

PCR en tiempo real: fundamentos y aplicaciones en investigación, diagnóstico clínico y ambiental



tanirel
BIOTECNOLOGÍA


EDUCACION PERMANENTE
Universidad de la República


FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

MÓDULO I

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE DIFERENTES MIEMBROS DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO *TRYPANOSOMA CRUZI*

OJETIVO:

Cuantificar la expresión diferencial de miembros representativos de las tres subfamilias de amastinas en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.

INTRODUCCION:

Las amastinas integran una familia de proteínas que constituyen potenciales factores de virulencia y que se expresan en la superficie del parásito *Trypanosoma cruzi*. Este parásito tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre formas infectivas y no infectivas y replicativas y no replicativas alternando entre dos hospederos, un insecto vector y un mamífero. Curiosamente, los diferentes miembros de esta familia de proteínas se expresan en diferentes estadios del parásito lo que sugiere una función diferencial de los mismos. Durante este módulo práctico, se cuantificará por RT-qPCR la expresión de diferentes miembros representativos de cada una de las tres subfamilias dentro de la gran familia amastinas en diferentes estadios del ciclo de vida del parásito.

CONSIDERACIONES INICIALES:

Tres subfamilias: β (beta), δ (delta), ω (omega)

Tres estadios: epimastigotas, amastigotas, tripomastigotas

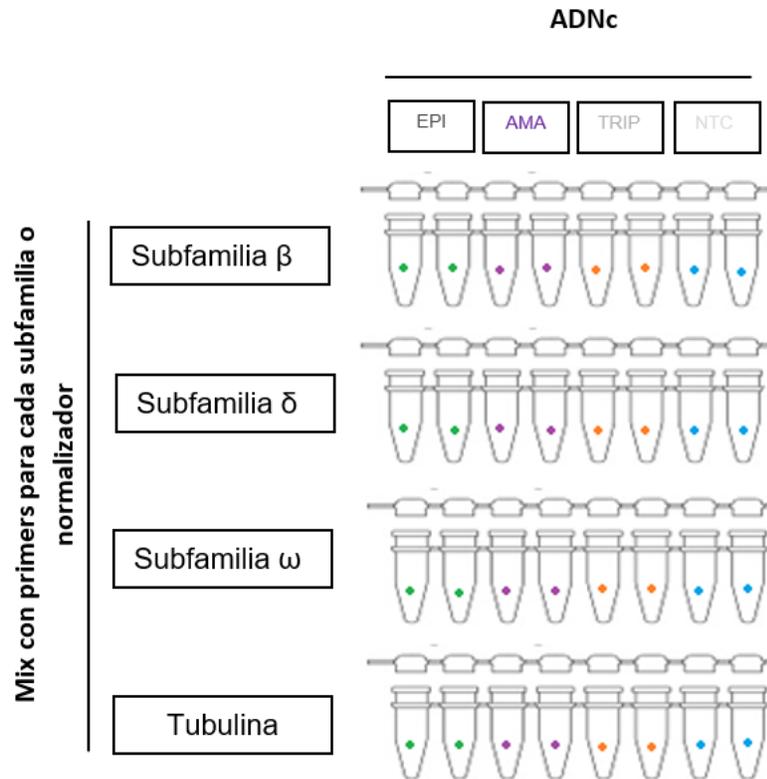
Gen normalizador: tubulina

Método de detección: SYBR Green (Bioline)

La reacción de qPCR en cada tubo contendrá los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen (μL)
Mix Syber Green 2X	5
Primer Fw (10 μM)	0,4
Primer Rev (10 μM)	0,4
H ₂ O	3,2
ADNc	1

La disposición de los tubos está dada de manera que en cada strip se evalúe una subfamilia o el gen normalizador (un par de primers), en los distintos estadios del parásito (3 ADNc) y un NTC como control, todo por duplicado:



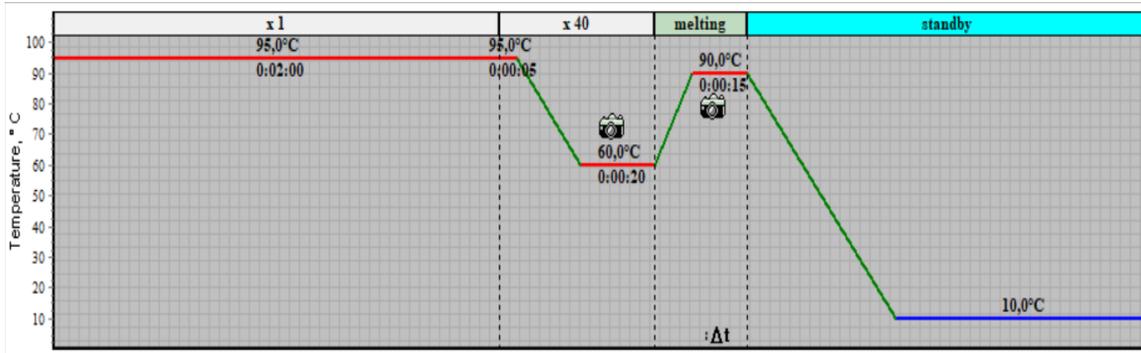
PROTOCOLO:

1. Calcular los volúmenes y preparar un mix para cada subfamilia y para el gen normalizador a partir de los volúmenes indicados, sin incluir el ADNc.

Reactivo	Volumen (μL)
Mix Syber Green 2X	
Primer Fw (10 μM)	
Primer Rev (10 μM)	
H ₂ O	
ADNc	

2. Dispensar 9 μL de cada mix en cada tubo de la strip (8 en total).

3. Dispensar 1 μL de ADNc en cada strip según corresponda (1-2: EPI, 3-4: AMA, 5-6: TRIP).
4. En el NTC (8-9) agregar 1 μL de agua.
5. Tapar la strip y dar un spin para homogeneizar.
6. Realizar la corrida con las siguientes condiciones de ciclado de acuerdo al kit utilizado:



7. Descargar los resultados en método Threshold (Ct) en formatos .r96, pdf y odt.

REFERENCIAS:

Kangussu-Marcolino MM, de Paiva RM, Araújo PR, de Mendonça-Neto RP, Lemos L, Bartholomeu DC, Mortara RA, daRocha WD, Teixeira SM. Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiol. doi: 10.1186/1471-2180-13-10.

F. Mosquillo, P. Smircich, M. Ciganda, A. Lima, D. Gambino, B. Garat and L. Perez-Diaz. Comparative high-throughput analysis of the *Trypanosoma cruzi* response to organometallic compounds. Metallomics. 2020. doi: 10.1039/d0mt00030b.

https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2668/sensifast_sybr_hi_rox_kit_manual.pdf

MÓDULO II

DETECCIÓN DE *SALMONELLA* spp. EN MUESTRAS DE RESIDUOS SÓLIDOS DESTINADAS A SER USADAS COMO MEJORADORES DE SUELO

OBJETIVO

Detección de *Salmonella* spp. en muestras de residuos sólidos destinadas a ser usadas como mejoradores de suelos mediante qPCR.

APLICACIÓN

Esta normativa técnica se utiliza para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de residuos sólidos destinadas a ser usadas como mejoradores de suelos, mediante la combinación de técnicas tradicionales y moleculares, que permiten obtener resultados en 72 h.

RESUMEN DEL MÉTODO

El género *Salmonella* está compuesto de 7 grupos filogenéticos, que habitualmente se clasifican en dos especies: *Salmonella* entérica y *Salmonella* bongori. La mayoría de las cepas son patógenos entéricos. Los residuos sólidos de la categoría II pueden ser usados como mejoradores de suelo, pero deben demostrar ausencia de *Salmonella* spp.

Este método combina las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento de la microbiología clásica, con una etapa de detección-confirmación que se realiza por técnicas moleculares: se extrae ADN a partir del caldo de enriquecimiento y se detecta al patógeno por qPCR.

INTERFERENCIAS

La presencia de tóxicos orgánicos como fenoles en la matriz residuos sólidos, junto con una baja densidad de *Salmonella* spp. pueden afectar la recuperación del microorganismo.

Las reacciones de amplificación del ADN pueden verse inhibidas por talco, polvo, restos de material vegetal (carbohidratos complejos, almidón), restos de reactivos de la extracción de ADN (fenol, CTAB, guanidina de las columnas de purificación, etc.). Se requiere asegurar la pureza y calidad del ADN a emplear, así como la higiene de las superficies y las pipetas a emplear.

Si la cantidad de ADN de la muestra es excesiva, se puede ver inhibida la reacción de amplificación. Se requiere cuantificar el ADN y realizar diluciones pertinentes (trabajar con un máximo de 50-20 ng de ADN por reacción).

Tabla 1: Sistema de primers y sondas a emplear

Secuencia target	Nombre primer/sonda	Secuencia	Tamaño del producto esperado	Referencia
ttrBCA	ttr6	5'- CTCACCAGGAGATTACAACATGG -3'	95 bp	Environ. Sci. Technol. 2011, 45, 8996-9002
	ttr4	5'-AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC -3'		
	ttrProbe	HEX 5'- <u>CCAGGCGACCGACTTTTAGCCACT</u> <u>GACGAGCCTGG</u> -3' DABCYL		

PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- i. Todo el material a emplear debe estar estéril (bolsas, tubos, puntas, placas de Petri).
- ii. Es imprescindible limpiar la mesada de trabajo, al iniciar el análisis, con alcohol y realizar el análisis microbiológico entre dos mecheros, para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.
- iii. Para evitar contaminaciones accidentales de ADN, la detección molecular de *Salmonella spp.* debe estar organizada y contenida en etapas metodológicas y siguiendo el flujo "hacia adelante" o de no retorno (*forward flow*) para el manejo de las muestras.
- iv. Las áreas de trabajo deben estar espacialmente separadas. Se recomienda la preparación de la mezcla de reacción en una cabina con lámpara UV destinada para tal fin, exclusivamente. El ADN se debe cargar en un área físicamente separada.
- v. Previo al inicio del trabajo, dejar el material plástico estéril y las micropipetas expuestas durante 15 minutos al UV de la cabina de preparación de la reacción.
- vi. Los reactivos, en particular la ADN polimerasa, son sensibles al calor. La mezcla de reacción debe realizarse en frío, pues la enzima puede perder actividad, y con la mayor celeridad posible.
- vii. El agua ultrapura estéril sobrante debe eliminarse. El re-uso del sobrante es una de las principales causas de contaminación de la mezcla de reacción.
- viii. No se debe emplear las pipetas de toma de volúmenes de reactivos para cargar ADN, ya que puede ser una fuente de contaminación. Las pipetas para preparar la mezcla de reacción son de uso exclusivo y no deben emplearse para hacer tomas de volúmenes de muestras de otra índole, por los mismos motivos.

ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del Agua de Peptona Bufferada (BPW)

Adicionar 20 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.

Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclave y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación Caldo Tetrionato base Hajna

Adicionar 45,75 g de caldo tetrionato a 480 mL de agua desionizada, y disolver agitando. Calentar con agitación frecuente y hervir por 1 minuto hasta que se disuelva completamente.

NO SE AUTOCLAVA.

Enfriar a 45-50°C. Justo antes de incubar agregar 20 ml de solución iodo/ioduro de potasio.

Nota: Para preparar 40 mL de solución iodo/ioduro de potasio, se deben diluir 5 g de iodo (I₂, Nro. de CAS 7553-56-2) y 8 g de ioduro de potasio (KI, Nro. CAS 7681-11-0) en 40 mL de agua estéril.

Repartir en recipientes estériles con tapa de 10 mL de volumen. Puede almacenarse a 4°C, dura varios meses, pero una vez agregada la solución de iodo debe usarse en el mismo día.

Pre enriquecimiento

Pesar 25 g de muestra (como se recibe) directamente en una bolsa de Whirl-Pak estéril.

Agregar 225 mL de Agua de Peptona Buffereada y mezclar por 60 s a 200 rpm.

Incubar a 36 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), 22 h \pm 2 h.

Homogeneizar manualmente, mezclando gentilmente.

Enriquecimiento

- i. Transferir asépticamente 2,5 mL del homogeneizado a un tubo de 50 mL, estéril, conteniendo 22,5 mL de Caldo Tetrionato Base Hajna.
- ii. Homogeneizar manualmente, mezclando gentilmente.
- iii. Incubar a 36 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), 22 h \pm 2 h.

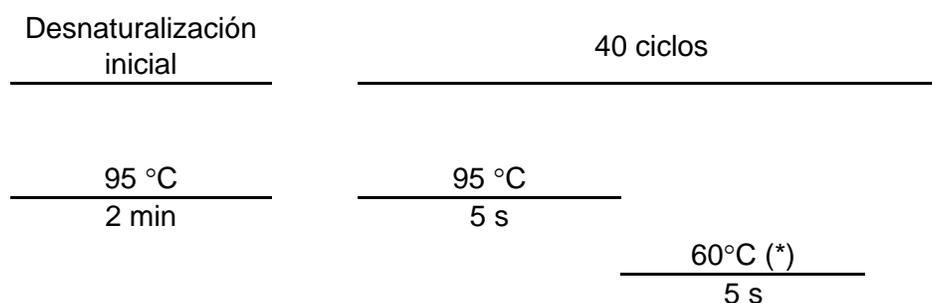
Detección y confirmación por Q-PCR

- iv. Luego de la incubación, vortexear el tubo de 5 a 10 s.
- v. Extraer el ADN a partir de los caldos incubados, de acuerdo a las instrucciones establecidas por el fabricante en el kit de extracción.
- vi. Fundir en hielo 2x QuantiNova Probe PCR Kit, ADN de la muestra, ADN control y agua ultrapura estéril. Mezclar las soluciones individuales, inclinando suavemente los tubos hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Darle un spin a cada tubo.
- vii. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la Tabla 2.
- viii. Vortexear suavemente la mezcla de reacción y dispensar 23 μL en los tubos de PCR

Tabla 2: Mezcla de reacción

Componente	x1 (en μL)
2x QuantiNova	12,5
Primer F 0,5 μM	2
Primer R 0,5 μM	2
Sonda 0,5 μM	1
Agua ultrapura estéril	5,5
ADN	2
Volumen final	25

- ix. Sembrar cada muestra y controles al menos por duplicado.
- x. Fuera de la cabina de preparación, con una pipeta exclusiva para uso de ADN, agregar 1 μL de molde de ADN, de concentración conocida y ajustada a 20-50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Se vortexea y se le da un spin en la minifuga.
- xi. El ciclado térmico es el siguiente:



* adquisición de la fluorescencia

- xii. La adquisición se hace en el step de (60 °C).

CONTROLES DE CALIDAD ANALÍTICO

Blanco de proceso: Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en mL de Agua de Peptona Buffereada. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser negativa.

Control positivo de proceso: Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en mL de Agua de Peptona Buffereada, con una anzada de *Salmonella spp.* Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser positiva.

Fortificación de una muestra: Se realiza una muestra por duplicado, y a uno de los duplicados se le agrega una anzada de *Salmonella spp.* Se trata como si fuera una muestra.

La detección por PCR debe ser positiva. Un resultado negativo indica que existe inhibición de crecimiento y/o de extracción de ADN.

Non Template Control (NTC) o Blanco de PCR: se incluye por duplicado un blanco de agua. La detección por PCR debe ser negativa.

Control positivo de PCR: incluir un ADN de *Salmonella spp.* de concentración conocida. La detección por PCR debe ser positiva.

La dispersión entre los duplicados de la PCR no deben superar el 15%. En caso de que así sea, se evaluará la pertinencia de repetir la muestra.

ANEXO

INSTRUMENTAL Y MATERIALES

Balanzas de resolución 0,01 g

Autoclave

Mecheros

Bolsa de Whirl-Pak

Material de vidrio para preparación del medio de cultivo.

Termómetro calibrado para controlar la temperatura de la incubadora.

Tubos tipo Falcon 50 mL estéril

Incubadora a 35 °C

Heladera a 2-8 °C

Freezer -20 °C

Anzas

Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 90 mm de diámetro

Cinta de revelado de autoclave

Destilador de agua (Barnstead o similar)

Desionizador de agua (Milli-Q o similar)

pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

Cabina de preparación de la PCR

Minifuga

Vortex

Juego de micropipetas de 200- 1000 μ L, 20-200 μ L, 2 – 20 μ L para uso exclusivo de reactivos NO ADN

Pipeta 0,2-2 μ L para uso exclusivo de ADN

Tips estériles

Tubos eppendorff de 1,5 mL estériles
Tubos de PCR ópticamente adecuados, estériles
Termociclador a tiempo real

REACTIVOS

Etanol 70%

Agua desionizada (grado 2 según norma ISO 3696 en su versión vigente)

Caldo Agua de Peptona Buffereada

Caldo Tetrionato base Hajna

Cristales de Iodo y Ioduro de potasio

Agua ultrapura estéril, alicuotada en tubos de 1,5 mL (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

Kit de extracción de ADN

Kit de reacción que incluye buffer de reacción, dNTP, ADN polimerasa Hot Start, Cloruro de Magnesio

Sistemas de primers y sonda según Tabla 1

ADN de *Salmonella spp.* para control positivo de la reacción de amplificación

Cepa de referencia: *Salmonella spp.* ATCC14028 para control positivo de proceso

Cepa de referencia: *E. coli* ATCC25922 para control negativo del proceso

BIBLIOGRAFÍA

TMECC 07.02-B. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2001

Jyoti A., Vajpayee P., Singh G., Bali Patel C., Chand Gupta K., Shanker R. Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of *Salmonella Typhimurium* by Quantitative Polymerase Chain Reaction. 2011. Environ. Sci. Technol. 45: 8996–9002 dx.doi.org/10.1021/es2018994

MÓDULO III

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS RESPIRATORIOS

OBJETIVO:

El objetivo de la práctica es la detección simultánea de SARS-CoV 2, Influenza A e Influenza B, mediante múltiplex real time PCR.

INTRODUCCION:

Las infecciones causadas por virus respiratorios son recurrentes y de gran relevancia sanitaria tanto en los seres humanos como en los animales. Existe un amplio repertorio conocido de virus asociados a infecciones respiratorias y en particular alguno de ellos son de especial interés por su persistencia, su rápida capacidad evolutiva y la alta morbimortalidad asociada. Entre estos el virus de Influenza agente causal de la gripe ha sido responsable de grandes epidemias y pandemias a lo largo de la historia de la humanidad. Por este motivo es un virus bajo vigilancia epidemiológica constante y se dispone de una vacuna que protege frente a los subtipos que frecuentemente circulan estacionalmente y que se recomienda se administre todos los años en especial a las poblaciones de riesgo.

A partir del año 2020, surgió un nuevo Coronavirus capaz de generar un síndrome respiratorio severo emparentado al Coronavirus SARS del año 2001-2002 que rápidamente se dispersó generando una emergencia sanitaria mundial. A finales del mismo año estuvieron disponibles vacunas en diferentes formatos y se comenzó la inmunización mundial con la intención de controlar principalmente la forma grave de la enfermedad respiratoria asociada ³.

Actualmente en un escenario post pandémico de Covid-19, se comenzó a constatar nuevamente la circulación de otros virus respiratorios. En este contexto surge la necesidad de diseñar metodologías de detección simultánea de éstos virus brindando un diagnóstico rápido y confiable.

Para abordar esta problemática, en ATGen se optimizó ² un multiplex RT qPCR que permite detectar en una misma reacción la presencia de Influenza A, Influenza B y Covid.

Multiplex RT real time PCR

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) es la capacidad de monitorear el progreso de la PCR a medida que ocurre (es decir, en tiempo real). Por lo tanto, los datos

se recopilan a medida que la reacción ocurre y los resultados se pueden obtener en tiempo real.

Existen diversos formatos a través de los cuáles se puede monitorear este progreso. Uno de los más utilizados son las sondas TaqMan. En este sistema se basa en una sonda que es complementaria al fragmento que se quiere amplificar y que está conjugada con un fluoróforo en el extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3'. A su vez el ensayo se sirve de la actividad 5' nucleasa que presenta la Taq Polimerasa. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del *quencher* en 3' al fluoróforo en el extremo 5' reduce la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo. Si la secuencia diana está presente, la sonda se hibrida en su región complementaria en algún sitio dentro de la región que amplifican los cebadores y es escindida por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq a medida que se extiende el fragmento sintetizado. Este evento separa el *quencher* del fluoróforo permitiendo que el mismo emita fluorescencia que será detectada por el equipo (Fig.1).

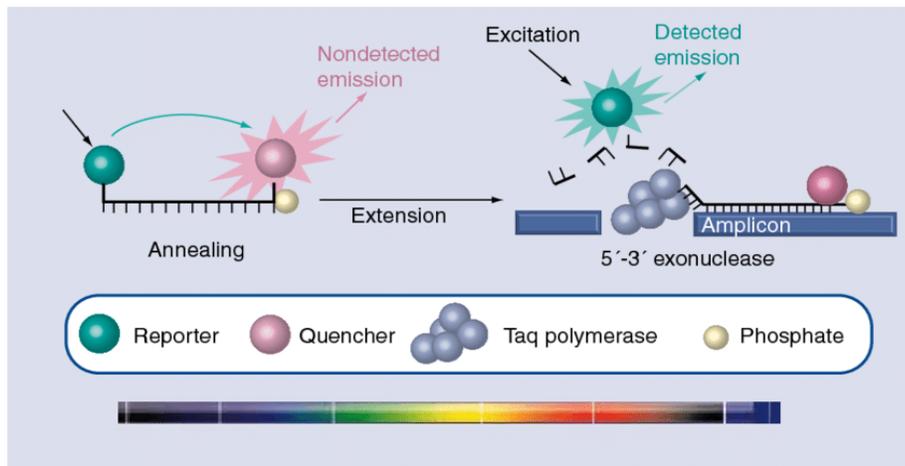


Figura 1. Representación esquemática de la tecnología TaqMan¹.

Sistema *multiplex*

En este sistema dos o más targets son amplificados en la misma reacción, utilizando la misma mezcla de reactivos. Esto permite, partiendo de una sola muestra, la detección simultánea de varios virus al mismo tiempo. En este sistema cada uno de los targets emitirá fluorescencia en diferentes canales de forma tal de poder diferenciar la amplificación de cada uno de ellos. En este sentido la asignación de un fluoróforo a cada *target* que se quiere detectar se convierte en un desafío. Varios parámetros pueden afectar la eficiencia de esta asignación, repercutiendo en la sensibilidad y especificidad obtenida para cada uno de los genes que se busca amplificar. La gran ventaja de este sistema es el ahorro de reactivos y de tiempo ya que en la misma reacción se pueden detectar varios virus, minimizando también, la introducción de errores de pipeteo.

El kit de detección Flu A/B COVID-19 RT-PCR Real Time, es una prueba de RT-PCR (One-Step) en tiempo real para la detección cualitativa del ácido nucleico de los virus: Influenza A, Influenza B y SARS-CoV-2 en muestras clínicas procedentes del tracto respiratorio superior (hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos, lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal) y/o del tracto respiratorio inferior (aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado bronco-alveolar y esputo).

El ARN extraído a partir de las muestras clínicas, será retrotranscrito a ADN y amplificado mediante PCR en tiempo real en un solo paso basándose en la amplificación de regiones específicas de cada genoma viral. El reactivo contiene cebadores y sondas de hidrólisis (TaqMan®) que amplifican secuencias específicas de una región del gen N de SARS-CoV2, una región del gen M1 del Influenza A, una región del gen NS2 de Influenza B. Adicionalmente el kit contiene otro juego de cebadores y sonda para la amplificación del gen humano de la RNasa P (Control Interno) como control de la extracción de ARN.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Kit de amplificación para Flu A/B CoV2 (ATGen) que contiene:
 - Mix Flu A/B CoV-2
 - Mix enzimas 4x
 - Controles positivos
 - Agua ultra pura
- Termociclador de tiempo real
- Centrífuga o *mini spin*
- Muestras clínicas (ARNs)
- Micropipetas de 100ul y 20ul
- Tips de 20ul y 100ul.
- Tiras para pcr de 0.2 y sus tapas
- Guantes
- Software del equipo de real time para análisis de resultados.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA:

Cada grupo recibirá dos muestras incógnitas. Se largará una única PCR con las muestras de todos los grupos, controles positivos y un control negativo.

Una vez obtenidos los resultados cada grupo deberá analizar la corrida y determinar el resultado obtenido para las muestras asignadas, argumentando el mismo.

Preparación de la mezcla de reacción:

- Descongelar completamente los componentes del kit.

- Mezclar por inversión todos los insumos del kit durante unos segundos.
- Dar un spin con la centrifuga a todos los insumos.
- Preparar la mezcla de reacción según la cantidad de reacciones que se van a utilizar (N) de acuerdo a lo indicado en la tabla a continuación. Tomar en cuenta un control Positivo para cada virus y un Control Negativo de PCR (buffer de elución de ARN o agua calidad biología molecular).

	1 rxn (μL)	N rxns +1
Mix enzimas 4x	5	5 x N+1
Mix Flu A/B- CoV-2	10	10 x N+1

- Alicuotar 15 μ l de la mezcla de reacción en tubos de PCR (o tiras).
- Agregar 5 μ l de Control Negativo (buffer de elución de ARN o agua para biología molecular) al tubo de reacción correspondiente al C- de PCR; Agregar 5 μ l de Controles Positivos a los tubos de reacción correspondientes a cada C+ de PCR; Agregar 5 μ l de cada muestra de ARN extraído a cada tubo de reacción (previo a la apertura de cada muestra se recomienda la realización de un spin para evitar aerosoles).
- Cerrar cuidadosamente cada tira controlando que la tapa esté a la misma altura en todos los pocillos.
- Cargar las tiras (*strips*) en el equipo de real time y lagar la corrida de acuerdo al manual del equipo para tal fin (RealTime_PCR v7.9)

Programación del ciclado:

Etapas	Temperatura	Tiempo	Detección	Ciclos
1	50 °C	15 min	-	1
2	95 °C	2 min	-	1
3	95 °C	15 seg	-	x 40

	55 °C	30 seg	FAM/HEX/CY5/ ROX	
--	-------	--------	---------------------	--

- La línea umbral dependerá del equipo utilizado por lo cual la misma puede ajustarse manualmente ubicándola en la décima parte inferior de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo.

Interpretación de Resultados

	FAM (FLU A)	HEX (FLU B)	ROX (SARS CoV2)	Cy5 (Control Interno)
Control negativo	No amplifica	No amplifica	No amplifica	No amplifica
Control positivo	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30	No amplifica
Muestra positiva	Ct < 35	Ct < 35	Ct < 35	Irrelevante
Muestra negativa	No amplifica	No amplifica	No amplifica	Ct ≤ 35
Muestra Indeterminada*	35 ≤ Ct ≤ 39	35 ≤ Ct ≤ 39	35 ≤ Ct ≤ 39	Ct ≤ 35
Muestra Invalida*	No amplifica	No amplifica	No amplifica	>35 o No amplifica

REFERENCIAS:

1. O'Connor L, Glynn B. (2010) 'Recent advances in the development of nucleic acid diagnostics' *Expert Rev Med Devices*. 2010 Jul 7(4):529-39.
2. Center for Disease Control and Prevention - Flu SC2 Multiplex Assay. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex.html>
3. World Health Organization. Pneumonia of unknown cause—China. 2020 [cited 2020 Jul 8]. <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/>.

MÓDULO IV: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OGM EN SEMILLAS

OBJETIVO

Determinar el porcentaje de semilla OGM presente como contaminante de un lote de semillas no transgénico

INTRODUCCIÓN

INASE es un instituto de derecho público no estatal creado en febrero de 1997 por la Ley N° 16.811 y promueve el desarrollo de la actividad semillera. Uno de sus cometidos es mantener el laboratorio oficial de semillas del país que se compone de dos sectores: el físico-fisiológico y el molecular-sanitario.

Dentro de los análisis que realiza el sector molecular-sanitario, se encuentra la detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) en semillas y plantas, que se aplica para detectar la presencia de semillas transgénicas en lotes no-OGM. Esta estrategia se emplea para monitorear los lotes de semilla importada y en el caso de colza y alfalfa se exige como requisito previo al ingreso al país, de manera de evitar que ingresen semillas OGM que no están aprobadas en Uruguay.

Para el caso de eventos autorizados en el país, el Laboratorio brinda el servicio de cuantificación de OGM y es utilizado por productores y empresas para monitorear la producción de lotes de semilla no-OGM de soja y maíz. De esta forma, mediante un análisis de PCR en tiempo real es posible determinar el porcentaje de semilla OGM presente como contaminante de un lote de semillas no transgénico.

CONCEPTOS IMPORTANTES

❖ Validación de un método.

La validación es la confirmación mediante el examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico. La validación completa de un método analítico generalmente comprende un examen de las características del método en un estudio interlaboratorio de desempeño del método. La validación de estos métodos requiere un número mínimo de laboratorios y muestras de prueba para ser incluidos en el ensayo de colaboración para validar el método analítico.

❖ Verificación de un método

Proporcionar evidencia objetiva de que un laboratorio puede operar adecuadamente un método validado, cumpliendo con los requisitos de rendimiento para las matrices de muestra a las que se aplica el método.

❖ Límite de detección (LOD)

LOD es la menor cantidad o concentración de analito en una muestra, que puede detectarse de manera confiable pero no necesariamente ser cuantificada. Experimentalmente, los

métodos deben detectar la presencia del analito en al menos el 95% de los casos (muestras) en el LOD, asegurando $\leq 5\%$ de resultados falsos negativos.

❖ Límite de cuantificación (LOQ)

LOQ es la menor cantidad o concentración de analito en una muestra, que se puede cuantificar de manera confiable con un nivel aceptable de precisión y veracidad.

❖ Eficiencia de amplificación

Es la tasa de amplificación por PCR que conduce a una pendiente teórica de -3.32 con una eficiencia del 100% en cada ciclo. La eficiencia se puede calcular:

$$E = (10^{(-1/pend)} - 1) \times 100$$

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Para la actividad práctica determinaremos el porcentaje de OGM presente en muestras de soja por PCR cuantitativa, utilizando sondas de tipo Taqman. Para ello, contamos con la información previa de la detección del evento MON89788 en las muestras. Utilizaremos los métodos validados por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (JRC), disponibles en su página web (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/method-validations>).

1. EXTRACCIÓN DE ADN

Es posible realizar la extracción de ADN con kits comerciales o con métodos químicos como el método del CTAB. Lo importante es asegurar un ADN de calidad y cantidad suficiente para su posterior amplificación.

2. CHEQUEO DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN

Chequear la concentración del ADN extraído por ejemplo con un fluorímetro (que solo mide ADN doble hebra) o en nanodrop (establecer relación A260/280 y A260/230) o mediante una corrida electroforética. Para el chequeo de la integridad del ADN se puede realizar una corrida electroforética. En caso de ser aceptable, diluir la muestra a la concentración de trabajo.

3. PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

Para la cuantificación debemos preparar 2 curvas estándares: una para el gen de interés (MON89788) y otra para el gen endógeno normalizador (lec, gen de referencia para soja). La curva estándar se prepara realizando diluciones seriadas de un material de referencia (porcentaje de OGM conocido). Este paso es clave para el éxito de la cuantificación, ya que a partir de la curva de calibración, se obtendrá una recta en la que se interpolará el valor de la muestra problema para obtener el porcentaje.

4. PCR

Permitir que todos los reactivos se descongelen totalmente. Mezclar brevemente y dar un spin para que no queden gotas en las paredes de los tubos. Realizar los

cálculos de los volúmenes necesarios (tener en cuenta las curvas y el blanco), utilizando la siguiente tabla:

Componentes	Concentración final	µl/reacción	N reacciones
Agua milli-Q	c.s.p		
Master Mix kit (2X)	1X		
<i>Primer forward</i> (20 µM)	0,2 µM		
<i>Primer reverse</i> (20 µM)	0,2 µM		
Sonda fluorescente (10 µM)	0,1 µM		
Muestra de ADN (12-30 ng/µl)	60 ng totales		
Volumen total de reacción	20 µl		

Una vez realizada la mezcla de PCR, mezclar bien y dar spin. Dispensar el volumen correspondiente en cada tubo de reacción. Agregar el ADN que corresponda y cerrar los tubos.

Configurar el equipo con las siguientes condiciones de ciclado:

Paso	Etapas	T (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización	95 °C	10 min	1
2	Desnaturalización	95 °C	15 s	40
3	<i>Annealing</i> /Extensión	60 °C	1 min	

Secuencias de primers y sondas a utilizar:

Gen	Nombre	Secuencia
MON 89788	MON89788-F	TCCCCTCTAGCGCTTCAAT
	MON89788-R	TCGAGCAGGACCTGCAGAA
	MON89788-Pr	FAM -CTG AAG GCG GGA AAC GAC AAT CTG-TAMRA
TAXÓN ESPECÍFICO	Lec-F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
	Lec-R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
	Lec-Pr	FAM -CTTCACCTTCTATGCCCTGACAC-TAMRA

5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Determinar la ecuación de la recta para ambos genes graficando el valor CT en función del logaritmo del número de copias. Evaluar eficiencia y coeficiente de

correlación de las curvas. Para realizar la cuantificación, las eficiencias de ambas curvas deben ser comparables.

Una vez obtenida la ecuación de la recta, obtener el cociente entre el número de copias del transgén y el gen endógeno normalizador. Para obtener el porcentaje se debe multiplicar por 100.

REFERENCIAS

European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON 89788 Using Real-time PCR - Protocol. CRLVL05/06VP 18/02/2008.