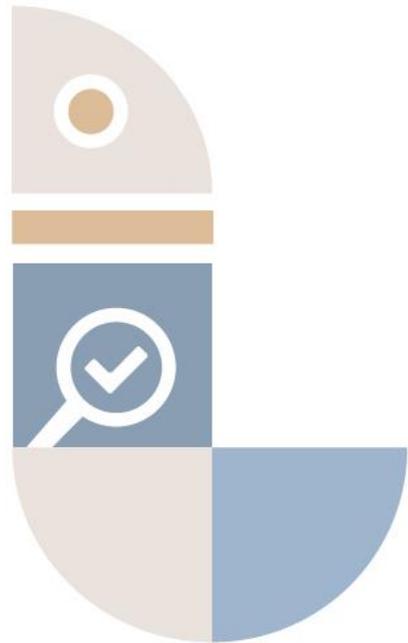


25 años **INASE**
URUGUAY
1997 - 2022





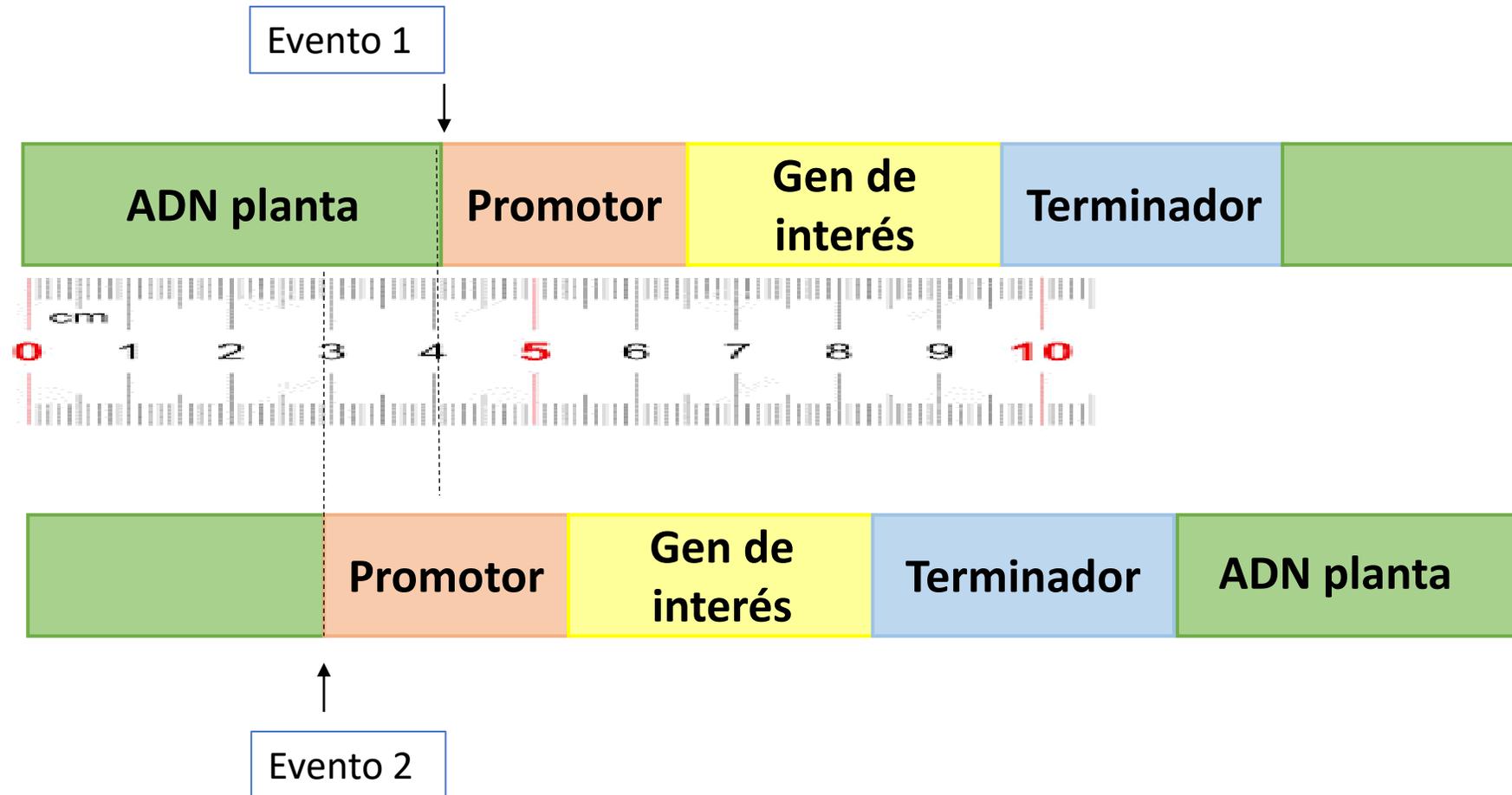
MÓDULO IV: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OGM EN SEMILLAS

Lic. Bioq. Mariana Menoni

LABORATORIO DE CALIDAD DE SEMILLAS

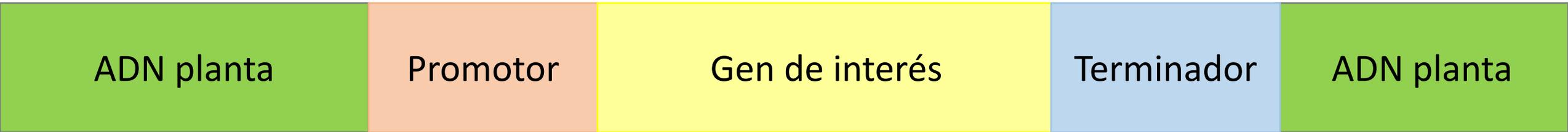
16 de septiembre de 2022

¿QUÉ ES UN EVENTO TRANSGÉNICO?



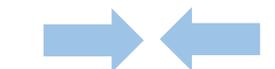
Incorporación de una secuencia de interés en un sitio específico del genoma

ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN POR PCR




Taxón específico


Screening

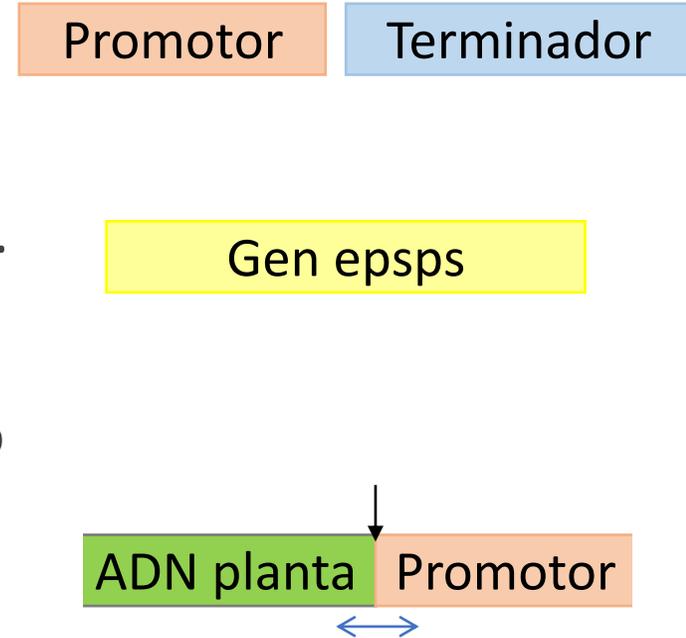

Screening


Gen específica


Evento específica

ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN POR PCR

- Screening: para detectar contaminación de OGM en lotes convencionales (no sabemos el evento)
- Gen específico: para detectar una característica (*trait*) por ej. tolerancia a glifosato (epsps) en alfalfa y colza importadas
- Evento específico: se usan *primers* específicos para el evento que buscamos. Por ej. para verificación de eventos regulados (sabemos cuál buscamos)



ORGANISMOS INTERNACIONALES DE ESTANDARIZACIÓN

ISO 17025:2017 – Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración

Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y sus productos derivados:

- ISO 24276:2006_ Requerimientos generales y definiciones
- ISO 21571:2005_ Extracción de ácidos nucleicos
- ISO 21569:2005_ Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos
- ISO 21570:2005_ Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos
- ISO 21572:2004_ Métodos basados en proteínas



ISTA
Seed Quality Assurance

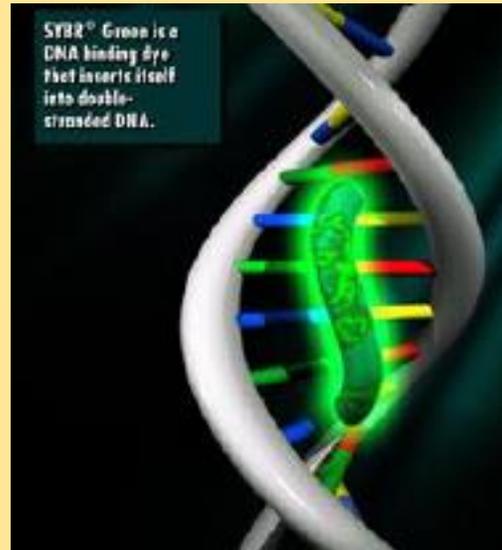
European Commission
JOINT RESEARCH CENTRE
European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed

Event	Crop name	UniqueID	Method technique	Applicant	Status	Document type	Document title	Version	Publication date
MON 87708	soybean	MON-87708-9	Real-time PCR	Monsanto Company	Validation completed	Validation report	Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON87708 Using Real-time PCR	EURL-VL-02/11VR 06/05/2013	16/05/2013
						Validation Method	Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON87708 Using Real-time PCR	EURL-VL-02/11VR 06/05/2013	16/05/2013
						DNA Extraction	Report on the Validation of a DNA Extraction Method for Soybean	CRLVL05/06XP 18/02/2008	16/05/2013
T304-40									21/12/2012
									21/12/2012
							Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods		14/03/2007
40278					completed	reports	Validation report for the Quantification of Maize DAS-40278-9 by Real-time PCR - Validation Report	7 November 2012	11/12/2012
						Validated Method	Event-specific Method for the Quantification of Maize DAS-40278-9 using	EURLVL10/10VP 7 November 2012	11/12/2012

PCR EN TIEMPO REAL: PRINCIPALES SISTEMAS DE DETECCIÓN

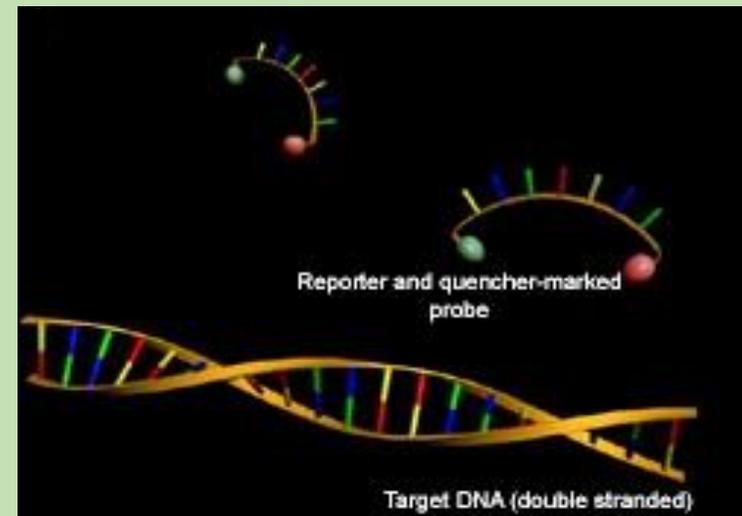
Intercalantes de ADN: tecnología SYBR® Green

Emite fluorescencia cuando se intercala dentro de la molécula de ADN

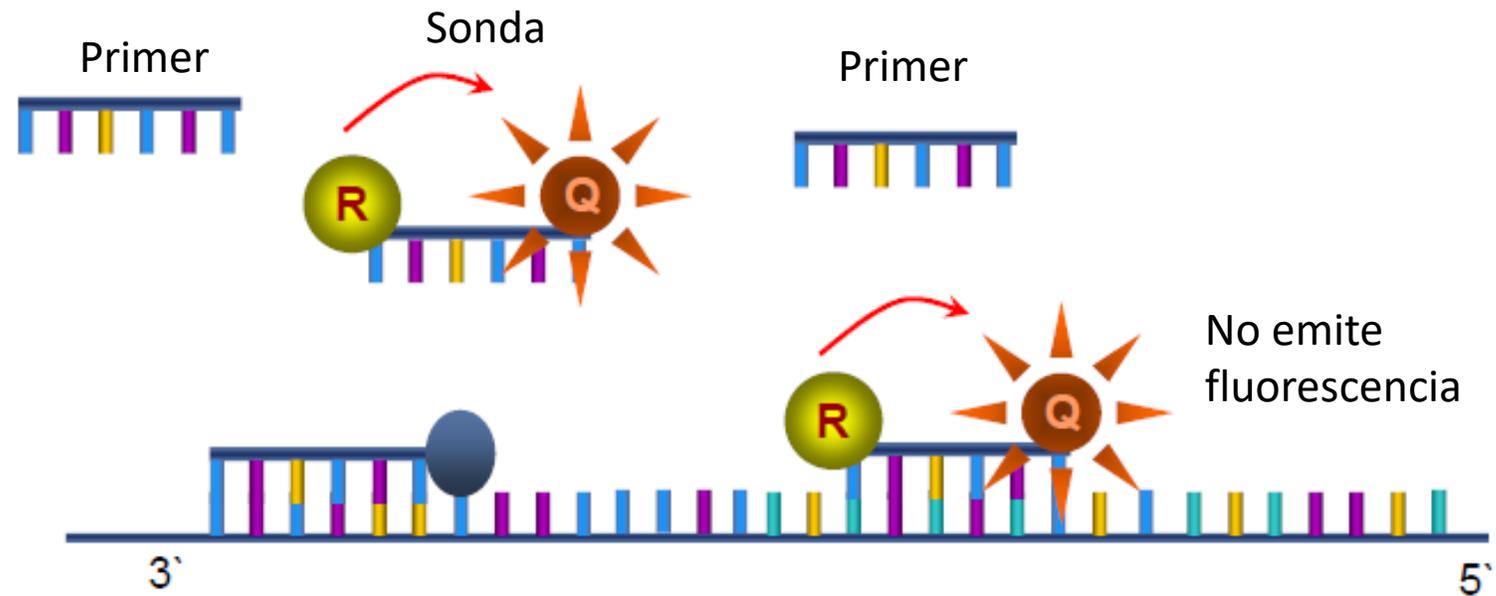


Sondas de hidrólisis: tecnología TaqMan®

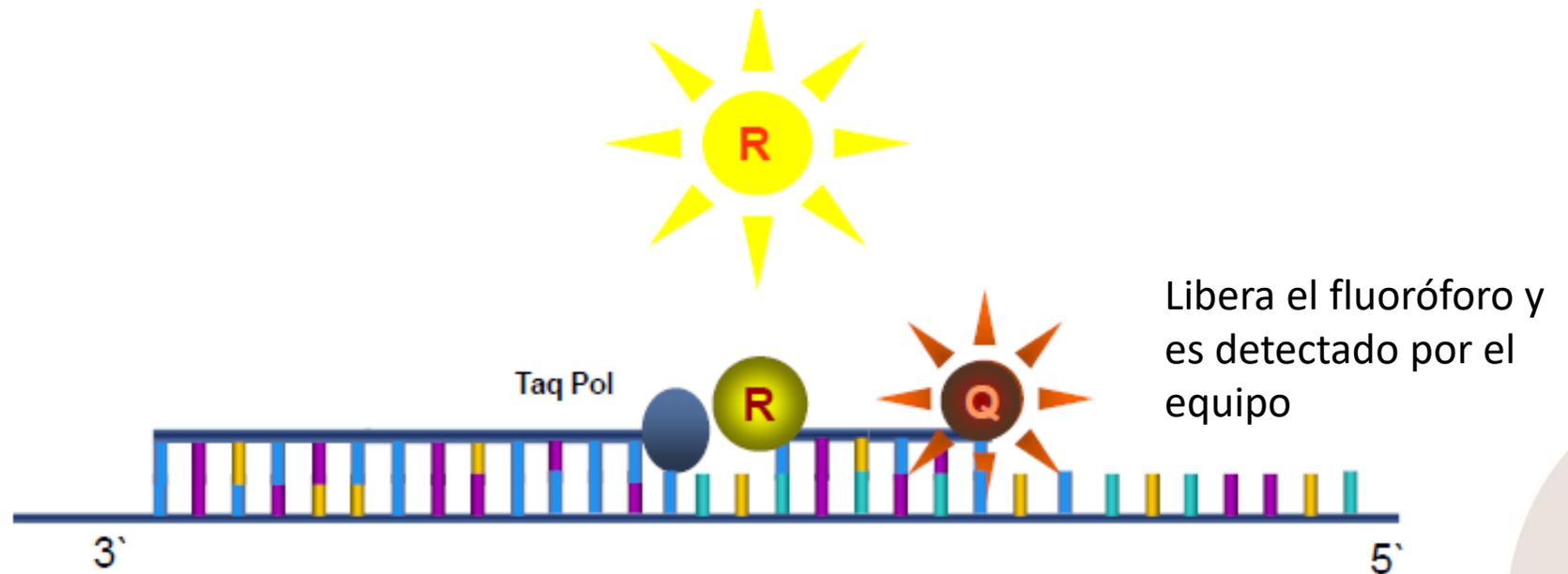
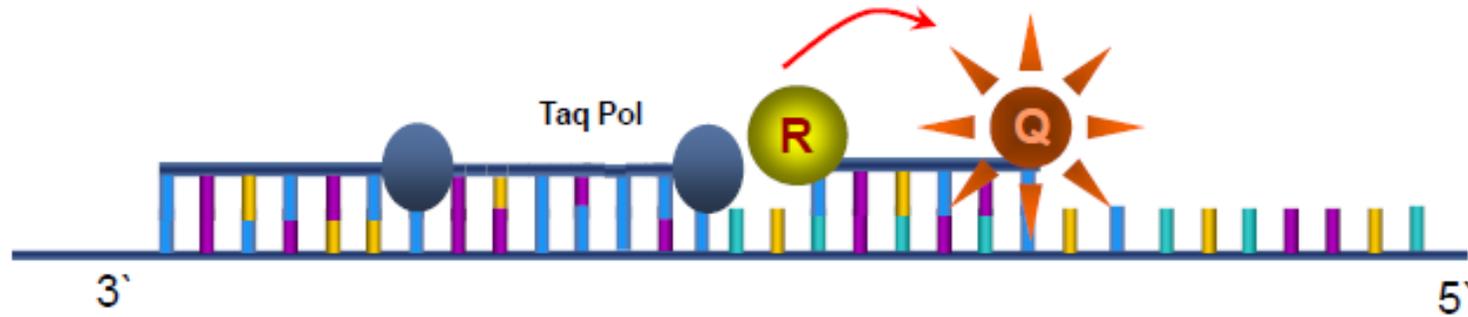
Emite fluorescencia cuando se hibrida la sonda y ocurre la polimerización, liberando el quencher



SONDAS DE HIDRÓLISIS TaqMan®



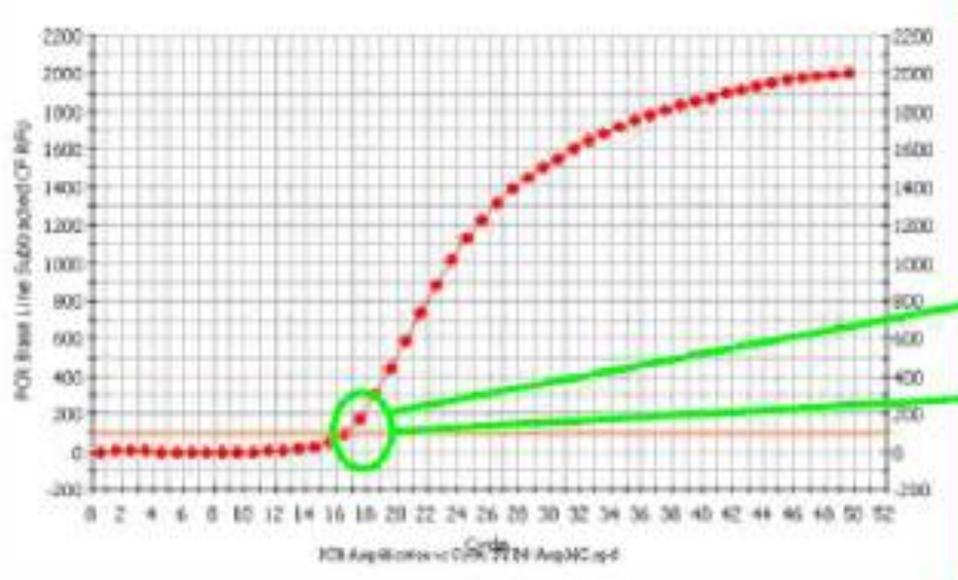
SONDAS DE HIDRÓLISIS TaqMan®



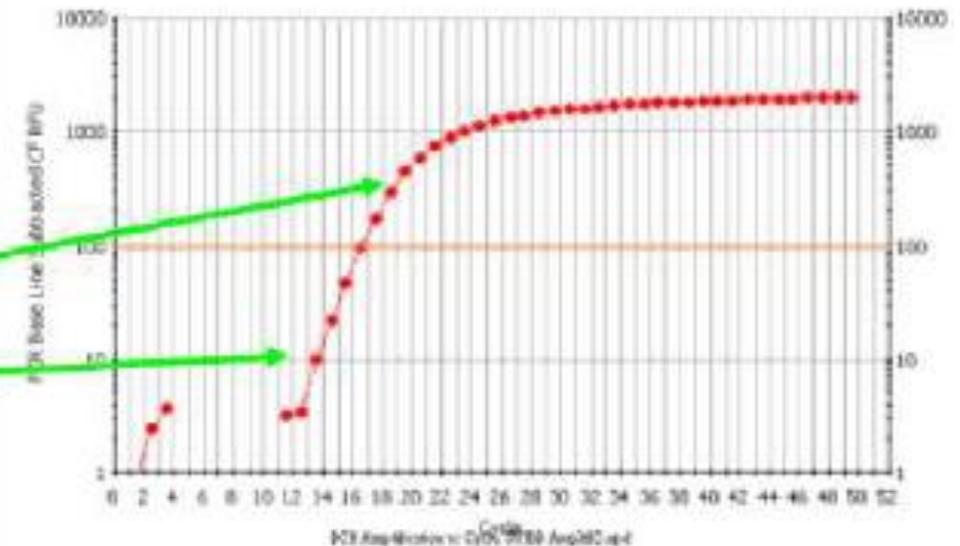
PCR EN TIEMPO REAL

A medida que progresa la reacción, se recogen los datos de fluorescencia y se va realizando un gráfico respecto al n° de ciclos

Escala lineal



Escala exponencial

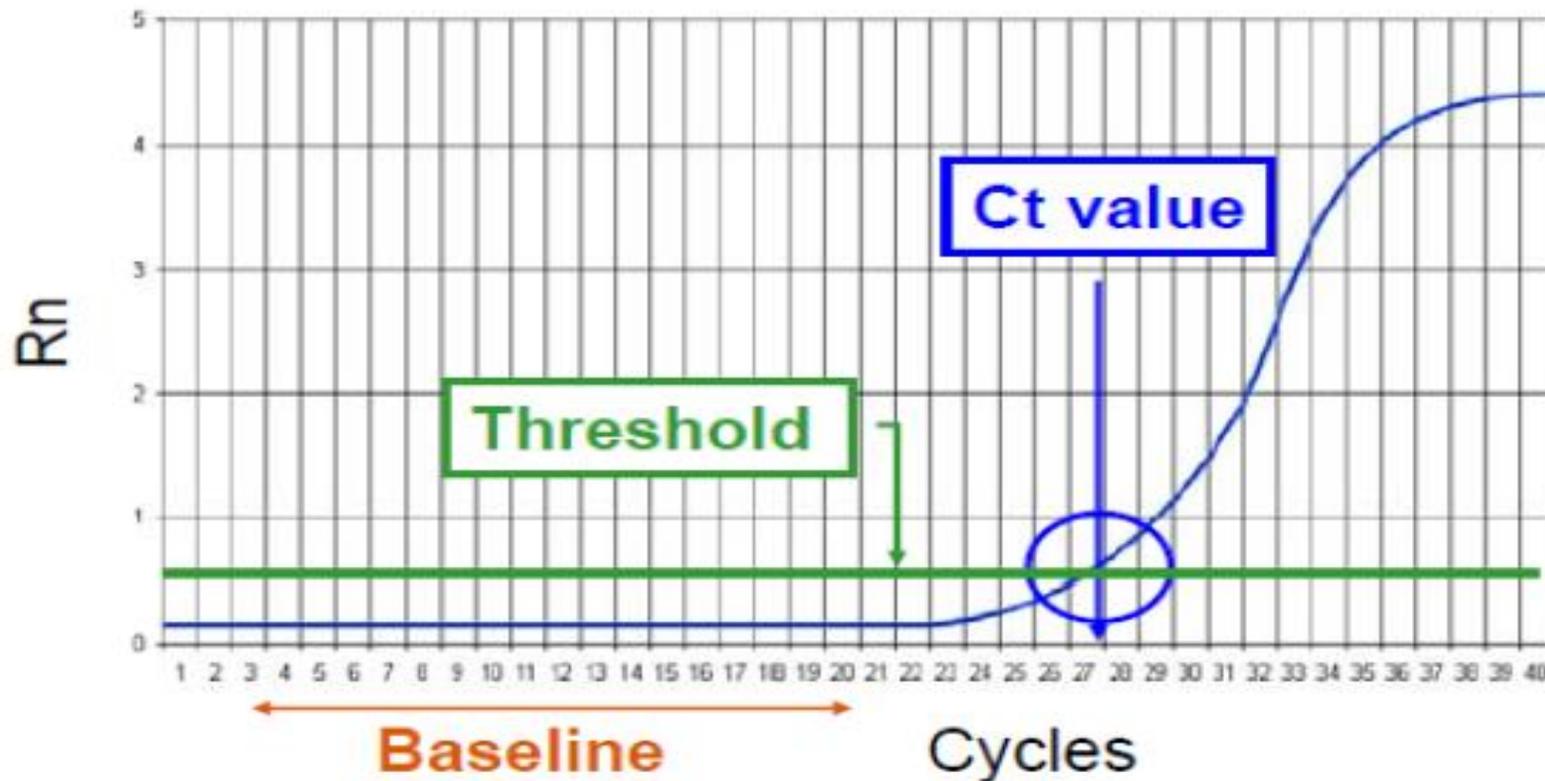


La detección y cuantificación se realiza en la fase exponencial del gráfico, donde la eficiencia es constante e igual al 100% (cinética de reacción 2^n)



De la fluorescencia a los resultados

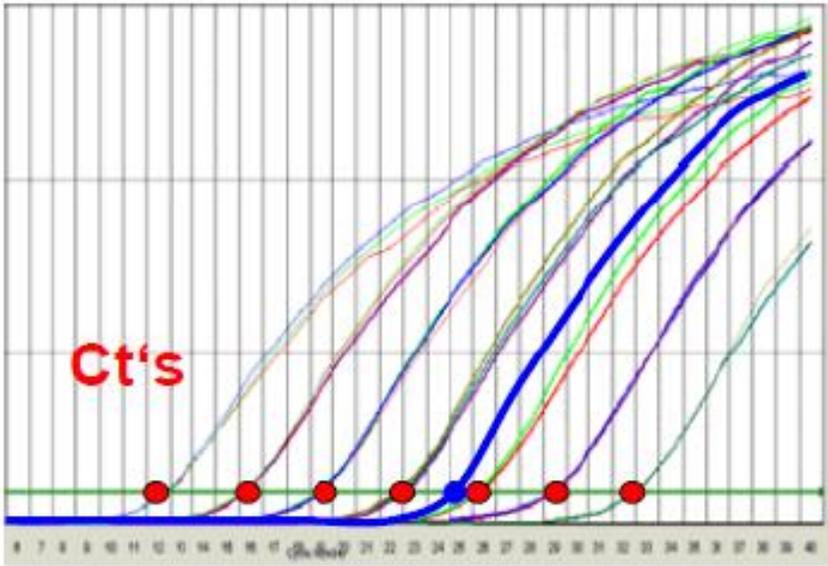
Paso 1. Determinar el valor de Ct



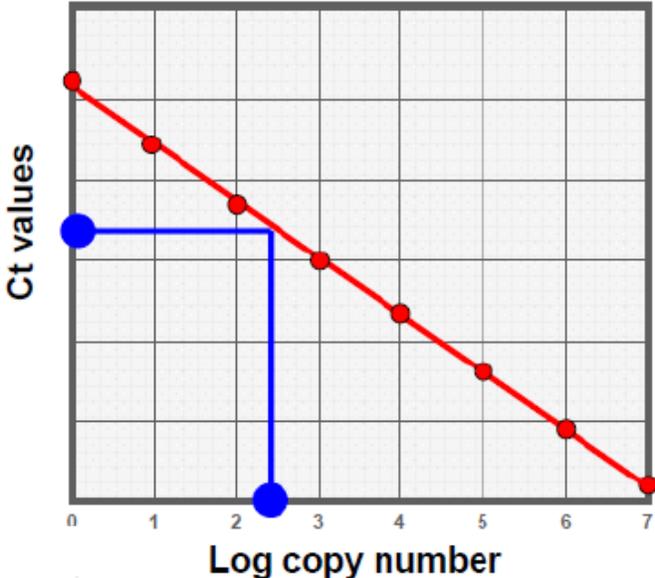
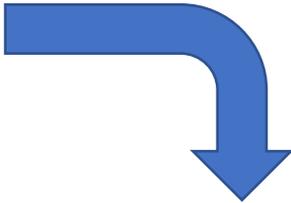
Para ello determinar el valor umbral y la línea de base

De la fluorescencia a los resultados

Paso 2. Comparación de los valores de Ct



Curva de calibración



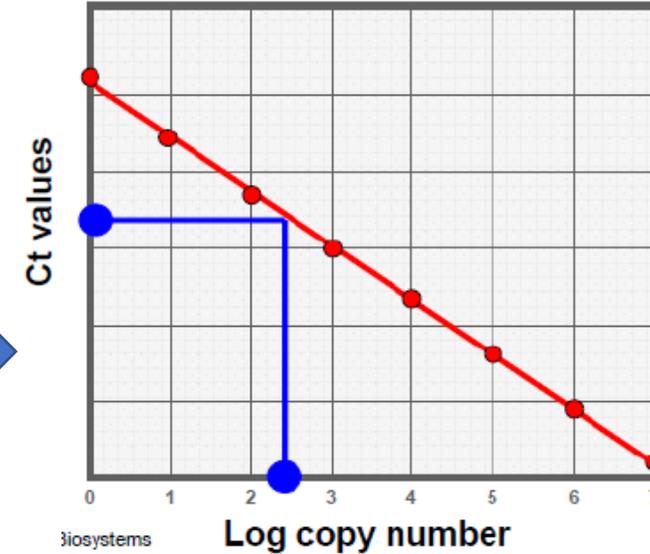
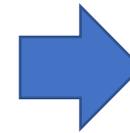
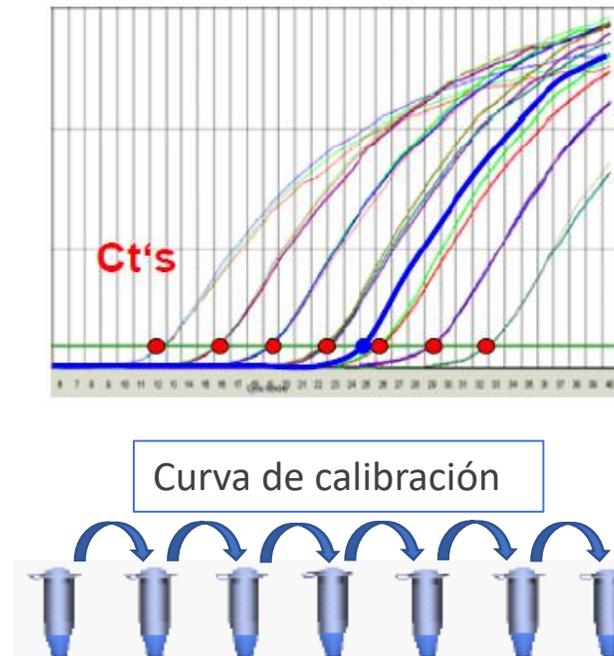
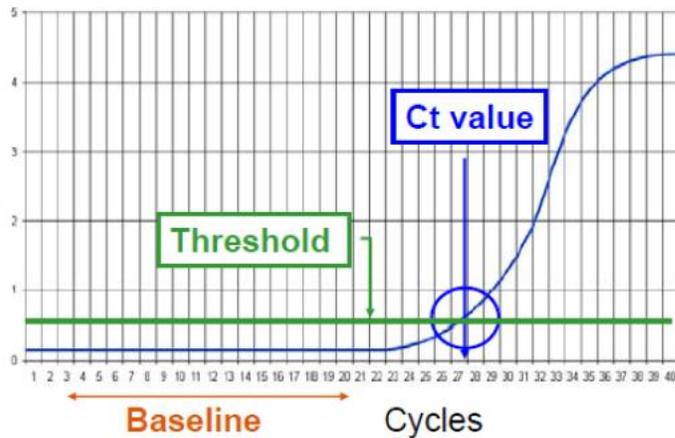
CUANTIFICACIÓN DE OGM

- ❖ El contenido de OGM se determina normalizando la cantidad de secuencias específicas del OGM con respecto a la cantidad de un gen específico de la planta (endógeno)
- ❖ Se realizan 2 curvas de calibración para realizar la cuantificación relativa
 - ❖ Gen endógeno:
 - Específico de especie
 - Presente en copia única
 - ❖ Secuencia GM
 - Región evento específica

$$\% \text{ GM} = \frac{\text{ADN GM}}{\text{ADN referencia}} \times 100$$

CUANTIFICACIÓN DE OGM

- Evento específico: se usan *primers* específicos para el evento que buscamos. Se hace curva de calibración con material de referencia del evento.



$$\% \text{ GM} = \frac{\text{n}^\circ \text{ copias GM}}{\text{n}^\circ \text{ copias endógeno}} \times 100$$

CONSIDERACIONES IMPORTANTES



ÁREA 1

Preparación de la mix
Dispensar mix
Set 1 de pipetas



ÁREA 2

Agregado de ADN
Sellado de placa
Set 2 de pipetas



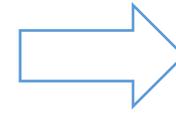
ÁREA 3

Corrida de PCR
Descarte de placa



MEDIDAS PARA EVITAR CONTAMINACIÓN

1. Organización del laboratorio y flujo de trabajo



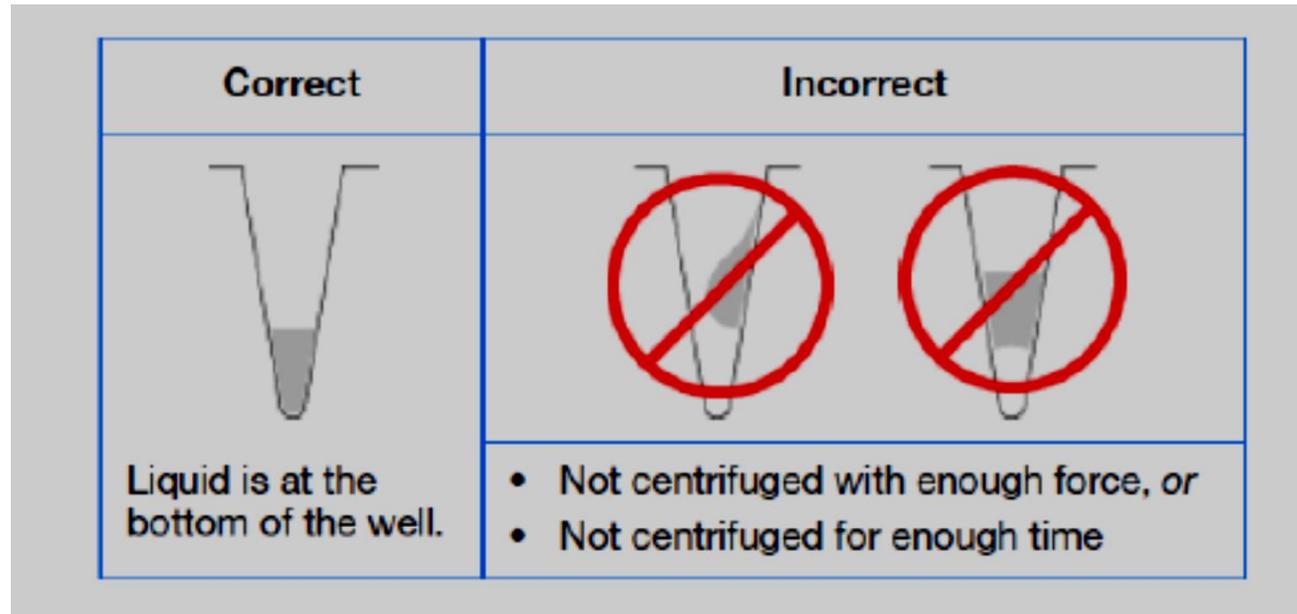
ÁREAS DE
TRABAJO
SEPARADAS

2. Buenas prácticas de laboratorio

- Descontaminar áreas de trabajo: EtOH 70%, hipoclorito 10%
- Uso de túnica y guantes sin talco Realizar alícuotas de los reactivos de PCR
- Usar tips con filtro para evitar aerosoles

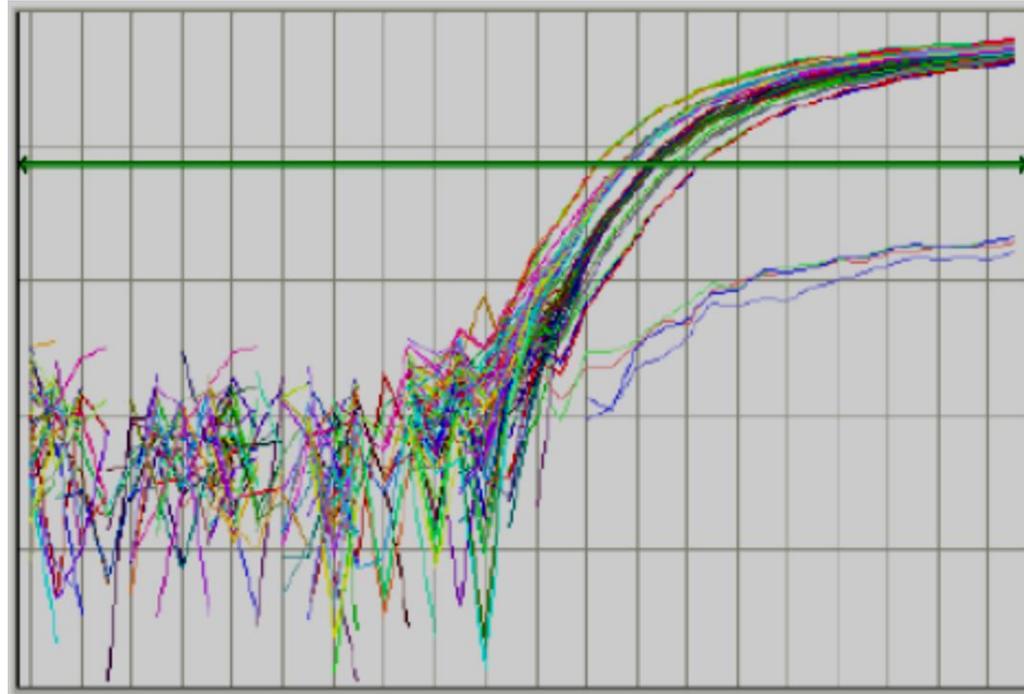
CONSIDERACIONES IMPORTANTES

- ❖ Correcta centrifugación de la mix de PCR, previo al ciclado en termociclador



CONSIDERACIONES IMPORTANTES

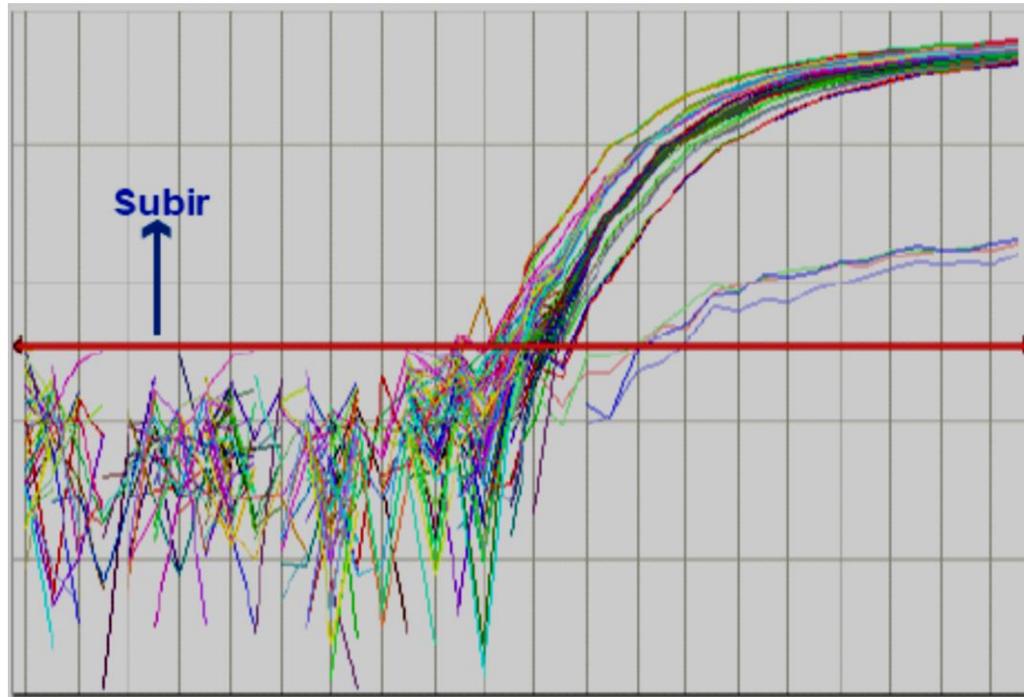
- ❖ Ajuste correcto del umbral o *treshold*



El umbral está colocado en la fase exponencial, por encima de ruido de fondo.

CONSIDERACIONES IMPORTANTES

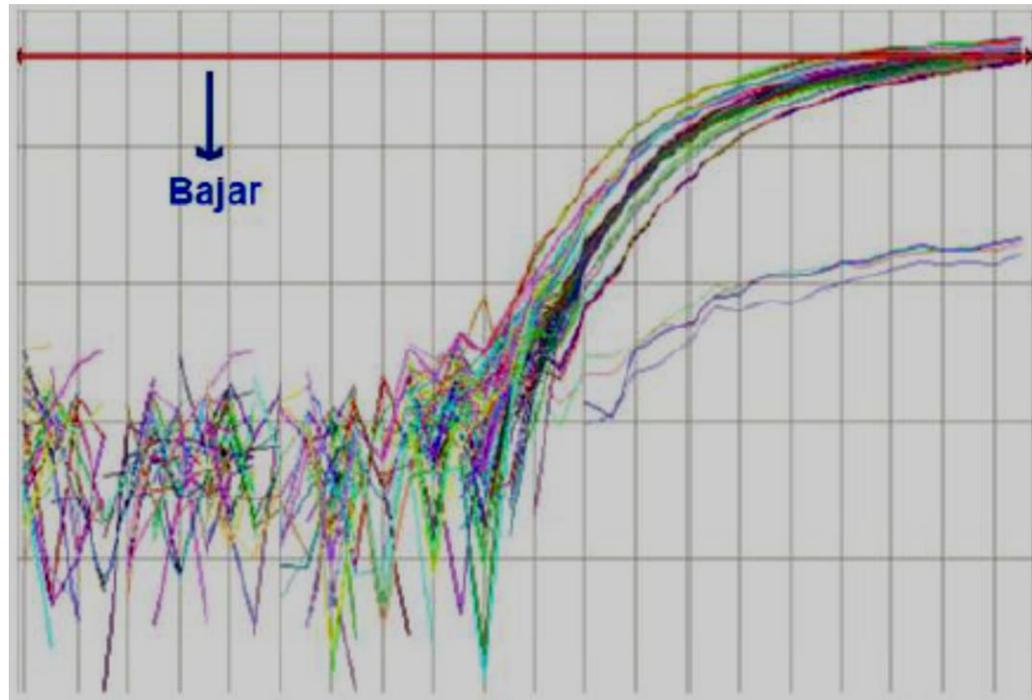
- ❖ Ajuste del umbral demasiado bajo



El umbral está colocado por debajo de la fase exponencial, por debajo del ruido de fondo.

CONSIDERACIONES IMPORTANTES

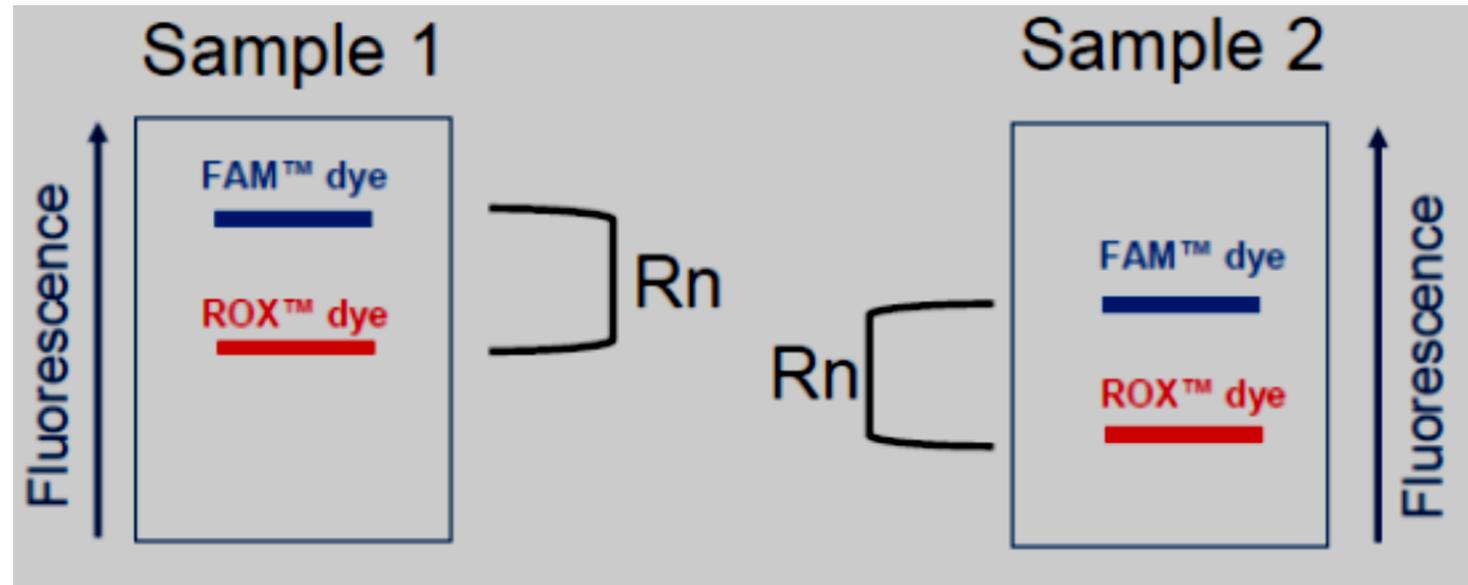
- ❖ Ajuste del umbral demasiado alto



El umbral está colocado por encima de la fase exponencial, en la fase de plateau

CONSIDERACIONES IMPORTANTES

- ❖ **Referencia pasiva (ROX):** Permite normalizar todas las señales de fluorescencia para comparar los resultados de muestras y controles internos



$$Rn = \frac{\text{Reporter}}{\text{Passive ref}}$$

ALGUNOS CONCEPTOS

❖ **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 requieren 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.

ALGUNOS CONCEPTOS

❖ **Rango dinámico**

Es el rango de concentraciones sobre el cual el método proporciona una correlación lineal entre la medición y la cantidad real del OGM blanco, con un nivel aceptable de veracidad y precisión.

❖ **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.

ALGUNOS CONCEPTOS

❖ **Coefficiente R²**

R² es el coeficiente de determinación, que se calcula como el cuadrado del coeficiente de correlación (entre el valor de Ct medido y el logaritmo en base 10 de la concentración) de una curva estándar obtenida por análisis de regresión lineal.

❖ **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:

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

ALGUNOS CONCEPTOS

❖ **Robustez**

La robustez de un método es la medida de su capacidad para no verse afectado por desviaciones pequeñas pero deliberadas de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento.

❖ **Exactitud o veracidad**

La proximidad entre el valor promedio obtenido de una serie de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. La medida de la veracidad generalmente se expresa en términos de sesgo (“bias”).

VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO VALIDADO POR RT-PCR

❖ Límite de detección (LOD)

Es la mínima cantidad de analito que puede ser detectado de manera confiable, pero no necesariamente cuantificado. Puede ser calculado en %OGM o en número de copias.

Para calcular el LOD de un método con un 95% de confianza, es necesario analizar 60 réplicas de PCR para cada concentración ensayada. Como no es un enfoque práctico, se calcula la tasa de falsos negativos en un número menor de réplicas. La tasa de falsos negativos debe ser $< 5\%$ (realizando 10 réplicas, todas deben ser positivas).

Criterio de aceptación: El LOD es el mínimo valor ensayado en el cuál las 10 réplicas son positivas.

VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO VALIDADO POR RT-PCR

❖ Límite de cuantificación (LOQ)

Es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada de manera confiable, con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

- Un control positivo de 0,1% puede ser analizado en 10 réplicas y el RSD debe ser $\leq 25\%$. Porcentajes menores deberían ser ensayados (depende de la decisión del laboratorio)