



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Decenio de las Naciones Unidas
sobre La Biodiversidad

Módulo Didáctico: Recursos Genéticos y Bioseguridad

“BASES TÉCNICAS PARA LA SEGURIDAD DE BIOTECNOLOGÍA”

Cajamarca, 19 - 21 junio de 2012

Blgo. David Castro Garro
Especialista en Biotecnología
Dirección General de Diversidad Biológica

20/06/2012

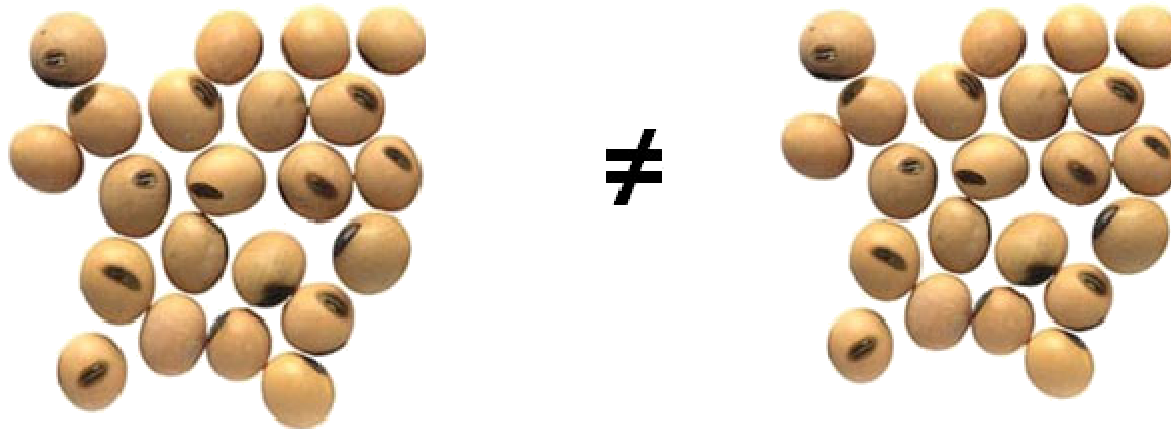
www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

4. DETECCIÓN DE OVM



Se requiere contar con metodologías que permitan realizar la detección e identificación de eventos transgénicos de manera sensible, reproducible, rápida y de bajo costo.

20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

Necesario para:

- Asegurar la pureza y segregación de los productos o eventos.
- Permitir la trazabilidad de las modificaciones genéticas en la industria de alimentos, las compañías de semillas y los cultivos.
- Asegurar el cumplimiento con la legislación por las autoridades competentes.
- Tener la capacidad de identificar productos específicos en el mercado.

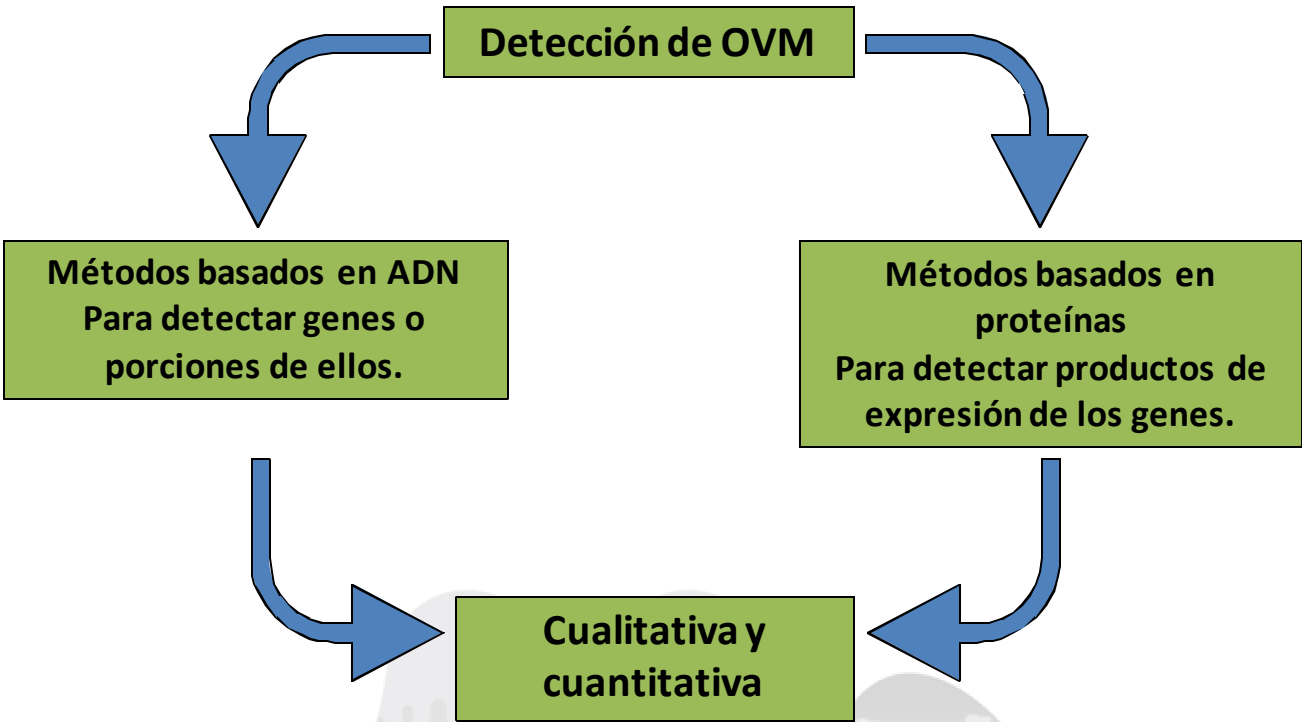
Trazabilidad: Es la posibilidad de identificar el origen y las diferentes etapas de un proceso de producción y distribución de bienes de consumo

20/06/2012

www.minam.gob.pe



Principales métodos de detección de OVM



20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

Principales métodos de detección de OVM

Métodos basados en el análisis de ADN:

- Detección en muestras con alto grado de procesamiento
- Requieren equipo y personal especializado laboratorio
- Los resultados son más precisos
- Metodologías más laboriosas

Métodos basados en el análisis de proteínas:

- Para materias primas
- Se pueden aplicar en el campo
- No requiere personal muy especializado
- El formato de tiras reactivas no requiere equipo especializado
- Metodología simple

20/06/2012

www.minam.gob.pe



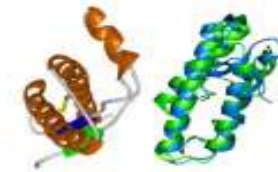
PERÚ

Ministerio
del Ambiente

Principales métodos de detección de OVM

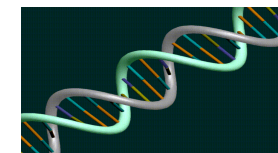
1. Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas:

- ELISA (Ensayo de inmunodetección)
- Strips o tiras reactivas
- Western Blot



2. Detección del ADN de los OVM

- PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

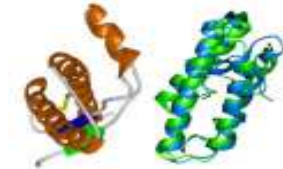


20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



Requerimientos para la detección de OVM

Moléculas Blanco:

- ADN o proteína.

Captura de moléculas:

- Para ADN: Iniciadores.
- Para Proteínas: Anticuerpos.

Materiales de referencia:

- Controles positivos y negativos.
- Calibradores para cuantificación.

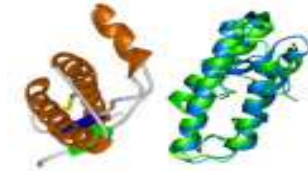
20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

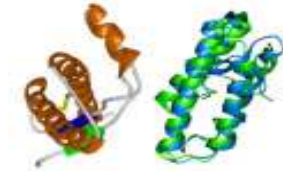
- Esta metodología se basa en el reconocimiento específico de una porción de proteína expresada por el OVM mediante un anticuerpo, recreando una respuesta inmune.
- Puede permitir la detección específica de determinado anticuerpo por un epítipo único.
- Alta especificidad.

20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

ELISA “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”

- Básicamente, esta prueba es una reacción antígeno-anticuerpo que se lleva a cabo en una fase sólida (placa 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, que puede ser medida fotométricamente.

20/06/2012

www.minam.gob.pe

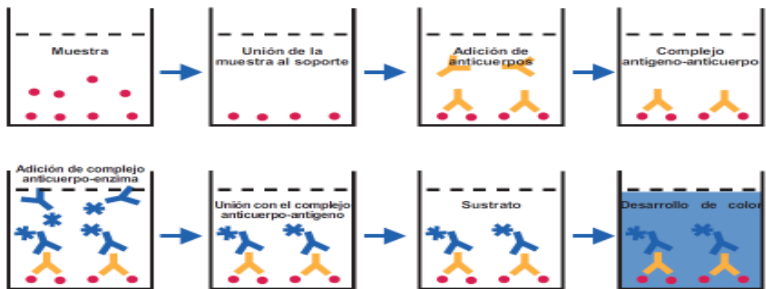


PERÚ

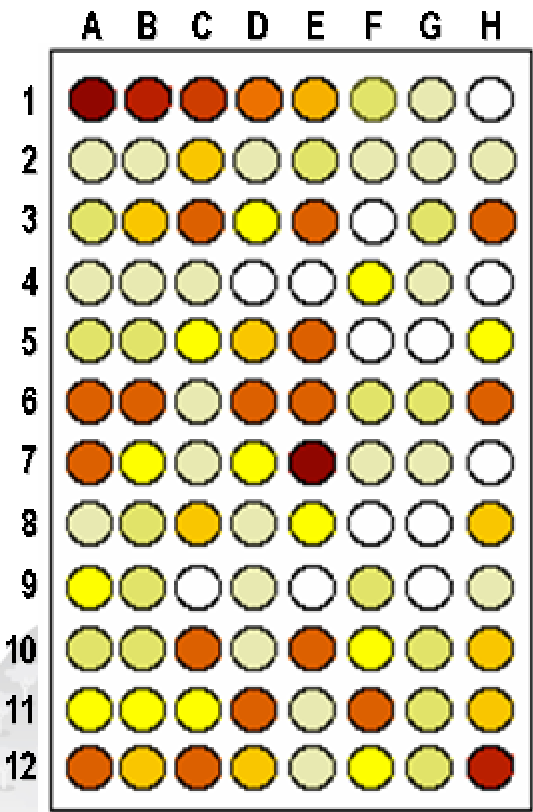
Ministerio
del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas



ELISA:
Respuesta

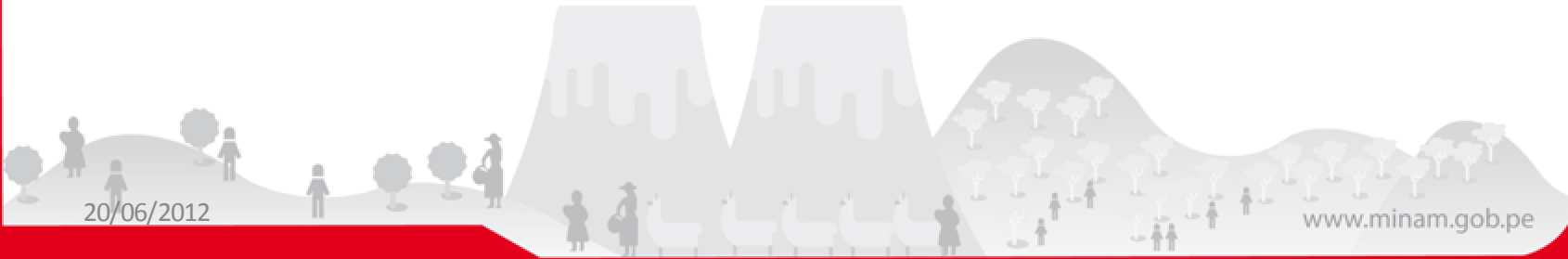
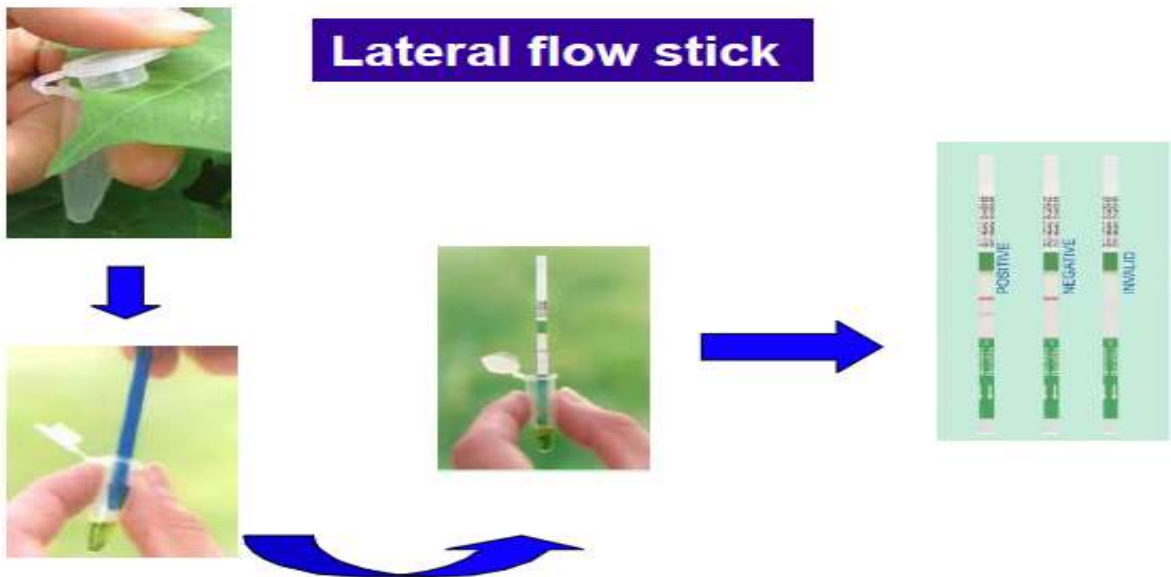


20/06/2012

ob.pe

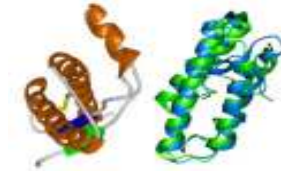


Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas





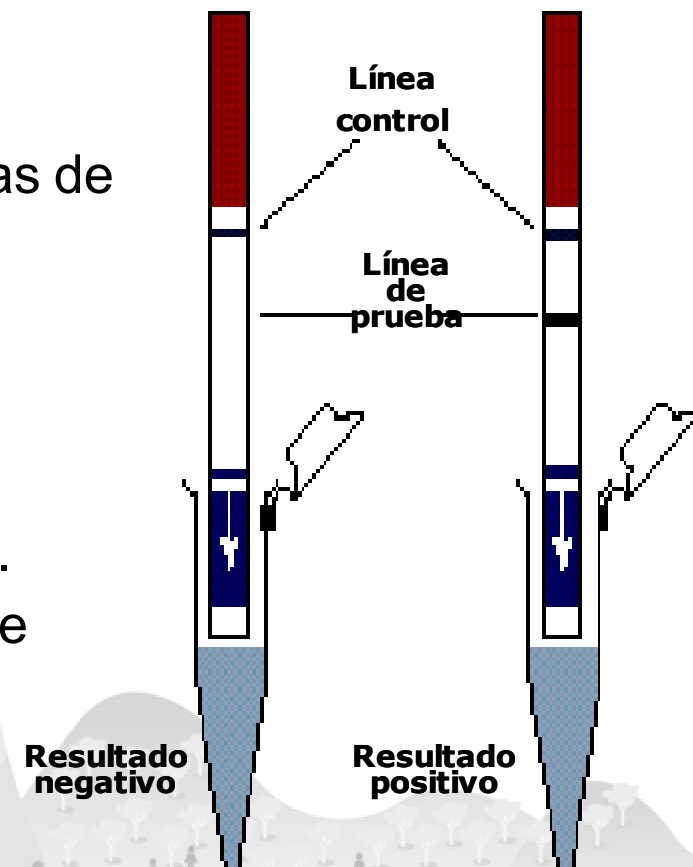
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Tiras de flujo lateral

- Variación comercial de las pruebas de ELISA que permiten obtener resultados semi cuantitativos de forma sencilla y rápida.
- Se emplean para la detección de OVM en hojas, semillas y granos. Como soporte se emplean tiras de papel o plásticas, que es donde ocurre la reacción.



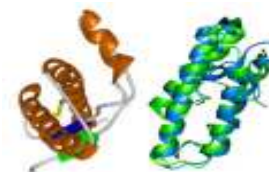
20/06/2012

www.minam.gob.pe



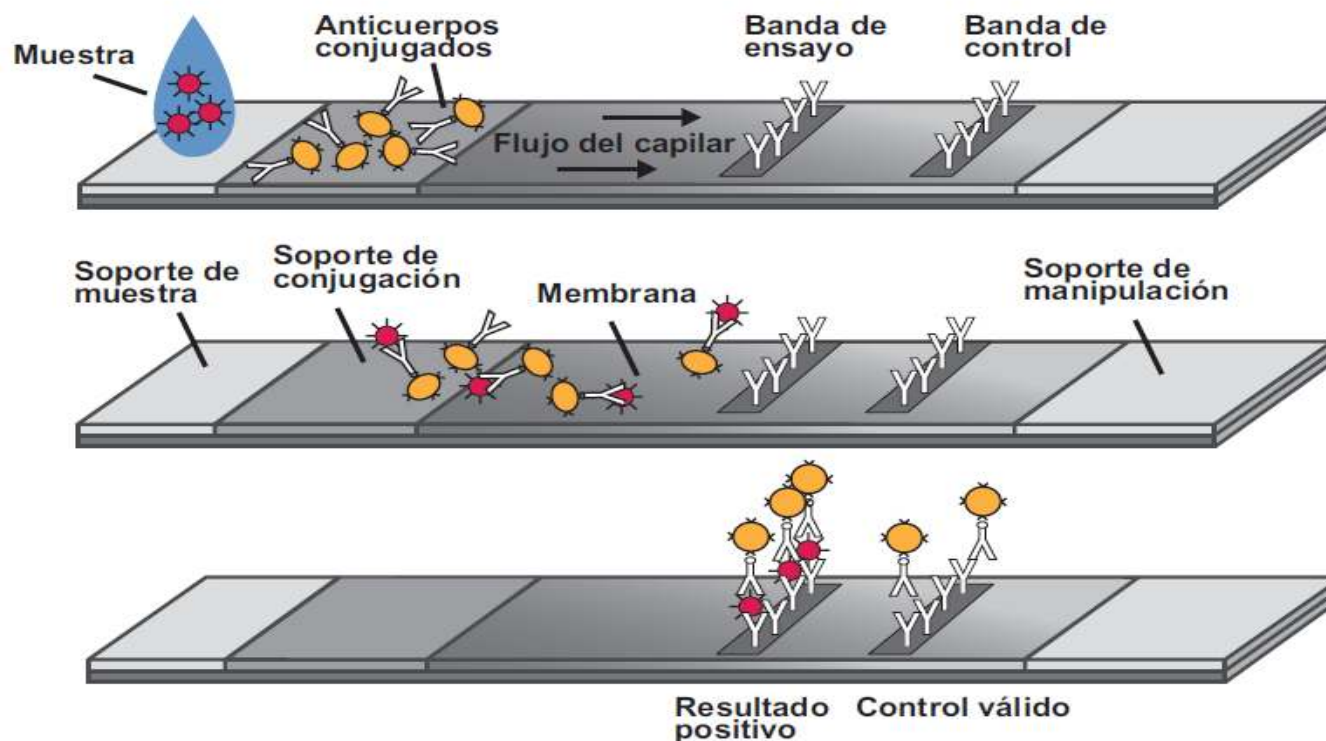
PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Tiras de flujo lateral



20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas



Western Blot

- Es un método altamente específico que permite determinar si la muestra contiene la proteína objetivo, eficiente con proteínas insolubles.
- Se basa en la separación de proteínas de una muestra en función de su tamaño mediante electroforesis y posterior detección mediante anticuerpos específicos para la proteína.

20/06/2012

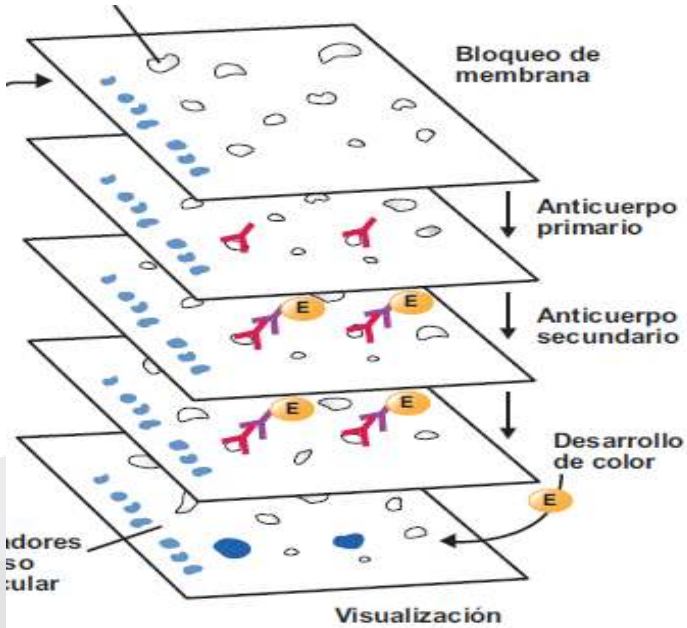
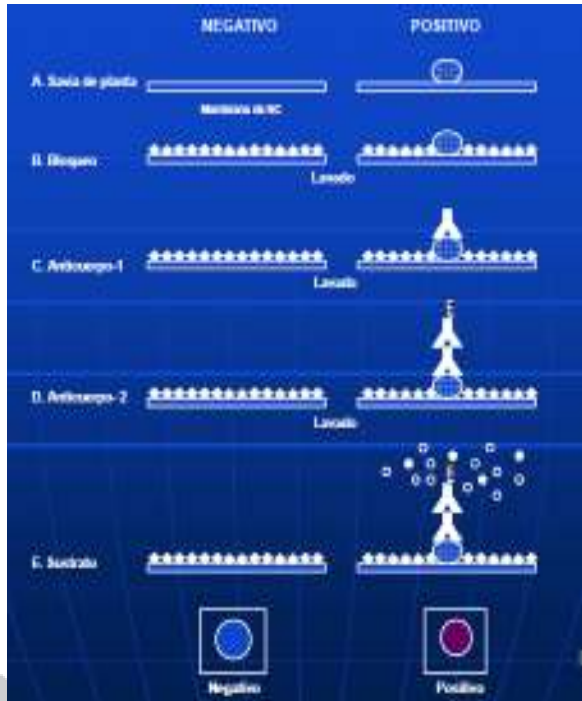
www.minam.gob.pe



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Western Blot

Proteínas transferidas



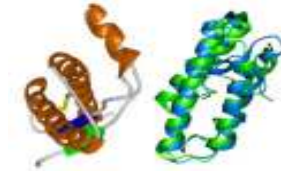
20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Ventajas

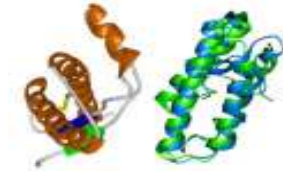
- No requiere mucha preparación de la muestra.
- Ensayo relativamente rápido (2-4 horas, incluyendo preparación de la muestra).
- Produce resultados cualitativos o semi-cuantitativos.
- Costo relativamente bajo o medio.
- Aplicable para el análisis de muestras numerosas.

20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



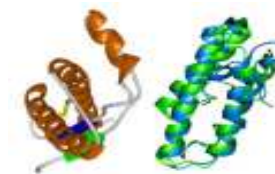
Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Desventajas

- Faltan anticuerpos relevantes para los diversos eventos OVM.
- Pueden producirse falsos positivos.
- No todos los OVM expresan la proteína en todas partes de las plantas.
- ELISA no son evento específico.

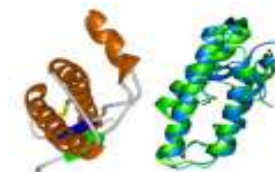
20/06/2012

www.minam.gob.pe



Algunos kits de diagnóstico basado en ELISA (Cont.)

Compañía	Nombre del Kit	Formato de la prueba
Agdia Inc., USA	Bt- Cry 1Ab, -Cry1Ac, -Cry1c, -Cry2A, -Cry3A, -Cry9C	DAS-ELISA
	DAS-ELISA	Immunostrips
Biogenetic Services Inc., USA	Cry 1Ab (Corn Mon809, 810, Bt 11, E-176)	ELISA (about 0.15% detection level)
	Cry9C (Corn CBH 351, Starlink)	ELISA (about 0.04% detection level)
	Cry1F (Corn Herculex)	ELISA
	CP4 (EPSPS Soybean RR)	ELISA (about 0.05% detection level)



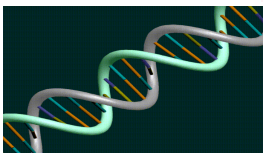
Algunos kits de diagnóstico basado en ELISA

Compañía	Nombre del Kit	Formato de la prueba
EnviroLogix Inc., USA	Cry 1Ab & Cry1Ac in Bt corn and cotton	ELISA
	Cry2A, Cry1C, Cry1F, Cry3B and Cry9C in Starlink Corn	ELISA
	Cry9C	Quickstix (1 kernel in 800 in 5 min.)
Neogen Corporation, USA	CP4	Lateral flow assay (Soybeans 0.1% ; corn 0.125%)
	Cry9C	Lateral flow assay (corn 0.125%)
Strategic Diagnostics Inc., USA	RUR Soya Meal, Soya Grain, Bt 1 Maize, Bt 9 Maize	ELISA

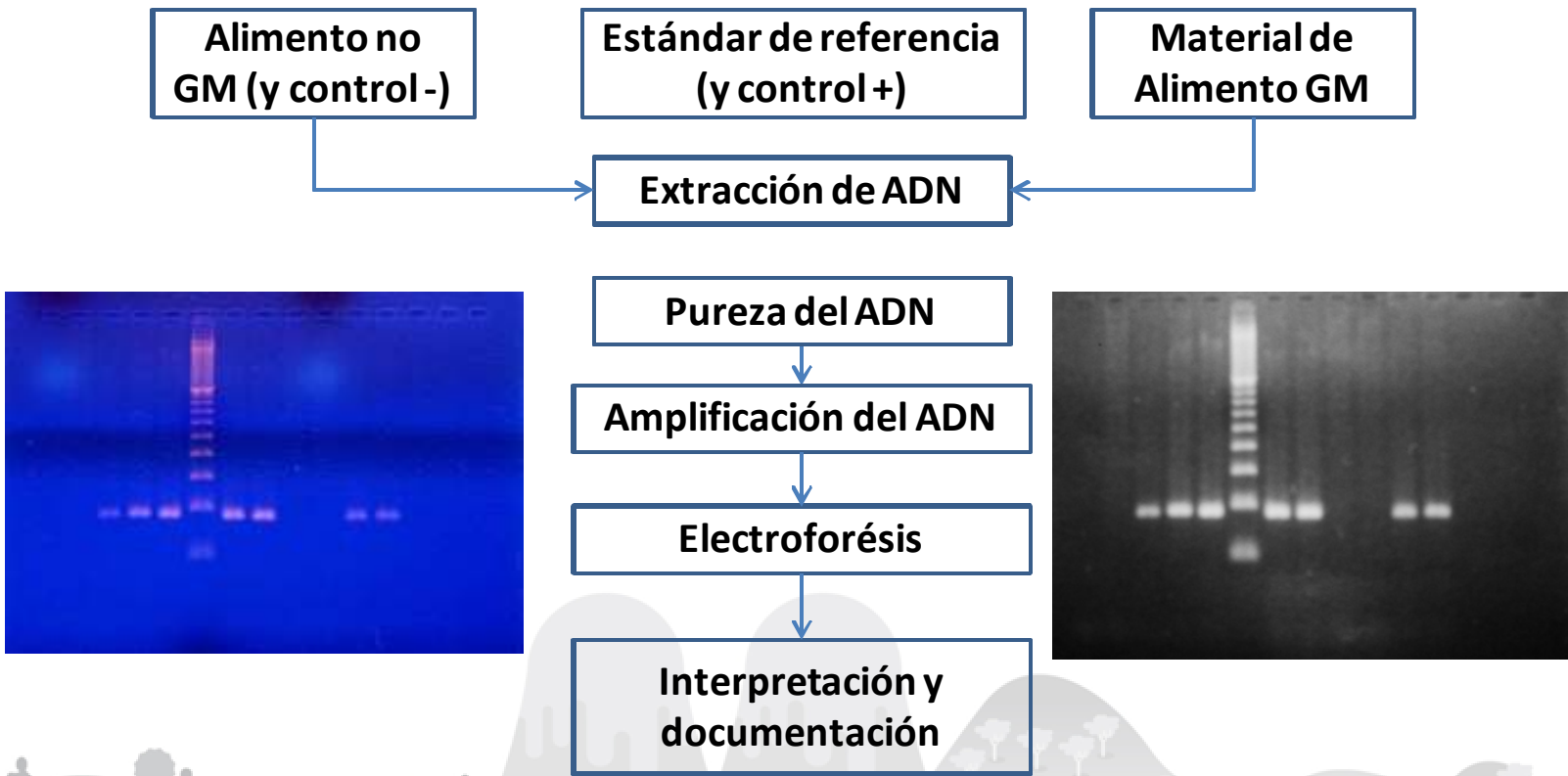


PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Flujograma para el análisis de OVM usando ADN



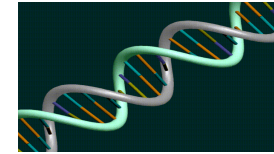
20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Detección del ADN de los OVM

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

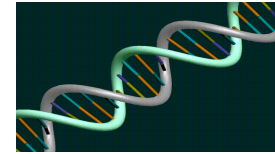
20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Detección del ADN de los OVM

Factores intrínsecos de la muestra que afectan la amplificación:

- Integridad de ADN molde.
- Tamaño del amplicón.
- Presencia de sustancias inhibidoras.
- Proteínas.
- Otros: EDTA, NaOH, SDS y otros detergentes.

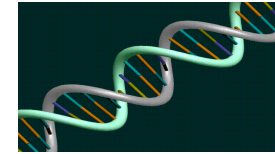
20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



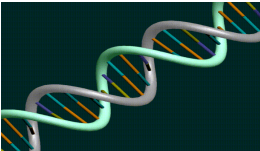
Detección del ADN de los OVM

Control de calidad del PCR:

- Controles positivos y negativos.
- Controles de extracción (blancos)
- Iniciadores (primers) validados.
- Todo el análisis realizado (al menos) en duplicado.

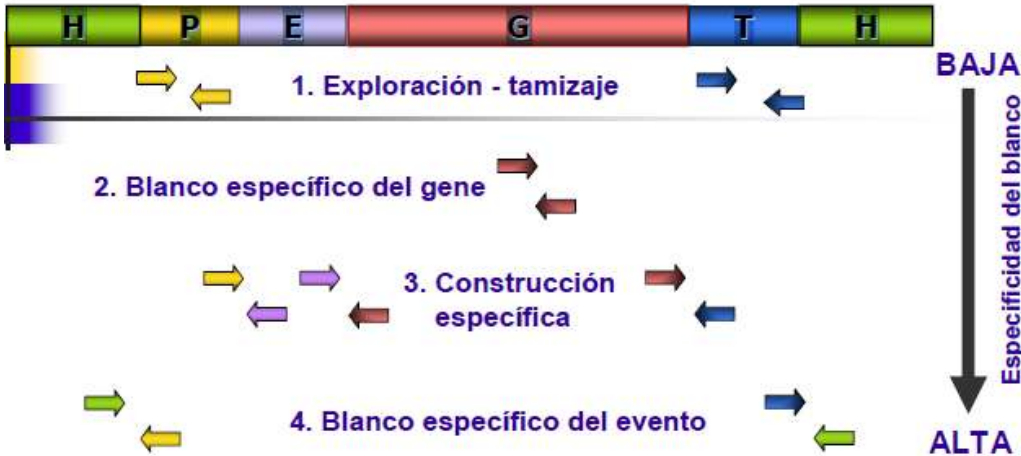
20/06/2012

www.minam.gob.pe



Detección del ADN de los OVM

Diseño de cebadores

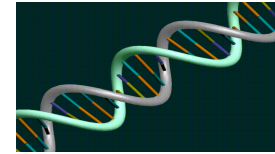


- H ADN genómico del hospedero
- P Elemento promotor (CaMV 35S)
- E Elemento amplificador
- G Gen de interés (Cry, EPSPS)
- T Terminador (NOS)



PERÚ

Ministerio
del Ambiente



Detección del ADN de los OVM

PCR Multiplex

- Variación de la técnica de PCR en la cual se usan dos o mas sets de primers en un único tubo de mezcla.
- Tiene por objetivo lograr la amplificación simultánea de múltiples segmentos de ADN.
- Debe ser estandarizado.



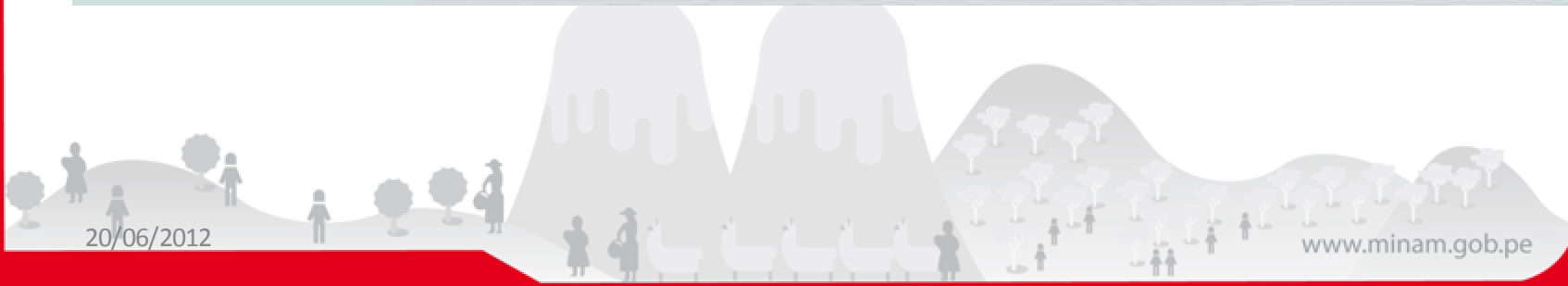
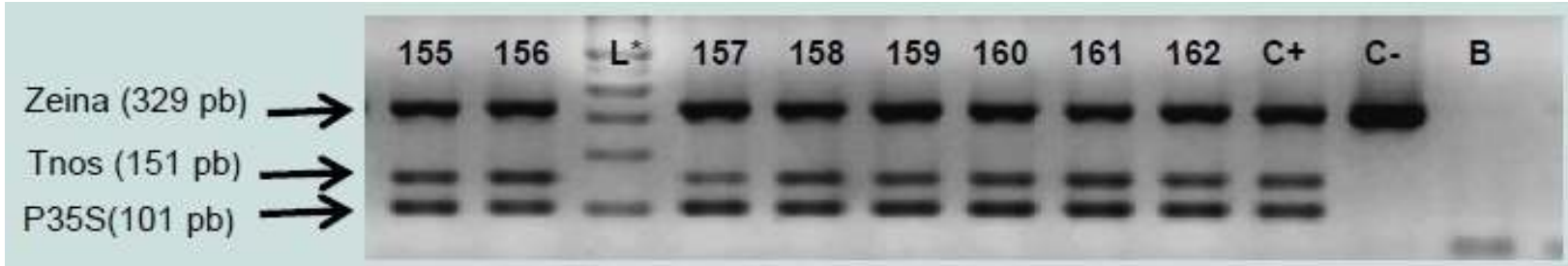
20/06/2012

www.minam.gob.pe



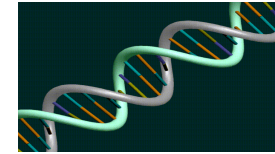
PERÚ
Ministerio
del Ambiente

Caso de detección de OVM
empleando PCR Multiplex en el
Perú





PERÚ
Ministerio
del Ambiente



Detección del ADN de los OVM

Ventajas

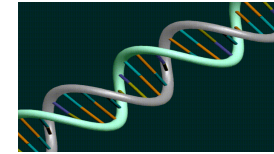
- Alta sensibilidad, límites de detección $\leq$ al 0,1% del ADN presente.
- El PCR semi-cuantitativo puede brindar un estimado aproximado del nivel de contaminación.
- El PCR en tiempo real puede proporcionar una cuantificación bastante precisa en un rango menor al 10%
- ADN altamente estable.

20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



Detección del ADN de los OVM

Desventajas

- No todos los tejidos contienen la misma cantidad de ADN.
- Requiere facilidades e instrumentación de laboratorio relativamente avanzadas y personal altamente calificado.
- Costo más o menos alto.
- Puede demandar tiempo (generalmente más de 24 horas para tener resultados)
- Se deben tomar precauciones para evitar contaminación.

20/06/2012

www.minam.gob.pe



Algunos kits de diagnóstico basado en PCR

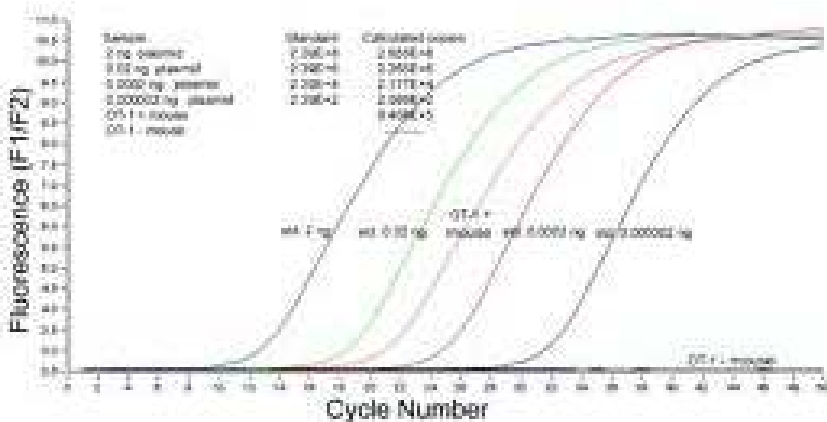
Compañía	Nombre del Kit	Matrices primarias
Applied Biosystems	TaqManR GMO Maize 355 Detection Kit	Alimentos e ingredientes procesados incluyendo harina, comidas, semillas, granos, tejidos de plantas y aceites.
Applied Biosystems	TaqManR GMO Soy 355 Detection Kit	Alimentos e ingredientes procesados incluyendo harina, comidas, semillas, granos, tejidos de plantas y aceites.
BioteCon Diagnostics GmbH	Round-up Ready Soya	Productos de la soya.
EnviroLogix	QualiPlate Kit for Roundup Ready Corn, Event 603 and Cotton	Roundup Ready corn, Roundup Ready cotton, Soybean and soy flour
EnviroLogix	QuickStix Kit for Roundup Ready Bulk Grain	Algodón RR, habas y canola



PERÚ
Ministerio
del Ambiente

Sistemas automatizados

COBAS® TaqMan®
Roche





Evento t14/t25 liberty link maize (tolerante a herbicida)

Nucleic Acid - Based Method For Exogenous Gene:

Strategy	Method Type	Primer Name	Amplicon	Probe Type	Validation Info	Standard
Screening	Qualitative	sF / sR	79bp			
		CM01 / CM02	220bp			
		T35S 1-5 / T35S 4-3	84bp			
	Quantitative	p35S 1-5 / p35S 1-3	101bp			
		35S-promoter.for / 35S-promoter.rev	68bp	TaqMan		
		P35S 1-5 / P35S1-3	101bp	TaqMan		
Gene-Specific	Chip	T-35S_29-L / T-35S_29-R	134bp			
		pat1-5 / pat1-3	161bp			
	Qualitative	2F / 2R	262bp			
		KVM-5 / KVM-6	68bp	TaqMan		
Construct-Specific	Qualitative	T25 2-5 / T25 2-3	311bp			
		CM01 / PA01	400bp			
		P35S 1-5 / T35S 1-3	800bp			
		T25 1-5 / T35S 4-3	200bp			
		T25-F7 / T25-R3	209bp		Yes	ISO&National
		CM03 / PA01	231bp		Yes	National
	Quantitative	T25 1-5 / T25 1-3	149bp			
		T25 1-5 / T25 1-3	149bp	TaqMan	Yes	National
		T25-F / T25-R	83bp	TaqMan		
		89_12-L / 89_12-R	106bp	TaqMan		
Event-Specific	Quantitative	PM1 / revPM1	155bp	TaqMan		
		MLD143 / MDB551	Unknown	TaqMan	Yes	
	Chip	89_100-L / 89_100-R	149bp			

BMC Bioinformatics Database Open Access
GMDD: a database of GMO detection methods

Wei Dong†1, Litao Yang†1, Kailin Shen2, Banghyun Kim3, Gijs A Kleter4, Hans JP Marvin4, Rong Guo5, Wanqi Liang1 and Dabing Zhang*

20/06/2012

www.minam.gob.pe



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

GRACIAS

David Castro
dcastro@minam.gob.pe

20/06/2012

www.minam.gob.pe