



Universidad de Burgos
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Comparación de diferentes métodos de
extracción de ADN para la detección de
transgénicos en alimentos mediante
tecnología PCR

David Palacios Santamaría

Tesis de Master en Seguridad y Biotecnología Alimentarias

Septiembre de 2008



UNIVERSIDAD DE BURGOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Manuel Pérez Mateos, y Pilar Muñiz Rodríguez profesores del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos y profesores del Master Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en dicha Universidad,

INFORMA:

Que Don David Palacios Santamaría ha realizado un trabajo experimental fin de estudios, titulado “**Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN para la detección de transgénicos en alimentos mediante tecnología PCR**” en los laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos bajo la dirección de los Doctores D. Manuel Pérez Mateos y Doña Pilar Muñiz Rodríguez

Asimismo, informa que tras revisar la realización y memoria de dicho trabajo, **considera que cumple los requisitos y características exigidos en la normativa vigente** para ser considerado como Trabajo Experimental Fin de Estudios correspondiente a la Tesis de Master Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en la Universidad de Burgos.

Informe que, a los efectos oportunos extiende en Burgos a 22 de septiembre de 2008

Fdo.: Manuel Pérez Mateos

Fdo: Pilar Muñiz Rodríguez

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la actividad agraria, el hombre está intentando mejorar las características agronómicas de cultivos de interés haciendo uso de la genética. Tradicionalmente esta actividad ha venido realizándose mediante técnicas de entrecruzamiento y selección de especies más ventajosas: variedades más productivas, más resistentes a condiciones ambientales adversas, etc... Así, la mayoría de las plantas que son cultivadas actualmente son el resultado de procesos de entrecruzamiento y selección de características agronómicas de interés. En este proceso se produce un intercambio de material genético al azar entre ambas variedades lo que permite la creación de variedades genéticamente nuevas. Sin embargo, éste es un proceso lento y restringido a especies vegetales sexualmente compatibles, y que además es poco específico ya que el entrecruzamiento de dos variedades o especies de plantas conlleva un intercambio masivo e incontrolado de su material genético.

Con las técnicas de ingeniería genética podemos obtener plantas de interés agrícola modificando de forma controlada su ADN, reduciendo el tiempo empleado y evitando la barrera que supone el cruce entre especies distintas. Estos organismos se denominan “transgénicos” o “organismos modificados genéticamente” (GMOs). En la actualidad la mayor parte de plantas transgénicas han sido diseñadas con el objetivo de mejorar las resistencia a plagas o tolerancia a algunos herbicidas. Entre las variedades más comercializadas está el maíz Bt. El maíz Bt es un maíz transgénico que produce en sus tejidos la proteína Cry. Así, cuando las larvas del barrenador del tallo intentan alimentarse de la hoja o del tallo del maíz Bt, mueren. La denominación Bt deriva de *Bacillus thuringiensis*, una bacteria que normalmente habita el suelo y cuyas esporas contienen proteínas tóxicas para ciertos insectos. Estas proteínas, denominadas Cry, se activan en el sistema digestivo del insecto y se adhieren a su epitelio intestinal, alterando el equilibrio osmótico del intestino. Esto provoca la parálisis del sistema digestivo del insecto el cual deja de alimentarse y muere a los pocos días. Las toxinas Cry son consideradas inocuas para mamíferos y pájaros.

La producción de cultivos modificados, especialmente maíz y soja, se ha incrementado notablemente en los últimos años. Según Clives (2006), la superficie total de cultivos transgénicos en el mundo desde 1996 hasta el 2005 ha pasado de los 1,7 millones de hectáreas cultivadas en seis países hasta los 90 millones de hectáreas en 21 países. Los 8,5 millones de agricultores dedicados a los cultivos biotecnológicos marcaron también un importante hito al alcanzar una plantación acumulada, de más de 400 millones de hectáreas desde 1996. Los cálculos oficiales ofrecidos por el Ministerio

de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) indican que la cantidad de hectáreas de maíz transgénico de España en 2006 aumentó un 0,8% con respecto al año anterior, hasta alcanzar un total de 53.667 hectáreas España sigue siendo líder en la UE, en plantaciones de cultivos transgénicos.

Con la aparición de estos nuevos productos surge un problema, la sociedad demanda un nuevo tipo de información que es conocer el origen de los alimentos que están consumiendo, y esto conlleva la necesidad de desarrollar técnicas innovadoras capaces de identificar y medir la presencia de estos organismos modificados genéticamente en los alimentos. Esto hace necesario el diseñar un método sensible, fiable y reproducible, para poder etiquetar los productos (Hernández M. et al, 2004)

La legislación sobre el etiquetado de los productos que contienen GMO varía mucho, mientras que en la UE un producto alimentario debe estar etiquetado como GMO si el contenido es mayor a un 1%, en Japón o China este contenido se incrementa a un 5% (Corbisier P. et al 2007).

La presencia de GMOs en un alimento se puede demostrar mediante métodos basados en el análisis de proteínas o de ácidos nucleicos (Gachet E. et al, 1999). Entre los primeros, algunos autores señalan la posibilidad de identificar y medir la cantidad de proteínas expresadas por los GMOs por el método ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Pero aunque es un método sencillo y que posee una alta especificidad, es poco sensible, lo cual hace que en la actualidad no sea una técnica muy extendida en la detección de GMOs (Wenijn S. et al, 2003). Otros métodos implican la detección de GMOs a través de secuencias específicas de ADN. Frente a las proteínas presenta la ventaja de una mayor estabilidad térmica unido al hecho de estar presente en casi todos los tejidos. En este sentido, la detección de secuencias de ADN mediante su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mejora la sensibilidad de los métodos analíticos basados en detección de ADN.

A pesar de que la PCR es el método más extendido en la detección de GMO, la gran variedad de primers utilizados, y las diferentes procedencias del material de partida hace que no exista un procedimiento comúnmente utilizado en la detección de GMOs. Además es sabido que el método con el cual se extrae el ADN, tiene influencia en la cuantificación por PCR (Corbisier P. et al 2007).

Hasta la actualidad han sido publicado diversos protocolos de extracción y purificación de ADN para GMOs, como los variantes del método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o aquellos que utilizan kits de purificación comerciales (Holden M.J et al.2003). Debido a la gran variabilidad obtenida hasta la actualidad,

suele ser necesario llevar a cabo procesos de optimización del procedimiento de extracción de ADN a partir de GMOs.

Muchas de las plantas modificadas genéticamente que se explotan comercialmente han sido construidas con el promotor de la subunidad 35 S del RNA ribosómico del virus mosaico de la coliflor (CaMV). Los primers elegidos, con unas secuencias complementarias a la secuencia de ADN, deben flanquear la zona a amplificar por la polimerasa.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue seleccionar y optimizar métodos de extracción del promotor p35 S característicos de maíz GMOs y su detección mediante PCR.

Este objetivo general se realizó a través de la realización de los siguientes objetivos parciales:

1. Comparar la eficacia de diferentes métodos de extracción de ADN a partir de semillas de maíz Bt176.
2. Optimización de los parámetros de PCR para detección del gen endógeno de referencia p35 S en semillas de maíz transgénicas Bt176.
3. Comparar la influencia de los métodos seleccionados sobre la detección de p35S por PCR.
4. Identificación del promotor p35S del maíz Bt176 a través de la técnica de PCR-a tiempo real.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

- Espectrofotómetro (Biorad SmatSpect plus)
- Equipo electroforesis (BIO-RAD power-Pac)
- Transiluminador con cámara fotográfica (Molecular Imager ChemiDoc XRS con software Quantity One)
- Termociclador (Eppendorf)
- PCR- a tiempo real (Biorad Cyclor IQ Real Time PCR Detection System)
- Centrífugas, microbalanzas, baños, pHmetros, congeladores (a 4, -20 y -70°C)

2. Reactivos

- Solución de CTAB 2x: CTAB (2%), tris HCl (100mM), NaCl (1,4M), EDTA (20mM), PVP (2%)
- SEVAG: cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- Tampón TAE 10x: tris HCl (400mM), acetato sódico (50mM), EDTA (7,7mM)
- Tampón TBE 10x: tris borato sódico (0,9M), (20mM).
- Tampón de carga: TAE 0,5x, azul de bromofenol (4mg/ml), glicerina (2%)
- Lechos para PCR preparados para usar: puRe Taq Ready-to-go
- Taq polimerasa: solución stock de 5U/ μ l
- Tampón de PCR 10x: contiene KCl
- Solución stock de dNTPs (10mM)
- Solución stock de cloruro de magnesio (50mM)
- Solución stock de primers (100mM)
- Patrones de peso molecular de 50pb y 23 kb.
- SYBR green

3. Muestras

El estudio se realizó utilizando Maíz Bt-176 suministrado por el European Reference Materials (ERM), garantizando tanto el porcentaje de material transgénico que contiene como el tamaño de partícula.

Es distribuido como polvo liofilizado de semillas de maíz que contiene 50 g de maíz Bt modificado genéticamente por cada Kg total de maíz. Este maíz se prepara a partir de 250 kg de las semillas de la variedad Bahía no modificada genéticamente y 50 kg del maíz transgénico Bt-176 (variedad Garaona Bt-175) proporcionado por Syngenta Seeds S.A.S.

4. Extracción de ADN con el método del CTAB

La extracción de ADN se realizó a partir de 20 mg de muestra de semilla liofilizada y se incubaron con 500 μ l de una solución 2x de CTAB, durante 30 minutos a 65°C. Posteriormente se añade 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y se incuba 10 minutos a 65°C. Posteriormente se procedió a la purificación con un volumen de SEVAG, y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos. A la fase acuosa se le añadió 0,1 volumen de CTAB 2x, se mezcla por inversión y volvió añadir 1 volumen de SEVAG y posterior centrifugación a 13000 rpm 15 minutos. A la fase superior se le añaden 2 μ l de ARNasa A y se incuba a 37°C durante 20 minutos. Se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Tras incubar a -70°C durante 20 minutos se centrifuga 10 minutos

a 13000 rpm, descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó y se elimina el sobrenadante. Posteriormente se añade 100 µl de agua destilada y se deja re-hidratando 24 horas (Sambrook J. y Russel D. 2001)

5. Extracción de ADN con el kit comercial “DNeasy plant mini”

El kit de extracción de QIAGEN utiliza 2 tipos diferentes de membranas para la extracción y purificación del ADN. Se utilizó 20 mg del liofilizado de maíz, a cual se le añadió 400 µl del tampón de lisis AP1 y 4 µl de ARNasa A (100mg/ml) y se incubó 10 minutos a 65°C mezclando por inversión cada 5 minutos. Posteriormente se añaden 130 µl del tampón AP2 de precipitación y se mezcló e incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm 5 minutos y se añadió el sobrenadante a la columna QIA Shredder mini spin, y se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm. Se recogieron 450 µl, a los cuales hay que añadir 1.5 volúmenes del buffer AP3 (675 µl). Se pipeteó en la columna DNeasy mini spin y se centrifugó a 8000 rpm. Se descarta la fracción que atraviesa la columna y se añaden 500 µl del buffer AW centrifugándose 8000 rpm durante 1 minuto. Se añadió a la columna otros 500 µl del buffer AW y se centrifugó 13000 rpm durante 2 minutos. Una vez centrifugado se cambia la columna a un tubo nuevo y se añaden 100 µl del buffer AE, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm.

6. Cuantificación y medida de la pureza del ADN extraído

La cuantificación del ADN total extraído se realizó por la medida de la absorbancia a 260 nm, dado que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 ng/µl.

La medida de la pureza se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, siendo el coeficiente de absorbancias 260/280 el que nos indica la pureza de la solución. Un cociente de 1,8 indica que la solución es de ADN puro, valores inferiores indican una contaminación por proteínas o polifenoles mientras que si la relación es de 2,0 se trata de ARN puro.

7. Electroforesis en geles de agarosa

La evaluación de la integridad del ADN se realizó utilizando geles de agarosa al 0,7% de agarosa utilizando un sistema de electroforesis BIO-RAD power-Pac 1000 (Hercules, CA, USA). Posteriormente el gel que contiene bromuro de etidio (10mg/ml)

es observado bajo luz ultravioleta con un transiluminador y fotografiado (Molecular Imager ChemiDoc XRS con software Quantity One). Los resultados son expresados como bp (pares de bases) de los fragmentos de ADN obtenidos, calculado a partir de patrones de peso molecular como el 50 bp ADN Ladder de 50 a 450 pb y el λ ADN/Hind III de 125 pb a 23,1 Kb, ambos de Invitrogen (CA, USA). El software Quantity One nos permite determinar el tamaño de cada banda por comparación con la migración de los estándares de peso molecular. El programa es capaz de medir la intensidad de las bandas dándonos así una idea de la cantidad de ADN que hay en cada una.

8. Protocolo de amplificación del promotor 35S por PCR

La amplificación del promotor 35S por PCR se realizó utilizando el termociclador de Eppendorf. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, a una cantidad de primers de 50 pmoles, a una concentración de 200 mM de dNTP y 1.5 mM de cloruro de magnesio en tampón de reacción 1x.

Se utilizaron los siguientes primers:

Primer directo: 5'gct cct aca aat gcc atc 3'

Primer reverso: 5' gat agt ggg att gtg cgt ca 3'

El programa del termociclador con el cual se empezó a optimizar la PCR fue: 96°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 60 segundos y 72°C durante 30 segundos. Posteriormente a los ciclos se programó a 72°C durante 3 minutos (Wolf C. et al, 2000).

El análisis de los resultados de la PCR se realizó con un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (10mg/ml). El gel se analizó en el transiluminador Molecular Imager ChemiDoc XRS, y las imágenes obtenidas se trataron con el programa Quantity One. Este programa permite el análisis de geles determinando de forma la intensidad y el peso molecular de las distintas bandas, comparando las migraciones electroforéticas de la muestra con las de un patrón de peso molecular conocido.

9. Amplificación del promotor 35S por PCR- a tiempo real

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l, de los cuales 25 μ l son del tampón que contiene la ADN polimerasa, las sales y el

fluorocromo SYBR green. Además se añadió 2 μ l de cada primer (50 pmoles), ADN (50, 100 y 500 ng) y agua destilada esterilizada.

Las temperaturas de la amplificación fueron la mismas que para la PCR anterior: 96°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación de 96°C durante 30 segundos, otro de anillamiento a 55°C durante 60 segundos y un paso de síntesis a 72°C y 30 segundos y un último paso a 72°C durante 3 minutos.

10. Tratamiento estadístico de los datos

Se realizó un análisis entre los resultados obtenidos por los diferentes métodos de extracción con el programa "Statgraphics". Por otro lado se realizó el análisis comparativo de las varianzas con el test ANOVA, y con el test LSD para determinar las diferencias significativas entre las muestras a un nivel de significación de $\alpha= 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio del rendimiento, pureza e integridad del ADN obtenido por los distintos métodos de extracción

Una de las etapas cruciales de los procedimientos analíticos basados en PCR es la extracción y purificación del ADN, ya que la detección depende de la calidad e integridad del ADN extraído (García-Cañas et al, 2004). Son varios los factores que pueden afectar a la integridad del ADN durante el proceso de extracción como puede ser, variaciones del pH y temperatura, actividades nucleasas, etc. que puede llevar a una escisión de los fragmentos del ADN. Por otro lado, los contaminantes procedentes del propio proceso de extracción o de la matriz alimentaria pueden inhibir las reacciones de PCR (Hughes S. y Moody A, 2007). Otros autores como Porebski S. et al (1997) debido a la alta concentración de polisacáridos que contienen algunas plantas, proponen utilizar una solución muy concentrada de cloruro sódico para mejorar la precipitación de estos hidratos de carbono. En nuestro caso, dado que conseguimos llevar a cabo amplificación del promotor 35S, no pusimos en práctica esta modificación aunque para otros estudios genéticos basados en PCR como puede ser análisis de RAPDs puede ser interesante dado que son técnicas más complejas en las que los polisacáridos pueden interferir en mayor medida.

En nuestro trabajo seleccionamos dos métodos de extracción y purificación, el método del CTAB y el Kit de purificación DNeasy. Para ambos métodos fue necesario

realizar modificaciones del mismo con el objetivo de incrementar la recuperación de la muestra así como el grado de pureza.

El método del CTAB, se basa en la degradación de la pared celular mediante el detergente catiónico CTAB que une polisacáridos, el uso de PVP para fijar los polifenoles que puedan interferir en la amplificación de la muestra y en la adición de enzimas purificadoras como proteinasa K y ARNasa A. Posteriormente, se realiza la purificación con disolventes orgánicos y la precipitación con etanol. Distintos autores han utilizado este mismo método sin añadir PVP y reduciendo los tiempos de extracción al no añadir las enzimas proteinasa y ARNasa (Csaikl U.M. et al, 1998). Basándonos en estos estudios uno de nuestros primeros objetivos fue evaluar el rendimiento del método en presencia y ausencia de estos componentes.

Los resultados obtenidos de pureza y concentración de ADN usando el método CTAB y las tres variantes se muestran en la tabla 1.

Los resultados obtenidos por el método del CTAB muestran que el ADN obtenido es de un alto grado de pureza y el método mostró ser muy reproducible como muestran la desviación estándar obtenida. Los resultados obtenidos muestran una pureza de aproximadamente 1,8 valor necesario para los procesos de amplificación de ADN.

Tabla 1. Efecto de varios métodos de extracción sobre la pureza y concentración de ADN

	CTAB	Sin PVP	Sin proteinasa K	Sin ARNasa
Pureza	1,78 ± 0,078 (18)	1,76±0,073 (7)	1,64± 0,048 (5)	2,06± 0,076 (7)
ADN (ng/μl)	236±29	233±28	249± 18	221±13
ADN (ng/mg de maíz)	1184±146 ^{a-b}	1167±142 ^{a-b}	1245± 92 ^c	1109± 66 ^b

Resultados son media ± desviación de n=18, n=7, n=5, y n= 7 para el método de la extracción con el protocolo básico con CTAB y sus modificaciones sin PVP, proteinasa y ARNasa respectivamente. Letras diferentes muestran diferencias significativas p<0.05

El rendimiento obtenido por el método del CTAB sin modificar resultó ser de 1184 ng/mg de maíz. Estos resultados difieren al de otros autores donde usando el mismo método, con pequeñas diferencias, llegando a variar en diez órdenes de

magnitud. Así, Oraby H.A. et al, (2005) obtuvieron valores de 1700 ng/mg, mientras que Corbisier P. et al (2007), la concentración obtenida fue de 80 ng/ mg de maíz.

El segundo objetivo dentro de este apartado fue usar variantes del método con la finalidad de disminuir el tiempo de extracción, evitando así contaminaciones y degradación de la muestra. Las variantes al método se diseñaron en función de la matriz alimentaria que en nuestro estudio fue la semilla de maíz. Las tres variantes del método fueron: 1) Efecto de la extracción de ADN sin proteinasa K ya que las células de la semilla tienen una cantidad relativamente baja de proteínas. 2) Efecto del PVP ya que su adicción elimina los polifenoles presentes tanto en la pared celular como del material de reserva. 3) La adicción de RNAsas ya que el ARN es una molécula mucho más inestable que el ADN, y el tratamiento a 65°C con detergentes y la agitación durante el proceso de extracción para homogeneizar las soluciones puede romper el ARN y hacer que se elimine en los sucesivos lavados, disminuyendo así los tiempos de extracción.

La proteinasa K, es una enzima que hidroliza proteínas, entre ellas las enzimas ADNAsas que además de digerir el ADN interfieren durante el proceso de amplificación por PCR. Algunos autores sugieren que es suficiente la adicción del agente quelante EDTA, que retira iones metálicos como Mg^{2+} o Ca^{2+} que actúan como cofactores de las ADNAsas evitando usar la enzima proteinasa K. Por otro lado la propia proteasa puede hidrolizar a la Taq polimerasa. Nuestro estudio (tabla 1) muestra que la ausencia de proteinasa K no afecta de forma significativa a la cantidad de ADN y aunque la cantidad obtenida fue mayor, la diferencia con el método no modificado fue no significativa. La pureza del ADN obtenido en ausencia de proteína K fue de 1,64 lo que nos indica contaminación debida a la presencia de proteínas no eliminadas en el proceso de purificación enzimático.

La ausencia del reactivo PVP (polivinil pirrolidona) en el método de extracción resultó no modificar los parámetros de concentración y pureza. Así observamos que la concentración de ADN es muy similar a la obtenida usando PVP, y aunque los valores de pureza se han visto reducido, no lo hacen de manera significativa.

La ausencia de RNAsa en el proceso de purificación resultó en un incremento de la relación de absorbancia a 260 aumentando por tanto la cantidad de ADN extraído. Como era de esperar, el grado de pureza se ve disminuido, los valores de la relación de absorbancias 260/280 de 2,06 indica claramente una contaminación por ARN.

El segundo método de extracción utilizado fue el kit DNeasy de QIAGEN (Tabla 2). En este caso existen grandes diferencias con los métodos anteriores tanto en la

cantidad como en la pureza del ADN extraído. Los fabricantes del kit indican que para maíz la cantidad de ADN extraído puede llegar hasta los 15-20 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$, aunque esto depende en gran parte del material de partida. Si el material de partida son hojas la cantidad de ADN extraído por la mayor parte de los autores está algo por debajo de estos valores. Pero cuando se utilizan semillas como material de partida, este porcentaje de recuperación disminuye claramente, en nuestro caso la recuperación ha sido de 6,8 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$, mientras que otros autores llegan a 3,8 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ (Corbisier et al 2007). Esto es debido que las células que forman las semillas contienen gran cantidad de sustancias de reserva, siendo menor la relación cantidad de ADN/ volumen celular (Ovesna J. et al 2002).

Tabla 2. *Efecto del método de extracción de ADN kit DNeasy sobre su pureza y su concentración*

	Kit DNeasy
Pureza	1,60 \pm 0,145
Concentración ADN (ng/μl)	13,6 \pm 3,43
Cantidad ADN (ng/mg maíz)	68 \pm 17

Observando que se recuperaba una cantidad de ADN mucho menor que en los métodos anteriores se procedió a re-extraer el ADN que posiblemente hay quedado retenido en las membranas del kit. Se encontró que en la primera membrana utilizada la cantidad de ADN que quedaba retenido era indetectable. El resultado en la segunda membrana es totalmente distinto, donde se recuperó entre 7 y 4,25 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$.

En la figura 1 se representa la cantidad de ADN obtenida por los diferentes métodos. Los resultados muestran claramente como el método del CTAB o sus variantes, permiten obtener cantidades de ADN significativamente mayores.

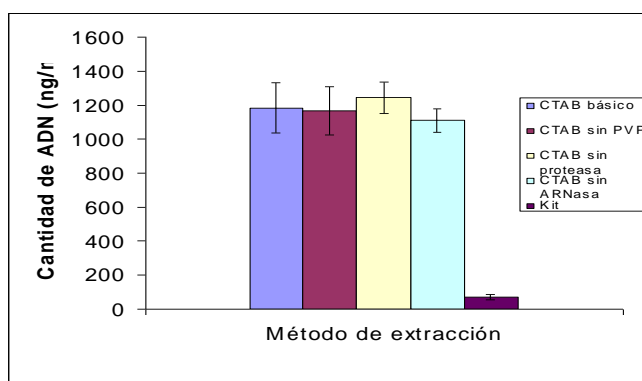


Figura 1. Cantidad de ADN obtenida por los diferentes métodos de extracción.

Estos resultados nos permiten concluir que el kit de extracción consigue unos ratios de recuperación bastante menores que los obtenidos por CTAB, pero frente a este último la ventaja del kit es la rapidez y facilidad con la que se extrae el ADN. En este caso puede obtenerse un extracto de ADN para realizar la PCR en 1 hora aproximadamente (dependiendo del número de muestras) mientras que con el protocolo completo se tarda alrededor de 3 horas y hay que dejar re-hidratar el ADN 24 horas más antes de poder utilizarlo.

La integridad del ADN es importante durante el proceso de amplificación de secuencias por PCR. Muchos de los métodos empleados para aislar los ácidos nucleicos a partir de muestras de maíz dan como resultado un amplio rango fragmentos de diferente tamaño y una gran parte de ellos tienen un tamaño entre 23 y 48 kbp. Degradaciones y/o a una cantidad insuficiente de ADN como consecuencia de utilizar procesos de extracción inadecuados disminuye la eficacia del proceso de PCR (Holden M.J. et al 2003).

La integridad del ADN se puede evaluar electroforéticamente mediante geles de agarosa. La migración de DNA en geles de agarosa sometido a un campo eléctrico depende del tamaño del ADN. Una degradación durante las diferentes etapas del proceso de extracción resultaría en la obtención de fragmentos de ADN de diferente peso molecular lo cual en los geles de agarosa resultaría en la presencia de más de un fragmento lugar de una banda definida.



Figura 2. Resultados de la integridad del ADN extraído por diferentes métodos en geles de agarosa al 0,7%. Línea 1 patrón de peso molecular de 23 kb. Línea 2 ADN total extraído con el kit DNeasy. Línea 3 ADN total extraído con el protocolo básico CTAB. Línea 4 ADN extraído sin PVP.

Los resultados de integridad obtenidos a partir de métodos de extracción seleccionados en el apartado anterior (CTAB, CTAB sin PVP y kit) se muestran en la Figura 2. En el gel se observa una única banda de ADN de aproximadamente 23 Kb de peso molecular para los tres métodos utilizados lo cual nos indica que el proceso de extracción el ADN mantiene su integridad y no sufre degradación.

El ADN puede almacenarse durante al menos 5 días en agua destilada a 4°C sin que por ello afecte a su integridad y a la eficiencia de la PCR. Algunos autores conservan el ADN (Oraby H.A. et al, 2005) en una solución que lleva EDTA como agente quelante para evitar la acción de DNasas, pero en nuestro caso su adición afectó a los procesos de amplificación afectando a la actividad Taq polimerasa. Esta actividad quedó reflejada en los resultados de amplificación, en los geles de agarosa no se observaron bandas definidas.

2. Determinación de la presencia del marcador 35S en maíz por PCR estándar

La etapa más característica de los procedimientos analíticos basados en PCR es la amplificación. El objetivo de los estudios de PCR es la separación y detección de los fragmentos de ADN amplificados, lo cual se realiza combinando la técnica de PCR con la detección en placas de geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. El bromuro de etidio, es una sonda fluorescente que se intercala entre la doble hélice de ADN aumentando el rendimiento cuántico de fluorescencia. Entre las limitaciones de esta técnica se encuentra que la eficiencia de amplificación nunca es del 100%. Esta eficiencia depende de factores como composición de la muestra, la secuencia diana, los cebadores y el número de ciclos.

Tal y como se mostró en los apartados anteriores el ADN obtenido por los 3 métodos de extracción seleccionados tiene la pureza y la integridad suficiente como para realizar la detección del promotor 35S mediante PCR. La menor cantidad de ADN extraído con el kit no es un problema dado que puede añadirse un mayor volumen del extracto para adecuar la concentración del ADN de la reacción. De los métodos de CTAB se seleccionó el CTAB básico ya aunque que el ADN obtenido por el CTAB sin PVP tiene una media de la pureza aceptable, algunas de las mediciones individuales eran del orden de 1,65 indicando una posible contaminación por polifenoles que pueden interferir en la amplificación.

Por otro lado hay estudios que indican que la PCR se ve afectada debido a que las semillas de maíz liofilizadas poseen una cantidad de polisacáridos muy elevada, y se ha encontrado que cantidades relativamente altas de estos pueden actuar como inhibidores de la PCR (Holden M.J et al.2003)

Para cumplir con el objetivo de este trabajo fue necesario optimizar las condiciones de amplificación para el maíz Bt176 tanto en relación a los componentes de la reacción como las condiciones de amplificación de la PCR.

En relación a los componentes de la reacción se optimizaron los siguientes parámetros:

Cantidad de ADN molde. Se estudió tanto el tipo de ADN según el método de extracción seleccionado como la concentración de este. Se ensayaron las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 ng de ADN.

Cantidad de los primers. En todos los casos la pareja de primers fue la misma, variando únicamente la cantidad de estos de 1, 15, 25, 35, 50, 100 y 200 pmoles. La secuencia utilizada en este estudio para la detección del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor no solo en maíz sino también en otras especies transgénicas que llevan esta secuencia como es el la soja Roundup Ready (Hurst C. D. et al, 1999)

Concentración del ión magnesio. Este ión es un cofactor fundamental para el funcionamiento de la polimerasa, y su concentración óptima varía dependiendo de los primers que se utilicen en la reacción, de la concentración de desoxinucleótidos y de la concentración del ADN molde. Las concentraciones finales de magnesio que fueron evaluadas fueron 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mM.

En relación a los pasos de amplificación los ensayos que se realizaron fueron:

1. *Inicio de la amplificación:* este primer paso no es crítico de modo que no se estudió su optimización, las condiciones en todos los casos fueron de 95°C y 3 minutos
2. *Desnaturalización:* Temperatura de 95°C y 40 segundos de duración
3. *Hibridación:* Se ensayaron las temperaturas: 54, 55, 56, 57 y 58 °C y los tiempos de 40 y 60 segundos
4. *Extensión:* Temperatura de 72 °C y 40 segundos de duración dado que es la temperatura óptima de la Taq polimerasa
5. *Número de ciclos:* se ensayaron 30, y 40 ciclos
6. *Extensión final:* Se realizó a 72 °C y 3 minutos.

La visualización de los resultados de la PCR se basa en la separación y detección de los fragmentos amplificados mediante geles de agarosa.

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para los distintos ensayos de PCR.

2.1. Optimización de la cantidad de ADN y primer

La optimización de la cantidad de ADN es esencial para evitar falsos negativos y resultados erróneos. En general la cantidad de ADN utilizada por distintos autores para una óptima amplificación de GMO es de 50 ng para 30-40 ciclos de reacción. Sin embargo, un factor a tener en cuenta es el porcentaje de transgénico presente en el alimento, en nuestro caso tenemos que optimizar la metodología teniendo en cuenta que solo un 5 % de ADN es transgénico mientras que el 95% es ADN de la misma especie pero sin modificar genéticamente.

Otra variable crítica en la PCR es el diseño de los primers, no solamente influye que tengan una secuencia capaz de hibridar específicamente con la secuencia de ADN a amplificar, evitando que lo haga en lugares inespecíficos, consigo mismo o con el otro primer, sino también el contenido en G+C del oligonucleótido. La especificidad de amplificación se consigue mediante un diseño adecuado de los primers. En nuestro trabajo para hemos utilizado el promotor de la subunidad 35S del RNA ribosómico del virus mosaico de la coliflor. Este promotor está presente en muchas de las plantas modificadas genéticamente entre ellas en el maíz Bt-176 objeto de este estudio.

En primer lugar se estudio el ADN obtenido por el método del CTAB para el cual se evaluó la influencia de la cantidad de ADN y la concentración de primer que se añade a la mezcla de reacción. Se ensayaron las siguientes cantidades de ADN 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ng de ADN y las siguientes cantidades de primer 1, 15, 25, 35, 50, 10,0 200 pmoles. Los resultados se muestran en la figura 3.

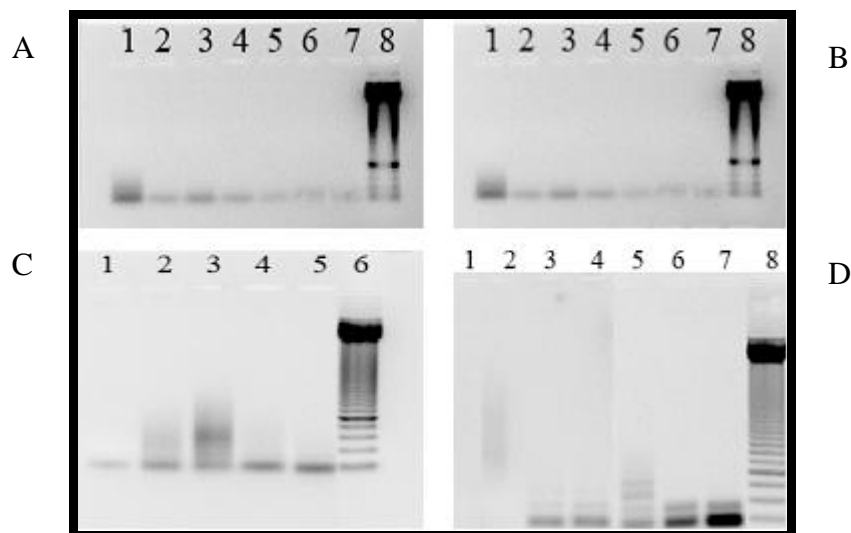


Figura 3. Efecto de la cantidad de ADN obtenido por el método del CTAB y de primer sobre la amplificación del promotor p35S de maíz Bt176. A) Líneas 1-7 50 ng de ADN y 200, 100, 50, 35, 25, 15 y 1 pmoles de primer respectivamente. B) Líneas 1-8 100 ng de ADN y 200, 100, 50, 35, 25, 15 y 1 pmoles de primer respectivamente C) Líneas 1-5, 300 ng de ADN 15, 25, 50, 100, 200 pmoles de primer respectivamente. D) Líneas 1-7 500 ng de ADN 1, 15, 25, 35, 50, 100, 200 pmoles de primer respectivamente.

En los geles se observa que la cantidad de primer necesaria para la amplificación es de 50 pmoles, cantidades menores no producen amplificación por que están en cantidad insuficiente y a cantidades superiores los primers se unen entre sí formando dímeros o aparecen rastros sin un patrón de bandeado definido, sin que se produzca amplificación. Algunos estudios de otros autores señalan la conveniencia de utilizar primers con otra composición nucleotídica debido a la gran cantidad de bandas inespecíficas y la baja intensidad de la banda de 195 pb, con esta pareja de oligonucleótidos (Wolf C. et al, 1999).

Una vez optimizada la cantidad de primers a 50 pmoles, ensayamos nuevamente dicha cantidad con diferentes cantidades de ADN (Figura 4). Se observa que a 100 y 50 ng de ADN las bandas no están muy definidas debido a que la cantidad de ADN que se añadió para llevar a cabo la amplificación fue insuficiente. Cuando se ensayaron a 300 y 500 ng los resultados son similares a los obtenidos en la Figura 3. donde se observa una banda de 195 pb que es el amplicón del promotor 35S, mientras que la otra banda es una banda resultado de amplificaciones inespecíficas. Estas amplificaciones inespecíficas varían en gran medida dependiendo de la cantidad de ADN molde, de magnesio o de primers añadidos a la reacción de amplificación. En este caso la banda inespecífica es de unos 150 pb. Con cantidades de ADN superiores a 500 ng de ADN la resolución empeora notablemente, apareciendo un mayor número de bandas inespecíficas y llegando desaparecer el patrón de bandeado sustituido por un rastro de gran tamaño.

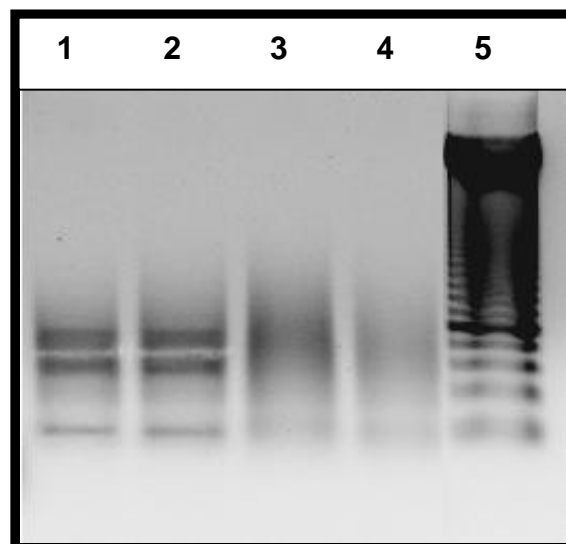


Figura 4. Resultados del efecto de la cantidad de ADN del método CTAB sobre la amplificación del promotor p35S a una cantidad de 50 pmol de primer. (1-4) 500, 300, 100 y 50 ng de ADN total respectivamente. 5) es el patrón de peso molecular de 50 pb.

Cuando se ensayo el efecto de la cantidad de ADN y de primer por el método del kit Dneasy los resultados de obtenidos no eran muy resolutivos, no observándose bandas de amplificación definidas aunque en algunos casos si se observó una pequeña amplificación correspondiente al promotor p35 S tal y como se observa en la figura 5.

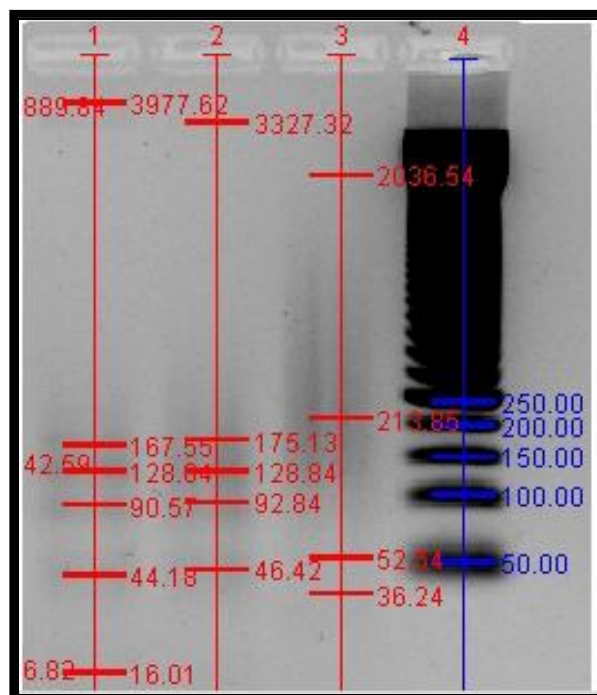


Figura 5. Efecto de la cantidad de ADN obtenida por el método del Kit Dneasy y de primer. Línea 1 500 ng de ADN y 100 pmoles de primers. Línea 2 500 ng de ADN y 50 pmoles de primers. Línea 3 200 ng de ADN y 25 pmoles de primer

2.2. Optimización de la concentración de magnesio

Optimizar la concentración de magnesio de la reacción resulta fundamental para el buen desarrollo de la PCR. Este ión es un cofactor imprescindible para el funcionamiento de la polimerasa, y su concentración óptima varía dependiendo de los primers que se utilicen en la reacción, de la concentración de desoxinucleótidos y de la cantidad de ADN molde (Sambrook J. y Russel D 2001).

Las concentraciones finales de magnesio que fueron evaluadas en estudio fueron de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mM. En la figura 6 se muestran los resultados para las diferentes concentraciones.

De estos resultados podemos concluir que la cantidad óptima de cloruro de magnesio para las condiciones establecidas anteriormente es entre 1 y 2 mM. Al

aumentar la concentración de magnesio por encima del óptimo de 2mM aumenta también el número de bandas inespecíficas, y a concentraciones muy altas se observa únicamente un rastro de gran tamaño e intensidad. A concentraciones inferiores a 1 mM (línea 2) se observa una banda muy tenue aunque si es detectada por el equipo de análisis electroforético (software Quantity One). En ausencia de cloruro de magnesio (línea 1) no se observa ninguna banda debido a que la enzima polimerasa no tiene actividad.

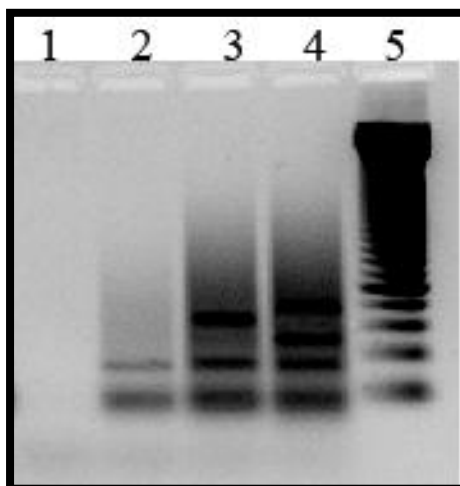


Figura 6. Efecto de la concentración de magnesio sobre la amplificación del promotor p35S. (1) 0 mM (2) 0,5 mM (3) 2 mM (4) 3 mM de cloruro de magnesio (5) patrón de peso molecular 50 pb

2.3. Optimización de las temperaturas de hibridación

Otro de los factores que determina la amplificación de un gen es la temperatura de hibridación y el número de ciclos. La temperatura de hibridación es específica para cada pareja de primers en base a su composición nucleotídica. A altas temperaturas se disminuye la estabilidad de la hibridación entre el ADN molde y el cebador y en cambio a bajas temperaturas ambas moléculas se alinean de manera más estable, pero permite hibridar secuencias que no sean complementarias, lo que nos proporcionará amplificaciones inespecíficas.

Para tener una primera idea de la temperatura de hibridación se hace el cálculo de T_m (melting temperature) en base a la fórmula $T_m = [2 (A+T) + 4 (G+C)] - 2$. Es muy importante que las T_m de los 2 primers sean muy similares (una diferencia menor de 1 °C), para que haya una correcta hibridación. El cálculo de las T_m para los primers utilizados para la amplificación de p35s fue de 54 y 58°C. Como la diferencia es mayor de un grado esto hace necesario una optimización experimental de la misma.

En este apartado el rango de temperaturas a los cuales se amplificó la muestra fue desde 52 a 59 ° C. Los resultados de amplificación a temperaturas de 52 a 57 y 40 s de hibridación se muestran en la figura 7.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando la amplificación se realizó durante 40 segundos y 56 °C de temperatura de hibridación para 40 ciclos donde se consigue amplificar de forma clara la banda de 195pb perteneciente al amplicón del promotor 35S. Si bien es cierto que aparecen otra serie de bandas inespecíficas éstas son poco numerosas y de menor intensidad.

Si se introducen unas condiciones más restrictivas de amplificación para eliminar las bandas inespecíficas como es a 58° se disminuye en gran medida la resolución de la bandas de 195 pb. Si se aumenta mucho la temperatura llega a desaparecer por completo la banda perteneciente a la amplificación del promotor 35S. A temperaturas de hibridación bajas inferiores a 54°C se observan una gran cantidad de bandas inespecíficas, perdiendo la banda de 195 pb gran resolución.

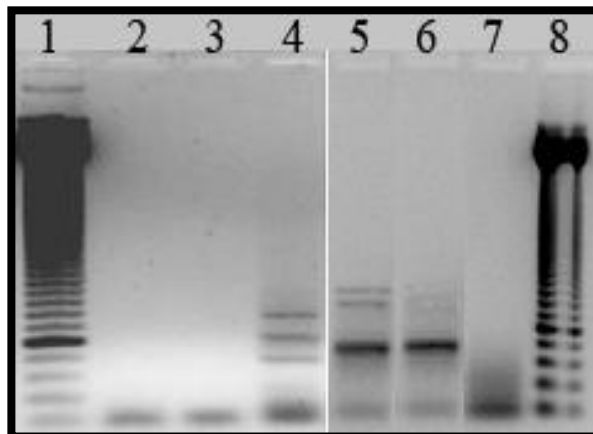


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la amplificación del gen promotor p35S del maíz Bt176. Línea 1 y 8 patrón de pesos moleculares de pb; líneas 2-7 temperatura de hibridación de 52°, 53°, 54° 55°, 56 ° y 57 durante 40 S

Con el objetivo de disminuir las bandas inespecíficas se amplió el tiempo de hibridación desde 40 s a un minuto (Figura.8). Los resultados muestran que ampliar el número de ciclos no mejora la resolución y se alarga mucho en el tiempo el análisis

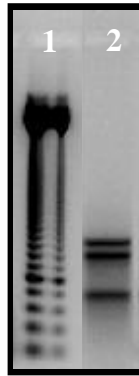


Figura 8. Efecto del número de ciclos sobre la amplificación del gen promotor p35S Línea 1 patrón de pesos moleculares y línea 2 amplificación a 55° y 1 minuto de anillamiento.

3. Resultados de la PCR a tiempo real.

Para solventar las limitaciones del método clásico en la actualidad se han desarrollado métodos cuantitativos que permiten mejorar los resultados obtenidos por la PCR clásica, entre ellos la PCR en tiempo real (RT-PCR). Las ventajas que ofrece frente a otros métodos es un riesgo mínimo de contaminación, alta capacidad de procesamiento, tiempo de análisis cortos y una alta reproducibilidad y sensibilidad. Debido a la alta sensibilidad su limitación es que el ADN debe de estar puro y libre de inhibidores.

En una PCR estándar la amplificación de la secuencia diana se visualiza al final del proceso, pero en la PCR a tiempo real esta visualización se realiza ciclo a ciclo. Uno de los fluorocromos más ampliamente utilizados es el SYBR green, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena independientemente de la secuencia (Ahmed F.E., 2002). Cuando se encuentra unido al ADN y es excitado con una luz de 495 nm éste emite una fluorescencia verde de 521 nm, en cambio cuando no está unido al ADN el SYBR green no emite fluorescencia. En el curso de una PCR después de cada ciclo de replicación el fluorocromo se incorpora a la doble cadena de ADN. Cuando el ADN está desnaturizado el fluorocromo vuelve a la solución de reacción y perdiendo así su capacidad de emitir fluorescencia. En los sucesivos ciclos de la PCR se incrementa el número de copias de la secuencia diana, incrementándose así la fluorescencia (Maurer J. 2006).

En la figura 9 se muestran los resultados de amplificación para el ADN de maíz Bt-176 obtenido por el método del CTAB. Los resultados muestran que el uso del fluorocromo SYBR es adecuado para la detección de GMO, siendo incluso más sensible que las técnicas de PCR a punto final.

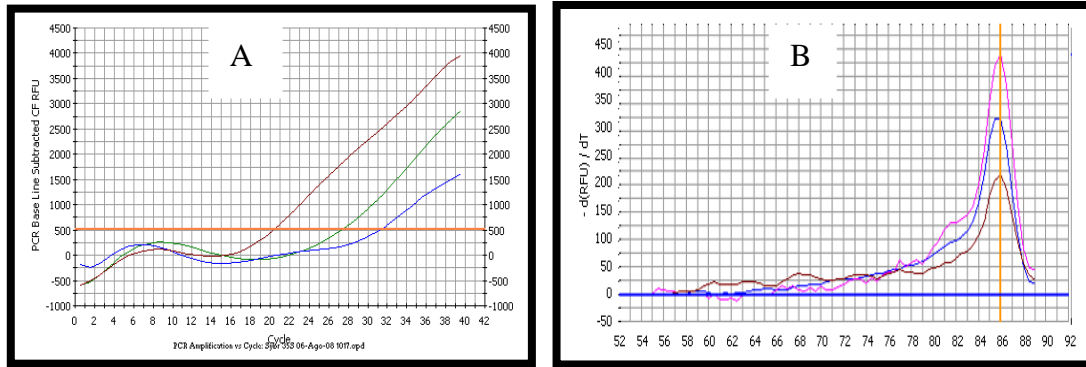


Figura 9: Curvas de amplificación y picos de temperatura de amplificación resultado del análisis por PCR-RT con SYBR green a partir de concentraciones conocidas de maíz Bt-176. A) Línea marrón 500 ng de ADN, verde 100 y azul 50 ng. B) Línea rosa 500 ng de ADN, azul 100 y marrón 50 ng.

Las pruebas se realizaron a distintas cantidades de ADN (500, 100 y 50 ng), detectándose el promotor 35S en todos los casos, algo que no ocurría realizando el ensayo con una PCR estándar en la cual a 50 ng la cantidad era insuficiente para que fuese detectada. Los resultados de la temperatura de desnaturalización (T_m) que resultó ser de 86°C para este ADN, muestran la especificidad de la reacción de PCR. Resultados similares de T_m fueron obtenidos por otros autores utilizando como muestra semilla de maíz transgénica, donde la T_m fue de 85,3°C (Hernández M., et col, 2003).

CONCLUSIONES

1. El método de CTAB resultó ser más adecuado que el kit Dneasy para la obtención de ADN a partir de semillas de maíz BT176. Siendo la concentración y pureza independiente de la presencia de PVP.
2. Las condiciones óptimas de amplificación por PCR clásica son 500 ng de ADN 50 pmoles de primers, 2 mM de cloruro de magnesio y las condiciones de PCR: de 56°C y 40 segundos de anillamiento para 40 ciclos de amplificación.
3. La cuantificación por RT-PCR utilizando SYBR green incrementa el umbral de detección del maíz transgénico con respecto a la PCR clásica en 10 unidades.

BIBLIOGRAFIA

1. The certification of reference materials of dry-mixed maize powder with different mass fractions of Bt-176 maize. European Reference Materials (ERM).
2. Ahmed F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology Vol.20 No.5, 2002.*
3. CLIVES, J. Global Status of Commercialized Transgenic Crops in 2005. *International service for the acquisition of agri-biotech applications, 2006.*
4. Corbisier P., Broothaerts W., Gioria S., Schimmel H., Burns M., Baoutina A., Emslie K. R., Furui S., Kurosawa Y., Holden M.J., Kim H.H., Lee Y.M., Kawaharasaki M., Sin D., y Wang J. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt-176 corn by real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55, 3249-3257.*
5. Csaikl U.M., Bastian H., Brettschneider R., Gauch S., Meir A., Schauerte M., Scholz F., Sperisen C., Vornam B. y Ziegenhagen B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter 16: 69–86, 1998.*
6. Gachet E., Martin G.G., Vigneau F. y Meyer G. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology 9 (1999) 380-388.*
7. García-Cañas V., Cifuentes A. y González R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Critical Reviews in Food Science, 44 (2004) 425-436.*
8. Hernández M., Duplan M.N., Berthier G., Vaïtilingom M., Hauser W., Freyer R., Bertheau Y. y Pla M. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction Systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, 52, 4632-4637.*
9. Hernández M., Rodríguez-Lázaro D., Esteve T., Prat S. y Pla M. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry Volume 323, 2003, 164-170.*
10. Holden M.J., Blasic J.R., Bussjaeger L., Kao C., Shokere L.A., Kendall D.C., Freese L., y Jenkins G. R. Evaluation of extraction methodologies for corn

- kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 2468-2474.
11. Hughes S. y Moody A. PCR. Methods express. 2007
 12. Hurst C. D., Knight A. y Bruce I.J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding* 5: 579–586, 1999.
 13. Maurer J. (editor) .PCR methods in foods. 2006
 14. Oraby H.A., Hassan A.A. y Mossallam A.A.A. Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1974-1980 (2005).
 15. Ovesna J., Dedicova L., Horacek J., Sadilova E., Kucera L. y Meskova L. Comparison of different PCR-bases protocols for detection of Roundup Ready soybean. *Czech Journal of Genetics and Plant Breed*, 38, 2002(1) 55-63.
 16. Porebski S., Bailey L.G. y Baum B. R. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter* 8-15, 1997.
 17. Sambrook J. y Russel D. Molecular Cloning. A laboratory manual. Tercera Edición. New York : Cold Spring. Harbour, cop. 2001.
 18. Wenijn S., Siyang S., Minnan L. y Guangming L. Multiplex polymerase chain reaction/membrane hybridization assay for detection of genetically modified organisms. *Journal of Biotechnology* 105 (2003) 227–233.
 19. Wolf C., Scherzinger M., Wurz A., Pauli U., Hübner P. y Lüthy J. 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* (2000) 210 :367–372.