



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR  
DIGITAL (dPCR)**

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

**PRESENTA**

**JESSICA ASTRID CANTO GRAJEDA**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Dra. Marina Gavilanes Ruiz**

**VOCAL:**               **Profesor: Dr. Euclides Avila Chávez**

**SECRETARIO:**       **Profesor: M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (CNRDOGM), SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASICA)/SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA). KM 37.5 CARRETERA FEDERAL MÉXICO-PACHUCA, COL. CENTRO, TECÁMAC DE FELIPE VILLANUEVA, ESTADO DE MÉXICO, C.P. 55740.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

---

### **SUSTENTANTE:**

Jessica Astrid Canto Grajeda

---

*“Tanta prisa tenemos por hacer, escribir y dejar oír nuestra voz en el silencio de la eternidad, que olvidamos lo único realmente importante: vivir.”*

*Robert Louis Stevenson*

### **DEDICATORIA**

*Dedico esta tesis a todos aquellos que me han impulsado a salir adelante con su apoyo y fe, principalmente a mis padres y hermanos porque han estado a mi lado en cada instante de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi mamá, tú eres el ser que más amo en esta vida, todos y cada uno de mis logros te los debo a ti, no solo por tu apoyo incondicional y sacrificios, también porque eres mi más grande motivación en esta vida. Te admiro y estoy orgullosa de ti. Dios me ha obsequiado muchas bendiciones, pero ninguna se compara con el hecho de que tú seas mi madre.*

*A mi papá, por apoyarme cuando ha sido necesario, y por mostrarme su amor siempre, Dios ha sido generoso conmigo a través de ti, te amo.*

*A mis hermanos, ambos me han enseñado mucho de la vida aun sin saberlo, los amo y nunca acabaré de pagarles todo lo que me han dado, siempre estaré ahí para ustedes al igual que ustedes lo han hecho conmigo desde siempre.*

*A mi abuelito Daniel, mi tío Jorge y mi primo Jorge, porque han sido parte importante de mi vida también, y siempre he contado con su apoyo y amor incondicional. Y a mi Drago, porque es parte de mi familia también, y ha cambiado mi forma de ser y de vivir.*

*A Karina, David y Miriam, ustedes son esos amigos que han estado conmigo siempre, aun sin estar presentes físicamente. Los amo porque me han encaminado a ser un mejor ser humano, por eso y más, tendrán un lugar en mi corazón eternamente.*

*A Felipe, porque cuando te conocí me brindaste tu conocimiento y amistad y al paso del tiempo me has entregado tu amor y apoyo incondicional, gracias mi amor por darle a mi vida un cambio fascinante.*

*A mi asesor, por permitirme formar parte de uno de sus proyectos para que pudiera plasmarlo en esta tesis, donde la dedicación y el*

*esfuerzo fueron compartidos en cada una de sus etapas, pero sobre todo porque depositó en mí su confianza siempre. Gracias Abraham, por compartir tu experiencia y conocimiento conmigo.*

*A los miembros del equipo del CNRDOGM: Abraham, José Luis, Isabel, Luis Brindis, Blanca y Arturo, que me acogieron y guiaron mis pasos, pero sobre todo, por brindarme su amistad y concederme momentos colmados de alegría que hicieron de mi estancia en este centro una experiencia de vida inolvidable; también gracias, a los chicos, que igual que yo, formaron parte de este centro efímeramente: Blanquita, Lizbeth, Mímiz, Valeria, Juan Carlos, Geovanni, Luz, Omar y Gaby, quienes me mostraron su mejor cara todo el tiempo y me colmaron de momentos llenos de diversión.*

*A mis sinodales, porque en todo momento se mostraron amables y accesibles conmigo, pero principalmente por invertir parte de su tiempo en la mejora de este trabajo gracias a sus correcciones.*

*Y finalmente a la UNAM, por permitirme conocer personas admirables que no solo me prepararon como profesionista, también me ayudaron a crecer como ser humano e hicieron de mi estancia en esta institución una grata experiencia; e igualmente por darme la oportunidad de coincidir con individuos caracterizados por su soberbia que me motivaron a esforzarme siempre por no asumir la misma conducta.*

## Índice

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Organismos Genéticamente Modificados (OGM)</b>	4
<b>3.2 Legislación internacional de OGM</b>	5
<b>3.3 Legislación y regulación nacional de OGM</b>	7
<b>3.4 Requerimientos legales en la detección de OGM</b>	13
<b>3.5 Algodón</b>	13
<b>3.6 Algodón en México</b>	14
<b>3.7 Algodón GM</b>	15
<b>3.8 Algodón GM con el evento específico (EE) <i>MON88913-8</i></b>	16
<b>3.9 Detección y análisis de OGM</b>	17
<b>3.10 PCR digital (dPCR)</b>	21
<b>3.11 Ventajas de la cuantificación por dPCR sobre qPCR</b>	22
<b>3.12 Tipos de matrices digitales</b>	23
<b>3.13 Materiales de Referencia (MR)</b>	29
<b>4. Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Objetivo general</b>	31
<b>4.2 Objetivos particulares</b>	31
<b>5. Metodología</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Materiales y métodos</b>	33
<b>5.2.1 MRC</b>	33
<b>5.2.2 Preparación de mezclas de harina de algodón GM</b>	33
<b>5.2.3 Extracción de DNA genómico de MRC y mezclas de harina de algodón GM</b>	34
<b>5.2.4 Cálculo de la concentración de DNA para la cuantificación por dPCR</b>	35
<b>5.2.5 Dilución del material por cuantificar</b>	36

5.2.6 Plásmidos	38
5.2.7 Diseño y preparación del protocolo de diluciones para la cuantificación por dPCR de DNA plasmídico	38
5.2.8 Determinación del LC para la plataforma de dPCR Open Array®	39
5.2.9 Cuantificación de los materiales de algodón GM por dPCR	40
5.2.10 Análisis estadístico de los resultados generados por dPCR	44
5.2.11 Cuantificación de mezclas de harina de algodón GM por qPCR empleando plásmido linearizado como calibrante	46
<b>6. Resultados y Discusión</b>	<b>48</b>
6.1 Cuantificación de MRC	48
6.1.1 Cuantificación del MRC <i>AOCS-0906-D</i>	49
6.1.2 Cuantificación del MRC <i>ERM-BF422d</i>	53
6.2 Obtención del límite de cuantificación (LC) para la plataforma Open Array® con mezclas DNA/DNA de algodón GM	56
6.3 Cuantificación de mezclas de algodón GM	60
6.4 Cuantificación de plásmidos	70
6.4.1 Determinación del número de copias del plásmido circular con el EE <i>MON88913-8</i> y la secuencia endógena <i>acp-1</i>	72
6.4.2 Determinación del número de copias del plásmido linerizado con el EE <i>MON88913-8</i> y la secuencia endógena <i>acp-1</i>	75
6.5 Cuantificación de las copias en las mezclas de harina de algodón GM por qPCR empleando un plásmido como calibrante	80
<b>7. Logros del trabajo</b>	<b>86</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>86</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>86</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>I</b>



## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>acp</b>	Proteína transportadora de acilos ( <i>Acyl carrier protein</i> )
<b>AMC</b>	Academia Mexicana de las Ciencias
<b>AOCS</b>	American Oil Chemists' Society
<b>BCR</b>	Bureau Communautaire de Référence
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>CDB</b>	Convenio sobre la Diversidad Biológica
<b>CENAM</b>	Centro Nacional de Metrología
<b>CIBIOGEM</b>	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados
<b>CNBA</b>	Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola
<b>CNRDOGM</b>	Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados
<b>Conc.</b>	Concentración
<b>COP-10</b>	Décimo encuentro de la Conferencia de las Partes
<b>cp</b>	Copias
<b>Ct</b>	Ciclo de umbral de detección ( <i>Cycle threshold</i> )
<b>DGSV</b>	Dirección General de Sanidad Vegetal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa digital ( <i>Digital polymerase chain reaction</i> )
<b>EE</b>	Evento específico
<b>EPSPS</b>	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa
<b>ERM</b>	European Reference Materials
<b>FAM</b>	6-carboxilfluoresceína
<b>GM</b>	Genéticamente modificado
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICAC</b>	Comité Consultivo Internacional del Algodón ( <i>International Cotton Advisory Committee</i> )
<b>IRMM</b>	Institute for Reference Materials and Measurements
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Normalización ( <i>International Organization for Standardization</i> )
<b>JRC</b>	Centro Común de Investigación ( <i>Joint Research Center</i> )
<b>LBOGM</b>	Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>Mb</b>	Megabases
<b>MGB</b>	Ligando de unión al surco menor ( <i>Minor groove binder</i> )
<b>MR</b>	Material de Referencia
<b>MRC</b>	Material de Referencia Certificado
<b>NFQ</b>	Apantallador no fluorescente ( <i>Nonfluorescent quencher</i> )
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nL</b>	Nanolitros

<b>NTC</b>	Control sin templado ( <i>No Template Control</i> )
<b>OGM</b>	Organismo Genéticamente Modificado
<b>PCSB</b>	Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología
<b>pg</b>	Picogramos
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real ( <i>Real-time polymerase chain reaction</i> )
<b>ROX</b>	6-carboxi-X-rodamina
<b>RSD<sub>r</sub></b>	Desviación estándar relativa a la repetibilidad
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SEA</b>	Subcomité Especializado en Agricultura
<b>SEMARNAT</b>	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<b>SENASICA</b>	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
<b>SIAP</b>	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
<b>TAMRA</b>	6-carboxitetrametilrhodamina
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i> o <i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>U<sub>combinada</sub></b>	Incertidumbre combinada
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>U<sub>expandida</sub></b>	Incertidumbre expandida
<b>VIC</b>	Fluoróforo de Applied Biosystem
<b>μL</b>	Microlitros

## 1. Resumen

El algodón resulta relevante desde el punto de vista industrial para nuestro país, por lo que ha sido necesario mejorar la producción del mismo. Una de las alternativas es el uso de variedades genéticamente modificadas, sin embargo, al formar parte de las especies de las cuales México es centro de origen y diversidad genética, se requiere tener un estricto control en el uso de las variedades que son liberadas al campo.

Con el objeto de mejorar el control de los principales cultivos genéticamente modificados en México, el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados ha implementado un buen número de técnicas que le han permitido simplificar y emitir resultados confiables para el monitoreo de dichos cultivos. Una de las técnicas más novedosas con las que cuenta actualmente, es la PCR digital, la cual es una técnica que permite la cuantificación de secuencias específicas de DNA sin la necesidad de un calibrante para obtener mediciones de manera directa.

El presente estudio permitió la evaluación de la PCR digital frente a una de las principales variedades de algodón genéticamente modificado, a fin de implementar ésta técnica en el análisis rutinario de muestras de algodón genéticamente modificado para la emisión de cuantificaciones confiables.

Se demostró que la técnica de PCR digital permite realizar cuantificaciones de manera directa, a diferencia de la PCR tiempo real, la cual requiere de un calibrante, obteniendo resultados comparables entre sí; además de presentar una incertidumbre asociada menor y mayor precisión.

Adicionalmente, se obtuvo el límite de cuantificación de la plataforma empleada, con lo cual se demostró que es posible realizar cuantificaciones por debajo del rango de número de copias especificado por el fabricante, lo que permitirá la cuantificación de bajas concentraciones de secuencias específicas, en las muestras analizadas.

## 2. Introducción

México es uno de los 12 países megadiversos y que es centro de origen y diversidad genética de varias especies. Muchas de ellas son consideradas de gran importancia para la humanidad, lo que se traduce en una responsabilidad trascendental para la conservación de las mismas.

Todos los países, y en particular países tan megadiversos como México, deben incluir la seguridad ambiental en los aspectos a evaluar cuando se analice la viabilidad de un cultivo genéticamente modificado (GM).

En nuestro país, durante más de 10 años de trabajo y con el aporte de los distintos actores involucrados (entre los que se encuentran legisladores y servidores públicos, así como representantes de la academia, de la sociedad civil organizada y de la cadena agroindustrial) se ha forjado uno de los marcos regulatorios más rigurosos a nivel mundial para poder incorporar estas tecnologías innovadoras a la producción agrícola nacional.

En respuesta a muchos de los compromisos adquiridos en la regulación de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), se han creado varias organizaciones y laboratorios, uno de ellos es el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), inaugurado en el año 2010, cuya misión es conducir las actividades operativas para la detección, identificación, y cuantificación, así como la secuenciación de OGM de especies vegetales, animales, acuícolas y microorganismos, relacionadas con la utilización confinada, la liberación experimental, la liberación en programa piloto y la liberación comercial (SENASICA, 2013).

Desde sus comienzos, este Centro ha destacado por la implementación y mejora constante de nuevos protocolos de análisis de OGM, así como la validación de los mismos con la finalidad de emitir resultados confiables.

El protocolo de análisis realizado a las muestras recibidas en el CNRDOGM consiste en la detección positiva o negativa de un OGM; en caso de obtener resultados positivos se da paso a la identificación de él o los eventos específicos presentes en el DNA de la muestra, seguido de la cuantificación de cada uno de los eventos que se hayan identificado. Una vez que se obtienen los resultados necesarios se emite

un reporte de resultados que indica la ausencia o presencia para cierto evento, así como el porcentaje del mismo.

Por lo anterior y con el propósito de obtener cuantificaciones más confiables y exactas de los eventos específicos detectados en las muestras recibidas, el CNRDOGM busca implementar y validar la técnica de PCR digital (dPCR) en diferentes matrices, para llevar a cabo la cuantificación sin la necesidad de emplear estándares, a diferencia de la PCR en tiempo real (qPCR), la cual hoy día es la opción más usada en el análisis de OGM, lo cual requiere de la construcción de curvas de patrón para lograr una cuantificación del OGM.

A diferencia de la dPCR, la qPCR tradicional ya ha sido bien caracterizada y es considerada como una metodología trascendental para una variedad de enfoques analíticos utilizando DNA y está apoyada por un buen número de protocolos validados en la Unión Europea (UE). La dPCR por otro lado es una tecnología relativamente nueva, y los protocolos que hasta ahora existen para su uso, aplicación y validación a nivel internacional todavía no han sido realizados o son incipientes. Sin embargo, en los últimos años se han producido una gran cantidad de estudios que emplean la dPCR para diversas aplicaciones que se benefician de una cuantificación absoluta.

El algodón es una de las especies cultivadas de mayor importancia en el mundo, principalmente debido a su uso en la industria textil, además de ser una de las principales especies en las que se han realizado modificaciones genéticas, resulta relevante evaluar cualquier tecnología nueva, en este caso la dPCR, en material de algodón GM.

México es centro de origen y diversidad del algodón, y por muchos años, fue uno de los principales productores de este cultivo, sin embargo, como consecuencia de los problemas que limitaron su producción, se dio paso a la aprobación de cultivos GM para solucionar las complicaciones relacionadas con su producción. Actualmente, es el principal cultivo GM en México (CIBIOGEM, 2013).

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Organismos Genéticamente Modificados (OGM)

En la actualidad, la manipulación genética de los organismos vivos ha dado oportunidad a que una característica genética de un organismo se transfiera a otro de una manera más selectiva a diferencia del mejoramiento genético tradicional, además ha permitido romper con las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual y ha hecho posible introducir en plantas genes provenientes no solo de otras especies vegetales evolutivamente distantes, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales, este tipo de modificaciones se identifica con el término de Biotecnología moderna.

La Biotecnología moderna es una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (entre otras, Biología Molecular, Ingeniería Bioquímica, Genómica, Bioinformática, Ingeniería de proteínas), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales) (Bolívar, 2003). La Biotecnología moderna surge de la capacidad de poder diseñar y construir OGM, los cuales se conciben como variedades de especies conocidas a los que se les ha conferido alguna capacidad funcional nueva, mediante el uso de las técnicas de ingeniería genética, a partir de la incorporación de factores hereditarios (genes) de especies distantes o cercanas.

De acuerdo a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), un OGM es: *“Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la Biotecnología moderna que se define en esta Ley, siempre que se utilicen técnicas que se establezcan en esta Ley o en las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma”* (LBOGM, 2005).

En el caso de la Biotecnología agrícola, se utilizan técnicas de Ingeniería Genética para que mediante la inserción de genes se logre mejorar un cultivo vegetal con el fin de desarrollar mejores sistemas biológicos. De esta manera, se agregan a las plantas nuevas propiedades agronómicas como la tolerancia a herbicidas, la

resistencia a plagas, la tolerancia a sequías, entre otras, para aumentar el rendimiento y reducir los costos de la producción.

Un inserto típico (construcción génica o casete) en un OGM está compuesto de al menos tres elementos (Figura 3.1): *a*) el *promotor*, que funciona como un interruptor de encendido y apagado para la lectura del gen insertado; *b*) el gen que ha sido insertado y codifica la proteína deseada, y *c*) el *terminador*, que funciona como señal de alto para la lectura del casete insertado. Una construcción génica o casete deberá estar integrada dentro del genoma del organismo para ser heredada de forma estable (Sun, 2008).



**Figura 3.1. Representación gráfica de un inserto típico, construcción génica o casete.**

### 3.2 Legislación internacional de OGM

La diversidad y utilidad de los OGM, así como su liberación al ambiente y comercialización, han despertado cuestionamientos y generado conciencia mundial sobre la importancia de analizar y evaluar exhaustivamente – considerando los diferentes factores y posibles riesgos – la liberación de los OGM al medio ambiente de manera responsable, promoviendo el establecimiento de un marco legal que permite el aprovechamiento sustentable de los mismos mediante un manejo seguro. Lo anterior ha permitido, a través de discusiones y procesos de revisión por expertos, la creación de acuerdos internacionales y legislaciones nacionales para el manejo responsable de los OGM.

Uno de los acuerdos internacionales es el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) firmado por México, el cual entró en vigor en 1993. Dentro de los objetivos de este Convenio se encuentra la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los

beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, dando lugar al compromiso de establecer un acuerdo sobre la seguridad de las aplicaciones biotecnológicas.

Por lo anterior, en el año 2000 se estableció el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología (PCSB) del CDB.

Su objeto es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la Biotecnología moderna que pudieran tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos. Es el primer instrumento internacional especializado en OGM, el cual entró en vigor en septiembre del año 2003. México lo firmó y ratificó, por lo que formalmente es parte del Protocolo (AgroBio, 2012).

Más tarde, en el año 2010, se aprobó el Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y reparto justo y equitativo de los beneficios que se deriven de su utilización, como parte de la décima Conferencia de las Partes (COP-10) del CDB.

El objetivo de este Protocolo Suplementario es contribuir a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, proporcionando normas y procedimientos internacionales en la esfera de la responsabilidad y compensación en relación con los OGM, particularmente en cuanto a satisfacer necesidades críticas de alimentación, agricultura y cuidados sanitarios (AgroBio, 2012).

Actualmente, el desarrollo y uso comercial de los OGM se encuentra sujeto a estrictas regulaciones legales en una gran cantidad de países. El marco legal vigente, aborda principalmente los riesgos de liberación de OGM en el medio ambiente y los referentes al consumo de materiales GM en la salud humana y animal.

El mejor ejemplo lo representa la UE, donde la aplicación de la tecnología de los OGM está estrictamente regulada y un marco legislativo amplio se ha desarrollado



desde principios de 1990. Desde el inicio, el objetivo clave de la legislación sobre los OGM en la UE ha sido proteger la salud y el medio ambiente, de tal manera que un OGM, un producto alimenticio o piensos producidos a partir de OGM pueden ser puestos en el mercado en la UE sólo después de que hayan sido autorizados luego de un detallado proceso de aprobación, con base en una evaluación científica exhaustiva de los riesgos para la salud y el medio ambiente.

Otro objetivo claro de la legislación de la UE es proporcionar información a los consumidores a través del etiquetado obligatorio de los OGM para alimentos y piensos producidos a partir de OGM.

### **3.3 Legislación y regulación nacional de OGM**

México ha sido pionero en la experimentación con OGM de uso agrícola. Las primeras solicitudes de liberaciones de OGM al ambiente con fines experimentales que se presentaron ante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) fueron en el año de 1988, pero apenas en 1991 se liberó el primero: el jitomate (*Lycopersicon esculentum*) resistente a insectos. Desde entonces y hasta 2006 se han sembrado OGM de 21 cultivos, todos en etapa experimental, con un total de 1 116 liberaciones caso por caso (Acevedo, 2009). En la Figura 3.2 se muestran las liberaciones llevadas a cabo en distintas zonas del país resaltando, particularmente, el caso del algodón en el norte del país y la soya en el sur.

Para 1989, se forma el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA), denominado posteriormente como Subcomité Especializado en Agricultura (SEA), cuya función era apoyar como grupo asesor a la DGSV en la evaluación de la información sobre solicitudes para la liberación de productos GM; así como en el establecimiento de regulaciones y políticas relacionadas con el tema.

La función primordial del Comité fue enfocarse en la formulación de una norma que permitiera la regulación de dichos productos, tomando en cuenta la información referente a la regulación de plantas genéticamente modificadas existente hasta ese momento en otros países, dando pie a la publicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-056-FITO-1995 en el año de 1996, en la cual se sentaron los requisitos fitosanitarios para la movilización nacional, la importación y el establecimiento de

pruebas de campo de organismos manipulados mediante la aplicación de ingeniería genética.

Con el objetivo de generar políticas públicas y coordinar acciones sobre el tema de los OGM entre las dependencias del gobierno federal con competencia en la materia, se forma en el año de 1999 la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM).

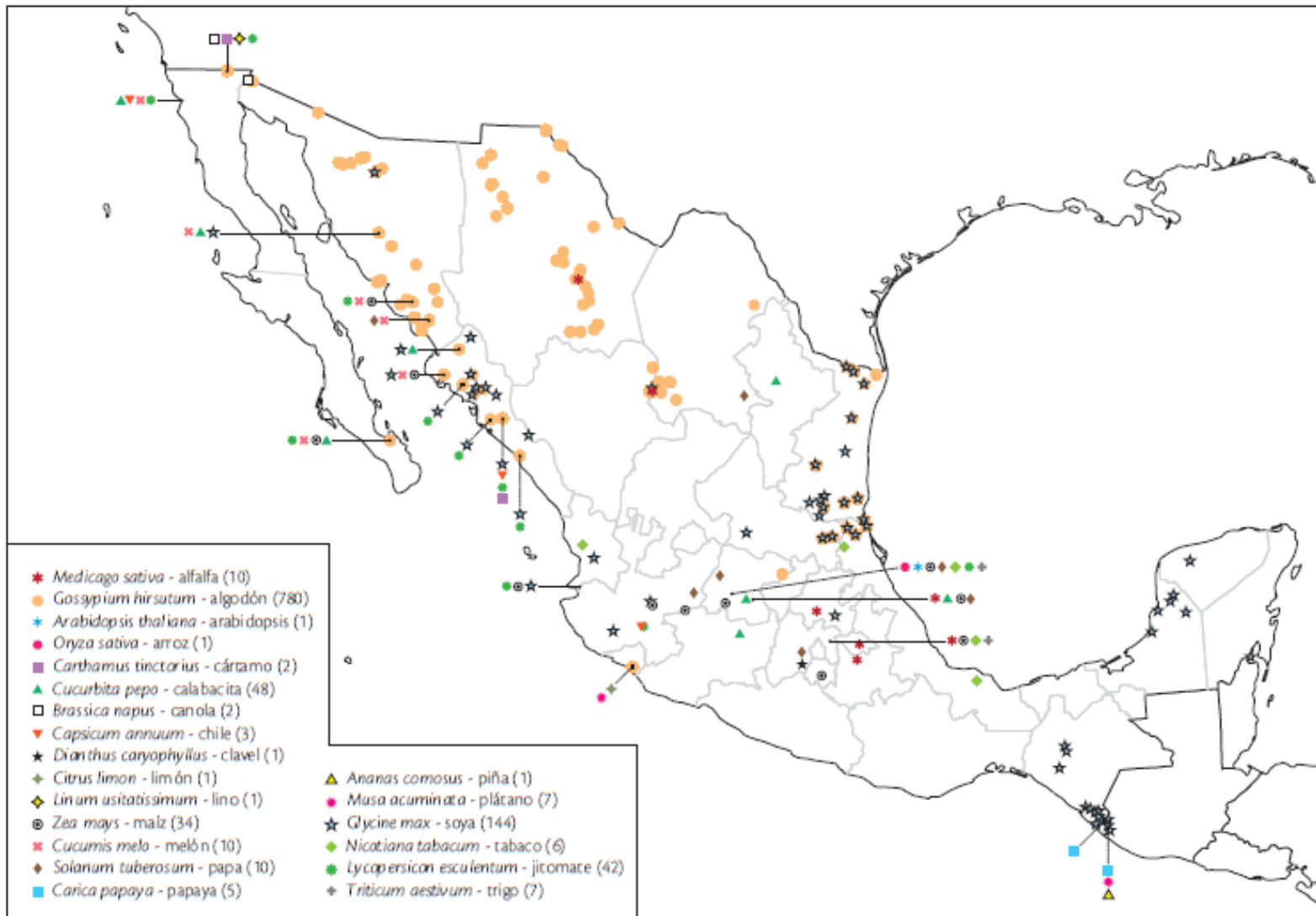


Figura 3.2. Liberaciones permitidas de OGM en México durante el período 1991-2006 (SENASICA, 2006; SIAP, 2007).

En el año 2005, el Congreso de la Unión con apoyo del Comité de Biotecnología de la Academia Mexicana de las Ciencias (AMC), en cumplimiento de los compromisos internacionales adquiridos, en particular a partir de la firma del Protocolo de Cartagena, y luego de un proceso de consulta, discusión y revisión en un lapso de tres años, emitió la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), la cual tiene como objetivo garantizar la protección de la salud humana, del medio ambiente, de la diversidad biológica y de la sanidad animal, vegetal y acuícola, respecto de los posibles efectos adversos derivados de las actividades con OGM.

Entre muchas otras disposiciones, esta Ley en su Artículo 32, plasma las fases de liberación a las que se encuentran sujetos los OGM de acuerdo con la regulación nacional (representadas en la Figura 3.3). Las fases que conforman esta reglamentación son:

- ❖ *Fase Experimental.* Es la primera evaluación a campo abierto de un cultivo agrícola GM en un sitio específico, cumpliendo varias medidas de seguridad que impidan la dispersión de polen, de semillas de material vegetativo, para evitar su interacción con especies sexualmente compatibles. En esta etapa se demuestra la eficacia biológica del atributo biotecnológico y su equivalencia agronómica en comparación con el material convencional (AgroBio, 2012).
- ❖ *Fase Piloto.* Es la segunda fase de evaluación de un Cultivo GM en una escala semi-comercial bajo algunas medidas de bioseguridad e implementando prácticas para el manejo de riesgos. En esta etapa el objetivo principal es evaluar el costo-beneficio de las modificaciones adquiridas en relación a un material convencional que sirve como comparador (AgroBio, 2012).
- ❖ *Fase Comercial.* Es la introducción internacional y permitida del cultivo agrícola GM, en diversos predios del área de liberación, con requerimientos específicos y apropiados para la producción comercial. En esta fase se llevan a cabo actividades de monitoreo, control y seguimiento de la utilización de

las tecnologías liberadas en las áreas permitidas en los términos de la ley (AgroBio, 2012).

Con la finalidad de reglamentar la LBOGM, se publica en el año 2008, el Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Éste Reglamento tiene por objetivo, entre otros, el de contribuir al cumplimiento de la LBOGM, estableciendo los procedimientos a seguir y requisitos a cumplir, en la obtención de permisos y autorizaciones.

En 2009, a éste Reglamento se anexa el Régimen de Protección Especial del Maíz, el cual establece las disposiciones jurídicas necesarias relativas a la bioseguridad para resolver las solicitudes de liberación de maíces GM, como son: prevención, monitoreo, inspección, vigilancia y medidas de control, además de prohibir la experimentación y la liberación al ambiente de maíces GM que contengan características que impidan o limiten su uso o consumo humano o animal, o bien, su uso en procesamiento de alimentos para consumo humano.

Como parte de la adopción del marco legal vigente, producto de la participación del país en los acuerdos internacionales como el Protocolo de Cartagena, las necesidades del gobierno en materia de bioseguridad, principalmente para los casos de los sectores ambiente, salud y agrícola, han sido contar con infraestructura y recursos humanos lo suficientemente capacitados como para atender todas las obligaciones legales adquiridas.

Es entonces entre los años 2002 y 2005, cuando comienzan los trabajos de capacitación técnica de recursos humanos en todo el país, tanto para la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) como para la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), autoridades responsables de hacer cumplir el marco legal, entre otras. A la par, fueron creados dos laboratorios de detección e identificación de OGM, y a partir de 2006, se planteó un segundo proyecto, cuya finalidad era establecer un laboratorio donde fueran detectados OGM en alimentos para el sector salud, incluyendo metodologías y protocolos para el análisis de las muestras.

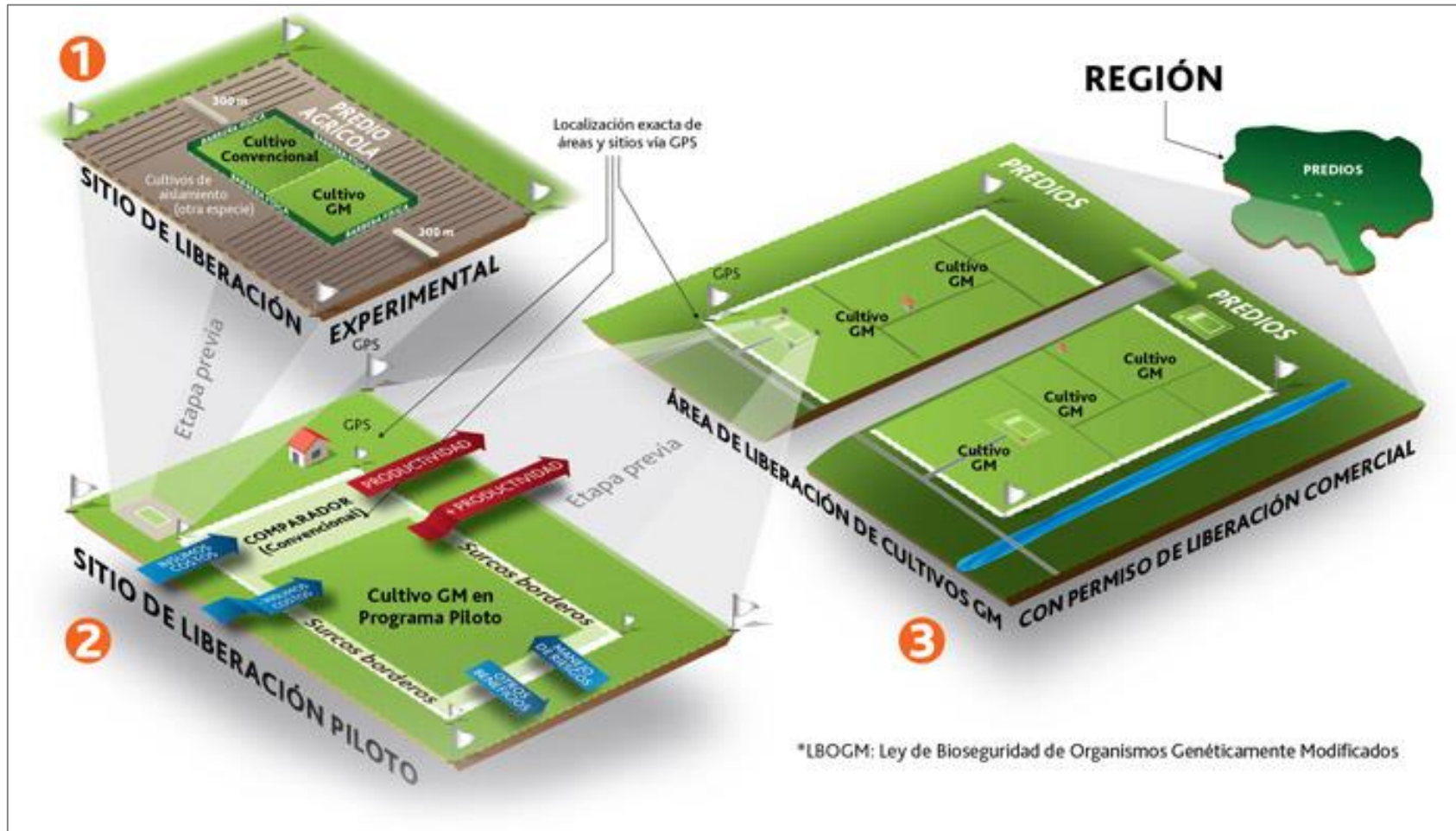


Figura 3.3. Fases de liberación de OGM en México según la LBOGM (AgroBio, 2012).

### 3.4 Requerimientos legales en la detección de OGM

Como consecuencia del incremento en las liberaciones permitidas en campo de OGM, y de las probables liberaciones accidentales, es necesario que las instancias responsables de su monitoreo y sus inspectores cuenten con metodologías que sean rápidas, de bajo costo y confiables que permitan emitir una primera respuesta en campo, para que posteriormente sea corroborada y certificada en sus laboratorios, con el fin de cumplir con lo estipulado en la LBOGM en cuanto al monitoreo de OGM.

Dicha ley establece entre sus objetivos y finalidades, la generación de procedimientos y criterios para el monitoreo de los posibles riesgos que puedan ocasionar las actividades con OGM en la salud humana, en el medio ambiente, en la diversidad biológica y/o en la sanidad animal, vegetal o acuícola.

De acuerdo a las competencias que establece la LBOGM a las distintas autoridades, el monitoreo es una obligación tanto de la SEMARNAT como de la SAGARPA, quienes deben realizar el monitoreo de los efectos que pudiera causar la liberación permitida o accidental de OGM, al medio ambiente, a la diversidad biológica y a la sanidad animal, vegetal y acuícola, respectivamente. Además, ambas instancias deben inspeccionar y vigilar para asegurar el cumplimiento de la Ley, a través del monitoreo de las actividades realizadas con OGM en el ambiente.

### 3.5 Algodón

El algodón comprende un amplio número de especies, forma parte de la familia *Malvaceae* y pertenece al género *Gossypium*. Citológicamente, las especies de este género se pueden dividir en: diploides ( $n=13$ ) y tetraploides ( $n=26$ ), cuya distribución geográfica se encuentra por todo el mundo. De las especies diploides únicamente *G. herbaceum* y *G. arboreum* han sido cultivadas comercialmente, y aún son importantes en áreas restringidas de la India, Asia y África. Entre las tetraploides, del Nuevo Mundo, solamente *G. hirsutum* y *G. barbadense* se cultivan ampliamente y son las responsables del 98 % de la producción mundial de fibra de algodón, con un 90 % y 8 %, respectivamente.

El cultivo del algodón es típico de las zonas cálidas. Se trata de un cultivo exigente en agua, pues la planta tiene mucha cantidad de hojas provistas de estomas por las

que se transpira cuando hay un exceso de calor, lo que hace necesario que los riegos deban aplicarse durante todo el desarrollo de la planta.

Es la principal planta cultivada para producción de fibra en el mundo. Como subproducto, una vez removida la fibra, queda la semilla que es procesada para la extracción de aceite comestible y pasta de uso en la fabricación de alimentos concentrados para animales.

De acuerdo con el Comité Consultivo Internacional del Algodón (ICAC) los principales países productores de algodón en el periodo 2007-2011 fueron: China, India, Estados Unidos, Pakistán, Brasil y Uzbekistán (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Principales países productores de algodón en el período 2010/2011 (ICAC, 2011).**

<b>País</b>	<b>Producción (Millones de toneladas)</b>	<b>Porcentaje</b>
China	6.93	31.24
India	5.19	23.39
EE. UU.	2.65	11.97
Pakistán	2.07	9.34
Brasil	1.19	5.39
Uzbekistán	0.85	3.83
México	0.10	
Otros	3.29	14.85
<b>Total Mundial</b>	<b>22.17</b>	

Para el ciclo 2010/11, la producción mundial de algodón se situó en 22.17 millones de toneladas, y actualmente su impacto económico se estima en aproximadamente \$ 500 mil millones de dólares al año en el mundo.

### **3.6 Algodón en México**

La producción de algodón en México es considerada de las principales de nuestro país, debido a que por muchos años fue un producto de exportación altamente generador de divisas. La especie cultivada en México es *Gossypium hirsutum*, considerada originaria de nuestro país y América Central, también conocida con el nombre común de Upland Cotton o Mexican Cotton.

Desde el año 2010 y hasta el 2012 destacan seis regiones algodonerías a nivel nacional: Chihuahua, Baja California, Coahuila, Sonora, Durango y Tamaulipas (Tabla 3.2).



**Tabla 3.2. Principales estados productores de algodón en México en el periodo 2010-2012 (SIAP, 2012).**

Estado	Producción (Toneladas)		
	2010	2011	2012
Chihuahua	254,114.02	383,983.75	355,036.53
Baja California	89,630.11	143,594.23	152,570.43
Coahuila	57,160.20	100,074.00	75,290.20
Sonora	21,247.80	75,114.67	58,897.01
Durango	9,499.94	27,949.94	15,896.99
Tamaulipas	8,837.35	15,179.24	6,104.72
<b>Producción total</b>	<b>440,489.42</b>	<b>746,245.83</b>	<b>668,661.90</b>

Nota aclaratoria. Los estados que no fueron constantes durante este periodo no están enlistados, sin embargo, son considerados dentro de la producción total del año en que participaron.

Para el año 2012, el valor de la producción algodонера fue de \$ 5,911,371.26 miles de pesos, mismo que se encontró por debajo del registrado en 2011 de \$ 7,089,886.92, y por encima del obtenido en 2010 de \$ 4,098,733.52, según reporta el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

En México, el algodón se caracteriza por dos ciclos productivos. El primero es el de Otoño-Invierno, cuyo aporte a la producción nacional es mínimo pues sólo participa el Estado de Tamaulipas, y el ciclo Primavera-Verano, el cual es el ciclo de mayor importancia ya que intervienen todos los estados productores.

A mediados de la década de los 90, la producción de algodón en México se vio afectada a consecuencia del ataque de plagas, lo que permitió la aprobación del gobierno mexicano para consentir el uso de algodón GM en el país, impulsando así la siembra de semillas GM de este cultivo. Como consecuencia, se generó un aumento marcado en la producción desde 1996 a 2010.

### 3.7 Algodón GM

El algodón GM pertenece a la primera generación de cultivos modificados genéticamente. Desde la introducción del primer algodón biotecnológico Bt (de *Bacillus thuringiensis*) en 1996, el algodón ha sido uno de los principales cultivos a ser genéticamente modificados, además de ser considerado como una de las tecnologías más rápidamente adoptadas en la historia.

Las variedades de algodón GM de mayor importancia comercial en la actualidad facilitan el manejo de los cultivos, permitiendo solucionar problemas agronómicos como el control de plagas (resistencia a insectos, algodón Bt) y la presencia de malezas (tolerancia a herbicidas). Recientemente, se ha desarrollado una combinación de ambos, lo que hace posible que con un solo producto se pueda atacar más de un problema a la vez.

### **3.8 Algodón GM con el evento específico (EE) *MON88913-8***

También conocido como Roundup Ready® Flex (GM Crop Database, 2013). Ésta variedad de algodón GM está catalogada como un producto GM de segunda generación que provee una alta tolerancia al glifosato, ingrediente activo del herbicida Roundup Ready®, haciendo posible el control de maleza en la producción de algodón, a la vez que se inhiben los efectos negativos que el glifosato produce en la planta.

Fue desarrollado a partir de la inserción de dos casetes de expresión del gen CP4 EPSPS conectados en serie mediante el método de transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, para conferir a las plantas de algodón la capacidad de producir la proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa), derivada de la cepa CP4 de *Agrobacterium* sp., una bacteria característica de suelo que de manera natural tolera el herbicida Roundup Ready®. La enzima CP4 EPSPS posee una menor afinidad de unión al glifosato y funciona normalmente en presencia del herbicida, confiriendo al cultivo tolerancia al mismo.

El glifosato es una sal isopropilamina de N-(fosfometil) glicina, clasificado como un herbicida no selectivo, sistémico, de acción foliar, es decir, que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado. El mecanismo de acción del glifosato radica en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima CP4 EPSPS, con lo que se reduce la producción de proteínas y el desarrollo de la misma. El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en el penúltimo paso en la vía del shikimato, reduce también la biosíntesis de otros compuestos tales como tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K; lo que finalmente produce la muerte de la planta (Salazar, *et al.*, 2011).

La conformación de los dos casetes que forman parte de la construcción del EE *MON88913-8* consta de los insertos mostrados en la Figura 3.4, los cuales provienen de las especies *Agrobacterium tumefaciens* y *Arabidopsis thaliana*, para el primero y segundo casete, respectivamente.

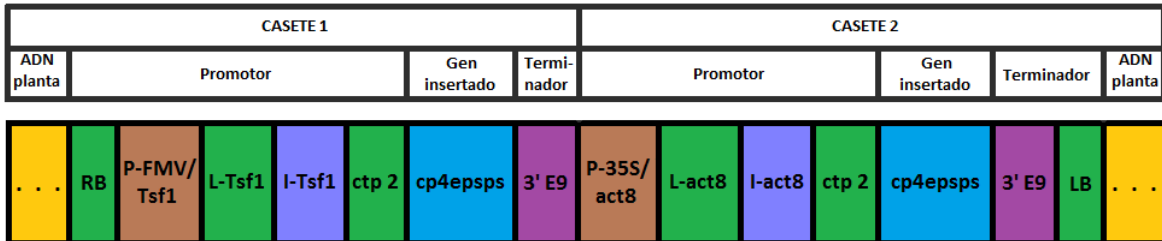


Figura 3.4. Construcción génica del evento específico *MON88913-8* (Biosafety Scanner, 2013).

### 3.9 Detección y análisis de OGM

Tomando en cuenta las consideraciones para regular los OGM, se ha generado una demanda de métodos de análisis capaces de detectar, identificar y cuantificar tanto las secuencias únicas de DNA introducidas como de las proteínas expresadas en plantas transgénicas. Cada uno de los métodos que forma parte de este análisis consta de lo siguiente:

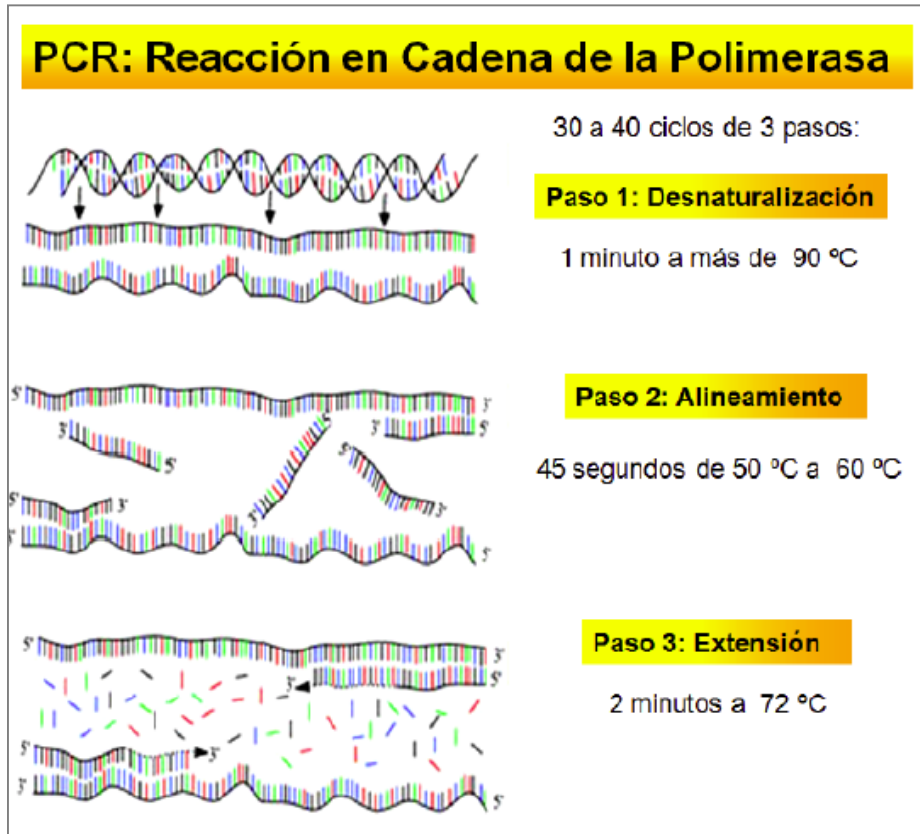
- ❖ *Detección*: El objetivo es determinar si un producto contiene OGM o no. Para este propósito, se puede utilizar un método de detección. El resultado es una declaración positiva / negativa. Los métodos analíticos de detección deben ser lo suficientemente sensibles y fiables para obtener resultados exactos y precisos.
- ❖ *Identificación*: El propósito de la identificación es revelar cuántos diferentes OGM están presentes y si están autorizados o no. Información específica (es decir detalles sobre la composición molecular de los OGM) tiene que estar disponible para la identificación de los OGM.
- ❖ *Cuantificación*: Si se ha demostrado que existe (uno o más) OGM autorizados, entonces se vuelve necesario evaluar el cumplimiento de la normativa establecida de acuerdo con el umbral de nivel de regulación establecido para la cantidad de cada uno de los OGM presentes.

Todas las técnicas de detección de OGM consisten en explotar la diferencia entre la variedad no modificada y la planta transgénica, y se fundamentan en el principio de que las plantas transgénicas se caracterizan por la inserción de un nuevo gen (o de un nuevo conjunto de genes) en sus genomas, y que a su vez el nuevo gen o genes se traducen y la nueva proteína se expresa proporcionando a la planta una característica nueva. Lo anterior se logra, detectando el nuevo DNA transgénico que se ha insertado, o la nueva proteína expresada, o (si la proteína actúa de enzima) utilizando el análisis químico para detectar el producto de la reacción enzimática.

En el análisis de OGM, la PCR permite la detección de las secuencias de control que flanquean el gen introducido, usualmente el promotor 35S y el terminador *nos*, a través de una serie de ciclos térmicos diferenciales repetitivos y una enzima DNA polimerasa que ayuda a la replicación y a la amplificación exponencial de una secuencia específica.

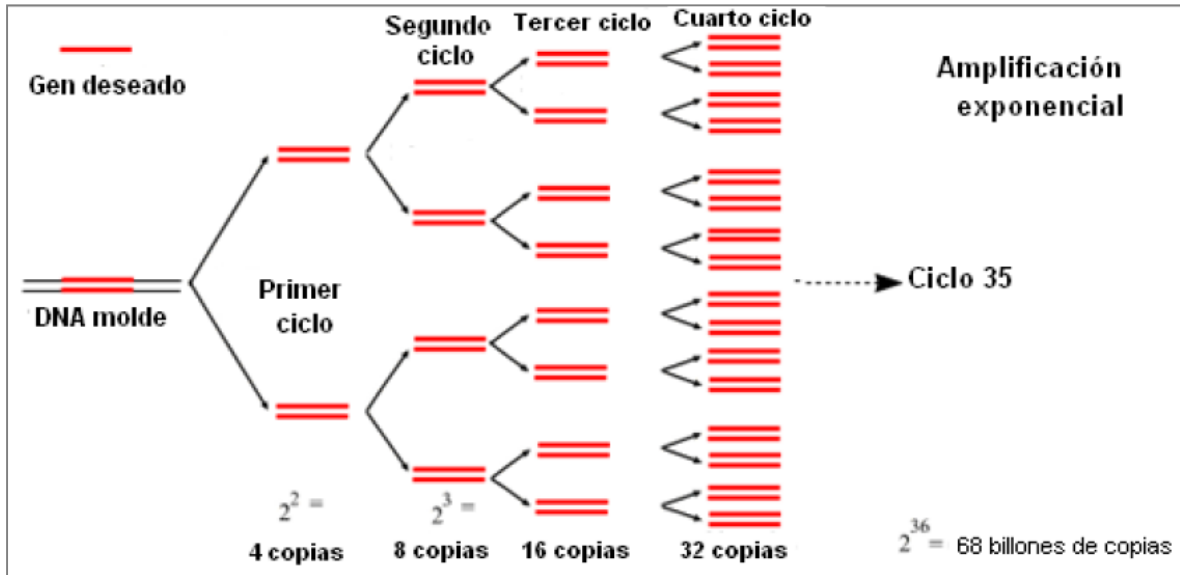
En esencia, la PCR se basa en el mecanismo de la replicación *in vivo* del DNA. Tal como se muestra en la Figura 3.5, el DNA bicatenario se desenrolla y pasa a DNA monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. Consta de ciclos repetitivos de:

- ❖ *Desnaturalización de DNA*, durante esta etapa la hebra doble se funde a temperatura elevada ( $T = 93-96\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a fin de convertir el DNA bicatenario en DNA monocatenario, como consecuencia de la ruptura de puentes de hidrógeno.
- ❖ *Unión (alineamiento) de dos oligonucleótidos*, se lleva a cabo a una temperatura inferior ( $T = 55-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), en este paso las dos hebras complementarias de DNA monocatenario tienden a formar de nuevo una molécula de DNA bicatenario, con la intervención de los cebadores.
- ❖ *Extensión de la cadena de DNA*, en esta fase los cebadores se extienden a lo largo de la secuencia blanco y en conjunto con la DNA polimerasa termoestable (frecuentemente se emplea la DNA *Taq* polimerasa) en presencia de dNTPs (desoxinucleósidos trifosfatados), se produce la duplicación de la secuencia blanco. La temperatura de trabajo ideal para la DNA *Taq* polimerasa es de  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.5. Representación gráfica de las fases de amplificación en la PCR** (Modificado de Vierstraete, 1999).

Tras cada ciclo, las hebras de DNA recién sintetizadas pueden servir de DNA molde para el ciclo siguiente. Como se esquematiza en la Figura 3.6, el producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de DNA bicatenario cuyos extremos vienen definidos por los extremos 5' de los oligonucleótidos cebadores y cuya longitud viene dada por la distancia entre los cebadores.



**Figura 3.6. Esquema de la representación exponencial del DNA mediante la PCR**  
(Modificado de Vierstraete, 1999).

Así, se lleva a cabo una amplificación de forma exponencial, que suele expresarse con la siguiente ecuación:

$$(2^n - 2n) x$$

donde  $n$  es el número de ciclos,  $2n$  es el número de moléculas del primer producto obtenidas tras el primer ciclo y de los segundos productos obtenidos tras el segundo ciclo con longitud indefinida, y  $x$  es el número de ejemplares del DNA molde original. Con el tiempo, fue desarrollada una variante de la PCR tradicional, la PCR en tiempo real (qPCR), que utiliza la medición óptica de amplicones generados para evaluar las amplificaciones de PCR, volviéndola la alternativa cuantitativa más empleada para el análisis de OGM. En esta técnica, la concentración del templado inicial se obtiene a partir del número de ciclos de amplificación (valor Ct) requerida por la señal óptica para superar un umbral elegido para la medición. En teoría, la PCR amplifica ácidos nucleicos exponencialmente, y el número de ciclos de amplificación y la cantidad de amplicones de la PCR debe permitir el cálculo de la cantidad de partida del templado inicial. La concentración inicial se calcula mediante un calibrador con concentración conocida y con el cual la señal de la muestra desconocida es comparada (Corbisier, *et al.*, 2010).

La qPCR utiliza un par de cebadores específicos para amplificar el DNA blanco de interés, además de sondas fluorescentes específicas para el DNA diana que se unen a los productos de amplificación y posteriormente son degradadas por la enzima Taq polimerasa, dando como resultado una señal fluorescente. De este modo hay una acumulación neta de una respuesta fluorescente para la sonda marcada durante un número determinado de reacciones cíclicas, y esta acumulación de señal fluorescente con el tiempo es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado y por lo tanto a la cantidad original de analito blanco (Burns, *et al.*, 2010).

En años recientes, se ha perfeccionado la qPCR, dando paso a una técnica capaz de detectar cantidades trazas de DNA, y que además, no es dependiente de una curva de calibración y por lo tanto, evita diferencias potenciales de la matriz entre los estándares y la muestra bajo investigación. Esta técnica es la PCR digital (dPCR).

### **3.10 PCR digital (dPCR)**

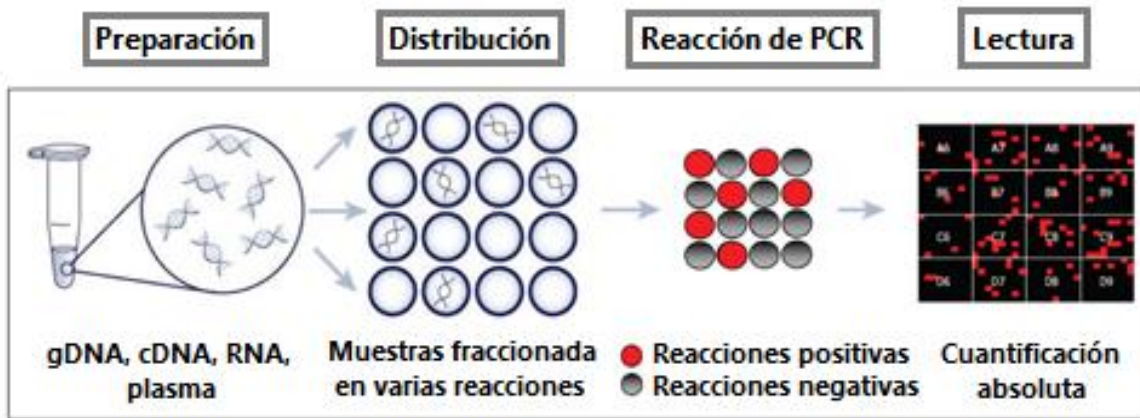
La dPCR es un método utilizado para cuantificar la cantidad de DNA en una muestra mediante el recuento de amplificaciones a partir de moléculas individuales. Las matrices digitales, como se ejemplifica en la Figura 3.7, en general llevan a cabo la partición de la muestra en cientos de pequeñas cámaras de PCR en tiempo real, y la concentración de cualquier secuencia en una muestra de DNA puede ser calculada usando el número de cámaras positivas que contienen al menos una copia de dicha secuencia (Burns, *et al.*, 2010).

La dPCR se basa en el concepto de diluciones limitantes, que es una técnica utilizada para enriquecer los objetivos minoritarios por un proceso de división. En este contexto, la muestra original, que consiste en una mezcla heterogénea de la secuencia de templado de DNA blanco y no blanco, está efectivamente dividida en varias particiones mediante dilución limitante. En teoría, cada una de las diluciones se compone de una copia de la plantilla de DNA diana o menos. La PCR se lleva a cabo a través de todas las fracciones de las diluciones, y la concentración de la secuencia de DNA blanco en la muestra original se calcula basándose en el número de PCR positivas en comparación con el número de PCR negativas en todas las

fracciones (Burns, *et al.*, 2010). La concentración de la secuencia blanco de DNA en la solución es estimada utilizando la aproximación binomial de Poisson, basada en el número de particiones que contienen productos amplificados y el número total de particiones analizadas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

donde,  $M$  es el número de moléculas por panel,  $H$  es el número de particiones que contienen el producto amplificado, y  $C$  es el número total de particiones analizadas.



**Figura 3.7. Fundamento de la dPCR para la cuantificación de secuencias de DNA** (Life Technologies®, 2013).

Por tanto, la dPCR transforma las señales análogas exponenciales obtenidas de la qPCR convencional en señales lineales digitales, permitiendo un análisis estadístico del producto (Pohl, *et al.*, 2004).

### 3.11 Ventajas de la cuantificación por dPCR sobre qPCR

Aun cuando la dPCR, a diferencia de la qPCR, no ha sido bien caracterizada para ser implementada globalmente en el análisis de OGM, dado que es una técnica relativamente nueva, cada vez son más las ventajas que se han llegado a conocer de esta técnica. En la Tabla 3.3, se resumen algunas ventajas y características de ambas técnicas.



**Tabla 3.3. Comparativo de las características de las técnicas de qPCR y de dPCR.**

	<b>dPCR</b>	<b>qPCR</b>
<b>Descripción</b>	Mide la fracción de réplicas negativas para determinar las copias absolutas.	Mide la amplificación de PCR tal como ésta ocurre.
<b>Cuantificación</b>	La fracción de reacciones negativas se ajusta con base en un algoritmo estadístico, conocido como aproximación binomial de Poisson.	Los datos recolectados de los productos de PCR durante la fase de crecimiento exponencial (log), son directamente proporcionales a la cantidad de DNA molde.
<b>Ventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor sensibilidad.</li> <li>• No depende de estándares o referencias, (la precisión deseada se puede lograr con el aumento en el número total de réplicas de PCR).</li> <li>• Alta tolerancia a inhibidores.</li> <li>• Permite el análisis de mezclas complejas.</li> <li>• Proporciona una respuesta lineal del número de copias presentes permitiendo detectar pequeñas variaciones de cambio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuenta con un mayor rango dinámico de detección (copias/mL).</li> <li>• Registra los datos del experimento en la fase de crecimiento exponencial de la PCR.</li> <li>• Un aumento en la señal de fluorescencia del reportero es directamente proporcional al número de amplicones generados.</li> <li>• La división de los componentes de la sonda ofrece un registro permanente de la amplificación de un amplicón.</li> <li>• Existe normatividad.</li> </ul>

*Fuente: Life Technologies®, 2013.*

Como se indica en la Tabla 3.2, la dPCR tiene el potencial de permitir una cuantificación absoluta en lugar de una cuantificación relativa; además, tiene el potencial de superar la falta de disponibilidad de estándares adecuados para ser utilizados en una curva de calibración y reducir los efectos asociados a la matriz, a menudo unidos a los métodos en qPCR.

### **3.12 Tipos de matrices digitales**

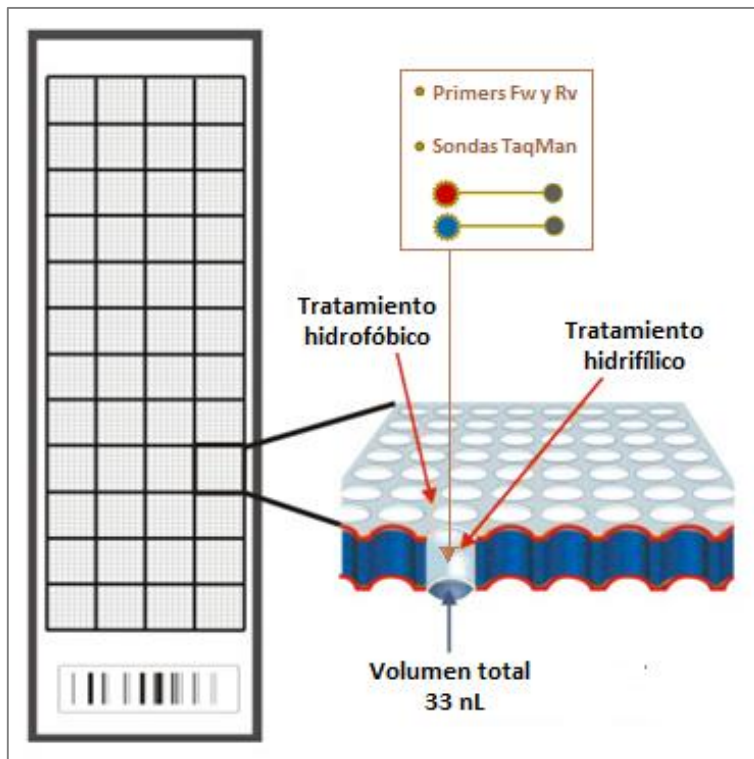
Aunque en esencia todas las plataformas existentes para la técnica de dPCR se basan en la partición de la muestra, no todas emplean el mismo principio para lograr desarrollar esta propiedad, y cada una de ellas muestra características que la definen.

Actualmente, las compañías que cuentan con plataformas en el mercado para dPCR son:

- ❖ Bio-Rad<sup>®</sup>, con el sistema QX100 Droplet Digital PCR (ddPCR<sup>®</sup>), el cual combina la tecnología de emulsión en gota agua-aceite con la partición microfluídica de 20  $\mu$ L de una muestra llevando a cabo una PCR en tiempo real en miles de nanogotas de forma individual. La ventaja de esta plataforma radica en que se requieren volúmenes de muestra más pequeños en comparación con otros sistemas digitales de PCR, lo que permite reducir los costos experimentales y no desperdiciar muestra, a la vez que ofrece una alta sensibilidad y cuantificaciones precisas.
- ❖ Fluidigm<sup>®</sup> por su parte cuenta con el sistema BioMark<sup>®</sup> HD System, el cual integra el termociclado y la detección de la fluorescencia en los Arreglos Digitales, basados en la tecnología de Circuitos Integrados de Fluidos (IFC) cargados con un controlador. Los arreglos digitales aceptan diluciones seriales de muestras mezcladas con reactivos de la PCR que son distribuidas por válvulas en finas particiones sobre las redes de chips de las cámaras de reacción. Hasta el momento, es el sistema más utilizado en el análisis de OGM.
- ❖ Life Technologies<sup>®</sup> inició con la plataforma de PCR en tiempo real masiva Open Array<sup>®</sup> (Figura 3.8), y recientemente en 2013 lanzó al mercado su plataforma QuanStudio<sup>®</sup> 12K Flex System, ambas requieren del uso de placas de acero que poseen la tecnología patentada Open Array<sup>®</sup> con un total de 3072 perforaciones (nanopozos) donde se llevan a cabo las reacciones de PCR. Como se puede observar en la Figura 3.9, los nanopozos de estas placas cuentan con un tratamiento que fomenta la retención de líquidos en el interior de cada perforación, evitando así la evaporación del volumen que contienen.



**Figura 3.8. Plataforma Open Array® de Life Technologies®,** compuesta (de izquierda a derecha) por: Equipo de cómputo, NT Cycler, Sistema Accufill, Case Sealing Station (Life Technologies®, 2013).



**Figura 3.9. Tecnología de las placas Open Array®** (Modificada de BioMed Central, 2013).

Cada placa Open Array® presenta la distribución esquematizada en la Figura 3.10, en la cual, las 3072 perforaciones se encuentran acomodadas en 48 subarreglos con 64 nanopozos en cada uno.

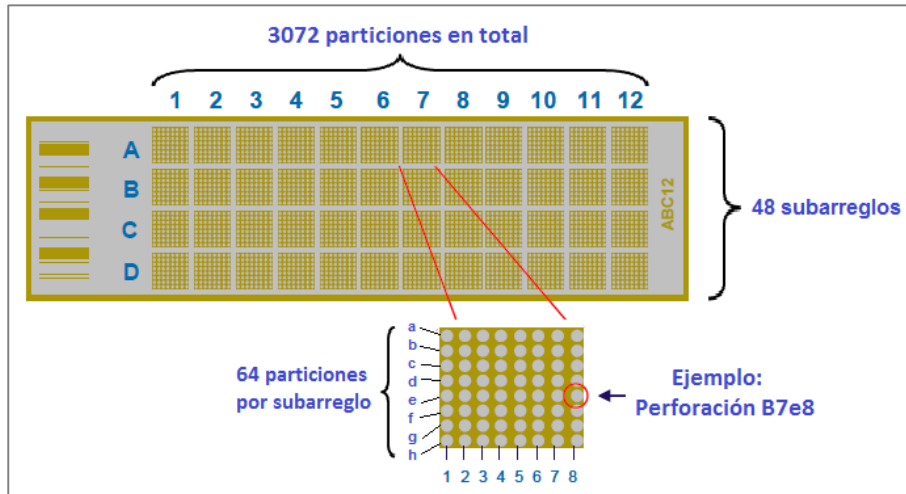


Figura 3.10. Arquitectura de una placa Open Array® (Life Technologies®, 2013).

La plataforma Open Array® consta de los siguientes instrumentos:

- **Sistema Accufill:** Cuyo diseño se muestra en la Figura 3.11, es el instrumento que realiza el cargado automatizado de la mezcla de reacción contenida en placas de 384 pozos a las placas Open Array®.

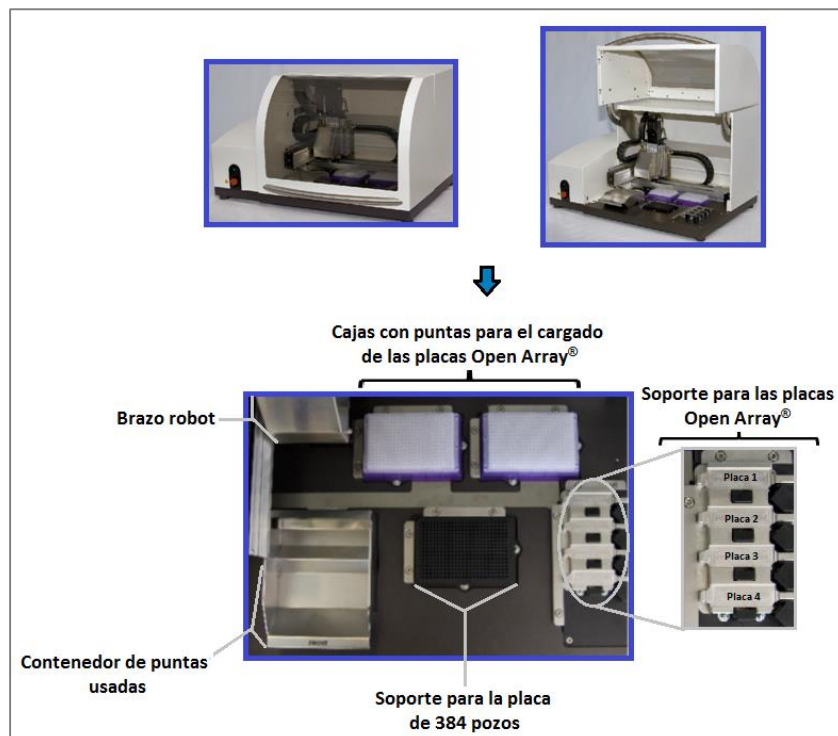


Figura 3.11. Sistema Accufill®, apariencia (parte superior) y conformación (parte inferior) (Life Technologies®, 2013).

- **Case Sealing Station (Figura 3.12):** Estación que permite el sellado de las placas Open Array<sup>®</sup> empleando luz UV dentro de casetes especiales, que hacen posible el termociclado de las placas sin riesgo de evaporación de la muestra y los reactivos.

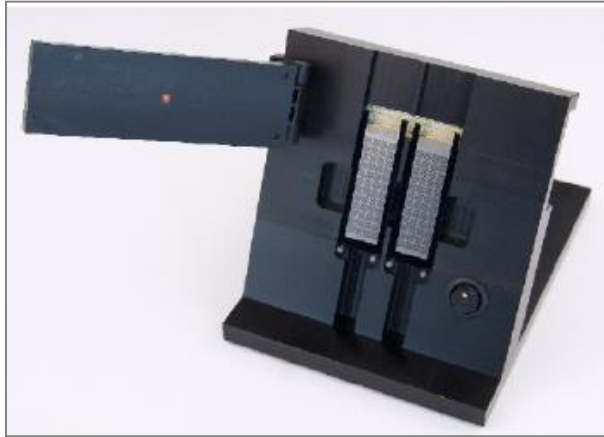


Figura 3.12. Case Sealing Station (Life Technologies<sup>®</sup>, 2013).

- **NT Cycler (Figura 3.13):** En él se lleva el termociclado y la lectura de las placas. Este instrumento cuenta con tres filtros para la captura de los fluoróforos FAM, VIC y ROX.

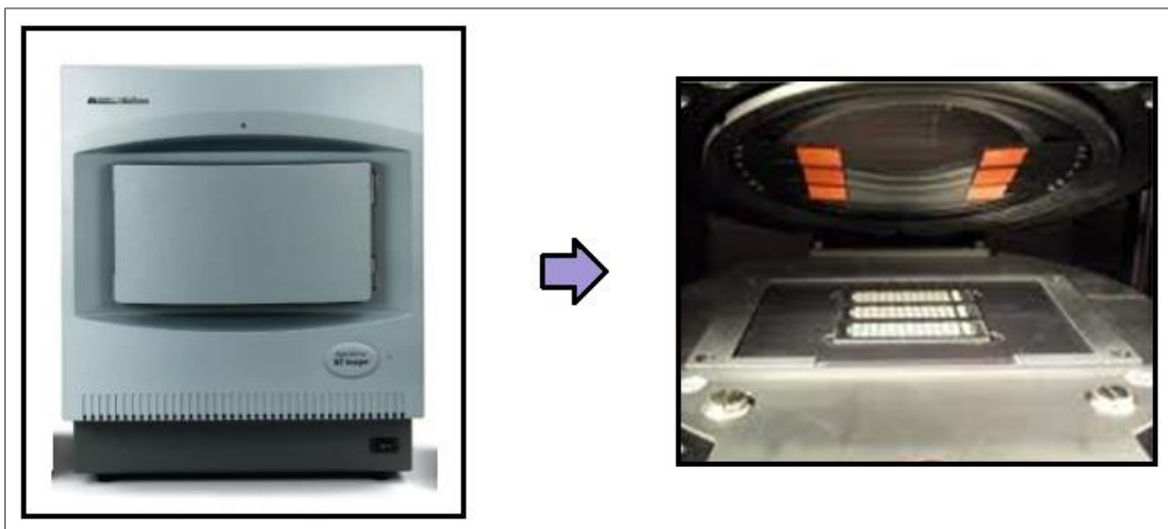
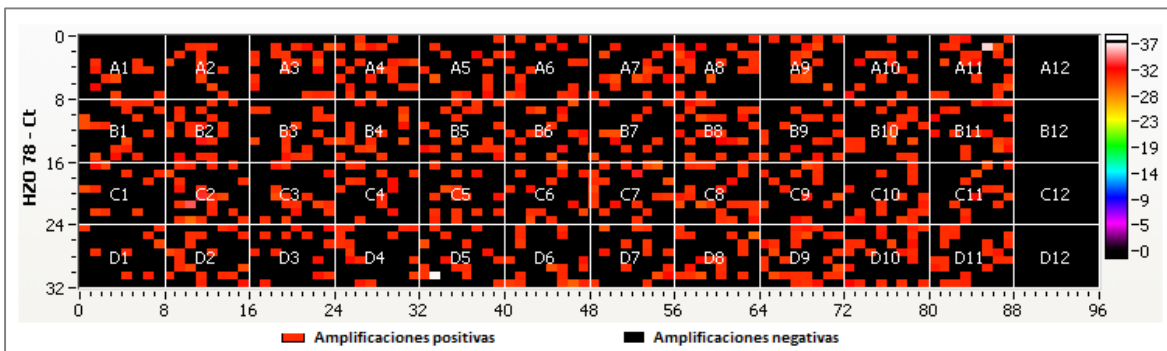


Figura 3.13. NT Cycler (Life Technologies<sup>®</sup>, 2013).

Para el análisis del experimento realizado se requiere el siguiente software:

- **Open Array® Real Time qPCR Software:** Permite el termociclado y la captura de fluorescencia, expresada en gráficos de curvas de amplificación.
- **Open Array® Digital PCR Software:** Permite el análisis de las placas de PCR digital mediante la generación de mapas de amplificación de cada placa, ejemplificado en la Figura 3.14, y que muestran las amplificaciones positivas (particiones coloreadas de rojo o naranja) y negativas (particiones negras).



**Figura 3.14.** Mapa de amplificación de una placa Open Array® (Life Technologies®, 2013).

Para obtener los resultados de un ensayo, el Open Array® Real Time qPCR Software hace uso de un algoritmo que permite calcular un ciclo umbral (Ct) para cada una de las reacciones que tuvieron lugar en cada una de las placas Open Array®. Posteriormente, se da una segunda etapa de análisis en la que el Open Array® Digital PCR Software emplea el Ct calculado para considerar a cada reacción ya sea positiva como 1 si el Ct está dentro del rango aceptable, o como negativa o 0 si está fuera del rango.

Finalmente, el Open Array® Digital PCR Software genera valores en número de copias con intervalos de confianza asociados (mayor y menor) para la muestra contenida en cada subarreglo de la placa. Para ello, el software efectúa el cálculo del valor en número de copias en cada subarreglo contando el número de nanopozos positivos. Con estos datos, Open Array® Digital PCR Software calcula los valores en número de copias para las muestras presentes en la placa Open Array® y genera los intervalos de confianza asociados al resultado con un 95 % de confianza con base en el algoritmo.

Para cada muestra, el software comienza el cálculo de un valor de número de copias para cada subarreglo contando el número de pozos positivos. Utilizando dichos datos, el software Open Array® Digital PCR calcula entonces los valores de número de copias para todas las muestras presentes en la placa y genera intervalos con un 95 % de confianza de acuerdo en el algoritmo de la aproximación binomial de Poisson.

### **3.13 Materiales de Referencia (MR)**

La verificación de la trazabilidad de los resultados de un método analítico se lleva a cabo mediante la comparación con una referencia. Desde un punto de vista metrológico, la mejor referencia posible la constituyen los métodos definitivos o absolutos. Sin embargo, en la práctica la mejor referencia posible la constituyen los Materiales de Referencia Certificados (MRC).

Un MR según la guía ISO 30 [ISO, 1992], es un “material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente bien establecidas para calibrar un aparato o instrumento, validar un método analítico, o asignar valores a un material o sistema”. Los MR en el análisis de OGM sirven con controles positivos y negativos así como calibrantes para análisis cuantitativos (Holst-Jensen, 2012).

Por otro lado, un MRC [ISO, 1992], es un “material de referencia que tiene certificados uno o varios de sus valores de una o más de sus propiedades por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente”. La principal diferencia entre un MR y un MRC es el certificado asociado al MRC emitido por un organismo competente.

Para que un cierto material pueda ser considerado como un MRC, tiene que cumplir una serie de propiedades. Las más importantes son:

- Trazabilidad
- Homogeneidad
- Estabilidad
- Similitud con las muestras reales
- Incertidumbre

Dentro de los organismos con prestigio y reconocimiento que comercializan MRC para OGM destacan el IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)

de la JRC (Joint Research Center) que comercializa los MRC del BCR (Bureau Communautaire de Référence) en la Unión Europea, la AOCS (American Oil Chemists' Society), y recientemente en México, el CENAM (Centro Nacional de Metrología).



## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Implementar y verificar la metodología para la cuantificación de algodón GM mediante la técnica de dPCR, para obtener cuantificaciones confiables, exactas y comparables con la técnica de qPCR.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Establecer la técnica de dPCR en la plataforma Open Array® para cuantificar muestras de algodón GM.
2. Verificar la técnica de cuantificación de dPCR a través de la cuantificación de los MRC a fin de encontrar resultados comparables con qPCR.
3. Determinar el Límite de Cuantificación (LC) para la plataforma Open Array®, con base en mezclas de algodón GM.
4. Cuantificar mezclas de algodón GM con el EE *MON88913-8*, para comparar los resultados con los reportados en un estudio previo realizado con la técnica de qPCR.
5. Realizar la cuantificación de plásmidos en número de copias, a través de dPCR, a fin de evaluarlos como calibrantes en cuantificaciones por qPCR.

## 5. Metodología

### 5.1 Estrategia experimental

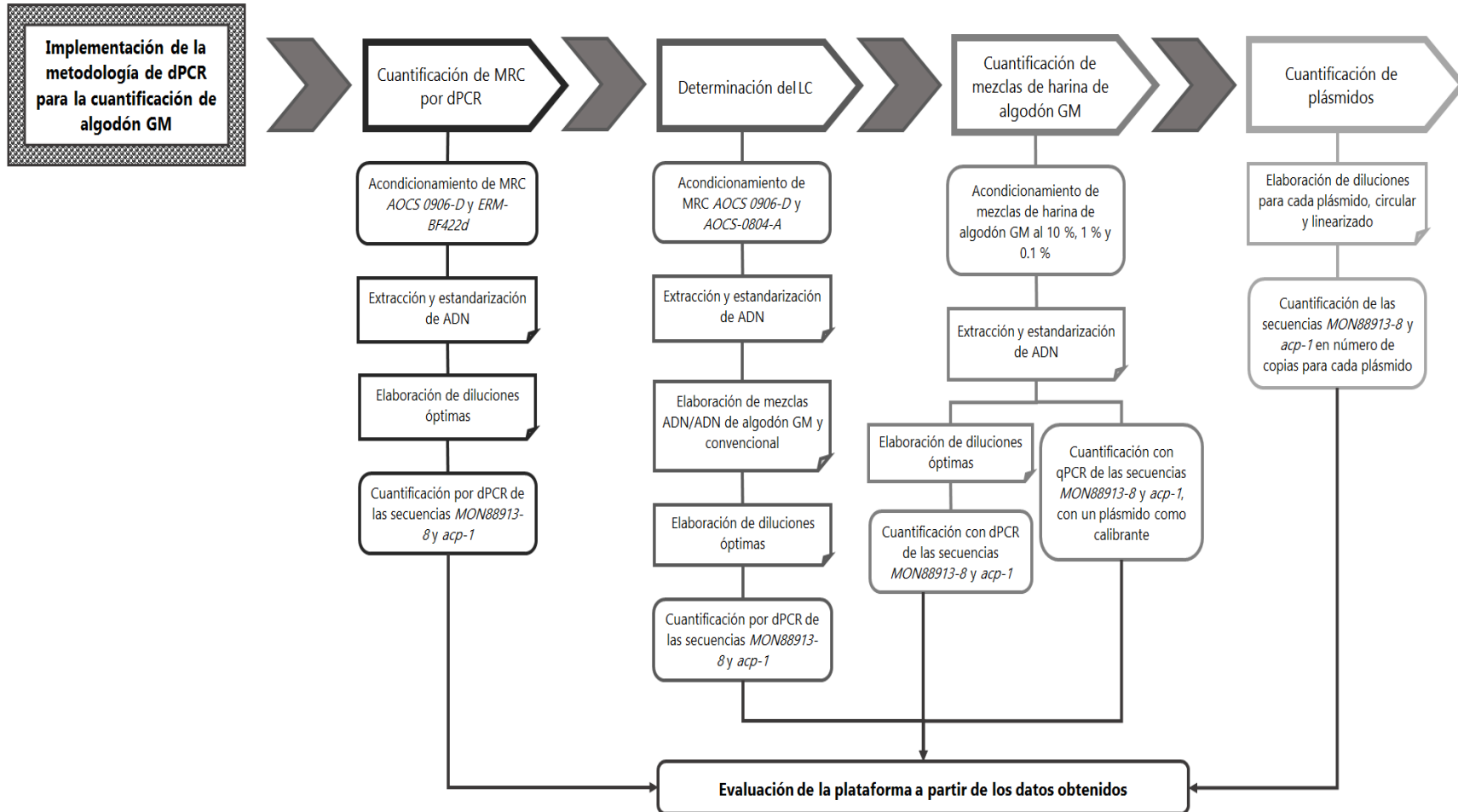


Figura 5.1 Diagrama de bloques de la estrategia experimental realizada.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 MRC

#### 5.2.1.1 MRC AOCS-0906-D

El MRC AOCS-0906-D es una harina de algodón genéticamente modificado, de la especie *Gossypium hirsutum*, con el EE *MON88913-8* certificado por la AOCS, en cuyo certificado se reporta una concentración del EE de 99.4 % copia/copia con ausencia de datos asociados a la incertidumbre de la medición (Anexo I). Dicho material se adquirió en una presentación de 10 g de harina de algodón, y es almacenado a -20 °C.

#### 5.2.1.2 MRC ERM-BF422d

El MRC ERM-BF422d es una harina de algodón genéticamente modificado, igualmente de la especie *Gossypium hirsutum*, con los EE *DAS24236-5* y *DAS21023-5*, el cual se encuentra certificado por la JRC cuyo certificado especifica una concentración de 10 % copia/copia con una incertidumbre de 1.6 % copia/copia asociada a la medición (Anexo II). Éste material se adquirió en una presentación de 2g y es almacenado a -20 °C.

#### 5.2.1.3 MRC AOCS-0804-A

El MRC AOCS-0804-A es una harina de algodón no modificado genéticamente, de la especie *Gossypium hirsutum*, el cual está aprobado por la AOCS como control negativo para los EE *MON1445*, *MON531*, *MON15985-7*. Éste material fue adquirido en una presentación de 10 g y es almacenado a -20 °C.

### 5.2.2 Preparación de mezclas de harina de algodón GM

La obtención de las mezclas de harina de algodón se llevó a cabo previamente para un estudio realizado en el CNRDOGM (López, 2012). Estas se generaron a partir de harinas de materiales de referencia de algodón GM y no GM. El material de referencia GM presenta el EE *MON88913-8*, mientras que el material de referencia no GM o convencional no posee ninguna modificación genética.

El proceso de preparación de las mezclas consistió en un paso de molienda, seguido de un proceso de mezclado entre la harina de algodón GM y algodón no GM de acuerdo al porcentaje deseado (10%, 1% y 0.1%), en donde el porcentaje se refiere al contenido del EE con respecto al gen endógeno. A continuación se

enviaron al CENAM para una fase de homogenización y envasado en contenedores color ámbar de aproximadamente 2 g, obteniendo 20 frascos para cada porcentaje. Posteriormente fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.

### **5.2.3 Extracción de DNA genómico de MRC y mezclas de harina de algodón GM**

Para la extracción de DNA de los MRC y las mezclas de harina de algodón GM se empleó el sistema de extracción comercial Genetic-ID.

Para el caso de las mezclas se eligieron tres muestras de forma aleatoria de cada uno de los porcentajes de las mezclas elaboradas al 10, 1 y 0.1 %, mientras que para los MRC se tomó la cantidad a pesar directamente del frasco que los contenía. Se pesaron 200 mg de harina de cada material y se colocaron en un microtubo de 2 mL (previamente etiquetado), inmediatamente se adicionaron 1.6 mL de Genomic Lyse Buffer (solución de lisis) y 30  $\mu$ L de proteinasa K y se homogenizó por 15 s. Seguido de esto, se sometió a una etapa de incubación por 1 h a una temperatura de 65 °C, con agitación cada 15 min. Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min en una microcentrífuga. De cada microtubo, se tomó aproximadamente 1 mL de sobrenadante y se colocó en un microtubo al cual se le adicionó la misma cantidad de cloroformo, se homogenizó y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 5 min. Se tomaron aproximadamente 900  $\mu$ L de sobrenadante y se agregó una cantidad igual de Genomic Bind Buffer (solución de unión), se homogenizó por 15 s y se centrifugó a 10000 rpm por 2 min. El sobrenadante se pasó a través de una columna de unión de DNA en un equipo Manifold con bomba de vacío especial para columna de unión de DNA; en el mismo equipo se realizó un lavado con 800  $\mu$ L de Genomic Wash Buffer (solución de lavado), seguido de tres lavados de 800  $\mu$ L cada uno con etanol al 75 %. Se centrifugó por 2 min a 10000 rpm, para luego transmitir las columnas a microtubos de 1.6 mL donde se adicionaron 50  $\mu$ L de buffer TE 1 x (previamente calentado a 65 °C), con el cual se incubó por 8 min a 65 °C, seguido de una centrifugación a 10000 rpm por 5 min. Ésta operación se realizó por duplicado. Con ello se obtuvieron aproximadamente 100  $\mu$ L de solución (DNA en buffer TE 1 x).

Para conocer la calidad del DNA genómico extraído se midió la absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Las muestras se estandarizaron a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L. Aquellas obtenidas con una concentración menor fueron concentradas en un concentrador de DNA miVac DNA concentrator<sup>®</sup>; mientras que las que presentaban una concentración superior eran diluidas con agua de acuerdo a la fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$  para obtener la concentración deseada.

#### 5.2.4 Cálculo de la concentración de DNA para la cuantificación por dPCR

El cálculo de las diluciones óptimas para las secuencias a cuantificar se determinó siguiendo las Ecuaciones que se muestran a continuación.

Para obtener el peso en ng de 1 copia del genoma de algodón se emplearon las ecuaciones 1 y 2.

- Ecuación 1

$$G \times F = m$$

donde:

G: Tamaño del genoma (Mb); para este caso se consideró un tamaño aproximado del genoma de algodón de 2246 Mb (Yu, *et al.*, 2011).

F: Factor universal = 1 pg/978 Mb

m: Masa del genoma en pg

- Ecuación 2

$$m \times f = M$$

donde:

m: masa del genoma en pg

f: Factor de conversión de pg a ng = 0.001 ng/1 pg

M: Masa del genoma en ng

Posteriormente, con las Ecuaciones 3 y 4, se obtiene el número de copias esperadas por reacción (por cada partición del subarreglo,  $V = 33$  nL) de cada

secuencia se deben evaluar cuatro concentraciones del DNA a cuantificar para obtener la dilución óptima que entrará dentro del rango de número de copias que especifica el fabricante (0.6 a 1.6 copias por partición).

- Ecuación 3

$$C \times \frac{1 \text{ copia por genoma}}{M} = CP$$

donde:

C: Concentración de DNA a evaluar (ng/μL) = 0.1 ng/μL, 1 ng/μL, 10 ng/μL o 100 ng/μL

M: Masa del genoma en ng

CP: Número de copias de la concentración de DNA evaluada (cp)

- Ecuación 4

$$v \left( \frac{CP}{V} \right) = cp$$

donde:

v: Volumen por partición = 33 nL

CP: Número de copias de la concentración de DNA evaluada por subarreglo (cp)

V: Volumen por subarreglo = 5000 nL

cp: Número de copias de la concentración de DNA evaluada por partición (cp)

### 5.2.5 Dilución del material por cuantificar

Se llevaron a cabo las diluciones seriales para la cuantificación del gen endógeno *acyl carrier protein (acp-1)* en los MRC y mezclas de harina de algodón de acuerdo al esquema que se muestra en la Figura 5.2; tomando en cuenta que para el caso de un MRC al 100 %, tanto la secuencia GM como el gen endógeno se encuentra en relación 1:1, se siguió el mismo esquema para la cuantificación del EE MON88913-8.

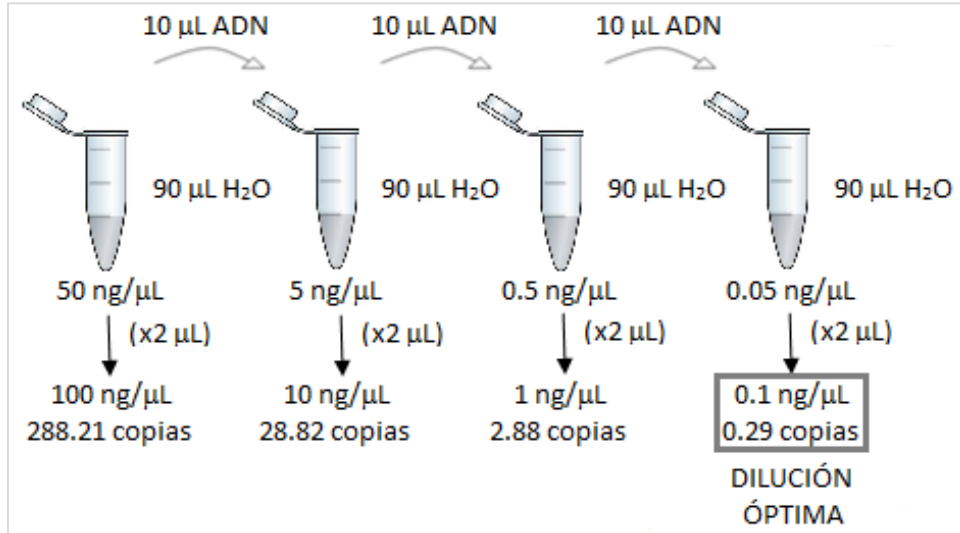


Figura 5.2. Dilución de DNA realizada para la cuantificación del gen *acp-1* en MRC y mezclas de harina de algodón.

Se cargaron 2 µL de DNA por cada subarreglo, para obtener la concentración requerida y cumplir con las diluciones óptimas calculadas para obtener el número de copias esperado dentro de los rangos planteados por el fabricante.

En el caso de la cuantificación del EE *MON88913-8*, en cada una de las mezclas se siguió el esquema de trabajo mostrado en la Figura 5.3, teniendo en consideración que para cada una de ellas la concentración de la secuencia GM es diferente.

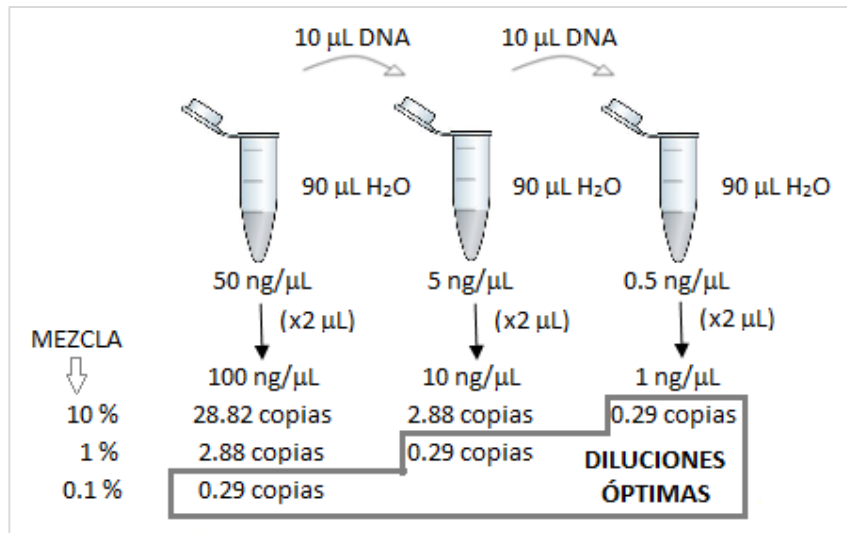


Figura 5.3. Dilución de DNA realizada para la cuantificación de la secuencia GM en mezclas de harina de algodón.

### 5.2.6 Plásmidos

Los plásmidos se obtuvieron a partir del vector p-GEM<sup>®</sup>-T Easy e insertos del gen endógeno de algodón *acp-1* y el EE *MON88913-8* en relación 1:1 de ambas secuencias, en forma circular (no linearizado) y linearizada (con ayuda de la enzima *ScaI*), para los cuales se reporta una concentración de 1238 ng/μL y 227 ng/μL, respectivamente. Una vez que el DNA plasmídico fue recibido se almacenó a -70 °C para su almacenamiento.

### 5.2.7 Diseño y preparación del protocolo de diluciones para la cuantificación por dPCR de DNA plasmídico

Se buscó obtener diluciones entre 100 y 200 copias por microlitro para cada uno de los plásmidos, dichas concentraciones se fijaron tomando como referencia los resultados obtenidos en un estudio realizado previamente en el CNRDOGM (Gutiérrez, 2012).

Los protocolos de dilución a seguir en la preparación de las diluciones en serie para cada uno de los plásmidos, se muestran a continuación en las Figuras 5.4 y 5.5.

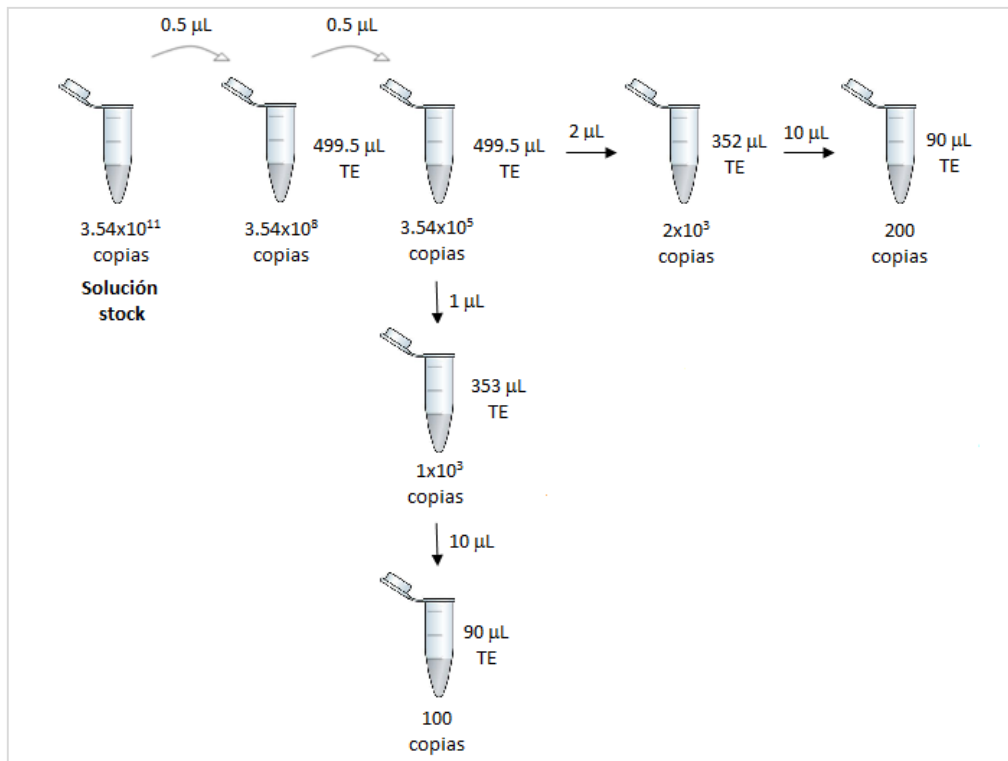
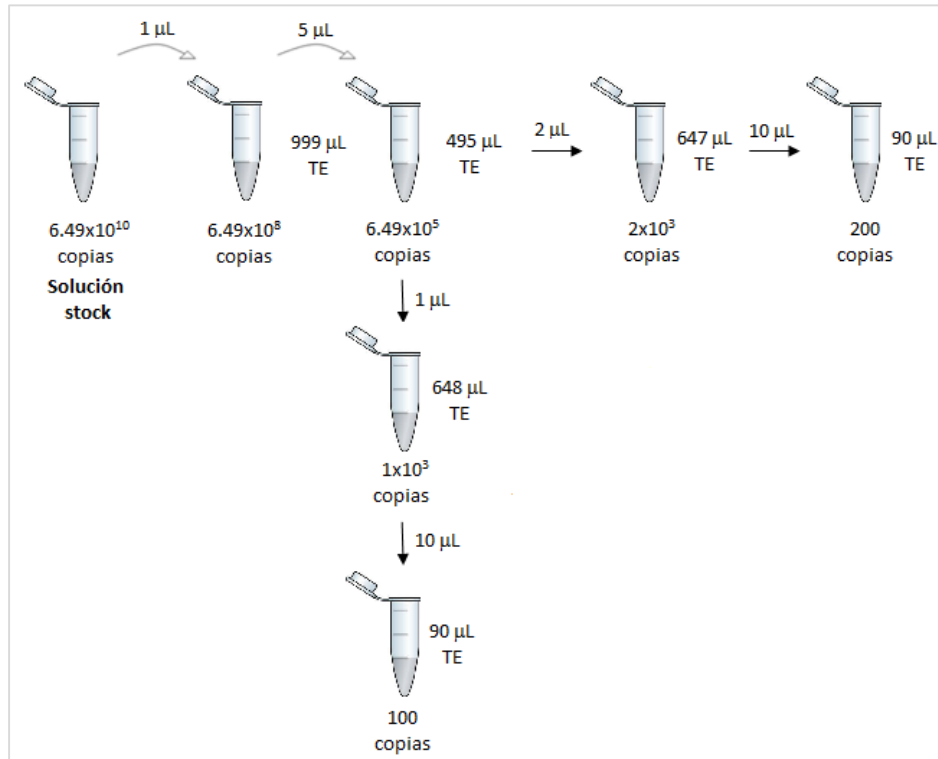


Figura 5.4. Protocolo de dilución para plásmido no linearizado (circular).



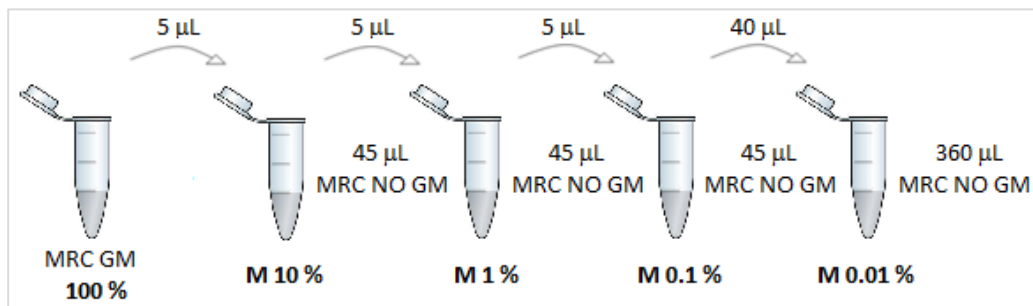


**Figura 5.5. Protocolo de dilución de plásmido linealizado.**

Las diluciones de los plásmidos fueron realizadas en baño de hielo para evitar la degradación del DNA plasmídico, y de manera gravimétrica en una balanza analítica con la finalidad de conocer las cantidades reales de DNA y de diluyente de los que se componía cada dilución y así contar con datos más exactos para obtener los valores reales de la cuantificación de los plásmidos.

### 5.2.8 Determinación del LC para la plataforma de dPCR Open Array®

Para la determinación del LC de la plataforma de dPCR Open Array® se realizaron mezclas de DNA de algodón GM y DNA de algodón no GM hasta obtener una concentración de 0.01 % DNA GM/DNA NO GM. Para ello se emplearon los MRC AOCS-0906-D como el MRC GM y el MRC AOCS-0804-A como el MRC NO GM o convencional, el protocolo de elaboración de dichas mezclas se ilustra en la Figura 5.6.



**Figura 5.6. Protocolo de elaboración de mezclas de DNA de algodón GM y no GM para la determinación del LC de la plataforma de dPCR Open Array®.**

Una vez que se obtuvo la mezcla de DNA de algodón al 0.01 %, se procedió a estimar el número de copias esperadas al cargar 100 ng de DNA de la mezcla obtenida. De la misma manera que para los MRC y mezclas de harina de algodón GM, se consideró que el EE se encontraba en una concentración de 0.01 % respecto al gen endógeno, es decir, de 0.029 copias para el EE, y 0.29 copias para la secuencia endógena.

### 5.2.9 Cuantificación de los materiales de algodón GM por dPCR

La cuantificación de los MRC y las mezclas de harina de algodón se realizó en la plataforma Open Array® de Life Technologies®.

Para todas las reacciones se empleó una mezcla de enzima, amortiguador y nucleótidos, o “master mix”, oligonucleótidos y sondas Taqman®, para armar posteriormente la mezcla de reacción con el DNA genómico. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas utilizados se muestran en la Tabla 5.1 (Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, 2010).

**Tabla 5.1. Secuencia de los iniciadores y sondas de las secuencias cuantificadas.**

<b>Secuencia blanco</b>	<b>Iniciador o sonda</b>	<b>Secuencia de oligonucleótido de DNA</b>
<i>acp-1</i>	IF	5' - ATT GTG ATG GGA CTT GAG GAA GA - 3'
	IR	5' - CTT GAA CAG TTG TGA TGG ATT GTG - 3'
	S	5' - FAM - ATT GTC CTC TTC CAC CGT GAT TCC GAA - TAMRA - 3'
MON88913-8	IF	5' - CAA ATT ACC CAT TAA GTA GCC AAA TTA C - 3'
	IR	5' - GGC TTT GGC TAC CTT AAG AGA GTC - 3'
	S	5' - FAM - AAC TAT CAG TGT TTG ACT ACA T - MGBNFQ - 3'
DAS21023-5	IF	5' - AAA TAT TAA CAA TGC ATT GAG TAT GAT G - 3'
	IR	5' - ACT CTT TCT TTT TCT CCA TAT TGA CC - 3'
	S	5' - FAM- TAC TCA TTG CTG ATC CAT GTA GAT TTC CCG-TAMRA - 3'

El volumen de los componentes para la elaboración de las diferentes mezclas de reacción tanto para el DNA genómico como el DNA plasmídico integrado y los NTC (NotTemplate Control, con agua en vez de DNA), se muestra en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2. Componentes de las mezclas de reacción utilizadas en la cuantificación de qPCR.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Vol. por subarreglo (μL)</b>	<b>Vol. para 12 subarreglos (μL)</b>		<b>Vol. para 5 subarreglos de NTC (μL)</b>
			<b>DNA genómico</b>	<b>DNA plasmídico</b>	
Agua	-	-	-	12	5
Master Mix	2 x	2.5	30	30	12.5
Oligonucleótido Forward	10 nM	0.15	1.8	1.8	0.75
Oligonucleótido Reverse	10 nM	0.15	1.8	1.8	0.75
Sonda	5 nM	0.2	2.4	2.4	1
DNA	-	2	24	12	-
Vol. total		5	60		20

Para la cuantificación de las muestras se siguió el esquema mostrado en la Figura 5.7, empleándose una mezcla de reacción individual para 11 subarreglos para cada una de las filas de la placa Open Array®, mientras que para los NTC de cada secuencia se realizaron mezclas de reacción independientes.

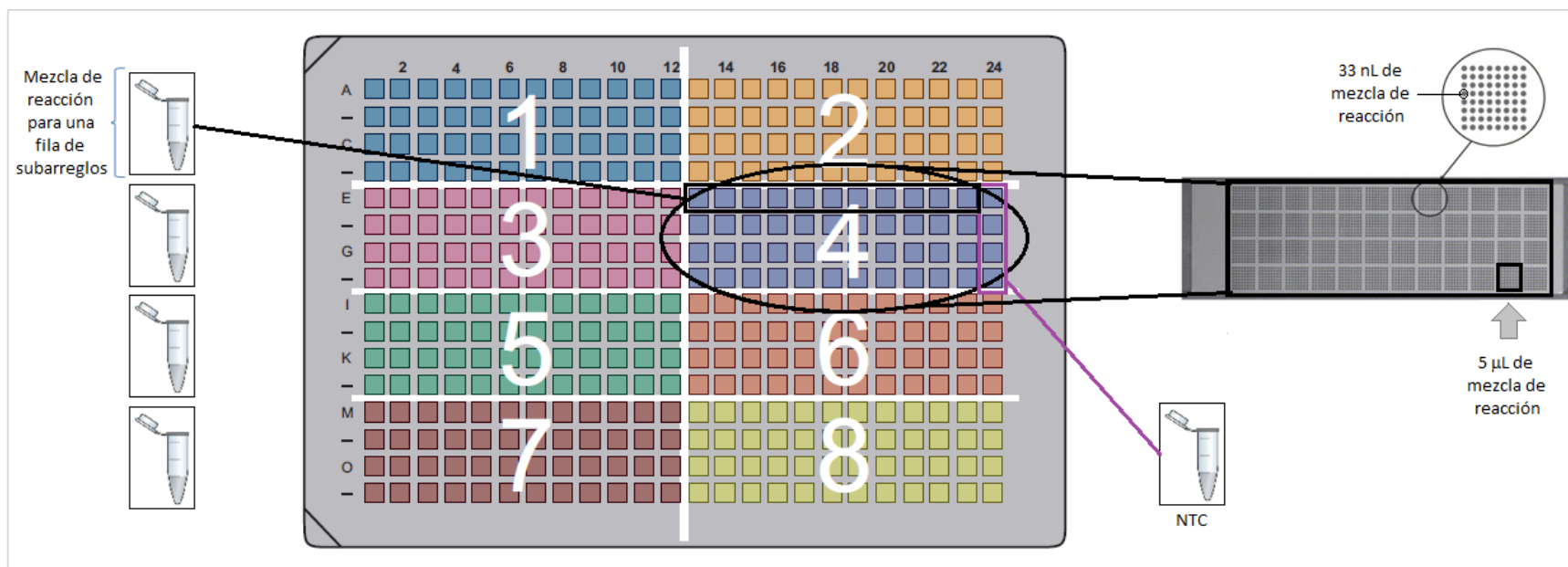
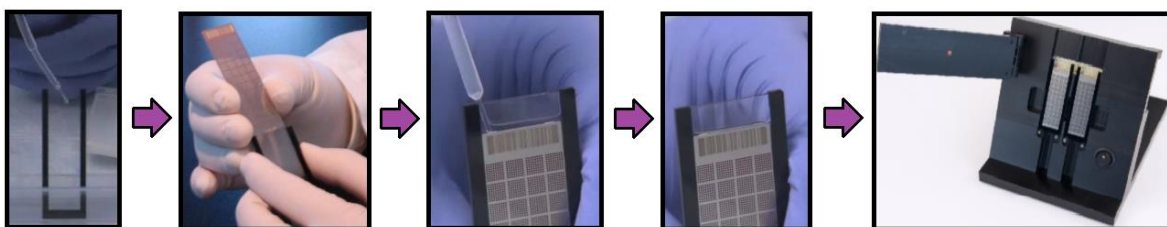


Figura 5.7. Esquema de trabajo para cuantificación por dPCR.

El llenado de las placas Open Array<sup>®</sup> se realizó con ayuda del Sistema Acuffil<sup>®</sup>. Se cargaron las mezclas de reacción necesarias en placas de 384 pozos, distribuyéndose de tal forma que por cada 11 pozos de la placa de 384 se cargó un volumen de 5  $\mu$ L en cada uno, y 5  $\mu$ L de mezcla de reacción para NTC en el pozo 12, como se indica en la Figura 5.7.

Posteriormente con el Sistema Acuffil<sup>®</sup> se cargó cada una de las particiones de los subarreglos de las placas Open Array<sup>®</sup> (previamente atemperadas en un refrigerador de 4 °C después de su almacenamiento a -20 °C a) con 33 nL de la mezcla de reacción.

Una vez cargadas, las placas Open Array<sup>®</sup> fueron introducidas en casetes, previamente llenados con líquido de inmersión hasta tres cuartas partes de su capacidad y hasta permitir la cobertura total de la placa. El resto del casete se rellenó con polímero sellador que se solidificó con la exposición a luz UV por un lapso de 3 min por cada cara del casete con ayuda de la Estación de sellado de placas Open Array<sup>®</sup>, lo anterior para permitir la protección de la placa Open Array<sup>®</sup> bajo las condiciones de termociclado. Este proceso se ejemplifica en la Figura 5.8.



**Figura 5.8. Esquema de preparación de las placas Open Array<sup>®</sup> previo al termociclado.**

Una vez que se crearon los archivos pertinentes para la corrida de termociclado (archivos con extensión *.tpf* y *.csv*), tomando como referencia el manual de entrenamiento Open Array<sup>®</sup>, se procedió a la colocación de las placas Open Array<sup>®</sup> en el termociclador NT Cyclor y se dio inicio a la corrida siguiendo el protocolo plasmado en el mismo manual. Las etapas de termociclado se resumen en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3. Condiciones de termociclado del NT Cycler.**

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (s)</i>	<i>Repeticiones</i>
Pre-calentamiento	94	540	1
Amplificación	95	20	40
	60	60	
	72	30	

Para la obtención de los datos referentes a la corrida de termociclado, se exportaron los archivos generados del software Open Array® Real Time PCR System (archivos con extensión *.ncx* y *.csv*) al software del Open Array® Digital PCR siguiendo las instrucciones indicadas en el manual de entrenamiento de Open Array®. Éste último software, permite desplegar un análisis de los datos propios de la corrida, que incluyen:

- Heatmap Tab (Mapas de amplificación): Permite visualizar un esquema de la placa Open Array® en donde se muestran los pozos con y sin amplificación.
- Results Tab: Despliega los resultados obtenidos para cada subarreglo con base en la información contenida en los archivos creados previo a la amplificación, dentro de los cuales se encuentran: promedio de copias por reacción, intervalo de confianza menor y mayor, total de réplicas (reacciones que se consideraron para el análisis), total de amplificaciones negativas, y total de omitidas (reacciones que se omitieron automáticamente por algún error del cargado).

#### **5.2.10 Análisis estadístico de los resultados generados por dPCR**

El análisis que arroja el software del Open Array® Digital PCR, permite obtener un promedio del número de copias por cada reacción que compone a un subarreglo (64 particiones = 64 reacciones), así como un intervalo de confianza para estos resultados.

Para los fines de este estudio, en la generación de los resultados reportados se consideró el promedio del número de copias por cada fila de la placa Open Array® (compuesta por 11 subarreglos, más uno destinado para NTC que no se considera para efectos del cálculo), así como de sus intervalos de confianza. Con ello, se estimaron el número de copias que se tenían en una partición ( $V = 33 \text{ nL}$ ), para después relacionarlo con el número de copias en un subarreglo ( $V = 5 \text{ } \mu\text{L}$ ), y así

obtener el número de copias en 100 ng de DNA, y determinar el % GM de acuerdo con la siguiente ecuación:

- Ecuación 5

$$\% GM = \frac{\text{número de copias de EE}}{\text{número de copias de gen endógeno}} \times 100$$

Este resultado permite obtener el porcentaje de EE cuantificado con el equipo dPCR que contiene cada uno de los materiales con DNA genómico que fueron cuantificados.

En el caso de los materiales con DNA plasmídico, se consideró que el software del Open Array® Digital PCR proporciona el promedio de copias por reacción de cada subarreglo (64 particiones = 64 reacciones) y un intervalo de confianza asociado. Por ello se utilizó la siguiente fórmula para obtener el número de copias asociado a la cuantificación de la secuencia blanco.

- Ecuación 6

$$33 \text{ nL} \left( \frac{\text{número de copias de secuencia blanco}}{5000 \text{ nL}} \right) \\ = \text{número de copias de secuencia blanco en 33 nL}$$

El tratamiento estadístico que se realizó para obtener el valor de incertidumbre expandida asociada a las mediciones realizadas consistió en obtener la distribución de los resultados a partir de la desviación estándar de los mismos, mediante las siguientes ecuaciones:

- Ecuación 7

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

Donde:

$U_{\text{combinada}}$  = Incertidumbre típica combinada

$u(C_{\text{ref}})$  = Incertidumbre del componente o material de referencia

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

Considerando que en la técnica de dPCR no se requiere un calibrante o material de referencia, este parámetro se descartó para el cálculo, quedando lo siguiente:

- Ecuación 8

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

Donde:

$U_{combinada}$  =  $u$  ( $RSD_{IP}$ ) = Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

SD = Promedio de la desviación estándar de la medición

$n$  = número de repeticiones de la medición

A partir de la incertidumbre combinada es posible obtener la **incertidumbre expandida** necesaria para evaluar las mediciones realizadas en los ensayos, con la siguiente Ecuación:

- Ecuación 9

$$U = (U_{combinada})k$$

Donde:

**$U$  = Incertidumbre expandida**

$U_{combinada}$  = Incertidumbre típica combinada

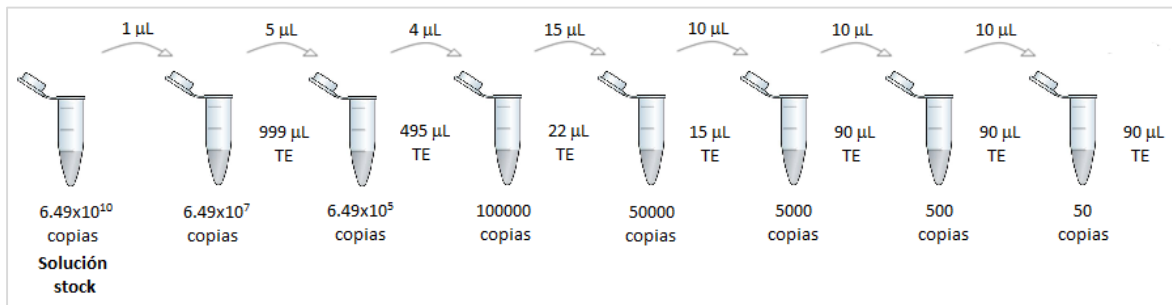
$k$  = factor de cobertura (igual a 2 representado por un intervalo de confianza del 95 %)

### 5.2.11 Cuantificación de mezclas de harina de algodón GM por qPCR empleando plásmido linearizado como calibrante

La cuantificación de las mezclas de algodón GM (10 %, 1 % y 0.1 %), partiendo del plásmido con el EE *MON88913-8* en su forma linearizada como calibrante, fue llevada a cabo en la plataforma ViiA<sup>®</sup>-7 Real Time PCR System de Life Technologies<sup>®</sup>. Para ello, se elaboraron diluciones seriales 1:10, de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 5.9, con concentraciones desde 100000 hasta 100 copias a partir de la solución stock del plásmido linearizado de manera volumétrica



para la construcción de una curva de calibración, tanto para la secuencia referencia como para la GM (EE *MON88913-8*) en las mezclas de algodón GM, y así determinar el % GM propio de cada una de ellas mediante esta técnica.



**Figura 5.9. Diluciones seriadas del plásmido linealizado con el EE *MON88913-8* empleado en la cuantificación de mezclas de harina de algodón por qPCR.**

Se emplearon una mezcla de enzima, buffer y nucleótidos, cebadores y sondas Taqman®, para que en conjunto con el DNA genómico (estandarizado a 50 ng/µL) y DNA plasmídico, conformaran la mezcla de reacción empleada para el cargado de los pozos requeridos de un placa con capacidad de 96 pozos. En cada pozo se depositó un volumen de 20 µL de la mezcla de reacción elaborada. Los volúmenes añadidos para obtener la mezcla de reacción se detallan en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4. Componentes de las mezclas de reacción usadas en la cuantificación de qPCR.**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. por 1 reacción = 20 µL
Agua	-	-	6.1 µL
Master mix	2X	1X	10 µL
Oligonucleótido Forward	10 µM	300 nM	0.6 µL
Oligonucleótido Reverse	10 µM	300 nM	0.6 µL
Sonda	5 µM	180 nM	0.7 µL
DNA	cpb~100 ng		2 µL
Volumen Final			20 µL

Las condiciones de termociclado para la corrida corresponden a las indicadas en la Tabla 5.3, para el NT Cycler.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Cuantificación de MRC

Con el propósito de evaluar las cuantificaciones realizadas por la técnica de dPCR con la plataforma Open Array® de Life Technologies®, se efectuó la cuantificación de MRC para comparar los resultados experimentales obtenidos con la concentración reportada en sus respectivos certificados. Para lograr este objetivo, posteriormente al proceso de extracción y estandarización de DNA a 50 ng/μL (como se especifica en los puntos 5.2.2 y 5.2.3 del apartado de metodología), se prepararon los MRC como se describe en los puntos 5.2.4 y 5.2.5 del apartado antes citado para conseguir las condiciones requeridas para la cuantificación del DNA genómico de cada uno de los MRC y establecer su posterior cuantificación por dPCR.

El cálculo de las diluciones óptimas, tanto para el gen endógeno *acp-1* como para el EE *MON88913-8* en los MRC, se determinó con base en las Ecuaciones 1-4 del apartado de Materiales y Métodos, como se muestra en el siguiente ejemplo de cálculo, en donde los parámetros considerados se explican en la sección 5.2.4 del apartado ya mencionado:

*Ecuación 1*

$$2246 \text{ Mb} \left( \frac{1 \text{ pg de ADN}}{978 \text{ Mb}} \right) = 2.29 \text{ pg de ADN}$$

*Ecuación 2*

$$2.29 \text{ pg de ADN} \left( \frac{0.001 \text{ ng}}{1 \text{ pg}} \right) = 2.29 \times 10^{-3} \text{ ng de ADN}$$

*Ecuación 3*

$$0.1 \text{ ng de ADN} \left( \frac{1 \text{ copia de } acp - 1}{2.29 \times 10^{-3} \text{ ng de ADN}} \right) = 43.67 \text{ copias de } acp - 1$$

*Ecuación 4*

$$33 \text{ nL} \left( \frac{43.67 \text{ copias de } acp - 1}{5000 \text{ nL}} \right) = 0.29 \text{ copias de } acp - 1$$

Donde el valor desprendido de la Ecuación 4 indicará el número de copias esperadas de la secuencia a cuantificar, mismo que deberá estar dentro o por debajo del rango especificado por el fabricante, que es de 0.6 a 1.6 copias por partición. De acuerdo a los cálculos realizados se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 6.1 para el número de copias esperadas de acuerdo a la concentración de trabajo empleada.

**Tabla 6.1. Estimación de la concentración de DNA para adicionar el número de copias indicado por el fabricante.**

<b>Concentración de DNA (ng)</b>	<b>Número de copias esperadas en 5000 nL</b>	<b>Número de copias esperadas en 33 nL</b>
0.1	43.67	0.29

A partir de la dilución óptima de 0.1 ng/ $\mu$ L del gen endógeno, correspondiente a 0.29 copias esperadas de la secuencia *acp-1*, se consideraron 0.29 copias esperadas del EE *MON88913-8* para el caso de los MRC (100 % “Control positivo” = 100 ng de DNA) debido a que la relación entre el gen endógeno y el evento específico es 1:1.

Para evaluar la confiabilidad de los resultados obtenidos de los ensayos realizados se consideraron los siguientes parámetros: la concentración obtenida a partir de la cuantificación de ambas secuencias en comparación con la reportada en el certificado, la incertidumbre relativa de los ensayos, así como la desviación estándar relativa a la repetibilidad; donde para ésta última se esperaría que se encontrara dentro del rango aceptado ( $\leq 25\%$ ) (Luque, 2012).

### **6.1.1 Cuantificación del MRC AOCS-0906-D**

Se llevó a cabo la cuantificación del MRC *AOCS-0906-D*, del cual su certificado reporta una concentración de 99.4 % copia/copia de la secuencia específica *MON88913-8* con respecto a la secuencia endógena *acp-1*, sin una incertidumbre asociada.

La cuantificación de éste material se realizó para obtener un resultado comparable con el reportado en su certificado, a fin de evaluar la exactitud y precisión que ofrece la técnica de dPCR, teniendo en cuenta que los datos reportados en el certificado del MRC están avalados por una institución de metrología.

Tras la preparación del DNA para su cuantificación por dPCR, se cargaron dos placas Open Array®, una para el EE *MON88913-8* y otra para la secuencia endógena, ambas con 0.1 ng de DNA por subarreglo. Se realizaron cuatro ensayos para la emisión del resultado de la cuantificación, considerando como un replicado el conjunto de 11 subarreglos conteniendo DNA genómico y un subarreglo adicional como NTC.

En la Tabla 6.2, se pueden observar los datos obtenidos de la cuantificación por dPCR del MRC *AOCS-0906-D* con la plataforma Open Array®. En la Tabla 6.2 se indica el valor esperado en número de copias para las secuencias del EE *MON88913-8* y para el gen endógeno *acp-1*, así como el valor de las copias obtenidas de la cuantificación con sus respectivos intervalos de confianza, lo cual permite comparar el valor esperado de número de copias y el valor obtenido.

**Tabla 6.2. Número de copias promedio por reacción para la cuantificación del MRC *AOCS-0906-D*.**

MRC	Secuencia	Conc. de DNA por subarreglo (ng)	# copias esperadas	# copias obtenidas	IC inferior	IC superior
<i>AOCS-0906-D</i>	<i>MON88913-8</i>	0.1	0.29	0.31	0.19	0.50
	<i>acp-1</i>			0.33	0.21	0.52

Los mapas y curvas de amplificación desprendidos para cada uno de los cuatro ensayos efectuados durante la cuantificación tanto de la secuencia del EE *MON88913-8* como de la secuencia endógena *acp-1*, se presentan en las Figuras 6.1 y 6.2, en donde se observan los pozos con amplificación (rojo) y sin amplificación (negro) en los mapas, en complemento con las curvas de amplificación. En la cuantificación de este material se evidencia la relación 1:1 de ambas secuencias ya que al encontrarse en la misma relación el número de pozos con amplificaciones positivas que ambas presentan es similar, lo mismo se observa en el conjunto de las curvas de amplificación desprendidas para cada uno de los ensayos, las cuales se muestran en apariencia similares.

A partir de los datos obtenidos en la cuantificación, se llevaron a cabo los cálculos necesarios para determinar el % GM del MRC *AOCS-0906-D* a fin de comparar el

valor obtenido con el reportado en el certificado de este material, cuyo valor obtenido por dPCR con la plataforma Open Array® es de 94.02 % con una incertidumbre expandida asociada de 1.54 %, mientras que el valor reportado por la entidad de metrología encargada de certificar este material es de 99.4 % sin una incertidumbre asociada, por lo cual se planteó la cuantificación de un MRC que contará con una incertidumbre asociada reportada, cuya determinación se detalla en el siguiente apartado.

Respecto a la desviación estándar relativa a la repetibilidad, considerada para respaldar la confiabilidad de los ensayos en términos de repetibilidad, se determinó que se obtuvo un valor de 0.82 %, el cual es menor al máximo aceptado de 25 % RDSr.

En la Figura 6.3 se ilustra de manera gráfica que el valor obtenido se encuentra alejado del reportado, sin embargo, al no contar con una incertidumbre asociada para el valor emitido en el certificado del MRC no se puede asegurar que el valor determinado no sea comparable con el reportado.

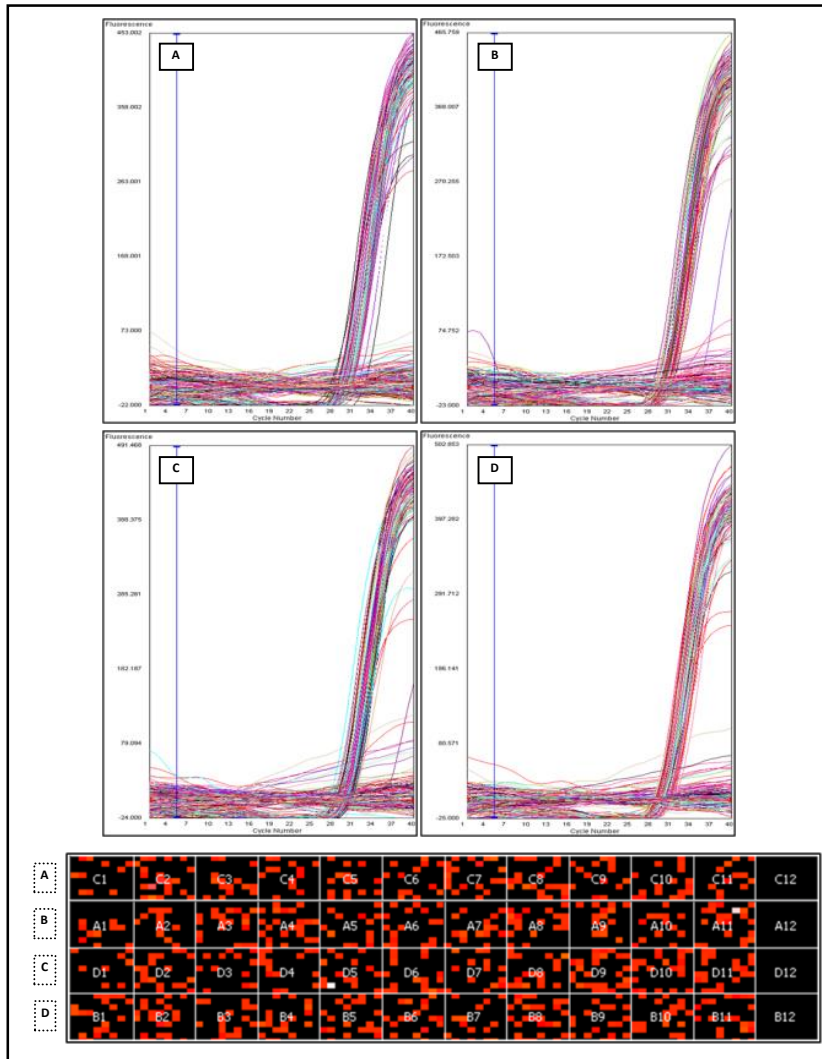


Figura 6.1. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON88913-8* en el MRC *AOCS-0906-D* por dPCR.

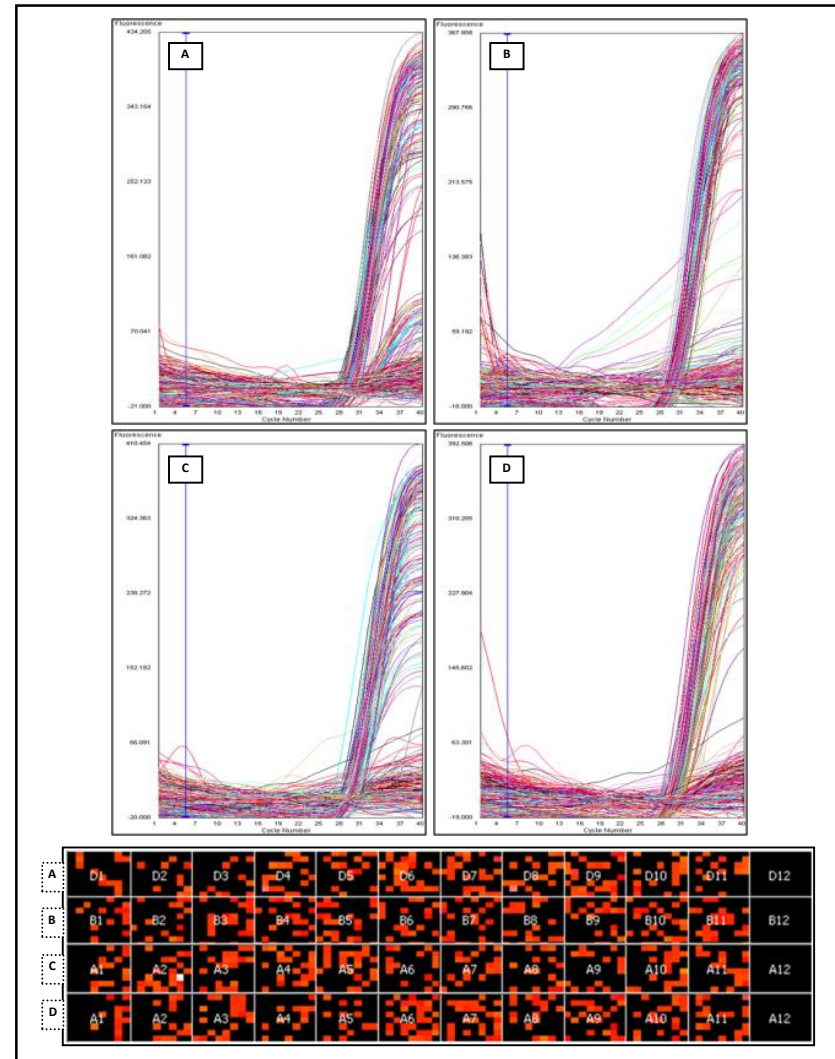
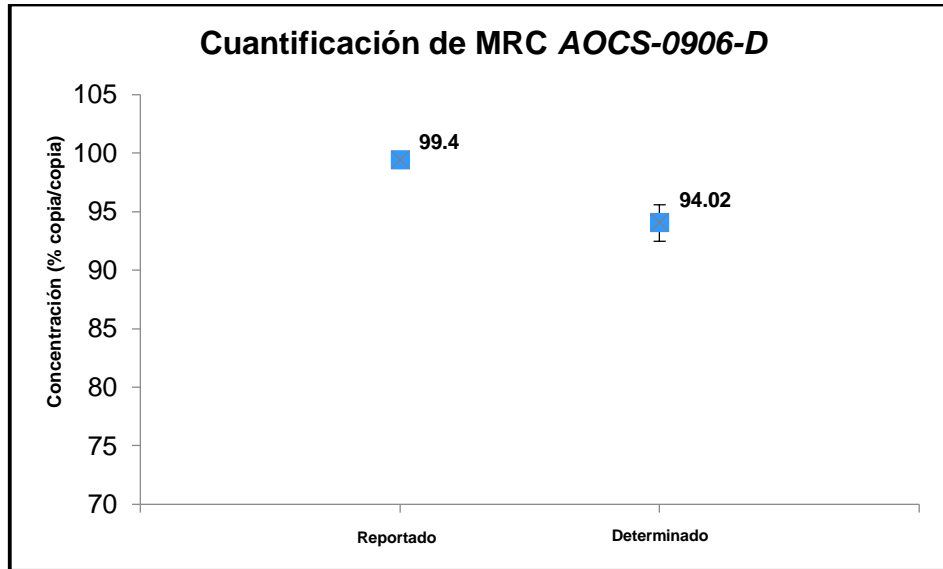


Figura 6.2. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en el MRC *AOCS-0906-D* por dPCR.



**Figura 6.3.** Comparativo del valor reportado en el certificado del MRC AOCS-0906-D y el valor determinado a partir de su cuantificación por dPCR.

### 6.1.2 Cuantificación del MRC *ERM-BF422d*

Posterior a la cuantificación del MRC AOCS-0906-D donde se observó que el valor determinado a partir de la cuantificación con dPCR no podía ser comparado con el reportado en su certificado, debido a que no especificaba una incertidumbre asociada, se decidió cuantificar un nuevo MRC para evaluar la respuesta de la técnica de dPCR con la plataforma Open Array®.

El material seleccionado no contenía el EE objeto del presente estudio y fue seleccionado por disponibilidad, porque el certificado presentaba un valor de incertidumbre asociada y porque corresponde a la misma especie con la que se estaba trabajando.

El MRC *ERM-BF422d* es un material modificado genéticamente de tipo “stack” o apilado, cuya concentración es de 10 % copia/copia de las secuencias GM con respecto al gen endógeno *acp-1*. Al ser un material “stack” brinda la posibilidad de cuantificar cualquiera de las dos secuencias GM con las que cuenta: *DAS24236-5* y/o *DAS21023-5*, por lo cual, en este análisis se consideró la secuencia *DAS21023-5* para llevar a cabo su cuantificación y obtener el porcentaje GM del MRC respecto a la cuantificación de la secuencia endógena. Para ello, después de obtener el DNA en las condiciones requeridas para su cuantificación por dPCR, se cargaron dos

placas Open Array® para cuantificar cada una de las secuencias: *DAS21023-5* a una concentración de 1 ng y la secuencia endógena *acp-1* con 0.1 ng, llevando a cabo cuatro ensayos para cada una de ellas, al igual que para el MRC AOCs-0906-D (punto 6.1.1, de este apartado).

Los resultados obtenidos para esta cuantificación se detallan en la Tabla 6.3, en donde se registra el número de copias esperadas de cada una de las secuencias.

**Tabla 6.3. Número de copias promedio por reacción para la cuantificación de MRC.**

MRC	Secuencia	Conc. de DNA por subarreglo (ng)	# copias esperadas	# copias obtenidas	IC inferior	IC superior
<i>ERM-BF422d</i>	<i>DAS21023-5</i>	1	0.29	0.23	0.14	0.40
	<i>acp-1</i>	0.1		0.28	0.17	0.47

En las Figuras 6.4 y 6.5 se presentan los mapas y curvas de amplificación de los ensayos realizados para la cuantificación de las secuencias *DAS21023-5* y *acp-1*, en donde se observa que este material no presenta una relación 1:1 en las secuencias que lo conforman, debido a que se hace evidente el menor número de amplificaciones positivas para la secuencia *DAS21023-5* respecto a la secuencia endógena.



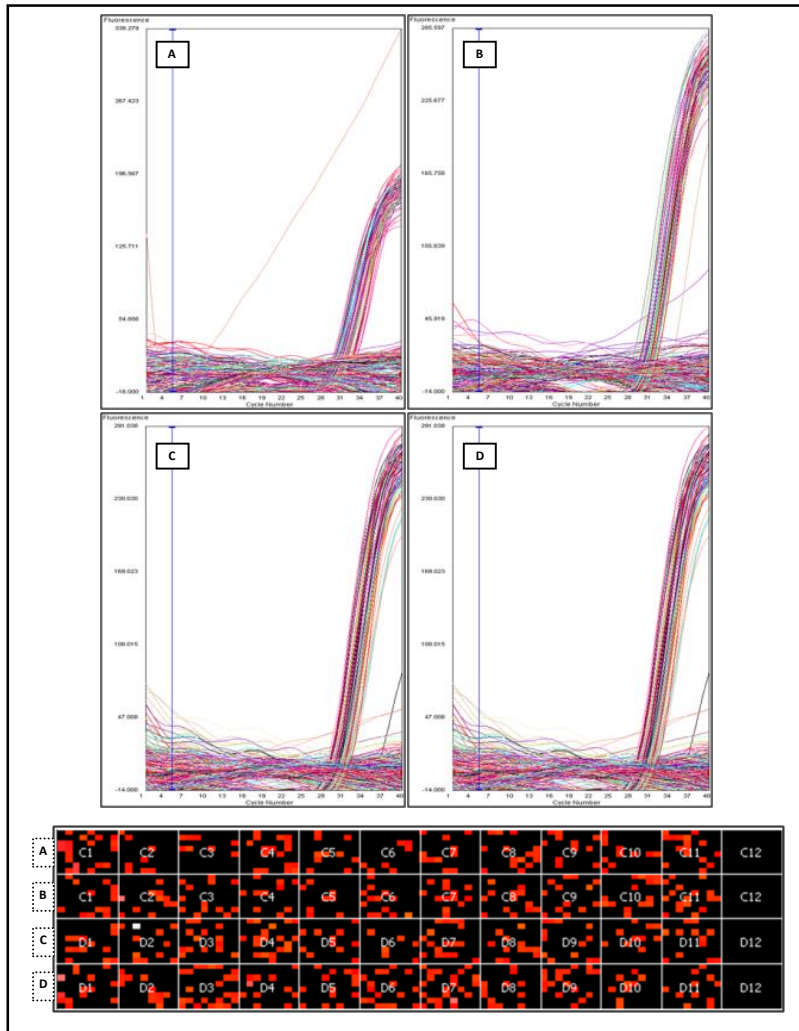


Figura 6.4. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *DAS21023-5* en el MRC *ERM-BF422d* por dPCR.

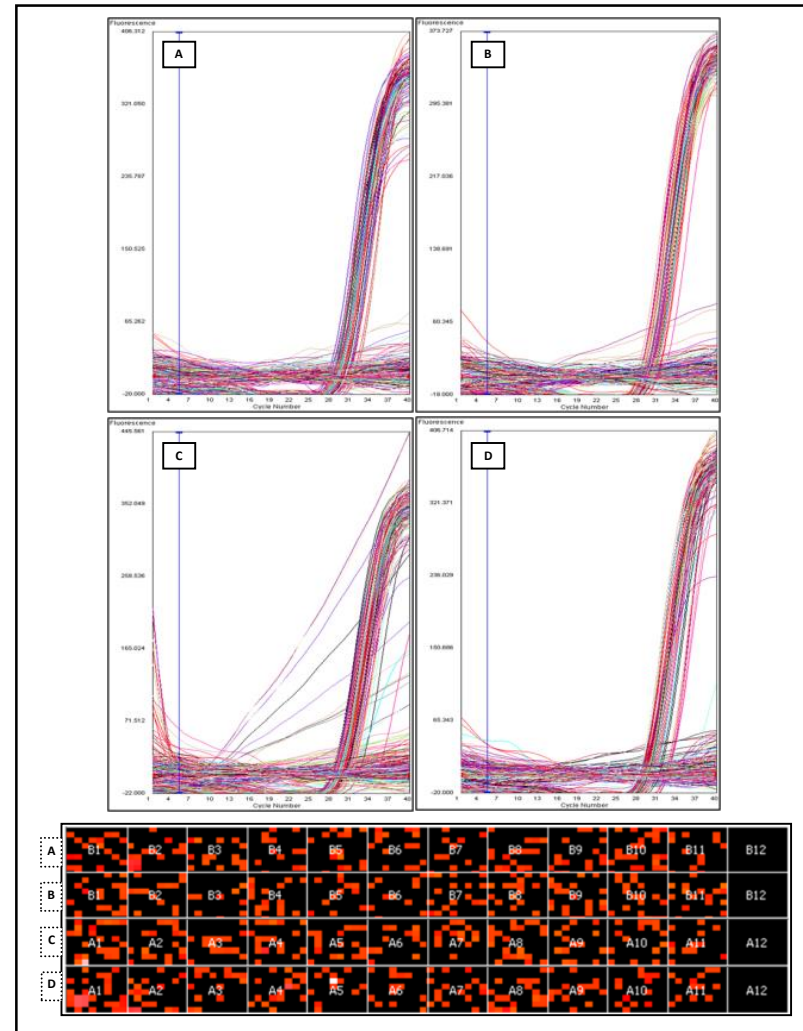


Figura 6.5. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en el MRC *ERM-BF422d* por dPCR.

Con los resultados obtenidos en número de copias se procedió a determinar el valor de concentración expresada en porcentaje, obteniéndose un valor de 8.44 % con una incertidumbre asociada de 0.48 %, mientras que en su certificado se reporta una concentración de 10 % con una incertidumbre asociada de 1.6 %.

Al contar con dos datos que tienen una incertidumbre asociada se puede llevar a cabo una comparación entre el valor reportado en el certificado del MRC y el valor obtenido por su cuantificación con dPCR. Como se visualiza en la Figura 6.6, el valor obtenido es comparable con el valor reportado al considerar la incertidumbre reportada y la obtenida. Con el propósito de evaluar la repetibilidad de los ensayos realizados se determinó la desviación estándar relativa a la repetibilidad, para la cual se obtuvo un valor de 2.86 %, mismo que es menor al máximo aceptado de 25 % RSDr. El valor determinado es estadísticamente aceptable y por lo tanto se concluye que la metodología utilizada es apta para el fin propuesto.

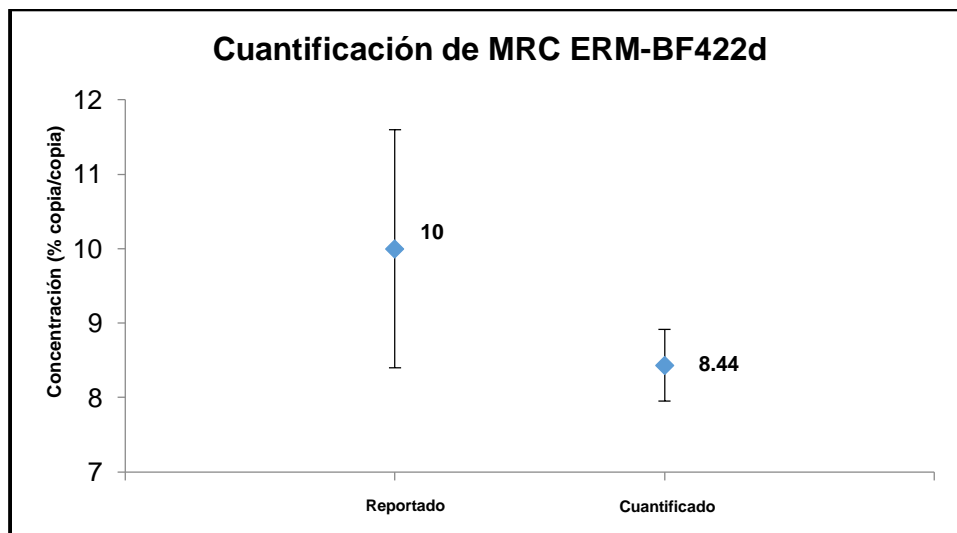


Figura 6.6. Gráfico comparativo del valor reportado en el certificado del MRC *ERM-BF422d* y el valor determinado a partir de su cuantificación por dPCR.

## 6.2 Obtención del límite de cuantificación (LC) para la plataforma Open Array® con mezclas DNA/DNA de algodón GM

Para obtener el límite de cuantificación de la plataforma de dPCR Open Array®, se realizaron mezclas de algodón GM en % DNA/DNA al 0.01 %, y se llevó a cabo su cuantificación por dPCR.

Los datos obtenidos se especifican en la Tabla 6.4, donde se puede observar el alto grado de exactitud en la cuantificación del EE *MON88913-8* debido a que el número de copias obtenidas respecto a las esperadas es comparable.

**Tabla 6.4. Número de copias promedio por reacción en la cuantificación de mezclas de algodón GM porcentaje DNA/DNA por dPCR para la determinación del LC.**

Mezcla	Secuencia	Conc. de DNA por subarreglo (ng)	# copias esperadas	#copias obtenidas	IC inferior	IC superior
0.1 %	<i>MON88913-8</i>	100	0.29	0.25	0.15	0.42
	<i>acp-1</i>	1		0.43	0.28	0.65
0.01 %	<i>MON88913-8</i>	100	0.029	0.025	0.007	0.101
	<i>acp-1</i>	0.1	0.29	0.337	0.213	0.535

En la Figura 6.7 y Figura 6.8 es posible comparar el número de amplificaciones positivas obtenidas para los ensayos de cuantificación de cada una de las secuencias en la mezcla 0.1 %, destacando un menor número de las mismas para la secuencia del EE respecto a la endógena, ya que la primera se encuentra en menor proporción que la segunda en la mezcla cuantificada. En cuanto a las curvas de amplificación obtenidas, se observó que el conjunto descrito para la secuencia endógena muestra un mayor número de curvas de amplificación en relación al EE *MON88913-8*, lo cual influye en el número de amplificaciones positivas obtenidas en los mapas de amplificación.

En los mapas y curvas de amplificación mostrados en las Figuras 6.9 y 6.10 obtenidos de la cuantificación de la mezcla 0.01 %, el número de pozos con amplificaciones positivas es mayor para la secuencia endógena respecto a la secuencia del EE, al igual que en las curvas de amplificación. Resalta que para ambos casos el número de amplificaciones tanto en el mapa como en el conjunto de curvas de amplificación es prácticamente nulo para esta mezcla, producto de la baja concentración de la secuencia GM analizada.

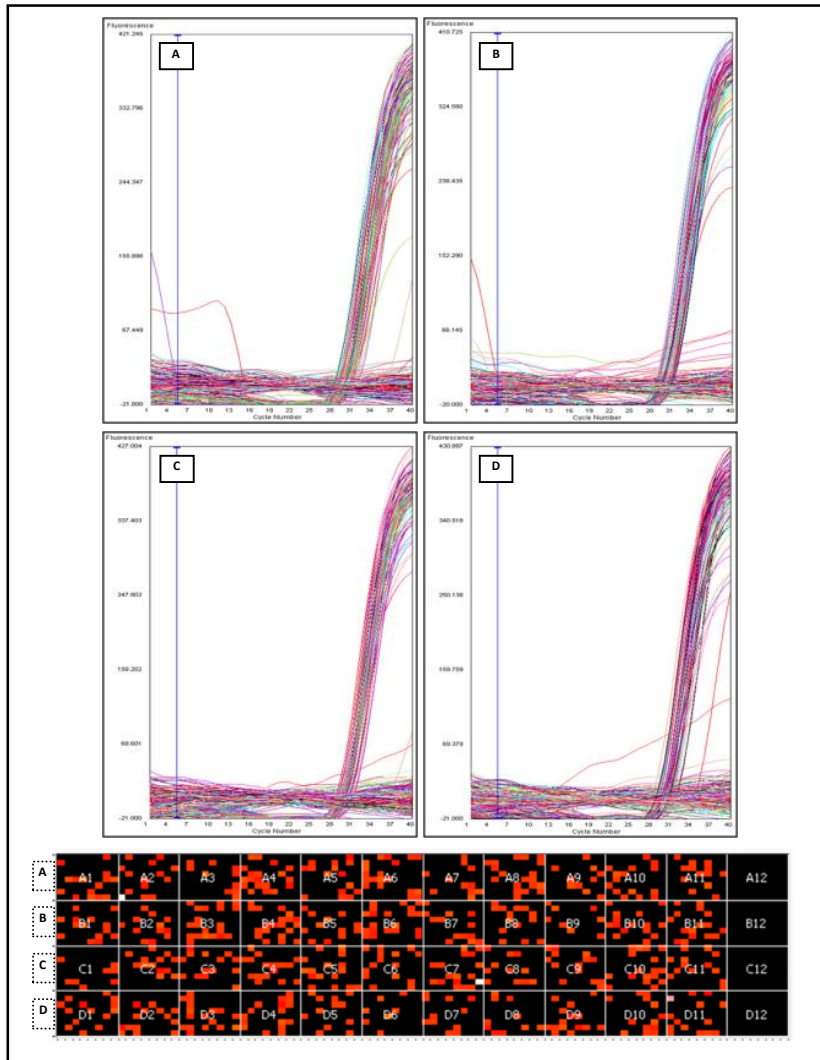


Figura 6.7. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON8913-8* en la mezcla de algodón GM al 0.1 % DNA/DNA por dPCR.

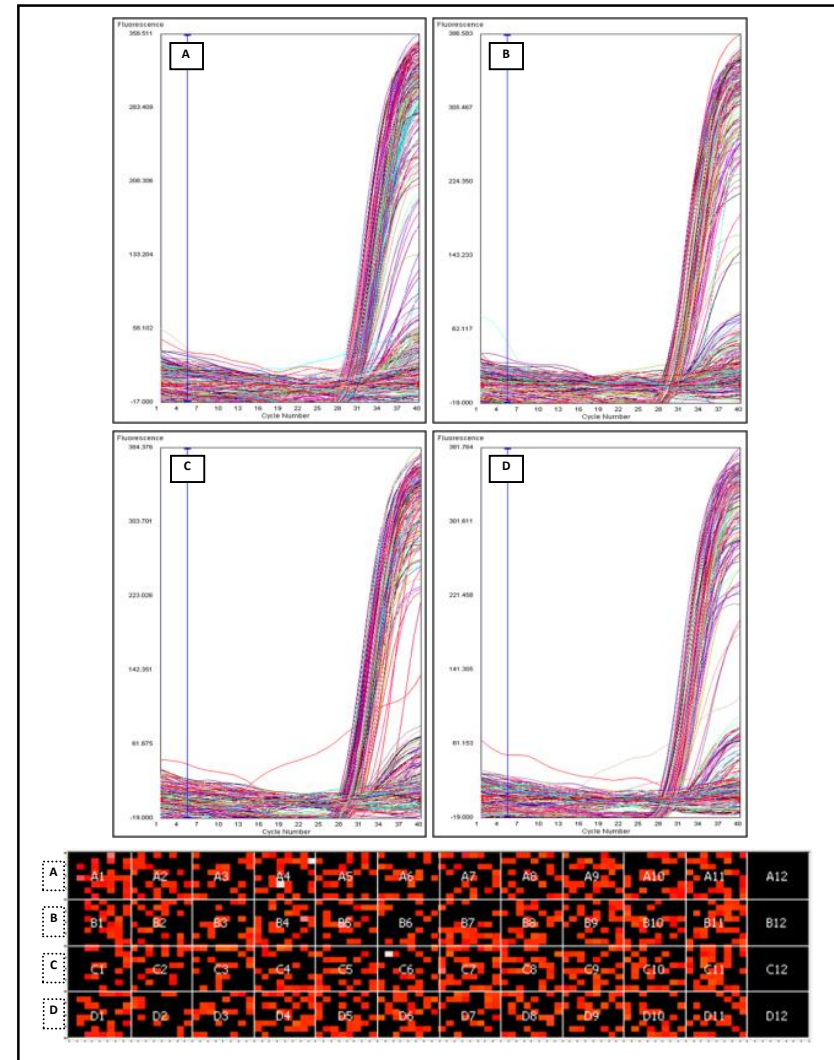


Figura 6.8. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en la mezcla de algodón GM al 0.1 % DNA/DNA por dPCR.

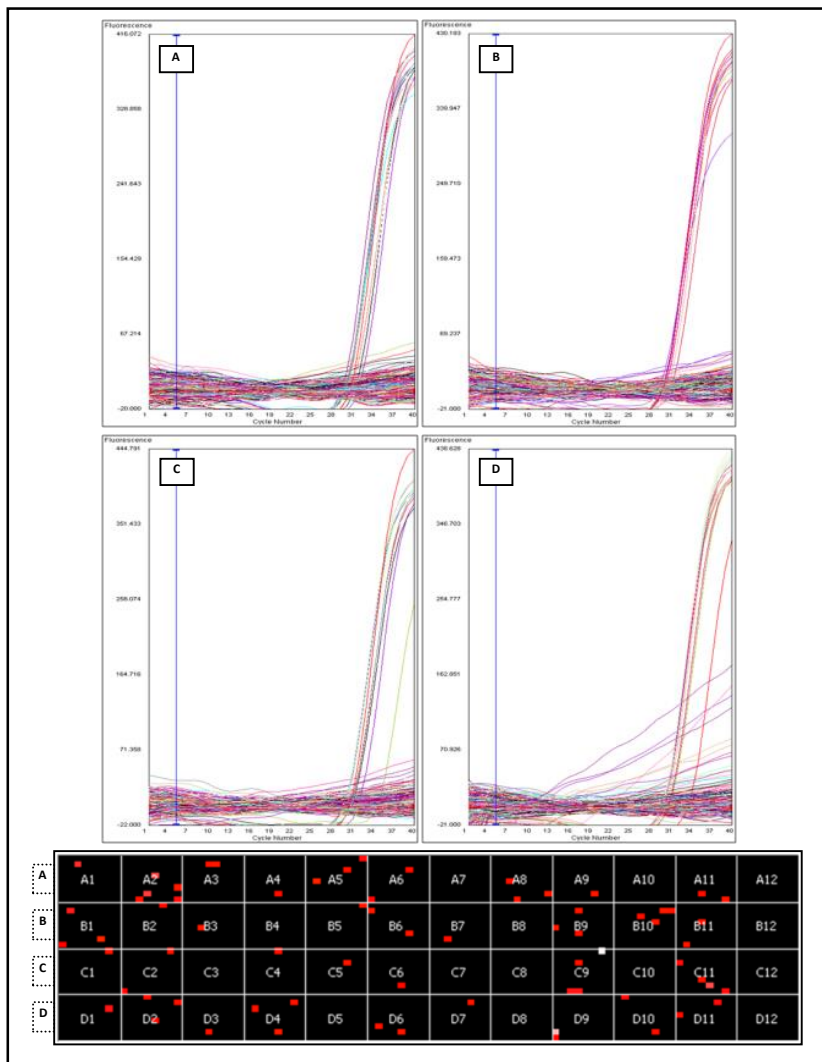


Figura 6.9. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON8913-8* en la mezcla de algodón GM al 0.01 % DNA/DNA por dPCR.

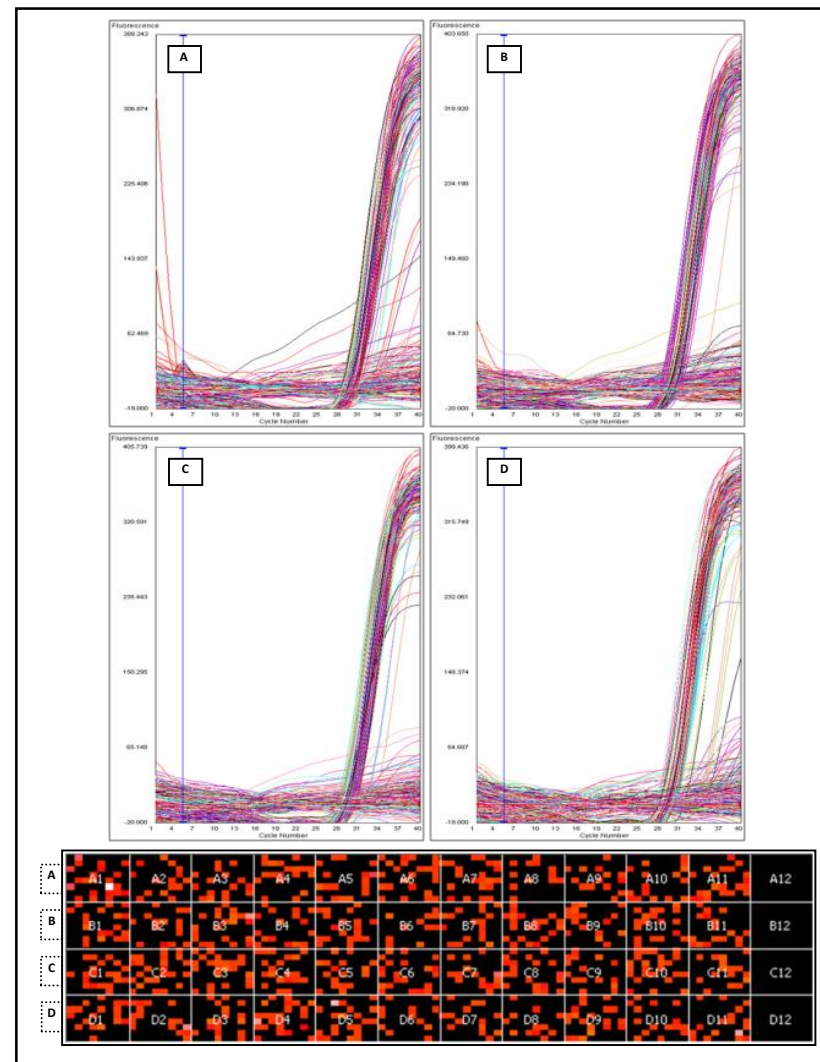


Figura 6.10. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en la mezcla de algodón GM al 0.01 % DNA/DNA por dPCR.

Los resultados de la cuantificación de las mezclas 0.1 % y 0.01 % DNA/DNA, mostrados en la Tabla 6.5, dan evidencia de que es posible obtener mezclas más homogéneas al ser elaboradas en % DNA/DNA, respecto a la obtenidas a partir de harinas en fracción masa.

**Tabla 6.5. Concentración obtenida para las mezclas porcentaje DNA/DNA por dPCR.**

Mezcla	Conc. determinada (%copia/copia) $\pm U_{\text{expandida}}$	RSDr
0.1 %	0.12 $\pm$ 0.01	0.005
0.010 %	0.015 $\pm$ 18.040	9.020

Con base en el resultado de la cuantificación de la mezcla al 0.01 %, se buscó determinar la capacidad de esta plataforma para cuantificar secuencias de DNA por debajo del rango de número de copias especificado por el fabricante. Con base en los resultados obtenidos, se estableció que esta plataforma cuenta con la capacidad de llevar a cabo cuantificaciones a partir de una cantidad de DNA menor a la recomendada por el fabricante, generando así la evidencia necesaria para establecer el límite de cuantificación del equipo.

De los resultados presentados en la Tabla 6.5 destaca que, aun cuando en el caso de la secuencia endógena no se obtuvieron datos del número de copias cercanos a los esperados, los valores de cuantificación en porcentaje obtenidos fueron satisfactorios. Además, se puede observar que los valores de desviación estándar relativa a la repetibilidad fueron menores al valor aceptado ( $RSDr \leq 25 \%$ ).

### 6.3 Cuantificación de mezclas de algodón GM

Como parte de este estudio se cuantificaron mezclas de harina de algodón GM en porcentajes de 10, 1 y 0.1 %, las cuales fueron elaboradas y cuantificadas en un estudio previo en el CNRDOGGM (López, 2012). La naturaleza de estas mezclas se describe de manera detallada en el punto 5.2.2 de la metodología, para comparar los resultados obtenidos por qPCR con los emitidos por dPCR empleando la plataforma Open Array®.

En el caso de MRC se asume que la relación de sus secuencias es 1:1, por lo que el número de copias esperadas será el mismo para ambas secuencias (*acp-1* y *MON88913-8*). Sin embargo, al trabajar con mezclas en las que el EE se encuentra en menor número de copias respecto a la secuencia de referencia es necesario llevar a cabo las siguientes relaciones para la obtención del número de copias esperadas por reacción (por cada partición del subarreglo,  $V = 33$  nL):

*Ejemplo para la estimación de la concentración de trabajo del EE en una mezcla al 10 %:*

*288.21 copias de EE* → 100 % "Control positivo" 100 ng de DNA

*x* → 10 % Mezcla al 10 %

*x = 28.82 copias de EE en Mezcla al 10 %*

*28.82 copias de EE* → 100 % "Control positivo" Dilución 10 ng de ADN

*x* → 10 % Mezcla al 10 %

*x = 2.88 copias de EE en Mezcla al 10 %*

***2.88 copias de EE*** → 100 % "Control positivo" Dilución 1 ng de ADN

***x*** → 10 % Mezcla al 10 %

***x = 0.29 copias de EE en Mezcla al 10 %***

*0.29 copias de EE* → 100 % "Control positivo" Dilución 0.1 ng de ADN

*x* → 10 % Mezcla al 10 %

*x = 0.029 copias de EE en Mezcla al 10 %*

Con base en el ejemplo presentado, se observa que la concentración de trabajo para la cuantificación del evento específico en una mezcla de algodón al 10 % será aquella con una concentración de 1 ng/ $\mu$ L. En la Tabla 6.6 se indican las diluciones óptimas obtenidas para cada una de las mezclas de acuerdo al ejemplo anterior.



**Tabla 6.6. Estimación de la concentración de trabajo para el evento específico MON88913-8 de acuerdo al número de copias esperadas.**

Mezcla (%)	Número de copias esperadas en 33 nL para las diluciones óptimas a partir de un "Control positivo" (100 %)			
	100 ng/μL	10 ng/μL	1 ng/μL	0.1 ng/μL
100	288.21	28.82	2.88	<b>0.29</b>
10	28.82	2.88	<b>0.29</b>	0.029
1	2.88	<b>0.29</b>	0.029	0.0029
0.1	<b>0.29</b>	0.029	0.0029	0.0029

Las diluciones óptimas se fijaron de acuerdo al rango óptimo de número de copias por reacción a cuantificar que el fabricante de la plataforma de dPCR establece, el cual es de 0.6 a 1.6 de la secuencia blanco, sin embargo, la plataforma permite cargar una cantidad menor a la mínima, más no una mayor a la superior, por lo que el número de copias obtenido queda definido en 0.29 copias para cada una de las mezclas, tanto para el gen endógeno como para el evento específico.

Para llevar a cabo una comparación de los resultados generados a partir de la cuantificación de las mezclas de harina de algodón GM por las dos técnicas, se consideró el promedio de la concentración obtenida, la incertidumbre expandida de los ensayos, así como la desviación estándar y la desviación estándar relativa a la repetibilidad.

Los resultados obtenidos de la cuantificación por qPCR, a partir del uso de dos plataformas distintas (LightCycler® 480 de Roche® y ViiA®7 de Life Technologies®) para éstas mezclas (López, 2012), se muestran a continuación en la Tabla 6.7

**Tabla 6.7. Concentraciones obtenidas en porcentaje copia/copia para mezclas de harina de algodón GM a partir de su cuantificación por qPCR (López, 2012).**

Equipo	LC-480			ViiA-7		
<b>Conc. Esperada</b>	10 %	1 %	0.10 %	10 %	1 %	0.10 %
<b>Conc. Determinada</b>	<b>10.48</b>	<b>0.92</b>	<b>0.11</b>	<b>9.30</b>	<b>0.71</b>	<b>0.08</b>
<b>U<sub>expandida</sub></b>	0.21	0.09	0.01	0.60	0.11	0.01
<b>SD</b>	0.41	0.12	0.02	0.73	0.13	0.02
<b>RSDr</b>	0.87	3.00	4.42	1.75	3.95	4.49



De la cuantificación por dPCR con la plataforma Open Array® se obtuvieron los valores de número de copias mostrados en la Tabla 6.8, en la cual se observa que para las tres concentraciones evaluadas se obtuvieron valores en número de copias cercanos a los esperados tanto para la secuencia endógena como para la GM.

**Tabla 6.8. Número de copias promedio por reacción en la cuantificación de mezclas de harina de algodón GM por dPCR.**

Mezcla	Secuencia	Conc. de DNA por subarreglo (ng)	# copias esperadas	# copias obtenidas	IC inferior	IC superior
10 %	<i>MON88913-8</i>	1	0.29	0.29	0.18	0.47
	<i>acp-1</i>	0.1		0.29	0.18	0.48
1 %	<i>MON88913-8</i>	10		0.29	0.18	0.48
	<i>acp-1</i>	0.1		0.25	0.15	0.42
0.1 %	<i>MON88913-8</i>	100		0.38	0.25	0.59
	<i>acp-1</i>	0.1		0.28	0.16	0.44

En las Figuras 6.11 a 6.16 se muestran los mapas y curvas de amplificación obtenidos de los ensayos de cuantificación de las secuencias endógena y del EE *MON88913-8* de las mezclas de harina de algodón GM al 10 % (Figura 6.11 y 6.12), 1 % (Figura 6.13 y 6.14) y 0.1 % (Figura 6.15 y 6.16), en la cual el número de amplificaciones positivas de la secuencia del EE respecto a la endógena mostró un comportamiento esperado debido a que se obtuvo un mayor número de amplificaciones positivas para la secuencia endógena en comparación con la secuencias GM. Sin embargo, para las mezclas 1 % y 0.1 % la diferencia entre el número de amplificaciones positivas obtenidas para ambas secuencias cuantificadas no varió, y en algunos ensayos se observó un aumento evidente del número de pozos positivos para la secuencia del EE, lo cual no corresponde con lo esperado al considerar que esta secuencia debe encontrarse en una relación menor respecto a la endógena. Sin embargo, aunque como se observará en la Tabla 6.7, este comportamiento no interfirió con los resultados de la cuantificación de estas mezclas.

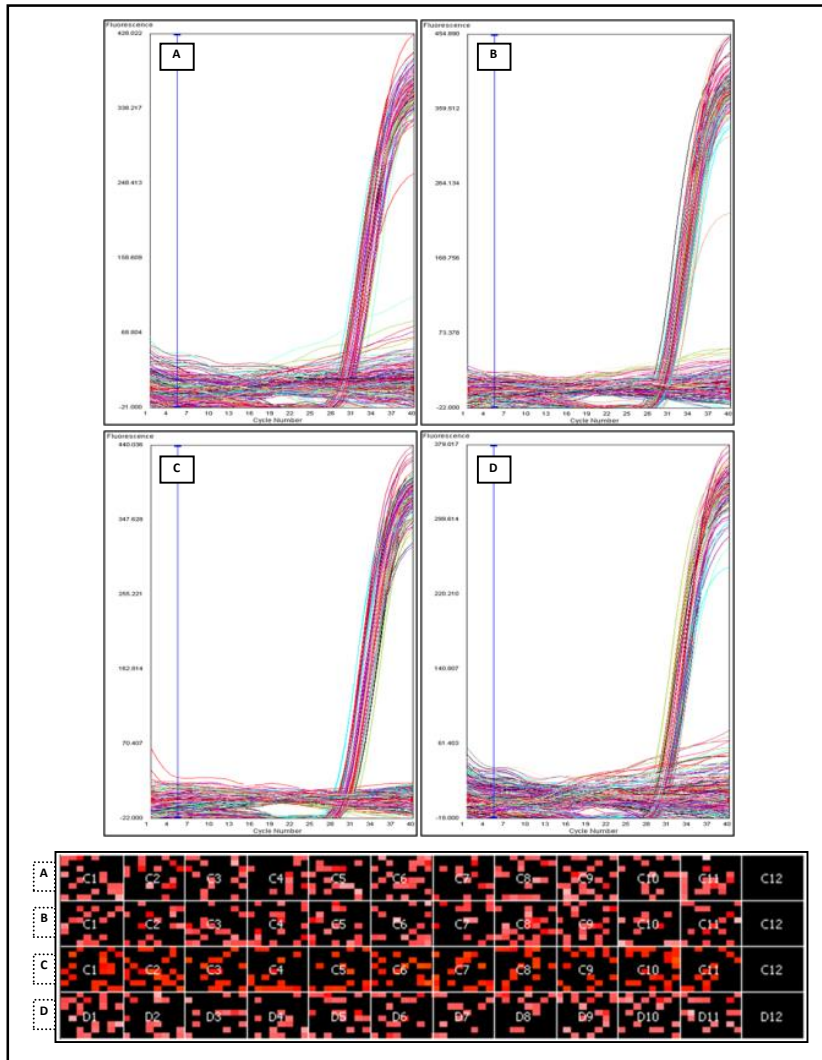


Figura 6.11. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON8913-8* en la mezcla de harina de algodón GM al 10 % por dPCR.

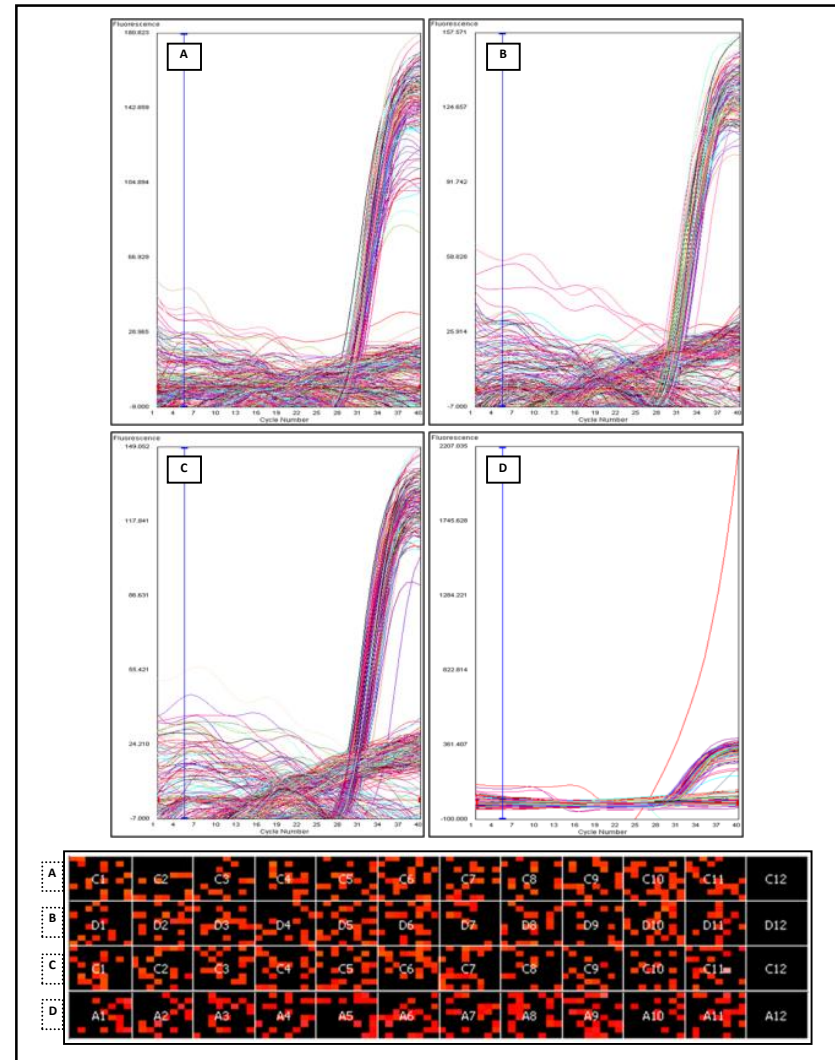


Figura 6.12. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en la mezcla de harina de algodón GM al 10 % por dPCR.

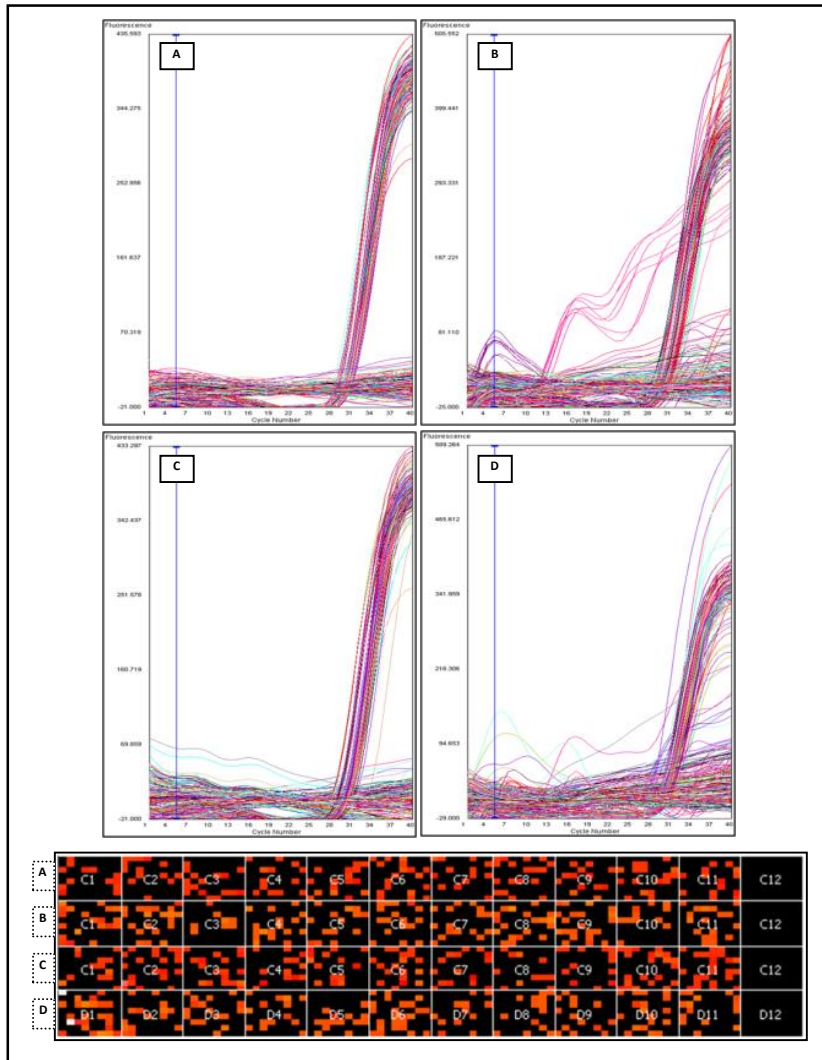


Figura 6.13. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON8913-8* en la mezcla de harina de algodón GM al 1 % por dPCR.

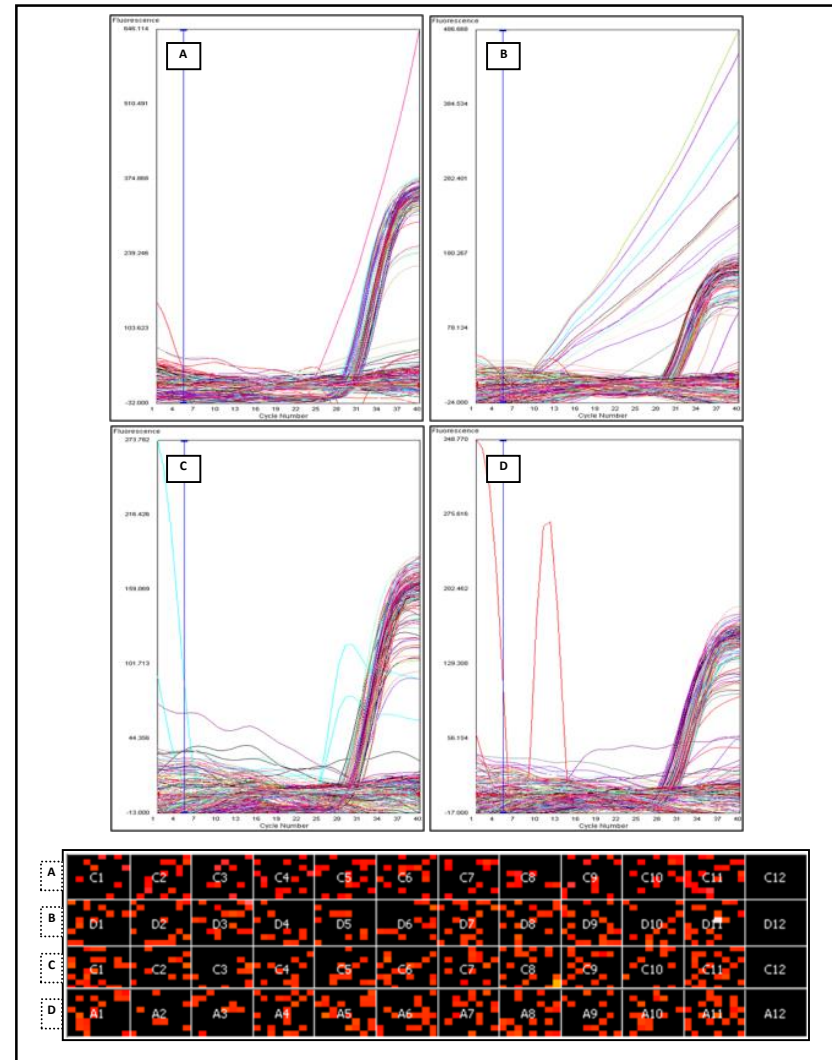


Figura 6.14. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en la mezcla de harina de algodón GM al 1 % por dPCR.

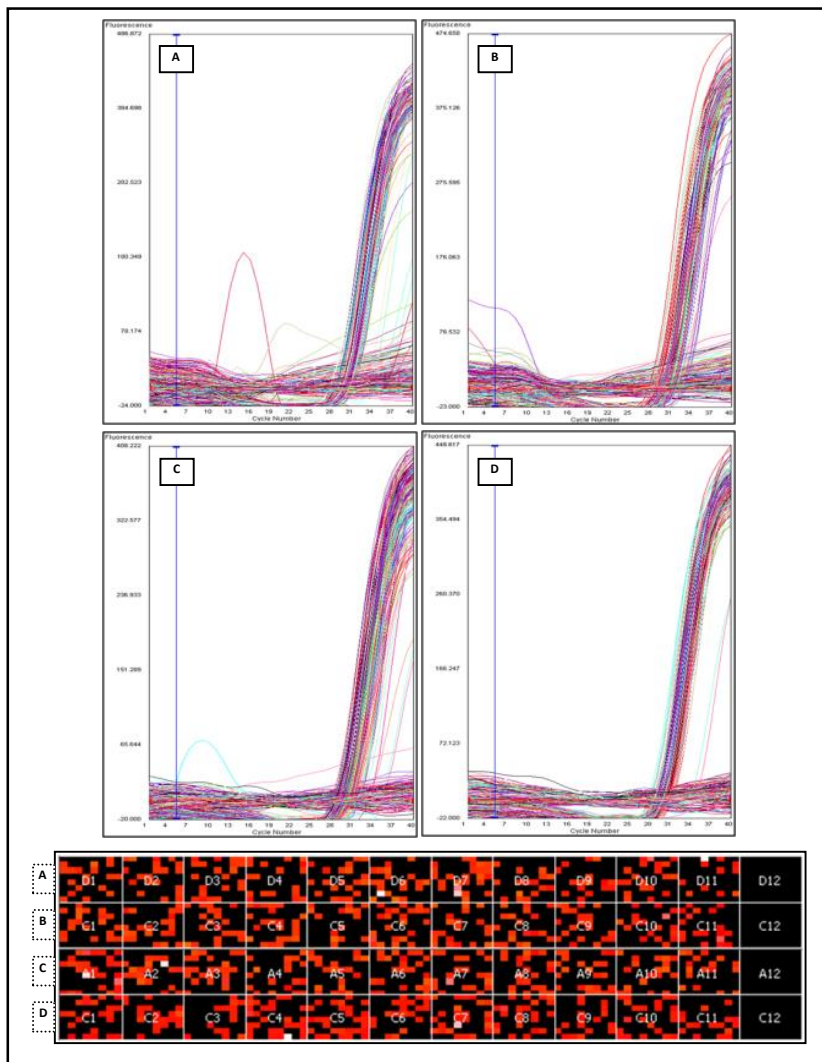


Figura 6.15. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON88913-8* en la mezcla de harina de algodón GM al 0.1 % por dPCR.

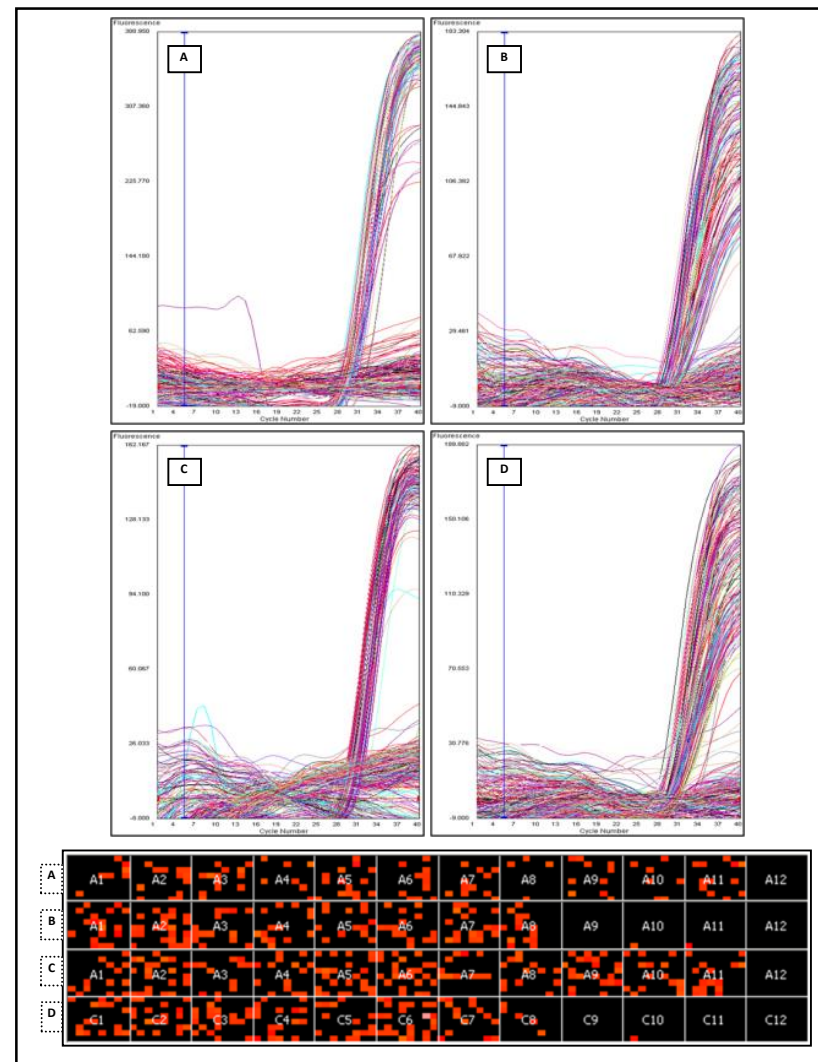


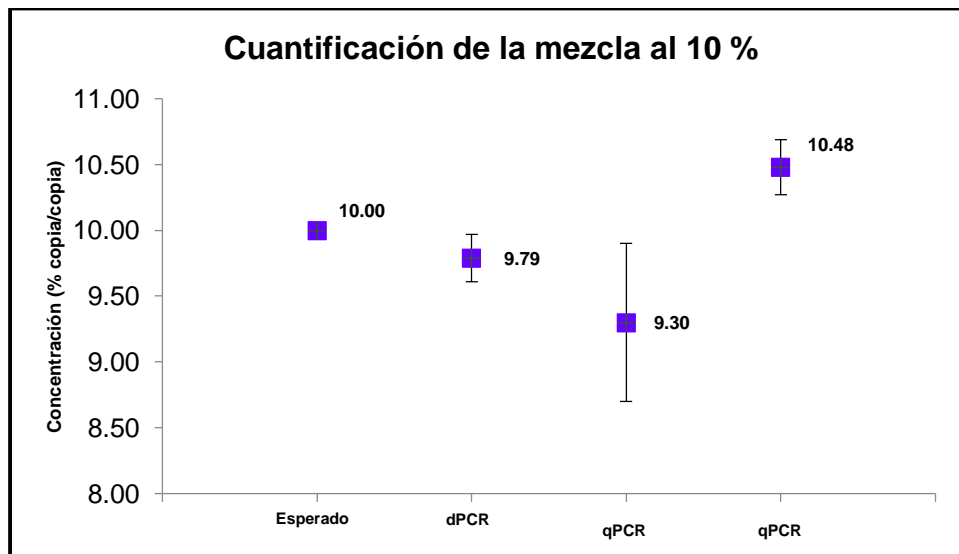
Figura 6.16. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en la mezcla de harina de algodón GM al 0.1 % por dPCR.

Una vez obtenidos los resultados en número de copias para cada ensayo se procedió a realizar el cálculo en porcentaje de material GM en las mezclas. Los resultados producto de la cuantificación con dPCR para cada una de las mezclas de harina de algodón cuantificadas, se plasman en la Tabla 6.9.

**Tabla 6.9. Concentración en porcentaje de las copias en las mezclas de harina de algodón GM.**

Mezcla = Valor esperado (% copia/copia)	Conc. Determinada (% copia/copia) $\pm U_{\text{expandida}}$	SD	RSDr
10	9.79 $\pm$ 0.18	0.18	0.93
1	1.20 $\pm$ 0.06	0.06	2.72
0.1	0.14 $\pm$ 0.01	0.01	4.71

En la Figura 6.17, se puede ver el valor obtenido con la cuantificación por dPCR de la mezcla al 10 % y con la técnica de qPCR, se observa que el valor obtenido con la técnica de dPCR es más cercano al esperado, mientras que con la técnica de qPCR se presentaron subestimaciones y sobreestimaciones con las dos plataformas usadas.



**Figura 6.17. Comparación del valor esperado para la mezcla de harina de algodón GM al 10 % y el valor determinado a partir de su cuantificación por qPCR y dPCR.**



En lo que respecta a los parámetros de incertidumbre relativa, desviación estándar y desviación estándar relativa a la repetibilidad se obtuvieron valores más precisos en comparación con los obtenidos por qPCR. Al observar los valores obtenidos en las Tablas 6.7 y 6.9 por ambas plataformas de qPCR y dPCR, y en lo que respecta a incertidumbre relativa con la plataforma LC-480 y la de dPCR se obtuvieron valores cercanos, tanto en la desviación estándar como en la desviación estándar relativa a la repetibilidad, determinándose valores menores por dPCR que por cualquiera de las plataformas de qPCR. Finalmente, en lo que respecta a desviación estándar relativa a la repetibilidad, todas las plataformas de las dos diferentes técnicas entran en el rango aceptado, mismo que no debe ser mayor a un 25 %. Con relación a los resultados de cuantificación de la mezcla GM al 1 %, comparados en la Figura 6.18, por dPCR se obtuvo un valor cercano al esperado, pero se mostró una aparente sobrestimación respecto al obtenido con la plataforma LC-480 de qPCR. Sin embargo, tanto en la incertidumbre expandida como en la desviación estándar con dPCR se presentaron valores menores respecto a cualquiera de las dos plataformas de qPCR que se emplearon. E incluso aun cuando la diferencia entre la desviación estándar relativa a la repetibilidad de ambas plataformas de qPCR en comparación con la plataforma Open Array® fue baja, igualmente se obtuvo un mejor resultado para dPCR.

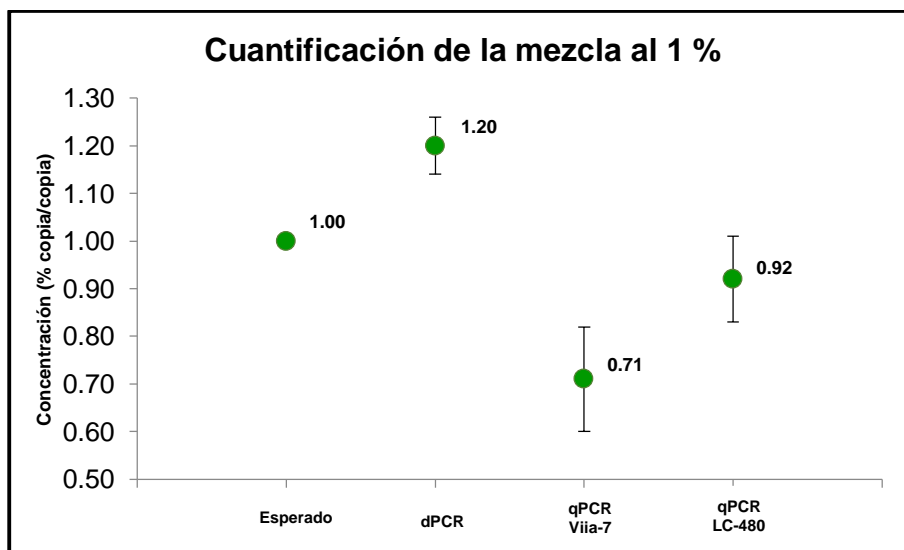
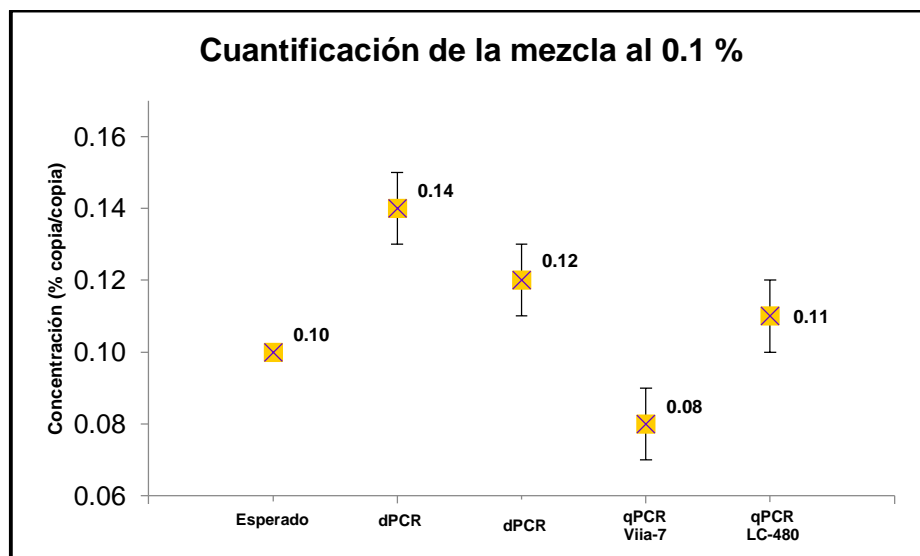


Figura 6.18. Comparación del valor esperado para la mezcla de harina de algodón GM al 1 % y el valor determinado a partir de su cuantificación por qPCR y dPCR.

Para la mezcla de harina de algodón GM al 0.1 %, los valores obtenidos y representados en la Figura 6.19, muestran un valor más cercano por parte del ensayo en qPCR respecto al obtenido de la cuantificación por dPCR, con base en el valor esperado. La plataforma LC-480 es quien se acerca más al valor, sin embargo, los valores de incertidumbre expandida y desviación estándar para las plataformas de qPCR resultaron mayores a los obtenidos partir de la cuantificación por dPCR, mientras que el valor de desviación estándar relativa a la repetibilidad obtenido por qPCR y dPCR fue comparable.



**Figura 6.19. Comparación del valor esperado para la mezcla de harina de algodón GM al 1 % y el valor determinado a partir de su cuantificación por qPCR y dPCR.**

Los resultados obtenidos por dPCR para la mezcla de algodón GM al 0.1 % DNA/DNA, mostrados en la Tabla 6.5 del apartado 6.2, muestran que el valor de cuantificación determinado es comparable con el determinado para la mezcla del mismo porcentaje elaborada con harinas en fracción masa. Sin embargo, la diferencia en el número de amplificaciones esperadas tanto en los mapas como en las curvas de amplificación para la secuencia del EE respecto a la endógena resultó más cercano a lo esperado para el caso de la mezcla en % DNA/DNA respecto a la obtenida en fracción masa.

Cabe señalar que los resultados obtenidos por qPCR se obtuvieron a partir de la curva de calibración construida con el material que se utilizó para generar las mezclas GM, por lo cual el valor resultante es directamente proporcional al valor del contenido GM que posee la muestra y en el caso de la cuantificación con dPCR es el valor absoluto y de mayor nivel metrológico, por lo cual no se puede concluir hasta realizar estudios paralelos, si la concentración determinada es la final. Para ello es necesario analizar las muestras en un estudio de tipo interlaboratorio para generar datos que muestren el contenido real de las mezclas. Hasta el momento se puede concluir que los valores obtenidos presentan valores con menor variabilidad como lo muestran los resultados de dPCR en las tres mezclas.

#### 6.4 Cuantificación de plásmidos

Una vez que se evaluaron las mediciones en la plataforma Open Array® con los MRC, y se comprobó que los resultados obtenidos eran comparables con los reportados por una entidad de metrología, se buscó realizar la cuantificación de plásmidos de tipo circular (no linearizado) y linearizado. Se trata de DNA plasmídico producido a partir de un convenio entre el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y la UNAM, a través del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, que serviría como MR por contener las secuencias *MON88913-8* y *acp-1* en su construcción, a fin de obtener su concentración nominal en número de copias de manera directa para posteriormente ser utilizados en los ensayos de qPCR.

Para lograr la cuantificación de éstos plásmidos por la técnica de dPCR fue necesario estimar su concentración en copias/ $\mu\text{L}$  a partir de la concentración de  $\text{ng}/\mu\text{L}$  reportada en el informe entregado por el Departamento de Bioquímica con el objeto de obtener las diluciones en número de copias de DNA para su posterior cuantificación. La fórmula empleada para realizar la estimación del número de copias por microlitro fue la siguiente:

- Ecuación 10

$$\text{número de copias de ADN [copias}/\mu\text{L}] = \frac{(\text{Concentración masa de ADN [g}/\mu\text{L}]) (N_A [\text{pb}/\text{mol}])}{(M [\text{g}/\text{mol}]) (\text{Tamaño del plásmido [pb}/\text{copias})}$$



donde,

$$\text{Concentración masa [g/}\mu\text{L]} = (\text{Concentración del plásmido en [ng/}\mu\text{L]}) \left( \frac{10^{-9} \text{ g}}{1 \text{ ng}} \right)$$

**Tamaño del plásmido [pb/copias]**

$$= (\text{Tamaño del vector [pb/copias]}) + (\text{Tamaño del inserto [pb/copias]})$$

$$= (3015 \text{ pb/copias}) + (176 \text{ pb/copias}) = 3191 \text{ [pb/copias]}$$

$$N_A = \text{Número de Avogadro} = 6.022 \times 10^{23} \text{ pb/mol}$$

$$M = 660 \text{ g/mol}$$

de éste modo las concentraciones en número de copias por microlitro esperadas son:

$$\text{Plásmido circular} = 3.54 \times 10^{11} \text{ copias/}\mu\text{L}$$

$$\text{Plásmido linearizado} = 6.49 \times 10^{10} \text{ copias/}\mu\text{L}$$

El plan de trabajo para la cuantificación de los plásmidos, se estableció tomando como referencia un estudio previo realizado para CNRDOGM (Gutiérrez, 2012), en el cual se cuantificó un plásmido con la misma plataforma. Se evaluaron diferentes concentraciones de trabajo para determinar con cuál de ellas se obtenían resultados repetibles; se seleccionó con base en el número de copias por reacción y que entraran dentro del rango especificado por el fabricante que es de 0.6 a 1.6 copias. En el estudio previo se dedujo que las concentraciones de trabajo de 100 (correspondiente a 0.66 copias por reacción) y 400 (correspondiente a 2.64 copias por reacción) copias habían proporcionado resultados apegados a lo esperado en comparación con la de 200 (correspondiente a 1.32 copias por reacción) copias. Con base en lo anterior, se decidió trabajar con concentraciones de trabajo de 100 y 200 copias, para que el número de copias por reacción se encontrara dentro del rango especificado.

Considerando que el material plasmídico recibido, tanto para el plásmido circular como para el linearizado, fue obtenido en concentraciones muy elevadas para lograr las concentraciones nominales deseadas, fue necesario diluir ambos materiales tal como se muestra en los protocolos de dilución plasmados en el apartado 5.2.8 de la metodología.

Los plásmidos, circular y linearizado, fueron cuantificados para evaluar la respuesta del equipo, así como valorar si existen diferencias cada uno de estos plásmidos.

**6.4.1 Determinación del número de copias del plásmido circular con el EE *MON88913-8* y la secuencia endógena *acp-1***

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de las secuencias *MON88913-8* y *acp-1* presentes en éste plásmido se muestran en la Tabla 6.10, donde se observa que el número de copias estimadas para ésta cuantificación, tanto para la concentración de trabajo de 100 copias por reacción como para la de 200 copias por reacción, no es comparable con el estimado.

**Tabla 6.10. Número de copias promedio por reacción para la cuantificación de plásmido circular por dPCR para las secuencias *MON88913-8* y *acp-1* en concentraciones de trabajo de 100 y 200 copias.**

Plásmido	Secuencia	Conc. de trabajo (# de copias)	# copias estimadas	# copias obtenidas	IC inferior	IC superior
Circular	<i>MON88913-8</i>	100	0.66	0.08	0.03	0.19
	<i>acp-1</i>			0.07	0.03	0.18
	<i>MON88913-8</i>	200	1.32	0.13	0.06	0.26
	<i>acp-1</i>			0.11	0.05	0.24

En las Figuras 6.20, 6.21, 6.22 y 6.23 se evidencia la escasa distribución de las amplificaciones obtenidas para la cuantificación de ambas secuencias, *MON88913-8* y *acp-1*, tanto en los mapas de amplificación, como en los gráficos de las curvas de amplificación, correspondientes a cada uno de los ensayos realizados para la cuantificación de este plásmido para las dos concentraciones de trabajo de 100 y 200 copias.

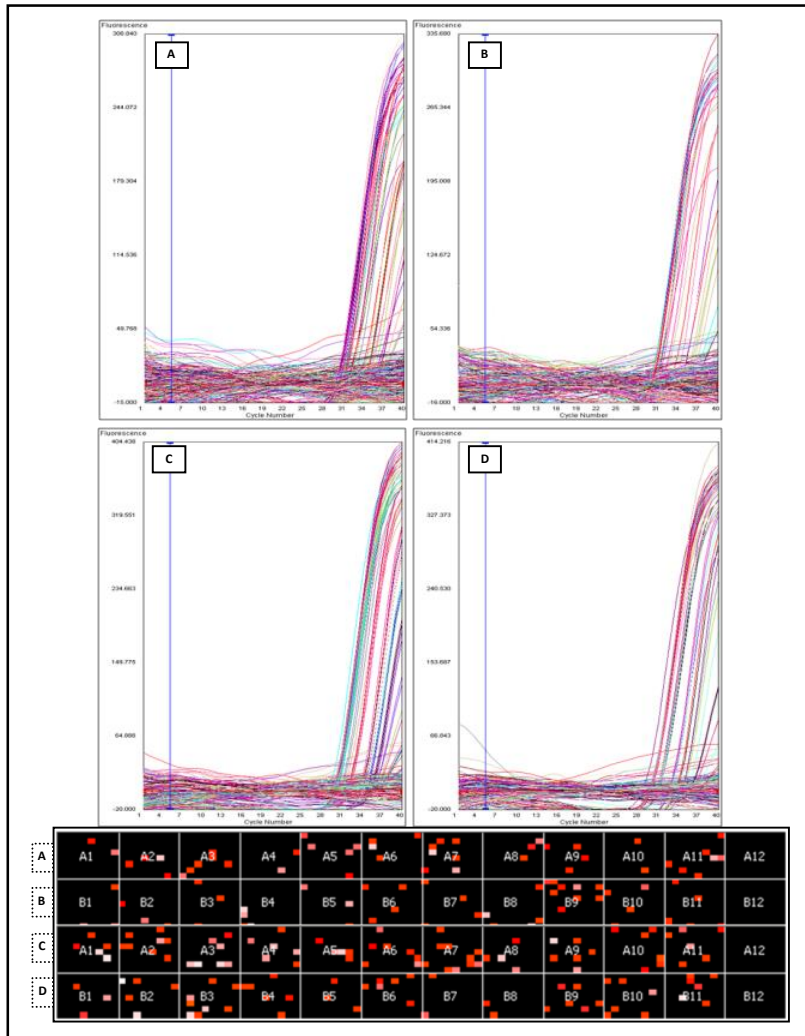


Figura 6.20. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON88913-8* en el plásmido circular a una concentración nominal de 100 copias por dPCR.

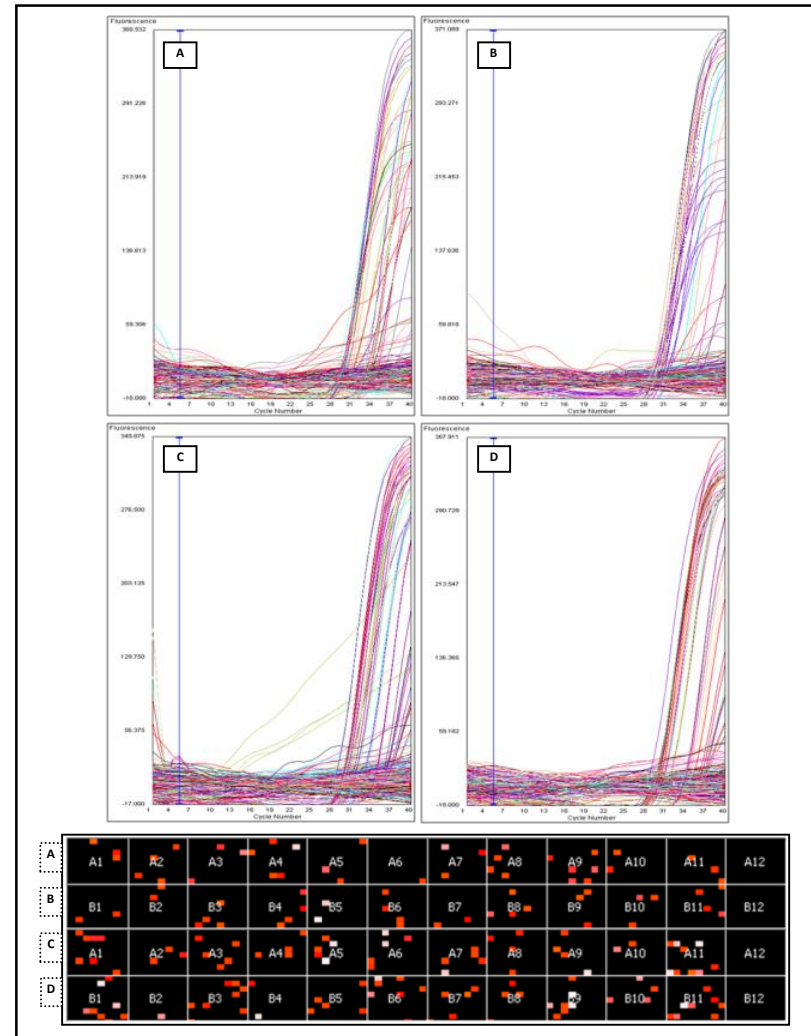


Figura 6.21. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en el plásmido circular a una concentración nominal de 100 copias por dPCR.

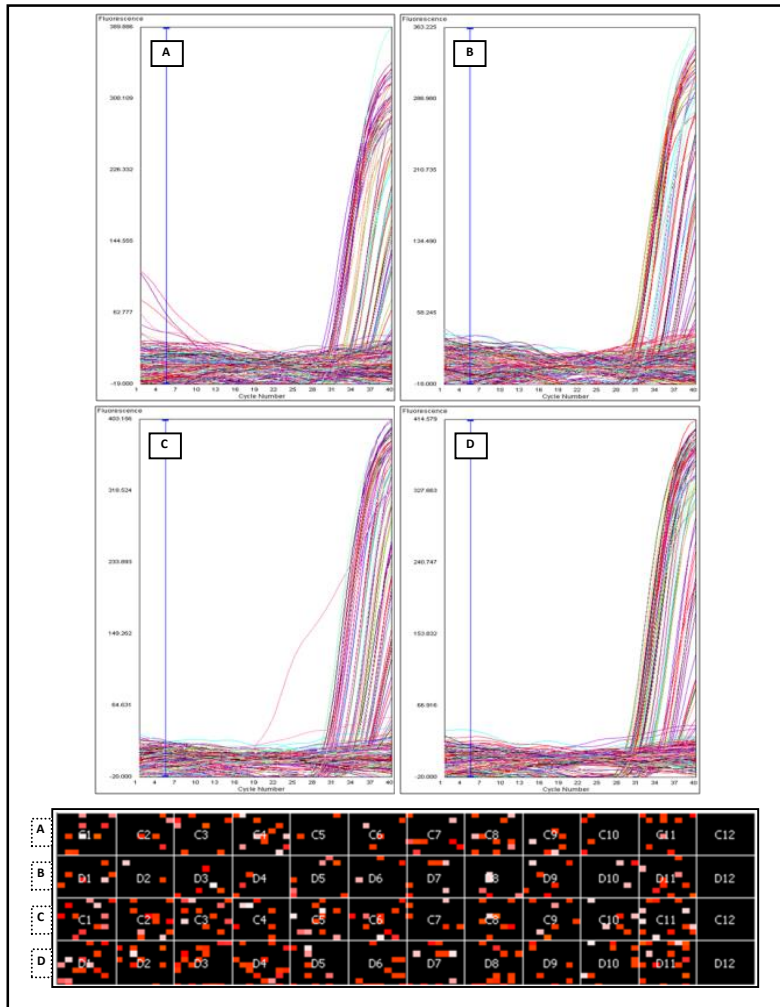


Figura 6.22. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON88913-8* en el plásmido circular a una concentración nominal de 200 copias por dPCR.

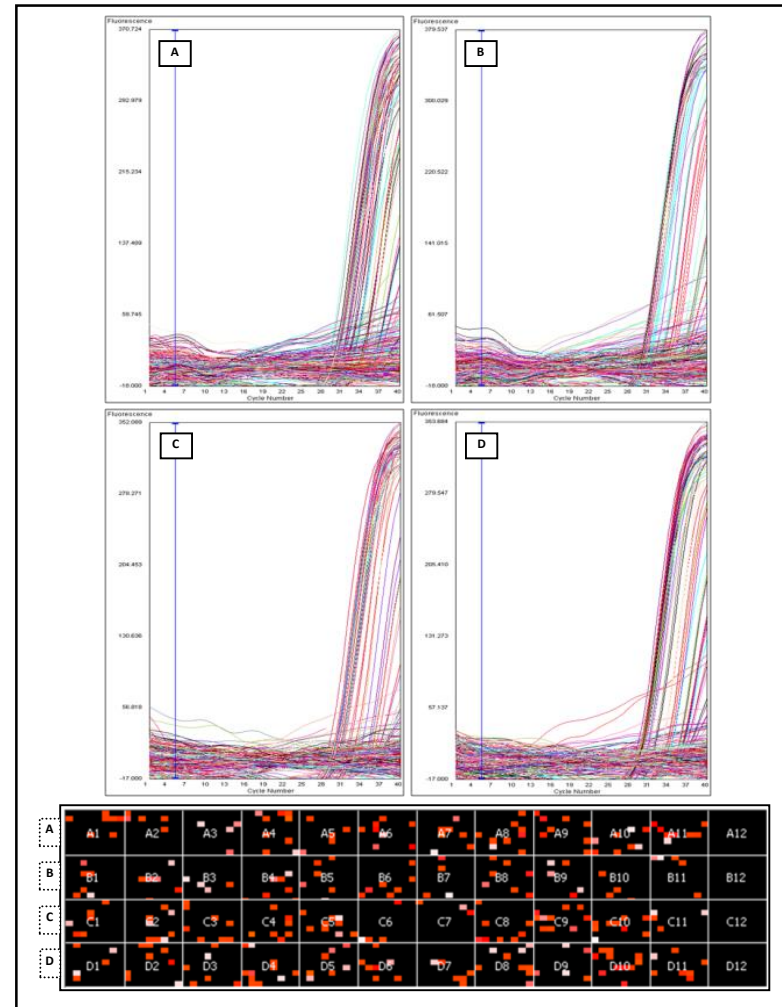


Figura 6.23. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en el plásmido circular a una concentración nominal de 200 copias por dPCR.

Lo anterior, permitió determinar que la cuantificación de éste plásmido en su forma circular no proporciona resultados confiables. Esto concuerda con lo obtenido en un estudio realizado con material plasmídico en una publicación anterior (Burns, 2010), donde se sugiere que al trabajar con éste material por dPCR se aumenta la eficiencia de la amplificación tras realizar una digestión (linealización) del plásmido, y a pesar de que se emplearon plataformas de dPCR distintas, nos permite establecer que al trabajar cuantificaciones en dPCR es necesaria una digestión previa del plásmido para obtener resultados confiables y precisos.

#### 6.4.2 Determinación del número de copias del plásmido linerizado con el EE *MON88913-8* y la secuencia endógena *acp-1*

Se realizó la cuantificación del plásmido linearizado por dPCR, con la plataforma Open Array®, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.11, en donde se puede observar que el número de copias determinadas por reacción resultó ser muy cercano al número de copias estimadas, en las dos concentraciones de trabajo evaluadas, de 100 y 200 copias, tanto para la secuencia del EE *MON88913-8* como para la endógena *acp-1*. El número de copias obtenidas para ambas secuencias cuantificadas con la concentración de trabajo de 100 copias permitió obtener valores similares entre sí, en comparación con los obtenidos con la concentración de trabajo de 200 copias, donde los valores para las mismas secuencias mostraron mayor dispersión.

Tabla 6.11. Determinación del número de copias del plásmido linearizado por dPCR.

Plásmido	Secuencia	Conc. de Trabajo (# de copias)	# copias estimadas	# copias obtenidas	IC inferior	IC superior
Linearizado	<i>MON88913-8</i>	100	0.66	0.48	0.32	0.71
	<i>acp-1</i>			0.47	0.31	0.71
	<i>MON88913-8</i>	200	1.32	1.00	0.72	1.41
	<i>acp-1</i>			1.17	0.84	1.64

Los mapas y curvas de amplificación obtenidos para cada uno de los ensayos llevados a cabo para la cuantificación de la secuencias *MON88913-8* y *acp-1*, con las dos concentraciones de trabajo evaluadas, se muestran en las Figuras 6.24, 6.25, 6.26 y 6.27, en las cuales se observó una captura de la imagen alterada en

los mapas y curvas de amplificación, específicamente en las Figuras 6.24 B, 6.26 D, 6.27 C y 6.27 D. Sin embargo, aun cuando se presenten fallas en la captura de los mapas y curvas de amplificación, esto no se reflejó en los datos y resultados obtenidos de la cuantificación plasmados en las Tablas 6.10 y 6.11, debido a que fue posible una concentración nominal real del plásmido y con un intervalo de confianza o variabilidad menor.

En la Tabla 6.12, se plasman los resultados que se consiguieron para cada una de las secuencias cuantificadas con las dos diferentes concentraciones nominales evaluadas.

**Tabla 6.12. Concentraciones determinadas para el plásmido linearizado a partir de su cuantificación por dPCR.**

Secuencia	Conc. de trabajo (# de copias)	Conc. estimada (# copias/ $\mu$ L)	Conc. nominal obtenida (# copias/ $\mu$ L) $\pm U_{\text{expandida}}$
<i>MON88913-8</i>	100	6.49E+10	<b>1.23E+10 <math>\pm</math> 2.51E+08</b>
<i>acp-1</i>			<b>1.22E+10 <math>\pm</math> 9.91E+08</b>
<i>MON88913-8</i>	200		<b>1.19E+10 <math>\pm</math> 1.38E+09</b>
<i>acp-1</i>			<b>1.40E+10 <math>\pm</math> 1.20E+09</b>

Como se observa en la Tabla 6.12 las concentraciones obtenidas a partir de la solución de trabajo estimada de 100 copias para las secuencias *MON88913-8* y *acp-1*, son más cercanas, en comparación con la concentración de trabajo de 200 copias.

Además se observa mayor uniformidad en las concentraciones obtenidas para ambas secuencias con la concentración de trabajo de 100 copias. En la Figura 6.28 se muestra que al comparar las incertidumbres de los valores obtenidos con las dos concentraciones de trabajo evaluadas, los valores de incertidumbre para la cuantificación con una concentración de 100 copias son comparables de manera satisfactoria. En contraste, los valores de incertidumbre derivados de la cuantificación con una concentración de trabajo de 200 copias muestran una mayor diferencia, ya que tienen un mayor valor, lo que indica una menor precisión en la medición.

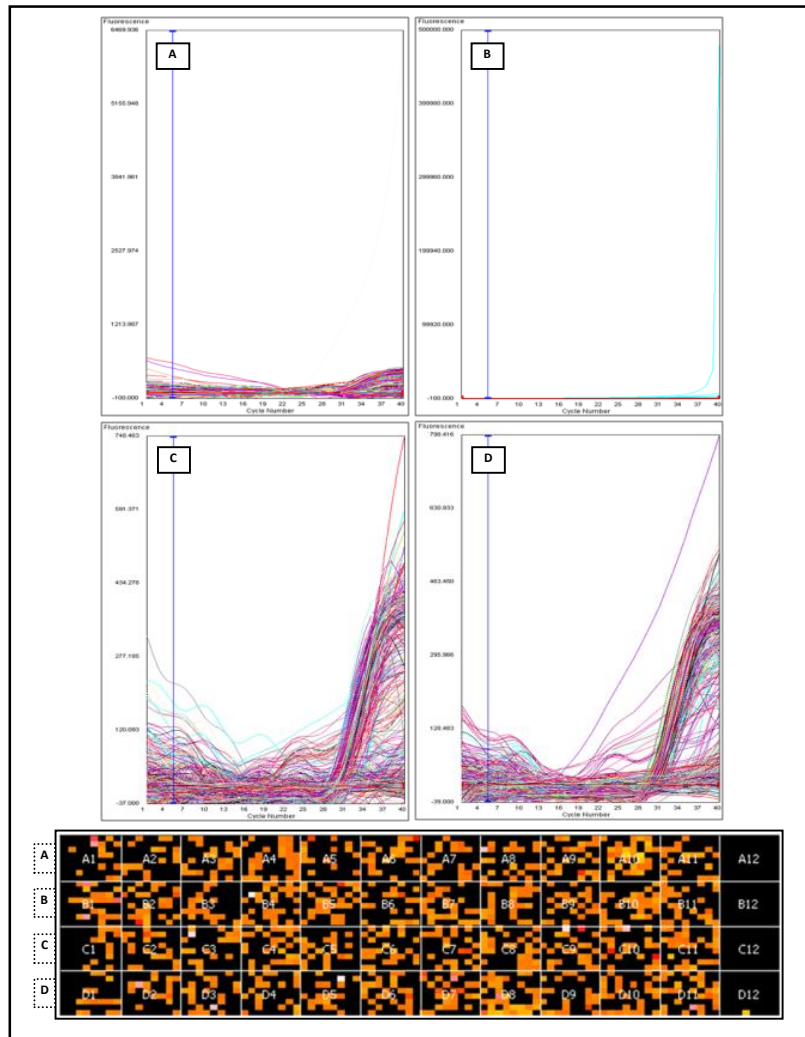


Figura 6.24. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON8913-8* en el plásmido linealizado a una concentración nominal de 100 copias por dPCR.

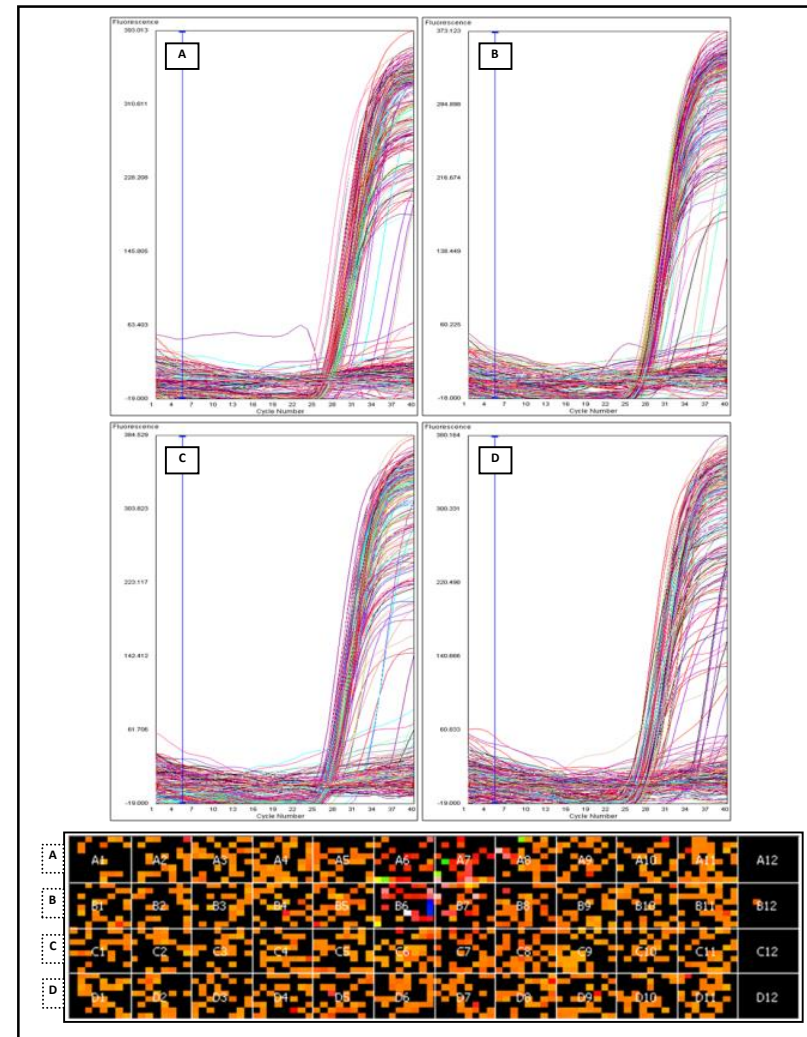


Figura 6.25. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en el plásmido linealizado a una concentración nominal de 100 copias por dPCR.



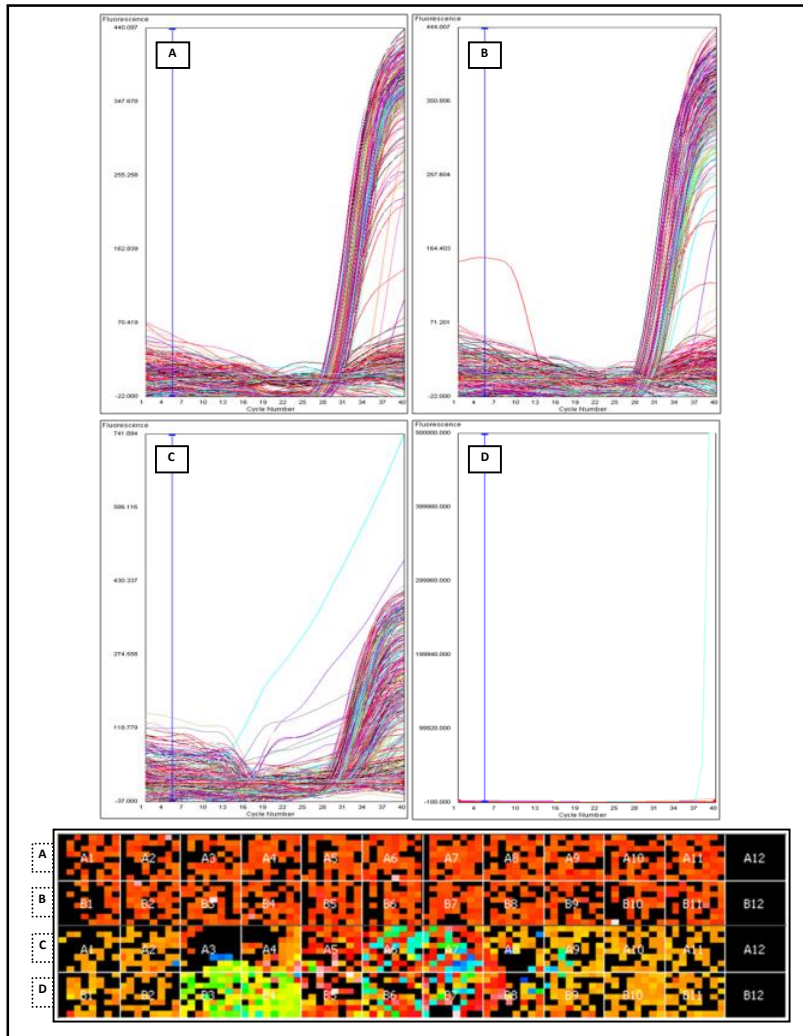


Figura 6.26. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *MON88913-8* en el plásmido linealizado a una concentración nominal de 200 copias por dPCR.

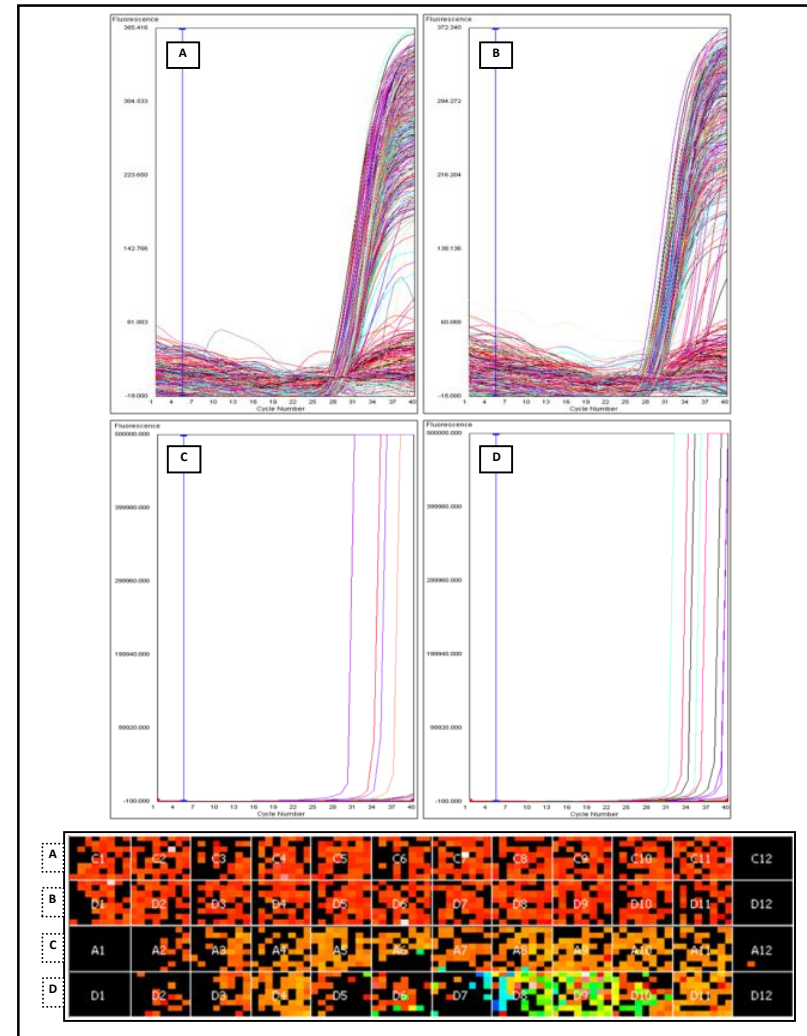
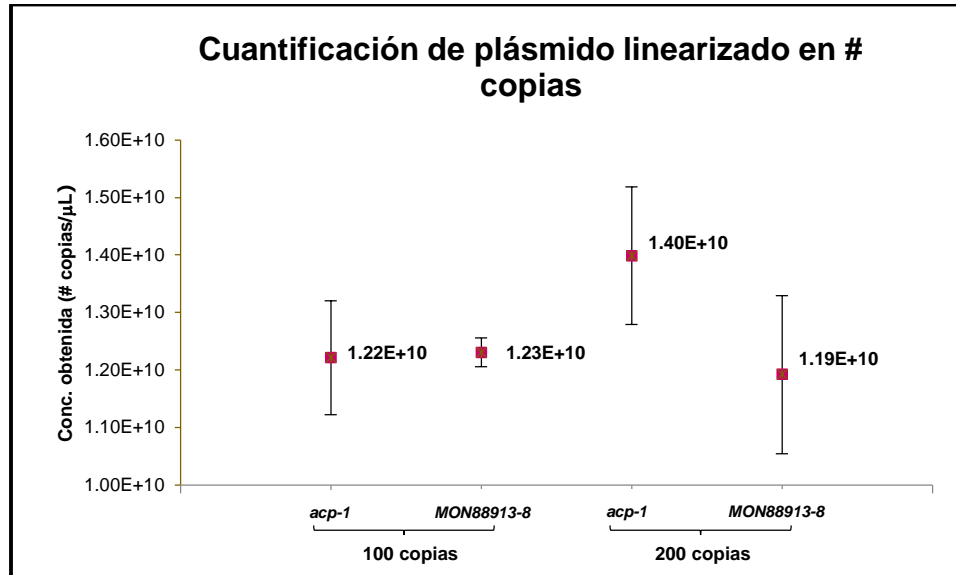


Figura 6.27. Curvas y mapa de amplificación de los cuatro ensayos realizados (A-D) para la cuantificación de la secuencia *acp-1* en el plásmido linealizado a una concentración nominal de 200 copias por dPCR.





**Figura 6.28. Comparativo de concentraciones e incertidumbres asociadas a la cuantificación del plásmido linealizado por dPCR.**

Una vez que se determinó que los resultados derivados de la solución de trabajo de 100 copias del plásmido linealizado resultaron ser más homogéneos y presentaron una menor incertidumbre asociada, es decir, mayor precisión, se buscó obtener un promedio de los valores de concentración nominal alcanzados para ambas secuencias. Sin embargo, un análisis de amplificación para ambas secuencias del plásmido por qPCR para conocer si la relación entre *MON88913-8* y *acp-1* era 1:1 en la construcción del mismo reveló que la relación de ambas secuencias en la construcción del plásmido no mostraba un comportamiento de amplificación 1:1, ya que como se observa en la Figura 6.29, las curvas para ambas secuencias se encuentran en ciclos distintos, aun cuando se adicionó la misma concentración de DNA en ambos ensayos: las curvas para *acp-1* amplificaron en el ciclo 22 y las de *MON88913-8* en el ciclo 24 aproximadamente, lo que indicó que la eficiencia de amplificación entre ellas no es igual para esta construcción, pues tienen una diferencia de dos ciclos de amplificación, aproximadamente. Debido a esto, no fue posible establecer un promedio de los valores obtenidos de la cuantificación de ambas secuencias. Lo anterior se puede deber a la diferencia en la eficiencia de la amplificación debido a que esta se ve influenciada directamente por el diseño de las

sondas y cebadores. En este caso se hace evidente que el diseño para la amplificación de la secuencia endógena y GM produce la diferencia en el Ct. Por lo anterior, se concluyó que la asignación de número de copias debe calcularse en función de la secuencia de referencia, es decir, si es la endógena o la del EE.

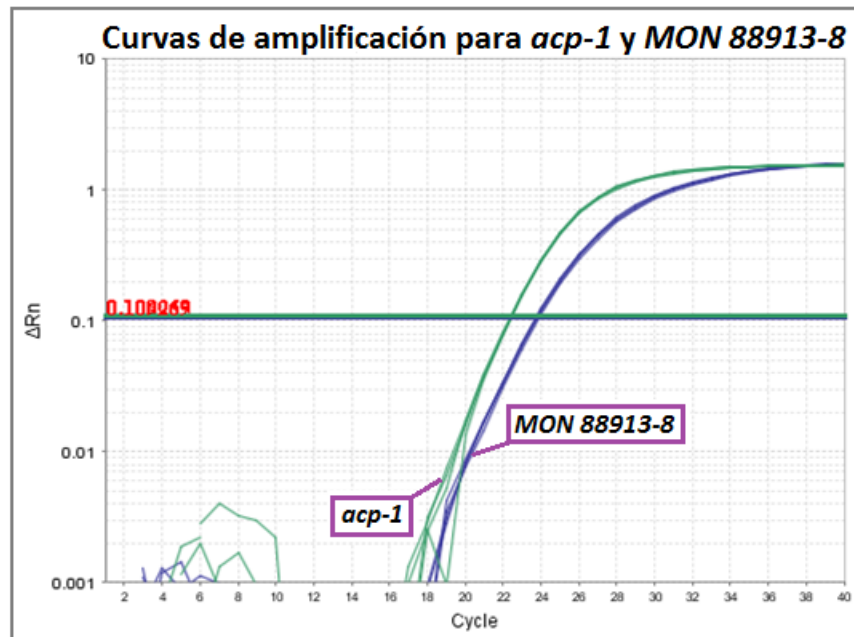


Figura 6.29. Curvas de amplificación obtenidas para el análisis de amplificación por qPCR de las secuencias *MON88913-8* y *acp-1* del plásmido linearizado.

### 6.5 Cuantificación de las copias en las mezclas de harina de algodón GM por qPCR empleando un plásmido como calibrante

Una vez determinada la concentración nominal en número de copias de los plásmidos se buscó evaluar su desempeño como calibrante a través de su uso en la técnica de qPCR. Se tomaron como referencia las mezclas de harina de algodón GM que se habían cuantificado por qPCR (haciendo uso de otro calibrante) y por dPCR.

Para cuantificar las mezclas se elaboró una curva de calibración para cada secuencia (*acp-1* y *MON88913-8*), a partir del plásmido linearizado, cuya construcción incluye ambas secuencias. Inicialmente, se empleó la concentración estimada en número de copias del plásmido a partir de la concentración reportada en el informe proporcionado por la UNAM, sin embargo, una vez que se determinó

por dPCR la concentración en número de copias para cada una de las secuencias del calibrante, se hizo uso de dicha concentración para obtener el porcentaje de GM de las mezclas.

En la Figura 6.30 se muestran las amplificaciones de cada punto de la curva de calibración para la secuencia endógena *acp-1*, y en la Figura 6.31 su respectiva curva estándar, en donde es posible observar que las curvas que corresponden a una solución con un mayor número de copias aparecen en ciclos más tempranos en comparación con los que tiene una concentración menor. Lo mismo se puede observar en las amplificaciones de la curva de calibración de la secuencia *MON88913-8*, mostrada en la Figura 6.32 y en su curva de calibración en la Figura 6.33.

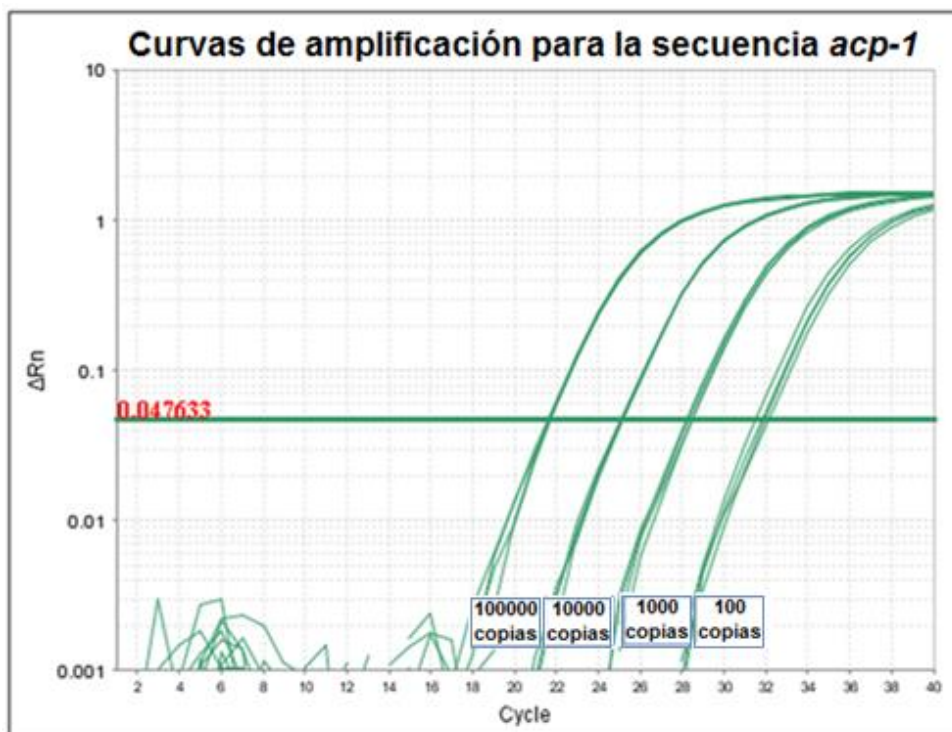


Figura 6.30. Curvas de amplificación de la secuencia *acp-1* para la construcción de la curva estándar, a cuatro puntos, del plásmido linearizado.

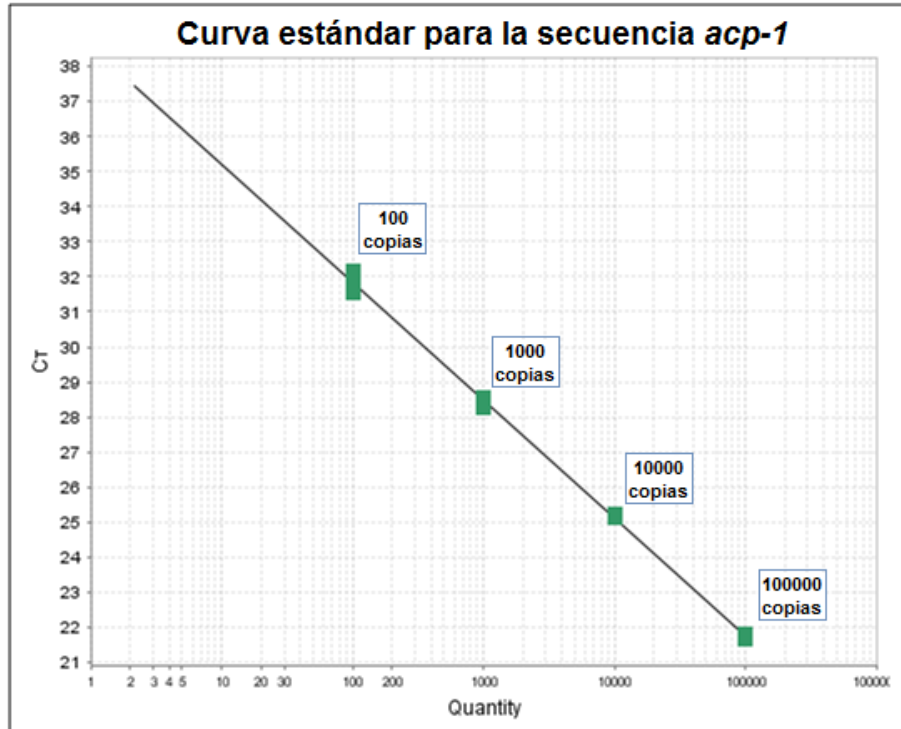


Figura 6.31. Curva estándar de la secuencia *acp-1*, a cuatro puntos, para emplear el plásmido linealizado como calibrante en la cuantificación de mezclas de algodón GM por qPCR.

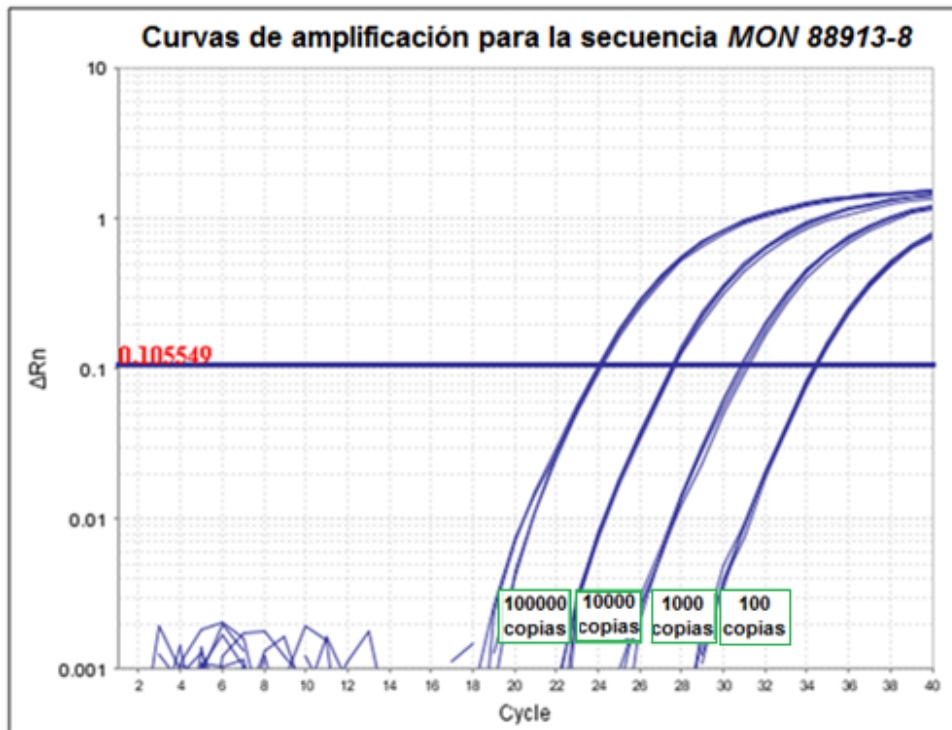


Figura 6.32. Curvas de amplificación de la secuencia *MON88913-8* para la construcción de la curva estándar, a cuatro puntos, del plásmido linealizado.

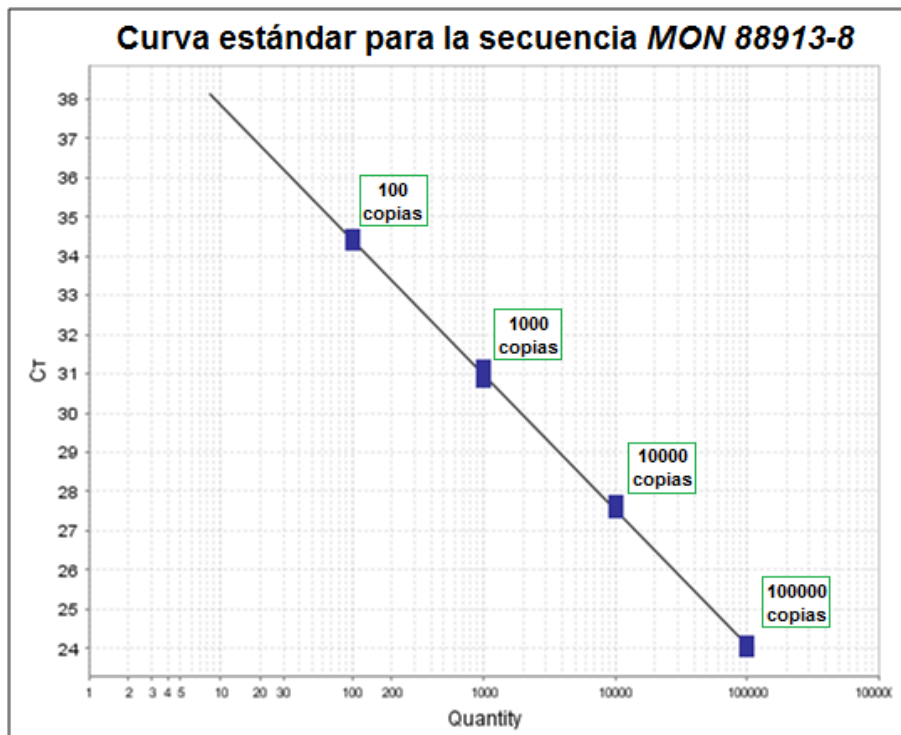


Figura 6.33. Curva estándar de la secuencia *MON88913-8*, a cuatro puntos, para emplear el plásmido linealizado como calibrante en la cuantificación de mezclas de algodón GM por qPCR.

En la Tabla 6.13 se muestran los resultados obtenidos para ambas secuencias de los parámetros evaluados en la curva de calibración. Con base en los criterios de aceptación establecidos por la Unión Europea en materia de análisis de OGM por qPCR (EUR 24790 EN-2011), se puede observar que las curvas obtenidas para ambas secuencias cumplen con el rango de aceptación.

Tabla 6.13. Resultados estadísticos del ensayo de qPCR.

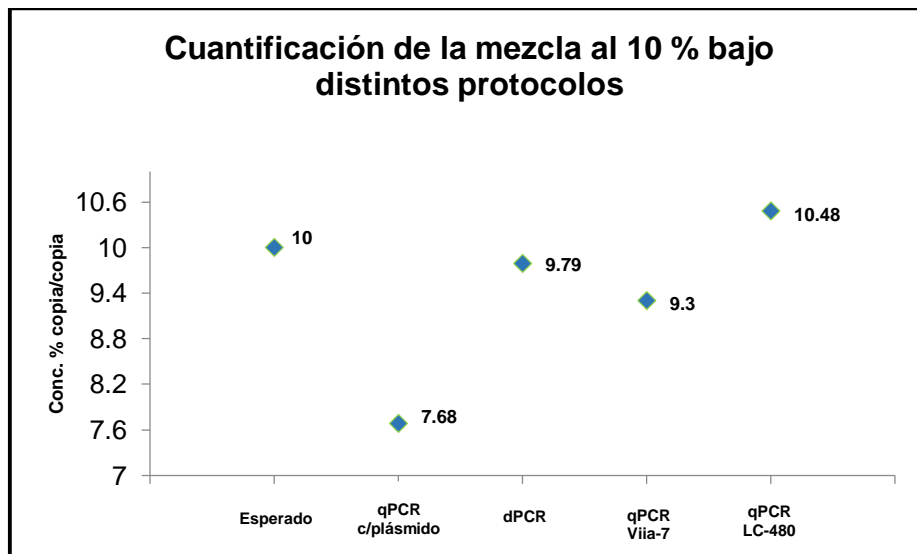
Parámetro de aceptación	Requerimiento	Valores determinados	
		Secuencia	
		<i>acp-1</i>	<i>MON88913-8</i>
Pendiente	-3.1 a -3.6	- 3.368	- 3.447
R <sup>2</sup>	≥ 0.98	0.999	0.999
% Eficiencia	90 a 110 %	98.09 7	95.036
Error	-	0.032	0.023

Una vez aceptado el ensayo de cuantificación se procedió a calcular el valor de las mezclas GM, para las cuales se obtuvieron los resultados que se plasman en la Tabla 6.14, en donde además se muestran los resultados obtenidos por la técnica de dPCR a fin de comparar lo obtenido por ambos estudios.

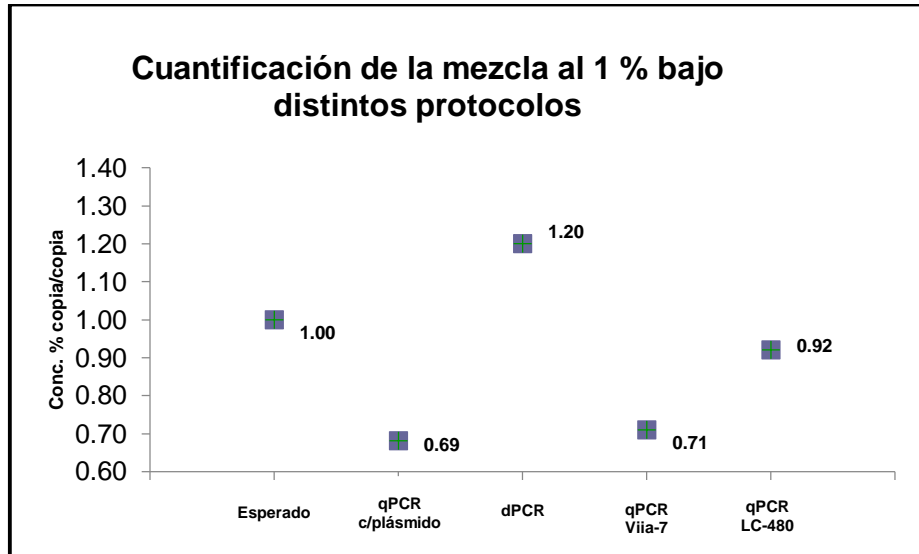
**Tabla 6.14. Comparación de los resultados obtenidos en la cuantificación de mezclas de algodón GM por qPCR y dPCR.**

Mezcla	qPCR	dPCR
	% GM	% GM
10 %	7.68	9.79
1 %	0.69	1.20
0.1 %	0.08	0.14

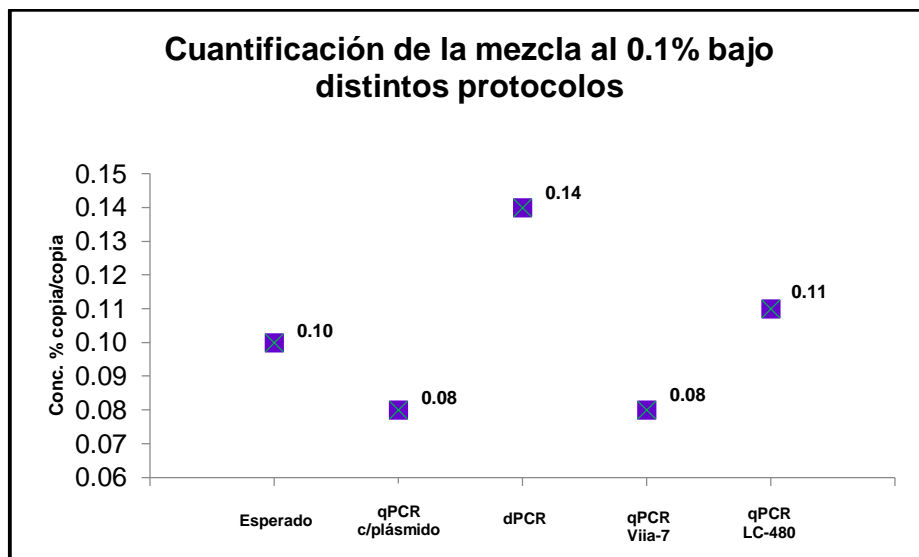
Después de verificar los resultados obtenidos con los que se lograron por dPCR y en las cuantificaciones efectuadas por qPCR haciendo uso de otro calibrante con la plataforma ViiA<sup>®</sup> 7 de Life Technologies<sup>®</sup>, se observa que con el uso del plásmido como calibrante, la cuantificación arroja valores subestimados para todas las mezclas. Como se ve en las Figuras 6.34, 6.35 y 6.36, en donde se muestran gráficos comparativos entre los valores obtenidos para la cuantificación de éstas mezclas bajo distintos protocolos, los valores obtenidos por este estudio se encuentran considerablemente alejados de los demás.



**Figura 6.34. Comparativo de los valores obtenidos para la cuantificación de mezclas de harina de algodón GM al 10 % en distintos protocolos.**



**Figura 6.35. Gráfico comparativo de los valores obtenidos para la cuantificación de mezclas de harina de algodón GM al 1 % en distintos protocolos.**



**Figura 6.36. Gráfico comparativo de los valores obtenidos para la cuantificación de mezclas de harina de algodón GM al 0.1 % en distintos protocolos.**

Sin embargo, aun cuando los resultados obtenidos para las tres mezclas por qPCR haciendo uso del plásmido linearizado como calibrante en comparación con los de dPCR se mostraron alejados, al ser comparados con los obtenidos únicamente por la técnica de qPCR empleando distintos calibrantes, con el plásmido y con un MR, se pueden observar valores comparables con la plataforma de LC-480, y muy cercanos a los obtenidos con la plataforma ViiA® 7 haciendo uso de un MR como calibrante.

## 7. Logros del trabajo

- ⊠ Se implementó la técnica de dPCR para la cuantificación de secuencias específicas en material de algodón GM y plásmidos, linearizado y circular.
- ⊠ Se cuantificaron MRC de manera directa con la técnica de dPCR, obteniendo valores comparables con los reportados en sus certificados.
- ⊠ Se determinó el LC de la plataforma de dPCR Open Array®.
- ⊠ Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de mezclas de algodón GM por dPCR mostraron ser comparables con los obtenidos previamente por qPCR, destacando que mediante la técnica de dPCR no es necesaria la presencia de un calibrante, permitiendo así, una cuantificación directa del material a cuantificar.
- ⊠ Se obtuvo la cuantificación de un plásmido linearizado en número de copias.
- ⊠ Se evaluó el potencial del plásmido linearizado cuantificado como calibrante para el EE *MON88913-8* y la secuencia endógena de algodón *acp-1*, en cuantificaciones con la técnica qPCR.

## 8. Conclusiones

- ⊠ Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de dPCR permite realizar cuantificaciones de material GM en ausencia de un calibrante, además de obtenerse mediciones con una menor incertidumbre asociada.

## 9. Perspectivas

Considerando los fines del CNRDOGM para hacer de ésta una técnica una herramienta habitual de análisis, resultará conveniente evaluar su eficiencia en las demás especies con las que se desee trabajar, así como verificar si resulta necesario adecuar la metodología para alguna de ellas.

Además, será necesario realizar un mayor número de ensayos con distintos analistas para hacer posible su validación en el futuro, de acuerdo con las necesidades del CNRDOGM.



## 10. Bibliografía

- ✿ Acevedo, F. 2009. La Bioseguridad en México y los Organismos Genéticamente Modificados: Cómo Enfrentar un Nuevo Desafío. Capital natural de México, Vol. II. CONABIO. México. Disponible en: [http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20II/II07\\_La%20bioseguridad%20en%20Mexico%20y%20los%20organismos%20geneticam e.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20II/II07_La%20bioseguridad%20en%20Mexico%20y%20los%20organismos%20geneticam e.pdf) [Último acceso 7 de Mayo 2013]
- ✿ AgroBio México. 2012. ABC de la Biotecnología Agrícola. Disponible en: [http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/ABC\\_Biotecnologia.pdf](http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/ABC_Biotecnologia.pdf) [Último acceso 17 de Mayo 2013]
- ✿ AgroBio México. 2012. Marco Regulatorio de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) Destinados a la Agricultura. Disponible en: [http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/Marco\\_Regulatorio.pdf](http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/Marco_Regulatorio.pdf) [Último acceso 17 de Mayo 2013]
- ✿ Bio-Rad, 2013. QX100<sup>®</sup> Droplet Digital PCR system. Disponible en [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6237.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6237.pdf) [Último acceso 21 de Junio de 2013]
- ✿ Bio Trove, Inc. 2009. Open Array<sup>®</sup> Real-Time qPCR System. Users' Guide.
- ✿ Biosafety Scanner. Genetic Rights Foundation. Disponible en: <http://en.biosafetyscanner.org/> [Último acceso 27 de Abril 2013]
- ✿ Bolívar, F. 2003. Recomendaciones para el desarrollo y consolidación de la Biotecnología en México. Academia Mexicana de Ciencias A.C. México. Disponible en: <http://www.cibiogem.gob.mx/Publicaciones/Documents/Biotec2ed/Recomendaciones.pdf> [Último acceso 12 de Abril 2013]
- ✿ Bolívar, F. 2007. Fundamentos y casos exitosos de la Biotecnología moderna. El Colegio Nacional. México. Disponible en: <http://web.cua.uam.mx/docs/CNI/profesores/archivos/295.pdf> [Último acceso 30 de Abril 2013]
- ✿ Bolívar, F. 2011. Por un uso responsable de los Organismos Genéticamente Modificados. Ed. Academia Mexicana de Ciencias A.C. México.

- ✿ Burns, M., Burrell, A. and Foy, C. 2010. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *European Food Research and Technology* 231: 353-362.
- ✿ Cerny, R., Bookout, J., CaJacob, C., Groat, J., Hart, J., Heck, G., Huber, S., Listello, J., Martens, A., Oppenhuized, M., Sammons, B., Scanlon, N., Shappley, Z., Yang, J. and Xiao, J. 2010. Development and characterization of a cotton (*Gossypium hirsutum* L.) event with enhanced reproductive resistance to glyphosate. *Crop Science* 50: 1375-1384.
- ✿ CIBIOGEM. 2011. Desarrollo de metodologías de detección en campo de organismos genéticamente modificados que se siembran actualmente en México. Disponible en: [http://www.cibiogem.gob.mx/Convocatorias/Documents/bioseguridad/2011/CIBIOGEM\\_Bioseguridad\\_2011\\_Demandas-Especificas-2.pdf](http://www.cibiogem.gob.mx/Convocatorias/Documents/bioseguridad/2011/CIBIOGEM_Bioseguridad_2011_Demandas-Especificas-2.pdf)
- ✿ Comité Nacional Sistema Producto Algodón, A.C. 2012. Plan Rector Sistema Producto Algodón. México. Disponible en: <http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=plan%20rector%20sistema%20producto%20algod%C3%B3n&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.senasica.gob.mx%2Fincludes%2Fasp%2Fdownload.asp%3FIdDocumento%3D19998%26IdUrl%3D32705&ei=vfIDUtuJE6bkyQGVIHIDA&usq=AFQjCNEzfN3Ud6zy94Snc2eFT87KHb-Afg&bvm=bv.50500085,d.aWc> [Último acceso 21 de Marzo 2013]
- ✿ Corbisier, P., Bhat, S. and Partis, L., 2010. Absolute quantification of genetically modified MON810maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 2143-2150. Disponible en: <http://www.cibiogem.gob.mx/Documentos/interes/Documents/Us-responsible-OGM.pdf> [último acceso 5 de Abril 2013]
- ✿ Dorak, M. 2006. Real-time PCR. Moller S. 2006. PCR. 2ª ed.
- ✿ Fluidigm, 2013. Quantitative real-time digital PCR. Disponible en <http://www.fluidigm.com/rt-digital-pcr.html> [Último acceso 15 de Junio de 2013]

- \* GM Crop Database, Center for Environmental Risk Assessment (CERA). Disponible en: [http://www.cera-gmc.org/?action=gm\\_crop\\_database](http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database) [Último acceso 25 de Febrero 2013]
- \* GMO Detection Method Database (GMDD). Disponible en: <http://gmdd.shgmo.org/> [Último acceso 18 de Marzo 2013]
- \* Guitiérrez, L. 2012. Validación de la PCR digital para la cuantificación de maíz genéticamente modificado. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- \* Hindson, B., Ness, K., Masquelier, D., Belgrader, P., Heredia, N., Makarewicz, A., Bright, I., Lucero, M., Hiddessen, A., Legler, T., Kitano, T., Hodel, M., Petersen, J., Wyatt, P., Steenblock, E., Shah, P., Bousse, L., Troup, C., Mellen, J., Wittmann, D., Erndt, N., Cauley, T., Koehler, R., So, A., Dube, S., Rose, K., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D., Hodges, S., Romine, S., Milanovich, F., White, H., Regan, J., Karlin-Neumann, G., Hindson, C., Saxonov, S. and Colston B. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry* 83: 8604-8610.
- \* Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Morisset, D., Pecoraro, S., Pla, M., Bulcke, M. and Wulff, D. 2012. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology Advances* 30: 1318-1335.
- \* Horak, M., Rosenbaum, E., Woodrum, C., Martens, A., Mery, R., Cothren, J., Burns, J., Nickson, T., Pester, T., Jiang, C., Hart, J. and Sammons, B. 2007. Characterization of Roudup Ready Flex cotton, "MON88913", for use in ecological risk assessment: evaluation of seed germination, vegetative and reproductive growth, and ecological interactions. *Crop Science* 47: 268-277.
- \* Institute for Reference Materials and Measurements. 2007. Certification report, Certification of plasmidic DNA containing MON 810 maize DNA fragments, Certified Reference Materials ERM<sup>®</sup>-AD413.
- \* JRC European Comission. 2010. Compendium of reference methods for GMO analysis. European Union. Luxemburg.

- ✧ Lee, S., Kim, J. and Yi, B. 2007. Detection methods for biotech cotton MON15985 and MON88913 by PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3351-3357.
- ✧ Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, Diario Oficial de la Federación, 18 marzo 2005, Ley DOF 18-03-2005.
- ✧ Life Technologies®. 2010. Open Array Real Time PCR system Digital PCR experiment User Guide.
- ✧ Life Technologies®. 2010. Open Array® AccuFill® System User Guide.
- ✧ Life Technologies®. 2011. Introducción a la PCR en tiempo real. Sistema ViiA®7. Curso teórico-práctico de PCR tiempo real y sus aplicaciones.
- ✧ Life Technologies®. 2012. Manual de entrenamiento del sistema Open Array®.
- ✧ Life Technologies®. 2012. qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR. Disponible en: <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html> [Último acceso 21 de Febrero de 2013]
- ✧ Life Technologies®. 2013. Digital PCR for virology research—beyond Ct. Disponible en: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms\\_097945.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_097945.pdf) [Último acceso 07 de Junio de 2013]
- ✧ López, M., 2012. Validación de la metodología para el análisis de algodón genéticamente modificado por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- ✧ Luque, E., Mazzara, M., Weber, T., Foti, N., Grazioli, E., Munaro, B., Pinski, G., Bellocchi, G., Eede, G. and Savini, C. 2012. Testing the robustness of validated methods for quantitative detection of GMOs across qPCR instruments. *Food Analytical Methods* 6: 343-360.
- ✧ McPherson, M. y Moller S. 2006. PCR. 2ª ed. New York: Taylor & Francis Group.
- ✧ NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

- ✧ Pérez, M. y Xoconostle, B. 2012. Desarrollo y certificación de un plásmido calibrante para la medición de un evento de modificación genética en maíz. CENAM & CINVESTAV-IPN. México.
- ✧ Pohl, G. and Shih, M. 2004. Principle and applications of digital PCR. A review: Expert Review of Molecular Diagnostics 4: 41-47.
- ✧ Preetha, S and Raveendren T. 2008. Molecular marker technology in cotton. Biotechnology and Molecular Biology Review 3: 032-045.
- ✧ Promega. 2010. Technical Manual. pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems.
- ✧ Querci, M., Jermini, M. and Van den Eede, G. 2007. Manual del participante. Comunidades Europeas. Luxemburgo.
- ✧ Reglamento de la LBOGM, Diario Oficial de la Federación, 19 marzo 2008, Última Reforma DOF 06-03-2009.
- ✧ Riu, J. 2004. Materiales de Referencia Certificados. Universitat Rovira i Virgili. España.
- ✧ Rodríguez, M. y Rodríguez, W. 2006. PCR en Tiempo Real. IBT-UNAM. México.
- ✧ Salazar, N. y Aldana, M. 2011. Herbicida glifosfato: usos, toxicidad y regulación. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora XII: 23-28. Disponible en: <http://www.biocnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-04.pdf> [Último acceso 7 de Mayo 2013]
- ✧ Sanders, R., Hugget, J., Bushell, C., Cowen, S., Scott, D. and Foy, C. 2011. Evaluation of Digital PCR for absolute DNA quantification. Analytical Chemistry 83: 6474-6484.
- ✧ SENASICA, 2013. CNRDOGM. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2411> [Último acceso 17 de Enero de 2013]
- ✧ SIAP, 2013. Cierre de la producción agrícola de *Algodón hueso*. Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&layout=full&id=112](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&layout=full&id=112) [Último acceso 15 de Septiembre de 2013]


- ✿ Silva, C. 2005. Algodón Genéticamente Modificado. AgroBio Colombia. 1-47. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/AlgodF3n20GenE9ticamente20Modificado.pdf> [Último acceso 21 de Marzo 2013]
- ✿ Sun, D. 2008. Modern Techniques for Food Authentication. Academic Press. UK. Pág. 426.
- ✿ Vierstraete, A. 1999. Principle of the PCR. Disponible en: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> [Último acceso 18 Marzo de 2013]
- ✿ Vogelstein, B. and Kinzler, K. 1999. Digital PCR. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96: 9236-9241.
- ✿ Wakelyn, P. 2007. International Fiber, Chemistry and Technology. Cotton Fiber, Chemistry and Technology. CRC Press. USA. Pág. 1-9.
- ✿ Yu, Y., Yuan, D., Liang, S., Li, X., Wang, X., Lin, Z. and Zhang, X. 2011. Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC<sub>1</sub> population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. BioMed Central Genomics 12:15: 1-14.
- ✿ Žel, J., Milavec, M., Morisset, D., Plan, D., Van den Eede, G. and Gruden K. 2012. How to Reliably Test for GMOs. Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition.



# ANEXOS

## ANEXO I

### Certificado del Material de Referencia Certificado AOCS-0906-D



**AOCS**  
Your Global Fats and Oils Connection


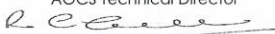
**Mail Address:**  
AOCS, P.O. Box 17190, Urbana, IL 61803-7190 USA

**Street Address:**  
AOCS, 2710 S. Boulder Drive, Urbana, IL 61802-6996 USA

**Phone:** +1 217-359-2344; **Fax:** +1 217-351-8091

**Email:** general@aocs.org; **Web:** www.aocs.org

**Certificate of Analysis**  
**AOCS Certified Reference Material**  
**Product Number: 0906-D**

Description: cotton powder			
OECD Unique Identifier for Event	Zygosity	Mass Fraction	
		Certified Value* g/kg	Certification Methodology
MON88913	Homozygous	> 994.0	Immunoassy Testkit and event-specific real-time PCR
<p><b>*Uncertainty Statement:</b> 95 % confident that the true content of MON88913 in this cotton is above the certified value. The certified value is traceable to the SI.</p>			
<p>This is the first batch of MON88913 Certified Reference Material prepared by AOCS for Monsanto Company.</p>			
<p><b>This certificate is valid through: 2013 July 31</b></p> <p>This validity may be extended when further evidence of stability becomes available. <b>Customers will be notified by AOCS if a stability issue arises at AOCS Headquarters.</b></p>			
<p><b>Date introduced: February 2012</b> <b>Revised: June 2012</b></p>			
<p>AOCS Reference Materials Manager</p>  <p>G. M. Clapper Urbana, IL 61802</p>		<p>AOCS Technical Director</p>  <p>R. C. Cantrill Urbana, IL 61802</p>	
<p>AOCS Mission Statement: To be a global forum to promote the exchange of ideas, information and experience, to enhance personal excellence, and to provide high standards of quality among those with a professional interest in the science and technology of fats, oils, surfactants, and related materials.</p>			
<p><b>This material is for limited purposes only: see "Terms and Conditions".</b></p>			

Certificate of Analysis for 0906-D  
Page 1 of 4  
© AOCS, 2012

[www.aocs.org](http://www.aocs.org)

**Product Description**

AOCS 0906-D has been prepared by AOCS from cotton powder. AOCS 0906-D is available in 27 -mL glass headspace vials containing approximately **10 g** of cotton powder. Users are informed that this reference material has been produced from powder of MON88913 cotton (Line ST 4664 RF) delivered by Monsanto Company. The MON88913 cotton seeds used in the preparation of AOCS 0906-D were Homozygous for the MON88913 event.

**Certification Analytical Method**

Eurofins-GeneScan, Metairie, LA (an ISO 17025 Accredited laboratory) performed event-specific real-time PCR and AOCS performed the Immunoassy Testkit to validate the certification value of AOCS 0906-D.

**Intended Use**

This CRM, AOCS 0906-D, is intended for use as quality control material or a calibrant in methods for the detection of biotechnology-derived events.

**Instructions for Use**

Upon receipt the product should be stored in a sealed container at +4° C in the dark.

Product opening date: \_\_\_\_\_(completed by customer)

Recommended test portion for DNA extraction: minimum of 1 g

Protocols have been followed to insure that the certified value represents the true value. AOCS cannot be held responsible for changes that happen during storage of the product at the buyer's location.

Note:  
The AOCS 0906-D Certification Report is available online though a paper copy will be supplied upon request. <https://secure.aocs.org/crm>.

Certificate of Analysis for 0906-D  
Page 2 of 4  
© AOCS, 2012

## ANEXO II

### Certificado del Material de Referencia Certificado *ERM-BF422d*



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**ERM<sup>®</sup> - BF422d**

DRIED COTTON SEED POWDER		
	Mass Fraction	
	Certified value <sup>1)</sup> [g/kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [g/kg]
281-24-236 x 3006-210-23 cotton seed	100	16
<p><small>1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and calculated on the basis of their respective 281-24-236 x 3006-210-23 purity and the water content. The certified value is traceable to the SI.</small></p> <p><small>2) The certified uncertainty provides the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor <math>k = 2</math>, corresponding to a level of confidence of about 95 %.</small></p>		

This certificate is valid for 12 months after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

#### NOTE

European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BF422d was produced and certified under the responsibility of the IRMM according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials<sup>®</sup> co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM<sup>®</sup>, Geel, December 2006

Signed:

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



Registration No. 268-TEST  
ISO Guide 34 for the

All following pages are an integral part of the certificate.

Page 1 of 2

#### DESCRIPTION OF THE SAMPLE

ERM-BF422d is part of a set of four cotton seed powder CRMs containing different mass fractions of genetically modified (GM) 281-24-236 x 3006-210-23 cotton seed. The set of CRMs (ERM-BF422a, ERM-BF422b, ERM-BF422c and ERM-BF422d) was produced and certified under the responsibility of the Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Directorate General Joint Research Centre (EC-DG JRC-IRMM). ERM-BF422d is available in glass bottles containing approximately 1 g of cotton seed powder closed under argon atmosphere. This reference material has been produced from whole seeds of non-modified cotton and 281-24-236 x 3006-210-23 cotton delivered by Dow AgroSciences LLC (Indianapolis, IN, USA). According to Commission Regulation (EC) No 65/2004 the cotton event 281-24-236 x 3006-210-23 received the unique identifier DAS-24236-5 x DAS-21023-5.

#### ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

Gravimetric preparation confirmed by real-time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR).

#### PARTICIPANT

EC-DG JRC-IRMM, Geel, BE

#### SAFETY INFORMATION

This CRM is intended for laboratory use only and should not be used for drugs, household and other uses. As the powder material is not viable, accidental release into the environment forms no risk.

#### INSTRUCTIONS FOR USE

CRM ERM-BF422d is intended to be used for the quality control or calibration of methods for the quantification of the 281-24-236 x 3006-210-23 cotton mass fraction in food and feed. During certification a significant difference concerning the DNA mass precipitating in ethanol between the non-GM and GM maize powder has been observed. Using DNA-based quantification techniques like rt-PCR may therefore lead to 60 % higher values for the quantity of DNA extracted from 281-24-236 x 3006-210-23 cotton compared to the quantity of DNA extracted from the non-GMO cotton. Consequently the GM DNA fraction determined in relative haploid genome copy numbers may lead to up to 60 % higher values in comparison to the real mass fraction.

#### STORAGE

Bottles should be stored dry and in the dark at maximum 4 °C. However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

#### LEGAL NOTICE

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

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

#### NOTE

A detailed technical report is available on [www.erm-crm.org](http://www.erm-crm.org). A paper copy can be obtained from IRMM on request.

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

Page 2 of 2



ANEXO III

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación del MRC AOCs-0906-D

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON8913-8	68	NTC	NaN	NaN	NaN	238	238	18	NaN - NaN
		A1	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215
		A2	0.2113	0.1199	0.3725	63	51	1	0.1199 - 0.3725
		A3	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A4	0.4296	0.2819	0.6545	63	41	1	0.2819 - 0.6545
		A5	0.2311	0.134	0.3985	63	50	1	0.1340 - 0.3985
		A6	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		A7	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		A8	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		A9	0.2938	0.1737	0.4969	55	41	9	0.1737 - 0.4969
		A10	0.2311	0.134	0.3985	63	50	1	0.1340 - 0.3985
		A11	0.481	0.3123	0.7407	55	34	9	0.3123 - 0.7407
		PROMEDIO	0.30	0.19	0.50				
		cp en 5000nL	46.04	28.33	75.07				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>46038.57</b>	<b>28326.45</b>	<b>75070.25</b>				
		B1	0.3429	0.2156	0.5456	62	44	2	0.2156 - 0.5456
		B2	0.3365	0.2115	0.5352	63	45	1	0.2115 - 0.5352
		B3	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		B4	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		B5	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		B6	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		B7	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		B8	0.4543	0.3008	0.686	63	40	1	0.3008 - 0.6860
		B9	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		B10	0.3429	0.2156	0.5456	62	44	2	0.2156 - 0.5456
		B11	0.3365	0.2115	0.5352	63	45	1	0.2115 - 0.5352
		PROMEDIO	0.32	0.20	0.52				
		cp en 5000nL	48.66	30.37	78.08				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>48658.40</b>	<b>30366.39</b>	<b>78084.02</b>				
		C1	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215
		C2	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237
		C3	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		C4	0.2353	0.1365	0.4058	62	49	2	0.1365 - 0.4058
		C5	0.3254	0.1957	0.541	54	39	10	0.1957 - 0.5410
		C6	0.2311	0.134	0.3985	63	50	1	0.1340 - 0.3985
		C7	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		C8	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237
		C9	0.2513	0.1486	0.4249	63	49	1	0.1486 - 0.4249
		C10	0.3542	0.2196	0.5711	57	40	7	0.2196 - 0.5711
		C11	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		PROMEDIO	0.29	0.18	0.48				
		cp en 5000nL	44.25	27.00	72.75				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>44253.44</b>	<b>26998.62</b>	<b>72747.93</b>				
		D1	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		D2	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		D3	0.2151	0.122	0.3792	62	50	2	0.1220 - 0.3792
		D4	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		D5	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		D6	0.3145	0.1951	0.5069	63	46	1	0.1951 - 0.5069
		D7	0.2559	0.1514	0.4328	62	48	2	0.1514 - 0.4328
		D8	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		D9	0.5322	0.3607	0.7852	63	37	1	0.3607 - 0.7852
		D10	0.3819	0.2458	0.5936	63	43	1	0.2458 - 0.5936
D11	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237		
PROMEDIO	0.31	0.20	0.50						
cp en 5000nL	47.45	29.61	76.39						
<b>cp en 100ng</b>	<b>47454.55</b>	<b>29611.57</b>	<b>76387.05</b>						
acp-1	68	NTC	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		A2	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117

		A3	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		A4	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		A5	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		A6	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		A7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		A8	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		A9	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		A10	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		A11	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		PROMEDIO	0.33	0.21	0.53				
		cp en 5000nL	50.65	31.98	80.33				
<b>cp en 100ng</b>	<b>50650.14</b>	<b>31982.09</b>	<b>80327.82</b>						
70		A1	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		A2	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		A3	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		A4	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		A5	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		A6	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
		A7	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		A8	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		A9	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		A10	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A11	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
PROMEDIO	0.34	0.22	0.54						
cp en 5000nL	52.08	33.20	82.05						
<b>cp en 100ng</b>	<b>52075.76</b>	<b>33202.48</b>	<b>82049.59</b>						
74		D1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		D2	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		D3	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		D4	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		D5	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		D6	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		D7	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		D8	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		D9	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		D10	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		D11	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
PROMEDIO	0.32	0.20	0.50						
cp en 5000nL	47.73	29.95	76.45						
<b>cp en 100ng</b>	<b>47728.65</b>	<b>29946.28</b>	<b>76450.41</b>						
74		B1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		B2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		B3	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		B4	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		B5	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		B6	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		B7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		B8	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		B9	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		B10	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		B11	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
PROMEDIO	0.32	0.20	0.51						
cp en 5000nL	47.83	29.85	76.72						
<b>cp en 100ng</b>	<b>47834.71</b>	<b>29853.99</b>	<b>76724.52</b>						

#### ANEXO IV

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación del MRC *ERM-BF422d*

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON8891 3-8	79	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN
		C1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C2	0.1919	0.1062	0.3468	63	52	1	0.1062 - 0.3468
		C3	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915

		C4	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215	
		C5	0.1457	0.0728	0.2915	59	51	5	0.0728 - 0.2915	
		C6	0.2311	0.134	0.3985	63	50	1	0.1340 - 0.3985	
		C7	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C8	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C9	0.2311	0.134	0.3985	63	50	1	0.1340 - 0.3985	
		C10	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
		C11	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
		PROMEDIO	0.22	0.13	0.39					
		cp en 5000nL	33.84	19.55	58.73					
		<b>cp en 100ng</b>	<b>3384.02</b>	<b>1954.68</b>	<b>5873.42</b>					
		D1	0.2353	0.1365	0.4058	62	49	2	0.1365 - 0.4058	
		D2	0.1919	0.1062	0.3468	63	52	1	0.1062 - 0.3468	
		D3	0.2559	0.1514	0.4328	62	48	2	0.1514 - 0.4328	
		D4	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641	
		D5	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		D6	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228	
		D7	0.3145	0.1951	0.5069	63	46	1	0.1951 - 0.5069	
		D8	0.2231	0.1266	0.3934	60	48	4	0.1266 - 0.3934	
		D9	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		D10	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215	
		D11	0.2113	0.1199	0.3725	63	51	1	0.1199 - 0.3725	
		PROMEDIO	0.23	0.13	0.39					
		cp en 5000nL	34.15	19.81	59.21					
		<b>cp en 100ng</b>	<b>3415.29</b>	<b>1980.72</b>	<b>5921.35</b>					
	80	C1	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823	
		C2	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671	
		C3	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671	
		C4	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
		C5	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160	
		C6	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431	
		C7	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		C8	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
		C9	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		C10	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		C11	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704	
			PROMEDIO	0.21	0.12	0.37				
			cp en 5000nL	32.46	18.77	56.61				
			<b>cp en 100ng</b>	<b>3246.14</b>	<b>1876.72</b>	<b>5660.74</b>				
			D1	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
			D2	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
			D3	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
			D4	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
			D5	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
			D6	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
			D7	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
			D8	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
			D9	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		D10	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914	
		D11	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		PROMEDIO	0.27	0.16	0.44					
		cp en 5000nL	40.54	24.60	67.17					
		<b>cp en 100ng</b>	<b>4053.86</b>	<b>2459.78</b>	<b>6717.36</b>					
acp-1	79	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN	
		A1	0.4834	0.32	0.7304	60	37	4	0.3200 - 0.7304	
		A2	0.3497	0.2198	0.5563	61	43	3	0.2198 - 0.5563	
		A3	0.277	0.1667	0.4602	62	47	2	0.1667 - 0.4602	
		A4	0.4055	0.2547	0.6456	54	36	10	0.2547 - 0.6456	
		A5	0.3868	0.2397	0.624	53	36	11	0.2397 - 0.6240	
		A6	0.2113	0.1199	0.3725	63	51	1	0.1199 - 0.3725	
		A7	0.2763	0.1633	0.4672	58	44	6	0.1633 - 0.4672	
		A8	0.4296	0.2819	0.6545	63	41	1	0.2819 - 0.6545	
		A9	0.2513	0.1486	0.4249	63	49	1	0.1486 - 0.4249	
		A10	0.277	0.1667	0.4602	62	47	2	0.1667 - 0.4602	
		A11	0.2113	0.1199	0.3725	63	51	1	0.1199 - 0.3725	
				PROMEDIO	0.28	0.20	0.52			
		cp en 5000nL	42.44	30.32	79.45					
		<b>cp en 100ng</b>	<b>42437.50</b>	<b>30319.56</b>	<b>79453.17</b>					
		B1	0.3567	0.2242	0.5675	60	42	4	0.2242 - 0.5675	

80	B2	0.2513	0.1486	0.4249	63	49	1	0.1486 - 0.4249
	B3	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
	B4	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
	B5	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
	B6	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215
	B7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
	B8	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
	B9	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
	B10	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
	B11	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
	PROMEDIO	0.27	0.16	0.44				
	cp en 5000nL	40.36	24.32	67.23				
	<b>cp en 100ng</b>	<b>40360.88</b>	<b>24318.18</b>	<b>67230.03</b>				
	A1	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
	A2	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
	A3	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
	A4	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
	A5	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
	A6	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
	A7	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
	A8	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
	A9	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
A10	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
A11	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
PROMEDIO	0.29	0.18	0.48					
cp en 5000nL	44.41	27.38	72.24					
<b>cp en 100ng</b>	<b>44410.47</b>	<b>27384.30</b>	<b>72242.42</b>					
B1	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
B2	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
B3	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
B4	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
B5	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
B6	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
B7	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160	
B8	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704	
B9	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174	
B10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417	
B11	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160	
PROMEDIO	0.26	0.16	0.44					
cp en 5000nL	39.67	23.88	66.11					
<b>cp en 100ng</b>	<b>39673.55</b>	<b>23878.79</b>	<b>66114.33</b>					

## ANEXO V

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación de la mezcla DNA/DNA 0.1 %

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON88913-8	81	NTC	0	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		A2	0.2513	0.1486	0.4249	63	49	1	0.1486 - 0.4249
		A3	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215
		A4	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		A5	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		A6	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A7	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		A8	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A9	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		A10	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		A11	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		PROMEDIO	0.26	0.16	0.44				
		cp en 5000nL	39.66	23.84	66.18				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>39.66</b>	<b>23.84</b>	<b>66.18</b>				
B1	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174		
B2	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660		

		B3	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		B4	0.3819	0.2458	0.5936	63	43	1	0.2458 - 0.5936
		B5	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		B6	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		B7	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		B8	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		B9	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		B10	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		B11	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		PROMEDIO	0.27	0.16	0.45				
		cp en 5000nL	40.71	24.67	67.46				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>40.71</b>	<b>24.67</b>	<b>67.46</b>				
		C1	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		C2	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C3	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C4	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C5	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		C6	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C8	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C9	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C10	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C11	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		PROMEDIO	0.25	0.15	0.42				
		cp en 5000nL	37.68	22.39	63.56				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>37.68</b>	<b>22.39</b>	<b>63.56</b>				
		D1	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		D2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		D3	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		D4	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		D5	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		D6	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		D7	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		D8	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		D9	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		D10	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		D11	0.2513	0.1486	0.4249	63	49	1	0.1486 - 0.4249
		PROMEDIO	0.23	0.13	0.39				
		cp en 5000nL	34.68	20.24	59.63				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>34.68</b>	<b>20.24</b>	<b>59.63</b>				
		NTC	NaN	NaN	NaN	255	255	1	NaN - NaN
		A1	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		A2	0.4543	0.3008	0.686	63	40	1	0.3008 - 0.6860
		A3	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A4	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		A5	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		A6	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		A7	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		A8	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		A9	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		A10	0.4543	0.3008	0.686	63	40	1	0.3008 - 0.6860
		A11	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		PROMEDIO	0.44	0.29	0.67				
		cp en 5000nL	66.71	44.11	100.95				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>66710.74</b>	<b>44108.82</b>	<b>100946.28</b>				
		B1	0.4296	0.2819	0.6545	63	41	1	0.2819 - 0.6545
		B2	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		B3	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		B4	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		B5	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		B6	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		B7	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		B8	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		B9	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		B10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		B11	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
		PROMEDIO	0.41	0.27	0.63				
		cp en 5000nL	62.60	41.03	95.64				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>62600.55</b>	<b>41031.68</b>	<b>95640.50</b>				

C1	0.2657	0.1571	0.4493	60	46	4	0.1571 - 0.4493
C2	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
C3	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
C4	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
C5	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
C6	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
C7	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
C8	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
C9	0.5322	0.3607	0.7852	63	37	1	0.3607 - 0.7852
C10	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
C11	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
PROMEDIO	0.45	0.30	0.67				
cp en 5000nL	67.70	44.92	102.24				
<b>cp en 100ng</b>	<b>67696.97</b>	<b>44915.98</b>	<b>102235.54</b>				
D1	0.4895	0.3268	0.7333	62	38	2	0.3268 - 0.7333
D2	0.2353	0.1365	0.4058	62	49	2	0.1365 - 0.4058
D3	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
D4	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
D5	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
D6	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
D7	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D8	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D9	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D10	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D11	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
PROMEDIO	0.42	0.28	0.64				
cp en 5000nL	63.84	41.94	97.30				
<b>cp en 100ng</b>	<b>63836.09</b>	<b>41940.77</b>	<b>97304.41</b>				

## ANEXO VI

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación de la mezcla DNA/DNA 0.01 % para determinar el Límite de Detección de la plataforma Open Array

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON88913-8	81	NTC	0	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		A2	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		A3	0.0323	0.0081	0.129	63	61	1	0.0081 - 0.1290
		A4	0.016	0.0023	0.1136	63	62	1	0.0023 - 0.1136
		A5	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		A6	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		A7	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		A8	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		A9	0.016	0.0023	0.1136	63	62	1	0.0023 - 0.1136
		A10	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		A11	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		PROMEDIO	0.03	0.01	0.11				
		cp en 5000nL	4.42	1.32	16.74				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>4.42</b>	<b>1.32</b>	<b>16.74</b>				
		B1	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B2	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		B3	0.016	0.0023	0.1136	63	62	1	0.0023 - 0.1136
		B4	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		B5	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		B6	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		B7	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		B8	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		B9	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B10	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		B11	0.0323	0.0081	0.129	63	61	1	0.0081 - 0.1290
		PROMEDIO	0.03	0.01	0.11				
		cp en 5000nL	3.96	1.10	16.18				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>3.96</b>	<b>1.10</b>	<b>16.18</b>				

		C1	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		C2	0.0323	0.0081	0.129	63	61	1	0.0081 - 0.1290
		C3	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		C4	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		C5	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		C6	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		C7	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		C8	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		C9	0.0656	0.0246	0.1748	63	59	1	0.0246 - 0.1748
		C10	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		C11	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		PROMEDIO	0.02	0.01	0.08				
		cp en 5000nL	3.10	0.90	12.71				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>3.10</b>	<b>0.90</b>	<b>12.71</b>				
		D1	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		D2	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		D3	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		D4	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		D5	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		D6	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		D7	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		D8	0	0	0	64	64	0	NaN - NaN
		D9	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		D10	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		D11	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		PROMEDIO	0.02	0.01	0.10				
		cp en 5000nL	3.72	0.95	15.72				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>3.72</b>	<b>0.95</b>	<b>15.72</b>				
		NTC	NaN	NaN	NaN	255	255	1	NaN - NaN
		A1	0.4383	0.2876	0.6678	62	40	2	0.2876 - 0.6678
		A2	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		A3	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		A4	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		A5	0.3145	0.1951	0.5069	63	46	1	0.1951 - 0.5069
		A6	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		A7	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237
		A8	0.2318	0.1315	0.4087	58	46	6	0.1315 - 0.4087
		A9	0.2513	0.1486	0.4249	63	49	1	0.1486 - 0.4249
		A10	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		A11	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237
		PROMEDIO	0.34	0.21	0.54				
		cp en 5000nL	51.43	32.43	81.73				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>25714.19</b>	<b>16214.88</b>	<b>40865.01</b>				
		B1	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		B2	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		B3	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		B4	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791
		B5	0.3589	0.2284	0.5641	63	44	1	0.2284 - 0.5641
		B6	0.1989	0.11	0.3594	61	50	3	0.1100 - 0.3594
		B7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		B8	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		B9	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		B10	0.3497	0.2198	0.5563	61	43	3	0.2198 - 0.5563
		B11	0.3145	0.1951	0.5069	63	46	1	0.1951 - 0.5069
		PROMEDIO	0.32	0.20	0.52				
		cp en 5000nL	49.02	30.65	78.52				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>24508.26</b>	<b>15323.69</b>	<b>39258.26</b>				
		C1	0.3819	0.2458	0.5936	63	43	1	0.2458 - 0.5936
		C2	0.4796	0.3202	0.7182	63	39	1	0.3202 - 0.7182
		C3	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		C4	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C5	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C6	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237
		C7	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C8	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C9	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C10	0.4796	0.3202	0.7182	63	39	1	0.3202 - 0.7182
		C11	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		PROMEDIO	0.37	0.24	0.58				

acp-1

82

cp en 5000nL	56.09	36.03	87.41					
<b>cp en 100ng</b>	<b>28043.39</b>	<b>18016.53</b>	<b>43705.92</b>					
D1	0.3365	0.2115	0.5352	63	45	1	0.2115 - 0.5352	
D2	0.293	0.1792	0.4791	63	47	1	0.1792 - 0.4791	
D3	0.3469	0.2151	0.5593	58	41	6	0.2151 - 0.5593	
D4	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038	
D5	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117	
D6	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
D7	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174	
D8	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
D9	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823	
D10	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
D11	0.3145	0.1951	0.5069	63	46	1	0.1951 - 0.5069	
PROMEDIO	0.31	0.20	0.51					
cp en 5000nL	47.69	29.71	76.74					
<b>cp en 100ng</b>	<b>23846.42</b>	<b>14854.68</b>	<b>38370.52</b>					

### ANEXO VII

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación de la mezcla de algodón genéticamente modificado al 10 %

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON88913-8	42	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN
		C1	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C3	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C4	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C5	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C6	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C7	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C8	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		C9	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C10	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C11	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		PROMEDIO	0.30	0.18	0.48				
		cp en 5000nL	45.21	27.98	73.27				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>4520.80</b>	<b>2797.66</b>	<b>7327.27</b>				
		D1	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		D2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
	D3	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
	D4	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
	D5	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
	D6	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
	D7	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
	D8	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
	D9	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
	D10	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
	D11	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
	PROMEDIO	0.27	0.16	0.45					
	cp en 5000nL	40.98	24.80	67.83					
	<b>cp en 100ng</b>	<b>4097.52</b>	<b>2480.17</b>	<b>6783.47</b>					
	49	C1	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C3	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		C4	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
C5		0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
C6		0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704	
C7		0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
C8		0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117	
C9		0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535	
C10		0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
C11		0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
PROMEDIO		0.28	0.17	0.46					



		cp en 5000nL	42.99	26.29	70.44				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>4298.76</b>	<b>2628.65</b>	<b>7043.80</b>				
54		C1	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		C2	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C3	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C4	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C5	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C6	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C8	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C9	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C10	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		C11	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		PROMEDIO	0.30	0.18	0.48				
		cp en 5000nL	45.05	27.82	73.10				
	<b>cp en 100ng</b>	<b>4504.96</b>	<b>2781.54</b>	<b>7310.19</b>					
44		NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN
		C1	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C2	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C3	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		C4	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		C5	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C6	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		C7	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		C8	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C9	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C10	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C11	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		PROMEDIO	0.30	0.19	0.49				
		cp en 5000nL	45.64	28.26	73.86				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>45639.12</b>	<b>28264.46</b>	<b>73856.75</b>				
		D1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		D2	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		D3	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		D4	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		D5	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
	D6	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535	
	D7	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914	
	D8	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
	D9	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
	D10	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117	
	D11	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660	
	PROMEDIO	0.28	0.17	0.46					
	cp en 5000nL	42.94	26.32	70.32					
	<b>cp en 100ng</b>	<b>42939.39</b>	<b>26318.18</b>	<b>70320.94</b>					
53		C1	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C2	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C3	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C4	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C5	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C6	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C7	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C8	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C9	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C11	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		PROMEDIO	0.28	0.17	0.46				
		cp en 5000nL	42.51	25.96	69.80				
	<b>cp en 100ng</b>	<b>42511.02</b>	<b>25957.30</b>	<b>69800.28</b>					
63		C1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C3	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C4	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C5	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C6	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C8	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C9	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		C10	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408

	C11	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
	PROMEDIO	0.31	0.19	0.50				
	cp en 5000nL	46.86	29.18	75.43				
	<b>cp en 100ng</b>	<b>46863.64</b>	<b>29177.69</b>	<b>75429.75</b>				

### ANEXO VIII

#### Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación de la mezcla de algodón genéticamente modificado al 1 %

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range	
MON8913-8	45	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN	
		C1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C2	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117	
		C3	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
		C4	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C5	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174	
		C6	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
		C7	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437	
		C8	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		C9	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417	
		C11	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038	
	PROMEDIO	0.30	0.19	0.49						
	cp en 5000nL	45.91	28.52	74.16						
	<b>cp en 100ng</b>	<b>459.12</b>	<b>285.19</b>	<b>741.63</b>						
	49	C1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174	
		C3	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
		C4	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C5	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704	
		C6	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
		C7	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C8	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
		C9	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915	
		C10	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
		C11	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174	
		PROMEDIO	0.27	0.16	0.45					
	cp en 5000nL	40.88	24.70	67.73						
	<b>cp en 100ng</b>	<b>408.77</b>	<b>246.98</b>	<b>677.27</b>						
	50	C1	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823	
		C2	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823	
		C3	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671	
		C4	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
		C5	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174	
		C6	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976	
		C7	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704	
		C8	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535	
		C9	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117	
		C10	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408	
		C11	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253	
		PROMEDIO	0.30	0.19	0.49					
		cp en 5000nL	45.50	28.22	73.64					
<b>cp en 100ng</b>		<b>455.04</b>	<b>282.19</b>	<b>736.36</b>						
D1		0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360		
D2		0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437		
D3		0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976		
D4		0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174		
D5		0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174		
D6		0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038		
D7	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660			
D8	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174			
D9	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174			
D10	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253			

		D11	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		PROMEDIO	0.30	0.19	0.49				
		cp en 5000nL	45.92	28.51	74.18				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>459.17</b>	<b>285.11</b>	<b>741.83</b>				
53	53	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN
		A1	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		A2	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		A3	0.1568	0.0816	0.3016	62	53	2	0.0816 - 0.3016
		A4	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		A5	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A6	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		A7	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		A8	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		A9	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		A10	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		A11	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		PROMEDIO	0.27	0.17	0.45				
		cp en 5000nL	41.36	25.19	68.29				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>41362.26</b>	<b>25194.21</b>	<b>68286.50</b>				
		C1	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C2	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		C3	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		C4	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C5	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C6	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		C7	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C8	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		C9	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C10	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		C11	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		PROMEDIO	0.25	0.15	0.43				
		cp en 5000nL	38.62	23.21	64.65				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>38615.70</b>	<b>23213.50</b>	<b>64652.89</b>				
		D1	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		D2	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		D3	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		D4	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		D5	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		D6	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		D7	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		D8	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		D9	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		D10	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		D11	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		PROMEDIO	0.25	0.15	0.42				
cp en 5000nL	37.41	22.23	63.17						
<b>cp en 100ng</b>	<b>37410.47</b>	<b>22228.65</b>	<b>63169.42</b>						
63	63	C1	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		C2	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C3	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		C4	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
		C5	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C6	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C7	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		C8	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		C9	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C10	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C11	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		PROMEDIO	0.21	0.12	0.37				
		cp en 5000nL	32.31	18.59	56.45				
<b>cp en 100ng</b>	<b>32305.79</b>	<b>18593.66</b>	<b>56453.17</b>						

ANEXO XI

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación de la mezcla de algodón genéticamente modificado al 0.1 %

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON88913-8	45	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN
		C1	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C2	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C3	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C4	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		C5	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
		C6	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		C7	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C8	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		C9	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		C10	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C11	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		PROMEDIO	0.37	0.24	0.58				
	cp en 5000nL	56.36	36.26	87.67					
	<b>cp en 100ng</b>	<b>56.36</b>	<b>36.26</b>	<b>87.67</b>					
	49	D1	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		D2	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		D3	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		D4	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
		D5	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		D6	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		D7	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		D8	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		D9	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		D10	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		D11	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		PROMEDIO	0.35	0.22	0.55				
		cp en 5000nL	52.87	33.67	83.16				
	<b>cp en 100ng</b>	<b>52.87</b>	<b>33.67</b>	<b>83.16</b>					
	50	C1	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C2	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C3	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
		C4	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
		C5	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
		C6	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C7	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		C8	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		C9	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
		C10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C11	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
		PROMEDIO	0.41	0.27	0.63				
		cp en 5000nL	62.74	41.17	95.77				
		<b>cp en 100ng</b>	<b>62.74</b>	<b>41.17</b>	<b>95.77</b>				
		A1	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
		A2	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A3	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		A4	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
A5		0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823	
A6		0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724	
A7		0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823	
A8		0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417	
A9	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724		
A10	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535		
A11	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976		
PROMEDIO	0.40	0.26	0.62						
cp en 5000nL	60.95	39.75	93.54						
<b>cp en 100ng</b>	<b>60.95</b>	<b>39.75</b>	<b>93.54</b>						
ac p-5	5	NTC	NaN	NaN	NaN	128	128	0	NaN - NaN

45	A1	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
	A2	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
	A3	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
	A4	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
	A5	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
	A6	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
	A7	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
	A8	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
	A9	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
	A10	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
	A11	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
PROMEDIO	0.30	0.19	0.49					
cp en 5000nL	45.72	28.40	73.89					
<b>cp en 100ng</b>	<b>45717.63</b>	<b>28400.83</b>	<b>73888.43</b>					
53	A1	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
	A2	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
	A3	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
	A4	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
	A5	0.2271	0.1317	0.3915	64	51	0	0.1317 - 0.3915
	A6	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
	A7	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
	A8	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
	A9	NaN	NaN	NaN	64	64	0	NaN - NaN
	A10	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
	A11	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
PROMEDIO	0.29	0.14	0.40					
cp en 5000nL	44.39	21.94	61.18					
<b>cp en 100ng</b>	<b>44390.15</b>	<b>21939.39</b>	<b>61177.27</b>					
63	C1	0.2877	0.1759	0.4704	64	48	0	0.1759 - 0.4704
	C2	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
	C3	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
	C4	0.3087	0.1916	0.4976	64	47	0	0.1916 - 0.4976
	C5	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
	C6	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
	C7	0.2671	0.1608	0.4437	64	49	0	0.1608 - 0.4437
	C8	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
	C9	NaN	NaN	NaN	64	64	0	NaN - NaN
	C10	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
	C11	NaN	NaN	NaN	64	64	0	NaN - NaN
PROMEDIO	0.30	0.17	0.45					
cp en 5000nL	46.06	25.62	67.87					
<b>cp en 100ng</b>	<b>46056.82</b>	<b>25619.53</b>	<b>67873.74</b>					
63	A1	0.1542	0.0734	0.3236	49	42	15	0.0734 - 0.3236
	A2	0.2697	0.1563	0.4652	55	42	9	0.1563 - 0.4652
	A3	0.2877	0.1667	0.4964	52	39	12	0.1667 - 0.4964
	A4	0.1651	0.0786	0.3466	46	39	18	0.0786 - 0.3466
	A5	0.3054	0.1837	0.5075	57	42	7	0.1837 - 0.5075
	A6	0.2187	0.121	0.3954	56	45	8	0.1210 - 0.3954
	A7	0.2326	0.1287	0.4206	53	42	11	0.1287 - 0.4206
	A8	0.0852	0.032	0.227	49	45	15	0.0320 - 0.2270
	A9	0.2719	0.146	0.5064	42	32	22	0.1460 - 0.5064
	A10	0.1651	0.0786	0.3466	46	39	18	0.0786 - 0.3466
	A11	0.2877	0.1631	0.5076	48	36	16	0.1631 - 0.5076
PROMEDIO	0.22	0.12	0.41					
cp en 5000nL	33.65	18.29	62.57					
<b>cp en 100ng</b>	<b>33654.27</b>	<b>18293.39</b>	<b>62574.38</b>					

## ANEXO X

### Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación del plásmido circular a 100 copias

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON 8891	57	NTC	NaN	NaN	NaN	238	238	18	NaN - NaN
		A1	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270

		A2	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		A3	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		A4	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		A5	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		A6	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		A7	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		A8	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		A9	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		A10	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		A11	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		PROMEDIO	0.07	0.03	0.18				
		cp en 5000nL	10.30	4.14	26.82				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>8.84E+09</b>	<b>3.55E+09</b>	<b>2.30E+10</b>				
		B1	0.0157	0.0022	0.1118	64	63	0	0.0022 - 0.1118
		B2	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		B3	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		B4	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		B5	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		B6	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		B7	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B8	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B9	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		B10	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B11	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		PROMEDIO	0.05	0.02	0.15				
		cp en 5000nL	7.58	2.74	23.12				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>6.50E+09</b>	<b>2.35E+09</b>	<b>1.98E+10</b>				
	75	A1	0.0841	0.035	0.2021	62	57	2	0.0350 - 0.2021
		A2	0.1358	0.0679	0.2717	63	55	1	0.0679 - 0.2717
		A3	0.1178	0.0561	0.2472	63	56	1	0.0561 - 0.2472
		A4	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228
		A5	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987
		A6	0.1178	0.0561	0.2472	63	56	1	0.0561 - 0.2472
		A7	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215
		A8	0.0667	0.025	0.1777	62	58	2	0.0250 - 0.1777
		A9	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		A10	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228
		A11	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228
		PROMEDIO	0.11	0.05	0.23				
		cp en 5000nL	16.20	7.52	35.17				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.38E+10</b>	<b>6.39E+09</b>	<b>2.99E+10</b>				
		B1	0.0488	0.0157	0.1513	63	60	1	0.0157 - 0.1513
		B2	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987
		B3	0.1358	0.0679	0.2717	63	55	1	0.0679 - 0.2717
		B4	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		B5	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B6	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228
		B7	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		B8	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
	B9	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192	
	B10	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228	
	B11	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228	
	PROMEDIO	0.08	0.03	0.19					
	cp en 5000nL	12.06	5.13	29.36					
	<b>cp en 1mg</b>	<b>1.02E+10</b>	<b>4.36E+09</b>	<b>2.49E+10</b>					
acp-1	69	NTC	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	0.0619	0.02	0.1919	50	47	14	0.0200 - 0.1919
		A2	0.0834	0.0313	0.2222	50	46	14	0.0313 - 0.2222
		A3	0.0496	0.016	0.1538	62	59	2	0.0160 - 0.1538
		A4	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987
		A5	0.0513	0.0165	0.1591	60	57	4	0.0165 - 0.1591
		A6	0.0168	0.0024	0.1193	60	59	4	0.0024 - 0.1193
		A7	0.0488	0.0157	0.1513	63	60	1	0.0157 - 0.1513
		A8	0.0702	0.0263	0.1871	59	55	5	0.0263 - 0.1871
		A9	0.1018	0.0457	0.2266	62	56	2	0.0457 - 0.2266
		A10	0.0323	0.0081	0.129	63	61	1	0.0081 - 0.1290
		A11	0.0522	0.0168	0.1618	59	56	5	0.0168 - 0.1618
		PROMEDIO	0.06	0.02	0.17				
		cp en 5000nL	8.97	3.21	26.18				

		<b>cp en 1mg</b>	<b>9.88E+09</b>	<b>3.54E+09</b>	<b>2.88E+10</b>					
		B1	0.0377	0.0094	0.1509	54	52	10	0.0094 - 0.1509	
		B2	0.0385	0.0096	0.1538	53	51	11	0.0096 - 0.1538	
		B3	0.0667	0.025	0.1777	62	58	2	0.0250 - 0.1777	
		B4	0.0656	0.0246	0.1748	63	59	1	0.0246 - 0.1748	
		B5	0.0328	0.0082	0.1311	62	60	2	0.0082 - 0.1311	
		B6	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720	
		B7	0.0323	0.0081	0.129	63	61	1	0.0081 - 0.1290	
		B8	0.0656	0.0246	0.1748	63	59	1	0.0246 - 0.1748	
		B9	0.0488	0.0157	0.1513	63	60	1	0.0157 - 0.1513	
		B10	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489	
		B11	0.0656	0.0246	0.1748	63	59	1	0.0246 - 0.1748	
		PROMEDIO	0.05	0.02	0.16					
		cp en 5000nL	7.80	2.61	23.95					
		<b>cp en 1mg</b>	<b>8.59E+09</b>	<b>2.87E+09</b>	<b>2.64E+10</b>					
	75	A1	0.1241	0.0591	0.2603	60	53	4	0.0591 - 0.2603	
		A2	0.0522	0.0168	0.1618	59	56	5	0.0168 - 0.1618	
		A3	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987	
		A4	0.0678	0.0255	0.1807	61	57	3	0.0255 - 0.1807	
		A5	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987	
		A6	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987	
		A7	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987	
		A8	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720	
		A9	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720	
		A10	0.0323	0.0081	0.129	63	61	1	0.0081 - 0.1290	
		A11	0.1568	0.0816	0.3016	62	53	2	0.0816 - 0.3016	
		PROMEDIO	0.08	0.03	0.20					
		cp en 5000nL	12.30	5.19	29.92					
			<b>cp en 1mg</b>	<b>1.04E+10</b>	<b>4.41E+09</b>	<b>2.54E+10</b>				
			B1	0.1198	0.0571	0.2514	62	55	2	0.0571 - 0.2514
			B2	0.0163	0.0023	0.1154	62	61	2	0.0023 - 0.1154
			B3	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
			B4	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
			B5	0.0827	0.0344	0.1987	63	58	1	0.0344 - 0.1987
			B6	0.1018	0.0457	0.2266	62	56	2	0.0457 - 0.2266
			B7	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
			B8	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
			B9	0.1178	0.0561	0.2472	63	56	1	0.0561 - 0.2472
		B10	0.0656	0.0246	0.1748	63	59	1	0.0246 - 0.1748	
		B11	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671	
		PROMEDIO	0.08	0.04	0.20					
		cp en 5000nL	12.36	5.37	29.92					
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.05E+10</b>	<b>4.56E+09</b>	<b>2.54E+10</b>					

## ANEXO XI

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación del plásmido circular a 200 copias

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON88913-8	57	NTC	NaN	NaN	NaN	238	238	18	NaN - NaN
		C1	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		C2	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		C3	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		C4	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		C5	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		C6	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		C7	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		C8	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
		C9	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		C10	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		C11	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		PROMEDIO	0.12	0.06	0.24				
cp en 5000nL	17.50	8.58	36.65						
		<b>cp en 1mg</b>	<b>7.59E+09</b>	<b>3.72E+09</b>	<b>1.59E+10</b>				

		D1	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		D2	0.0317	0.0079	0.127	64	62	0	0.0079 - 0.1270
		D3	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		D4	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		D5	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		D6	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		D7	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		D8	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		D9	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		D10	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		D11	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
PROMEDIO	0.08	0.04	0.20						
cp en 5000nL	12.41	5.36	29.71						
<b>cp en 1mg</b>	<b>5.38E+09</b>	<b>2.32E+09</b>	<b>1.29E+10</b>						
	75	C1	0.1919	0.1062	0.3468	63	52	1	0.1062 - 0.3468
		C2	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C3	0.1919	0.1062	0.3468	63	52	1	0.1062 - 0.3468
		C4	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		C5	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		C6	0.1728	0.0929	0.3215	63	53	1	0.0929 - 0.3215
		C7	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		C8	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		C9	0.1178	0.0561	0.2472	63	56	1	0.0561 - 0.2472
		C10	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		C11	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
PROMEDIO	0.15	0.08	0.29						
cp en 5000nL	23.25	12.23	44.56						
<b>cp en 1mg</b>	<b>9.17E+09</b>	<b>4.82E+09</b>	<b>1.76E+10</b>						
		D1	0.2311	0.134	0.3985	63	50	1	0.1340 - 0.3985
		D2	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		D3	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
		D4	0.2559	0.1514	0.4328	62	48	2	0.1514 - 0.4328
		D5	0.1018	0.0457	0.2266	62	56	2	0.0457 - 0.2266
		D6	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		D7	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		D8	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		D9	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		D10	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		D11	0.2469	0.146	0.4174	64	50	0	0.1460 - 0.4174
PROMEDIO	0.16	0.09	0.30						
cp en 5000nL	24.18	12.92	45.78						
<b>cp en 1mg</b>	<b>9.54E+09</b>	<b>5.10E+09</b>	<b>1.81E+10</b>						
	59	NTC	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		A2	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		A3	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		A4	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		A5	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		A6	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		A7	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		A8	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
		A9	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
		A10	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
A11	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671		
PROMEDIO	0.12	0.06	0.25						
cp en 5000nL	17.85	8.63	37.20						
<b>cp en 1mg</b>	<b>7.73E+09</b>	<b>3.74E+09</b>	<b>1.61E+10</b>						
		B1	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
		B2	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		B3	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		B4	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		B5	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		B6	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		B7	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
		B8	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
		B9	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
		B10	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
		B11	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
PROMEDIO	0.08	0.04	0.20						



75	cp en 5000nL	12.58	5.34	29.97				
	<b>cp en 1mg</b>	<b>5.45E+09</b>	<b>2.31E+09</b>	<b>1.30E+10</b>				
	C1	0.1018	0.0457	0.2266	62	56	2	0.0457 - 0.2266
	C2	0.1744	0.0871	0.3489	50	42	14	0.0871 - 0.3489
	C3	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
	C4	0.1178	0.0561	0.2472	63	56	1	0.0561 - 0.2472
	C5	0.1542	0.0802	0.2965	63	54	1	0.0802 - 0.2965
	C6	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
	C7	0.048	0.0155	0.1489	64	61	0	0.0155 - 0.1489
	C8	0.1335	0.0667	0.2671	64	56	0	0.0667 - 0.2671
	C9	0.1699	0.0913	0.316	64	54	0	0.0913 - 0.3160
	C10	0.1515	0.0788	0.2914	64	55	0	0.0788 - 0.2914
	C11	0.0645	0.0242	0.172	64	60	0	0.0242 - 0.1720
	PROMEDIO	0.12	0.06	0.25				
	cp en 5000nL	18.09	8.77	37.93				
	<b>cp en 1mg</b>	<b>7.14E+09</b>	<b>3.46E+09</b>	<b>1.50E+10</b>				
	D1	0.0841	0.035	0.2021	62	57	2	0.0350 - 0.2021
	D2	0.1358	0.0679	0.2717	63	55	1	0.0679 - 0.2717
	D3	0.1001	0.0449	0.2228	63	57	1	0.0449 - 0.2228
	D4	0.1886	0.1044	0.3408	64	53	0	0.1044 - 0.3408
	D5	0.1178	0.0561	0.2472	63	56	1	0.0561 - 0.2472
	D6	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
	D7	0.0984	0.0442	0.2192	64	58	0	0.0442 - 0.2192
	D8	0.1542	0.0802	0.2965	63	54	1	0.0802 - 0.2965
	D9	0.0813	0.0339	0.1955	64	59	0	0.0339 - 0.1955
	D10	0.1919	0.1062	0.3468	63	52	1	0.1062 - 0.3468
	D11	0.1158	0.0552	0.2431	64	57	0	0.0552 - 0.2431
PROMEDIO	0.13	0.06	0.26					
cp en 5000nL	19.06	9.41	38.96					
<b>cp en 1mg</b>	<b>7.52E+09</b>	<b>3.71E+09</b>	<b>1.54E+10</b>					

## ANEXO XII

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación del plásmido linearizado a 100 copias

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON88913-8	73	NTC	NaN	NaN	NaN	238	238	18	NaN - NaN
		A1	0.2076	0.1178	0.366	64	52	0	0.1178 - 0.3660
		A2	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		A3	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		A4	0.6931	0.4868	0.987	64	32	0	0.4868 - 0.9870
		A5	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		A6	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A7	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		A8	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		A9	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		A10	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A11	0.7577	0.537	1.069	64	30	0	0.5370 - 1.0690
		PROMEDIO	0.47	0.31	0.70				
		cp en 5000nL	70.46	47.13	105.59				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.20E+10</b>	<b>8.04E+09</b>	<b>1.80E+10</b>				
		B1	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		B2	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		B3	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		B4	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		B5	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733
		B6	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		B7	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		B8	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		B9	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		B10	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		B11	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
		PROMEDIO	0.47	0.32	0.71				
cp en 5000nL	71.40	47.74	106.85						

		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.22E+10</b>	<b>8.15E+09</b>	<b>1.82E+10</b>				
		C1	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C2	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C3	0.3747	0.2411	0.5823	64	44	0	0.2411 - 0.5823
		C4	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		C5	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		C6	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
		C7	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		C8	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
		C9	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		C10	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		C11	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		PROMEDIO	0.49	0.33	0.73				
		cp en 5000nL	73.79	49.58	109.90				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.26E+10</b>	<b>8.46E+09</b>	<b>1.88E+10</b>				
		D1	0.47	0.3139	0.7038	64	40	0	0.3139 - 0.7038
		D2	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		D3	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		D4	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		D5	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		D6	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		D7	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		D8	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		D9	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		D10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		D11	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		PROMEDIO	0.48	0.32	0.72				
		cp en 5000nL	72.76	48.77	108.60				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.24E+10</b>	<b>8.32E+09</b>	<b>1.85E+10</b>				
		NTC	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	0.2938	0.1737	0.4969	55	41	9	0.1737 - 0.4969
		A2	0.3102	0.1896	0.5073	60	44	4	0.1896 - 0.5073
		A3	0.4473	0.2935	0.6817	61	39	3	0.2935 - 0.6817
		A4	0.6604	0.4559	0.9566	60	31	4	0.4559 - 0.9566
		A5	0.2719	0.1637	0.4518	63	48	1	0.1637 - 0.4518
		A6	0.4636	0.3069	0.7002	62	39	2	0.3069 - 0.7002
		A7	0.3819	0.2458	0.5936	63	43	1	0.2458 - 0.5936
		A8	0.3819	0.2458	0.5936	63	43	1	0.2458 - 0.5936
		A9	0.5322	0.3607	0.7852	63	37	1	0.3607 - 0.7852
		A10	0.6624	0.4628	0.948	64	33	0	0.4628 - 0.9480
		A11	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
		PROMEDIO	0.44	0.29	0.67				
		cp en 5000nL	66.16	43.48	100.92				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.14E+10</b>	<b>7.47E+09</b>	<b>1.73E+10</b>				
		B1	0.5878	0.3917	0.882	54	30	10	0.3917 - 0.8820
		B2	0.5947	0.4026	0.8784	58	32	6	0.4026 - 0.8784
		B3	0.3429	0.2156	0.5456	62	44	2	0.2156 - 0.5456
		B4	0.5718	0.3901	0.8381	62	35	2	0.3901 - 0.8381
		B5	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
		B6	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		B7	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
		B8	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		B9	0.499	0.3271	0.7611	56	34	8	0.3271 - 0.7611
		B10	0.5878	0.4037	0.8559	63	35	1	0.4037 - 0.8559
		B11	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		PROMEDIO	0.52	0.35	0.78				
		cp en 5000nL	78.97	53.10	117.53				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.36E+10</b>	<b>9.12E+09</b>	<b>2.02E+10</b>				
		C1	0.2754	0.1596	0.4751	54	41	10	0.1596 - 0.4751
		C2	0.3895	0.2506	0.6054	62	42	2	0.2506 - 0.6054
		C3	0.3497	0.2198	0.5563	61	43	3	0.2198 - 0.5563
		C4	0.5845	0.3987	0.8569	61	34	3	0.3987 - 0.8569
		C5	0.3819	0.2458	0.5936	63	43	1	0.2458 - 0.5936
		C6	0.4953	0.3334	0.736	64	39	0	0.3334 - 0.7360
		C7	0.4055	0.2636	0.6237	63	42	1	0.2636 - 0.6237
		C8	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		C9	0.4453	0.2949	0.6724	64	41	0	0.2949 - 0.6724
		C10	0.4212	0.2765	0.6417	64	42	0	0.2765 - 0.6417
		C11	0.6035	0.4171	0.8733	64	35	0	0.4171 - 0.8733

acp-1

72

PROMEDIO	0.45	0.29	0.68				
cp en 5000nL	67.49	44.55	102.44				
<b>cp en 1mg</b>	<b>1.16E+10</b>	<b>7.65E+09</b>	<b>1.76E+10</b>				
D1	0.3403	0.2047	0.5659	52	37	12	0.2047 - 0.5659
D2	0.3542	0.2196	0.5711	57	40	7	0.2196 - 0.5711
D3	0.4495	0.292	0.6919	58	37	6	0.2920 - 0.6919
D4	0.3895	0.2506	0.6054	62	42	2	0.2506 - 0.6054
D5	0.3302	0.2076	0.5253	64	46	0	0.2076 - 0.5253
D6	0.5055	0.3402	0.7513	63	38	1	0.3402 - 0.7513
D7	0.5213	0.3534	0.769	64	38	0	0.3534 - 0.7690
D8	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
D9	0.3977	0.2586	0.6117	64	43	0	0.2586 - 0.6117
D10	0.5596	0.3819	0.8201	63	36	1	0.3819 - 0.8201
D11	0.5754	0.3952	0.8376	64	36	0	0.3952 - 0.8376
PROMEDIO	0.47	0.32	0.71				
cp en 5000nL	71.83	47.76	108.29				
<b>cp en 1mg</b>	<b>1.23E+10</b>	<b>8.20E+09</b>	<b>1.86E+10</b>				

### ANEXO XIII

Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación del plásmido linearizado a 200 copias

Secuencia	Corrida	Subarreglo	Average Copies per Reaction	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval	Total Replicates	Total Negatives	Total Omitted	Confidence Interval Range
MON89913-8	69	NTC	NaN	NaN	NaN	238	238	18	NaN - NaN
		C1	1.0818	0.7782	1.5038	59	20	5	0.7782 - 1.5038
		C2	1.0826	0.7851	1.4928	62	21	2	0.7851 - 1.4928
		C3	0.7156	0.4714	1.0864	45	22	19	0.4714 - 1.0864
		C4	1.1741	0.8386	1.6439	55	17	9	0.8386 - 1.6439
		C5	1.4604	1.0539	2.0236	56	13	8	1.0539 - 2.0236
		C6	0.9734	0.6623	1.4309	45	17	19	0.6623 - 1.4309
		C7	1.4955	1.0858	2.0598	58	13	6	1.0858 - 2.0598
		C8	1.0076	0.7294	1.3921	63	23	1	0.7294 - 1.3921
		C9	1.3099	0.9607	1.7861	63	17	1	0.9607 - 1.7861
		C10	1.0799	0.7628	1.5289	53	18	11	0.7628 - 1.5289
		C11	1.3099	0.9607	1.7861	63	17	1	0.9607 - 1.7861
		PROMEDIO	1.15	0.83	1.61				
		cp en 5000nL	174.80	125.19	244.28				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.28E+10</b>	<b>9.14E+09</b>	<b>1.78E+10</b>				
		D1	0.8362	0.5916	1.182	60	26	4	0.5916 - 1.1820
		D2	1.2939	0.9462	1.7694	62	17	2	0.9462 - 1.7694
		D3	1.117	0.7956	1.5681	55	18	9	0.7956 - 1.5681
	D4	1.3312	0.9499	1.8657	53	14	11	0.9499 - 1.8657	
	D5	1.424	1.0211	1.986	54	13	10	1.0211 - 1.9860	
	D6	1.2611	0.9166	1.7352	60	17	4	0.9166 - 1.7352	
	D7	1.0296	0.7319	1.4484	56	20	8	0.7319 - 1.4484	
	D8	1.4191	1.0403	1.9358	62	15	2	1.0403 - 1.9358	
	D9	1.2777	0.9315	1.7525	61	17	3	0.9315 - 1.7525	
	D10	1.2809	0.9156	1.792	54	15	10	0.9156 - 1.7920	
	D11	1.0531	0.7146	1.552	43	15	21	0.7146 - 1.5520	
	PROMEDIO	1.21	0.87	1.69					
	cp en 5000nL	183.52	131.61	256.02					
	<b>cp en 1mg</b>	<b>1.34E+10</b>	<b>9.61E+09</b>	<b>1.87E+10</b>					
	A1	NaN	NaN	NaN	38	38	26	NaN - NaN	
	A2	0.3011	0.1745	0.5196	50	37	14	0.1745 - 0.5196	
	A3	0.6931	0.4683	1.0259	52	26	12	0.4683 - 1.0259	
	A4	0.7122	0.4845	1.0469	53	26	11	0.4845 - 1.0469	
A5	1.1151	0.808	1.5391	61	20	3	0.8080 - 1.5391		
A6	0.5274	0.3547	0.784	61	36	3	0.3547 - 0.7840		
A7	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122		
A8	1.1151	0.808	1.5391	61	20	3	0.8080 - 1.5391		
A9	1.0521	0.7637	1.4495	63	22	1	0.7637 - 1.4495		
A10	1.1314	0.8225	1.5562	62	20	2	0.8225 - 1.5562		
A11	0.7097	0.4954	1.0166	61	30	3	0.4954 - 1.0166		
PROMEDIO	0.81	0.57	1.16						

		cp en 5000nL	123.47	87.02	175.59				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.06E+10</b>	<b>7.47E+09</b>	<b>1.51E+10</b>				
		D1	NaN	NaN	NaN	44	44	20	NaN - NaN
		D2	0.2642	0.1531	0.4556	56	43	8	0.1531 - 0.4556
		D3	0.4877	0.3198	0.7438	57	35	7	0.3198 - 0.7438
		D4	1.2879	0.9317	1.7802	58	16	6	0.9317 - 1.7802
		D5	0.277	0.1667	0.4602	62	47	2	0.1667 - 0.4602
		D6	0.548	0.374	0.8028	64	37	0	0.3740 - 0.8028
		D7	0.2113	0.1199	0.3725	63	51	1	0.1199 - 0.3725
		D8	1.2368	0.9029	1.6941	62	18	2	0.9029 - 1.6941
		D9	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
		D10	1.0521	0.7637	1.4495	63	22	1	0.7637 - 1.4495
		D11	1.4191	1.0403	1.9358	62	15	2	1.0403 - 1.9358
		PROMEDIO	0.84	0.59	1.19				
		cp en 5000nL	126.94	90.12	179.63				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.09E+10</b>	<b>7.74E+09</b>	<b>1.54E+10</b>				
		NTC	NaN	NaN	NaN	256	256	0	NaN - NaN
		A1	1.0415	0.7289	1.488	51	18	13	0.7289 - 1.4880
		A2	0.9676	0.6711	1.3951	50	19	14	0.6711 - 1.3951
		A3	1.118	0.7888	1.5847	52	17	12	0.7888 - 1.5847
		A4	1.1701	0.843	1.6241	58	18	6	0.8430 - 1.6241
		A5	1.5686	1.1037	2.2295	48	10	16	1.1037 - 2.2295
		A6	1.2528	0.9173	1.7109	63	18	1	0.9173 - 1.7109
		A7	1.7228	1.2434	2.3869	56	10	8	1.2434 - 2.3869
		A8	1.5724	1.1253	2.1972	53	11	11	1.1253 - 2.1972
		A9	1.3705	1.0064	1.8664	63	16	1	1.0064 - 1.8664
		A10	1.0986	0.7865	1.5345	57	19	7	0.7865 - 1.5345
		A11	1.5755	1.1443	2.1693	58	12	6	1.1443 - 2.1693
		PROMEDIO	1.31	0.94	1.84				
		cp en 5000nL	199.15	142.68	278.05				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.45E+10</b>	<b>1.04E+10</b>	<b>2.03E+10</b>				
		B1	0.8473	0.5611	1.2795	42	18	22	0.5611 - 1.2795
		B2	1.1977	0.8509	1.6858	53	16	11	0.8509 - 1.6858
		B3	1.116	0.802	1.5529	58	19	6	0.8020 - 1.5529
		B4	1.1314	0.8225	1.5562	62	20	2	0.8225 - 1.5562
		B5	1.4663	1.0453	2.0569	52	12	12	1.0453 - 2.0569
		B6	1.3471	0.952	1.9061	50	13	14	0.9520 - 1.9061
		B7	1.2272	0.8861	1.6997	58	17	6	0.8861 - 1.6997
		B8	1.1701	0.843	1.6241	58	18	6	0.8430 - 1.6241
		B9	0.9163	0.6436	1.3045	55	22	9	0.6436 - 1.3045
		B10	1.038	0.7184	1.4998	48	17	16	0.7184 - 1.4998
		B11	1.3499	0.9666	1.8852	54	14	10	0.9666 - 1.8852
		PROMEDIO	1.16	0.83	1.64				
		cp en 5000nL	176.41	125.23	248.63				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.29E+10</b>	<b>9.15E+09</b>	<b>1.82E+10</b>				
		A1	0.3969	0.2524	0.6241	58	39	6	0.2524 - 0.6241
		A2	0.9651	0.6965	1.3373	63	24	1	0.6965 - 1.3373
		A3	0.3522	0.2241	0.5535	64	45	0	0.2241 - 0.5535
		A4	0.9491	0.6823	1.3202	62	24	2	0.6823 - 1.3202
		A5	1.2144	0.8903	1.6566	64	19	0	0.8903 - 1.6566
		A6	1.5939	1.1756	2.1612	64	13	0	1.1756 - 2.1612
		A7	2.213	1.6135	3.0351	64	7	0	1.6135 - 3.0351
		A8	0.7916	0.5634	1.1122	64	29	0	0.5634 - 1.1122
		A9	1.1144	0.8136	1.5264	64	21	0	0.8136 - 1.5264
		A10	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
		A11	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
		PROMEDIO	1.01	0.73	1.41				
		cp en 5000nL	153.76	110.61	214.03				
		<b>cp en 1mg</b>	<b>1.31E+10</b>	<b>9.43E+09</b>	<b>1.83E+10</b>				
		B1	0.6325	0.4396	0.9101	64	34	0	0.4396 - 0.9101
		B2	0.6774	0.4732	0.9698	63	32	1	0.4732 - 0.9698
		B3	1.626	1.1903	2.221	61	12	3	1.1903 - 2.2210
		B4	2.7726	1.9691	3.904	64	4	0	1.9691 - 3.9040
		B5	0.9651	0.6965	1.3373	63	24	1	0.6965 - 1.3373
		B6	1.1987	0.8761	1.64	63	19	1	0.8761 - 1.6400
		B7	1.2685	0.9315	1.7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274
		B8	0.94	0.6788	1.3017	64	25	0	0.6788 - 1.3017
		B9	0.9008	0.6484	1.2515	64	26	0	0.6484 - 1.2515
		B10	1.2685	0.9315	1.7274	64	18	0	0.9315 - 1.7274

	B11	0.863	0.619	1.2032	64	27	0	0.6190 - 1.2032
	PROMEDIO	1.19	0.86	1.65				
	cp en 5000nL	180.62	130.22	250.60				
	<b>cp en 1mg</b>	<b>1.54E+10</b>	<b>1.11E+10</b>	<b>2.14E+10</b>				

**ANEXO XIV**

**Datos desprendidos de los ensayos realizados en la cuantificación de las mezclas de algodón genéticamente modificado por qPCR**

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	21.787	21.739	0.048	100000.00		
2	A2		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	21.756	21.739	0.048	100000.00		
3	A3		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	21.738	21.739	0.048	100000.00		
4	A4		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	21.674	21.739	0.048	100000.00		
6	A6	M 100 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.656	23.683	0.027	27321.82	<b>26821.46</b>	492.287
7	A7	M 100 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.681	23.683	0.027	26857.02	<b>26821.46</b>	492.287
8	A8	M 100 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.676	23.683	0.027	26960.83	<b>26821.46</b>	492.287
9	A9	M 100 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.720	23.683	0.027	26146.19	<b>26821.46</b>	492.287
11	A11	NTC	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	37.450	37.450		2.19	<b>2.19</b>	
12	A12	NTC	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	Undetermined	37.450				
13	B1		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	25.148	25.179	0.044	10000.00		
14	B2		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	25.188	25.179	0.044	10000.00		
15	B3		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	25.237	25.179	0.044	10000.00		
16	B4		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	25.143	25.179	0.044	10000.00		
18	B6	M 10 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.073	22.107	0.024	80626.45	<b>78796.50</b>	1,322.486
19	B7	M 10 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.107	22.107	0.024	78770.54	<b>78796.50</b>	1,322.486
20	B8	M 10 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.130	22.107	0.024	77526.86	<b>78796.50</b>	1,322.486
21	B9	M 10 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.117	22.107	0.024	78262.16	<b>78796.50</b>	1,322.486
23	B11	C- MR 100	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	37.180	37.258	0.110	2.64	<b>2.51</b>	0.188
24	B12	C- MR 100	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	37.336	37.258	0.110	2.37	<b>2.51</b>	0.188
25	C1		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	28.559	28.447	0.127	1000.00		
26	C2		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	28.539	28.447	0.127	1000.00		
27	C3		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	28.404	28.447	0.127	1000.00		
28	C4		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	28.288	28.447	0.127	1000.00		
30	C6	M 1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	21.991	22.003	0.024	85265.55	<b>84565.47</b>	1,407.249
31	C7	M 1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.020	22.003	0.024	83621.80	<b>84565.47</b>	1,407.249
32	C8	M 1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.027	22.003	0.024	83182.15	<b>84565.47</b>	1,407.249
33	C9	M 1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	21.975	22.003	0.024	86192.38	<b>84565.47</b>	1,407.249
35	C11	C+ MR 469	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.370	22.385	0.021	65806.13	<b>65146.43</b>	932.967
36	C12	C+ MR 469	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.400	22.385	0.021	64486.72	<b>65146.43</b>	932.967
37	D1		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	32.164	31.877	0.259	100.00		
38	D2		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	31.948	31.877	0.259	100.00		
39	D3		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	31.541	31.877	0.259	100.00		
40	D4		acp-1	STANDARD	FAM	TAMRA	31.857	31.877	0.259	100.00		
42	D6	M 0.1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	21.836	21.934	0.120	94804.70	<b>88881.84</b>	7,139.943
43	D7	M 0.1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	21.970	21.934	0.120	86527.37	<b>88881.84</b>	7,139.943
44	D8	M 0.1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.088	21.934	0.120	79819.39	<b>88881.84</b>	7,139.943
45	D9	M 0.1 %	acp-1	UNKNOWN	FAM	TAMRA	21.843	21.934	0.120	94375.88	<b>88881.84</b>	7,139.943
49	E1		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	24.158	24.058	0.086	100000.00		
50	E2		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	24.103	24.058	0.086	100000.00		
51	E3		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	23.982	24.058	0.086	100000.00		
52	E4		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	23.990	24.058	0.086	100000.00		
54	E6	M 100 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.830	24.849	0.021	60987.23	<b>60201.55</b>	832.768
55	E7	M 100 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.853	24.849	0.021	60052.90	<b>60201.55</b>	832.768

56	E8	M 100 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.877	24.849	0.021	59096.20	60201.55	832.768
57	E9	M 100 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.838	24.849	0.021	60669.86	60201.55	832.768
59	E11	NTC	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined					
60	E12	NTC	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined					
61	F1		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.711	27.600	0.089	10000.00		
62	F2		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.619	27.600	0.089	10000.00		
63	F3		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.573	27.600	0.089	10000.00		
64	F4		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.498	27.600	0.089	10000.00		
66	F6	M 10 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.451	28.303	0.100	5427.36	6003.47	389.423
67	F7	M 10 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.233	28.303	0.100	6280.24	6003.47	389.423
68	F8	M 10 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.271	28.303	0.100	6124.44	6003.47	389.423
69	F9	M 10 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.257	28.303	0.100	6181.83	6003.47	389.423
71	F11	C- MR 186	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	38.133	38.133		8.43	8.43	
72	F12	C- MR 186	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	38.133				
73	G1		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.154	30.951	0.149	1000.00		
74	G2		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	30.852	30.951	0.149	1000.00		
75	G3		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	30.971	30.951	0.149	1000.00		
76	G4		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	30.827	30.951	0.149	1000.00		
78	G6	M 1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.851	31.805	0.040	560.18	578.00	15.301
79	G7	M 1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.811	31.805	0.040	575.21	578.00	15.301
80	G8	M 1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.801	31.805	0.040	579.22	578.00	15.301
81	G9	M 1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	31.755	31.805	0.040	597.38	578.00	15.301
83	G11	C+ MR 469	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	24.990	25.119	0.182	54796.94	50471.88	6,116.559
84	G12	C+ MR 469	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.247	25.119	0.182	46146.82	50471.88	6,116.559
85	H1		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	34.479	34.431	0.071	100.00		
86	H2		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	34.500	34.431	0.071	100.00		
87	H3		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	34.396	34.431	0.071	100.00		
88	H4		MON88913-8	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	34.348	34.431	0.071	100.00		
90	H6	M 0.1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.046	34.980	0.319	66.28	70.50	15.360
91	H7	M 0.1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.342	34.980	0.319	54.40	70.50	15.360
92	H8	M 0.1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.963	34.980	0.319	70.07	70.50	15.360
93	H9	M 0.1 %	MON88913-8	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34.567	34.980	0.319	91.25	70.50	15.360