” *European Journal of Food Research and Technology*
- Trifa Y., Zhang D.; (2004) “DNA content in Embryo and Endosperm of Maize Kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO Quantification” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- UCCS, ECOSUR; (2012) “Miel y cultivos transgénicos en México: la imposible coexistencia” *Amicus Curiae al Juzgado Segundo de Distrito del Trigésimo Primer Circuito*
- *Claridades Agropecuarias, 2010. Exportaciones mexicanas de miel no. 199*

Sitios Web consultados

- BCH (Biosafety Clearing House) <https://bch.cbd.int/>
- http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/mieles/pdf/Detec_Polen_Plantas_Genticamente_Modificadas_FI.pdf
- CERA (Center for Environmental Risk Assessment) http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database
- CERA (Center for Environmental Risk Assessment) <http://www.cera-gmc.org/GmCropDatabaseEvent/T25>
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados) <http://www.conacyt.mx/cibiogem/>
- Convention on Biological Diversity (CBD) <http://www.cbd.int/>
- Custom Primers-Oligo Perfect Designer (<https://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>)
- COFEPRIS <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Lista.aspx>
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología <http://www.conacyt.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf>
- GMO COMPASS http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/506.usa_cultivation_gm_plant_2013.html
- GMO Detection method Database (GMDD), <http://gmdd.shgmo.org/sequence/view/17#>, Mayo 2014
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16

- Institute of Science in Society (ISIS)
http://www.i-sis.org.uk/Substantial_Non-Equivalence.php
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R08871
- NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- New England Biolabs Double Digest Finder
<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>

15.- ANEXO

ANEXO 1

Fragmento I secuenciado en pVADH

```
>150306-12_G02_V1_VF.ab1      829
GAAACTTCGGGAGGCTCGAGTTTTAGCACGATCCTTGGTTCCCGTCACGC
TCCATATGGTTCCCTCCGTTCTCCATCCGGCCCGGACCCGAGCTTCCTTT
GCCGAAATTCTTTTCAACATTTGGAAAACAACAAACCCCCGATCATCCT
CGGCCCCCGGGGCGAGCGGGGGGACCCCCACCGACTCAGTGCCTTGAGG
AAATTCTCCCCGATATGGTGGAGCCCGGAGAGGTGTGCCCTCCGAAAATC
CCCCAAACCAACCCCCGAGGTTTCTTCCCGGGATGAGGGGGCAAAAAG
GGCAATACCCCCAAACCTCCTAGCCTAGGATCTAGACACCGCGTTGTCCT
GCTCCAGGTGTAAAGATGCAGCCCCGGTTTCGCAAGCCGCGCCGTGGTTT
GCTTGCCACAGGCGGCCAAACCGCACCCCTTCCCGTCTGTTTCCCATC
TCTTCTCCTTTAGAGCTACCACTATATAAATCAGGGCTCATTTTCTCGC
TCCTCACAGGCTCATCTCGCTTTGGATCGATTGGTTTTCGTAACGGTGAG
GGACTGAGGGTCTCGGAGTGGATGATTGGGATTCTGCTCGAGATCTTTCT
AGAAGATCTCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTC
TTTTATTCTCTCAAGATTTTTCAGCTGTATATTAACCTTATATTAAGAAC
TATGCTAACCACTCATCNNAACCGTTGTAGTGGCGTGGGGTTTTCTGGC
ATCGACTCTCATGAAACTACGAGCTAATATTCATATGTTCTCTTGACCAA
CTTTAATTCNGCATTTTTTTTTTGAACGA
```

Fragmento II secuenciado en pVADH

```
>150306-12_I02_V2_VF.ab1      808
ATGACTCGGGNTTTTCGGGATTCTCTGCTTTCACCCGATGCAATTTCTC
CCTTCTTTTTTCTCCAAGGCCCAAGTTATCCTTGGCCAAAATCCTTTTAC
CATTTGAAACCACGAACCACCCGCCGCGTCTCGGCTTCTGGGGGGGCG
GGGGGATGCTTCTTCTTTCTACGTTTTTGTGGCGTTTTTCGCGCCGATT
TTCCCCCGCGGAGATCTCCCCAAGCGAGGCCCCCCAACAAAAGACAC
GCGTTCTTTCTTTGGGAAAGGAGGAAAAACCCCGAGGCCCCCCCCCCC
CCAACCTTTAAAAAAAATTTCTTGGCGGTTTCTTGGCCCAATTAATAA
CGTTTGTAGCGCTCTTACTTTGCTTCGGATTAATGTCATAGGATTGGGA
GGTGAAGCAGAATCTAGAGGCTAGACTAGGAAGTTTCCAAGATATTACCC
TTTGTTGAAAAGTCTCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTG
ATATTTTTGGAGTAGACAAGCGTGTGCGTCCACCATGTTGACGAAGAT
TTTCTTCTTGTATTGAGTCGTTCCCGCCATTGTCGCTGTCGCACGGCGG
TGAAGGGAGTATCATGTCGTAGCTGCCGTCGAGGGGACATGGAACCTGA
TGACTTCACCTGATATCTGTATGCACCGTCCCNNGTCTGATANGGTCT
GCTTGNGTACTGACCCATTCNGGNGCCTTGACNNGNAGCCATGGNTCTTC
TTGANGATCTCNACATATCTCAGCTGCATGGNAANCATGTCNNNNTGAT
TCTCNAG
```

Fragmento I secuenciado en pVHMG

>150306-12_K02_V3_VF.ab1 811
AATNTCNGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCCATGGTCCCGTCAAGC
TCCAGATGACAAACATGATCTCATATCAGGGACTTGTTGCGACCTTCCCT
AGAAAGATGCTCGAGGGTTCATTATCCTCCCTGTCATCAGCAGCACTCGC
CGCCGCATCTGTAGCCGGAGCTGCATCAGCATTAGCATCCACCGGTTAG
CGATGCCTATGCTTTCCACCGGTCTAGCATCATCACCTGCGGGCTCTGGC
TTCACCGCACTGGCATCGATTTCTCTCTTGGTGACAGGAGCTGATGGTTG
ATCAGCTTTGGGTCCGGACACCGGCGGGCGGATTGCTCGCGCTGCTGC
CCCCAGTCGTTCCGTTTTGCATTGCAGCGCTCTGACTTTGCTTCGGAGTA
GATGTCAAAGGATTGGGAGGTGAAGCAGAATCTAGAGGCTAGACGAGGAG
GTTTCCGGATATTACCTTTGTTGAAAAGTCTCAATTGCCCTTTGGTCTT
CTGAGACTGTATCTTTGATATTTTTGGAGTAGACAAGCGTGTCTGTCTCC
ACCATGTTGACGAAGATTTCTTCTTGTCATTGAGTCGTTCCGCCATTGT
CGCTGTGCGACGGCGGTGAAGGAGTATCATGTCTGAGTGCCTCGTCCGAGG
GACATGAACTCAAGACTCCC GAAACGGAGCACCGTCCC GGGCCGGAGAGG
TTGCTGGAGACTGCCCATCTGGAGCTTGACGGGAACCATGGATCTTTCTA
GAAGATCTCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGNAAATCGATGTTCTTCT
TTTATTCTCTC

Fragmento II secuenciado en pVHMG

>150306-12_M02_V4_VR.ab1 756
GAATTGTGGGAGATCTTCTAGTAGATCCATGGCTCCCGTTAAGCTCCTTA
TGGGCATTCTTCATCATCTCTCCCGCCCGGTACCCGGTTCGATTCTCG
TTTCTTGTTTTGTGTCCACCAACCGCCCCACAATCTGCTTCTCCTTGG
CCGCGGGGGACGCTCCTTCTTTGCGTTCCTTGGCGGATTGACCCAAA
TTTTCGTTAACCCGGAGAATCACCCAGCCTTGCTACCCAAAAAAAAC
AAAGATGCTTCTTTCAAGACCAAAGGAGAATTGAGACTTTTCCCCCCC
GGTAATATCCGAAAACCTCCTTCTTAGCCTCTCGATTCTGCTTCAATT
CCCAATCCTTTGACATCTACTCCGAAGCAAAGTCAGAACGCTGCAATGCA
AAACGGAACGACTGGGGGCAGCAGCGGAGCAAATCCGCCGCGCCGGTGT
CCGGACCCAAAGCTGATCAACCATCAGCTCCTGTACCAAGAGAGAAATC
GATGCCAGTGCCGGTGAAGCCAGAGCCGCGAGTATGCTAGACCGGTG
GAAAGCATAGGCATCGCTGAACCGGTGGATGCTAATGCTGATGCAGCTCC
GGCTACAGATGCGGCGGCGAGTGTCTGCTGATGACAGGAGGATATGAACCC
TCGAGCATCTTTCTAGGGAAGTGCAGAGTCTGATATGAGATCATGTTT
GTCATCTGGAGCTTGACGGGAACCATGGATCTTGTGAAAAACTCGAGCC
ATCCNN

Fragmento I secuenciado en pVSSIib

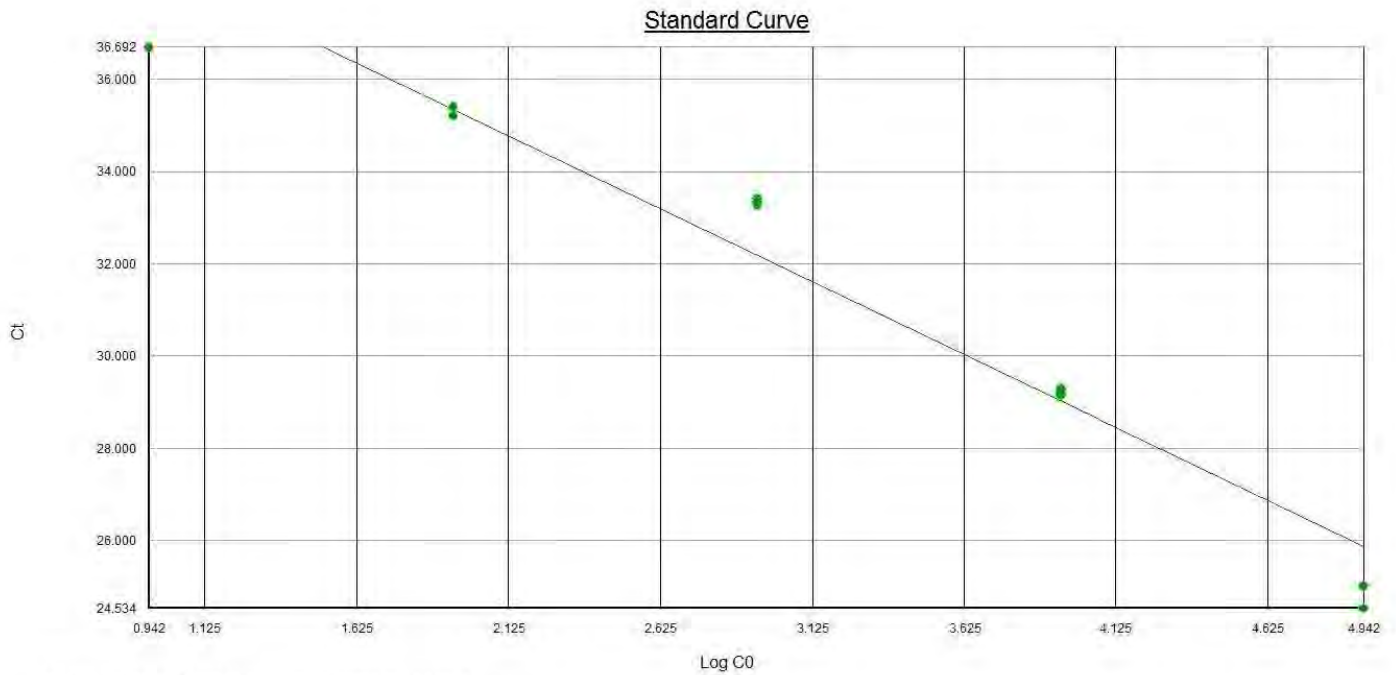
```
>150306-12_002_V5_VR.ab1      777
GANNTGGTAGGAGATCTTCTAGAAGATCCGGACGATGGCCTTGTTGTACT
CGAGCTTGAGCTTGTTAGCCTTGGCTACATAGGGAGCCTTGTCCTACAAT
CCACACAAACGCACGCGTAAAACAATTAATCAGCACGAGATTTCTAGTCC
AATCAACTACTACTTTAGTACAGAAGATGGAGCTTACCGACTCGCTCAGG
GATTTCCACCTGTGCGCCAGCAGCTTCCCCACCTGAAAAGTTCGACCAGG
AGAGGGTCTAGAGCCTAGACGAGGAGGTTTCCGGATATTACCCTTTGTTG
AAAAGTCTCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTGATATTTT
TGGAGTAGACAAGCGTGTGCTGCTCCACCATGTTGACGAAGATTTTCTTC
TTGTCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCGCTGTGCGCACGGCGGTGGAAGGA
GTATCATGTGCTAGCTGCCGTCGAGGGACATGAACTCAAGACTCCCGAAA
CGGAGCACCGTCCCGGGCCGGAGAGGTTGCTGGAGACTGCCCATCTGGAG
CTTGACGGGAACCATGGATCTTGCTGAAAAACTCGAGCCATCCGGAAGAT
CTGGCGGCCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCCGGATGGATATGG
TGTTCAGCACAAAGTGTAAAGCAGTTGATTTTATTCACTATGATGAAAAA
AACAAATGAATGGGAACCTGCTCCAAGTTAAAAATAGAGATAATACCGAAA
ACTCATCGAGTAGTAAGATTAGAGATA
```

Fragmento II secuenciado en pVSSIib

```
>150306-12_A04_V6_VR.ab1      774
TATTGTNGAGATCTTCTAGAAGATCCGGACGATGGCCTTGTTGTACTCGA
GCTTGAGCTTGTTAGCCTTGGCTACATAGGGAGCCTTGTCCTACAATCCA
CACAAACGCACGCGTAAAACAATTAATCAGCACGAGATTTCTAGTCCAAT
CAACTACTACTTTAGTACAGAAGATGGAGCTTACCGACTCGCTCAGGGAT
TTCCACCTGTGCGCCAGCAGCTTCCCCACCTGAAAAGTTCGACCAGGAGA
GGGTCTAGAGCCTAGACGAGGAGGTTTCCGGATATTACCCTTTGTTGAAA
AGTCTCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTGATATTTTTGG
AGTAGACAAGCGTGTGCTGCTCCACCATGTTGACGAAGATTTTCTTCTTG
TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCGCTGTGCGCACGGCGGTGGAAGGAGTA
TCATGTGCTAGCTGCCGTCGAGGGACATGAACTCAAGACTCCCGAAACGG
AGCACCGTCCCGGGCCGGAGAGGTTGCTGGAGACTGCCCATCTGGAGCTT
GACGGGAACCATGGATCTTGCTGAAAAACTCGAGCCATCCGGAAGATCTG
GCGGCCGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCCGGATGGATATGGTGT
TCANGCACAAAGTGTAAAGCAGTTGATTTTATTCACTATGATGAAAAAAA
CATGAATGGAACCTGCTCCAGTTAAAAATAGAGATATACCGAAACTCATCG
AGTAGTAGATTAGAGATATACACN
```

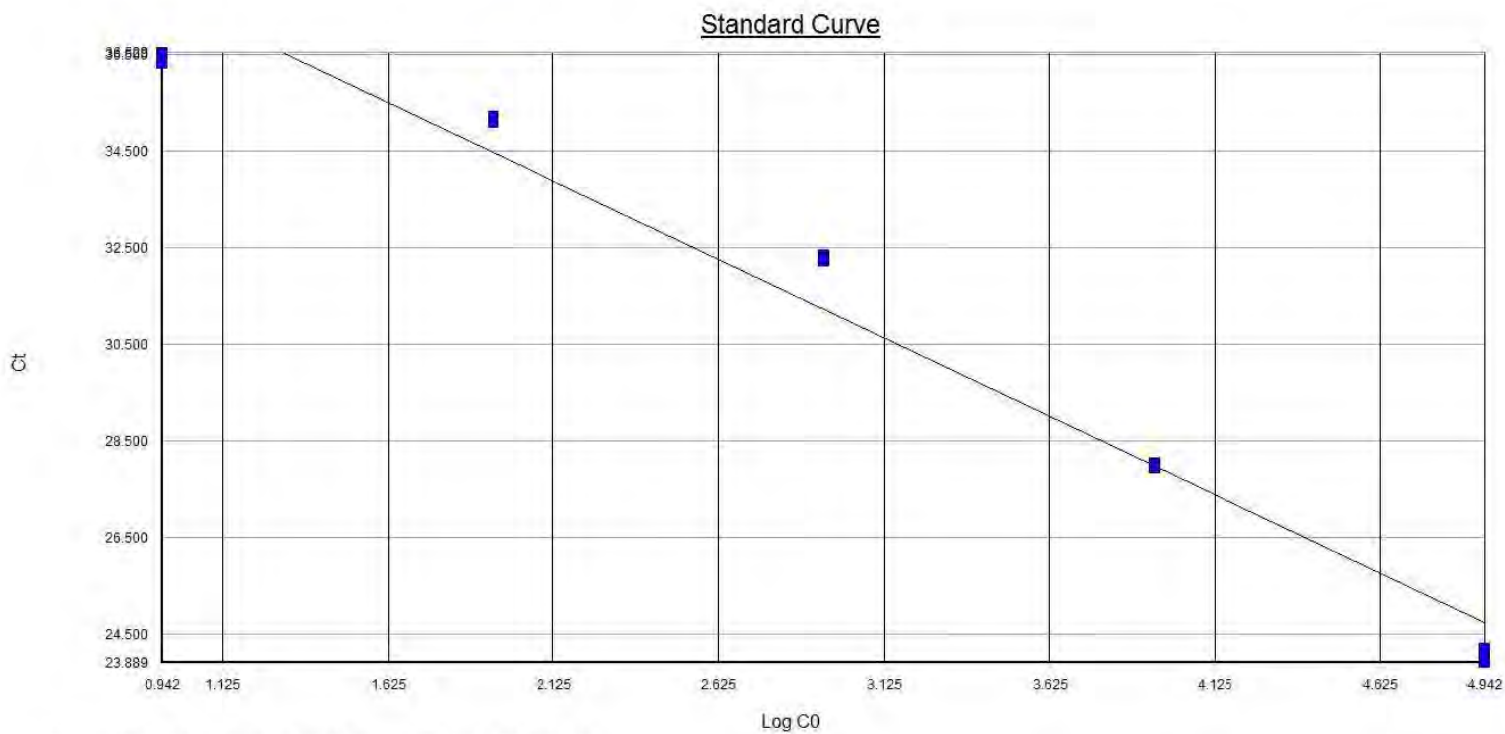
Anexo II

Curva de calibración a partir del fragmento ADH en el plásmido Pvadh



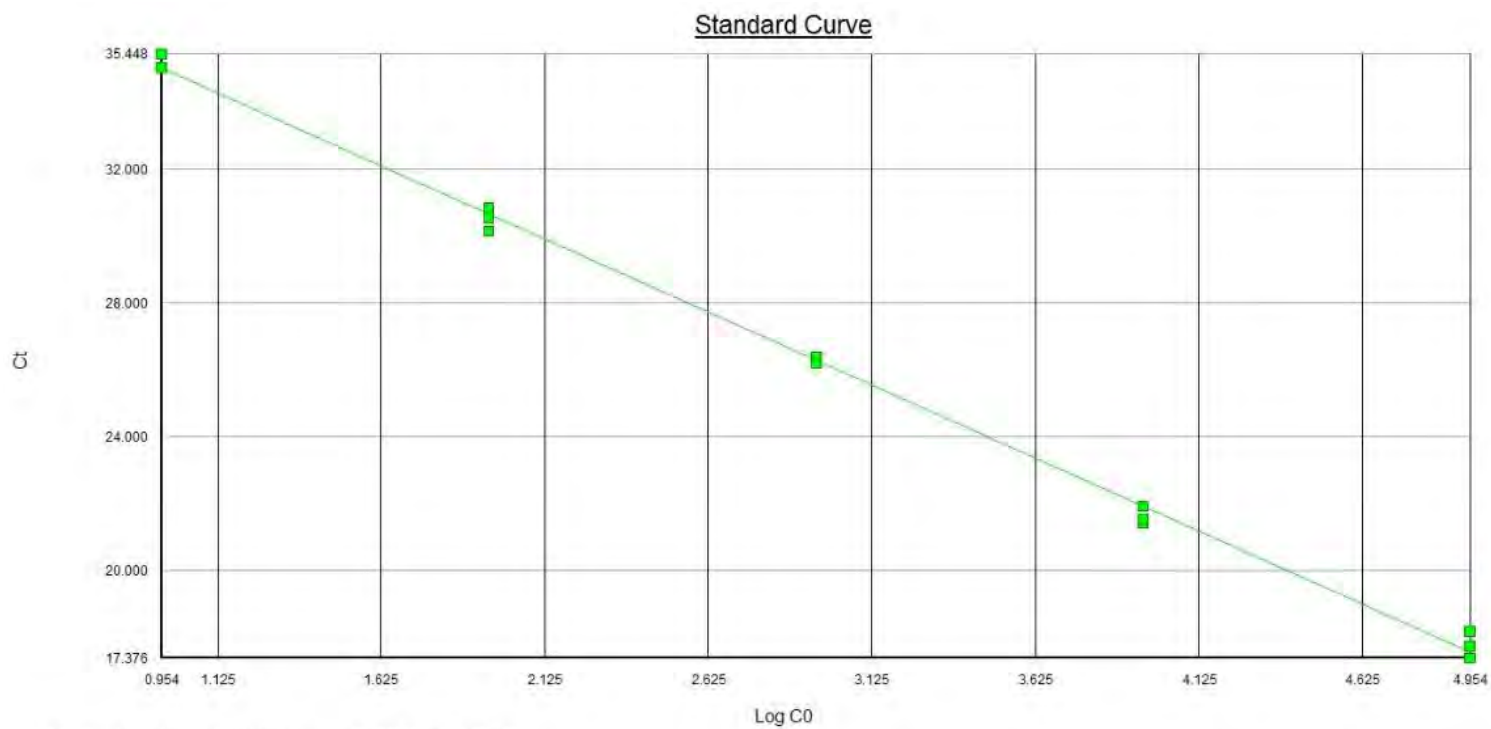
Detector: adh, Slope: -3.162555, Intercept: 41.490757, R2: 0.942143
Document: 230515.sds (Standard Curve)

Curva de calibración a partir del fragmento T25 en el plásmido pVADH



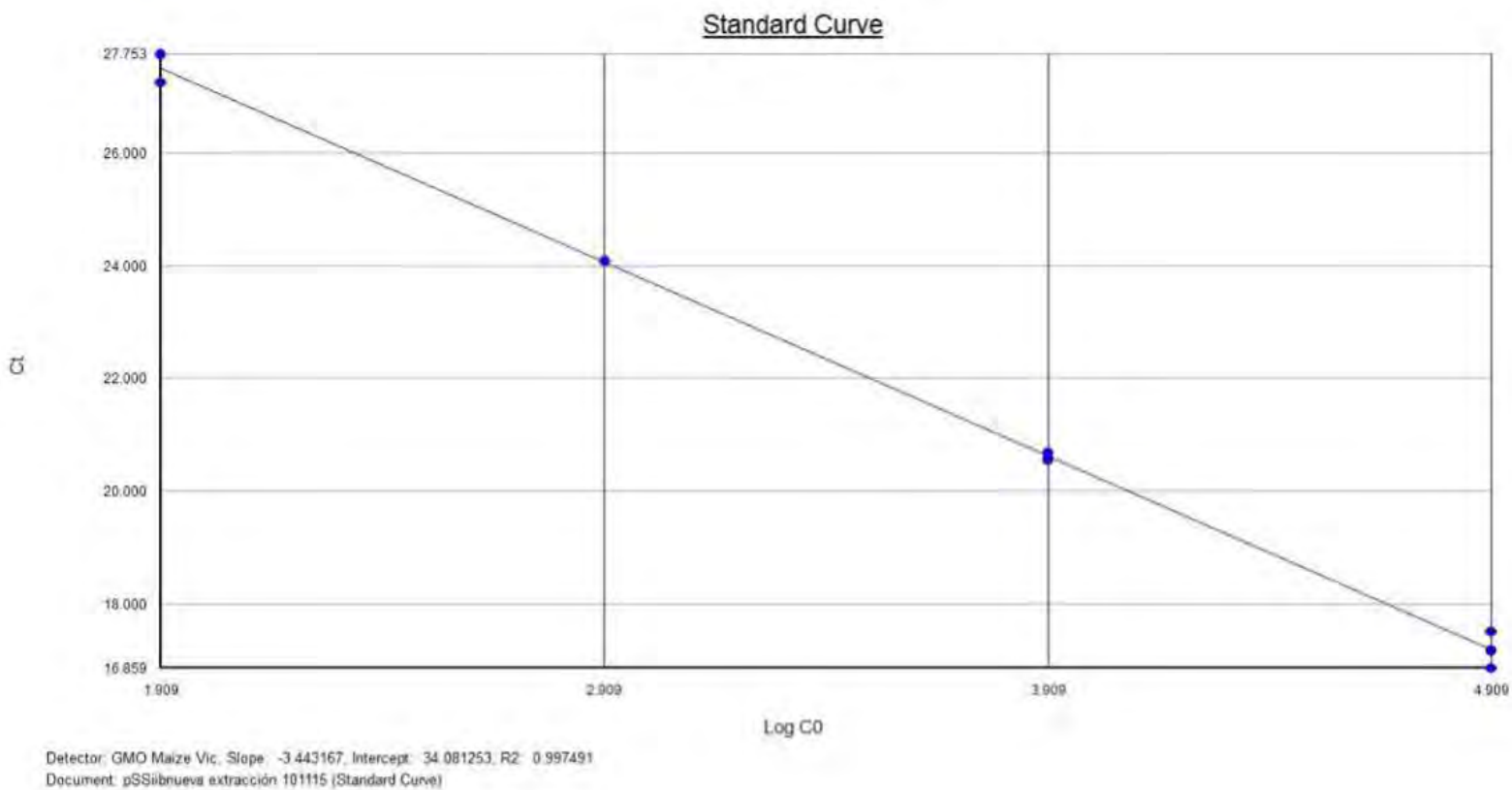
Detector: GMO Maize Vic, Slope: -3.248240, Intercept: 40.783512, R2: 0.965930
Document: 230515.sds (Standard Curve)

Curva de calibración a partir del fragmento SSIib en el plásmido pVSSIib

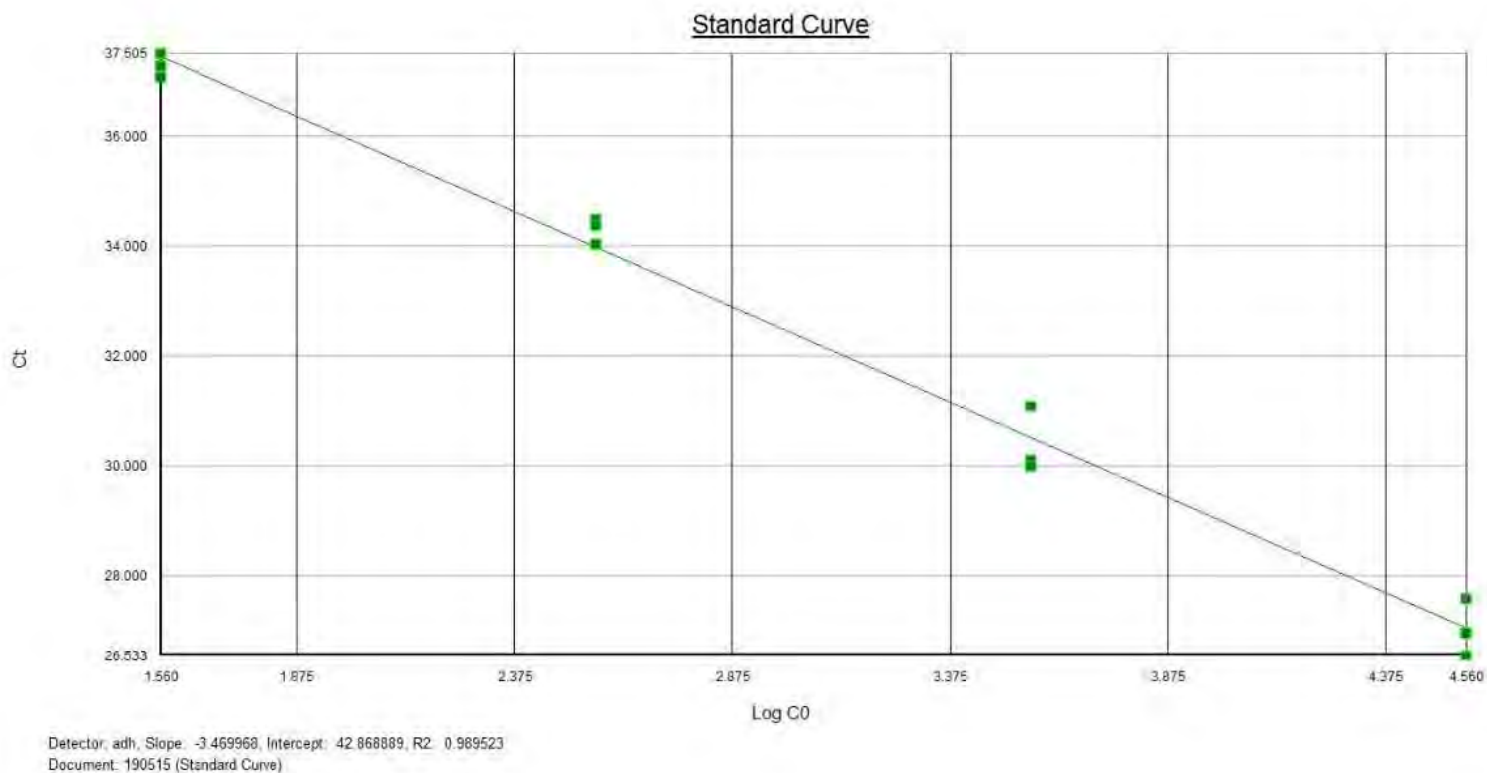


Detector: SSIib, Slope: -4.370268, Intercept: 39.183903, R2: 0.997650
Document: 2 hmg gDNAat25 SSIib nueva 281015 (Standard Curve)

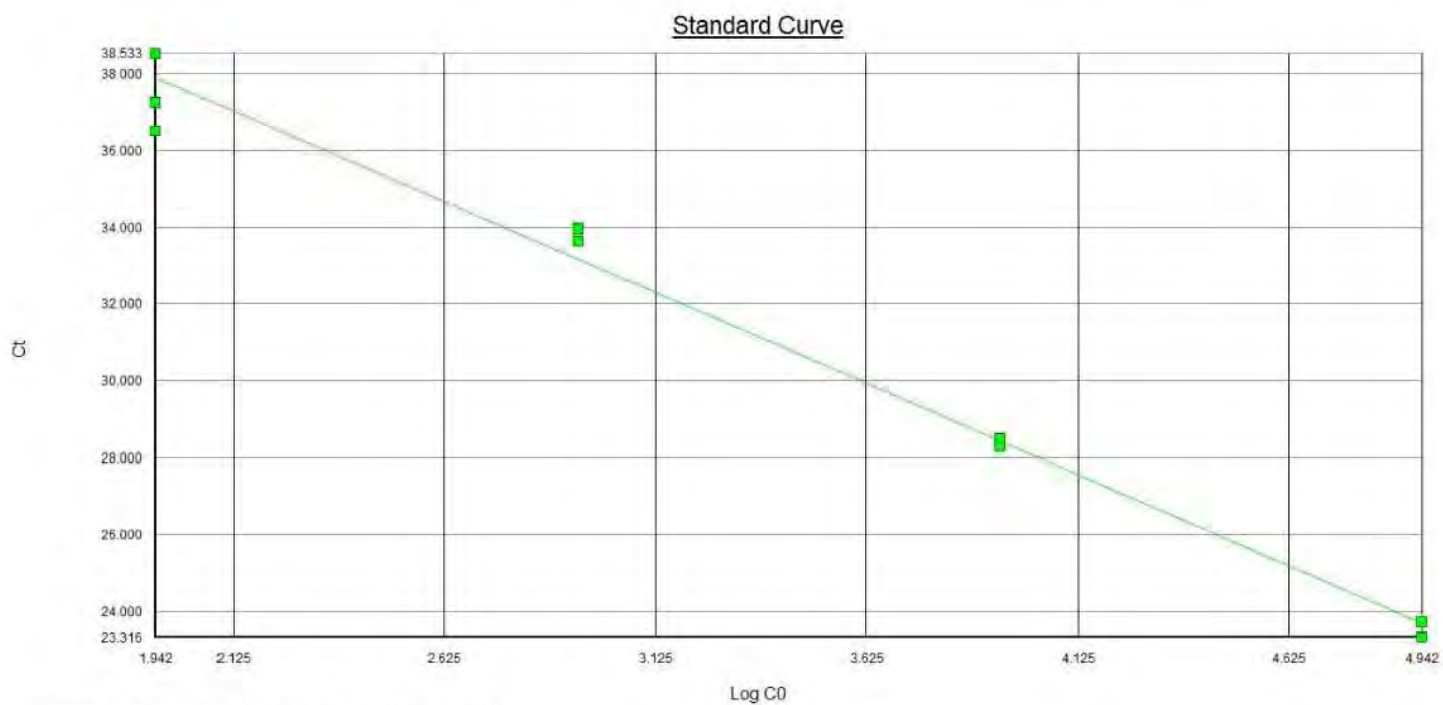
Curva de calibración a partir del fragmento T25 en el plásmido pVSSiib



Curva de calibración a partir del fragmento ADH en el Material de referencia AOCS 0306-H6



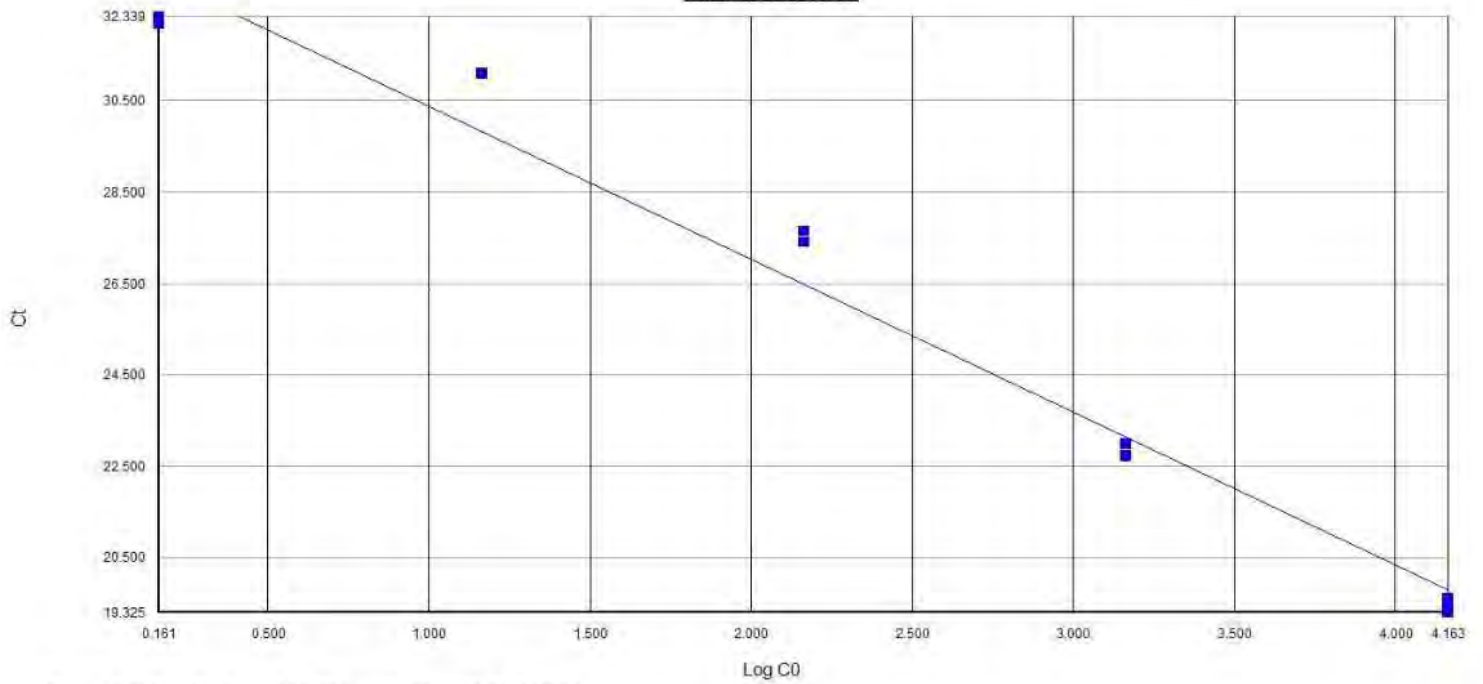
Curva de calibración a partir del fragmento SSIib en el Material de referencia AOCS 0306-H6



Detector: SSIib, Slope: -4.738808, Intercept: 47.097305, R2: 0.986421
Document: 290715 (Standard Curve)

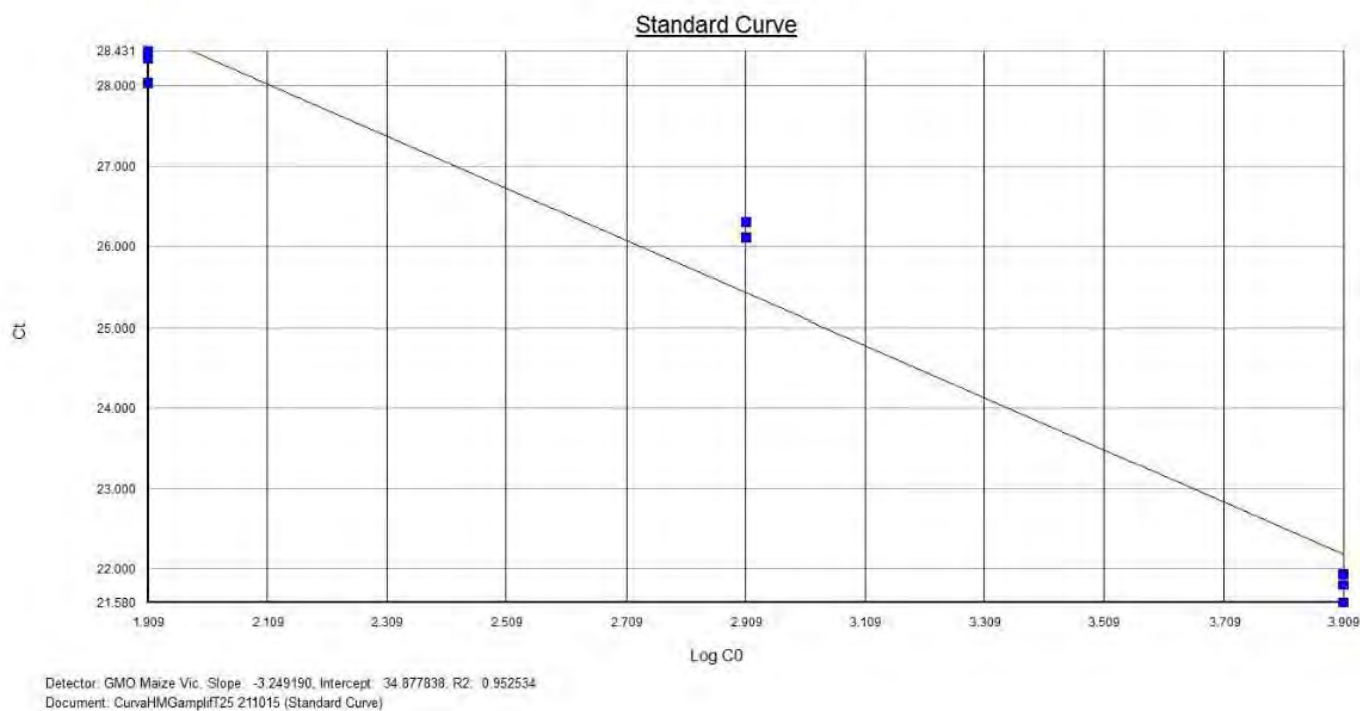
Curva de calibración a partir del fragmento T25 en el Material de referencia AOCS 0306-H6

Standard Curve

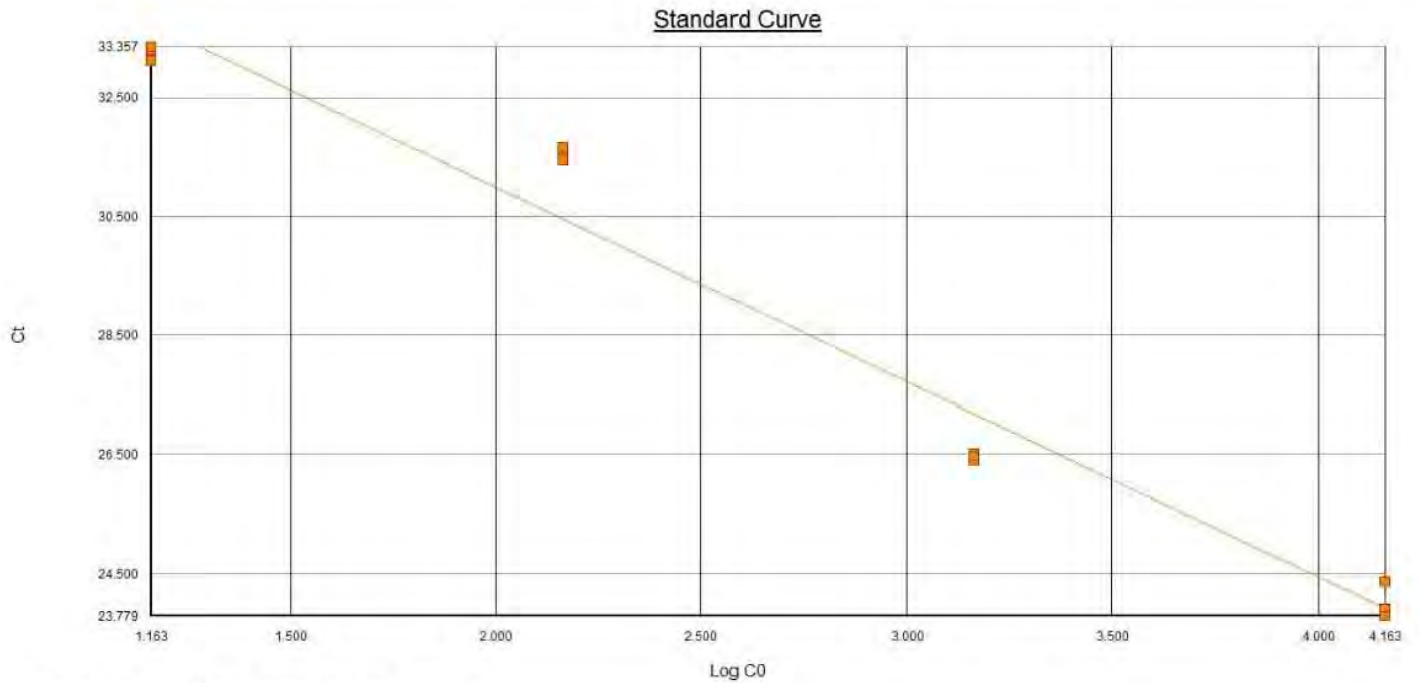


Detector: GMO Maize Vic, Slope: -3.351792, Intercept: 33.733612, R2: 0.975950
Document: gDNAT25Cuv230515 (Standard Curve)

Curva de calibración a partir del fragmento T25 en el Plásmido pVHMG



Curva de calibración a partir del fragmento HMG en el Plásmido pVHMG



Detector: hmg, Slope: -3.280856, Intercept: 37.555786, R2: 0.964129
Document: gDNAHMGcurva110615 (Standard Curve)