

CUANTIFICACIÓN DE MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADO MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE qPCR Y dPCR

QUANTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED MAIZE WITH qPCR AND dPCR TECHNIQUES

Lizbeth E. Gutiérrez-Angoa, Luis C. Castillo-Durán, Blanca E. Gómez-Castelo, Abraham I. Acatzi-Silva*

Centro Nacional de Referencia en Detección de OGM. Km 37.5, Carretera Federal México-Pachuca. Estado de México, 55740. Tecámac de Felipe Villanueva Centro. (abraham.acatzi@senasica.gob.mx)

RESUMEN

A partir de la emisión de los permisos de liberación al ambiente de maíz (*Zea mays* L.) genéticamente modificado (GM) en el año 2009, en México fue necesario realizar la detección, identificación y cuantificación de organismos genéticamente modificados (OGM) de los cultivos en el país. El objetivo del presente estudio fue validar la técnica de cuantificación absoluta de mezclas de hoja en fracción masa de maíz GM a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR) y digital (dPCR). Mezclas de hojas de maíz modificado con el evento MON810 se prepararon con hojas de maíz convencional, fueron analizadas con la técnica de qPCR, y como calibrantes se usaron un plásmido de referencia certificado y ADN obtenido de una hoja con la modificación MON810, y con la técnica de dPCR, la cual permite la medición precisa del número de copias iniciales de ADN en las muestras y no usa calibrantes. La prueba en qPCR cumplió con los criterios de validación, como límite de cuantificación, intervalo dinámico, eficiencia de amplificación, coeficiente de correlación y estimación de la incertidumbre. Además, se validó la técnica de dPCR previo a la cuantificación de las mezclas, usando materiales de referencia certificados (MRC). Una vez validada la técnica de dPCR se cuantificó la cantidad de material GM en las mezclas y los resultados entre ambas técnicas fueron comparables, indicando que pueden aplicarse para cuantificar la modificación genética en los cultivos y emitir los resultados en fracción masa o en número de copias. Los resultados muestran que se puede realizar la cuantificación de material genéticamente modificado de cultivos en México con resultados confiables.

Palabras clave: qPCR, dPCR, *Zea mays* L., OGM.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2014. Aprobado: febrero, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 373-394. 2015.

ABSTRACT

In 2009 in Mexico, permission was given to release genetically modified maize (*Zea mays* L.) into the environment. This made it necessary to detect, identify and quantify genetically modified organisms (GMO) in the country's crops. The objective of this study was to validate the technique of absolute quantification of leaf mixtures in mass fraction of GM maize using real time (qPCR) and digital (dPCR) polymerase chain reaction (PCR) technique. Mixed leaves of maize modified with the MON810 event were prepared with conventional maize and analyzed with the qPCR technique. A certified reference plasmid and DNA obtained from a leaf with the MON810 modification were used as calibrants; besides, the dPCR technique was utilized since it allows a precise measurement of the number of DNA initial copies in the samples and does not require the utilization of calibrants. The test in qPCR complied with validation criteria, such as quantification limit, dynamic interval, amplification efficiency, correlation coefficient and estimation of uncertainty. Moreover, the dPCR technique was validated prior to quantification of the mixtures with the certified reference materials (CRM). Once the dPCR technique was validated, the GM material in the mixtures were quantified, and the results of the two techniques were comparable, indicating that they can be applied in quantifying genetic modification in crops and emit the results in mass fraction or copy number. The results show that quantification of genetically modified crop material in México is possible with reliable results.

Key words: qPCR, dPCR, *Zea mays* L., GMO.

INTRODUCTION

In Mexico, with the law on biosafety of genetically modified organisms in force as of 2005 and its regulation in 2008, the Secretaría

INTRODUCCIÓN

En México, entró en vigor la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados en 2005 y su reglamento en 2008, por lo cual la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) inició las actividades de inspección, vigilancia y monitoreo de los cultivos genéticamente modificados (GM) en todo el país. El Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), donde se desarrolló este estudio, valida los métodos para asegurar la confianza en los resultados emitidos. El SENASICA envía las muestras al CNRDOGM para su análisis. Las muestras deben ser de las primeras etapas de crecimiento de la planta, para dar a la autoridad un periodo suficiente para el ejercicio de sus facultades si es necesario. La mayoría de los métodos validados en el mundo para el análisis de OGM usan muestras de harina de las semillas, como maíz, soya o algodón (Luque-Perez *et al.*, 2013; Mazzara *et al.*, 2013), por lo cual, es conveniente tener métodos validados aplicables a las matrices que se analizan en el país, como las hojas de plantas de maíz.

La PCR es la técnica más usada para el análisis de ADN de los organismos derivados de la biotecnología moderna. La PCR en tiempo real o qPCR es una técnica sensible, rápida y cuantitativa; pero, las limitaciones son la necesidad de usar un calibrante, realizarla en un laboratorio que trabaje en un Sistema de Gestión basado en la norma internacional ISO/IEC 17025:2005, y usar MRC generados por una institución competente (Žel *et al.*, 2006), los cuales, en muchos eventos con modificación genética, no están disponibles inmediatamente en la mayoría de los países, incluyendo México. Estas limitaciones pueden ser superadas por la nueva técnica dPCR, la cual permite cuantificar el número de copias de una secuencia de ADN en una muestra a través de la amplificación desde una sola copia por división de la muestra en arreglos digitales. Esta técnica permite obtener moléculas individuales de ADN en cada uno de los cientos de pozos pequeños donde se realiza la reacción; esta cuantificación es una respuesta lineal y no necesita calibrante como referencia. Se basa en el concepto de diluciones límite usadas para enriquecer secuencias minoritarias por un proceso de partición. En este proceso no hay diferencias potenciales por

de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), through the Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), began inspection, surveillance and monitoring genetically modified (GM) crops throughout the country. The Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), where this study was conducted, validates methods to assure reliability of the results emitted. The SENASICA sends samples to the CNRDOGM for analysis. The samples must be of the first growth stages of the plant to give the authorities sufficient time to exercise their powers if necessary. Most of the methods validated worldwide for analysis of GMOs use samples of flours from seeds, such as maize, soybeans or cotton (Luque-Perez *et al.*, 2013; Mazzara *et al.*, 2013). It is necessary to have validated methods applicable to the matrixes that are analyzed in Mexico, such as the leaves of maize plants.

PCR is the most used technique for analysis of DNA from organisms derived from modern biotechnology. Real-time PCR, or qPCR, is a sensitive, rapid and quantitative technique. Its limitations, however, are the need to use a calibrant, conduct the test in a laboratory that works under a management system based on the international norm ISO/IEC 17025:2005, and use certified reference materials (CRM) generated by a competent institution (Žel *et al.*, 2006), which, in many events with genetic modification, are not immediately available in most countries, including Mexico. These limitations can be overcome using the new dPCR technique, which allows quantification of the copy number of a DNA sequence in a sample by amplifying a single copy by division of the sample in digital arrays. With this technique, individual DNA molecules can be obtained from each of the hundreds of small wells where the reaction takes place. This quantification is a linear response, and a reference calibrant is not necessary. The technique is based on the concept of boundary dilutions used to enrich minority sequences by a partitioning process. In this process, the potential differences between the standard and the sample under study by effect of the matrix do not exist, as in qPCR, where the amplification cycle determines the initial concentration of the DNA sequence analyzed by interpolation with the calibration curve (Corbisier *et al.*, 2010). The dPCR technique is not used to quantify GM maize leaf samples.

efectos de la matriz entre el estándar y la muestra investigada, como en la qPCR, donde el ciclo de amplificación determina la concentración inicial de la secuencia de ADN analizada por interpolación con una curva de calibración (Corbisier *et al.*, 2010). La técnica de dPCR no se usa para cuantificar muestras en hoja de maíz GM.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la cuantificación de mezclas en fracción masa y en número de copias del evento MON810. El evento MON810 es una construcción genética generada con fines comerciales por *Monsanto Company*[®] (Monsanto Company, 2002) que contiene una parte del marco abierto de lectura (*ORF*) del gen *cry1Ab* de la bacteria Gram positiva *Bacillus thuringiensis* (Monsanto Company, 2002; CERA, 2012), construcción que se introdujo en el genoma de maíz (maíz comercial: *YielGard*[®]-*Monsanto Company*[®]). La transformación permite expresar a este tipo de maíz MON810 un fragmento de la proteína CryA1b de 91 kDa (CERA, 2012), un péptido que confiere resistencia a daño por insectos del orden Lepidóptera (Monsanto Company, 2002) y cuya liberación al ambiente fue primero en los EE.UU. en 1995 (CERA, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra

El estudio se realizó en el CNRDOGM del SENASICA. A partir del permiso de liberación al ambiente 094/2010 (CIBIOGEM, 2010), en julio de 2011 se recolectaron aleatoriamente 51 hojas de maíz (*Zea mays*) de un cultivo GM proveniente de Chihuahua, que contenía el evento MON810 y 32 hojas de maíz convencional. A cada hoja (convencional y GM) se le asignó un código con el cual se identificaron durante todo el estudio.

Acondicionamiento

La presencia del evento MON810 o la ausencia de modificación se verificó en segmentos, menores de 3 cm, del ápice de todas las hojas. Con el resto de cada hoja se formaron lotes de 1 ± 0.05 g, se etiquetaron y almacenaron a -20 °C.

Liofilización

Las hojas se almacenaron 48 h a -70 °C y se deshidrataron en una liofilizadora (LABCONCO, Kansas City, MO, USA) a -52 °C y 0.22 mBar. Las muestras se pesaron a las 6, 24 y 48 h hasta peso constante y se almacenaron a -20 °C.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the quantification of mixtures in mass fractions and copy number of the MON810 event. The MON810 event is a genetic construction generated by the Monsanto Company[®] (Monsanto Company, 2002) for commercial ends; it contains a part of the open reading frame (*ORF*) of the *cry1Ab* gene from the Gram positive bacteria *Bacillus thuringiensis* (Monsanto Company, 2002; CERA, 2012), a construction that was introduced into the maize genome (commercial maize: *YielGard*[®]-*Monsanto Company*[®]). The transformation allows the maize type MON810 to express a fragment of the 91 kDa protein CryA1b (CERA, 2012), which is a peptide that confers resistance to damage by insects of the Lepidoptera order (Monsanto Company, 2002). It was first released into the environment in the United States in 1995 (CERA, 2012).

MATERIALS AND METHODS

Sampling

The study was conducted in CNRDOGM of SENASICA. Under the permit for release into the environment 094/2010 (CIBIOBEM, 2010) in July 2011, 51 maize (*Zea mays*) leaves, which contained the MON810 event, were collected randomly from a GM crop in Chihuahua, and 32 leaves were collected from conventional maize. Each leaf (conventional and GM) was assigned a code with which it was identified throughout the study.

Conditioning

The presence of the MON810 event or the absence of modification was verified in segments of less than 3 cm from the apex of all of the leaves. With the rest of each leaf, lots of 1 ± 0.05 g were formed, labeled and stored at -20 °C.

Lyophilization

The leaves were stored -70 °C for 48 h and dehydrated in a lyophilizer (LABCONCO, Kansas City, MO, USA) at -52 °C and 0.22 mBar. The samples were weighed at 6, 24 and 48 h until constant weight and stored at -20 °C.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted with the commercial method Fast ID Genomic DNA Extraction Kit (Genetic ID NA, Inc.,

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo con el método comercial Fast ID Genomic DNA Extraction Kit (Genetic ID NA, Inc. Fairfield, IA, USA). En tubos de 15 mL se mezclaron 2 g de la muestra y 6 mL de solución de lisis, se homogeneizó y se agregaron 30 μL de proteinasa K, se homogeneizó con vortex, se incubó 1 h a 65 °C y se centrifugó 5 min a 4500 g . Un mL de sobrenadante, por duplicado, se transfirió a un tubo de 2 mL y se agregó un volumen igual de cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó 5 min a 9391 g . De la fase acuosa se transfirieron 900 μL a tubos de 2 mL, se agregó un volumen igual de solución de unión y se agitó en vortex. La mezcla se centrifugó 3 min a 9391 g , el sobrenadante se pasó a través de una columna de unión de ADN colocada en el sistema de vacío para columnas de unión a ADN QIAvac 24 Plus (QUIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU.). En el mismo equipo se lavaron las columnas con 800 μL de solución de lavado y se realizaron tres lavados con 800 μL de etanol al 75 %; la última centrifugación se realizó a 9391 g por 3 min. La columna se transfirió a microtubos de 1.6 mL y se agregaron 50 μL de amortiguador 1X TE, se incubó 5 min a 65 °C, se centrifugó 3 min a 9391 g y se repitió una vez el procedimiento con 50 μL de amortiguador 1X TE, para obtener un volumen final de 100 μL de amortiguador 1X TE con ADN en suspensión. La extracción de ADN del material liofilizado se hizo con 200 mg de muestra, se mezclaron con 2 mL de amortiguador de lisis y se adicionaron 10 μL de proteinasa K; después se realizó el mismo procedimiento para el Fast ID Genomic DNA Extraction Kit. La concentración se determinó con un espectrofotómetro de ultra bajo volumen NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) y las muestras se estandarizaron a una concentración 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ con agua estéril. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C.

Identificación del evento específico MON810

La identificación del gen endógeno *hmgA* y del evento específico MON810 en cada muestra se realizó por duplicado, en el equipo de PCR tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) con TaqMan® Universal PCR Master Mix, iniciadores y sondas TaqMan® (ABI, ibid). Las secuencias fueron tomadas del método validado por la European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed y la European Network of GMO Laboratories (EURL-GMFF y ENGL, 2010). *hmgA* con un producto de amplificación de 79 pb: (f) 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3', (r) 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3', (s) 5'-(FAM)-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-(TAMRA)-3'; y MON810 con un producto de amplificación de 92 pb: (f) 5'-TCG AAG GAC GAA

Fairfield, IA, USA). In 15 mL tubes, 2 g of the sample and 6 mL of lysis solution were mixed and homogenized; 30 μL proteinase K was added and the mixture was homogenized in vortex and incubated at 65 °C for 1 h. It was then centrifuged at 4500 g for 5 min. Of the supernatant, 1 mL, in duplicate, was transferred to a 2 mL tube and an equal volume of chloroform was added, shaken in vortex and centrifuged at 9391 g for 5 min. Of the aqueous phase, 900 μL was transferred to 2 mL tubes, an equal volume of binding solution was added; the mixture was shaken in vortex and centrifuged at 9391 g for 3 min. The supernatant was passed through a DNA binding column placed in the vacuum system for DNA binding columns QIAvac 24 Plus (QUIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). In the same equipment, the columns were washed with 800 μL wash solution, then three washes with 800 μL 75 % ethanol. The last centrifugation was done at 9391 g for 3 min. The column was transferred to 1.6 mL microtubes and 50 μL 1X TE buffer was added. It was incubated at 65 °C for 5 min and centrifuged at 9391 g for 3 min. The procedure was repeated once with 50 μL 1X TE buffer to obtain a final volume of 100 μL 1X TE buffer with DNA in suspension. DNA was extracted from the lyophilized material using 200 mg sample. The 200 mg sample was mixed with 2 mL lysis buffer and 10 μL proteinase K was added. As of this point, the same procedure was carried out for the Fast ID Genomic DNA Extraction Kit. Concentration was determined with an ultra-low volume spectrophotometer NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), and the samples were standardized at a concentration of 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ with sterile water. All of the samples were stored at -20 °C.

Identification of the specific MON810 event

Identification of the endogenous gene *hmgA* and the specific MON810 event in each sample was done in duplicate in the real-time PCR equipment ABI7500 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) with TaqMan® Universal PCR Master Mix, primers and TaqMan® (ABI, ibid) probes. The sequences were taken from the method validated by the European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed and the European Network of GMO Laboratories (EURL-GMFF and ENGL, 2010). *hmgA* with one 79 pb amplification product: (f) 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3', (r) 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3', (s) 5'-(FAM)-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-(TAMRA)-3' and MON810 with one 92 pb amplification product: (f) 5'-TCG AAG GAC GAA GAA CTC TAA CGT-3' (r) 5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'; (s) 5'-(FAM)-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-(TAMRA)-3'. Each reaction was prepared to a final volume of 20 μL , with 10 μL Master Mix, probe and primers, with a final concentration of 180 nM and 300 nM, respectively,

GGA CTC TAA CGT-3' (r) 5'-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'; (s) 5'-(FAM)-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-(TAMRA)-3'. Cada reacción se preparó a un volumen final de 20 μ L, con 10 μ L de Master Mix, sonda e iniciadores, con concentración final de 180 nM y 300 nM, respectivamente, 2 μ L (100 ng) de ADN molde y la cantidad suficiente de agua estéril para completar los 20 μ L. Cada análisis por PCR incluyó testigos negativos, con ADN de semilla de algodón (*Gossypium hirsutum*) para la respuesta a la secuencia endógena de maíz *hmg*, una muestra de maíz no modificado para la secuencia MON810, y un blanco de reactivos (sin ADN), por duplicado. Las condiciones de termociclado fueron 1 ciclo a 50 °C por 2 min, luego 1 ciclo a 95 °C por 10 min y 40 ciclos de amplificación de 95 °C por 10 s, alineamiento y extensión de 60 °C por 1 min.

Elaboración de mezclas GM

Mezclas GM al 0.1, 1 y 10 % se prepararon con hojas húmedas y liofilizadas identificadas como positivas (GM) y negativas (convencionales) a la presencia del evento específico MON810 (Cuadro 1). Las hojas con humedad se colocaron en un mortero, se trituraron con nitrógeno líquido hasta que el tamaño de partícula pareciera homogéneo. La cantidad de hoja GM correspondiente al porcentaje masa fue pesada, se agregó hoja convencional hasta completar 10 g y la mezcla se homogeneizó. De los 10 g se obtuvieron cuatro submuestras, de 2 \pm 0.2 g, y cada una se colocó en un mortero limpio. El mismo procedimiento se realizó para las mezclas de 0.1 y 1 %. Las mezclas se sometieron al proceso de reducción de tamaño de partícula, con nitrógeno líquido, en mortero, hasta alcanzar el tamaño menor y homogéneo de partícula posible. El mismo procedimiento se aplicó a las mezclas con hojas liofilizadas, pero las mezclas tuvieron 2 g de peso total y se dividieron en cuatro submuestras de 200 \pm 20 mg cada una. El ADN fue extraído después del acondicionamiento con el método ya descrito.

2 μ L (100 ng) template DNA and sterile water to complete the 20 μ L. Each PCR analysis carried out in duplicate included a negative control with cotton (*Gossypium hirsutum*) seed DNA for the response to the endogenous *hmgA* maize sequence, a sample of unmodified maize for the case of the MON810 sequence, and blank reagents (without DNA). Thermocycling conditions were one cycle at 50 °C for 2 min followed by one cycle at 95 °C for 10 min and 40 amplification cycles at 95 °C for 10 s, alignment and extension at 60 °C for 1 min.

Preparation of GM mixtures

GM mixtures were prepared to 0.1, 1 and 10 % with moist lyophilized leaves identified as positive (GM) and negative (conventional) in terms of the presence of the specific MON810 event (Table 1). Moist leaves were placed in a mortar and crushed with liquid nitrogen until particle size appeared to be homogenous. An amount of GM leaf corresponding to the mass percentage was weighed and conventional leaf was added to complete 10 g; the mixture was homogenized. Four 2 \pm 0.2 g subsamples were obtained from the 10 g of mixture. Each subsample was placed in a clean mortar. The same procedure was carried out for 0.1 and 1 % mixtures. Mixtures were subjected to the process of particle size reduction with liquid nitrogen in a mortar, until the smallest and the most homogeneous particles possible were achieved. The same procedure was applied to the mixtures with lyophilized leaves, but the mixtures had a total weight of 2 g and were divided into four 200 \pm 20 mg subsamples. DNA was extracted after conditioning with the method described above.

Quantification by qPCR

Results of the quantification of the GM mixtures with the dPCR technique were compared with the quantification of the

Cuadro 1. Mezclas analizadas por qPCR.

Table 1. Mixtures analyzed by qPCR.

Mezcla GM	GM (%)	Réplicas de las mezclas	Cantidad de mezcla para extracción de ADN	Réplicas de ADN	Número de reacciones en qPCR	
					MON810	hmgA
Hoja de maíz no filizada)	10.0	4	2 \pm 0.2 g	8	16	16
	1.0	4	2 \pm 0.2 g	8	16	16
	0.1	4	2 \pm 0.2 g	8	16	16
Hoja de maíz (liofilizada)	10.0	4	200 \pm 20 mg	8	16	16
	1.0	4	200 \pm 20 mg	8	16	16
	0.1	4	200 \pm 20 mg	8	16	16

GM: maíz genéticamente modificado. ♦ GM: genetically modified maize.

Cuantificación por qPCR

Los resultados de la cuantificación de las mezclas GM con la técnica de dPCR se compararon con la cuantificación de la secuencia MON810 y del gen endógeno *hmgA* por qPCR, con una curva de calibración para cada secuencia, en el intervalo dinámico de 0.1 a 100 ng de ADN de una hoja con la modificación genética MON810 (100 % GM). La cantidad de OGM en las mezclas se calculó con las curvas de calibración y la concentración se expresó en porcentaje (m/m) de acuerdo con la ecuación 1 (EURL-GMFF y ENGL, 2010):

$$OMG(\%) = \frac{\text{ng de secuencia GM}}{\text{ng de secuencia } hmgA} \times 100 \quad (1)$$

Para generar trazabilidad en las mediciones al SI y con base en la normativa ISO/IEC 17511:2005 se evaluó 100 % GM que sirvió como calibrante, en número de copias, usando el plásmido certificado EMR AD-413, del Instituto para Materiales de Referencia y Medidas (IRMM, Geel, Bélgica). Una curva de calibración se construyó con concentraciones nominales de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 copias del plásmido. Para obtener la concentración de OGM de las mezclas de hoja en porcentaje con los resultados obtenidos, se usó la ecuación 2 (EURL-GMFF y ENGL, 2010):

$$OMG(\%) = \frac{\text{cantidad de secuencia GM}}{\text{cantidad de secuencia } hmgA} \times 100 \quad (2)$$

Para estas pruebas, cada muestra se analizó por cuadruplicado empleando las plataformas LightCycler® 480 (LC480) (Roche Inc., Indianapolis, IN, USA), ABI7500 y ViiA 7 (ABI, ibid); correspondientemente, se utilizó en cada reacción de PCR LightCycler® 480 Probes Master (Roche, ibid) y TaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI, ibid). En todos los casos, iniciadores y sondas TaqMan® (ABI, ibid) para MON810 y *hmgA* ya descritas, en un volumen final de 20 μ L, que incluían 10 μ L de Master Mix, sonda e iniciadores a una concentración final de 180 nM y 300 nM, respectivamente, 2 μ L de ADN y la cantidad suficiente de agua estéril para completar 20 μ L.

Cada análisis por PCR incluyó testigos negativos con ADN de una especie diferente a maíz, en este caso ADN de semilla de algodón para la respuesta a la secuencia endógena de maíz *hmg*, y para la secuencia MON810 una muestra de maíz no modificado, así como un testigo reactivos (sin ADN), ambas por duplicado. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, y 40 ciclos de amplificación de 95 °C por 10 s, alineamiento de 60 °C por 30 s y elongación de 60 °C por 1 min. Las curvas

MON810 sequence and the endogenous gene *hmgA* by qPCR, with a calibration curve for each sequence, in the dynamic interval of 0.1 to 100 ng DNA from a MON810 genetically modified leaf (100 % GM). The amount of GMO in the mixtures was calculated with the calibration curves and the concentration was expressed in percentage (m/m) according to equation 1 (EURL-GMFF and ENGL, 2010):

$$OMG(\%) = \frac{\text{ng de secuencia GM}}{\text{ng de secuencia } hmgA} \times 100 \quad (1)$$

To generate traceability in the SI measurements and based on the ISO/IEC 17511:2005 rules, 100 % GM, which served as a calibrant, was evaluated in copy number, using the certified EMR®-AD413 plasmid from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium). A calibration curve was constructed with nominal concentrations of 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 copies of the plasmid. To obtain the GMO percentage concentration of the leaf mixtures using the obtained results, equation 2 was applied (EURL-GMFF and ENGL, 2010):

$$OMG(\%) = \frac{\text{cantidad de secuencia GM}}{\text{cantidad de secuencia } hmgA} \times 100 \quad (2)$$

For these tests, each sample was analyzed in quadruplicate using the platforms LightCycler® 480 (LC480) (Roche Inc., Indianapolis, IN, USA), ABI7500 and ViiA 7 (ABI, ibid); correspondingly, in each PCR reaction, LightCycler® 480 Probes Master (Roche, ibid) and TaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI, ibid) were used. In all cases, TaqMan® primers and probes (ABI, ibid) were used for MON810 and *hmgA* described previously in a final volume of 20 μ L, which included 10 μ L Master Mix, probe and primers at a final concentration of 180 nM and 300 nM, respectively, 2 μ L DNA, and the amount of sterile water necessary to complete 20 μ L.

Each PCR analysis included negative controls that contained DNA from a species different from maize, in this case DNA from cotton seed for the response to the endogenous *hmgA* maize sequence and, for MON810 sequence, a sample of unmodified maize, as well as a reagent control (without DNA), both in duplicate. Thermocycling conditions were one cycle at 95 °C for 10 min and 40 amplification cycles at 95 °C for 10 s, alignment at 60 °C for 30 s and elongation at 60 °C for 1 min. The calibration curves had to have linearity and slope between -3.1 and -3.6 to be used for the quantification.

Estimation of the uncertainty associated to the percentage of GMO was obtained with the statistical distribution of the

de calibración debieron poseer linealidad y pendiente entre -3.1 y -3.6 para ser usadas en la cuantificación.

La estimación de la incertidumbre asociada al porcentaje de OGM se obtuvo de la distribución estadística de los resultados, ésta se caracterizó mediante la desviación estándar de los resultados (ecuaciones 3 a 6) (Trapman *et al.*, 2009):

$$uc = \sqrt{u(C_{ref})^2 + (uRSD_{IP})^2} \quad (3)$$

donde uc : incertidumbre típica combinada; $u(C_{ref})$: incertidumbre del componente o material de referencia; $u(RSD_{IP})$: incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

$$uc = u(RSD_{IP}) = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

donde $u(RSD_{IP})$: incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad; SD : promedio de la desviación estándar de la medición; n : número de repeticiones de la medición.

Para obtener la incertidumbre expandida se usa la ecuación.

$$U = (uc)k \quad (5)$$

donde U : incertidumbre expandida; uc : incertidumbre típica combinada; k : factor de cobertura (igual a 2 representado por un intervalo de confianza del 95 %)

Por último, la incertidumbre relativa es obtenida del cociente entre la incertidumbre expandida y el promedio en porcentaje de OGM, como se muestra en la ecuación 6.

$$U \text{ Relativa} = \frac{U(\%)}{x(\%)} \times 100 \quad (6)$$

donde $U \text{ Relativa}$: incertidumbre relativa de la medición; U : incertidumbre expandida; x : Promedio en % de OGM de cada medición.

Cuantificación por dPCR

Los ensayos de dPCR se hicieron en la plataforma OpenArray® Real-Time PCR System, que es una placa OpenArray® Digital

results, characterized by the standard deviation of the results (equations 3 to 6) (Trapman *et al.*, 2009):

$$uc = \sqrt{u(C_{ref})^2 + (uRSD_{IP})^2} \quad (3)$$

where uc : typical uncertainty combined; $u(C_{ref})$: uncertainty of the component or reference material; $u(RSD_{IP})$: uncertainty of the measurement component in conditions of repeatability and reproducibility.

$$uc = u(RSD_{IP}) = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

where $u(RSD_{IP})$: uncertainty of the measurement component in conditions of repeatability and reproducibility; SD : average standard deviation of the measurement; n : number of repetitions of the measurement.

To obtain expanded uncertainty, this equation is used:

$$U = (uc)k \quad (5)$$

where U : expanded uncertainty; uc : typical uncertainty combined; k : coverage factor (equal to 2, represented by a confidence interval of 95 %).

Finally, relative uncertainty is obtained from the quotient between expanded uncertainty and the average GMO percentage, as shown in equation 6.

$$U \text{ Relativa} = \frac{U(\%)}{x(\%)} \times 100 \quad (6)$$

where Relative U : relative uncertainty of the measurement; U : expanded uncertainty; x : average % GMO of each measurement.

Quantification by dPCR

The dPCR assays were conducted in the platform OpenArray® Real-Time PCR System, which consists of an OpenArray® Digital PCR plate with 3072 perforations arranged in 48 sub-arrays of 64 wells with a capacity of 33 nL each. These have been treated to permit retention of liquids inside the wells. Each well of the Open Array™ plate was filled by the AccuFill™ System (ABI, *ibid*) from a well of a plate with 384 wells according to the distribution

PCR con 3072 perforaciones, las cuales están en 48 sub-arreglos de 64 pozos con capacidad de 33 nL cada uno. Estos fueron tratados para permitir la retención de líquidos dentro del pozo. Cada pozo de la placa Open Array™ fue llenado por el equipo AccuFill™ System (ABI, *ibid*) desde un pozo de una placa de 384 pozos de acuerdo con la distribución ya establecida en el programa. Una placa de 384 pozos sirvió para cargar 8 placas OpenArray® Digital PCR (Figura 1).

Inicialmente se validó la técnica de dPCR comparando el valor (en número de copias o fracción masa) reportado en los certificados de los materiales de referencia con el obtenido experimentalmente. Del plásmido ERM®-AD413 (EUR22948EN-2007), la concentración de la secuencia MON810 en número de copias de tres concentraciones nominales, 50, 100 y 200 copias, correspondientes a 0.33, 0.66 y 1.32 copias por reacción (Figura 2), respectivamente, se analizó con y sin digestión enzimática (Bhat *et al.*, 2009). Del MRC DMR436IIa (harina) (CENAM, Querétaro, México), se cuantificó la secuencia endógena *hmgA* y MON810 con dos cantidades diferentes de ADN (0.1 y 1 ng) para la amplificación de cada secuencia (Figura 3).

Una vez validada la técnica, se cuantificaron las mezclas para 0.1, 1 y 10 %, se realizaron diluciones en serie con factor 1:10 desde la solución de ADN estandarizada a 50 ng μL^{-1} hasta las concentraciones requeridas para obtener un número de copias entre 0.6 y 1.6, establecido por el fabricante. La cantidad de ADN de cada concentración para la amplificación de la secuencia *hmgA* fue 1 ng, para la secuencia GM al 10 % fue 10 ng y para las mezclas al 0.1 y 1 % fue 100 ng. Después de cuantificar el número de copias de MON810 y *hmgA* en las mezclas GM con dPCR, la cantidad de OGM expresada en porcentaje se calculó con la ecuación 7 (EURL-GMFF y ENGL, 2010).

Todos los casos se evaluaron cuadruplicados, y cada uno incluyó el promedio de 11 sub-arreglos usados en la placa de dPCR y un subarreglo sin la adición de ADN como control de reactivos para cada concentración. El volumen de reacción por subarreglo fue 5 μL , que contenían 2.5 μL de 1X TaqMan® OpenArray® Digital PCR Master Mix (ABI, *ibid*), sonda e iniciadores (secuencias ya descritas) a una concentración final de 180 y 300 nM, respectivamente. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, y 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 20 s, alineamiento a 60 °C por 60 s y elongación a 72 °C por 30 s.

$$OGM(\%) = \frac{\text{copias de secuencia GM}}{\text{copias de secuencia hmgA}} \times 100 \quad (7)$$

Análisis de dPCR

En la fase final de análisis, el programa OpenArray® Digital PCR genera el valor en número de copias y el intervalo de

establecido previamente en el software. A plate with 384 wells served to fill eight OpenArray® Digital PCR plates (Figure 1).

Initially, the dPCR technique was validated by comparing the value (copy number or mass fraction) reported in the certificates of the reference materials with that obtained experimentally. Of the plasmid ERM®-AD413 (EUR22948EN-2007), the concentration of the MON810 sequence in copy number of three nominal concentrations, 50, 100 and 200 copies, corresponding to 0.33, 0.66 and 1.32 copies per reaction (Figure 2), respectively, were evaluated with and without enzymatic digestion (Bhat *et al.*, 2009). Of the MRC DMR436IIa (flour) (CENAM, Querétaro, Mexico), the endogenous *hmgA* and MON810 sequences were quantified with two different amounts of DNA (0.1 and 1 ng) for amplification of each sequence (Figure 3).

Once the technique was validated, the mixtures for 0.1, 1 and 10 %, were quantified, and series dilutions with factor 1:10 from the DNA solution standardized to 50 ng μL^{-1} were carried out until the concentrations required by the manufacturer to obtain a copy number between 0.6 and 1.6 were attained. The amount of DNA of each concentration for the amplification of the *hmgA* sequence was 1 ng, 10 ng for the 10 % GM and 100 ng for the 0.1 and 1 % mixtures. After quantifying the copy number of MON810 and *hmgA* with dPCR in the GM mixtures, the quantity of GMO expressed in percentage was calculated with equation 7 (EURL-GMFF and ENGL, 2010).

All cases were evaluated in quadruplicate and each included the average of 11 sub-arrays used in the dPCR plate and one sub-array with no addition of DNA, as a reagent control for each concentration. The reaction volume per sub-array was 5 μL , that contained 2.5 μL of 1X TaqMan® OpenArray® Digital PCR Master Mix (ABI, *ibid*), probe and primers (sequences described above) at a final concentration of 180 and 300 nM, respectively. The thermocycling conditions were one cycle at 95 °C for 10 min and 40 amplification cycles at 95 °C for 20 s, alignment at 60 °C for 60 s and elongation at 72 °C for 30 s.

$$OGM(\%) = \frac{\text{copias de secuencia GM}}{\text{copias de secuencia hmgA}} \times 100 \quad (7)$$

Analysis of dPCR

In the final phase of analysis, the OpenArray® Digital PCR software generates the value in copy number and the confidence interval of each analyzed sample on the OpenArray® Digital PCR plate. For each sample, the software generates the copy number of each sub-array with a confidence interval of 95 % by counting the number of positive reactions, relative to the number of partitions, using the Poisson binomial approximation based on the number of partitions that the amplification products contain

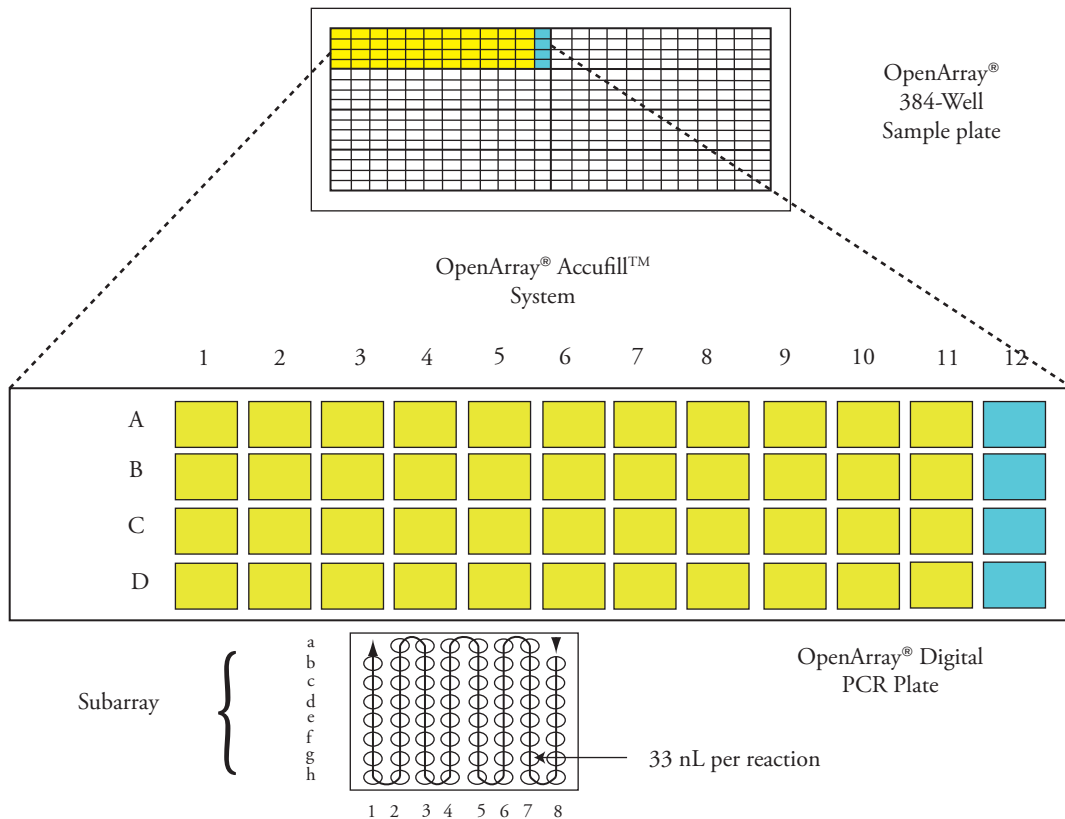


Figura 1. Distribución de la mezcla de reacción desde la placa de 384 pozos a placa OpenArray® Digital PCR.
Figure 1. Distribution of the reaction mixture from a 384 wells plate to the well OpenArray® Digital PCR plate.

confianza de cada muestra analizada en la placa de OpenArray® Digital PCR. Para cada muestra el programa genera el número de copias de cada subarreglo con un intervalo de confianza de 95 %, mediante el conteo del número de reacciones positivas con relación al número de particiones usando la aproximación binomial de Poisson, basada en el número de particiones con productos amplificados y el número total de particiones analizadas (Corbisier *et al.*, 2010), de acuerdo con la ecuación 8. Para cada posición del subarreglo el programa asigna un valor positivo (1) cuando detecta una amplificación dentro de un intervalo aceptable o negativo (0) si no hay una amplificación. El programa no permite el ajuste manual del ciclo de amplificación o Ct asociado con cada nano reacción. El programa OpenArray® Digital PCR genera, desde los datos procesados, mapas en dos dimensiones que permiten revisar mediante color el resultado de la variación de copias en cada una de las posiciones de los subarreglos de la placa OpenArray® Digital PCR:

$$M = \frac{\left(\log \left(1 - \frac{H}{C} \right) \right)}{\left(\log \left(1 - \frac{1}{C} \right) \right)} \quad (8)$$

and the total number of partitions analyzed (Corbisier *et al.*, 2010), according to equation 8. For each position of the subarray, the program assigns a positive value (1) when it detects an amplification within the acceptable interval, or negative (0) when there is no amplification. The program does not permit manual adjustment of the amplification cycle or Ct associated with each of the nano-reactions. The OpenArray® Digital PCR software generates two-dimensional colored maps from the processed data that permit reviewing the result of the variation of copies in each of the positions of the sub-arrays of the OpenArray® Digital PCR plate.

$$M = \frac{\left(\log \left(1 - \frac{H}{C} \right) \right)}{\left(\log \left(1 - \frac{1}{C} \right) \right)} \quad (8)$$

where *M*: number of molecules per panel; *H*: number of partitions the amplified product contains; *C*: total number of partitions analyzed.

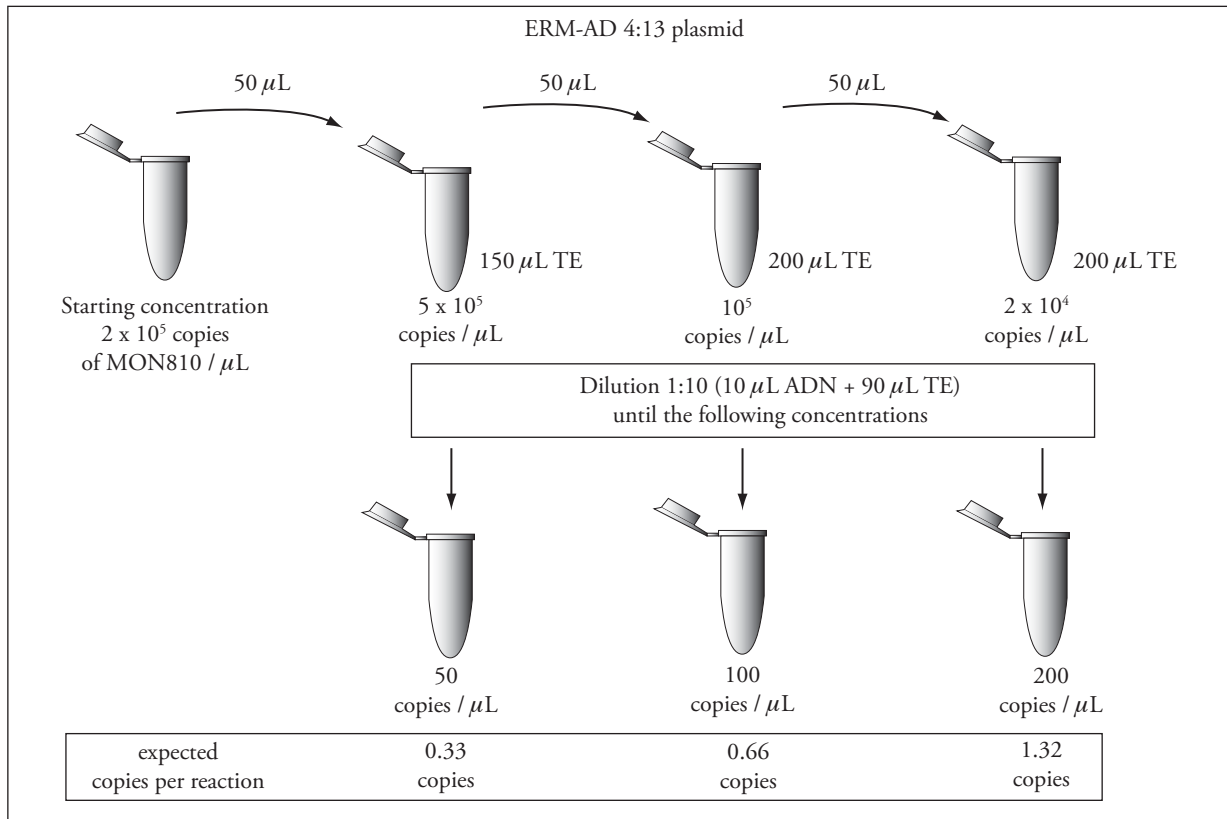


Figura 2. Diluciones del plásmido ERM-AD413 para su cuantificación por dPCR.
Figure 2. Dilutions of the plasmid ERM-AD413 for quantification by dPCR.

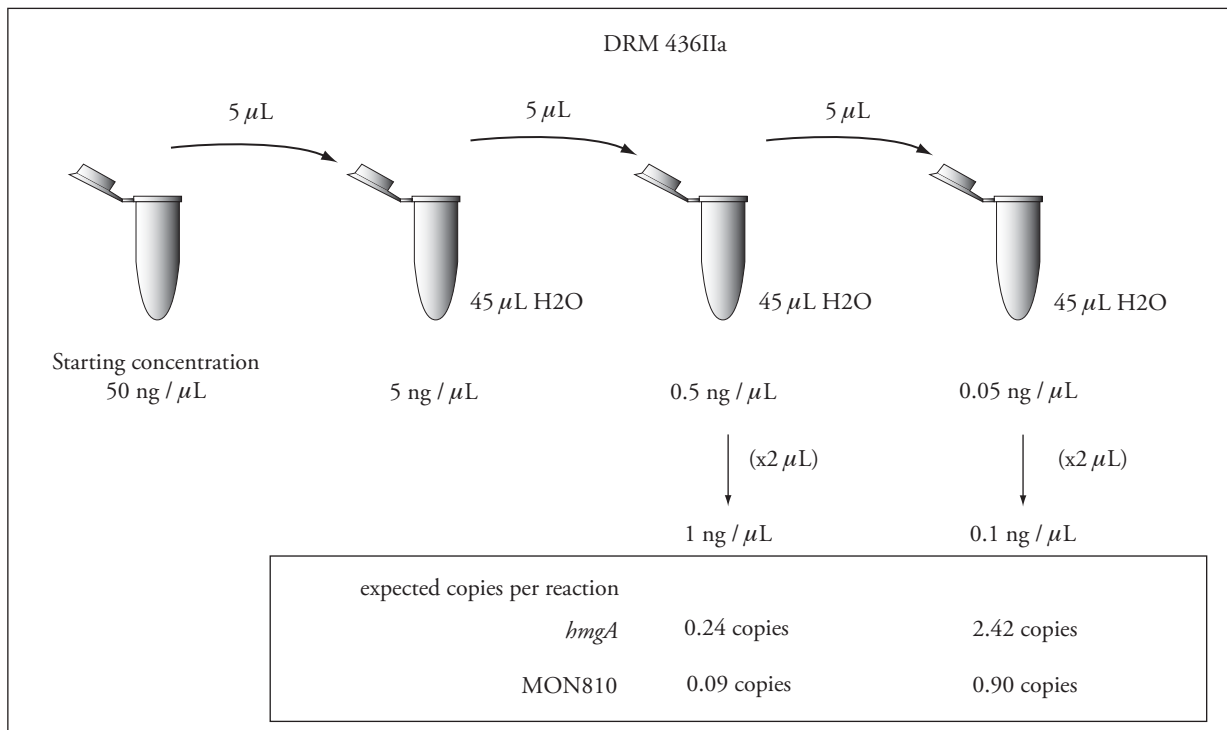


Figura 3. Diluciones del MRC DRM 436IIa para su cuantificación por dPCR.
Figure 3. Dilutions of MRC DRM 436IIa for quantification by dPCR.

donde M : número de moléculas por panel; H : número de particiones que contienen producto amplificado; C : número total de particiones analizadas.

Análisis estadístico de los resultados del dPCR

El programa Digital PCR® genera el valor promedio y un intervalo de confianza para cada cuantificación en número de copias. Para las mezclas GM, donde los resultados se expresan en porcentaje de la secuencia GM con respecto a la secuencia endógena, el análisis estadístico se realiza con las ecuaciones 3 a 6, considerando $U(\text{ref})$ igual a 0 porque no se usa material de referencia. Las fórmulas de incertidumbre están referenciadas a la guía de medición de incertidumbre publicada por la JRC (Trapman *et al.*, 2009), pero la incertidumbre del material de referencia en el cálculo es cero debido a que la PCR digital no necesita un material de referencia para la cuantificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del material recolectado

La identificación de la modificación genética MON810 se realizó en las 51 hojas recolectadas (Figura 4) a partir del permiso de liberación al ambiente 094/2010 (CIBIOGEM, 2010), y se comprobó en 47 de ellas; pero en ninguna de las 31 hojas convencionales se detectó la modificación genética. Además de la identificación de la modificación genética de MON810, en todas las hojas se realizó la amplificación de la secuencia endógena del maíz (*hmgA*), que sirvió como secuencia normalizadora para las pruebas cuantitativas en qPCR. La amplificación de esta secuencia fue positiva en todas las hojas, con valor experimental promedio $Ct_{hmgA}=23.5$ y para la secuencia transgénica de $Ct_{MON810}=26.3$ (Figura 5). La diferencia entre la secuencia endógena y la GM fue 2.8 ciclos, que es mayor al esperado de 1 Ct. Lo anterior tiene como base la ecuación de la PCR (2^n), donde n es el número de ciclos de amplificación, y la composición genética teórica del ADN de la hoja de maíz GM, en la cual 50 % del material genético proviene de la herencia paterna o materna. En este caso, comercialmente se usan líneas de herencia paterna, y se esperaba que el número de copias GM en el tejido vegetal se encontrara en esa proporción, y genera una reacción de qPCR con Ct de amplificación del gen endógeno con un ciclo antes que Ct de la secuencia

Statistical analysis of the results of dPCR

Digital PCR® software generates the average value and the confidence interval for each quantification in copy number. For the GM mixtures, where the results are expressed in percentage of the GM sequence, relative to the endogenous sequence, statistical analysis is done with equations 3 to 6, considering $U(\text{ref})$ equal to zero, because no reference material is used. The uncertainty equations are referenced to the guide of uncertainty measurement published by the JRC (Trapman *et al.*, 2009), but the uncertainty of the reference material in the calculation is zero since the digital PCR does not need reference material for the quantifications.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of collected material

The genetic modification MON 810 was identified in 51 collected leaves (Figure 4), based on license 094/2010, which permitted its release into the environment (CIBIOGEM, 2010), and genetic modification was confirmed in 47. In the 31 conventional leaves, no genetic modification was detected. Besides identification of the MON810 genetic modification, in all of the leaves, the endogenous maize sequence (*hmgA*) was amplified; this served as a normalizing sequence for the quantitative assays in qPCR. Amplification of this sequence was positive in all of the leaves, with an average experimental value of $Ct_{hmgA}=23.5$ and, for the transgenic sequence, of $Ct_{MON810}=26.3$ (Figure 5). The difference between the endogenous sequence and the GM sequence was 2.8 cycles, which is higher than the expected 1 Ct. This is based on the PCR (2^n) equation, where n is the number of amplification cycles and the theoretical genetic composition of the GM maize leaf DNA, in which 50 % of the genetic material is paternal or maternal inheritance. In this case, commercially, paternal inheritance lines are used. For this reason, it was expected that the number of GM copies in the plant tissue would be found in that proportion and would generate a qPCR reaction with amplification Ct of the endogenous gene one cycle before Ct of the GM sequence. The results suggested that atypical behavior of the mixtures should be expected since the calculated value did not correspond to the 50 % theoretical value.



Figura 4. Recolección de muestras a partir del permiso de liberación al ambiente 094/2010 ubicado en el estado de Chihuahua (CIBIOGEM, 2010), de un cultivo de maíz genéticamente modificado conteniendo el evento MON810 y de maíz convencional.

Figure 4. Sample collection of genetically modified maize containing the MON810 event, based on permit 094/2010 for release into the environment, in the state of Chihuahua (CIBIOGEM, 2010), and of conventional maize.

GM. Los resultados permitían esperar que las mezclas presentaran un comportamiento atípico, ya que el valor calculado no correspondió al 50 % del valor teórico.

Elaboración de mezclas GM y extracción de ADN

Las mezclas GM con hojas frescas y liofilizadas se analizaron según el diagrama en la Figura 6 y las cantidades del Cuadro 2. En todos los casos se obtuvieron concentraciones de ADN mayores a $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, por lo cual se cuantificaron las mezclas.

Cuantificación de las mezclas por qPCR

Los resultados de la cuantificación de las mezclas con muestras húmedas y uso de la curva de calibración

Preparation of GM mixtures and DNA extraction

GM mixtures of moist and lyophilized leaves were analyzed according to the diagram in Figure 6 and to the quantities in Table 2. In all cases, DNA concentrations above $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ were obtained, and so the mixtures were quantified.

Quantification of mixtures by qPCR

The results of the quantification of the mixtures of moist samples using the calibration curve of the 100 % GM leaf were far from the theoretical values, even when considering the relative uncertainty associated with the average expected values (Table 3). There was an over estimation of the amount of GMO, relative to the theoretical values. We ruled

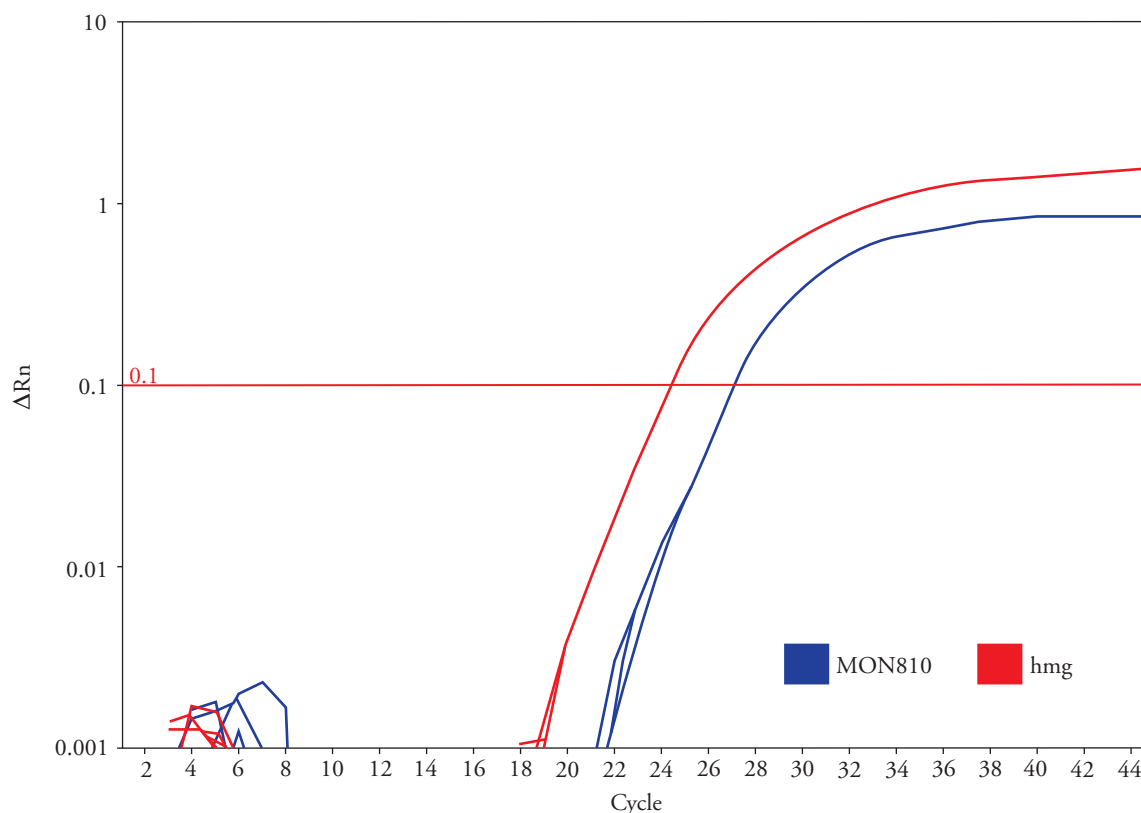


Figura 5. Amplificación de las secuencias MON810 y *hmgA* en la hoja 100 % GM.
 Figure 5. Amplification of the MON810 and *hmgA* sequences of a 100 % GM leaf.

de la hoja 100 % GM estuvieron lejos de los valores teóricos, inclusive cuando se consideró la incertidumbre relativa asociada con los valores promedio esperados (Cuadro 3). Una sobre estimación en la cantidad de OGM se observó respecto a los valores teóricos. Se descartó que los factores analíticos fueran el origen de la desviación en los resultados de cuantificación, ya que los valores de eficiencia de amplificación en las curvas de calibración se encontraron dentro de los rangos permitidos (Mazzara *et al.*, 2008; ENGL Working Group on Method Verification, 2011), 98.3 y 90.3 % para *hmgA* y MON810, y ambas con $R^2 \geq 0.98$. Además, los valores calculados de la desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSD_r) mostraron que el ensayo es preciso, pues las desviaciones fueron menores de 25 %, de acuerdo con la normativa europea (Mazzara *et al.*, 2008; ENGL Working Group on Method Verification, 2011). La incertidumbre relativa, aplicable sólo a la cuantificación experimental, es aceptable y comparable con resultados de publicaciones similares

out that the analytical factors were the origin of the deviation in the quantification results since the values of amplification efficiency in the calibration curves were found within the permitted range (Mazzara *et al.*, 2008; ENGL Working Group on Method Verification, 2011), 98.3 and 90.3 % for *hmgA* and MON810, both with $R^2 \geq 0.98$. Moreover, the calculated values of the relative standard deviation in conditions of repeatability (RSD_r) showed that the assay is precise, the deviations being less than 25 %, according to the European normativity (Mazzara *et al.*, 2008; ENGL Working Group on Method Verification, 2011). Relative uncertainty, applicable only to experimental quantification, is acceptable and comparable to results of similar publications (Mazzara *et al.*, 2008; ENGL Working Group on Method Verification, 2011).

Because the variation may have been due to the moisture content of the leaves in the mixtures, the lyophilized mixtures were quantified (Tables 2 and 4). The mixtures showed satisfactory results

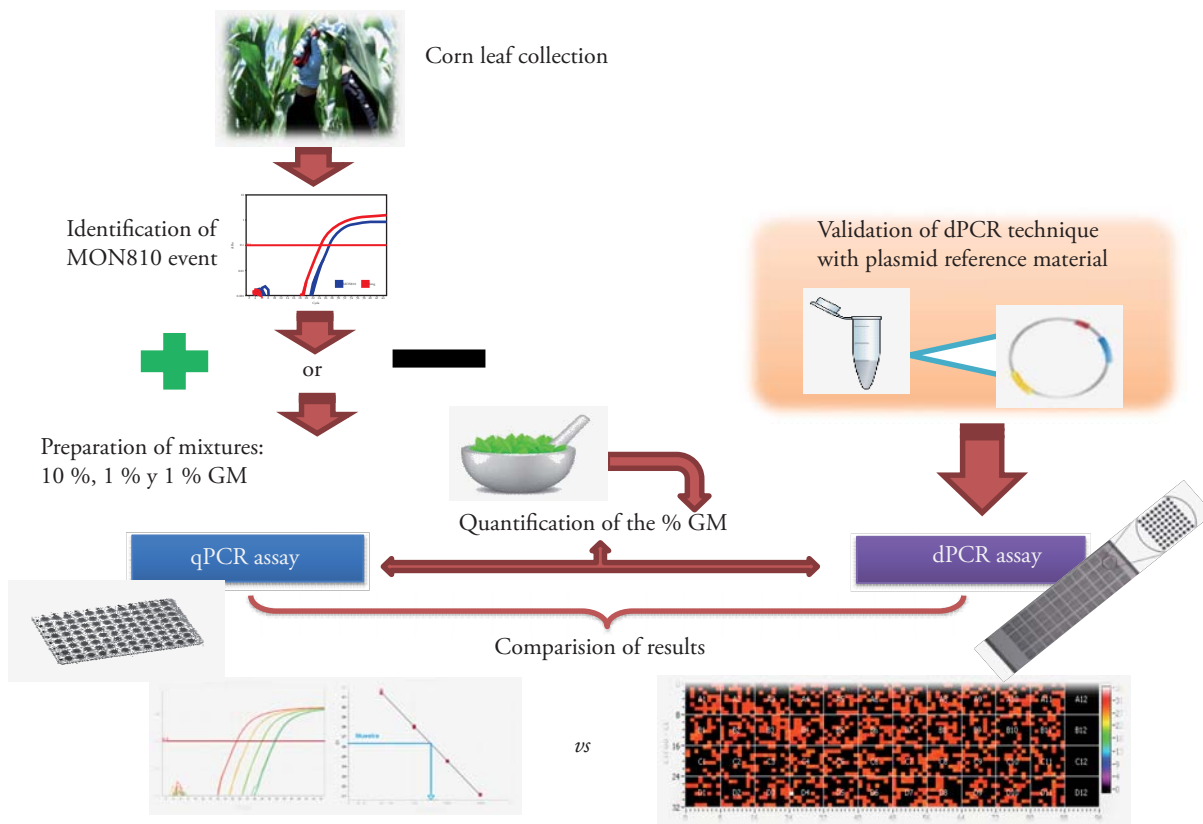


Figura 6. Diagrama experimental del estudio para la comparación en la medición del % OGM mediante las técnicas de qPCR y dPCR.

Figure 6. Experimental diagram of the study for comparison of % GMO measurement with the techniques qPCR and dPCR.

Cuadro 2. Muestras para la elaboración de las mezclas de maíz genéticamente modificado (GM).

Table 2. Samples for preparation of the mixtures of genetically modified (GM) maize.

	Mezcla en % teórico (mm)	Hoja GM (g)	Hoja convencional (g)	Mezcla (g)	Mezcla % real (m/m)
Hoja con humedad	10.0	1.0486	9.0429	10.0915	10.39
	1.0	0.1031	9.9320	10.0351	1.03
	0.1	0.0100	9.9860	9.9996	0.10
Hoja liofilizada	10.0	0.2010	1.7957	1.9967	10.07
	1.0	0.0260	1.9759	2.0019	1.30
	0.1	0.0024	1.9993	2.0017	0.12

(Mazzara *et al.*, 2008; ENGL Working Group on Method Verification, 2011).

Esa variación podría deberse al contenido de humedad de las hojas en las mezclas, por lo cual, se cuantificaron las mezclas liofilizadas (Cuadro 2 y 4). Las mezclas mostraron resultados satisfactorios, por

because they were comparable, precise (RSD_r below 25 % in all cases) and repeatable. The uncertainty of the measurement component in conditions of repeatability, $u(RSD_{IP})$, was reduced proportionally to a minimal value with the increase in the percentage of the GM mixture. The value of $u(RSD_{IP})$ decreased

Cuadro 3. Resultados de cuantificación por qPCR de mezclas de maíz genéticamente modificado (GM) húmedas.
Table 3. Results of the qPCR quantification of mixtures of moist genetically modified (GM) maize leaves.

Parámetro estadístico	Mezclas % GM (m/m)		
Valor promedio en fracción masa	0.100	1.030	10.390
Valor promedio experimental	0.424	2.194	16.496
S	0.105	0.662	3.660
RSDr	6.160	7.540	5.550
U(RSDIP)	0.026	0.165	0.915
Ucombinada (uc)	0.026	0.165	0.915
Uexpandida	0.052	0.331	1.830
Urelativa	12.322	15.088	11.092

Donde S: desviación estándar, RDRr: componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, U(RSDIP): Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, U: incertidumbre. ♦ S: standard deviation, RDRr: measurement component in conditions of repeatability and reproducibility, U(RSD_{IP}): Uncertainty of the measurement condition in conditions of repeatability and reproducibility, U: uncertainty.

Cuadro 4. Resultados de cuantificación por qPCR de mezclas de maíz genéticamente modificado (GM) liofilizadas.
Table 4. Results of qPCR quantification of lyophilized genetically modified (GM) maize mixtures.

Parámetro estadístico	Mezclas % GM (m/m)		
Valor promedio en fracción masa	0.120	1.300	10.070
Valor promedio experimental	0.083	1.010	11.310
S	0.025	0.139	0.925
RSDr	9.640	4.360	2.580
U(RSDIP)	0.008	0.044	0.292
Ucombinada (uc)	0.008	0.044	0.292
Uexpandida	0.016	0.088	0.585
Urelativa	18.940	8.800	5.170

Donde S: desviación estándar, RDRr: componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, U(RSDIP): incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, U: incertidumbre. ♦ S: standard deviation, RDRr: measurement component in conditions of repeatability and reproducibility, U(RSD_{IP}): Uncertainty of the measurement condition in conditions of repeatability and reproducibility, U: uncertainty.

ser comparables, precisos (RSDr menores de 25 % en todos los casos) y repetibles. La incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad $u(\text{RSD}_{IP})$ se redujo a un valor mínimo, proporcionalmente con el incremento del porcentaje de la mezcla GM. El valor de la $u(\text{RSD}_{IP})$ disminuyó y mostró que las condiciones de repetibilidad no afectaron la precisión del resultado.

Debido a que las mezclas GM elaboradas con hojas liofilizadas aportaron un valor más cercano a los valores en fracción masa, las cuantificaciones se realizaron a partir de estas mezclas, en lugar de las mezclas con hojas húmedas.

and showed that the conditions of repeatability did not affect the precision of the result.

Because the GM mixtures made from lyophilized leaves furnished a value closer to the values in mass fraction, the quantifications were carried out with these mixtures instead of the mixtures with moist leaves.

Having constructed the calibration curve with MRC EMR®-AD413 for the MON810 and *hmgA* sequences (Table 5), the copy numbers of the sequences of the 100 % GM leaf were quantified; these sequences served as calibrant in the previous assays together with the GM mixtures.

Con la curva de calibración elaborada con el MRC EMR AD-413 para las secuencias MON810 y *hmgA* (Cuadro 5) se cuantificó el número de copias de dichas secuencias de la hoja 100 % GM, y sirvió como calibrante en las pruebas anteriores, junto con las mezclas GM.

Una vez obtenido el número de copias se aplicó la ecuación 3 para calcular los valores en fracción masa (Cuadro 6). Los resultados experimentales coincidieron con el valor teórico predicho, pues con base en la fisiología del maíz se espera obtener 50 % del material genético modificado y los resultados experimentales. Así, los valores obtenidos de U_r son los esperados, son precisos y reproducibles, ya que los valores de RSD_r son menores a 25 % y coinciden con los criterios de aceptación establecidos por la regulación aplicable a los análisis de OGM en la Unión Europea (EURL-GMFF y ENGL, 2010).

Validación de la técnica de dPCR

Para validar la técnica se evaluó la concentración en número de copias del plásmido ERM[®]-AD413, con y sin digestión enzimática, la amplificación se realizó sólo de la secuencia MON810, y se analizaron tres concentraciones nominales (Figura 7). De acuerdo con los resultados obtenidos, las concentraciones nominales de valor menor (0.33 y 0.66 copias por reacción, correspondientes a 50 y 100 copias), fueron comparables con el valor nominal esperado y,

Cuadro 5. Datos de la curva de calibración con el MRC EMR AD-413.

Table 5. Data of the MRC EMR[®]-AD413 calibration curve.

Parámetro de aceptación	Secuencia blanco	
	<i>hmgA</i>	MON810
Eficiencia (90-110 %)	94.574	92.593
Pendiente (-3.1 a -3.6)	-3.459	-3.513
$R^2 \geq 0.98$	1.000	0.999

Once the copy number was obtained, equation 3 was used to calculate the values in mass fraction (Table 6). The experimental results coincided with the predicted theoretical values since, based on maize physiology, 50 % was expected from the modified genetic material and the experimental results. Thus, the U_r results obtained are the expected results; they are precise and reproducible since the RSD_r values are below 25 % and coincide with the acceptance criteria established by the regulation applicable to GMO analysis in the European Union (EURL-GMFF and ENGL, 2010).

Validation of the dPCR technique

To validate the technique, the concentration in copy number of the ERM[®]-AD413 plasmid was evaluated, with and without enzymatic digestion.

Cuadro 6. Evaluación de las mezclas de maíz genéticamente modificado (GM) liofilizadas por qPCR el plásmido ERM[®] AD-413 usado como calibrante certificado.

Table 6. Evaluation of lyophilized mixtures of genetically modified (GM) maize using the qPCR technique; the ERM[®]-AD413 plasmid used as a certified calibrant.

Parámetro estadístico	Material y mezclas (%) GM			
Valor % GM (m/m)	0.12	1.30	10.07	100.00
Valor teórico esperado	0.06	0.65	5.04	50.00
Valor promedio experimental	0.07	0.86	4.29	45.47
S	0.01	0.07	0.14	1.20
RSD _r	0.01	0.03	0.07	0.60
U(RSDIP)				-
Ucombinada (uc)	0.01	0.03	0.07	0.60
Uexpandida	0.01	0.07	0.14	1.20
Urelativa	14.88	7.91	3.35	2.65

Donde S: desviación estándar, RDRr: componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, U(RSDIP): Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, U: incertidumbre. ♦ S: standard deviation, RDRr: measurement component in conditions of repeatability and reproducibility, U(RSD_{IP}): Uncertainty of the measurement condition in conditions of repeatability and reproducibility, U: uncertainty.

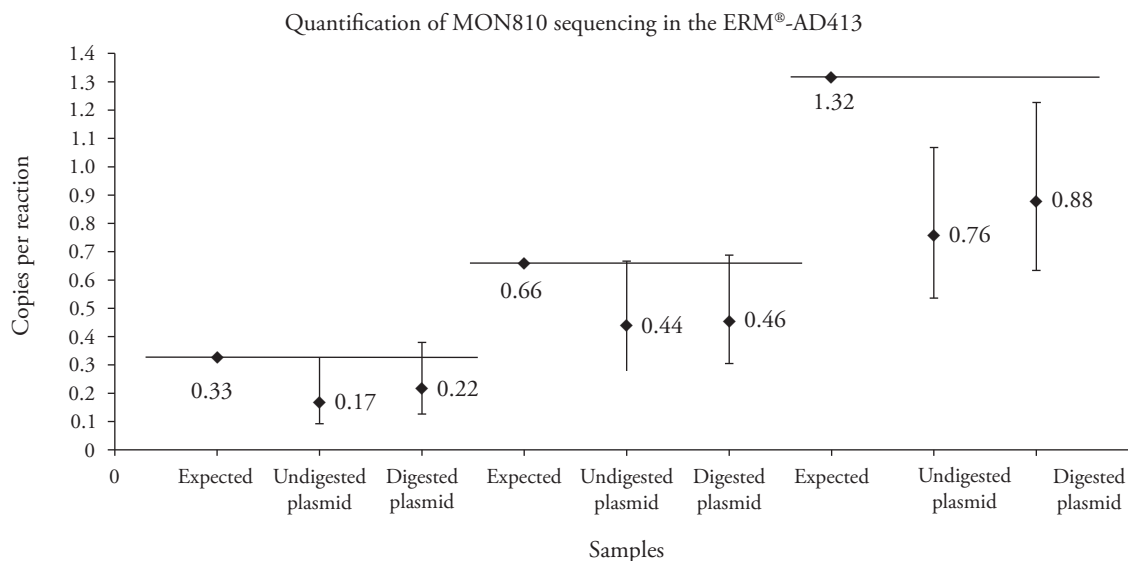


Figura 7. Resultados obtenidos de la medición en dPCR del material de referencia ERM[®]-AD413 digerido y sin digerir. Las barras en la figura representan los intervalos de confianza generados por el software OpenArray[®] Real-Time PCR.
Figure 7. Results obtained of dPCR measure of the reference material ERM[®]-AD413, digested and undigested. The bars in the figure represent the confidence intervals generated by the software OpenArray[®] Real-Time PCR.

con base en los valores del intervalo de confianza que genera el software del equipo OpenArray[®] Real-Time PCR, los resultados no mostraron diferencia con la evaluación del plásmido digerido y sin digerir. Estos resultados condujeron a la evaluación con el plásmido sin digerir.

Los resultados de la cuantificación del DMR-436IIa por dPCR mostraron que al utilizar 0.1 ng de la secuencia MON810 por subarreglo ($42.1 \pm 3.6\%$) fueron comparables con el reportado en fracción masa, al considerar la incertidumbre expandida con un factor de cobertura de 2 (Figura 8).

Lo anterior permitió concluir que los valores son comparables con los reportados en un certificado (Corbisier *et al.*, 2007) emitido por institutos de metrología (IRMM y CENAM), que fueron obtenidos con procedimientos estandarizados en laboratorios acreditados (ISO Guide 34:2009) con la técnica de qPCR, que es la más usada en pruebas moleculares debido al gran soporte técnico y validación en todo el mundo. El presente estudio es el primero realizado en la plataforma de OpenArray[®] Real-Time PCR System y aplica para medir secuencias GM. Los resultados de validación permitieron seguir con la siguiente etapa de cuantificación de las mezclas.

Amplification was carried out only for the MON810 sequence, and three nominal concentrations were analyzed (Figure 7). According to the results obtained, the nominal concentrations of lower value (0.33 and 0.66 copies per reaction, corresponding to 50 and 100 copies) were comparable with the expected nominal value. Moreover, based on the values of the confidence interval generated by the OpenArray[®] Real-Time PCR equipment software, the results of the evaluation with the digested plasmid were not different from those with the undigested plasmid. These results led us to evaluate with the undigested plasmid.

Results of the quantification of DMR-436IIa by dPCR showed that when 0.1 ng of the MON810 sequence was used by sub-array ($42.1 \pm 3.6\%$), they were comparable with those reported in mass fraction, considering the expanded uncertainty with a coverage factor of 2 (Figure 8).

It was therefore concluded that the results are comparable with the values reported in a certificate (Corbisier *et al.*, 2007) issued by metrology institutes (IRMM and CENAM) and obtained with standardized procedures in accredited laboratories (ISO Guide 34:209) with the qPCR technique,

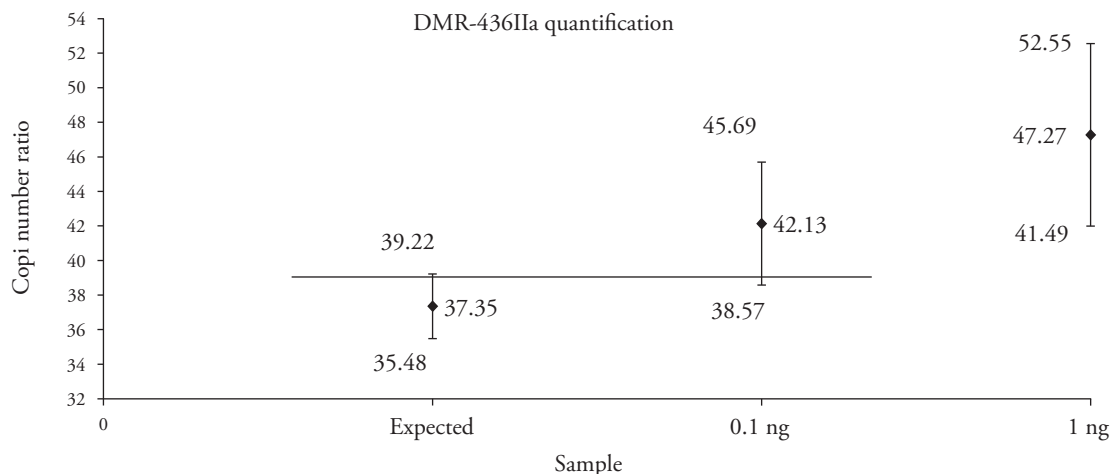


Figura 8. Resultados obtenidos de la cuantificación por dPCR en fracción masa del MRC DMR-436IIa. Las barras en la figura representan los valores de la incertidumbre expandida.

Figure 8. Results obtained in the quantification by dPCR in mass fraction of MRC DMR-436IIa. The bars in the figure represent expanded uncertainty values.

Cuantificación de las mezclas de maíz por dPCR

Las cuantificaciones de las mezclas con las secuencias *hmgA* y GM mostraron disminución del número de amplificaciones, proporcional al porcentaje de cada una de las mezclas para MON810 (Figura 9). La cuantificación de las mezclas por qPCR (Cuadro 7) permitió concluir que los valores obtenidos por dPCR son más precisos, ya que se observa una relación proporcional entre el porcentaje GM obtenido para la hoja 100 % GM y las mezclas elaboradas desde ella. Es decir, entre 0.031, 0.3, 3.69 y 41.87 % el factor de dilución fue cercano a 1:10, y corresponde al factor de dilución usado para elaborar las mezclas de manera gravimétrica.

La incertidumbre fue menor para la mezcla con concentración menor, comparada con la obtenida por qPCR. Sin embargo, los resultados de la cuantificación de la hoja 100 % GM y la mezcla 10 % GM por qPCR fueron más cercanos al valor esperado; así, la cuantificación de esos dos materiales fue más exacta.

Los resultados de la cuantificación por dPCR y qPCR para la hoja 100 % GM fueron 41.87 y 45.45 % (Cuadro 7); así, se consideraron comparables. En este caso la medición se realizó con el ADN de una sola hoja, en la cual se determinó la presencia de la modificación genética de MON810. Entonces, los valores 41.87 y 45.45 % mostraron que en ningún caso

which is the most utilized in molecular experiments because of the good technical support and worldwide validation. The present study is the first to be conducted in the OpenArray® Real-Time PCR System platform applied in measuring GM sequences. The results of validation allowed continuing with the following step in the quantification of the mixtures.

Quantification of maize mixtures by dPCR

Quantifications of the mixtures with the *hmgA* and GM sequences revealed a reduction in the number of amplifications, proportional to the percentage of each of the mixtures for MON810 (Figure 9). Quantification of the mixtures by qPCR (Table 7) led to the conclusion that the values obtained by dPCR are more precise since a proportional relationship was observed between the GM percentage obtained for the leaf 100 % GM and that obtained for the mixtures made from it. That is, in the 0.031, 0.3, 3.69 and 41.87 % mixtures there was a dilution factor close to 1:10, corresponding to the dilution factor used in the gravimetric preparation of the mixtures.

Lower uncertainty was obtained for the mixture with lower concentration, relative to that obtained by qPCR. However, the results of the quantification with qPCR of the 100 % GM leaf and the 10 % GM

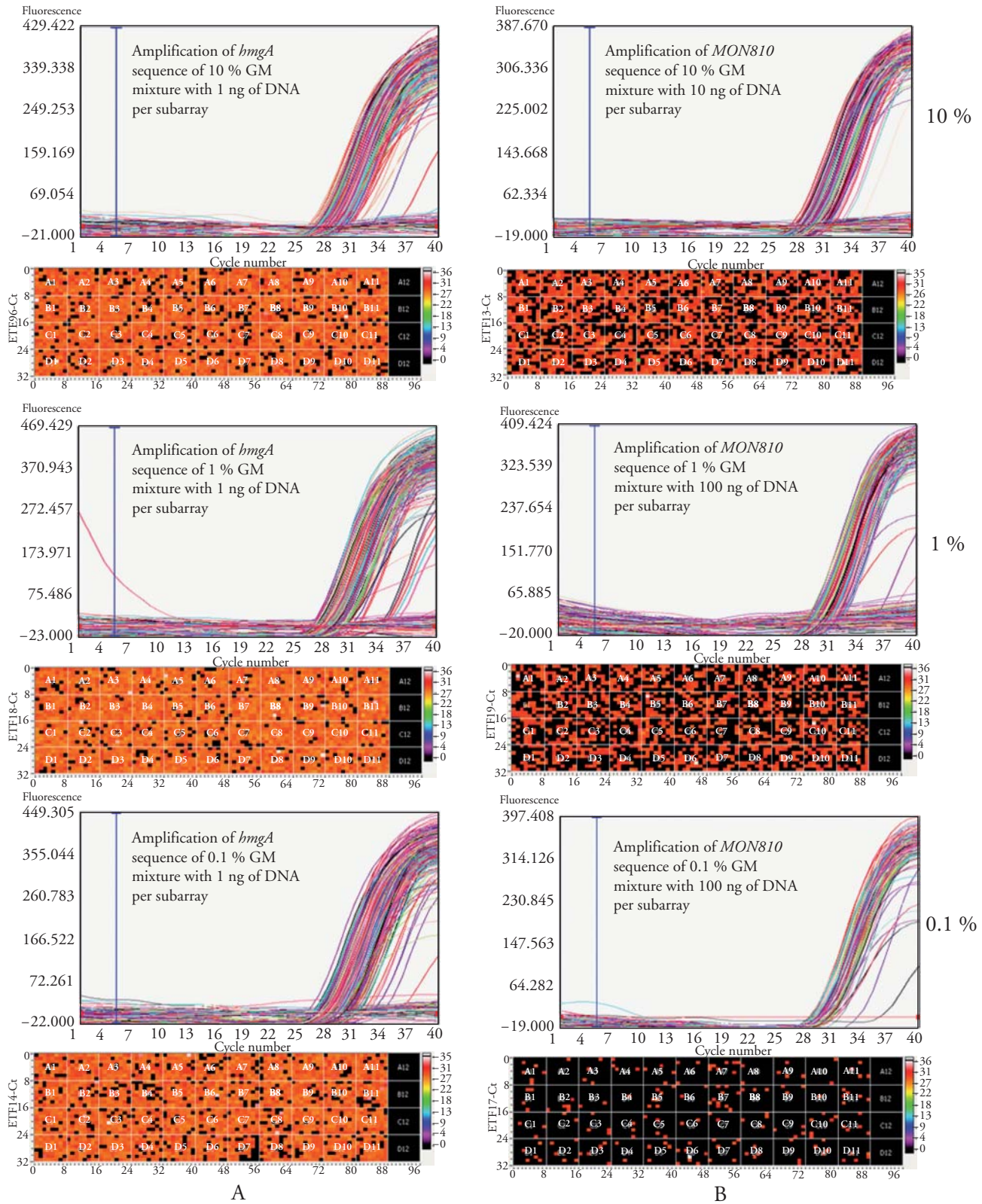


Figura 9. Curvas y mapas de amplificación de Mezcla GM al 10, 1 y 0.1 %. Columna A, resultados de amplificación secuencias *hmgA*. Columna B, resultados de amplificación de secuencia *MON810*.

Figure 9. Amplification curves and maps of the 10, 1 and 0.1 % GM mixtures. Column A, results of amplification of the *hmgA* sequences. Column B, results of amplification of the *MON810* sequence.

Cuadro 7. Resultados de la cuantificación de 0.1, 1, 10 y 100 % de la hoja de maíz genéticamente modificado (GM) por las técnicas qPCR y dPCR.**Table 7. Results of quantification of 0.1, 1, 10 and 100 % genetically modified (GM) maize leaf using the qPCR and dPCR techniques.**

Muestra	dPCR		qPCR	
	%GM	Urelativa	%GM	Urelativa
Mezcla 0.1 %	0.031	12.98	0.07	89.13
Mezcla 1 %	0.300	7.70	0.86	7.01
Mezcla 10 %	3.690	10.39	4.29	1.39
Hoja GM	41.870	2.45	45.45	0.13

se alcanzó el 50 % teórico esperado. Esto puede atribuirse a la eficiencia de amplificación de la secuencia evento específica de MON810 (Figura 5), la diferencia entre el ciclo de amplificación (Ct) para la secuencia *hmgA* y MON810 es de 2.7 ciclos; ambos con contenido similar de ADN (100 ng por reacción). Es decir, la prueba de amplificación para MON810 podría afectar la eficiencia requerida y generar una amplificación que el Ct no se presente exactamente un ciclo después que el de la secuencia endógena. Esto está de acuerdo con la relación de Ct con el factor de dilución, según la igualdad $2^n = \text{Factor de dilución}$, donde n es la diferencia de Ct (EURL-GMFF y ENGL, 2010):

De acuerdo con el valor teórico del 50 % GM para la hoja de maíz, el factor de dilución entre la secuencia *hmgA* y MON810 es 0.5, al substituir en la igualdad anterior, la diferencia de Ct esperada es 1.

CONCLUSIONES

En el presente estudio la técnica de PCR digital se validó usando materiales de referencia certificados por institutos de metrología nacional e internacional. Los resultados fueron comparables entre los valores reportados en los certificados y los determinados experimentalmente con la plataforma OpenArray® Real-Time PCR System. Además, los resultados se expresaron en número de copias para ERM-AD413, y en porcentaje GM para DMR-436IIa, lo cual contribuye a la validación de la técnica en la cuantificación de secuencias transgénicas. La cuantificación de hojas de maíz por PCR en tiempo real y PCR digital con la presencia del evento MON810 después de validar la técnica permitió obtener los resultados de

mixture were closer to the expected value; and thus, the quantification of these two materials was more exact.

The results of quantification by dPCR and qPCR for the 100 % GM leaf were 41.87 and 45.45 % (Table 7) and were thus considered comparable. In this case, measurement was done with the DNA of a single leaf, in which the presence of the MON810 genetic modification had been determined. Thus, the values 41.87 and 45.45 % showed that no case reached the expected theoretical 50 %. This may be attributed to the amplification efficiency of the specific MON810 event sequence (Figure 5). The difference in amplification cycles (Ct) between the *hmgA* sequence and that of MON810 was 2.7 cycles; the two had similar contents of DNA (100 ng per reaction). That is, the amplification assay for MON810 could affect the required efficiency and generate an amplification whose Ct does not occur exactly one cycle after that of the endogenous sequence. This is according to the relationship between the Ct and the dilution factor, $2^n = \text{dilution factor}$, where n is the Ct difference (EURL-GMFF and ENGL, 2010).

In accordance with the theoretical value of 50 % GM for the maize leaf, the dilution factor between the *hmgA* and MON810 sequences is 0.5; when this value is substituted in the above equation, the expected difference in Ct is 1.

CONCLUSIONS

In this study, the digital PCR technique was validated using reference materials certified by national and international metrology institutes.

cuantificación de mezclas por PCR digital más cercanos a los porcentajes en fracción masa de las mezclas realizadas que los obtenidos por la técnica tradicional de PCR en tiempo real.

La caracterización de cada hoja recolectada permitió establecer la presencia o ausencia del evento MON810; a la vez, esto condujo a realizar las mezclas genéticamente modificadas en fracción masa al 0.1, 1 y 10 %, con una hoja 100 % GM como calibrante para los ensayos por PCR en tiempo real y el tejido liofilizado, lo cual mejoró la cuantificación. Con las mezclas liofilizadas se obtuvieron resultados comparables entre las dos técnicas PCR en tiempo real y digital. Los resultados por PCR digital son los más próximos a los valores esperados en fracción masa de las mezclas.

En conclusión, la técnica de PCR digital a través de la plataforma OpenArray® Real-Time PCR System es aplicable para cuantificar el material vegetal genéticamente modificado y puede utilizarse en la caracterización de materiales de referencia, usados como calibrantes, en pruebas de PCR en tiempo real.

LITERATURA CITADA

Bhat, S., J. Hermann, P. Armishaw, P. Corbisier, and K. R. Emslie, K. 2009. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Anal. Bioanal. Chem.* 394: 457-467.

CERA (GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment). 2012. ILSI Research Foundation, Washington, D.C. <http://www.cera-gmc.org/GmCropDatabaseEvent/MON810%20#>. (Consulta: enero de 2015).

CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los OGM). 2010. Registro Nacional de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. CIBIOGEM, CONACYT. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/resoluciones/permisos>. (Consulta: agosto de 2013).

Corbisier, P., Broeders, S., Charles, S., Trapmann, S., Vincent, S. and Emons, H. 2007. Certification report. Certification of plasmidic DNA containing MON 810 maize DNA fragments. Certified Reference Material ERM®-AD413. Institute for Reference Material and Measurements (IRMM) and European Reference Materials (ERM). 37 p. https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/rm/ERM-AD413_report.pdf. (Consulta: agosto de 2013).

Corbisier, P., S. Bhat, L. Partis, V. R. D. Xie, and K. R. Emslie. 2010a. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Anal. Bioanalytical. Chem.* 396: 2143-2150.

ENGL Working Group on Method Verification. 2011. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. Joint Research Centre and Office for Official Publications of the European Communities, 23 p. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/>

Comparable results were found between the values reported in the certificates and those determined experimentally with the OpenArray® Real-Time PCR System platform. Moreover, it was possible to express the results in copy number for ERM®-AD413 and in percent GM for DMR-436IIa, contributing to the validation of the technique for quantifying transgenic sequences. Quantification of maize leaves by PCR in real-time and digital PCR with the presence of the MON810 event after validating the technique enabled quantification of mixtures by digital PCR closer to the percentages in mass fraction obtained by the traditional real-time PCR technique.

Characterization of each collected leaf established the presence or absence of the MON810 event. In turn, this led to genetically modified mixtures of 0.1, 1 and 10 % in mass fraction, relative to a 100 % GM leaf as calibrant for real-time PCR assays. Lyophilization of the leaf tissue improved quantification. With the lyophilized mixtures, the results obtained with the two PCR techniques, real time and digital, were comparable. The results obtained by digital PCR are those closest to the expected values in mass fraction of the mixtures.

In conclusion, the digital PCR technique using the platform OpenArray® Real-Time PCR System is applicable to quantification of genetically modified plant material and can be used in the characterization of reference material used as calibrants in real-time PCR assays.

—End of the English version—



repository/handle/111111111/22252. (Consulta: agosto de 2013).

EUR22948EN-2007. CERTIFICATION REPORT. Certification of plasmidic DNA containing MON 810 maize DNA fragments Certified Reference Materials ERM®-AD413. European Commission Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurements. EUR 22948 EN, ISBN 978-92-79-07139-3, ISSN 1018-5593, DOI 10.2787/49996.

EURL-GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed) and ENGL (European Network of GMO Laboratories). 2010. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. Joint Research Centre and Office for Official Publications of the European Communities.

- 259 p. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/15068>. (Consulta: agosto de 2013).
- ISO Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference material producers.
- Luque-Perez, E., M. Mazzara, T. P. Weber, N. Foti, E. Grazioli, B. Munaro, G. Pinski, G. Bellocchi, G. Van den Eede, and C. Savini. 2013. Testing the robustness of validated methods for quantitative detection of GMOs across qPCR instruments. *Food Anal. Methods* 6: 343-360.
- Mazzara, M., C. Savini, C. Delobel, H. Broll, A. Damant, C. Paoletti, and G. Van den Eede. 2008. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO Testing. European Network of GMO Laboratories (ENGL). Joint Research Centre and Office for Official Publications of the European Communities. 8 p. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/5261>. (Consulta: agosto de 2013).
- Mazzara, M., C. Paoletti, P. Corbisier, E. Grazioli, S. Larcher, G. Berben, M. De Loose, I. Folch, C. Henry, N. Hess, L. Hougs, E. Janssen, G. Moran, R. Onori, and G. Van den Eede. 2013. Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a comparative study of protein and DNA-based detection methods for GMO testing. *Food Analytical. Methods* 6: 210-220.
- Monsanto Company. 2002. Safety Assessment of YieldGard® Insect-Protected Corn Event MON 810. 28 p. <http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/dec-docs/02-269-010.pdf>. (Consulta: enero de 2015).
- Trapman, S., M. Burns, H. Broll, R. Macarthur, R. Wood, and J. Zel. 2009. Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories. Joint Research Centre and Office for Official Publications of the European Communities. 48 p. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/guidance-document-measurement-uncertainty-gmo-testing-laboratories>. (Consulta: agosto de 2013).
- Žel, J., K. Cankar, M. Ravnikar, M. Camloh, and K. Gruden. 2006. Accreditation of GMO detection laboratories: improving the reliability of GMO detection. *Accredit. Qual. Assur.* 10: 531-536.