

ASSESSMENT OF DNA EXTRACTION METHODS FOR GMO ANALYSIS FOR GRAIN MONITORING IN MEXICO. PART II: QUANTIFICATION BY REAL-TIME PCR

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA EL ANÁLISIS DE OGM EN EL MONITOREO DE GRANOS EN MÉXICO. PARTE II: CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

Abraham Acatzi¹, Amanda Galvez¹, Javier Plasencia², Maricarmen Quirasco^{1*}

¹Department of Food and Biotechnology. Faculty of Chemistry. National Autonomous University of Mexico. 04510. Mexico City, Mexico. (quirabma@unam.mx). ²Department of Biochemistry. Faculty of Chemistry. National Autonomous University of Mexico. 04510. Mexico City, Mexico.

ABSTRACT

Because of their specificity and high throughput, real-time PCR-based methods are suitable for the monitoring of genetically modified (GM) organisms at field level or in the grain trade, in order to comply with federal regulations on biosafety. In the first part of this study, DNA extracted from different maize (*Zea mays* L.) tissues using several commercial purification protocols available in Mexico were evaluated in terms of DNA quality as substrates for end-point PCR. In this second part, DNA preparations obtained from grain, by means of the same commercial protocols, were tested in quantitative PCR (qPCR), using TaqMan and SYBR Green protocols. Linear dynamic range, amplification efficiency and method accuracy were assessed using recommended qPCR criteria for validation purposes. Results showed that the chemical complexity of plant tissues, such as grains, require an efficient purification protocol for consistent and reliable PCR quantification. The ratio $A_{260/280}$ and DNA visualization in agarose gels are recommended as preliminary—but not exclusive—criteria of DNA quality because DNA amplification capability is not evinced with these procedures. Two of the methods tested yielded good-quality DNA as revealed by the linear dynamic range analysis. The third method analyzed rendered inaccurate results due to the presence of grain endogenous PCR inhibitors that did not allow a proper DNA quantification. As conclusion, TaqMan chemistry showed to be more sensitive to the presence of impurities than SYBR Green, even though amplification could be achieved in the latter, quantification may not be

RESUMEN

Por su especificidad y alta capacidad de procesamiento, los métodos basados en PCR en tiempo real son adecuados para el monitoreo de los organismos genéticamente modificados (GM) en el campo o en el comercio de granos, para cumplir con las regulaciones federales sobre bioseguridad. En la primera parte de este estudio, el ADN extraído de diferentes tejidos de maíz (*Zea mays* L.) mediante varios protocolos de purificación comerciales disponibles en México, se evaluó en términos de calidad como sustrato molde para PCR en punto final. En esta segunda parte, las preparaciones de ADN obtenidas de granos, por medio de los mismos protocolos comerciales, se probaron en PCR cuantitativa (qPCR) usando las técnicas TaqMan y SYBR Green. El rango dinámico lineal, la eficiencia de amplificación y la precisión se evaluaron usando criterios qPCR recomendados para validación. Los resultados mostraron que la complejidad química de los tejidos vegetales, como los granos, requiere un protocolo de purificación eficaz para la cuantificación consistente y confiable por PCR. La relación $A_{260/280}$ y el análisis del ADN en geles de agarosa se recomiendan como criterios preliminares—buto no exclusivos—de la calidad del ADN porque la capacidad de amplificación del ADN no se evidencia con estos procedimientos. Dos de los métodos probados produjeron ADN de buena calidad como lo revela el análisis de rango dinámico lineal. El tercer método analizado dio resultados inexactos debido a la presencia de inhibidores de la PCR endógenos de los granos que impidieron una cuantificación adecuada del ADN. Como conclusión, la química TaqMan mostró ser más susceptible a la presencia de impurezas que SYBR Green, a pesar de que la amplificación podría lograrse con esta última, la cuantificación puede ser inexacta. Las membranas de unión al ADN de sílica

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: December, 2012. Approved: November, 2013.

Published as ARTICLE in Agrociencia 48: 35-52. 2014.

accurate. Silica DNA-binding membranes yield the most suitable DNA preparations for PCR quantification of GM maize grains.

Keywords: quantitative PCR, PCR inhibition, GM maize, genetically modified organism (GMO), DNA quality.

INTRODUCTION

Mexico is the second maize (*Zea mays* L.) importer from the USA where transgenic maize hybrids occupy about 27×10^6 ha (GMO Compass, 2010; U.S. Grains Council, 2013). Yellow maize imported from the USA is used for food, feed and processing purposes, but escapes and misuse of this grain in maize-producing regions might constitute an environmental risk. Another potential source of genetically modified (GM) sequences in Mexican fields is grain brought from USA farms by migrant workers. In such cases, gene flow may occur if farmers use this grain as seed, because seed exchange in local communities affects the evolution of farmer's varieties (landraces) in Mexico (CEC Report, 2004; Cleveland *et al.*, 2005). Moreover, since 2009, Mexico has authorized the experimental and pilot field trials for various GM maize varieties (CIBIOGEM, 2012a). Considering that these trials are performed in facilities with containment measures, gene flow from biotech hybrids into native open-pollinated landraces is expected to be a low frequency event; nevertheless, it is an issue of environmental concern. Therefore, molecular methods to trace transgenic events in the field must include GM sequence quantification using highly sensitive, specific and reliable methods, such as quantitative real-time PCR (qPCR). Mexico, as a Party of the Cartagena Protocol, is legally bound to comply with international regulations such as labeling and identification of living modified organisms in intentional trans-boundary movements of grains (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000). In Europe or Japan, laws enforce labeling and identification of imports when GM levels are higher than 0.9 and 5 %, respectively. Therefore, those imports are carefully verified to avoid labeling and possible rejection from the public. For these purposes, specific detection of very low levels of GM sequences must be achieved (Anklam *et al.*, 2002).

In order to respond to this situation, Mexican government agencies face the challenge of

generaron las preparaciones de ADN más adecuadas para la cuantificación por PCR de los granos de maíz GM.

Palabras clave: PCR cuantitativa, inhibición de PCR, maíz GM, organismos genéticamente modificados (OGM), calidad de ADN.

INTRODUCCIÓN

México es el segundo importador de maíz (*Zea mays* L.) desde los EE.UU., donde los híbridos de maíz transgénico ocupan alrededor de 27×10^6 ha (GMO Compass, 2010; USA Grains Council, 2013). El maíz amarillo importado de los EE.UU. se usa en alimentos, piensos y con fines de procesamiento, pero los escapes y mal uso de este grano en las regiones productoras de maíz podría constituir un riesgo ambiental. Otra fuente potencial de secuencias modificadas genéticamente (GM) en campos mexicanos es el grano traído de granjas de EE.UU. por los trabajadores migrantes. En tales casos, el flujo de genes puede ocurrir si los agricultores usan este grano como semilla, ya que el intercambio de semillas en comunidades rurales afecta la evolución de las variedades nativas en México (CEC Report, 2004; Cleveland *et al.*, 2005). Además, desde 2009, México ha autorizado pruebas de campo experimentales y piloto para diversas variedades de maíz GM (CIBIOGEM, 2012a). Considerando que estas pruebas se realizan en instalaciones con medidas de contención, se espera que el flujo de genes de los híbridos transgénicos a las variedades nativas de polinización abierta sea un evento de baja frecuencia, pero es un tema de preocupación ambiental. Por tanto, los métodos moleculares para rastrear eventos transgénicos en el campo deben incluir cuantificación por secuencia GM usando métodos altamente sensibles, específicos y confiables, como el cuantitativo PCR en tiempo real (qPCR). México, como Parte del Protocolo de Cartagena, está legalmente obligado a cumplir con regulaciones internacionales, como el etiquetado e identificación de organismos vivos modificados en movimientos transfronterizos intencionales de granos (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000). En Europa o Japón, las leyes imponen el etiquetado y la identificación de las importaciones cuando los niveles GM son superiores a 0.9 y 5 %, respectivamente. Por tanto, estas importaciones se verifican cuidadosamente para evitar el etiquetado y el posible rechazo por el público. Para

implementing the monitoring of grain in trading, for the detection as well as the quantification of GM-related sequences (Mexican Biosafety Law, 2005; Mexican Regulation on the Biosafety Law, 2009; CIBIOGEM, 2012b). Inspection for quantification purposes is usually made in grains in field surveys as well as in grain shipments. Therefore, the aim of this investigation was to test different DNA extraction methods, commercially available in Mexico, using grains as testing material, in order to further verify the DNA extract performance in qPCR analysis, with TaqMan and SYBR Green chemistries. In the first part of this study, the performance of several DNA extraction methods was assessed by end-point PCR. The objective of the second part of this study was to assess the impact of DNA quality on qPCR analyses, considering that quantification of low concentrations of GM sequences in grain is necessary. These results are to be shared with the Mexican Network for GMO Monitoring (CIBIOGEM, 2012b).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

GM reference material, MON810 and Bt11 GM hybrid maize varieties, were provided by Genetic ID NA, Inc. (Fairfield, IA, USA). Non-GM grain from an open-pollinated white corn (Chalqueño landrace) was obtained from a local grower in Chalco, Mexico. GM grains were ground separately in a high-speed blender to obtain a <1 mm particle size and were mixed thoroughly with ground non-transgenic white corn grain at different ratios to obtain blends containing 10 %, 1 % and 0.1 % (w/w) of transgenic material.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from Chalqueño, MON810 and Bt11 grains by triplicate, using three commercial methods: 1) Fast DNA[®] kit (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA), 2) DNeasy plant kit (Qiagen, Inc. Germantown, MD, USA), and 3) Fast DNA extraction kit (Genetic ID NA, Inc. Fairfield, IA, USA). For all kits, manufacturer instructions were followed. The other DNA extraction methods analyzed in the previous part of this study, namely DNAzol[®] and Easy-DNA[™], both from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), were not assayed for qPCR because they did not yield good-quality DNA for amplification purposes, as evaluated by end-point PCR.

estos propósitos, se debe lograr la detección específica y cuantitativa de niveles muy bajos de secuencias GM (Anklam *et al.*, 2002).

Para responder a esta situación, las agencias gubernamentales mexicanas enfrentan el reto de implementar el monitoreo de granos en el comercio para la detección y la cuantificación de secuencias GM (Mexican Biosafety Law, 2005; Mexican Regulation on the Biosafety Law, 2009; CIBIOGEM, 2012b). La inspección cuantitativa se hace generalmente en granos en los estudios de campo, así como en los cargamentos de granos. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue probar diversos métodos de extracción de ADN, disponibles comercialmente en México, usando granos como material de prueba para verificar más la respuesta de extracción de ADN en análisis por qPCR, con las químicas de TaqMan y SYBR Green. En la primera parte de este estudio se evaluó por PCR punto final el desempeño de varios métodos de extracción de ADN. Debido a que es necesaria la cuantificación de bajas concentraciones de secuencias GM, el objetivo de la segunda parte de este estudio fue evaluar el impacto de la calidad del ADN en los análisis por qPCR. Estos resultados se compartirán con la Red Mexicana de Monitoreo de OGM (CIBIOGEM, 2012b).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material GM de referencia, variedades de maíz híbrido GM MON810 y Bt11, fueron proporcionados por Genetic ID NA, Inc. (Fairfield, IA, USA). Los granos no GM de un maíz blanco de polinización abierta (Chalqueño nativo) se obtuvieron de un productor de Chalco, México. Los granos GM se molieron por separado en un mezclador de alta velocidad para obtener un tamaño de partícula <1 mm y se mezclaron completamente con granos molidos de maíz blanco no transgénico en diferentes proporciones para obtener mezclas que contenían 10 %, 1 % y 0.1 % (p/p) de material transgénico.

Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de granos Chalqueño, MON810 y Bt11 por triplicado, usando tres métodos comerciales: 1) Kit Fast DNA (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA), Kit DNeasy para planta (Qiagen, Inc. Germantown, MD, USA), y 3) Kit Fast DNA (Genetic ID NA, Inc. Fairfield, IA, USA).

Spectrophotometric and electrophoretic analyses of genomic DNA

A UV scan from 200 to 380 nm was performed for DNA extractions using a Shimadzu UV160U UV/visible spectrophotometer. Genomic DNA concentration was estimated, considering that a value of A_{260} of 1.00 corresponds to 50 ng μL^{-1} of double-stranded DNA (Sambrook and Russell, 2001). Genomic DNA samples (approximately 125 ng lane⁻¹) were resolved by horizontal gel electrophoresis in 0.8 % agarose gels in 1X Tris-Acetate-EDTA buffer. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and photographed under UV light.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Quantification of target DNA was performed on an ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). DNA target sequences for primer and probe design were retrieved from the Joint Research Centre — European Commission data base (JRC-EC) (Bonfini *et al.*, 2007). Unless otherwise stated, oligonucleotides and TaqMan probes were ordered as customized assays at Applied Biosystems, Life Technologies (ABI, Foster City, CA, USA), which uses proprietary algorithms that generate primers-probe designs for qPCR applications. The 20 μL reaction volume contained 10 μL of TaqMan® Universal PCR Master Mix or SYBR Green PCR Master Mix (ABI, *ibid*), both with ROX as internal standard for data normalization. The concentrations of probe and primers were adjusted to 0.2 and 0.8 μM , respectively, in order to maintain a 1 to 4 ratio per reaction. For SYBR Green reactions, primers were adjusted to 0.35 μM . The housekeeping gene starch synthase (*zSSIIb*) was used as target endogenous gene for amplification with TaqMan chemistry, as used in certified methods by JRC-EC. For the construct-specific detection of MON810, the forward primer (ST2 F) corresponds to the 3'-end of the *hsp70* intron, the reverse one (ST2 R) to the *cryIA* gene, whereas the FAM-tagged probe corresponds to the junction between both genes. As for the Bt11 construct-specific set, the forward primer (ST1 F) corresponds to the enhancer element of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene (*adh1*), the reverse one to the phosphinothricin N-acetyl transferase gene (*pat*), and the FAM-tagged probe to the junction of both transgenic sequences. As for SYBR Green chemistry, invertase was used as the endogenous gene; construct specific primers M810 2-5' and M810 2-3', and IVS2-2 and PAT-B, were used for the amplification of MON810 and Bt11 events, respectively, as established by the JRC-EC methods (Bonfini *et al.*, 2007). Cycle conditions for TaqMan were: 2 min at 50 °C, followed

Para todos los kits se siguieron las instrucciones del fabricante. Los otros métodos de extracción de ADN analizados en la primera parte de este estudio, específicamente DNAzol® y Easy-DNA™, ambos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), no fueron probados para qPCR porque no produjeron ADN de buena calidad para fines de amplificación, como se evaluó por PCR punto final.

Análisis espectrofotométrico y electroforético del ADN genómico

Para las extracciones de ADN se realizó un barrido UV de 200 a 380 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV160U UV/visible. La concentración de ADN genómico se estimó considerando que un valor de A_{260} de 1.00 corresponde a 50 ng μL^{-1} de ADN de doble cadena (Sambrook y Russell, 2001). Las muestras de ADN genómico (aproximadamente 125 ng carril⁻¹) se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8 % en amortiguador 1X Tris-acetato-EDTA. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se fotografiaron bajo luz UV.

PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

La cuantificación del ADN blanco se realizó en un equipo ABI 7500 de PCR en tiempo real (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). Las secuencias de ADN blanco para el diseño de iniciadores y sonda se obtuvieron de la base de datos del Centro de Investigación Conjunta — Comisión Europea (JRC-EC) (Bonfini *et al.*, 2007). A menos que se indique lo contrario, los oligonucleótidos y sondas TaqMan se ordenaron como ensayos personalizados en Applied Biosystems, Life Technologies (ABI, Foster City, CA, EE.UU.), que usa algoritmos propios que generan diseños de iniciadores y sondas para aplicaciones de qPCR. Los 20 μL de volumen de reacción contenían 10 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix o SYBR Green PCR Master Mix (ABI, *ibid*), ambos con ROX como estándar interno para la normalización de datos. Las concentraciones de sonda e iniciadores se ajustaron a 0.2 y 0.8 μM , respectivamente, para mantener una relación de 1 a 4 por reacción. Para reacciones SYBR Green, los iniciadores se ajustaron a 0.35 μM . El gen de mantenimiento almidón sintasa (*zSSIIb*) se usó como gen endógeno blanco para la amplificación con química TaqMan, como se usa en los métodos certificados por JRC-EC. Para la detección construcción-específica de MON810, el iniciador directo (ST2 F) corresponde al extremo 3' del intrón *hsp70*, el reverso (ST2 R) para el gen *cryIA*, mientras que la sonda marcada con FAM corresponde a la unión entre ambos genes. Para la detección construcción-específica de Bt11, el iniciador directo (ST1 F) corresponde

by 10 min at 95 °C, and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. And for SYBR Green were: 2 min at 50 °C, followed by 10 min at 95 °C, and 40 cycles at 94 °C for 40 s, 60 °C for 45 s and 72 °C for 40 s. Non-template controls were included in each plate and all samples were run in triplicate.

The inhibition tests were run in duplicate, TaqMan and SYBR Green chemistries were used on genomic DNA obtained from a 100 % MON810 and Bt11 reference materials. Calibration curves were constructed by making a two-fold dilution series ranging from 20 to 0.156 ng of genomic DNA. Amplification efficiency was calculated with the following equation, considering the slope (m) of the inhibition curve:

$$\text{Efficiency} = \left[10^{(-1/m)} \right] - 1 \times 100$$

Dynamic linear range was evaluated by amplification with the event-specific primers and probe of 10-fold diluted DNA samples to construct a standard curve. In order to study the effect of DNA quality preparations on quantification, 40 ng of genomic DNA per reaction was used. DNA was obtained from

al elemento potenciador del gen de alcohol deshidrogenasa 1 (*adh1*) de maíz, el reverso para el gen de fosfinotricina N-acetil transferasa (*pat*), y la sonda marcada FAM a la unión de las dos secuencias transgénicas. Para la química SYBR Green se usó invertasa como el gen endógeno; se emplearon los iniciadores construcción-específicos M810 2-5' y M810 2-3', e IVS2-2 y PAT-B, para la amplificación de eventos MON810 y Bt11, respectivamente, según lo establecido por los métodos del JRC-EC (Bonfini *et al.*, 2007). Las condiciones de ciclo para TaqMan fueron: 2 min a 50 °C, seguido por 10 min a 95 °C, y 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Para SYBR Green fueron: 2 min a 50 °C, seguido por 10 min a 95 °C, y 40 ciclos a 94 °C por 40 s, 60 °C por 45 s y 72 °C por 40 s. Testigos sin ADN molde se incluyeron en cada placa y todas las muestras se corrieron por triplicado.

Las pruebas de inhibición se corrieron por duplicado, se usaron las químicas de TaqMan y SYBR Green con el ADN genómico obtenido de materiales de referencia al 100 % MON810 y Bt11. Las curvas de calibración se construyeron haciendo una serie de diluciones a la mitad que variaban desde 0.156 ng hasta 20 ng de ADN genómico. La eficiencia de

Table 1. PCR primers used for amplification of specific DNA sequences.

Tabla 1. Iniciadores PCR usados para la amplificación de secuencias específicas de ADN.

Target	Name	5' – 3' sequence	Amplicon size (bp)	Reference
TaqMan primers and probes				
Bt11 construct – specific (<i>adh1/pat</i>)	ST1 F	gggCagACTCCCCgTgTTC	75	This study
	ST1 R	CTgTAgCTggCCTAATCTCAACTg		
	ST1 M1	FAM-CTCggATCTCgACATgTC-TAMRA		
MON810 construct –specific (<i>hsp70/cry1A</i>)	ST2 F	AgTgTTACTCACATAgTCTTTgCTCATT	84	This study
	ST2 R	CACTCgTTgATgTTTgggTTgT		
	ST2 M1	FAM-CAAgCggCCATggACA-TAMRA		
<i>Zea mays</i> starch synthase IIb (<i>zSSIIb</i>) gene	GE F	CATCAgCTCCTgTCACCAAgAg	58	This study
	GE R	gCgggCTCTggCTTCA		
	GE M2	FAM-ACTggCATCgATTTCT-TAMRA		
SYBR Green primers				
Bt11 construct – specific (<i>adh1/pat</i>)	IVS2-2 Fw	CTgggAggCCAAggTATCTAAT	189	Bonfini <i>et al.</i> , 2007
	PAT-B Rev	GCTgCTgTAgCTggCCTAATCT		
MON810 construct – specific (<i>hsp70/cry1A</i>)	M810 2-5'	gATgCCTTCTCCCTAgTgTTgA	113	Bonfini <i>et al.</i> , 2007
	M810 2-3'	ggATgCACTCgTTgATgTTTg		
Invertase (<i>ivr1</i>) gene	IVR1-F	CCgCTgTATCACAaggCTggTACC	225	Bonfini <i>et al.</i> , 2007
	IVR1-R	ggAgCCCgTgTAgAgCATgACgATC		

grain blends containing 10, 1 and 0.1 % (w/w) MON810. GMO concentration, expressed as percentage (w/w), was calculated with the following equation:

$$\text{Percentage GMO} = (\text{ng transgene}) \times (\text{ng endogenous gene})^{-1} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

DNA purity and integrity

In GMO detection by means of PCR, the performance of the DNA extraction method in a given matrix is of crucial importance, due to the fact that the quality of the DNA obtained may significantly affect the final result. DNA integrity, as well as the presence of co-purified inhibitors from the matrix or the extraction reagents can reduce the amplification efficiency, by interacting with the DNA template, or by interfering with the DNA polymerase activity (Gryson, 2010; ENGL, 2011). In the first part of this study, genomic DNA was extracted from various maize tissues (*e.g.* leaves, grains, pollen) using five different commercial purification kits available in Mexico, and DNA suitability for amplification was assessed by end-point PCR. The methods including DNA binding to a silica-based membrane followed by several washing steps in the purification protocol (methods 2 and 3), showed to be more efficient to eliminate PCR inhibitors such as polyphenolic and phenolic compounds from green leaf tissues, as well as polysaccharides, in the case of grains. Such plant compounds exert their inhibitory activity through the formation of complexes with DNA strands thus hindering DNA amplification (ENGL, 2011). These results indicated that a high DNA extraction yield does not reflect its amplification quality. For the analysis by means of qPCR, besides testing DNA extraction methods 2 and 3, method 1 was also evaluated, considering that the quality of DNA was sufficient to render reliable amplification for the case of grain tissue. Quirasco *et al.* (2004) applied method 3 to quantify CBH351 Starlink corn in highly processed Mexican corn-based foods ranging from alkaline-cooked corn (nixtamal) to cooked and deep-fried tortillas; a progressive degradation of genomic DNA during processing was observed, but GMO was detected by qPCR up to 0.1% (w/w) in most products.

amplificación se calculó considerando la pendiente (m) de la curva de inhibición:

$$\text{Eficiencia} = [0^{(-1/m)}] - 1 \times 100$$

El rango dinámico lineal se evaluó mediante la amplificación con los iniciadores y sonda evento específicos en muestras de ADN en diluciones decimales. Para estudiar el efecto de la calidad de las preparaciones de ADN sobre la cuantificación, se usaron 40 ng de ADN genómico por reacción. El ADN se obtuvo de mezclas de granos que contenían MON810 al 10, 1 y 0.1 % (p/p). La concentración de OGM, expresada como porcentaje (p/p), se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje OGM} = (\text{ng transgen}) \times (\text{ng gen endógeno})^{-1} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pureza e integridad de ADN

El desempeño del método de extracción de ADN de una matriz dada es de crucial importancia en la detección de OGM por medio de PCR, debido a que la calidad del ADN obtenido puede afectar significativamente el resultado final. La integridad del ADN, así como la presencia de inhibidores copurificados de la matriz o los reactivos de extracción pueden reducir la eficiencia de la amplificación, mediante la interacción con el ADN molde, o al interferir con la actividad de la ADN polimerasa (Gryson, 2010; ENGL, 2011). En la primera parte de este estudio se extrajo ADN genómico a partir de diversos tejidos de maíz (por ejemplo, hojas, granos, polen) con cinco diferentes kits comerciales de purificación disponibles en México, y la idoneidad del ADN para la amplificación se evaluó por PCR punto final. Los métodos que involucran en el protocolo de la purificación la unión del ADN a una membrana sílica y lavados subsiguientes (métodos 2 y 3) fueron los más eficientes para eliminar inhibidores de PCR, como fenoles y polifenoles en los tejidos de hoja verde, así como polisacáridos en los granos. Tales compuestos vegetales ejercen su actividad inhibidora a través de la formación de complejos con cadenas de ADN, lo que dificulta su amplificación (ENGL, 2011). Los resultados del presente estudio indican que un rendimiento alto de extracción de ADN no refleja su calidad de

The other DNA extraction methods analyzed in the first part of this study were not assayed for qPCR because end-point PCR results showed that they did not yield amplifiable DNA. As for DNA quality evaluated by UV absorbance, the ratios of $A_{260/280}$ were 2.1 ± 0.02 , 4.0 ± 0.72 and 1.77 ± 0.03 , for methods 1, 2 and 3, respectively. The absorbance scan from 200 to 380 nm for each DNA preparation is shown in Figure 1. It is noticeable that DNA preparation obtained with method 1 rendered DNA with impurities that absorb at 230 nm, which could come from residual compounds in the extraction buffer, such as EDTA or guanidine-HCl or both (Demeke and Jenkins, 2010). The DNA ratio $A_{260/280}$ is not an absolute criterion of DNA purity because DNA rendered with method 2 showed a value that indicated a low purity preparation, which

amplificación. Para el análisis por medio de qPCR, además de probar los métodos de extracción 2 y 3, también se probó el método 1, considerando que la calidad del ADN fue suficiente para dar una amplificación confiable para el tejido de grano. Quirasco *et al.* (2004) aplicaron el método 3 para cuantificar el maíz Starlink CBH351 en alimentos mexicanos altamente procesados elaborados a base de maíz, desde el maíz cocido en condiciones alcalinas (nixtamal) hasta tortillas cocidas y fritas; se observó una degradación progresiva de ADN genómico durante el procesamiento, pero se detectó OGM por qPCR hasta un 0.1 % (p/p) en la mayoría de los productos.

Los otros métodos de extracción de ADN analizados en la primera parte de este estudio no se probaron en qPCR porque los resultados de la PCR punto final mostraron que no produjeron ADN

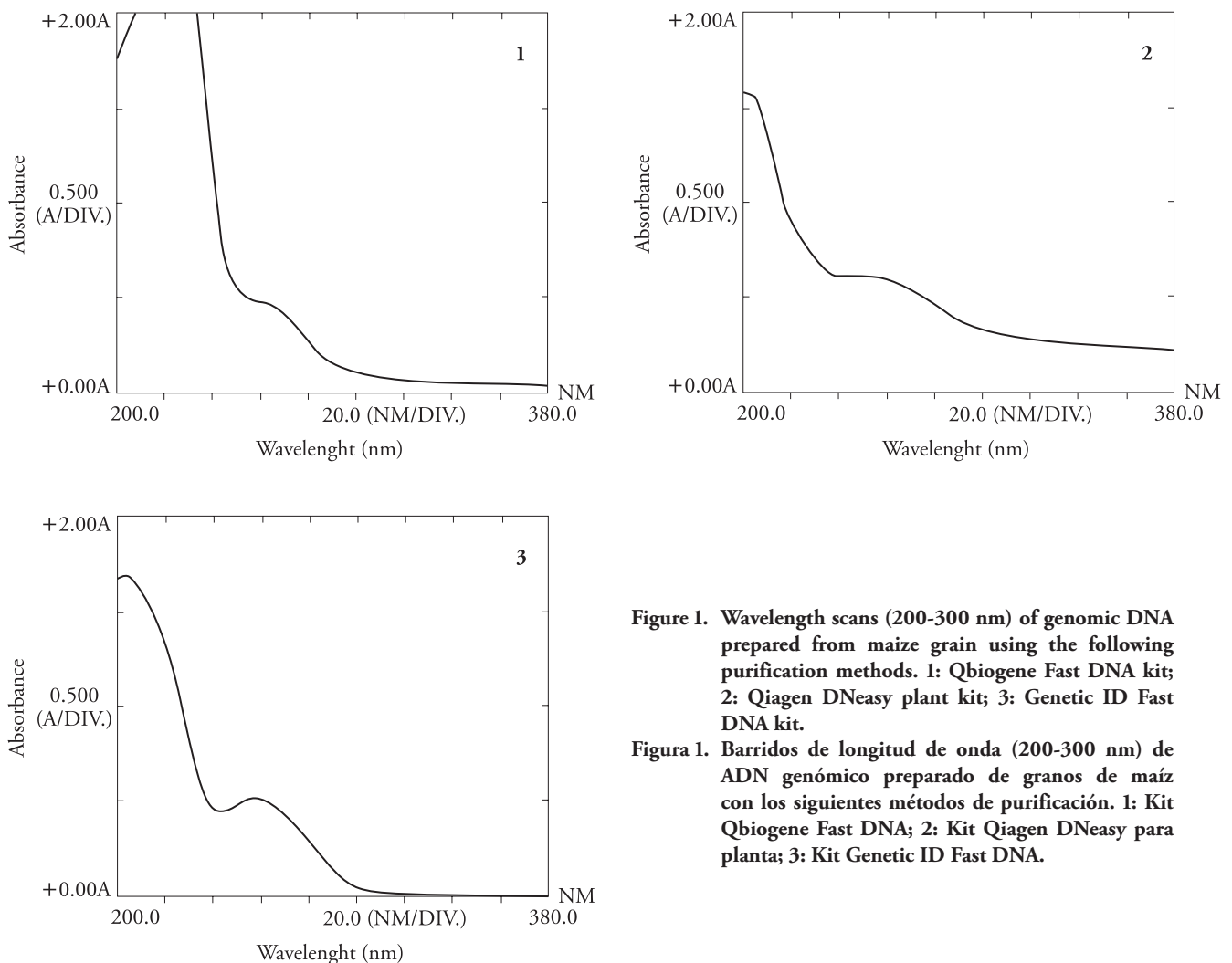


Figure 1. Wavelength scans (200-300 nm) of genomic DNA prepared from maize grain using the following purification methods. 1: Qbiogene Fast DNA kit; 2: Qiagen DNeasy plant kit; 3: Genetic ID Fast DNA kit.

Figura 1. Barridos de longitud de onda (200-300 nm) de ADN genómico preparado de granos de maíz con los siguientes métodos de purificación. 1: Kit Qbiogene Fast DNA; 2: Kit Qiagen DNeasy para planta; 3: Kit Genetic ID Fast DNA.

does not correspond to results obtained by means of end-point PCR. The electrophoretic pattern of this preparation (data not showed) presented some degradation, and this could cause a hyperchromic effect at 260 nm (mainly due to single-stranded DNA and shorter oligonucleotides) that in turn contributes to overestimate DNA concentration (Demeke and Jenkins, 2010). For quality of the DNA obtained with method 3, $A_{260/280}$ is just below the expected values, 1.9 to 2.0. However, the absorbance scan showed the optimal shape with a maximum at 260 and an inflection point around 230 nm, which corresponds to a ratio $A_{260/230}$ of 1.0. DNA obtained with kits 2 and 3, rendered the best proficiency in end-point PCR (data not showed). The assessment of the performance of DNA extraction protocols is a continuous process because methods applied to one matrix may not be suitable for others. Experimental approaches similar to the present study were used to test corn products, such as starch and extruded products, and other crops and foods, like soybean and derived products, including protein isolates, soybean based drinks and tofu (Murray *et al.*, 2007; Smith and Maxwell, 2007; Mafra *et al.*, 2008). Besides testing commercial kits, like the ones used in this study, those authors evaluated the CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) method. Their results indicate that the latter is particularly useful to extract good quality DNA for PCR from highly processed food, although it rendered low yields. Besides, for the extraction of DNA from grains, methods like those based on DNA binding to resins, membranes or magnetic particles are less laborious and time consuming, and render good amplification quality DNA. Practicability is one of the method acceptance criteria to be considered, especially, in regard to the high throughput needed (ENGL, 2008).

DNA as substrate for quantitative real-time PCR amplification: inhibition tests

Quantitative PCR relies on the ability of an efficient amplification, which means that the reaction should be performed in the absence of inhibitory molecules and that it should be specific enough in order to avoid the generation of fluorescence from non-target DNA templates. In order to assess DNA

amplificable. Para la calidad del ADN evaluada por absorbancia UV, las relaciones de $A_{260/280}$ fueron 2.1 ± 0.02 , 4.0 ± 0.72 y 1.77 ± 0.03 , para los métodos 1, 2 y 3, respectivamente. El barrido de la absorbancia de 200 a 380 nm para cada preparación de ADN se muestra en la Figura 1. Es notable que la preparación de ADN obtenida con el método 1 proporcionó ADN con impurezas que absorben a 230 nm, lo que podría provenir de compuestos residuales en el amortiguador de extracción, tales como EDTA o hidrocloreuro de guanidina o ambos (Demeke y Jenkins, 2010). La relación de $A_{260/280}$ no es un criterio absoluto de pureza del ADN porque el ADN obtenido con el método 2 mostró un valor que indicaba una preparación de baja pureza, que no corresponde a los resultados obtenidos por medio de PCR de punto final. El patrón electroforético de esta preparación (datos no mostrados) presentó cierta degradación, y esto podría causar un efecto hipercrómico a 260 nm (debido principalmente a ADN de una sola cadena y oligonucleótidos cortos), que a su vez contribuye a sobreestimar la concentración de ADN (Demeke y Jenkins, 2010). Para la calidad del ADN obtenido con el método 3, la $A_{260/280}$ está justo debajo de los valores esperados, 1.9 a 2.0. Sin embargo, el escaneo de absorbancia mostró la forma óptima, con un máximo a 260 y un punto de inflexión alrededor de 230 nm, que corresponde a una relación $A_{260/230}$ de 1.0. El ADN obtenido con los kits 2 y 3, proporcionó la mayor eficiencia en PCR punto final (resultados no mostrados). La evaluación del desempeño de los protocolos de extracción de ADN es un proceso continuo ya que los métodos aplicados a una matriz pueden ser inadecuados para otras. Métodos experimentales similares a los del presente estudio se han usado para probar productos de maíz, como almidón y productos extruidos y para otros cultivos y alimentos, como la soya y productos derivados, incluidos los aislados proteínicos, bebidas a base de soya y tofu (Murray *et al.*, 2007; Smith y Maxwell, 2007; Mafra *et al.*, 2008). Además de probar kits comerciales, como los usados en este estudio, dichos autores evaluaron el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Sus resultados indican que este último es particularmente útil para extraer ADN de buena calidad para PCR desde alimentos altamente procesados, aunque presentó bajos rendimientos. Además, para la extracción de ADN de granos,

purity, an inhibition curve must be performed. In this curve, a series of DNA target dilutions are run and the Ct value is registered. If the dilutions are two-fold, the ΔC_t is expected to be of one cycle. Besides, the slope of the curve, that in turn reflects the efficiency of amplification, should be within -3.6 and -3.1 (ENGL, 2008; Holden *et al.*, 2010). An inhibition test was performed for MON810 and Bt11 with DNA obtained with methods 1, 2 and 3, whose results are shown in Tables 2 and 3, respectively. Regarding TaqMan results, in the case of MON810, methods 2 and 3 rendered DNA extracts free of inhibitory compounds that led to high amplification efficiency calculated from the standard curve, as shown by values of 99.3 and 98.4 %, respectively. For DNA extracted with method 1, its UV analysis and visualization in gel indicated an acceptable purity and integrity; besides, reliable amplification was achieved by end-point PCR. However, real-time results showed that this preparation is not suitable for quantitative analysis, as an efficiency value of 292 % was calculated from the standard regression curve. Similar results were obtained for the construct-specific analysis of the Bt11 event. For methods 1, 2 and 3 the slope values were -1.39 , -3.28 and -3.46 . The amplification curves obtained with TaqMan chemistry, corresponding to the inhibition test of MON810 grains, are shown in Figure 2. DNA preparations obtained with methods 2 and 3 led to the amplification down to 57 target molecules, thus, they are suitable to perform sensitive and reliable detections (Hübner *et al.*, 2001; Kay and Van den Eede, 2001). In contrast, amplification

métodos como los basados en la unión del ADN a las resinas, membranas o partículas magnéticas son menos laboriosos y consumen menos tiempo, y proporcionan buena calidad de amplificación de ADN. Lo práctico es uno de los criterios de aceptación del método a tener en cuenta, sobre todo, respecto a la alta capacidad de procesamiento necesaria en análisis rutinarios (ENGL, 2008).

ADN como sustrato para la amplificación cuantitativa de PCR tiempo real: pruebas de inhibición

La PCR cuantitativa depende de la capacidad de una amplificación eficiente, lo cual significa que la reacción debe efectuarse en ausencia de moléculas inhibidoras y debería ser suficientemente específica para evitar la generación de fluorescencia desde ADN molde no blanco. Para evaluar la pureza del ADN, se debe realizar una curva de inhibición en la cual se corre la qPCR de una serie de diluciones de ADN blanco y se registra el valor de Ct. Si el factor de dilución es dos, se espera que el ΔC_t sea de un ciclo. Además, la pendiente de la curva, que a su vez refleja la eficiencia de la amplificación, debería estar dentro de -3.6 y -3.1 (ENGL, 2008; Holden *et al.*, 2010). Una prueba de inhibición se realizó con ADN de los eventos MON810 y Bt11 obtenido con los métodos 1, 2 y 3, cuyos resultados se muestran en los Cuadros 2 y 3, respectivamente. Respecto a los resultados de TaqMan, en el caso de MON810, los métodos 2 y 3 proporcionaron extractos de ADN

Table 2. Effect of DNA quality on the standard curve parameters of a construct specific amplification of different events. TaqMan chemistry.

Cuadro 2. Efecto de la calidad del ADN en los parámetros de la curva estándar de una amplificación construcción-específica de diferentes eventos. Química TaqMan.

Standard curve parameters	Event Bt11			Event MON810		
	Extraction methods			Extraction methods		
	1	2	3	1	2	3
Slope	-1.39	-3.28	-3.46	-1.68	-3.34	-3.36
Intercept	33.68	30.47	29.66	32.98	30.64	28.85
R ²	0.826	0.997	0.988	0.841	0.997	0.997
Efficiency (%)	424.7	101.8	94.6	292.2	99.3	98.4

Methods: 1 Qbiogene Fast DNA kit; 2 Qiagen DNeasy plant kit; 3 Genetic ID Fast DNA kit ❖ Métodos: 1 Kit Qbiogene Fast DNA; 2 Kit Qiagen DNeasy para planta; 3 Kit Genetic ID Fast DNA.

Table 3. Effect of DNA quality on the standard curve parameters of a construct specific amplification of different events. SYBR Green chemistry.**Cuadro 3. Efecto de la calidad del ADN en los parámetros de la curva estándar de una amplificación construcción-específica de diferentes eventos. Química SYBR Green.**

Standard curve parameters	Event Bt11			Event MON810		
	Extraction method			Extraction method		
	1	2	3	1	2	3
Slope	-3.40	-3.34	-3.44	-3.31	-3.44	-3.52
Intercept	30.39	29.02	28.35	30.49	29.08	27.86
R ²	0.977	0.991	0.998	0.994	0.998	0.99
Efficiency (%)	96.8	99.3	95.1	100.6	95.2	92.3

Methods: 1 Qbiogene Fast DNA kit; 2 Qiagen DNeasy plant kit; 3 Genetic ID Fast DNA kit ♦ Método: 1 Kit Qbiogene Fast DNA; 2 Kit Qiagen DNeasy para planta; 3 Kit Genetic ID Fast DNA.

results of DNA obtained with method 1 showed no relation with respect to the DNA template quantity in the reaction, which explains their non-linear behavior. The copy number of transgenic sequences was calculated considering the hemizygous nature of MON810 hybrid (Charels *et al.*, 2007; Holden *et al.*, 2010) and a 1C value of 2.725 pg (Trifa and Zhang, 2004; Murray *et al.*, 2007; Paterno *et al.*, 2009; Scholdberg *et al.*, 2009); therefore, the average number of transgenic copies in a solution containing 100 ng of DNA is 36 697.

The inhibition test results using SYBR Green are shown in Table 3. The amplification efficiencies for both GM events, with any of the extraction kits, are acceptable in all cases corresponding to values between 92.3 % and 100.6 %, according to what is established by the European Network of GMO Laboratories (ENGL, 2008). The amplicons obtained were subjected to dissociation analyses, which showed one amplification product for each event, with T_m values of 78.8 °C and 82.9 °C, specific for MON810 and Bt11, respectively. Multiple products, evinced by several peaks in melting curves, are detrimental to amplification efficiency, with the concomitant error in target DNA quantification (Holden *et al.*, 2010). A representative dissociation curve is shown for the amplicon synthesized with primers MON810 2-3' and MON810 2-5' for detection of MON810 maize (Figure 4A). The inhibition curves obtained with the three DNA preparations show a ΔC_t close to one cycle, as expected, and it was possible to amplify down to 57 target molecules (results not shown).

libres de compuestos inhibidores que llevaron a una eficiencia alta de amplificación, calculada de la curva estándar, que correspondió a valores de 99.3 y 98.4 %, respectivamente. El análisis de UV y la visualización en gel del ADN extraído con el método 1, indicaron una pureza e integridad aceptable; además se obtuvo una amplificación confiable por PCR en punto final. Sin embargo, los resultados en tiempo real mostraron que esta preparación es inadecuada para el análisis cuantitativo, ya que se calculó un valor de eficiencia del 292 % de la curva de regresión estándar. Resultados similares se obtuvieron para el análisis construcción-específica del evento Bt11. Para los métodos 1, 2 y 3 los valores de las pendientes fueron -1.39, -3.28 y -3.46, respectivamente. En la Figura 2 se muestran las curvas de amplificación obtenidas con la química de TaqMan correspondientes a la prueba de inhibición de granos MON810. Las preparaciones de ADN obtenidas con los métodos 2 y 3 condujeron a la amplificación de hasta 57 moléculas blanco; así, son adecuadas para realizar detecciones sensibles y confiables (Hübner *et al.*, 2001; Kay y Van den Eede, 2001). En contraste, los resultados de la amplificación de ADN obtenido con el método 1 no mostraron relación con respecto a la cantidad de ADN molde en la reacción, lo que explica su comportamiento no lineal. El número de copias de secuencias transgénicas se calculó considerando la naturaleza hemigota del híbrido MON810 (Charels *et al.*, 2007; Holden *et al.*, 2010) y un valor 1C de 2.725 pg (Trifa y Zhang, 2004; Murray *et al.*, 2007; Paterno *et al.*, 2009; Scholdberg *et al.*, 2009); por tanto, el número promedio de copias transgénicas

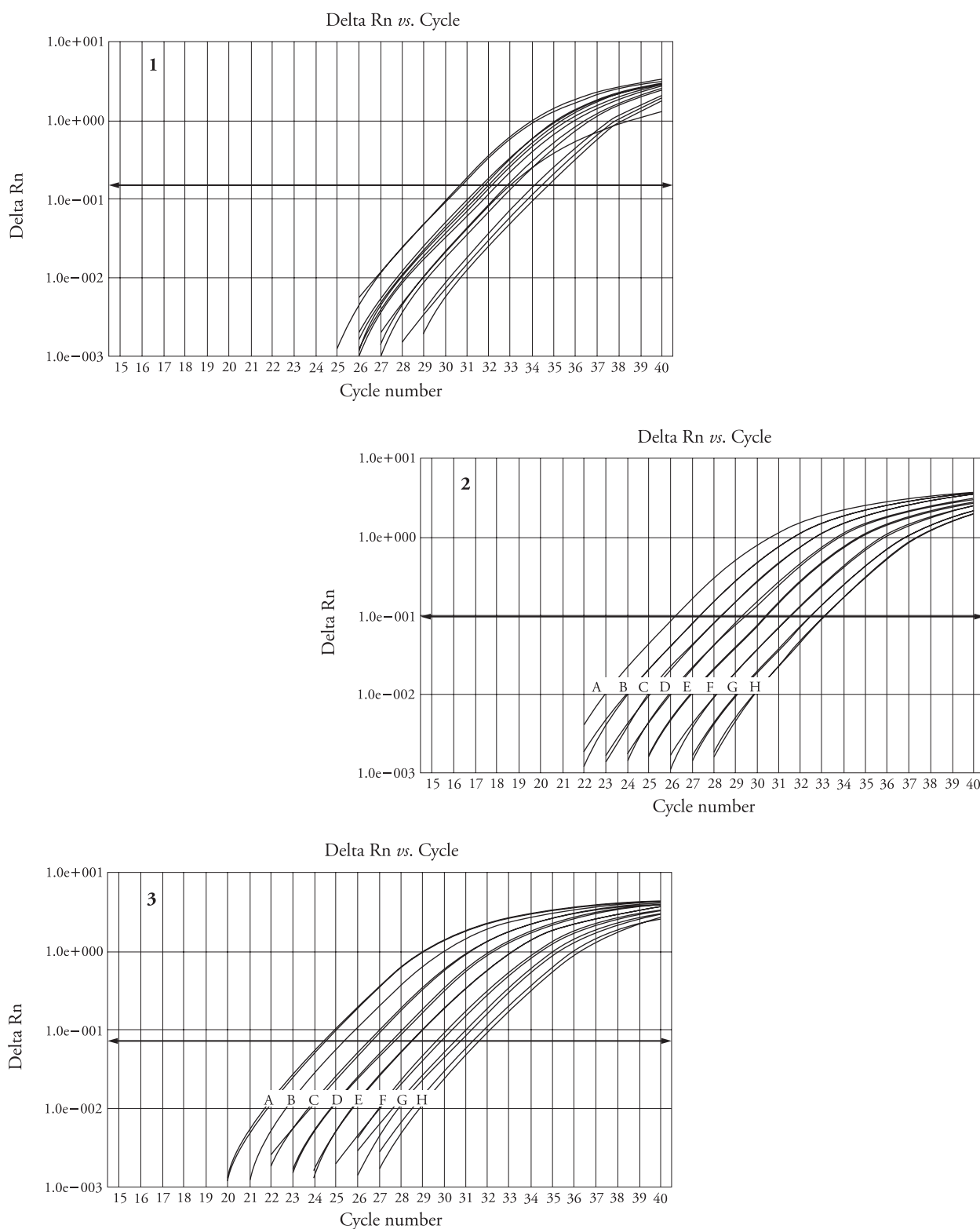


Figure 2. TaqMan chemistry. Construct specific amplification of event MON810 in real-time PCR, serial dilutions from 100 % GM grain, containing 7339 (A), 3670 (B), 1835 (C), 917 (D), 459 (E), 229 (F), 115 (G) and 57 (H) target molecules. DNA extraction methods: 1 Qbiogene Fast DNA kit; 2 Qiagen DNeasy plant kit; 3 Genetic ID Fast DNA kit.

Figura 2. Química TaqMan. Amplificación construcción específica del evento MON810 por PCR en tiempo real, diluciones en serie a partir de grano GM 100%, con 7339 (A), 3670 (B), 1835 (C), 917 (D), 459 (E), 229 (F), 115 (G) y 57 (H) moléculas blanco. Métodos de extracción de ADN: 1 Kit Qbiogene Fast DNA; 2 Kit Qiagen DNeasy para planta; 3 Kit Genetic ID Fast DNA.

DNA as substrate for quantitative real-time PCR amplification: quantification proficiency

An inefficient amplification due to DNA impurity would be reflected in the determination of an untrue value or in no amplification at all (Cankar *et al.*, 2006). Experiments were performed in order to quantify grain samples spiked with known quantities of GM material, namely MON810. In these experiments TaqMan and SYBR Green chemistries were tested and quantification results from triplicated analyses are shown in Table 4. The overall performance of the extraction method and the real time chemistry was evaluated by the agreement between the average value obtained from the test and the known spiked quantity of the transgenic material. The closeness between these parameters is expected to be within ± 25 % of the reference value (ENGL, 2008). The content of a GMO was quantified as percentage of transgenic DNA in relation to an endogenous control gene, which undergoes the same treatment as the target DNA before amplification. The choice of the housekeeping reference gene should consider that it has to be taxon-specific, it should be in single- or low-copy number and should amplify consistently across different cultivars. From the commonly used endogenous genes in maize-zein, starch synthase (*zSSIb*), alcohol dehydrogenase (*adh1*), high mobility group (*hmg*) and invertase (*ivr1*) genes- the ones that show more accurate and reproducible amplification efficiencies are *hmg*, *zSSIb* and *ivr1* (Scholdberg *et al.*, 2009). In fact, the use of *adh1* as reference gene led to erroneous GMO quantification. This was explained by differences on the genotype of the sample, the calibrant or both due to the presence

en una solución que contiene 100 ng de ADN es 36 697.

Los resultados de las pruebas de inhibición con SYBR Green se muestran en el Cuadro 3. La eficiencia de la amplificación para ambos eventos transgénicos, con cualquiera de los kits de extracción, es aceptable en todos los casos de acuerdo con lo establecido por la Red Europea de Laboratorios OGM y corresponde a valores entre 92.3 % y 100.6 %, (ENGL, 2008). Los amplicones obtenidos se sometieron a análisis de disociación que mostraron un producto de amplificación para cada evento, con valores de T_m de 78.8 °C y 82.9 °C, específicos para MON810 y Bt11, respectivamente. Varios picos en las curvas de disociación indican amplicones múltiples, lo que va en detrimento de la eficiencia de amplificación, con el error concomitante en la cuantificación del ADN blanco (Holden *et al.*, 2010). La Figura 4A muestra una curva representativa de disociación para el amplicón sintetizado con los primers MON810 2-3' y MON810 2-5' para la detección de maíz MON810. Las curvas de inhibición obtenidas con las tres preparaciones de ADN muestran un ΔC_t cercano a un ciclo, como se esperaba, y fue posible amplificar hasta 57 moléculas blanco (resultados no mostrados).

ADN como sustrato para la amplificación cuantitativa de PCR en tiempo real: eficiencia de cuantificación

Una amplificación ineficiente debido a la impureza del ADN se reflejaría en la determinación de un valor erróneo o en ninguna amplificación (Cankar *et al.*, 2006). Los experimentos se realizaron para

Table 4. Effect of DNA extraction method: maize grain analysis with known quantities of MON810 event.

Tabla 4. Efecto del método de extracción de ADN: análisis de grano de maíz con cantidades conocidas del evento MON810.

Extraction method	TaqMan chemistry MON810 quantity (%; w/w)			SYBR Green chemistry MON810 quantity (%; w/w)		
	10	1	0.1	10	1	0.1
1	13.96 $\pm$ 0.140	No amplification	No amplification	48.5 $\pm$ 0.157	53.8 $\pm$ 0.149	0.03 $\pm$ 0.011
2	16.15 $\pm$ 1.118	2.11 $\pm$ 0.154	0.12 $\pm$ 0.016 ^a	10.8 $\pm$ 0.018 ^a	2.3 $\pm$ 0.017	0.1 $\pm$ 0.077 ^a
3	11.48 $\pm$ 0.327 ^a	0.88 $\pm$ 0.12 ^a	0.13 $\pm$ 0.02 ^a	10.3 $\pm$ 0.007 ^a	1.1 $\pm$ 0.021 ^a	0.25 $\pm$ 0.006

Samples were analyzed by triplicate. ^a Values within ± 25 % of the spiked quantity of MON810 ❖ Las muestras se analizaron por triplicado. ^a Valores dentro ± 25 % de la cantidad conocida de MON810.

of a single nucleotide polymorphism for this gene in maize, which in turn affects the endogenous gene quantification by TaqMan chemistry. This error induces an overall miscalculation of the GMO content (Broothaerts *et al.*, 2008).

For both chemistries, results showed that DNA extracted with method 1 led to a non-accurate quantification, whereas methods 2 and 3 rendered a high quality DNA suitable for quantification. Method 3 gave the most accurate values for the three GMO concentrations tested using any real time chemistry. The Ct value for the endogenous reference gene is expected to be the same, regardless the method of DNA extraction. Thus, any difference observed would indicate a non-efficient amplification due to the presence of impurities, to the use of highly degraded DNA or to non-accurate template DNA estimation.

TaqMan chemistry

For the quantitative analysis, the starch synthase was used as endogenous reference gene, and its amplification rendered an efficiency of 94 % (slope = -3.475) from DNA extracted with method 3. As for the amplification of the endogenous reference gene, Figure 3 shows a ΔC_t around 0.5 cycles between DNA from methods 3 and 2 (curves A and B) that might explain the poor quantification values calculated for the latter. A considerable difference of Ct, approximately 12 cycles, was observed for DNA template prepared with method 1 (curve D). A delay in the onset of the exponential phase of the transgene amplification curve was observed for template DNA from method 1 *vs.* 2 or 3 (curves E and C, respectively); consequently, an erroneous quantification is expected. Such a difference in Ct values would likely be due to non-accurate template DNA quantification, as evinced by the absorbance spectra from this DNA preparation (Figure 1-1), that shows the presence of compounds with high absorbance at wave lengths below 260, which clearly led to an overestimation of the DNA concentration in the sample. The mean DNA value calculated from the standard curve showed that the actual quantity loaded as template from method 1 was almost four orders of magnitude lower than those with methods 2 and 3. The template under-load, plus the presence of

cuantificar las muestras de grano mezclado con cantidades conocidas de material GM, en este caso, MON810. En estos experimentos se probaron las químicas TaqMan y SYBR Green y los resultados de la cuantificación de los análisis triplicados se muestran en el Cuadro 4. El desempeño general del método de la extracción y la química en tiempo real se evaluó por la concordancia entre el valor promedio obtenido de la prueba y la cantidad conocida del material transgénico. La cercanía entre estos parámetros se espera encontrar dentro de ± 25 % del valor de la referencia (ENGL, 2008). El contenido del OGM se cuantificó como porcentaje de ADN transgénico en relación a un gen endógeno testigo, que tiene el mismo tratamiento que el ADN blanco antes de la amplificación. La elección del gen referencia debe considerar que debe ser taxón-específico, debe estar en una sola copia o en un bajo número de copias y debe amplificar consistentemente en diferentes cultivos. De los genes endógenos de uso común en el maíz —zeína, almidón sintasa (*zSSIb*), alcohol deshidrogenasa (*adh1*), grupo de alta movilidad (*hmg*) e invertasa (*ivr1*)— los que muestran las eficiencias de amplificación más exactas y reproducibles son *hmg*, *zSSIb* e *ivr1* (Scholdberg *et al.*, 2009). De hecho, el uso de *adh1* como gen de referencia llevó a la cuantificación errónea de OGM. Esto se explica por diferencias en el genotipo de la muestra, del gen calibrante o de ambos, debido a la presencia de un polimorfismo único de nucleótido para ese gen en el maíz, lo que a su vez afecta la cuantificación del gen endógeno por la química TaqMan. Este error induce un mal cálculo global del contenido de OGM (Broothaerts *et al.*, 2008).

Para ambas químicas, los resultados mostraron que el ADN extraído con el método 1 condujo a una cuantificación imprecisa, mientras que los métodos 2 y 3 proporcionan un ADN de alta calidad adecuado para la cuantificación. El método 3 dio los valores más precisos para las tres concentraciones de OGM sometidas a prueba con cualquier química en tiempo real. El valor de Ct para el gen endógeno de referencia se espera que sea el mismo, independientemente del método de extracción de ADN. Por tanto, cualquier diferencia observada indicaría una amplificación ineficiente debido a la presencia de impurezas, al uso de ADN altamente degradado o a la estimación no precisa de ADN molde.

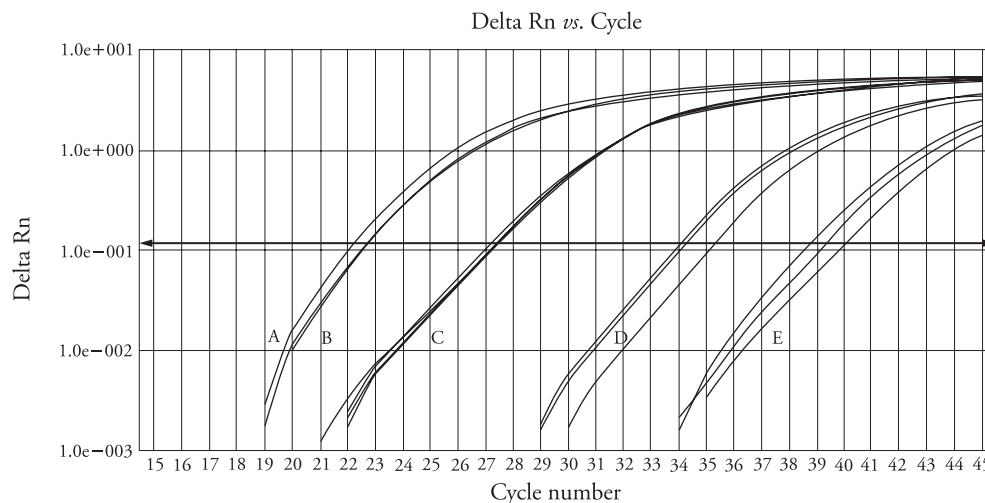


Figure 3. TaqMan amplification plots of 10 % MON810 grains. For the PCR reaction 40 ng of genomic DNA were employed. Plots: endogenous gene (starch synthase) amplification, DNA extracted with method 3 (A) and method 2 (B); construct specific amplification, DNA extracted with method 2 and 3 (C); endogenous gene amplification, DNA extracted with method 1 (D); construct specific amplification, DNA extracted with method 1 (E). All samples were run in triplicate.

Figura 3. Gráficas de amplificación con TaqMan de granos MON810 al 10 %. Para la reacción de PCR se emplearon 40 ng de ADN genómico. Gráficos: amplificación de gen endógeno (almidón sintasa), ADN extraído con el método 3 (A) y el método 2 (B); amplificación construcción-específica, ADN extraído con los métodos 2 y 3 (C); amplificación de gen endógeno, ADN extraído con el método 1 (D); amplificación de construcción-específica, ADN extraído con el método 1 (E). Todas las muestras se corrieron por triplicado.

inhibitors in DNA obtained with method 1 might explain the failure to amplify the target sequence when TaqMan was used (Table 4).

SYBR Green chemistry

Dissociation curves obtained from the amplification of invertase gene, used as the endogenous gene, and the transgene in the reference material showed just one amplicon (Figure 4A and 4B), indicating primer specificity and no primer-dimer formation. Cross reaction tests were performed by using the construct-specific primers with other GM events and no amplification products were obtained. The slope values for the detection of invertase gene and MON810 were -3.41 and -3.52 , respectively, which correspond to an efficiency of 96.5 and 92.3 %. This chemistry is less susceptible to the presence of inhibitors (Gonzalez-Salgado *et al.*, 2009). The estimation of transgene concentration using template DNA from methods 2 and 3 was in general accurate and within the acceptable deviation,

Química TaqMan

Para el análisis cuantitativo, el gen de referencia endógeno fue almidón sintasa y su amplificación tuvo una eficiencia del 94 % (pendiente = -3.475) a partir de ADN extraído con el método 3. Para la amplificación del gen endógeno de referencia, la Figura 3 muestra un ΔC_t alrededor de 0.5 ciclos entre el ADN de los métodos 3 y 2 (curvas a y b) que podría explicar los valores bajos de cuantificación calculados para este último. Una diferencia considerable de C_t , aproximadamente 12 ciclos, se observó para el ADN molde preparado con el método 1 (curva D). Un retraso se observó en el inicio de la fase exponencial de la curva de amplificación del transgén para el ADN molde del método 1 *vs* 2 o 3 (curvas de E y C, respectivamente); en consecuencia, se tendrá una cuantificación errónea. Tal diferencia en los valores C_t probablemente se debería a una cuantificación imprecisa de ADN molde como se evidencia por el espectro de absorbancia de esta preparación de ADN (Figura 1-1), que muestra la

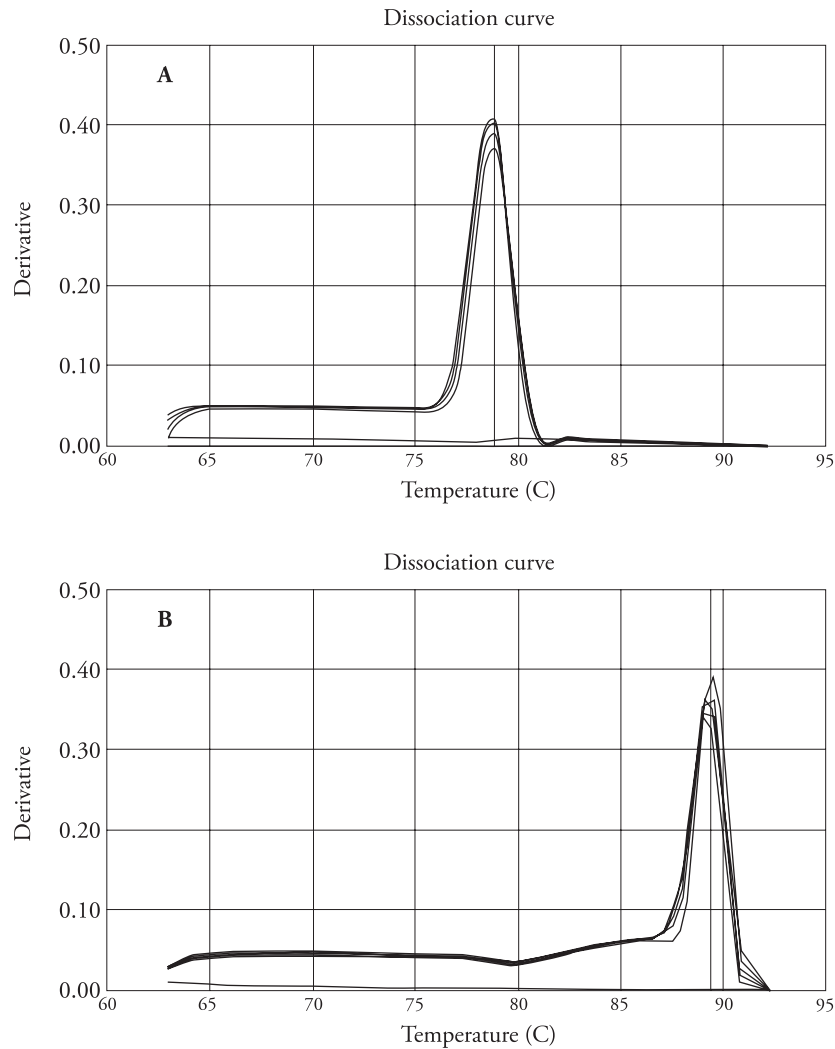


Figure 4. A. Thermal dissociation curve for the amplicon synthesized with primers MON81023 and MON81025 for detection of MON810 maize. $T_m=78.8^\circ$. B. Thermal dissociation curve for the amplicon synthesized with primers IVRIF and IVRIR for detection of the maize invertase gene. $T_m=89.1^\circ$.

Figura 4. A. Curva de disociación térmica para el amplicón sintetizado con los iniciadores MON81023 y MON81025 para la detección del maíz MON810. $T_m=78.8^\circ$. B. Curva de disociación térmica para el amplicón sintetizado con los iniciadores IVRIF e IVRIR para la detección del gen de la invertasa de maíz. $T_m=89.1^\circ$.

whereas results with template from method 1 are far away from the actual GMO concentrations (Table 4). The mean Ct value for the endogenous gene obtained from methods 2 and 3 was 20.3 in contrast with the corresponding to method 1 (25.8). This caused a delay in approximately six cycles, which indicates an overestimation of the template DNA quantity as discussed before. This problem in turn, led to large differences on DNA content in the

presencia de compuestos con alta absorbancia a longitudes de onda por debajo de 260, lo que claramente llevó a una sobreestimación de la concentración de ADN en la muestra. El valor promedio del ADN obtenido con el método 1, calculado a partir de la curva estándar, mostró que la cantidad real cargada como molde en la reacción fue casi cuatro órdenes de magnitud menor que aquella obtenida con los métodos 2 y 3. La cantidad de ADN molde

PCR reaction, which was very low, under the limit of quantification, where the results precision and accuracy were not on acceptable levels.

CONCLUSIONS

Quantitative PCR requires a highly pure DNA preparation as template, in order to obtain reliable quantification values of exogenous DNA in GM plant material such as maize grains. DNA amplification quality could be estimated by DNA visualization in agarose gels or by ultraviolet absorbance, or both, but these evaluations are preliminary criteria. It is advisable to run inhibition test curves in order to verify proper DNA amplification, which in turn reflects template DNA purity. Besides, silica DNA-binding membranes yielded the most suitable DNA preparations for quantification and detection of GM plant tissue. For qPCR, TaqMan chemistry was more accurate and more sensitive to the presence of impurities than SYBR Green.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financed by CONACYT-SEMARNAT (grant 2004-C01-266). We thank A. SanJuan-Badillo (UNAM, Faculty of Chemistry) for her technical assistance.

LITERATURE CITED

- Anklam, E., F. Gadani, P. Heinze, H. Pijnenburg, and G. Van den Eede. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 3-26.
- Bonfini, L., W. Moens, E. Ben, M. Querci, B. Aygun, P. Corbisier, D. Morisset, J. Zel, and G. Van den Eede. 2007. Analytes and related PCR primers used for GMO detection and quantification. *JRC Sci. Technol. Rep.* EUR 23059 EN. 1-51.
- Broothaerts, W., P. Corbisier, H. Schimmel, S. Trapmann, S. Vincent, and H. Emons. 2008. A single nucleotide polymorphism (SNP839) in the *adh1* reference gene affects the quantitation of genetically modified maize (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56: 8825-8831.
- Cankar K., D. Stebih, T. Dreo, J. Zel, and K. Gruden. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6: 37. doi:10.1186/1472-6750-6-37
- CEC Report. 2004. Maize and biodiversity. The effects of transgenic maize in Mexico. Key findings and recommendations. Commission on Environmental

en la reacción menor a la necesaria, más la presencia de inhibidores en el ADN obtenido con el método 1 podrían explicar el fracaso para amplificar la secuencia blanco cuando se usó TaqMan (Cuadro 4).

Química SYBR Green

Las curvas de disociación obtenidas de la amplificación del gen invertasa, usado como gen endógeno, y del transgén en el material de referencia mostraron sólo un amplicón (Figura 4A y 4B), lo que indica la especificidad de los iniciadores y que no hubo formación de dímeros de iniciadores. Pruebas de reacción cruzada se realizaron con los iniciadores construcción-específico con otros eventos GM y no se obtuvo productos de amplificación. Los valores de la pendiente para la detección del gen de invertasa y de MON810 fueron -3.41 y -3.52 , respectivamente, que corresponden a una eficiencia de 96.5 y 92.3 %. Esta química es menos susceptible a la presencia de inhibidores (Gonzalez-Salgado *et al.*, 2009). La estimación de la concentración de transgenes usando ADN molde de los métodos 2 y 3 fue en general exacta y dentro de la desviación aceptable, mientras que los resultados con molde del método 1 estuvieron más lejos de las concentraciones reales de OGM (Cuadro 4). El valor de C_t promedio para el gen endógeno obtenido de los métodos 2 y 3 fue 20.3 en contraste con el correspondiente al método 1 (25.8). Esto causó un retraso de amplificación de aproximadamente seis ciclos, lo cual indica una sobreestimación de la cantidad de ADN molde como se discutió anteriormente. Este problema, a su vez, dio lugar a grandes diferencias en el contenido de ADN en la reacción de PCR, que era muy bajo, por debajo del límite de cuantificación, donde la precisión y exactitud de los resultados no estaban en niveles aceptables.

CONCLUSIONES

La PCR cuantitativa requiere una preparación de ADN altamente pura como molde, con el fin de obtener valores de cuantificación confiables de ADN exógeno en el material vegetal GM como en granos de maíz. La calidad de la amplificación de ADN puede estimarse por visualización del ADN en geles de agarosa o por absorbancia ultravioleta, o ambos, pero estas evaluaciones son criterios preliminares. Es aconsejable correr curvas de prueba de

- Cooperation (CEC) Secretariat report. http://www.cec.org/files/PDF//Maize-and-Biodiversity_en.pdf (Accessed: October, 2013).
- Charels, D., S. Broeders, P. Corbisier, S. Trapmann, H. Schimmel, T. Linsinger, and H. Emons. 2007. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 2. Systematic study of parameters influencing the quantitative determination of MON 810 corn by real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3258-3267.
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los OGM). 2012a. Solicitudes de Registro de OGMs 2012. http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Solicitudes_Reg_OGMs.aspx. (Accessed: October, 2013).
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los OGM). 2012b. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad. <http://www.cibiogem.gob.mx/redes/RedMexOGMs/Paginas/inicio.aspx> (Accessed: October, 2013).
- Cleveland, D. A., D. Soleri, F. Aragon-Cuevas, J. Crossa, and P. Gepts. 2005. Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: Lessons from the case of maize in Mexico. *Environ. Biosafety Res.* 4: 197-208.
- Demeke, T., and G. R. Jenkins. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1977-1990.
- ENGL. European Network of GMO Laboratories. 2008. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm> (Accessed: October, 2013)
- ENGL. European Network of GMO Laboratories. 2011. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. *JRC Sci. Technol. Rep.* EUR 24790 EN. 1-23.
- GMO Compass. 2010. Genetically modified plants: Global Cultivation Area. Maize. Updated to March 29, 2010. http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341.genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html (Accessed: October, 2013).
- Gonzalez-Salgado, A., B. Patiño, J. Gil-Serna, C. Vazquez, and M. T. Gonzalez-Jaen. 2009. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 295: 57-66.
- Gryson, N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2003-2022.
- Holden, M.J., M. Levine, T. Scholdberg, R. J. Haynes, and G. R. Jenkins. 2010. The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2175-2187.
- Hübner, P., H. U. Waiblinger, and K. Pietsch. 2001. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J. AOAC Int.* 84: 1855-1864.
- Kay, S., and G. Van den Eede. 2001. The limits of GMO detection. *Nature Biotech.* 19: 405.
- Mafra, I., S. A. Silva, E. J. M. O. Moreira, C. S. Ferreira da Silva, M. Beatriz, and P. P. Oliveira. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control.* 19: 1183-1190.
- inhibición para verificar la amplificación correcta del ADN, que a su vez refleja la pureza del ADN molde. Las membranas de unión al ADN de sílica produjeron las preparaciones de ADN más adecuadas para la cuantificación y detección de tejido vegetal GM. Para la qPCR, la química TaqMan fue más precisa y más sensible a la presencia de impurezas, que SYBR Green.
- Fin de la versión en Español—
- ✱
- Mexican Biosafety Law. 2005. Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Centro de Documentación, Información y Análisis. <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf> (Accessed: October, 2013).
- Mexican Regulation on the Biosafety Law. 2009. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Centro de Documentación, Información y Análisis. <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regla.htm> (Accessed: October, 2013).
- Murray, S. R., R. C. Butler, A. K. Hardacre, and G. M. Timmerman-Vaughan. 2007. Use of quantitative real-time PCR to estimate maize endogenous DNA degradation after cooking and extrusion or in food products. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2231-2239.
- Paterno, A., U. Marchesi, F. Gatto, D. Verginelli, C. Quarchioni, C. Fusco, A. Zepparoni, D. Amaddeo, and I. Ciabatti. 2009. Finding the joker among the maize endogenous reference genes for genetically modified organism (GMO) detection. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11086-11091.
- Quirasco M., B. Schoel, J. Plasencia, J. Fagan, and A. Galvez. 2004. Suitability of real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in Mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *J. AOAC Int.* 87: 639-646.
- Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3rd edition. Cold Spring Harbor Press, USA.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2000. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Canada. 30 p.
- Scholdberg, T. A., T. D. Norden, D. D. Nelson, and G. R. Jenkins. 2009. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2903-2911.
- Smith, D. S., and P. W. Maxwell. 2007. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. *Food Control* 18: 236-242.

Trifa, Y., and D. Zhang. 2004. DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification. J. Agric. Food Chem. 52: 1044-1048.

U.S. Grains Council. 2013. Corn-production and exports. Updated to October 17, 2013. <http://www.grains.org/index.php/buying-selling/corn> (Accessed: October, 2013).