

# Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM)

Carolina Maldonado  
Elsa Leonor Álvarez  
Javier Castellanos  
(Compiladores)



Proyecto GEF-BM "Desarrollo de capacidades para implementar en Colombia el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad - Convenio de Diversidad Biológica"

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos  
ALEXANDER VON HUMBOLDT



© Instituto de Investigación de Recursos Biológicos  
Alexander von Humboldt  
2007

Los textos utilizados pueden ser utilizados total o  
parcialmente citando la fuente.

### **CONTRIBUCIÓN IAvH # 396**

### **COORDINACIÓN EDITORIAL**

Claudia María Villa G.  
María Margarita Gaitán U.

### **DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN**

Isabella Lomanto Uribe

### **IMPRESIÓN**

Arte y Fotolito (ARFO)

Impreso en Bogotá, D.C. - Colombia  
Agosto de 2007

1.000 ejemplares

**CITACIÓN SUGERIDA:** Maldonado C., Álvarez E. L. y Castellanos J. (comp.) 2007. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 70 p.

ISBN 978-958-8343-08-2

### **PALABRAS CLAVE:**

1. Organismos genéticamente modificados (OGM)
2. Bioseguridad
3. Detección de OGM
4. Transgenes

La presente publicación es uno de los productos del proyecto "Desarrollo de capacidades para implementar en Colombia el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad - Convenio de Diversidad Biológica", el cual fue cofinanciado por el Global Environmental Facility (GEF), con el Banco Mundial (BM) como entidad ejecutora y en el cual participaron los ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT); de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR); de la Protección Social (MPS); de Comercio, Industria y Turismo (MCIT); y de Relaciones Exteriores (MRE); el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH); el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA); el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima); el Departamento Nacional de Planeación (DNP); el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" (Colciencias); y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

**FERNANDO GAST HARDERS**  
Director General  
Instituto de Investigación de Recursos Biológicos  
Alexander von Humboldt

# Compiladores

---

**Carolina Maldonado**

Bióloga - Microbióloga - IAvH

Asistente Técnica Laboratorio de Detección y Monitoreo de OGM

curema@gmail.com

**Elsa Leonor Álvarez**

M.Sc - ICA

Directora Laboratorio de Detección y Monitoreo de OGM

laboratorio.ogm@ica.gov.co

**Javier Castellanos**

M.Sc. - Invima

Coordinador Laboratorio de Detección y Monitoreo de OGM

jcastellanos@invima.gov.co

# Contenido

---

<b>Presentación</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
<b>Muestreo y manejo de las muestras</b>	<b>15</b>
1. Tipos de muestras de OGM	15
2. Muestreo	15
3. Cadena de custodia	16
4. Requisitos de aceptabilidad de la muestra	17
5. Acondicionamiento de la muestra	17
<b>Fundamentos para el análisis molecular de OGM</b>	<b>18</b>
1. Métodos basados en ADN	18
1.1 Extracción de ADN	18
1.2 Cuantificación	20
1.3 Amplificación	20
1.4 PCR punto final	21
1.4.1 Electroforesis	22
1.5 PCR en tiempo real	22
1.6 Secuencias objetivo	23
1.6.1 No secuencia-específica	24
1.6.2 Secuencia-específica	24
1.7 Ventajas y desventajas de los métodos basados en ADN	25
2. Métodos basados en proteínas	25
2.1 Efectos de la matriz	26
2.2 Selección del antígeno	27
2.3 Cuantificación	27
2.4 ELISA	27
2.5 Tiras de flujo lateral	29
2.6 Western Blot	29
2.7 Ventajas y desventajas de los métodos basados en proteínas	30
<b>Fundamentos de la validación de los métodos para la detección de OGM</b>	<b>31</b>
1. Límites de detección (LD)	32
2. Límites de cuantificación (LC)	32
3. Validación de PCR	33
4. Validación de inmunoensayos	34
5. Materiales de referencia	34
6. Incertidumbre	35
<b>Informe de resultados</b>	<b>36</b>
<b>Protocolos para la detección molecular de OGM</b>	<b>36</b>
1. Muestras	36
2. Estrategia de muestreo y tamaño de muestra	37

3.	Acondicionamiento de las muestras	38
3.1	Protocolo para la molienda de muestras vegetales (semillas, granos) y alimentos (procesados y materias primas) (SDI, 2003)	38
3.2	Protocolo para la maceración de tejidos vegetales jóvenes	38
4.	Métodos basados en ADN	39
4.1	Extracción	39
4.1.1	Protocolo de extracción de ADN a partir de alimentos (Somma, 2005)	39
4.1.2	Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras vegetales con alto contenido de polisacáridos y polifenoles (Lin <i>et al.</i> , 2001)	41
4.1.3	Protocolo de extracción de ADN con CTAB (Doyle y Doyle, 1990)	42
4.1.4	Protocolo para la extracción de ADN a partir de semillas de arroz modificado por Dellaporta (European Commission, 2006)	43
4.1.5	Protocolo para la extracción de ADN a partir de tejido vegetal fresco (minipreparación) (Edwards <i>et al.</i> , 1999)	45
4.1.6	Procedimiento para la extracción de ADN a partir de muestras vegetales (minipreparación) (Pirttilä <i>et al.</i> , 2001)	46
4.2	Cuantificación	47
4.2.1	Protocolo para la estimación de la calidad y cantidad de ADN por electroforesis (Longo <i>et al.</i> , 2005)	47
4.2.2	Protocolo para la cuantificación de ADN por medio de espectrofotómetro (Universidad de Toledo, 2004)	48
5.	Amplificación	49
5.1	PCR punto final	52
5.1.1	Electroforesis (Longo <i>et al.</i> , 2005)	53
5.1.2	Amplificación por PCR en tiempo real con SYBR Green (QIAGEN, 2002)	53
6.	Métodos basados en proteínas	55
6.1	Extracción	55
6.1.1	EnviroLogix QuantiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac (Envirologix, 2007a)	55
6.1.2	EnviroLogix QuickStix™ Kit para granos de maíz Roundup Ready® NK603 determinando la proteína CP4 EPSPS (Envirologix, 2007b)	56
6.2	ELISA	56
6.2.1	EnviroLogix QuantiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac (Envirologix, 2007a)	56
6.3	Bandas de flujo lateral	57
6.3.1	EnviroLogix QuickStix™ Kit para granos de maíz Roundup Ready® NK603 determinando la proteína CP4 EPSPS (Envirologix, 2007b)	57
7.	Límites de detección	57
8.	Límites de cuantificación	58
9.	Informe de resultados	58
10.	Control de calidad para la detección de OGM	59
	<b>Glosario</b>	<b>60</b>
	<b>Referencias</b>	<b>64</b>

# Presentación

---

Los avances en biología molecular han llevado a desarrollos tales como las técnicas biotecnológicas, las cuales permiten la obtención de nuevos productos a través de las tecnologías del ADN recombinante (rADN). Estos procesos o productos de la biotecnología moderna tienen amplias aplicaciones en medicina, agricultura, ambiente e industria. Si bien en la mayoría de los casos ayudan a enfrentar o solucionar problemas o limitantes en diversos campos de aplicación, con una visión de desarrollo sostenible, también pueden ocasionar preocupaciones o temores al usuario no familiarizado con estas técnicas y a la sociedad en general. Esta situación ha estimulado el interés de los científicos sobre la evaluación *ex ante* de los posibles impactos de su quehacer y de sus desarrollos, y hacia la búsqueda de conservación y protección ambiental y de la salud, en un contexto de sostenibilidad, con el fin de garantizar un uso adecuado y conveniente de los avances científicos, englobado en el concepto de bioseguridad.

Estos planteamientos se encuentran reflejados en el Convenio de Diversidad Biológica (artículos 8, 16, 19) en los cuales se establece la necesidad de proteger el medio ambiente y la biodiversidad, considerando también la salud humana, frente a los posibles efectos adversos de los productos de la biotecnología moderna. Adicionalmente, se reconoce que la biotecnología moderna presenta un gran potencial para promover el bienestar de la humanidad, en particular en cuanto a la satisfacción de necesidades críticas de alimentación, agricultura y salud, donde los potenciales riesgos deben ser conocidos.

El “Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica”, más comúnmente conocido como Protocolo de Cartagena en Bioseguridad, es un acuerdo suplementario emanado del Convenio de Diversidad Biológica. Adoptado en enero de 2000, el Protocolo entró en vigor en septiembre de 2003 y constituye el primer marco regulatorio internacional en seguridad de la biotecnología y además es jurídicamente vinculante para las Partes. El Protocolo de Cartagena

busca regular la transferencia, el manejo y el uso de transgénicos u organismos vivos modificados (OVM) (también conocidos como organismos genéticamente modificados, OGM) que puedan tener efectos adversos en la biodiversidad, considerando riesgos a la salud humana, específicamente en relación con movimientos transfronterizos. Asimismo, el Protocolo pretende maximizar los beneficios de la biotecnología moderna mediante la minimización de sus posibles efectos adversos. Por ello, en el contexto del Protocolo de Cartagena, el concepto de bioseguridad se refiere a la búsqueda de instrumentos que permitan evaluar los riesgos con el fin de proteger la salud y el ambiente.

Colombia fue uno de los países líderes en la formulación y negociación del Protocolo de Cartagena en Bioseguridad, el cual fue aprobado mediante la Ley 740 de 2002, declarada exequible por la Corte Constitucional. El Punto Focal del Protocolo de Cartagena designado para Colombia es el Ministerio de Relaciones Exteriores y el Punto Focal designado para el Centro de Intercambio de Información sobre seguridad de la Biotecnología (BCH) es el Instituto Alexander von Humboldt. Con el fin de cumplir con los compromisos que para el país implica la implementación efectiva del Protocolo, se requiere del desarrollo de capacidad técnica institucional principalmente a través de sus recursos humanos. El establecimiento de un sistema amplio, articulado y eficiente en bioseguridad representa un considerable reto y requiere de inversión financiera y humana para su diseño, implementación y manejo. Se trata de un campo altamente técnico que requiere de capacidad y bases científicas sólidas.

Conscientes de esta enorme responsabilidad, las instituciones colombianas involucradas propiciaron la unión de esfuerzos de las entidades responsables en la toma de decisiones previstas dentro del Protocolo. A través de un grupo de trabajo interinstitucional, se gestionó el proyecto “Desarrollo de Capacidades para implementar en Colombia el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad – Convenio de Diversidad Biológica” ante el Global Environmental Facility (GEF), con el Banco Mundial (BM) como entidad ejecutora. El Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt fue designado por las instituciones como Unidad Implementadora del Proyecto. Este proyecto, ejecutado entre febrero de 2004 y junio de 2007, tuvo una financiación compartida en una relación 1:3 entre una donación GEF-BM y contrapartidas nacionales con recursos de los Ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial,

Agricultura y Desarrollo Rural y Protección Social, así como en especie de las instituciones participantes.

El objetivo fundamental del proyecto se centró en el desarrollo de competencias técnicas y científicas institucionales para que el país esté en capacidad de implementar los compromisos del Protocolo de Cartagena. Lo anterior involucra la evaluación, el manejo y el monitoreo de riesgos potenciales sobre la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad, con consideraciones sobre efectos en la salud, relacionados con el uso de organismos genéticamente modificados. Entre los principales logros se incluye el fortalecimiento de las capacidades técnicas institucionales para evaluación y gestión de riesgos relacionados con el uso de organismos genéticamente modificados, y su monitoreo, como elementos fundamentales para la toma de decisiones relacionadas.

El BCH Colombia quedó establecido como un instrumento nacional de comunicación entre diferentes actores en bioseguridad como son: 1) el BCH internacional, 2) los países que necesitan información para su propia toma de decisiones referentes al uso seguro de los OVM, 3) las autoridades competentes en bioseguridad en el ámbito nacional e internacional, 4) los expertos en bioseguridad, y 5) el público en general. Dicha información sobre bioseguridad está representada principalmente por los datos de contacto, el marco reglamentario y las actividades que se llevan a cabo en desarrollo de capacidades y resultados de investigación, tanto en el ámbito nacional como en el internacional.

Resultado fundamental para los análisis y estudios implicados en estudios de bioseguridad es el establecimiento del Laboratorio Interinstitucional de Detección y Monitoreo de OGM, localizado en instalaciones del ICA en Tibaitatá y en el cual participan el ICA, el Invima y el Instituto Alexander von Humboldt. Como complemento al fortalecimiento de capacidades investigativas en temas específicos y estudios complementarios en riesgos potenciales del uso de OGM se ejecutaron cuatro proyectos de investigación, tres en estudios en flujo de genes (maíz, papa, arroz) y uno en sistemas de información sobre especies relacionadas y silvestres, como apoyo para las evaluaciones de riesgo y toma de decisiones relacionadas con bioseguridad de OGM.

En conjunto, la ejecución del proyecto representó un apoyo para la consolidación, la articulación y la implementación del marco

normativo nacional en Bioseguridad mediante el establecimiento de un espacio de discusión e interacción entre los actores involucrados como autoridades nacionales competentes designadas, y la sensibilización de los tomadores de decisión en las distintas instituciones.

Con este proyecto se inició la tarea de empezar a abordar de manera interinstitucional la búsqueda de alternativas al complejo reto, así como las oportunidades y riesgos que implica la utilización de organismos genéticamente modificados. Esperamos que este proceso continúe consolidándose con el tiempo y se mantenga una alianza de personas e instituciones responsables del tema, y con la capacidad científica y administrativa que requiere el país para asumir este enorme desafío.

Fernando Gast Harders  
Director General  
Instituto Humboldt

Elizabeth Hodson de Jaramillo  
Coordinadora Proyecto GEF-BM  
Bioseguridad Colombia

# Introducción

---

La biotecnología, en el sentido amplio, puede describirse como cualquier aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos, o algunos de sus derivados para crear o modificar productos o procesos para usos específicos (Convenio de la Diversidad Biológica, 1992).

La biotecnología utiliza diferentes técnicas o métodos, y es aplicada en varios sectores o campos. Su aplicación brinda herramientas para el desarrollo sostenible de la agricultura, la pesca y la actividad forestal, así como de las industrias alimenticias, farmacéuticas y químicas entre otras (OECD, 2005). Por su parte, la biotecnología moderna se define en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología – Convenio de Diversidad Biológica, como la aplicación de técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico recombinante (ADNr); la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos; o la fusión de células más allá de la familia taxonómica.

Entre los productos que se pueden obtener a partir de la biotecnología moderna se encuentran los organismos genéticamente modificados (OGM). Estos se caracterizan por la inserción de un nuevo gen (o set de genes o secuencias) dentro de su genoma, confiriéndole al organismo una nueva característica (Querci, 2006). La palabra transgénico surge como término genérico para referirse a los organismos que poseen un gen insertado de un grupo taxonómico no relacionado.

La biotecnología moderna ofrece aplicaciones en el área de la salud para pacientes con diabetes, Sida, enfermedades congénitas y cáncer, entre otros. Se están utilizando nuevos desarrollos en biotecnología agrícola con el fin de incrementar la productividad de cultivos. Las características más frecuentes que han sido utilizadas hasta el momento en el mejoramiento de cultivos son resistencia a insectos, a virus, tolerancia a herbicidas, maduración retardada, mejora nutricional y tolerancia a condiciones ambientales extremas (Brookes, 2007). Algunas de estas aplicaciones han permitido reducir los costos de producción, mediante la disminución de los requerimientos de insumos como plaguicidas y herbicidas.

Los cultivos comerciales de plantas transgénicas se han incrementado, llegando a superar los 100 millones de hectáreas sembradas a nivel mundial en el 2006 (James, 2006). Los principales cultivos transgénicos (GM) de importancia comercial que han sido liberadas son algodón, maíz, soya y canola, entre otros.

En Colombia, se han liberado para la siembra comercial, algodón resistente a insectos lepidópteros y tolerantes a herbicidas con un área menor de 0,05 millones de hectáreas durante el 2006 (James, 2006). Recientemente, ICA aprobó la siembra controlada de maíz resistente a lepidópteros (ICA, 2007 a y b) así como para consumo animal (ICA, 2006 a, b y c). Por otro lado, la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas Alcohólicas del Invima aprobó algodón como materia prima para la producción de aceites; los productos derivados de maíz resistente a insectos lepidópteros y tolerantes a herbicidas; los productos derivados de semilla de soya tolerante a herbicidas; y los productos derivados de la remolacha azucarera resistente a herbicidas.

A medida que se incrementa el uso de cultivos genéticamente modificados surgen preocupaciones e inquietudes entre el público en general sobre la seguridad ambiental y en salud humana de los OGM. La implementación de sistemas de bioseguridad que buscan evaluar previamente a su comercialización, los productos de la biotecnología moderna, representan una respuesta a estas inquietudes. Como parte integral de este proceso, es la identificación y el monitoreo de OGM.

Colombia ratificó el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad mediante la Ley 740 de 2002 en el cual se plantea la necesidad del establecimiento de procedimientos adecuados para la transferencia, manipulación y utilización de OGM que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica. Por medio de un grupo interinstitucional y el Banco Mundial se formuló y gestionó ante el Global Environmental Facility (GEF) el proyecto “Desarrollo de Capacidades para Implementar en Colombia el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad – Convenido de Diversidad Biológica”. Como parte de los objetivos del Proyecto se comprometió el establecimiento de uno o varios Nodos de Excelencia Técnica para la investigación, la valoración y el manejo del riesgo involucrado en todas las actividades de introducción, transporte, investigación, producción, uso y comercialización de OGM, incluyendo la puesta en marcha de un laboratorio para detección y monitoreo de OGM.

El Laboratorio Central Interinstitucional de Detección y Monitoreo de OGM se creó en el marco del Proyecto GEF-BM Bioseguridad – Colombia, y de él forman parte el ICA, el Invima y el Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

La detección de un OGM se basa en determinar las diferencias entre un organismo no modificado y un OGM. Esto puede realizarse ya sea detectando el ADN insertado en el organismo modificado o por medio del análisis químico de la nueva proteína expresada (Querci, 2006). Para ello existen dos aproximaciones científicas: los métodos basados en ADN, por medio de la amplificación de secuencias específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y los métodos basados en proteínas formando complejos antígeno-anticuerpo. Estos métodos permiten observar la posible presencia/ausencia de OGM y, en algunos casos, se pueden obtener una cuantificación o porcentaje de OGM en las muestras analizadas (Querci, 2006). Para cualquiera de los dos casos, es necesaria una serie de etapas para reducir la variabilidad y asegurar la calidad de los resultados.

Para la detección es necesario definir el tipo de muestra que va a ser evaluada, el tipo de muestreo y el número de muestras que van a ser analizadas. Una vez definida la etapa del muestreo, es necesario precisar qué tipo de método se va a utilizar para la detección (ADN o proteínas) y realizar los pasos necesarios para su análisis (extracción, amplificación, visualización, reporte de resultados).

El manual que se presenta a continuación contiene los procedimientos de laboratorio que son utilizados frecuentemente para la detección de OGM, incluyendo los métodos para la identificación de ADN y de proteínas. En las primeras secciones se presentan los fundamentos generales relacionados con muestreo, análisis moleculares y validación de métodos, seguidas de la descripción detallada de los protocolos para las pruebas moleculares y un glosario. Esperamos que este manual sea de utilidad para quienes trabajan en el tema.



# Muestreo y manejo de las muestras

El muestreo y la preparación de la muestra son pasos cruciales en el proceso de detección de OGM. La inspección de una muestra es menos costosa que la inspección de todo un lote; sin embargo, el contenido de una muestra no siempre refleja el contenido del lote de muestreo. El procedimiento de muestreo determina la representatividad de un resultado mientras que la cantidad y calidad de los analitos puede variar dependiendo de la preparación de la muestra.

Una muestra al azar es aquella seleccionada en el proceso en la cual cada posible muestra de un lote de muestreo tiene la misma posibilidad de ser seleccionada. Esto significa que una muestra al azar produce un estimado imparcial de la medida de interés. En la práctica una muestra al azar no es siempre fácil de obtener a partir de un lote de muestreo (Asif, 2004).

## 1. Tipos de muestras de OGM

Las muestras para realizar un análisis de OGM pueden provenir de diversas matrices: vegetales, semillas y tejidos; las más utilizadas son tejido foliar, semillas y tallo. También se pueden analizar alimentos o sus procesados (harinas, panes, aceites, salsas, entre otros), los cuales van a ser utilizados como materia prima, para procesamiento o directamente como alimento. Dependiendo del tipo de muestra que se va a evaluar, es necesario seguir diferentes protocolos para una adecuada detección del OGM.

## 2. Muestreo

Vale la pena enfatizar que para la detección de OGM se debe seguir una cadena de custodia, efectuar una adecuada rotulación y emplear recipientes apropiados para cada tipo de muestra. Estos pasos permiten reducir la probabilidad de contaminación cruzada o mezcla de las muestras, en cualquiera de las etapas. Se recomienda el uso de contenedores (bolsas, frascos) para cada tipo de muestra, documentación y un correcto rotulado (Bindler *et al.*, 1999).

Debido a la alta sensibilidad de los protocolos para la detección de OGM, se debe tener especial cuidado en impedir contaminación cruzada entre lotes de muestreo o entre muestras de laboratorio (Bindler *et al.*, 1999). Los contenedores de las muestras deben ser preferiblemente nuevos y estar almacenados en áreas del laboratorio donde no exista la posibilidad de contaminación con muestras positivas de OGM (Zet *et al.*, 2006; Bindler *et al.*, 1999).

Uno de los factores más importantes en la detección de OGM son las estrategias de muestreo y el tamaño de la muestra. El plan de muestreo debe ser concebido, asegurando una representatividad estadística del material. Debido a que la presencia de OGM en la muestra no es homogénea, la varianza asociada con el muestreo representa en gran medida la varianza total de la detección, incluyendo los pasos de extracción y su posterior análisis (Zet *et al.*, 2006).

La mayoría de los planes de muestreo para granos asumen una distribución al azar de OGM de tal manera que el promedio, desviación estándar, los riesgos para el productor y el consumidor pueden ser estimados mediante una distribución normal o de Poisson. Sin embargo, dada la alta probabilidad de niveles de no-detección de material modificado genéticamente en los lotes de granos, el asumir una distribución normal puede llegar a ser altamente riesgoso, debido a que pequeñas variaciones tienen un efecto significativo en la exactitud (%OGM) y precisión (varianza de %OGM). Un modelo comúnmente utilizado es el KeLSa (por sus siglas en inglés: Kernel Lot Sampling), procedimiento complejo de múltiples etapas que reduce un lote en una muestra analítica de un tamaño representativo y cómodo para su manejo. KeLSa es un modelo que permite la estimación del error asociado al muestreo mediante diferentes protocolos, en términos de número como tamaño de muestras tomadas de un lote, sin limitarse a asumir algún tipo de distribución (Paoletti *et al.*, 2003).

### 3. Cadena de custodia

Una vez realizado el muestreo, la muestra debe ser manejada bajo ciertos parámetros con el fin de asegurar su calidad. Estos parámetros se conocen como cadena de custodia, e indican la persona responsable y bajo qué condiciones la muestra ha sido conservada desde su toma, hasta su llegada al laboratorio. Así mismo, el responsable de las diferentes etapas del transporte debe asegurarse de que se mantengan las condiciones para evitar alteraciones en

la muestra (temperatura de transporte, tipo de bolsas o empaques, entre otros).

#### 4. Requisitos de aceptabilidad de la muestra

- Semillas o granos: las semillas tienen que estar sin un exceso de humedad o contaminación visible por hongos. La cantidad mínima para el análisis de granos o semillas es de 3 kilos (3.000 g).
- Tejido vegetal fresco: tiene que mantenerse refrigerado desde la toma de la muestra (4 °C), preferiblemente en presencia de algún desecante (sílica gel); también se requiere que el tejido sea joven y sano.
- Alimentos procesados: las muestras deben estar en buenas condiciones, preferiblemente en sus empaques originales. Para alimentos procesados, la cantidad mínima requerida es de 500 g. En el caso de alimentos líquidos (aceite, leche) la cantidad mínima requerida es de 500 ml.

#### 5. Acondicionamiento de la muestra

Al ingresar al laboratorio, las muestras (vegetales, alimentos, líquidos, materias primas) deben ser acondicionadas en un área especial.

- Para semillas o granos, es necesario el empleo de un molino que permita obtener un tamaño de partícula de 200-500  $\mu\text{m}$  para la posterior extracción de ADN o de proteínas.
- Para el material vegetal fresco, es necesario el uso de nitrógeno líquido para macerar el material hasta obtener un polvo, manteniendo siempre la muestra a temperatura de congelación (-20 °C) hasta su análisis por métodos basados en ADN.
- Para alimentos o ingredientes procesados sólidos o semi-sólidos, es necesario el uso de un molino para obtener un tamaño de partícula de 200-500  $\mu\text{m}$ .

En todos los casos es necesario almacenar una contramuestra en su empaque original o recipiente de recolección y así mismo

una muestra molida lista para su extracción en un tubo de 1,5 ml. Ésta debe ser retenida por un tiempo prudente (determinado por las políticas del laboratorio) en el ultracongelador (-80 °C).

Para realizar el análisis de detección de OGM es necesario tener en consideración que algunos de los procedimientos de acondicionamiento pueden alterar la calidad de la muestra (congelación, secado, molienda). Así mismo, es necesario tener en cuenta que algunos tipos de muestras contienen compuestos que pueden afectar o inhibir posteriores procesos (PCR o inmunoensayos) complicando el proceso de detección (Bindler *et al.*, 1999).

# Fundamentos para el análisis molecular de OGM

## 1. Métodos basados en ADN

La detección de una secuencia específica de ADN es uno de los métodos más utilizados para la identificación y cuantificación de OGM y sus productos derivados. Los métodos que permiten la detección cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de OGM utilizan la tecnología de la PCR, ya sea en punto final (convencional) o en tiempo real.

### 1.1 Extracción de ADN

La selección del método de extracción de ADN es uno de los pasos determinantes para la detección de OGM. El protocolo más adecuado debe ser aquel con el que se obtenga la mejor eficiencia de extracción de ADN, y que permita la remoción de sustancias que pueden inhibir la amplificación posterior polifenoles, polisacáridos, entre otros (Smith y Maxwell, 2007; Gankar *et al.*, 2006; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Schreiber, 1999).

La determinación de un método ideal de extracción de ADN para la detección de OGM es compleja dado que una misma matriz,

empleando dos protocolos diferentes, puede arrojar eficiencias de amplificación diferentes (Hubner *et al.*, 2001). Por ende, no es conveniente trabajar con un solo protocolo de extracción, ya que la selección del método depende de factores variables. En los laboratorios de detección de OGM, las técnicas empleadas provienen generalmente de experiencias previas con muestras similares. Por esto se deben implementar controles de calidad rigurosos en cada una de las etapas de la detección, asegurando así, la confiabilidad de los resultados (Gankar *et al.*, 2006; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Ahmed, 2002).

La eficiencia de la extracción está determinada por la cantidad y calidad de ADN recuperada o el índice de falsos positivos. Una cantidad muy alta de falsos positivos aumentará las evaluaciones posteriores lo cual conlleva a una pérdida de esfuerzo y tiempo (Hubner *et al.*, 2001; Schreiber, 1999). Se debe obtener la suficiente cantidad de ADN para garantizar la detección de secuencias insertadas, estando esta cantidad entre los límites de detección y de cuantificación determinada por los protocolos empleados (Gankar *et al.*, 2006; Kay y Van den Eede, 2001).

Algunos compuestos presentes en plantas y alimentos pueden ser coextraídos junto con el ADN y pueden afectar su posterior amplificación por PCR. Entre los compuestos más comunes que pueden inhibir la amplificación se encuentran: polifenoles, polisacáridos, metabolitos secundarios, proteínas, grasas, extractos de cocoa o azúcar caramelizada (Kubista *et al.*, 2006).

La calidad y concentración de los reactivos usados tanto en la extracción como en la amplificación también pueden afectar el rendimiento de la misma, reduciendo la afinidad frente a la secuencia objetivo (Hubner *et al.*, 2004; Ahmed, 2002; Hubner *et al.*, 2001).

El efecto de inhibición de la amplificación puede ser observado y medido por (Kubista *et al.*, 2006):

- El bloqueo completo de la amplificación.
- Los valores Ct (ciclo de umbral de amplificación) en la PCR más altos a los esperados según la concentración de ADN adicionado inicialmente.
- Una eficiencia baja de la PCR.

## 1.2 Cuantificación

Es necesario cuantificar el ADN después de extraído para asegurar un resultado final confiable y reproducible. Tradicionalmente, la cuantificación de ADN se realiza por espectrofotometría, mediante la absorbancia a 260 nm, fundamentándose en el hecho de que cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto, contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de luz UV de una molécula de ADN (IBT, 2007). Su mayor desventaja consiste en una baja sensibilidad y la dificultad de distinguir entre ADN de cadena sencilla y ADN bicatenario.

Actualmente se utilizan otros métodos para la cuantificación del ADN usando fluorocromos y la hibridación de oligonucleótidos lo cual reduce el consumo de ADN debido a un aumento en la sensibilidad. PicoGreen®, un método recientemente empleado para la cuantificación de ADN, es un tinte fluorescente que aumenta la fluorescencia al unirse a ADN de doble cadena y que puede ser leído en una placa de 96 pozos (Van den Bulcke *et al.*, 2007; Mattarucchi *et al.*, 2005; Haque *et al.*, 2003).

## 1.3 Amplificación

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Esta técnica se utiliza para amplificar un fragmento de ADN, empleando primers o cebadores específicos (secuencias de oligonucleótidos) para una secuencia de ADN dada (Saiki *et al.*, 1985).

La tecnología de PCR se ha convertido en una de las principales herramientas de la biología molecular y por consiguiente es muy utilizada para la detección e identificación de OGM. La PCR se basa en el uso de dos secuencias específicas de nucleótidos (cebadores o primers) que corresponden a los dos extremos del segmento de ADN objetivo, el cual es amplificado exponencialmente utilizando una polimerasa termoestable (Holst-Jensen *et al.*, 2003; Schreiber, 1999).

Las mayores limitaciones en la detección de OGM son el conocimiento o acceso a la información sobre los posibles primers (cebadores) utilizados, la calidad y la cantidad de ADN extraído para el análisis. Estas limitaciones y los pasos propios del procesamiento

o tratamiento de las materias primas (lavados, calentamientos, maceración) hacen que las detecciones de OGM sean complicadas y complejas. Como consecuencia, muchos productos provenientes de la tecnología de OGM tienen una baja calidad de ADN, reduciendo las probabilidades de amplificación.

Dependiendo del objetivo del análisis (cualitativos o cuantitativos), la amplificación de ADN se puede desarrollar por medio de PCR tiempo real o PCR punto final. Si se ha realizado PCR punto final es necesario efectuar una electroforesis en gel de agarosa con el fin de visualizar el resultado de la amplificación. Por el contrario si se ha realizado una amplificación con PCR tiempo real el análisis se lleva a cabo a través del software del equipo.

### 1.4 PCR punto final

El desarrollo de PCR punto final se basa en la amplificación de una secuencia específica de ADN determinando la presencia/ausencia de la secuencia de ADN insertada en el organismo. La PCR convencional se basa en la denaturación de la cadena doble de ADN de la muestra, seguido del anillaje del primer con la secuencia objetivo y una posterior elongación de cada una de las nuevas cadenas (Figura 1); este proceso es repetido por varios ciclos obteniendo una amplificación exponencial de la secuencia de ADN objetivo.

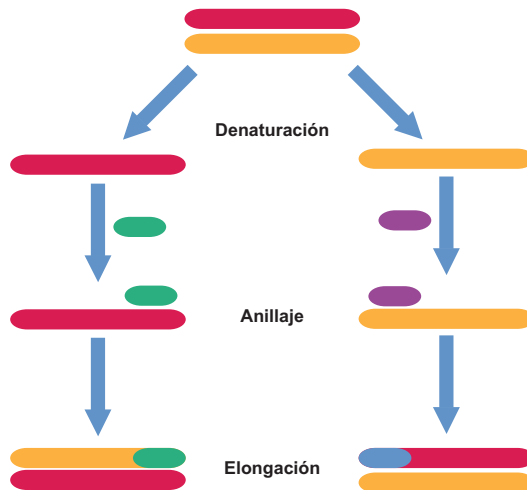


Figura 1. Diagrama de una PCR convencional.

Fuente: <http://members.aol.com/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/LNPics/Recomb/pcr.gif>.

Esta PCR se utiliza comúnmente como una primera evaluación o filtro rutinario (*screening*), teniendo en cuenta que la secuencia de ADN objetivo debe estar plenamente identificada y los oligonucleótidos (*primer*) disponibles (Anklam *et al.*, 2002).

Para confirmar los resultados obtenidos en la PCR cualitativa, se cuenta con diferentes métodos como el rompimiento específico del producto amplificado, hibridación con sondas específicas y secuenciación del producto. Sin embargo, estos procedimientos posteriores pueden incrementar los costos de la determinación siendo innecesarios en algunos casos donde sólo se quiera determinar cualitativamente la presencia de un OGM (Ahmed, 2002).

### 1.4.1 Electroforesis

Para visualizar los productos amplificados por medio de una PCR convencional, es necesario realizar una electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa es un método comúnmente empleado para separar, visualizar y purificar fragmentos de ADN. La técnica permite la separación de macromoléculas con base en su tamaño y carga eléctrica mediante la migración de partículas cargadas bajo la influencia de un campo magnético. El ADN en solución está cargado negativamente por sus grupos fosfatos, los cuales migran hacia el ánodo separándose de acuerdo con su tamaño (pares de bases). Para realizar la visualización se emplea algún colorante como bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases de ADN y fluoresce bajo luz ultravioleta (Longo *et al.*, 2005).

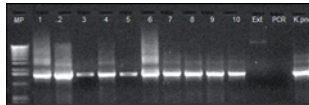


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa visualizado con bromuro de etidio.

### 1.5 PCR en tiempo real

El empleo de la PCR en tiempo real permite determinar límites de detección (LD) y cuantificación (LC) y contenidos aproximados de OGM con mayor exactitud (Smith y Maxwell, 2007; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Ahmed, 2002). La PCR en tiempo real ha sido utilizada con mejores resultados que la PCR convencional en la detección de OGM debido a su desarrollo cuantitativo, sin necesidad de procedimientos posteriores y con una mayor sensibilidad de amplificación.

La PCR en tiempo real permite el monitoreo de la reacción de la amplificación en un ambiente cerrado sin interferencias (Holst-Jensen *et al.*, 2003; QIAGEN, 2002). La señal de fluorescencia corresponde a un incremento en el producto amplificado el cual puede ser visualizado y medido en una pantalla de computador; el software adecuado puede estimar de forma cuantitativa inmediatamente la señal fluorescente emitida. El riesgo de contaminación cruzada es bajo y los resultados son obtenidos en poco tiempo –<30 min– (Smith y Maxwell, 2007; Hernández *et al.*, 2004; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Ahmed, 2002; QIAGEN, 2002) (Figura 3).

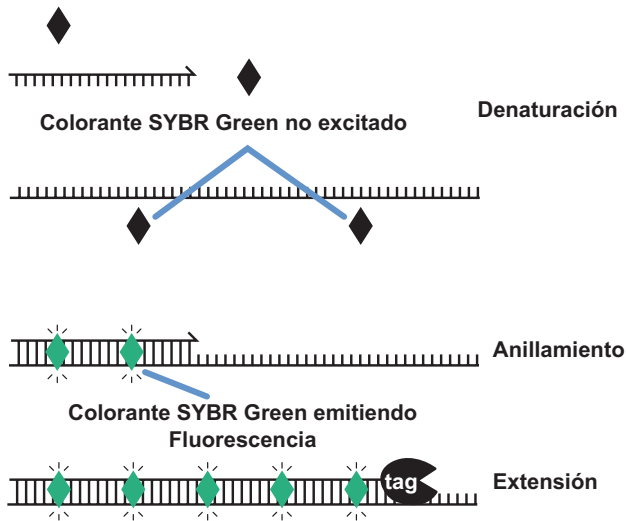


Figura 3. Diagrama de PCR en tiempo real empleando la tecnología SYBR® Green I.  
Fuente: [http://www.bcm.edu/cms\\_web/110/qpcr\\_sybrgreen\\_2\\_lg.gif](http://www.bcm.edu/cms_web/110/qpcr_sybrgreen_2_lg.gif)

Así mismo, el uso de la PCR en tiempo real es útil para la amplificación de pequeños fragmentos o fragmentos de ADN degradado (frecuentemente obtenidos en muestras de alimentos procesados) (Alary *et al.*, 2002).

## 1.6 Secuencias objetivo

Los métodos para la detección de OGM por medio de la PCR (punto final o tiempo real) pueden ser agrupados en dos, de acuerdo con su nivel de especificidad. Usualmente, un producto genéticamente modificado se obtiene a partir de una transformación donde hay una inserción de la secuencia específica junto con secuencias adicionales

de control de expresión –promotores o terminadores– (Gankar *et al.*, 2006; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2000). La detección de OGM se puede realizar por medio de secuencias no específicas o específicas; en el primer grupo se detectan los elementos empleados frecuentemente en biotecnología tales como secuencias promotoras, terminadoras y genes de resistencia a antibióticos (Wolf *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 1998). En el segundo grupo se busca amplificar secuencias específicas a los eventos OGM –tales como Bt, MON810– (Gankar *et al.*, 2006; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2000).

### 1.6.1 No secuencia-específica

Los protocolos más comunes para la detección de ADN a partir de plantas o alimentos genéticamente modificados se han basado en la amplificación de secuencias promotoras o terminadoras. Dado que son secuencias “genéricas” ampliamente distribuidas, un resultado positivo no indica necesariamente que se trate de un OGM, siendo necesario realizar pasos posteriores con secuencias específicas para cada evento que permiten confirmar los resultados positivos (Wolf *et al.*, 2000).

Entre las secuencias no específicas comúnmente usadas para la detección de OGM están: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), terminador de la nopalina sintetasa nos de *Agrobacterium tumefaciens* y genes de resistencia a la kanamicina *nrptII* (Cardarelli *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 1998).

La amplificación de secuencias no específicas es de gran importancia para análisis rutinarios y control del marcaje de alimentos. Sin embargo, se puede obtener una gran cantidad de falsos positivos, debido a que estas secuencias de control de expresión se encuentran en condiciones naturales (el promotor 35S pertenece al virus del mosaico de la coliflor (CaMV por sus siglas en inglés) y pueden estar presentes tanto en OGM como en otras plantas convencionales no modificadas (Holst-Jensen *et al.*, 2003; Brodmann *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2000). Otros falsos positivos han sido descritos como un resultado de la amplificación de fragmentos del mismo tamaño que el promotor o el terminador (Wolf *et al.*, 2000).

### 1.6.2 Secuencia-específica

La amplificación secuencia-específica se basa en la detección de secuencias específicas para cada evento de OGM, es decir, evidenciar la presencia del transgen. Los resultados de este tipo

de detección específica determinan con seguridad la presencia/ ausencia de un OGM.

Se pueden construir las secuencias específicas donde se unan secuencias del promotor o terminador con el gen transgénico (Holst-Jensen *et al.*, 2003). La detección de este tipo de fragmento es mucho más efectiva en la identificación del OGM, sin embargo sus costos son más altos (Gankar *et al.*, 2006; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2000).

### **1.7 Ventajas y desventajas de los métodos basados en ADN**

Las ventajas de emplear métodos basados en ADN radican en que no es necesaria la expresión de la característica introducida para que sean detectados (como sucede con proteínas).

La rápida y alta sensibilidad en detectar OGM es uno de los factores más importantes en la utilización de métodos específicos. Sin embargo, la detección de un transgen específico en OGM con eventos conjuntos (*stacked*) no es tan fácil por estas técnicas (Holst-Jensen *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2000). Lo anterior, debido a que utilizan sistemas de expresión similares en ambas características dificultando su diferenciación; por esta razón, requieren de la disponibilidad completa de la información genética insertada para poder desarrollar secuencias específicas que se hibridicen con el genoma para su detección.

Debido a la alta sensibilidad y especificidad de la PCR en sus diferentes formatos, esta tecnología es la principal para la detección de OGM cualitativa y cuantitativamente (Anklam *et al.*, 2002), dado que la reproducibilidad y trazabilidad de los protocolos es fundamental en los laboratorios de referencia.

## **2. Métodos basados en proteínas**

Las proteínas son el resultado de una expresión regulada de los genes. Para obtener un OGM se inserta una secuencia de ADN que posee no sólo el gen de interés, que codifica para determinada proteína, sino todas aquellas secuencias que regulan su expresión. El resultado es un organismo que expresa dicha proteína, confiriéndole nuevas características.

Esta metodología se basa en el reconocimiento específico de un epítotope, o porción de la proteína, por parte de un anticuerpo, recreando la respuesta inmune. La especificidad de determinado anticuerpo por un epítotope único permite que el uso de esta tecnología sea ideal para la detección cuantitativa y cualitativa de proteínas.

Una de las principales ventajas de emplear inmunoensayos para la detección de OGM es su alta especificidad, lo que permite el reconocimiento de una sustancia antigénica aún cuando haya presencia de sustancias contaminantes (Lübeck, 2007; Ahmed, 2002, Anklam *et al.*, 2002). La metodología de inmunoensayos se utiliza en forma rutinaria, para obtener una rápida purificación, visualización y cuantificación de proteínas provenientes de OGM.

Una las desventajas de los análisis inmunoquímicos es que su precisión y exactitud pueden verse seriamente afectadas en matrices complejas como algunos productos alimenticios. Las posibles causas de interferencia se deben a interacciones no específicas del anticuerpo con proteínas, surfactantes, compuestos fenólicos, denaturación de proteínas por ácidos grasos, la presencia de fosfatasas endógenas o inhibidores de enzimas (Anklam *et al.*, 2002). La detección también puede ser afectada en los casos en que se encuentran bajos niveles de expresión de proteínas transgénicas, por degradación asociada a tratamientos térmicos o por una baja afinidad del anticuerpo con el epítotope (Ahmed, 2002; Anklam *et al.*, 2002).

Los protocolos más exitosos para la detección de OGM, empleando anticuerpos, son los que se unen a una matriz sólida y están presentes en dos formatos: ensayos competitivos y ensayos en sándwich. Técnicas como el Western Blot y ELISA también han sido empleadas para la detección de productos transgénicos (Ahmed, 2002).

Algunos de los anticuerpos que han sido desarrollados para la detección de proteínas genéticamente modificadas son Bt, Cry1A y PAT; sin embargo, cabe resaltar que dependiendo de las variedades del cultivo, se pueden presentar algunas diferencias en la expresión proteica (Anklam *et al.*, 2002) afectando de esta manera la sensibilidad y exactitud del método.

## 2.1 Efectos de la matriz

Al igual que con los métodos basados en ADN, el tipo matriz es de gran importancia para la detección de proteínas provenientes de

OGM. Para evaluar el efecto de diferentes matrices, se emplea una solución patrón, basada en extractos de material no genéticamente modificado, realizando una curva de calibración con concentraciones conocidas del OGM. Si existe alguna interferencia significativa (p.e., más del 10-15% de inhibición o incremento) o si la forma de la curva de calibración cambia, los estándares deben ser diluidos con la solución patrón de material no genéticamente modificado para garantizar una cuantificación exacta (Miraglia *et al.*, 2004; Anklam *et al.*, 2002).

## 2.2 Selección del antígeno

En los inmunoensayos para la detección de OGM es de vital importancia la selección y caracterización adecuada de las proteínas que actúan como antígenos. La pureza de un antígeno debe ser idealmente mayor del 75% (Miraglia *et al.*, 2004). Algunas características de los antígenos que determinan la probabilidad de éxito, son: tamaño, hidrofobicidad, estructura terciaria, maduración de proteínas y glicosilación. Posiblemente la mayor variable asociada a los inmunoensayos es el tipo de antígeno empleado para la producción de anticuerpos (Miraglia *et al.*, 2004; Anklam *et al.*, 2002).

## 2.3 Cuantificación

Existen grandes limitaciones para la cuantificación de proteínas, dado que los niveles de expresión introducida son específicos para cada tejido del organismo y son regulados diferencialmente durante el desarrollo. Los niveles de proteínas en muestras desconocidas son difícilmente comparables con aquellos usados en materiales de referencia. Una determinación exacta sólo es posible cuando las matrices de la muestra son idénticas al material de referencia y los estándares o materiales de referencia que son compatibles han sido validados para la matriz disponible (Miraglia *et al.*, 2004).

## 2.4 ELISA

Muchos métodos de inmunoensayos se han basado en la técnica *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Básicamente, esta prueba es una reacción antígeno-anticuerpo que se lleva a cabo en una fase sólida (placas de 96 pozos). El antígeno-anticuerpo reacciona y produce un complejo estable que puede ser visualizado

por la adición de un segundo anticuerpo unido a una enzima. La adición de un sustrato que reacciona con la enzima resulta en una formación de color, la cual puede ser medida fotométricamente (Figura 4). Así se compara el color de las muestras con los de un estándar determinando, el rango de la concentración en la muestra (Miraglia *et al.*, 2004).

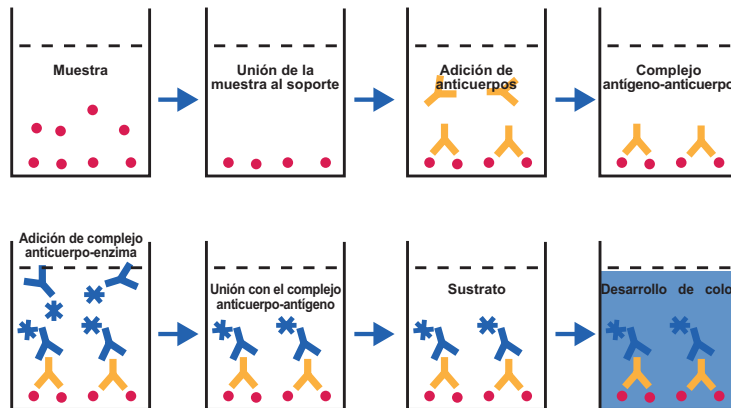


Figura 4. Diagrama de la prueba ELISA.

Fuente: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/ToolBox/elisa.html>

ELISA ha sido empleada con marcadores específicos de los eventos de OGM producidos hasta el momento neomicina fosfo-transferasa II - *nptII*. Un método de ELISA modificado recientemente (2007) basado en la detección de *ntplI* ha sido empleado con éxito en un gran número de líneas genéticamente modificadas en nueve especies vegetales. Similarmente, se ha demostrado que la enzima sintetasa 5-piruvil shikimato-3-fosfato (EPSPS) ha sido expresada en soya RR<sup>®</sup>, de la cual se ha desarrollado un inmunoensayo con resultados positivos en las validaciones (Lübeck, 2007; Anklam *et al.*, 2002).

Existen varios kits de ELISA comercialmente disponibles. Algunos de estos kits de gran interés en la detección de proteína genéticamente modificada son Bt, Cry1Ac, Cry1C, Cry3A, Cry2A, Cry9C, CP4 EPSPS y PAT, que además ofrecen un alto grado de automatización. Sin embargo, cabe resaltar que el contenido de las proteínas no está distribuido homogéneamente dentro de la planta (p.e., en el maíz las mayores concentraciones de proteínas genéticamente modificadas son observadas en las hojas y no en granos) según lo explicado anteriormente (Lübeck, 2007; Anklam *et al.*, 2002).

## 2.5 Tiras de flujo lateral

Comercialmente se han desarrollado algunas variaciones de ELISA para la detección de proteínas genéticamente modificadas. Entre las más usadas se tienen bandas de flujo lateral, con las cuales se obtienen resultados semicuantitativos de forma sencilla y rápida (Anklam *et al.*, 2002).

Este formato de bandas laterales se emplea para la detección de OGM en hojas, semillas y granos. Como soporte se emplean tiras de papel o plásticas, siendo éste el sitio de la reacción. La membrana de las bandas posee dos zonas de captura, una que se une a la proteína genéticamente modificada y la otra que captura el colorante. Una vez se añade la muestra, ésta se difunde a través de la tira, uniéndose primero a los anticuerpos conjugados. En su recorrido hasta la línea control, la muestra ya conjugada pasa por la línea de ensayo, sufriendo un cambio de color cuando ocurre la reacción en la membrana. La presencia de una sola línea (línea control) en la membrana, indica una muestra negativa y la presencia de dos líneas, indica una muestra positiva (Figura 5).

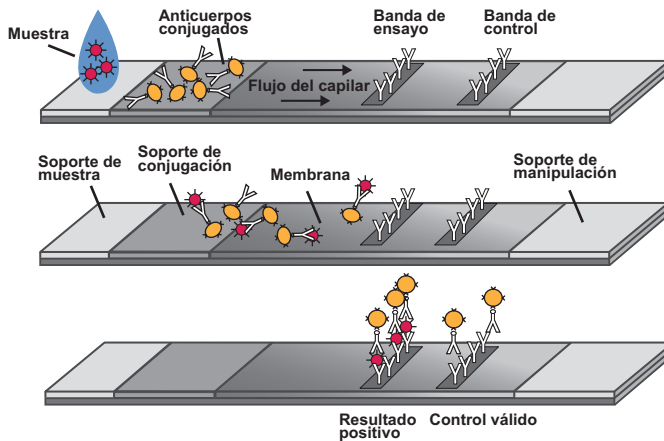


Figura 5. Diagrama de la bandas de flujo lateral.  
Adaptado de: [http://exploration.nasa.gov/articles/homeplanet\\_lite.html](http://exploration.nasa.gov/articles/homeplanet_lite.html).

## 2.6 Western Blot

Es un método altamente específico, que determina si la muestra contiene la proteína objetivo, y es muy eficiente con proteínas insolubles (Ahmed, 2002). La separación electroforética de la proteína

se realiza en un ambiente denaturante donde cualquier problema de solubilización, agregación o precipitación se elimina. Este método se basa en la separación de proteínas de una muestra en función de su tamaño mediante una electroforesis y una posterior detección mediante anticuerpos específicos para la proteína objetivo.

Las muestras que van a ser evaluadas se solubilizan con detergentes (SDS) y son separadas por su tamaño y polaridad en un gel de poliacrilamida. Luego, estos componentes son transferidos y fijados a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa). A la membrana se le adiciona un anticuerpo primario que reconoce la proteína determinada que luego será identificada con sondas específicas (sueros mono o policlonales). Finalmente, el anticuerpo es teñido con algún colorante como ponceau, comassie o nitrato de plata (Figura 6).

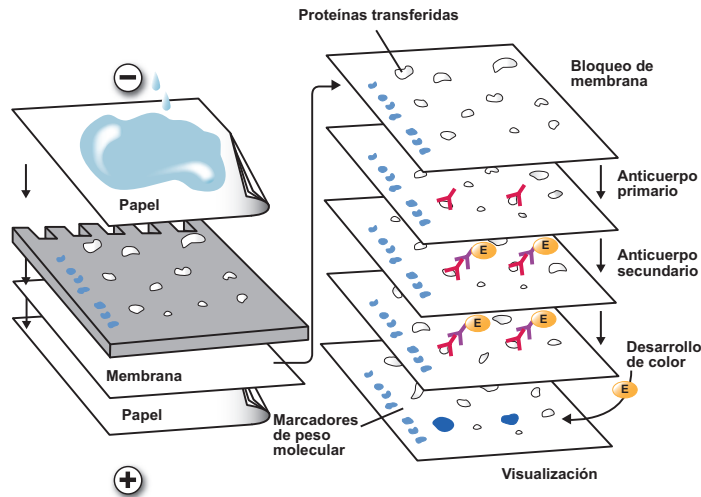


Figura 6. Diagrama del Western Blot.

Fuente: <http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2B.asp>

Los límites de detección de proteína genéticamente modificada, empleando la técnica del Western Blot, varían entre 0,25 y 1% dependiendo del tipo de muestra (material vegetal, alimentos procesados) (Ahmed, 2002).

## 2.7 Ventajas y desventajas de los métodos basados en proteínas

La aplicación de métodos basados en proteínas para la detección de OGM tiene un gran potencial por su bajo costo, practicidad,

rapidez y fácil procesamiento de una gran cantidad de muestras. Estos análisis se consideran adecuados cuando se necesita realizar controles de rutina (Ermolli *et al.*, 2004).

Por otro lado, los inmunoensayos se han convertido en herramientas apropiadas y muy empleadas para la detección de cultivos OGM en campo, además de que necesitan personal altamente calificado para la realización de las pruebas, debido a su fácil manipulación (Aklam *et al.*, 2002; Lübeck, 2007).

## Fundamentos de la validación de los métodos para la detección de OGM

La validación de un procedimiento analítico o ensayo es la forma para establecer, por medio de estudios en el laboratorio, una base de datos que demuestre científicamente que un método tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir con los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica además la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Gankar y colaboradores (2006), basados en la propuesta de Holst-Jensen y Berdal (2004), sugieren una metodología que permite la validación de métodos para la detección de OGM en alimentos y plantas por módulos o etapas (entendiendo estos módulos como los pasos que se deben llevar a cabo para la detección: muestreo, extracción del analito de la matriz, cuantificación del analito y análisis). De esta forma, la validación de las pruebas para detección de OGM se realiza por validaciones independientes.

Cualquier procedimiento de validación debe identificar y cuantificar las fuentes potenciales de error. No es posible determinar un único procedimiento de validación para todos los procesos. La selección depende de la naturaleza del ensayo y de los análisis requeridos. Para una adecuada selección del método es necesario realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva con el fin de conocer

diferentes metodologías analíticas, evaluarlas y seleccionar las más adecuadas para las condiciones específicas de cada laboratorio.

Para todas las validaciones es necesario evaluar el análisis o la verificación de los parámetros de:

- Exactitud
- Precisión
- Límite de detección (los datos obtenidos no son los mismos de exactitud o precisión)
- Límite de cuantificación
- Especificidad
- Linearidad
- Rango
- Solidez

## 1. Límites de detección (LD)

Es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Berdal y Holst–Jensen (2001) propusieron que se debe utilizar un número absoluto de copias de ADN y realizar la diferenciación entre los métodos para determinar LD teórico (estos valores son relativos y obtenidos con estudios de validaciones) y los valores de LD reales (obtenidos a partir de la evaluación de la muestra). Sin embargo, estos valores dependen de la matriz evaluada y la cantidad de ADN disponible para la realización de la PCR.

Un método comprobado para la determinación del LD se basa en la PCR de tiempo real usando SYBR<sup>®</sup> Green (Hernández *et al.*, 2004; Holst–Jensen *et al.*, 2004; Ahmed, 2002). La ventaja de este método de fluorescencia en tiempo real es que permite una determinación más precisa de LD.

## 2. Límites de cuantificación (LC)

Es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para determinar impurezas y productos de degradación. Existen dos aproximaciones principales para la cuantificación de ADN en la detección de OGM.

La primera es una comparación de Ct (ciclo umbral de amplificación) y la segunda, una curva de estandarización (Gankar *et al.*, 2006; Applied Biosystems, 2001). Para la comparación de Ct es necesaria una validación previa en donde se demuestre la eficiencia del gen objetivo y el gen de referencia, la cual debe ser igual. Aquí se observa una relación lineal basada en las diferencias de los valores de Ct y el gen de referencia de un OGM específico, utilizando materiales de referencia certificados con diferentes concentraciones de OGM (Lübeck, 2007; Gankar *et al.*, 2006; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Schreiber, 1999).

Para este primer acercamiento (comparación de Ct), es necesario asumir que las eficiencias de las amplificaciones son iguales para los dos Ct evaluados (control y OGM), en todos los experimentos y para todas las muestras evaluadas. La validación con este acercamiento debe ser estricta, sólida y con un número limitado de matrices reduciendo así la variación inherente de la matriz (Gankar *et al.*, 2006).

En el segundo acercamiento para determinar el LC, se emplea la curva de estandarización, para lo cual la secuencia de referencia es preparada con diluciones seriadas y analizada independientemente. De esta forma se pueden evaluar las diferencias en la eficiencia de la PCR entre los amplicones evaluados. Con este acercamiento se obtienen resultados más sólidos, ya que las eficiencias de amplificación son tenidas en cuenta. Sin embargo, de nuevo es necesario asumir que las eficiencias de la PCR son las mismas para el ADN de referencia y el evaluado, llevando a una posible sobre o subestimación del contenido de OGM en las muestras (Lübeck, 2007; Gankar *et al.*, 2006).

### 3. Validación de PCR

El objetivo de la validación para un método de PCR analítico es demostrar que en ensayos sucesivos de extracción, preparación y análisis el rendimiento va a ser adecuado, preciso, exacto y reproducible para un analito específico en una matriz dada. El proceso de validación permite el uso de métodos y resultados independientes que son comparables los unos con los otros (Anklam *et al.*, 2002).

Dependiendo del objetivo del análisis (cualitativo o cuantitativo) se deben tener en cuenta diferentes parámetros (Anklam *et al.*, 2002):

- Especificidad/selectividad
- Sensibilidad
- Precisión/exactitud
- Solidez

Los falsos positivos, pueden ser controlados por la coamplificación de un control interno (adicionalmente a los dos controles de rutina positivo y negativo).

Para un ensayo cuantitativo los datos recomendados para tener en cuenta son:

- Desviación estándar
- Desviación estándar relativa (coeficiente de variación)
- Repetibilidad y reproducibilidad del intervalo de confianza
- Recuperabilidad
- Solidez

#### **4. Validación de inmunoensayos**

A medida que aumenta el número de inmunoensayos producidos, se necesita un mayor número de validaciones para poder realizar comparaciones adecuadas (Lübeck, 2007; Aklam *et al.*, 2002). Para realizar una validación de inmunoensayos, es necesario tener en cuenta la matriz, el anticuerpo empleado en la técnica, la proteína a identificar y el método de identificación de la proteína genéticamente modificada (ELISA, Western Blot, tiras de flujo). Para obtener datos de validaciones confiables, el número de ensayos debe ser amplio permitiendo una repetibilidad y reproducibilidad adecuadas y evaluando las desviaciones estándar entre diferentes grupos de laboratorio.

#### **5. Materiales de referencia**

Para desarrollar validaciones y cuantificaciones es necesario contar con material de referencia adecuado. La producción de materiales de referencia debe seguir principios métricos y su medición debe estar de acuerdo con las unidades del sistema internacional (Aklam *et al.*, 2002). Es necesario concentrar esfuerzos para determinar métodos de cuantificación confiables acompañados con sus materiales de referencia adecuados (ADN de alta calidad, ADN degradado simulando condiciones normales en procesamiento de alimentos) (Aklam *et al.*, 2002).

Así mismo, los materiales de referencia de proteínas son críticos para las validaciones, y pueden ser derivados de una gran cantidad de fuentes desde extractos de plantas hasta proteínas purificadas (Lübeck, 2007; Aklam *et al.*, 2002).

En general se necesitan tres tipos de materiales de referencia para la detección de OGM:

- ADN
- Matriz para los eventos más importantes
- Proteínas

## 6. Incertidumbre

Es necesario que el laboratorio realice una lista de los parámetros que pueden afectar el análisis de OGM (la información con respecto a la reproducibilidad y repetibilidad son útiles para tener en cuenta) (Zet *et al.*, 2006).

Uno de los factores más importantes de establecer en la detección de OGM es la incertidumbre de las mediciones. La varianza asociada con el muestreo constituye la mayor varianza en todo el proceso de detección, debido a que los OGM no se distribuyen homogéneamente en el lote de muestreo (Lübeck, 2007; Miraglia *et al.*, 2004). La variabilidad intrínseca de un material, puede ser otra fuente de aumento de la varianza. El laboratorio no puede controlar dichas variables pero puede conocerlas para la correcta interpretación de los resultados (Zet *et al.*, 2006). Así mismo, otra fuente de medición errónea puede surgir de la incorrecta homogenización de la muestra resultando en diferencias del contenido de OGM (Lübeck, 2007; Zet *et al.*, 2006).

El uso de controles históricos, basado en mediciones periódicas ayuda a determinar desviaciones significativas de operaciones normales (EA, 2003). En la detección de OGM, el uso de cartas control (Shewhart) ayuda al control en el proceso de detección. La tendencia mostrada por los resultados obtenidos, permite determinar si estos son correctos o, si están por fuera de la tendencia con el fin de que el laboratorio tome las medidas necesarias para corregir los resultados (Zet *et al.*, 2006).

# Informe de resultados

El informe de resultados debe incluir información sobre la muestra, los métodos empleados para el análisis, fechas relevantes, firmas de los responsables del análisis de la muestra, e información importante para la correcta interpretación de los resultados (Zet *et al.*, 2006; Furr, 1995). Adicionalmente, el reporte debe incluir la incertidumbre de la técnica y si esta afectando los límites especificados (ISO, 1999).

En la detección de OGM, todavía existen discusiones sobre como informar correctamente los resultados, debido a que los métodos de detección no son capaces de medir directamente el porcentaje de OGM en las muestras.

Usualmente se emplea la cantidad relativa del material de referencia, con base en el número de copias estimado (Zet *et al.*, 2006). Generalmente, se utiliza la expresión de resultados empleando la relación del número de copias específicos de OGM sobre las especies-específicas, debido a que la relación de copias obtenida por el método, es más adecuada que el porcentaje de OGM presente en la muestra (Holst-Jensen y Berdal, 2004).

## Protocolos para la detección molecular de OGM

En esta sección se describen algunos de los protocolos utilizados en las diferentes etapas en el proceso de detección de OGM , presentadas en la Figura 7.

### 1. Muestras

Las muestras que se pueden evaluar para la detección de OGM son:

- Sólidas: semillas, granos, alimentos secos, material vegetal fresco.
- Líquidas: usualmente son procesados de alimentos como leche y aceites.

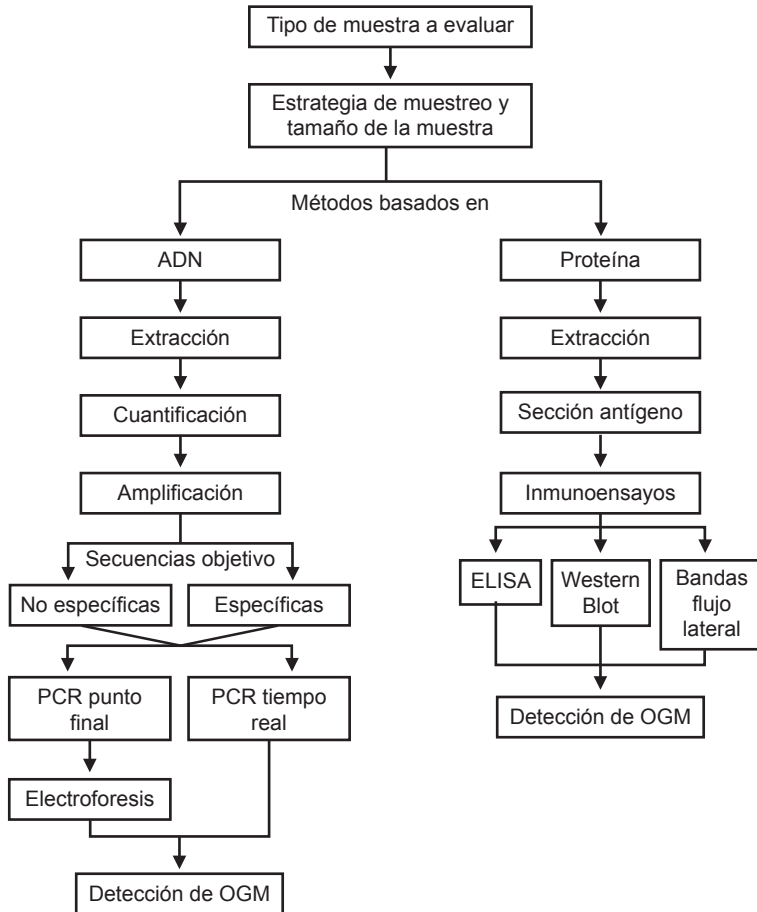


Figura 7. Diagrama general para la detección de OGM.

## 2. Estrategia de muestreo y tamaño de muestra

Primero se debe determinar el tipo de muestra a recolectar, ya sea un cultivo o un lote de importación. Luego, se debe definir el plan de muestreo, el cual incluye el tipo de muestra y la cantidad de muestras a tomar, que dependen del tamaño del lote de muestreo o área del cultivo (Lübeck, 2007).

Para cultivos, la estrategia de muestreo debe realizarse a partir de plantas distribuidas al azar y no debe estar sesgada hacia ningún área específica del cultivo. Se puede utilizar un recorrido de

una rendija o una W, lo que proporciona una distribución adecuada por toda el área del cultivo. La ubicación de las plantas que van a ser muestreadas debe ser señalada con anterioridad en el plan de muestreo. Cuando se trata de plantas en crecimiento, es necesario retirar una hoja del ápice y almacenarla en una bolsa plástica resealed, limpia y adecuadamente rotulada (Lübeck, 2007).

Para materias primas o alimentos que estén en contenedores de importación, es necesario que las muestras del contenedor no pesen más de 200 toneladas métricas y se realice un muestreo compuesto con cada una de las submuestras de no más de 500 g, tomando como peso final 3.000 g, según las reglas de la ISTA (1999).

### **3. Acondicionamiento de las muestras**

#### **3.1 Protocolo para la molienda de muestras vegetales (semillas, granos) y alimentos (procesados y materias primas) (SDI, 2003)**

1. Tome submuestras del lote total de muestreo.
2. Adicione aproximadamente 100-300 g de la muestra en el primer compartimiento del molino.
3. Cierre y asegure todas las secciones del molino.
4. Inicie la molienda oprimiendo el botón principal del molino (20-30 s).
5. Libere los seguros del molino y remueva la jarra.
6. Adicione la muestra en los tubos adecuados según el procedimiento para la extracción de ADN.

#### **3.2 Protocolo para la maceración de tejidos vegetales jóvenes**

1. Tome submuestras del lote total de muestreo.
2. Adicione aproximadamente 25 g de material vegetal fresco en un mortero.
3. Adicione aproximadamente un volumen de nitrógeno líquido y macere rápidamente.
4. Repita el paso 3.
5. Tome el material vegetal homogenizado y rápidamente adiciónelo en los tubos de acuerdo con el protocolo de extracción de ADN.

## 4. Métodos basados en ADN

### 4.1 Extracción

#### 4.1.1 Protocolo de extracción de ADN a partir de alimentos (Somma, 2005)

1. Tome 0,1 g de la muestra homogenizada previamente. Adiciónelo a un tubo de microcentrífuga estéril y añada 300  $\mu$ l de agua desionizada estéril y mezcle.
2. Adicione 500  $\mu$ l de buffer CTAB y mezcle.
3. Adicione 20  $\mu$ l de proteinasa K (0,020 g/ml), agite e incube a 65°C de 30-90 min.
4. Adicione 20  $\mu$ l de RNasa A (0,010 g/ml), agite e incube a 65 °C de 5-10 min.
5. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
6. Transfiera el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga con 500  $\mu$ l de cloroformo y agite cuidadosamente durante 30 s.
7. Centrifugue nuevamente a 14.000 rpm durante 10 min o hasta que se observe una separación de fases.
8. Transfiera 500  $\mu$ l del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga con 500  $\mu$ l de cloroformo y agite cuidadosamente.
9. Centrifugue nuevamente a 14.000 rpm durante 5 min. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga. Añada dos volúmenes de la solución CTAB (mezcle con la ayuda de la pipeta).
10. Incube a temperatura ambiente durante 60 min y luego centrifugue a 14.000 rpm durante 5 min.
11. Descarte el sobrenadante. Disuelva el precipitado en 350  $\mu$ l de NaCl (1,2 M), luego añada 350  $\mu$ l de cloroformo y agite durante 30 s.
12. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min.
13. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Añada 0,6 vol de isopropanol y agite. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min.
14. Descarte el sobrenadante. Añada 500  $\mu$ l de etanol 70% al pellet obtenido y agite cuidadosamente. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min.
15. Descarte el sobrenadante y seque el pellet. Resuspensa el ADN en 100  $\mu$ l de agua desionizada.

Nota: la solución de ADN puede ser almacenada máximo durante dos semanas a 4 °C o a -20 °C por periodos más prolongados.

Buffer CTAB	
CTAB 20g/L	4 g
NaCl 1.4 M	46,4 g
Tris-HCl 0.1 M	3,15 g
Na <sub>2</sub> EDTA	1,5 g

Añada 100 ml de agua desionizada. Ajuste el pH: 8,0 con NaOH 1M. Añada agua hasta completar a 200 ml y autoclave.

El buffer puede ser almacenado hasta por seis meses a 4 °C.

Buffer de precipitación CTAB	
CTAB 5 g/l	1 g
NaCl 0.04 M	0,5 g

Añada 100 ml de agua desionizada. Ajuste el pH: 8,0 con NaOH 1 M. Añada agua hasta completar a 200 ml y autoclave.

El buffer puede ser almacenado hasta por seis meses a 4 °C.

NaCl 1,2 M  
Disuelva 7,01 g de NaCl en 100 ml de agua desionizada. Autoclave y almacene a temperatura ambiente.

Solución de etanol 70%  
Mezcle 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de agua destilada desionizada estéril.

RNasa A  
0,010 g/ml RNasa A  
Almacenar a -20 °C hasta su uso.

Proteinasa K  
Proteinasa K 0,020 g/ml  
Almacenar a -20 °C hasta su uso.

#### **4.1.2 Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras vegetales con alto contenido de polisacáridos y polifenoles (Lin *et al.*, 2001)**

1. Mezcle 350  $\mu$ l de buffer de extracción con 350  $\mu$ l de cloruro de litio 8 M y precaliéntelo a 65 °C.
2. Macere el tejido vegetal con nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo. Pese 0,1 g del polvo obtenido en un tubo de microcentrífuga y añada inmediatamente el buffer de extracción.  
Nota: no permita que el polvo se descongele antes de añadir el buffer de extracción.
3. Incube el tubo a 65 °C durante 1 min y agite vigorosamente (con la ayuda de un vortex) 3-4 veces durante este periodo.
4. Adicione 700  $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mézclelo vigorosamente.
5. Centrifugue a 14.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo, añada 700  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugue.
7. Lleve el sobrenadante a un tubo nuevo, añada 0,5 vol de acetato de potasio 3 M (pH=4,8) y mezcle invirtiendo suavemente el tubo.
8. Incube el tubo a -20°C durante 30 min.
9. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C y transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo.  
Nota: Si no se observa precipitación, la centrifugación puede omitirse.
10. Adicione 0,6 vol de isopropanol frío y mezcle invirtiendo suavemente varias veces hasta que se mezclen las dos capas.  
Nota: el tubo no debe ser agitado bruscamente ya que el ADN se encuentra vulnerable a ser fragmentado.
11. Incube el tubo a -20 °C durante 30 min. Centrifugue nuevamente a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C.
12. Descarte el sobrenadante y seque el pellet.
13. Resuspenda el pellet en 300  $\mu$ l de agua destilada autoclavada. Añada 2 vol de etanol absoluto e incube el tubo a -20 °C durante 1 h o -70 °C por 30 min.

14. Centrifugue el tubo a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Lave el pellet de ADN con etanol al 70% y centrifugue a 13.000 rpm durante 5 min a 4 °C.
15. Seque el pellet de ADN y resuspéndalo en 10-15  $\mu$ l de agua destilada estéril.

Nota si el extracto de ADN no va a ser utilizado inmediatamente, almacene a -20 °C hasta su uso.

Buffer de extracción

2% CTAB (p/v)

100 mM Tris-HCl (pH=8)

20 mM EDTA (pH=8)

1,4 M NaCl

Autoclave la solución y añada inmediatamente antes de su uso:

2% polivinilpirrolidona (PVP) Mr 750.000 (p/v)

2%  $\beta$ -mercaptetanol

#### **4.1.3 Protocolo de extracción de ADN con CTAB (Doyle y Doyle, 1990)**

1. Precaliente 5-7,5 ml de buffer CTAB en un tubo cónico a 60 °C en baño María.
2. Macere 0,5-1,0 g de hojas frescas en un mortero precalentado con el buffer CTAB.
3. Incube a 60 °C durante 30 min con una agitación suave.
4. Adicione 1 vol de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y agite suavemente.

Nota: En esta etapa se producen dos fases: la fase superior acuosa contiene el ADN y la fase inferior orgánica que contiene algunas proteínas degradadas, lípidos y compuestos secundarios.

5. Centrifugue por 10 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente.
6. Remueva la fase acuosa con una pipeta de punta ancha y transfírela a un tubo de centrifuga nuevo. Añada 2/3 de vol de isopropanol y mezcle suavemente para precipitar el ADN.
7. Centrifugue durante 1-2 min por 2.500 rpm a temperatura ambiente. Descarte el sobrenadante de la forma más suave posible sin perder el pellet. Añada buffer de lavado directamente sobre el pellet para resuspender el ADN.

8. Dé al menos 20 min con el buffer de lavado, centrifugue durante 10 min a 6.000 rpm a temperatura ambiente.
9. Descarte suavemente el sobrenadante y seque el pellet a temperatura ambiente.
10. Resuspenda el ADN adicionando 1 ml de buffer TE.  
Nota: en esta etapa el ADN obtenido es adecuado para su digestión y amplificación. Si no va a seguir con el proceso de lavado, debe dejar secar completamente el pellet de ADN a temperatura ambiente.
11. Añada RNAsa con una concentración final de 10 ug/ml e incube durante 30 min a 37 °C.
12. Diluya la muestra con dos volúmenes de agua destilada o TE. Añada acetato de amonio a una concentración final de 2,5 M, mezcle y 2,5 volúmenes de EtOH; mezcle suavemente para precipitar el ADN.
13. Centrifugue el ADN durante 10 min a 10.000 rpm en una centrifuga refrigerada.
14. Seque a temperatura ambiente y resuspenda en buffer TE.  
Nota: si el ADN no va a ser utilizado inmediatamente almacene a -20 °C hasta su uso.

#### Buffer CATB

Boromuro de hexadeciltrimetil amonio	2%
Cloruro de sodio	1,4 M
2-mercaptoetanol	0,2%
EDTA	20 mM
Tris-HCl, pH:8	100 mM

#### Buffer de lavado

EtOH	76%
Acetato de amonio	10 mM

#### Buffer TE

Tris-HCl pH=8	10 mM
EDTA, pH:7.4	1 mM

### **4.1.4 Protocolo para la extracción de ADN a partir de semillas de arroz modificado por Dellaporta (European Commission, 2006)**

1. Transfiera 10 g de la muestra previamente homogenizada en un tubo de centrífuga.

2. Adicione 100  $\mu$ l de buffer de extracción.
3. Adicione 7 ml de SDS 20%, mezcle invirtiendo los tubos.
4. Incube a 65 °C durante 40 min (invirtiendo cada 10 min los tubos). Centrifugue a 10.000 gravedades durante 10 min.
5. Filtre el sobrenadante a través de una membrana de filtración Mirachloth.
6. Transfiera 30 ml del sobrenadante filtrado a un nuevo tubo de 50 ml.
7. Adicione 9 ml de KAc 5M, y agite vigorosamente durante 1 min. Incube en hielo durante 30 min.  
Nota: mezcle durante este tiempo invirtiendo los tubos.
8. Centrifugue a 3.000 gravedades durante 20 min.
9. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de 50 ml usando una pipeta de 25 ml. Adicione isopropanol, mezcle suavemente durante 1 min.
10. Incube en hielo durante 5 min. Centrifugue a 3.000 gravedades durante 20 min.
11. Descarte el sobrenadante y seque el pellet con aire seco a 37 °C hasta que todo el isopropanol se evapore.
12. Disuelva el pellet en 1 ml de buffer TE.
13. Transfiera la solución de ADN a un tubo de 2 ml. Añada 10  $\mu$ l RNasa A (0,010 g/ml), mezcle suavemente e incube a 37 °C durante 20 min.
14. Adicione 800  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezcle durante 1 min.
15. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min.
16. Transfiera la fase acuosa a un tubo nuevo de 2 ml. Evite alterar la interfase.
17. Adicione 800  $\mu$ l de cloroformo y mezcle durante 1 min.
18. Centrifugue a 14.000 durante 10 min.
19. Transfiera la fase superior acuosa a un tubo nuevo de 2 ml con 90  $\mu$ l de NaAc 3 M. Evite alterar la interfase.
20. Adicione 600  $\mu$ l isopropanol y mezcle suavemente durante 1 min.
21. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min.
22. Descarte todo el sobrenadante. Adicione 1 ml de etanol al 70% para lavar el pellet. Agite el tubo durante 1 hora.
23. Centrifugue a 14.000 rpm durante 5 min.

24. Descarte el sobrenadante y séquelo con aire seco a 37 °C hasta que el etanol residual se evapore.
25. Adicione 100  $\mu$ l de TE 0,1X al pellet de ADN. Almacene las muestras toda la noche a 4 °C; pasado este tiempo agite el tubo durante 1 hora.
26. Centrifugue a 14.000 rpm durante 1 min.
27. Purifique las muestras de ADN utilizando el kit Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research) según las instrucciones del fabricante.
28. Resuspenda el ADN de la columna dos veces utilizando 50  $\mu$ l de TE 0,1X.

Nota: si el extracto no va a ser utilizado inmediatamente almacene a -20 °C hasta su uso.

#### Buffer de extracción

Tris HCl pH:8	100 mM
EDTA pH:8	50 mM
NaCl	500 mM
2-mercaptoetanol	10 mM

#### RNasa A

10 mg/ml

#### Buffer TE 1X

Tris pH:8.3	10 mM
EDTA pH:8	1 mM

#### Buffer TE 0.1X

Tris pH:8.3	10 mM
EDTA pH:8	0,1 mM

### **4.1.5 Protocolo para la extracción de ADN a partir de tejido vegetal fresco (minipreparación) (Edwards *et al.*, 1999)**

1. Homogenice el tejido vegetal dentro de un tubo de microcentrífuga durante 15 s, a temperatura ambiente.
2. Adicione 400  $\mu$ l de buffer de extracción y agite vigorosamente (vortex) durante 5 s.
3. Incube a temperatura ambiente durante 1 h.
4. Centrifugue a 13.000 rpm durante 1 min.

5. Transfiera 300  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga.
6. Adicione 300  $\mu$ l de isopropanol e incube durante 2 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugue a 13.000 rpm durante 5 min.
8. Seque el pellet y resuspéndalo con 100  $\mu$ l de buffer TE 1X.  
Nota: si el extracto no va a ser utilizado inmediatamente almacene a -20 °C hasta su uso.

#### **4.1.6 Procedimiento para la extracción de ADN a partir de muestras vegetales (minipreparación) (Pirttilä et al., 2001)**

1. Pese alrededor de 0,025-0,100 g de tejido vegetal fresco en un tubo de 1,5 ml. Cierre el tubo y póngalo en nitrógeno líquido durante 10 s. Con la ayuda de una punta de pipeta (200  $\mu$ l) homogenice la muestra hasta convertirlo en polvo fino.
2. Añada 600  $\mu$ l de buffer de extracción y mezcle vigorosamente. Incube a 65 °C en baño María durante 15 min.
3. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo.
4. Añada 2  $\mu$ l de RNAsa A e incube a 37 °C durante 10 min.
5. Añada un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) mezcle invirtiendo el tubo varias veces. Centrifugue a 14.000 rpm durante 3 min. Tome la fase superior y descarte.
6. Repita le extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.
7. Precipite el ADN añadiendo 0,6 vol isopropanol e incubándolo a -20 °C durante 10 min.
8. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Descarte el sobrenadante.
9. Lave el pellet de ADN dos veces con 1 ml de etanol al 70%.
10. Seque el pellet a temperatura ambiente y resuspenda el ADN con 50  $\mu$ l de buffer TE.

Nota: si el extracto no va a hacer utilizado inmediatamente almacene a -20 °C hasta su uso.

Buffer de extracción

Tris-HCl, pH:8	100 mM
EDTA, pH:8	50 mM

Cloruro de sodio	500 mM
SDS	(p/v)2%
2-mercaptoetanol	2%
Luego de autoclavar e inmediatamente antes de su uso añada 2% PVP (p/v)	
Buffer TE	
Tris-HCl pH:8	10 mM
EDTA pH:8	1 mM

## 4.2 Cuantificación

### 4.2.1 Protocolo para la estimación de la calidad y cantidad de ADN por electroforesis (Longo *et al.*, 2005)

1. Pese 0,8 g de agarosa por cada 100 ml de gel y dilúyalo en 100 ml de buffer TAE 1X. Caliente en horno microondas hasta su completa disolución.
2. Deje enfriar hasta una temperatura de 50-60 °C. Adicione 5  $\mu$ l de bromuro de etidio 10  $\mu$ g/ml y mezcle cuidadosamente.
3. Ubique los peines adecuadamente en la cámara de electroforesis, vierta la solución en el compartimiento del gel y dejar solidificar (no deben quedar burbujas).
4. Una vez el gel esté frío y coagulado, saque los peines cuidadosamente y póngalo en la cámara de electroforesis.
5. Adicione buffer TAE 1X de forma que el gel quede totalmente cubierto por el buffer.
6. Adicione en cada pozo una alícuota de ADN. Así: una mezcla de 5  $\mu$ l de ADN, 2  $\mu$ l de buffer de carga (*loading buffer*).
7. Adicione en uno de los pozos la misma mezcla pero con el marcador de peso molecular.
8. Tape la cámara de electroforesis y conéctela a la fuente de poder.
9. Encienda la fuente de poder y corra a 120 V durante 30 min.
10. Una vez se ha terminado el tiempo de corrida, lleve el gel y ubíquelo en un trasiluminador de luz UV.
11. Evalúe la calidad y cantidad de ADN por comparación con el marcador de peso molecular.

#### 4.2.2 Protocolo para la cuantificación de ADN por medio de espectrofotómetro (Universidad de Toledo, 2004)

1. Encienda el espectrofotómetro mínimo con 15 min de anticipación.
2. Tome los estándares y las muestras del refrigerador y descongele en hielo. Mézclelas suavemente (invirtiendo varias veces el tubo).
3. En un tubo nuevo de 1,5 ml, mezcle 10  $\mu\text{l}$  de la ADN con 990  $\mu\text{l}$  de agua desionizada. Mezcle vigorosamente (con la ayuda de un vortex).
4. Incube a temperatura ambiente durante 10 min permitiendo la completa dilución del ADN en la solución. Esta dilución equivale a 1:100.
5. En el espectrofotómetro seleccione ADN/RNA, usualmente se cuantifica dsADN.  
Nota: La absorbancia de 1 determina una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN.
6. Seleccione el factor de dilución y presione "enter".
7. Blanquee el espectrofotómetro, revisando que no existan interferencias dentro de la celda, luego adicione agua en una de las celdas. Presione "Blank/Zero".
8. Mezcle rápidamente la muestra de ADN (con ayuda del vortex) y transfiera esta solución a la celda (teniendo precaución de no formar burbujas en la celda).
9. Inserte la celda dentro del espectrofotómetro (asegurándose que esta por el lado correcto de lectura). Presione "Read". Una lectura de absorbancia aparecerá en la pantalla (aproximadamente 3-5 s después).
10. Realice la lectura de los estándares primero y luego de las muestras.

A260: corresponde a la longitud de onda absorbida por el ADN. Este valor es usado para determinar la concentración de ADN en las muestras de acuerdo con el factor de conversión (A260 de 1,0 = 50  $\mu\text{g/ml}$  ADN).

A280: La absorbancia generada a 280 nm se emplea en la relación A260/A280, la cual determina la pureza del ADN. Se considera una muestra adecuada cuando la relación es  $> 1,5$ .

Concentración: basado en el factor de conversión y el factor de dilución en el espectrofotómetro, el resultado será la concentración de ADN en la muestra ( $\mu\text{g/ml}$ ).

*Estándares de ADN:* se debe tener soluciones *stock* de concentraciones conocidas de ADN (500, 100, 50 y 10 ng/ $\mu$ l). Mantenga estas soluciones *stock* diluyendo el marcador (10 mg/ml) en agua libre de DNasa/RNasa.

## 5. Amplificación

Lo primero que se debe establecer es el objetivo de la detección, si se van a detectar secuencias no específicas o secuencias específicas para cada evento de transformación. En las tablas 1 y 2 se presentan algunas de las secuencias evaluadas en los eventos de OGM.

Tabla 1.  
Primers empleados para la detección de OGM con métodos no específicos.

Objetivo	Primer	Secuencia (5'-3')	Gen objetivo	Numero acceso	Citado en
	p-35S 35S-1	GCT CCT ACA AAT GCC ATC A	CAMV 35S promoter		Cardarelli <i>et al.</i> , 2005
	35S-2	GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA			
	p-35S p35S- cf3	CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG			
	p35S-cr4	TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C			
	35SF	CGT CTT CAA AGC AAG TGG ATT G	CAMV 35S promoter	NC- 001497 (EMBL)	Alary <i>et al.</i> , 2002
	35SR	TCT TGC GAA GGA TAG TGG GAT T			
	t-nos HA- nos118-f	GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG	NOS ter- minator		Cardarelli <i>et al.</i> , 2005
	HA-nos118-r	GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC			
MON810	35Saf2	TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G			Hernández <i>et al.</i> , 2004
Maíz	hsp508	CGG CAA GTA ATC AGC ACA G			
Maíz	ivr7	GCG CTC TGT ACA AGC GTG C			
Maíz	ivr8	GCA AAG TGT TGT GCT TGG ACC			

Continúa en la siguiente página

Objetivo	Primer	Secuencia (5'-3')	Gen objetivo	Numero acceso	Citado en
Soya	sltm1	AAC CGG TAG CGT TGC CAG			Hernández <i>et al.</i> , 2004
	sltm2	AGC CCA TCT GCA AGC CTT T			
GTS 40-3-2 soya	sltmf3a	GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC	CTP-EPSPS		
	sltm2a	CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC			
Soya / maíz		GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG	NOS terminator	AY125353 (EMBL)	Hernández <i>et al.</i> , 2004
Soya		TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA			
Soya / maíz		TGC CTC TGC CGA CAG TGG TC	CAMV 35S promoter	AY192160 (EMBL)	Lipp <i>et al.</i> 1999; Forte <i>et al.</i> 2005
		AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C			
Soya		CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG	CTP4-CP4 EPSPS		Trapmann <i>et al.</i> 2002; Forte <i>et al.</i> 2005
		GAC TTG TCG CCG GGA ATG			
Maíz / soya	p35S1	ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T	CAMV 35S promoter		Moriuchi <i>et al.</i> 2007
		CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T			
HA-nos 118		GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC	NOS terminator		Tengel <i>et al.</i> 2001
		GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG			
TM-35S-1 TM-35S-2		GCC TCT GCC GAC AGT GGT	p35S promoter	V00141	Lipp <i>et al.</i> 1999; Lipp <i>et al.</i> 2001
		AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT			
tNOSF		GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG	tNOS terminator	V00087	Holck <i>et al.</i> 2002
tNOSR		CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T			

Tabla 2.  
Primers empleados para la detección de OGM con métodos específicos.

Objetivo	Primer	Secuencia (5'-3')	Gen objetivo	Numero acceso	Citado en
Maíz	CRYIA1	CGG CCC CGA GTT CAC CTT	cryIA cryIA		Cardarelli <i>et al.</i> , 2005
	CRYIA2	CTG CTG GGG ATG ATG TTG TTG			
	CRYIA3	CCG CAC CCT GAG CAG CAC			
Maíz	CRYIA4	GGT GCA CGT TGT TGT TCT GA			
Bt11	Bt11f	TCC TTG TCC TTG ACA CAG TTT CTG			Hernández <i>et al.</i> , 2003
Maíz	Bt11r	GAT GTC ACT AGT CCG AGA ACG AA			
Maximaizer	crytm1	GTG GAC AGC CTG GAC GAG AT			
176 maíz	crytm2	TGC TGA AGC CAC TGC GGA AC			
RR soya	20b for (RRS)	CCA TTC TTG AAA GAT CTG CT	CP4EPSPS/ NOS Terminator	AJ783418 (GenBank)	Peano <i>et al.</i> 2005
		ATC CCA CTA TCC TTC GCA A			
Maíz	Bt176Cle	CGA ACT CGA TGC GGT CGA TGT	Bt176 35SCaMV/ BAR	AJ783419 (GenBank)	
		CCC TTC AAC TTC AGC AAC GGC			
	Bt11Cle	AAC CGC GAG TTG TTG TAT C	Bt11 35SCaMV/ adh intron	AJ783420 (GenBank)	
		CCT TAC TCT AGC GAA GAT CCT			
	MONCle	GCA GAT CTA CCG TCT TCG GTA CG	MON810 35SCaMV/ hsp70 intron	BD014473 (GenBank)	
		CTC AGC AAT CAC CAC ACA AGA GAG			
GA 21	ACC ATG TTG GCC TGA GCA GG	GA21 Actin promoter/ CTP	BD014494 (GenBank)		
	TCC CTC AGC ATT GTT CAT CCG TA				
Soya	RRO1	TGG CGC CCA AAG CTT GCA TGG C	Roundup Ready Soy		Tengel <i>et al.</i> , 2001
	RRO4	CCC CAA GTT CCT AAA TCT TCA AGT			

Continúa en la siguiente página

Objetivo	Primer	Secuencia (5'-3')	Gen objetivo	Numero acceso	Citado en
Maíz	MON 810F1311	CCT TCA TAA CCT TCG CCC	MON810	AF434709	Gankar <i>et al.</i> 2006
	MON 810R1311	AAT AAA GTG ACA GAT AGC TGG GCA			
Soya	RRS-F	GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT	GTS 40-3-2 soybean	AB209952	
	RRS-R	GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C			
Maíz	RR2075	CTGCCT GAT GAG CTC GAA TTC	Roundup Ready Soy	AJ783418	Peano <i>et al.</i> 2005
	NOSterN	GCG GGA CTC TAA TCA TAA AAA CCC			
	Bi1 135S ADH241	CAA TCC CAC TAT CCT TCG CAA	Bi1 1	AJ783420	
	Bi1 135S ADH241	GTA GAC GTC GGT GTG GCA GA			
	Bi1 7635S BAR151	TTC TTA TAG GGT TTC GCT CAG CTG	Bi1 76	AJ783419	
	Bi1 7635S BAR151	GGT TGA CGA TGG TGC AGA CC			
	RACTN	TCC CTC AGC ATT GTT CAT CGG TA	GA 21	BD014494	
	CTPN	ACC ATG TTG GCC TGA GCA GG			
	MON For	TGG AGA GGA CAC GCT GAC AA	MON810	BD014473	
	MON Rev	GCA TTC AGA GAA ACG TGG CAG TA			

## 5.1 PCR punto final

Los tiempos de la amplificación de PCR dependen de los primers seleccionados para la secuencia objetivo.

1. Ponga todos los reactivos en hielo.
2. En la cabina de flujo laminar prepare la mezcla maestra (*master mix*). Ésta se compone de buffer de PCR, dNTPs, primers y cloruro de magnesio.
3. Adicione de forma rápida la Taq polimerasa. Mezcle la mezcla maestra con el volumen total de todas las muestras que se va a evaluar.
4. Divida las alícuotas en tubos de microcentrífuga nuevos y adicione la muestra de ADN.

5. Coloque los tubos en el termociclador (previamente encendido)
6. Ingrese el programa de denaturación, anillaje, extensión y número de ciclos.
7. Una vez transcurrido el tiempo de amplificación. Puede dejar almacenados los tubos dentro del mismo termociclador a 4 °C, hasta su posterior análisis por electroforesis.

### **5.1.1 Electroforesis (Longo *et al.*, 2005)**

1. Pese 1,5-2 g de agarosa por cada 100 ml de gel y dilúyalo en 100 ml de buffer TAE 1X. Caliente en horno microondas hasta su completa dilución.
2. Siga con los pasos del numeral 4.2.1

### **5.1.2 Amplificación por PCR en tiempo real con SYBR Green (QIAGEN, 2002)**

1. Descongele QuantiTect™ SYBR® Green master mix 2X (almacenada a -20 °C), el ADN, los primers y el agua libre de RNAsas. Mezcle las soluciones individuales.
2. Prepare la mezcla maestra de acuerdo con la Tabla 3. Es necesario mantener las muestras y la mezcla maestra en hielo mientras se realiza la programación del equipo, para evitar que se presente denaturación de alguno de los componentes.
3. Mezcle la mezcla maestra vigorosamente y añada los volúmenes adecuados en los capilares de PCR (usualmente 20 µl).
4. Añada el ADN (10-100 ng/reacción) a cada uno de los capilares.
5. Centrifugue los capilares a 3.000 rpm por 20 s.
6. Programe el LightCycler® de acuerdo con el programa descrito en la Tabla 4.
7. Ubique los capilares en el LightCycler® y empiece a correr el programa.
8. Desarrolle el análisis de la curva de fusión de los productos de la PCR.

Tabla 3.  
Componentes de la reacción usando el sistema LightCycler.

Componente	Volumen/Reacción	Concentración final
2x QuantiTect™ SYBR® Green master mix	10 ml	1x
Primer A	Variable	0,5 µM
Primer B	Variable	0,5 µM
Agua libre de RNasa	Variable	-
Opcional: uracil-N-glicosilada Templado de ADN (añadido en el paso 7,4)	Variable	0,5 unidades/ reacción
Volumen total	20 ml	<1 µg/reacción

Tabla 4.  
Condiciones de PCR tiempo real para el sistema LightCycler.

Paso	Tiempo	Temperatura	Rampa	Observaciones
Activación inicial de la PCR	15 min	95 °C	20 °C/s	La HotStarTaq polimerasa es activada en este paso
<b>Ciclos</b>				
Denaturación	15 s	94 °C	20 °C/s	
Anillamiento	20-30 s	50-60 °C	20 °C/s	Aproximadamente 5-8°C debajo del Tm de los primers.
Extensión	10-30 s	72 °C	20 °C/s	Recoja los datos de fluorescencia u otros datos especificados al inicio del programa. El tiempo de extensión depende del tamaño del producto. Permita 5 s/100 pb, con un máximo de tiempo de extensión de 10 s
Adquisición de datos (opcional)	5 s	X °C	20 °C/s	Tm
Número de ciclos	35-55 ciclos			El número de ciclos depende de la cantidad de ADN

## 6. Métodos basados en proteínas

### 6.1 Extracción

#### 6.1.1 EnviroLogix QuantiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac (Envirologix, 2007a)

##### Tejido vegetal fresco

1. Tome aproximadamente 10 mg de material vegetal fresco, utilice la tapa de un tubo de 1,5 ml para romper el material. Con la ayuda de la punta de una pipeta, rompa el material vegetal.

Nota: si se desea la determinación cuantitativa de los niveles de toxina Cry1Ab cuantitativamente debe registrarse la cantidad de material vegetal.

2. Adicione 0,5 ml de buffer de extracción/dilución.
3. Homogenice la muestra con una punta nueva.

Nota: para la dilución de la muestra, las concentraciones de la proteína pueden variar de planta a planta; sin embargo, los extractos deben ser diluidos como mínimo 1:11 antes de realizar el ensayo.

##### Semilla individual

1. Tome una sola semilla en una bolsa plástica pequeña y mácelala. Traslere el material a un tubo extractor de tejido.
2. Adicione 1 ml de la solución de extracción de granos 1X a cada tubo y agite vigorosamente por 20-30 s.

Nota: para una extracción óptima de la proteína, lave el extracto con buffer de extracción por lo menos durante 4 horas.

3. Las muestras deben ser clarificadas por medio de cualquiera de estos dos métodos:
  - Centrifugue a 5.000 gravedades durante 5 min.
  - Filtre el material por medio de un filtro (0,45  $\mu$ m) con una baja unión a proteínas hidrofílicas.

##### Lote de semillas

1. La muestra de ensayo debe haber sido homogenizada y mezclada adecuadamente del lote de muestreo, obteniendo una muestra representativa.
2. Pese 0,5 g y adiciónelo a un tubo de 2,0 ml.
3. Adicione 1,25 ml de solución de extracción de granos 1X a cada tubo y agite vigorosamente por 20-30 seg. Puede

- evaluar muestras más grandes adicionando 2,5 ml/g de muestra.
4. Incube las muestras a temperatura ambiente durante 1 h.
  5. Agite nuevamente.
  6. La muestras deben ser clarificadas por medio de cualquiera de estos dos métodos:
    - Centrifugue a 5.000 gravedades durante 5 min.
    - Filtre el material por medio de un filtro (0,45  $\mu\text{m}$ ) con una baja unión a proteínas hidrofílicas.

### **6.1.2 EnviroLogix QuickStix™ Kit para granos de maíz Roundup Ready® NK603 determinando la proteína CP4 EPSPS (Envirologix, 2007b)**

1. Pulverice la muestra.
2. Adicione la cantidad de agua adecuada dependiendo la siguiente fórmula: granos de maíz x 1,5= ml de agua
3. Cierre y agite vigorosamente hasta que toda la muestra esté húmeda (20-30 s dependiendo de los granos).
4. Adicione a un tubo o vial el sobrenadante en cantidad suficiente para realizar el posterior análisis.

## **6.2 ELISA**

### **6.2.1 EnviroLogix QuantiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac (Envirologix, 2007a)**

1. El desarrollo de color es directamente proporcional a la presencia de la proteína Cry1Ab/Cry1Ac
2. Añada 100  $\mu\text{L}$  del control negativo, 100  $\mu\text{L}$  de cada calibrador y 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra a cada uno de los respectivos pozos (siga el orden de adición de reactivos).
3. Mezcle vigorosamente el contenido de cada pozo moviendo la cinta con movimientos circulares durante 20-30 s.  
Nota: tenga cuidado con la contaminación cruzada.
4. Cubra los pozos con parafilm o cinta para prevenir la evaporación e incube a temperatura ambiente durante 15 min. Use un agitador orbital a 200 rpm.
5. Adicione 100  $\mu\text{L}$  de la enzima conjugada Cry1Ab a cada pozo.
6. Agite vigorosamente el contenido de cada pozo.
7. Nuevamente, cubra la placa con cinta o parafilm e incube durante 1 h. Use un agitador orbital a 200 rpm.

8. Luego de la incubación, retire la cubierta cuidadosamente y agite vigorosamente el contenido de los pozos al desagüe.
9. Llene completamente los pozos con el buffer de lavado y vuelva a descartar. Repita este paso tres veces.
10. Para remover la mayor cantidad de agua posible ponga la placa invertida encima de un papel absorbente.
11. Añada 100  $\mu\text{L}$  del sustrato a cada pozo.
12. Mezcle vigorosamente el contenido de cada pozo. Cubra nuevamente los pozos con cinta o parafilm, incube a temperatura ambiente durante 30 min. Use un agitador orbital a 200 rpm.
13. Añada 100  $\mu\text{L}$  de la solución de parada a cada pozo y mezcle vigorosamente. La reacción se tornará amarilla.
14. Lea la placa dentro de los primeros 30 min después de añadir la solución de parada.

### 6.3 Bandas de flujo lateral

#### 6.3.1 EnviroLogix QuickStix™ Kit para granos de maíz Roundup Ready® NK603 determinando la proteína CP4 EPSPS (Envirologix, 2007b)

1. Las bandas deben estar a temperatura ambiente antes de usarlas.
2. Ubique la banda en el vial; la muestra subirá por capilaridad a la banda.
3. Permita que la reacción se lleve a cabo durante 5 min. Las muestras positivas serán visualizadas a una mayor velocidad.
4. Para poder almacenar la banda, corte y descarte la sección inferior de la banda cubierta con cinta.

### 7. Límites de detección

Los límites de detección (LD) pueden ser expresados empleando la siguiente ecuación:

$$DL = \frac{3.3 \bar{\sigma}}{S}$$

Donde  $\bar{\sigma}$  es la desviación estándar de la respuesta, estimado como la desviación del blanco o por la curva de calibración (creada a partir de muestras con el analito en concentraciones del LD). La

desviación residual de la regresión lineal o de la desviación estándar del intercepto de y en la regresión lineal puede ser usado como desviación estándar. S es la pendiente de la curva de calibración.

## 8. Límites de cuantificación

El límite de cuantificación puede ser calculado de tres formas diferentes.

- Evaluación visual  
Se obtiene por medio del análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito y estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede ser cuantificado con una exactitud y precisión aceptables.
- Detección de ruido  
Sólo es aplicable a ensayos en los que se observe un ruido base. Esta determinación es desarrollada comparando los resultados de muestras con concentraciones bajas del analito contra el blanco y estableciendo una concentración mínima al cual el analito puede tener una detección confiable.
- Desviación estándar de la pendiente  
Expresándolo (LC) así:

$$LC = \frac{10 \delta}{S}$$

Donde  $\delta$  es la desviación estándar de la respuesta, estimado como la desviación del blanco o por la curva de calibración (creada a partir de muestras con el analito en concentraciones del LD). La desviación residual de la regresión lineal o de la desviación estándar del intercepto de y en la regresión lineal puede ser usado como desviación estándar.

## 9. Informe de resultados

Existen diferentes maneras de expresar el contenido de OGM, una de ellas puede ser calculando el porcentaje de ADN, así (Lübeck, 2007):

- Análisis de % de ADN en 3.000 granos o semillas usando la PCR cuantitativa.

## 10. Control de calidad para la detección de OGM

Se debe tener en cuenta, durante todas las etapas de la detección de OGM (muestreo, extracción, amplificación, análisis, visualización, reporte de resultados), la alta probabilidad de contaminación cruzada. El material de muestreo, los equipos de acondicionamiento y el material de extracción y detección deben ser limpiados periódicamente antes del análisis (Bindler *et al.*, 1999). A continuación se enumeran los aspectos más importantes en cada paso para obtener datos confiables:

- Preparación de material para análisis: la preparación de todos los reactivos para el análisis de OGM (acondicionamiento, extracción, amplificación-detección) deben estar bajo las normas propias de cada uno de los reactivos o de los lineamientos de los procedimientos involucrados. Los reactivos deben ser de alto grado (pureza o grado molecular).
- Controles de extracciones de ADN: para la extracción de ADN de material biológico, el laboratorio debe emplear controles de extracción determinados por los kits comerciales, o por medio de comparaciones entre diferentes protocolos de extracción.
- Controles de amplificación en la PCR: el laboratorio debe tener controles, tanto positivos como negativos, de todas las amplificaciones que se realizan en la PCR en tiempo real, o punto final.
- Inmunoanálisis con ELISA: algunos kits incluyen calibradores (sustancia conocida del analito objetivo) y un control negativo (libre de la proteína objetivo) para ser visualizado o interpretado instrumentalmente. Estos estándares desarrollan diferentes intensidades de colores dependiendo de las concentraciones incluidas.
- Uso de equipos adecuados, calibrados, evaluados y verificados: el laboratorio debe tener los equipos en buenas condiciones y deben ser de uso exclusivo para la detección de OGM.
- Uso de metodologías, procesos y análisis normalizados o validados: el laboratorio debe realizar los protocolos de detección de OGM bajo lineamientos normalizados internacionalmente o publicaciones científicas.

- **Cálculo de la incertidumbre:** se debe realizar en todos los procedimientos analíticos, realizados dentro del laboratorio.

## Glosario

**Alimento:** todo producto natural o artificial, elaborado o no, que ingerido aporta al organismo los nutrientes y la energía necesarios para el desarrollo de los procesos biológicos. Quedan incluidas las bebidas no alcohólicas, y aquellas sustancias con que se sazonan algunos comestibles y se conocen con el nombre genérico de especia.

**Bioseguridad:** conjunto de medidas y acciones que se deben tomar para evaluar, evitar, prevenir, mitigar, manejar y/o controlar los posibles riesgos y efectos directos o indirectos, que puedan afectar la salud humana, el medio ambiente y la biodiversidad, la productividad o producción agropecuaria, como consecuencia de la investigación, introducción, liberación, movimiento transfronterizo y producción de OGM.

**Cebador o primer:** oligonucleótido que se usa para iniciar una reacción de PCR. El primer se une a la secuencia complementaria y eso permite que la polimerasa comience la elongación o extensión de la molécula de ADN.

**Contramuestra:** parte de la muestra que se almacena, y sirve como garantía para repetir análisis a partir de la muestra original.

**Especificidad:** fracción del número total de detecciones de OGM negativas que son asignadas correctamente con el método utilizado.

**Exactitud (veracidad):** expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado) o valor

encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

**Grano:** tipo de fruto, llamado técnicamente cariósipide, típico de los cereales.

**Intervalo de linealidad:** ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra, (incluyendo éstas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

**Limite de cuantificación:** cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.

**Limite de detección:** cantidad más pequeña de analito en una muestra, que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

**Linealidad:** habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

**Material certificado de referencia:** aquel material de referencia que va acompañado de un certificado otorgado por una institución reconocida mundialmente.

**Material de referencia:** material o sustancia que posee valores de una o más propiedades suficientemente homogéneas y claramente establecidas como para poder ser utilizados en la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medida o la asignación de valores o materiales.

**Material vegetal:** muestra de cualquier parte de una planta, raíz, tallo, semilla, hojas o frutos, que puede ser empleado para la detección de OGM por diferentes técnicas analíticas.

**Método analítico:** adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionada.

**Muestra:** porción o fracción del material a ser analizado. Puede ser obtenida a partir de múltiples sub-muestras tomadas del lote de muestreo.

**OGM:** organismo genéticamente modificado. Cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético, que se haya obtenido mediante la aplicación de la tecnología de ADN recombinante, sus desarrollos o avances; así como sus partes, derivados o productos que los contengan, con capacidad de reproducirse o de transmitir información genética. Se incluyen dentro de este concepto los organismos vivos modificados (OVM) a que se refiere el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología.

**Pellet:** sedimentos que se forman una vez el material celular más pesado se ha precipitado después de una centrifugación o decantación.

**Polisacáridos:** los polisacáridos son polímeros cuyos monómeros son los monosacáridos, que se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos. Estos compuestos llegan a tener un peso molecular muy elevado.

**Polifenoles:** son sustancias de gran capacidad antioxidante. Son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas.

**Precisión:** expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Debe determinarse utilizando muestras originales y homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea puede ser determinada usando muestras preparadas o una disolución de la muestra.

**Promotor:** el promotor de un gen es una secuencia del ADN que controla la iniciación de la transcripción del ARN como producto de un gen específico.

**Procedimiento analítico:** forma en que se realiza un análisis dado. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Puede incluir, los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de los aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos.

**Proteína:** son macromoléculas de masa molecular elevada, formadas por cadenas lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Las proteínas pueden estar formadas por una o varias cadenas peptídicas y son biomoléculas constituidas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Suelen además contener azufre y algunas también fósforo, hierro, magnesio o cobre, entre otros elementos.

**Reproducibilidad:** expresa la precisión de una técnica para obtener resultados similares entre diferentes muestras con concentración del analito conocida.

**Selectividad:** describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

**Semilla:** embrión vegetal en estado de vida latente, acompañado de tejido nutritivo y protegido por tegumentos.

**Sobrenadante:** fase superior acuosa resultado de la centrifugación.

**Sensibilidad:** fracción de detecciones de OGM positivas que son asignadas correctamente con el método utilizado.

**Solidez:** medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer estable por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

**Terminador:** secuencia del ADN que contiene las señales que determinan la finalización del proceso de transcripción de un gen específico del ADN.

**Validación:** confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas de que se han cumplido los requisitos para el uso pretendido o una aplicación específica.

## Referencias

Ahmed F. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods TRENDS in Biotechnology. 20(5):215-223.

Alary R., Serin A., Maury D., Jouira H., Sirven J., Gautier M. and Joudrier P. 2002. Comparison of Ssimplex and Duplex Real-time PCR for the Quantification of GMO in Maize and Soybean. Food Control. 13: 235-244.

Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H. and Van Den Eede G. 2002. Analytical Methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms in Agricultural Crops and Plant-Derived Food Products. European Food Research Technology. 214:3-26.

Applied Biosystems. 2001. User Bulletin #2: Relative Quantification of Gene Expression.

Asif M. 2004. Sampling for Detection of GMO. In: NIBGE-FAO Workshop on GMO Detection. Capacity and Building in Biosafety of Genetically Modified Crops: GMOs Detection. Zafar Y. y Asif M. (ed). National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering. Pakistan.

Berdal K. and Holst-Jensen A. 2001. Roundup Ready® Soybean Event-specific Real-time Quantitative PCR Assay and Estimation of the Practical Detection and Quantification Limits in GMO Analysis. European Food Research Technology 213(6):432-438.

Bindler G., Dorlhac F., Gadani F., Gregg E., Guo Z., Klus H., Maunders M., Mueller L., Negishi H., Pijnenburg H., Ward M. and Zuber J. 1999. Report of the Task Force Genetically Modified Tobacco: Detection Methods. CORESTA Bulletin 1999-4. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. Paris, France. pp 77-148.

Brodmann P., Berthoud I. and Herrmann H. 2002. Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. *Journal AOAC International*. 85:646-653.

Brookes G. 2007. The Benefits of Adopting Genetically Modified, Insect Resistant (Bt) Maize in the European Union (EU): First Results from 1998-2006 Plantings. <http://www.pgeconomics.co.uk>.

Cardarelli P., Branquinho M., Ferreira R., da Cruz F. and Gemal A. 2005. Detection of GMO in Food Products in Brazil: The INCQS Experience. *Food Control*. 16: 859-866.

Convenio de Diversidad Biológica. 2000. Río de Janeiro, Brasil. <http://www.cbd.int/convention/convention.shtml>

Doyle, J. y Doyle, J. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus*. 12:13-15.

EA. 2003. EA-4/16. Guidelines on the Expression of Uncertainty in Quantitative Testing. European Co-operation for Accreditation. <http://www.european-accreditation.org/n1/doc/ea-4-16.pdf>

Edwards K., Johnstone C. and Thompson C. 1999. A Single and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acid Research*. 19(6): 1349.

Envirologix. 2007a. EnviroLogix QuantiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac. [www.EnviroLogix.com](http://www.EnviroLogix.com). Fecha de consulta: 14 de abril 2007.

Envirologix. 2007b. EnviroLogix QuickStix™ Kit para granos de maíz Roundup Ready® NK603 determinando la proteína CP4 EPSPS. [www.EnviroLogix.com](http://www.EnviroLogix.com). Fecha de consulta: 17 de abril 2007.

Ermolli M. Fantozzi A., Marini M., Scotti D., Balla B., Hoffmann S., Querci M. Paoletti C. and Van den Eede G. 2004. Food Safety: Screening Tests Used to Detect and Quantify GMO Proteins. *Accreditation Quality Assurance*. 11: 55-57

European Commission. 2006. Sampling and DNA extraction of rice Report on the Validation of a "Dellaporta-derived Method for DNA Extraction from Ground Rice Grains/Seeds". Doctorate General Joint Research Center. Institute of Health and Consumer Protection.

Forte V., Pinto A., Martino C., Tantillo G., Grasso G. and Schena F. 2005. A General Multiplex-PCR Assay for the General

Detection of Genetically Modified Soya and Maize. Food Control. 16:535-539.

Furr K. 1995. CRC Handbook of Laboratory Safety. 4th edition. CRC Press. Florida, USA. 783.

Gankar K., Štebih D., Dreo T., Žel J. and Gruden K. 2006. Critical Points of DNA Quantification by Real-time PCR – Effects of DNA Extraction Method and Sample Matrix on Quantification of Genetically Modified Organisms. BMC Biotechnology. 6:37.

Haque K., Pfeiffer R., Beerman M., Struewing J., Chanock S. and Bergen A. 2003. Performance of High-throughput DNA Quantification Methods. BMC Biotechnology. 3:20.

Hernández M., Esteve T., Prat T. and Pla M. 2004. Development of Real Time PCR Systems Base on SYBR Green I, Amplifluor™ and TaqMan® Technologies for Specific Quantitative Detection of the Transgenic Maize Event GA21. Journal of Cereal Science. 39:99-107.

Holck A., Vaitilingom M., Didierjean L. and Rudi K. 2002. 5' nuclease PCR for Quantitative Event Specific Detection of the Genetically Modified MON810 MaisGard™ Maize. European Food Research Technology. 214:449-453.

Holst-Jensen A. and Berdal K. 2004. The Modular Analytical Procedure and Validation Approach and the Units of Measurement for Genetically Modified Materials in Foods and Feeds. Journal of AOAC International. 87:927-936.

Holst-Jensen A., Rønning S., Løvseth A. and Berdal K. 2003. PCR Technology for Screening and Quantification of Genetically Modified Organisms (GMOs). Anal Bioanalytical Chemistry. 375: 985–993.

Hubner B., Gase G. and Baldwin I. 2004. Two-fold Differences Are the Detection Limit for Determining Transgene Copy Numbers in Plants by Real-time PCR. BMC Biotechnology. 4:14.

Hubner P., Waiblinger H., Pietsch K. and Brodmann P. 2001. Validation of PCR Methods for Quantification of Genetically Modified Plants in Food. Journal AOAC International. 84:1855-1864.

IBT. 2007. Instituto de Biotecnología UNAM. <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html>. Fecha de consulta: 22 de abril de 2007.

ICA. 2006a. Resolución número 3744 por la cual se establece que el maíz con la tecnología Roundup Ready®, evento NK 603

es apto para consumo como alimento de animales domésticos en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

ICA. 2006b. Resolución número 3745 por la cual se establece que el maíz con la tecnología Herculex I<sup>®</sup>, evento TC 1507 es apto para consumo como alimento de animales domésticos en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia.

ICA. 2006c. Resolución número 3746 por la cual se establece que el maíz con la tecnología Yieldgard<sup>®</sup>, evento MON 810 es apto para consumo como alimento de animales domésticos en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia.

ICA. 2007a. Resolución número 467 por la cual se autorizan las siembras de maíz con la tecnología Herculex I. Instituto Colombiano Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia.

ICA. 2007b. Resolución número 340 por la cual se autoriza ampliar las zonas de evaluación para estudios de bioseguridad con Maíz con la tecnología Yieldgard<sup>®</sup> (MON810) y Roundup Ready<sup>®</sup> (NK630). Instituto Colombiano Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia.

ISO. 1999. Norma Internacional ISO 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo.

ISTA. 1999. International Seed Testing Association. [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org). Fecha de consulta: 11 de Abril 2007.

James C. 2006. Global Status of Transgenic Crops, Varius Global Review Briefs from 1996 to 2006, ISAAA. <http://www.isaaa.org>. Fecha de consulta: 15 de mayo de 2007.

Kay S. and Van den Eede G. 2001. The Limits of GMO Detection. *Nature Biotechnology*. 19(5):405.

Kubista M., Andrade J., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A. and Zoric N. 2006. The Real-time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27:95-125.

Lin R., Ding Z., Li L. and Luang T. 2001. A Rapid and Efficient DNA Minipreparation Suitable for Screening Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19:379a-c.

Lipp M., Anklam E. and Stave J. 2001. Validation of an Immunoassay for Detection and Quantification of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. 83: 917–927.

Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Pauwels J. and Anklam E. 1999. IUPAC Collaborative Trial Study Of A Method To Detect Genetically Modified Soybeans And Maize In Dried Powder. *Journal of AOAC Internacional*. 82: 923–928.

Longo F., Forero C., Rodríguez F. y Vázquez E. 2005. Seminario-Taller. "Detección de organismos genéticamente modificados (OGM) en granos y alimentos". Proyecto GEF-BM Bioseguridad Colombia.

Lübeck, M. 2007. Detection of Genetically Modified Plants. Danish Forest and Nature Agency.

Mattarucchi E., Weighardt F., Barbati C., Querci M. and Van den Eede G. 2005. Development and Applications of Real-time PCR Standards for GMO Quantification Based on Tandem-marker Plasmids *European Food Research Technology*. 221:511–519.

Miraglia M., Berdal K., Brera C., Corbisier C., Holst-Jensen A., Kok E., Marvin H., Schimmel H., Rentsch J., van Rie J. and Zagon J. 2004. Detection and Traceability of Genetically Modified Organisms in the Food Production Chain. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1157–1180.

Moriuchi R., Monma K., Sagi N., Uno N. and Kamata K. 2007. Applicability of Quantitative PCR to Soy Processed Foods Containing Roundup Ready® Soy. *Food Control*. 18:191–195.

OECD. 2005. A Framework for Biotechnology Statistics. Organization for Economic Co-operation and Development.

Paoletti C., Donatelli M., Grazioli E. and Van den Eede G. 2003. GMOs Analysis in Large Kernel Lots: Modeling Sampling of Non-Randomly Distributed Contaminants. *Proceedings GMCC Conference*. 119-122. Denmark.

Peano C., Bordón R., Gulli M., Mezzelani A., Samson M., De Bellis G. and Marmiroli N. 2005. Multiplex Polymerase Chain Reaction and Ligation Detection Reaction/Universal Array Technology for the Traceability of Genetically modified Organisms in Foods. *Analytical Biochemistry*. 346: 90–100. Pirttilä A., Hirsikorpi M., Kämäräinen T., Jaakola L. and Hohtola

A. 2001. DNA Isolation Methods for Medicinal and Aromatic Plants. *Plant Molecular Reporter*. 19:273a-f.

Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2000. Montreal. <http://www.cbd.int/biosafety/protocol.shtml>

QIAGEN. 2002. QuantiTect SYBR® Green PCR Handbook.

Querci M. 2006. Manual Presentation, Working Methods and Course Introduction. In: *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. WHO. European Commission. JRC.

Tengel C., Schvüssler P., Setzke E., Balles J. and Sprenger-Haussels M. 2001. PCR-based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs. *Bio Techniques*. 31: 426–429.

Trapmann S., Catalani P., Conneely P., Corbisier P., Gancberg D., Hannes E., Le Guem L., Kramer N., Prokisch J., Robouch P., Schimmel H., Zeleny R., Pauwels J., Van den Eede G., Weighardt F., Mazzara M. and Anklam E. 2002. The Certification of Reference Materials of Dry Mixed Soybean Powder with Different Mass Fraction of Roundup Ready® Soya. Certified Reference Materials IRMM-410S. European Commission, Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurement (IRMM), Geel (BE).

Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. and Erlich H. 1985. Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.

Schreiber G. 1999. Challenges for Methods to Detect Genetically Modified DNA in Foods. *Food Control*. 10: 351:352.

SDI. 2003. Trait RUR test kit. Bulk Grain testing. P/N 3099956.

Shirai N., Momma K., Ozawa S., Hashimoto W., Kito M., Utsumi S., and Murata K. 1998. Safety Assessment of Genetically Engineered Food: Detection and Monitoring of Glyphosate-tolerant Soybeans. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62:1461–1464.

Smith D. and Maxwell P. 2007. Use of Quantitative PCR to Evaluate Several Methods for Extracting DNA from Corn Flour and Cornstarch. *Food Control*. 18: 236-242.

Somma M. 2005. The Analysis of Food Samples for the Analysis of Genetically Modified Organisms. Session 4. European Commission. Joint research Centre.

Universidad de Toledo, 2004. DNA Quantification (spectrophotometry). Laboratory for Microbial Ecology. Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences.

Van den Bulcke M., De Schrijver A., De Bernardi D., Devos Y., MbongoMbella G., Leunda A., Moens W. and Sneyers M. 2007. Detection of Genetically Modified Plant Products by Protein Strip Testing: An Evaluation of Real-life Samples. European Food and Research Technology. 225:49–57.

Wolf C., Scherzinger M., Wurz A., Pauli U., Hübner P. and Lüthy J. 2000. Detection of Cauliflower Mosaic Virus by the Polymerase Chain Reaction: Testing of Food Components for False- Positive 35S-Promoter Screening Results. European Food Research Technology. 210:367–372.

Zet J., Cankar K., Ravnikar M., Camloh M. and Gruden K. 2006. Accreditation of GMO Detection Laboratories: Improving the Reliability of GMO Detection. Accreditation Quality Assurance. 10: 531–536.