

 **PERÚ** Ministerio del Ambiente

 **2011-2020**
Decenio de las Naciones Unidas sobre la Biodiversidad

Módulo Didáctico: Recursos Genéticos y Bioseguridad

“BASES TÉCNICAS PARA LA SEGURIDAD DE BIOTECNOLOGÍA”

Huancayo, 13 - 15 noviembre de 2012

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

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.

www.minam.gob.pe

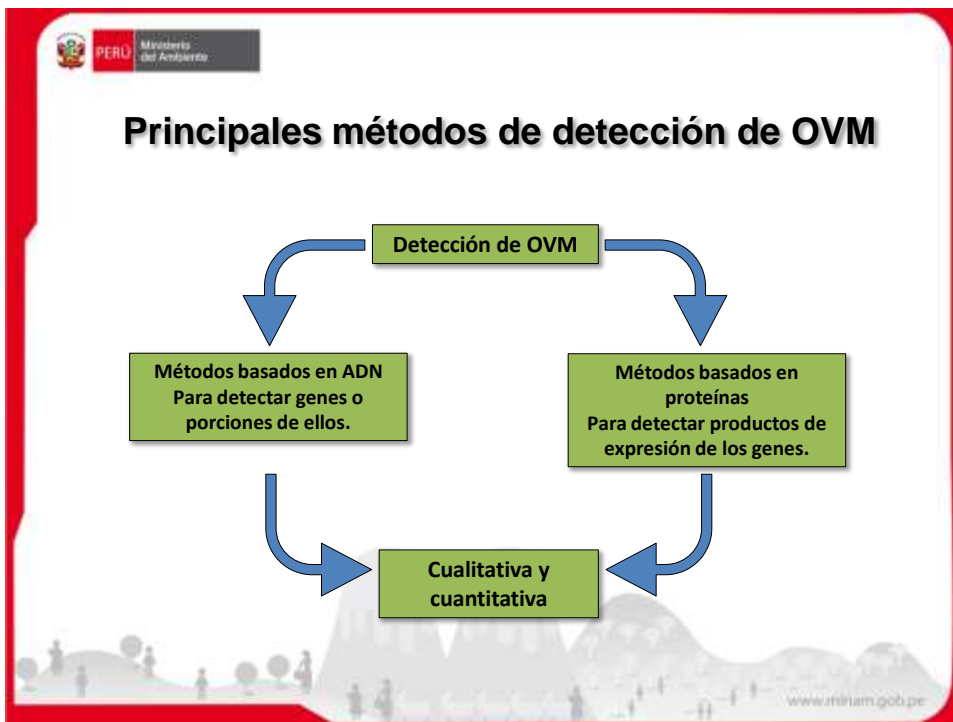



Necesario para:

- 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

www.minam.gob.pe



 **PERÚ** Ministerio del Ambiente

Principales métodos de detección de OVM

<p>Métodos basados en el análisis de ADN:</p> <ul style="list-style-type: none">• Detección en muestras con alto grado de procesamiento• Requieren equipo y personal especializado laboratorio• Los resultados son más precisos• Metodologías más laboriosas	<p>Métodos basados en el análisis de proteínas:</p> <ul style="list-style-type: none">• 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
--	--



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)

www.minam.gob.pe



Requerimientos para la detección de OVM

Moléculas Blanco:

- ADN o proteína.

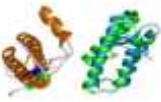

Captura de moléculas:

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

Materiales de referencia:

- Controles positivos y negativos.
- Calibradores para cuantificación.

www.minam.gob.pe





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 epítopo único.
- Alta especificidad.

www.minam.gob.pe

PERU Ministerio del Ambiente



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay" (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

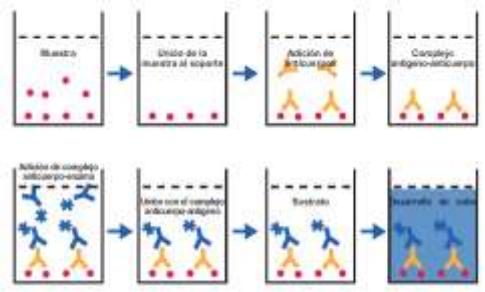
- Básicamente, esta prueba es una reacción antígeno-anticuerpo que se lleva a cabo en una fase sólida (placa de 96 pozos).
- El antígeno-anticuerpo reacciona y produce un complejo estable que puede ser visualizado por la adición de un segundo anticuerpo unido a una enzima.
- La adición de un sustrato que reacciona con la enzima resulta en una formación de color, que puede ser medida fotométricamente.

www.minam.gob.pe

PERU Ministerio del Ambiente

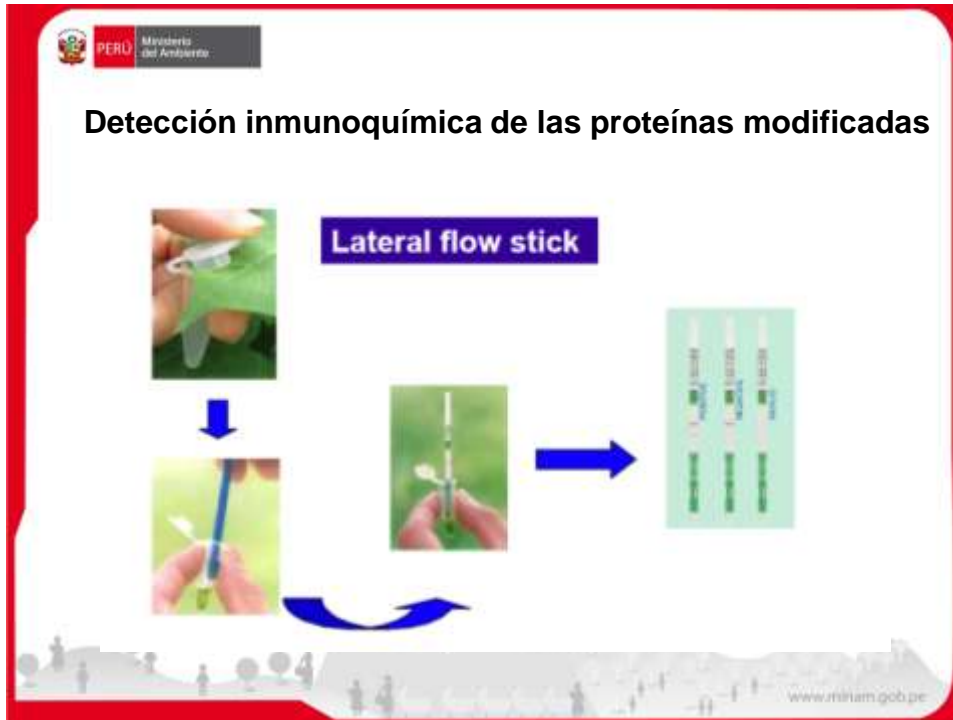
Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas



	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Red	Red	Red	Orange	Yellow	Light Green	White	White
2	White	White	White	White	White	White	White	White
3	White	White	White	White	White	White	White	White
4	White	White	White	White	White	White	White	White
5	White	White	White	White	White	White	White	White
6	Red	Orange	Yellow	Light Green	White	White	White	White
7	Red	Orange	Yellow	Light Green	White	White	White	White
8	White	White	White	White	White	White	White	White
9	White	White	White	White	White	White	White	White
10	White	White	White	White	White	White	White	White
11	White	White	White	White	White	White	White	White
12	Red	Orange	Yellow	Light Green	White	White	White	White

ELISA:
Respuesta

www.minam.gob.pe



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.

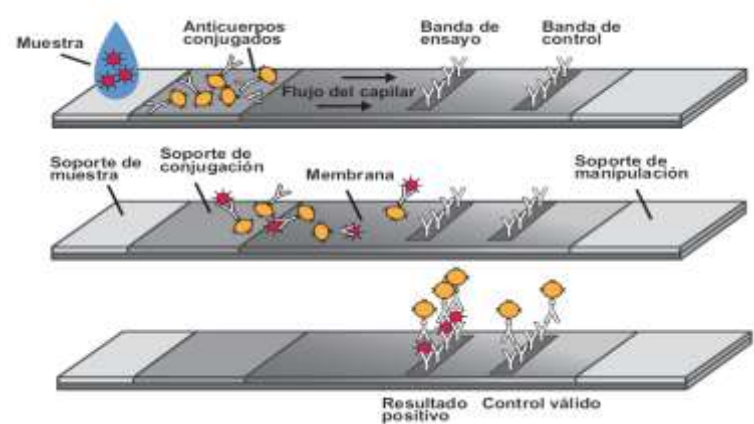
Resultado negativo **Resultado positivo**

Línea control
Línea de prueba

www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas


Tiras de flujo lateral



The diagram illustrates the three stages of a lateral flow assay. In the first stage, a sample (Muestra) is applied to the sample well (Soporte de muestra). In the second stage, the sample flows through a conjugation zone (Soporte de conjugación) where it binds to conjugated antibodies (Anticuerpos conjugados). In the third stage, the complex flows through a membrane (Membrana) with test (Banda de ensayo) and control (Banda de control) lines. The test line shows a positive result (Resultado positivo) with a red line, while the control line shows a valid control (Control válido) with a red line. Labels include: Muestra, Anticuerpos conjugados, Banda de ensayo, Banda de control, Flujo del capilar, Soporte de muestra, Soporte de conjugación, Membrana, Soporte de manipulación, Resultado positivo, Control válido, and www.minam.gob.pe.

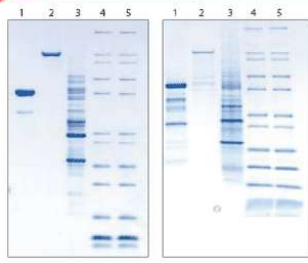
Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Western Blot

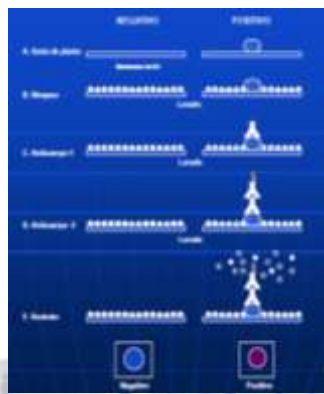
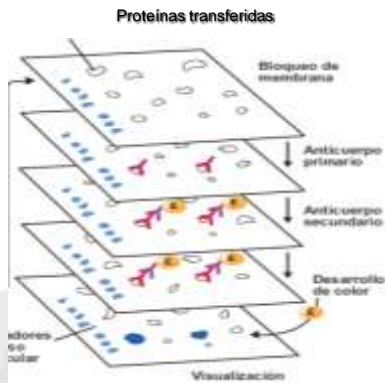


- Es un método altamente específico que permite determinar si la muestra contiene la proteína objetivo, eficiente con proteínas insolubles.
- Se basa en la separación de proteínas de una muestra en función de su tamaño mediante electroforesis y posterior detección mediante anticuerpos específicos para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

www.minam.gob.pe



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Proteínas transferidas

Bloqueo de membrana

Anticuerpo primario

Anticuerpo secundario

Desarrollo de color

Adornos secundarios

Visualización

www.minam.gob.pe





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




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)

20/06/2012 www.minam.gob.pe

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

20/06/2012 www.minam.gob.pe

Flujograma para el análisis de OVM usando ADN

```

    graph TD
      A[Alimento no GM (y control -)] --> E[Extracción de ADN]
      B[Estándar de referencia (y control +)] --> E
      C[Material de Alimento GM] --> E
      E --> D[Pureza del ADN]
      D --> A[Amplificación del ADN]
      A --> B[Electroforésis]
      B --> C[Interpretación y documentación]
  
```

20/06/2012 www.minam.gob.pe



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



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

PERU 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

PERU Ministerio del Ambiente



Detección del ADN de los OVM

Diseño de cebadores



1. Exploración - tamizaje

2. Blanco específico del gene

3. Construcción específica

4. Blanco específico del evento

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

20/06/2012 www.minam.gob.pe

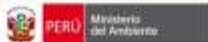
Detección del ADN de los OVM

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.

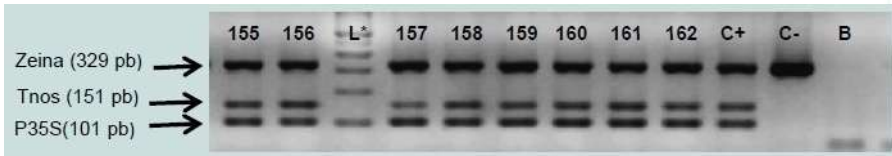


20/06/2012 www.minam.gob.pe



Caso de detección de OVM empleando PCR Multiplex en el Perú





20/06/2012 www.minam.gob.pe



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



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

PERU Ministerio del Ambiente

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

20/06/2012 www.minam.gob.pe

PERU Ministerio del Ambiente

Sistemas automatizados

COBAS® TaqMan®
Roche

The image shows two Roche COBAS TaqMan PCR systems. Below them is a graph of fluorescence (F/F2) versus cycle number. The graph displays several sigmoidal curves representing different concentrations of a target. The legend indicates the following concentrations: 2 ng plasmid, 100 ng plasmid, 1000 ng plasmid, 10000 ng plasmid, 100 ng tissue, and 100 ng muscle. The x-axis is labeled 'Cycle Number' and ranges from 1 to 40. The y-axis is labeled 'Fluorescence (F/F2)' and ranges from 0.0 to 10.0. The curves are labeled with their respective concentrations: 2 ng, 100 ng, 1000 ng, 10000 ng, 100 ng tissue, and 100 ng muscle.

www.minam.gob.pe

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

Nucleic Acid - Based Method For Ecogenomic Genes

Strategy	Method Type	Primer Name	Amplicon	Probe Type	Validation Info	Standard
Screening	Qualitative	wF - wR	79bp			
		CB01 / CB02	200bp			
	T35S_1-3 / T35S_4-3	88bp				
	g35S_1-5 / p35S_1-3	101 bp				
Quantitative	35S-promoter304 / 35S-promoter2ev	60bp	TaqMan			
	P35S_1-5 / P35S_1-3	101 bp	TaqMan			
Gene-Specific	Chip	T-35S_29-L / T-35S_29-R	134bp			
	Qualitative	pat1-R / pat1-L	161 bp			
Construct-Specific	Quantitative	2F - 2R	262bp			
		BVM6-5 / BVM6-6	60bp	TaqMan		
	T25-2-5 / T25-2-3	211 bp				
	CB01 / PA01	400bp				
	P35S_1-5 / T35S_1-3	800bp				
	T25_1-3 / T35S_4-3	200bp				
Event-Specific	Quantitative	T25_P2 / T25_P3	200bp		Yes	ISO/National
		CB03 / PA01	221 bp		Yes	National
	Quantitative	T25_1-5 / T25_1-3	149bp	TaqMan	Yes	National
Event-Specific	Quantitative	T25_1-5 / T25_1-3	149bp	TaqMan		
		T25_P1 / T25_R	83bp	TaqMan		
Event-Specific	Quantitative	09_12-L / 09_12-R	106bp	TaqMan		
		PA1 / wSPM1	166bp	TaqMan		
Event-Specific	Chip	MLD143 / MLD551	Unknown	TaqMan	Yes	
		09_100-L / 09_100-R	140bp			

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

GRACIAS

David Castro
dcastro@minam.gob.pe

20/06/2012 www.minam.gob.pe