

# TaqMan<sup>®</sup> GMO Maize Quantification Kit

Part No: 4481972

## 1. Introducción

Los organismos modificados genéticamente (OMG) se encuentran ampliamente distribuidos, siendo la soja y el maíz los vegetales que ocupan mayor extensión de cultivo a nivel mundial. Estas especies y sus derivados (almidón de maíz, proteína de soja, etc.) constituyen los ingredientes de más del 60% de los alimentos que consumimos.

La Unión Europea ha establecido un marco legal que regula el empleo, la liberación al medio ambiente y sobre todo, el etiquetado de los productos alimenticios que contienen organismos modificados genéticamente.

El **TaqMan® GMO Maize Quantification Kit**, permite determinar el número de copias del promotor P35S presente en los organismos modificados genéticamente con respecto al número de copias de maíz presente en una muestra. Este sistema de cuantificación de maíz transgénico, está basado en el promotor P35S debido a que esta región reguladora está presente en la mayoría de los eventos transgénicos.

La cuantificación de P35S respecto a maíz permite obtener una estima de la cantidad de material transgénico presente en una muestra. Si en la muestra analizada hay eventos de maíz con varias copias de P35S o eventos de otras especies vegetales, que posean P35S, el resultado obtenido puede estar sobreestimado.

Este kit emplea tecnología Real-Time PCR y contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la cuantificación del promotor P35S con respecto al maíz presente en cualquier alimento o pienso. Además, el kit contiene ADN plasmídico que se emplea como estándar frente al que comparar las muestras con el objetivo de determinar la cantidad de P35S.

## 2. Descripción del kit

El TaqMan® GMO Maize Quantification Kit permite cuantificar el número de copias de P35S con respecto al número de copias de maíz total presente en una muestra.

El análisis de cada muestra incluye dos reacciones de PCR a tiempo real. Una de ellas permite cuantificar la cantidad de maíz total presente en la muestra y la otra reacción permite determinar la cantidad del promotor P35S que contiene la muestra.

### **Reacción para determinar la cantidad de Maíz total:**

Esta reacción incluye dos cebadores y una sonda tipo TaqMan® marcada con el fluoróforo FAM. La reacción permite amplificar de forma específica un gen endógeno del maíz, denominado MSS.

### **Reacción para determinar la cantidad de P35S**

Esta reacción incluye dos cebadores y una sonda tipo TaqMan® marcada con el fluoróforo FAM. La reacción permite amplificar de forma específica el promotor P35S.

El kit incluye un estándar que consiste en ADN plasmídico con una copia de cada una de las dianas empleadas en el análisis. La comparación del resultado obtenido a partir de las muestras con este estándar, permite llevar a cabo la cuantificación relativa y obtener así el porcentaje de P35S con respecto al maíz total presente en cada muestra.

### **Límites de detección y cuantificación**

Límite de cuantificación: 20 copias de ADN

Límite de detección de la PCR (sistema maíz): 3 copias de ADN

Límite de detección de la PCR (sistema P35S): 3 copias de ADN

Este kit permite realizar cuantificaciones relativas de hasta el 0,01% de P35S respecto al maíz total presente en una muestra. El límite de cuantificación relativo, varía en función de la muestra analiza.

### 3. Componentes y almacenamiento del kit

Este kit contiene los reactivos necesarios para la realización de 50 reacciones de cada una de las regiones analizadas (ver apartado anterior):

Reactivos	Identificación	Cantidad	Conservación
Master Mix P35S	Disco azul	413 µl	-20°C
Master Mix Maize	Disco rojo	413 µl	-20°C
Master Mix General	Disco blanco	2 x 688 µl	4°C
Estándar P35S	Tapón azul	4 x 50 µl	-20°C

### 4. Equipamiento necesario

La siguiente tabla muestra el equipamiento necesario para utilizar el TaqMan® GMO Maize Quantification Kit:

Listado de Equipamiento	
1	Termociclador Real-time PCR con canal de detección para el fluoróforo FAM (520 nm)
2	Juego de micropipetas (10, 20 y 200 ul)
3	Centrífuga de sobremesa con adaptadores para placas de 96 y/o tubos
4	Vórtex

## 5. Material fungible necesario

La siguiente tabla muestra el material fungible necesario para utilizar el TaqMan® GMO Maize Quantification Kit:

Listado de Material	
1	Placas de PCR ópticas aptas para el termociclador empleado o tubos ópticos de 0,2 ml
2	Films ópticos para cubrir las placas de PCR o tapas ópticas para los tubos empleados
3	Puntas con filtro desechables para micropipetas
4	Tubos estériles de 1,5 ml
5	Guantes de látex sin talco

## 6. Preparación de las reacciones de amplificación

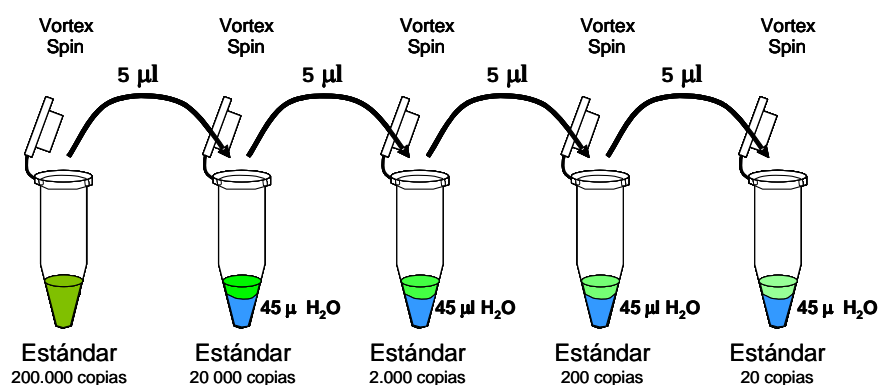
Para llevar a cabo la cuantificación relativa del promotor P35S con respecto al maíz total presente en una muestra, se llevan a cabo dos cuantificaciones absolutas. Por una parte se determina la cantidad de maíz total presente en la muestra, y por otra parte determinaremos la cantidad de P35S. La preparación de las reacciones de amplificación incluye:

- Diluciones del estándar.
- Controles negativos de PCR y/o extracción.
- Análisis de las muestras por duplicado.

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se tendrá en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

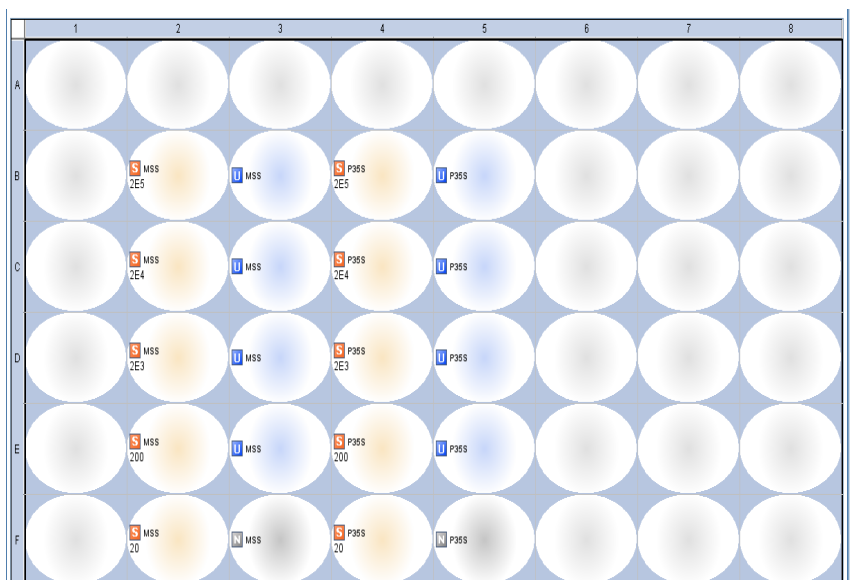
Se prepararán 2 masters de PCR distintos, uno para el maíz y otro para P35S. A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar un vial del estándar P35S y preparar 4 diluciones seriadas 1:10 del estándar. De este modo obtendremos los patrones cuantitativos frente a los que comparar las muestras.



2. Descongelar los Master Mix, los controles negativos y los ADNs de las muestras (en caso de que se conserven congelados).
3. Dar un vórtex a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
4. En un tubo de 1,5 ml, añadir 7,5 µl del Master Mix Maize por cada una de las reacciones.

5. En otro tubo de 1,5 ml, añadir 7,5 µl del Master Mix P35S por cada una de las reacciones.
6. Añadir por cada reacción 12,5 µl del Master Mix General a cada una de los tubos anteriores. Dar un vórtex y pipetear 20 µl en cada pocillo o tubo.
7. Añadir 5 µl del ADN (10-25 ng/µl) de las muestras en los pocillos correspondientes.
8. Añadir 5 µl de cada dilución del Estándar y de los controles negativos en los pocillos correspondientes.
9. Tapar la placa con film óptico y dar un spin.



## 7. Programa de amplificación

Someter las reacciones de amplificación al siguiente programa de amplificación:

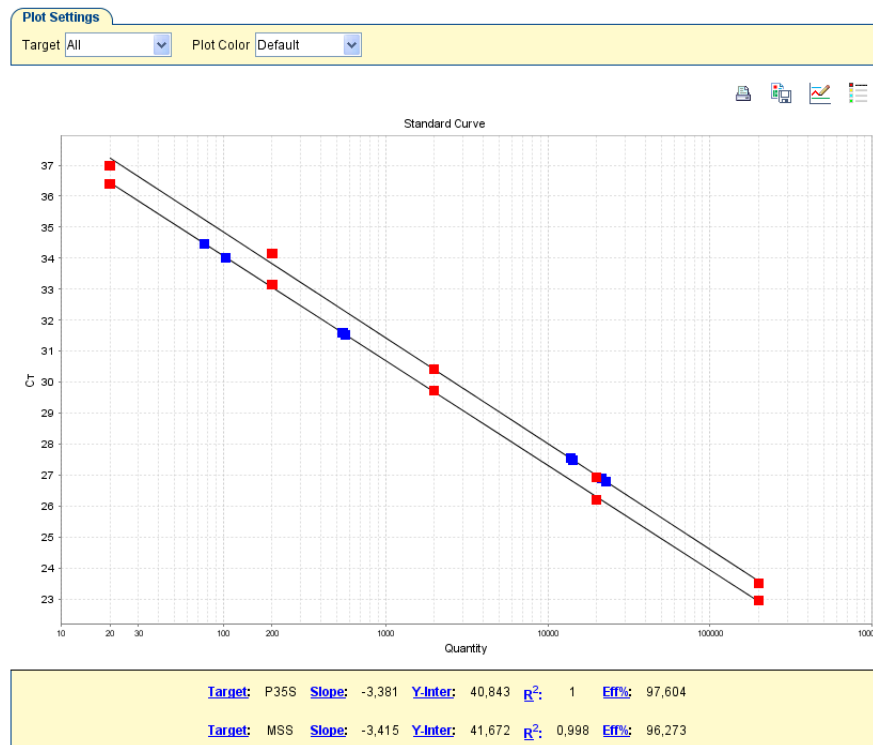
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	50
60°C	1 minuto	

*Nota: Este programa ha sido validado en un equipo StepOne Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Si se emplea en otra marca o modelo de termociclador, es posible que se deba ajustar el programa de amplificación. Póngase en contacto con nuestro servicio técnico si necesita recibir asesoramiento.*

## 8. Análisis de los resultados

Antes de analizar los resultados de las muestras, se comprobará que el resultado obtenido a partir de los diferentes controles es el esperado:

- **Controles negativos:** No se debe detectar amplificación ni en la reacción correspondiente a maíz ni en la reacción correspondiente al promotor P35S. La amplificación en un control negativo indicaría la presencia de contaminación, lo que conllevaría la repetición del ensayo.
- **Estándar P35S:** Se debe detectar amplificación en los cinco puntos del estándar de maíz y en los cinco puntos correspondientes al P35S. Además, las rectas obtenidas a partir de los distintos puntos del estándar deben cumplir los siguientes requisitos:
  - La eficiencia de la recta debe tener un valor comprendido entre 90% y 105%
  - La pendiente de la recta debe tener un valor comprendido entre -3,1 y -3,9
  - El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe tener un valor superior a 0,98





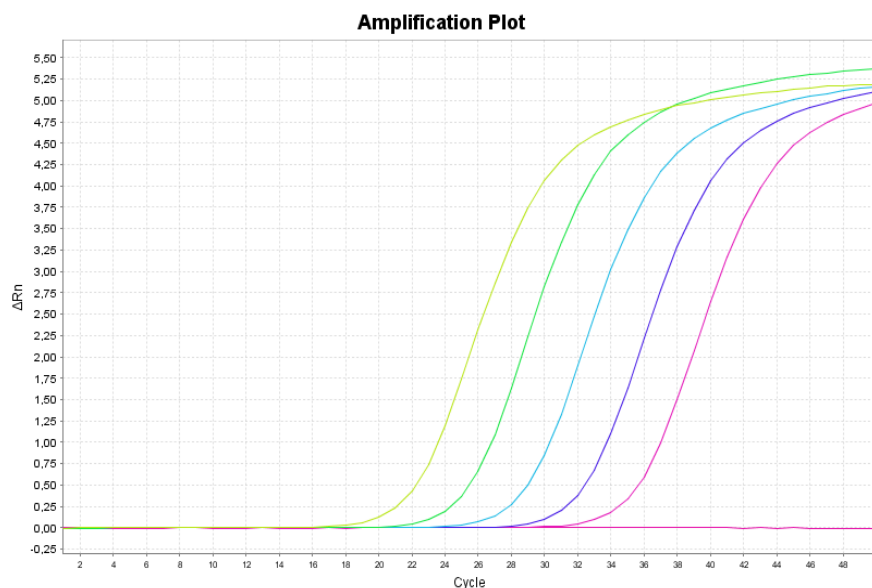
Una vez verificados los controles se analizan los resultados obtenidos a partir de las muestras. En el caso de que se hayan realizado duplicados, los resultados de ambas réplicas deben ser similares.

Para cada reacción de amplificación hay tres posibles resultados, tanto para las reacciones de maíz como para las de P35S:

- **No detectado:** No hay amplificación en la muestra. La curva de amplificación es plana.
- **No cuantificable:** Se detecta amplificación en la muestra pero en una cantidad inferior al último punto de la recta. Cuando el Ct de la muestra es mayor que el Ct del estándar de 20 copias, se puede concluir que existe la presencia del analito pero la cantidad no es cuantificable.
- **Cuantificable:** Se detecta amplificación en la muestra en una cantidad superior al último punto de la recta. Cuando el Ct de amplificación de la muestra está interpolado entre los valores de los puntos del estándar el resultado cuantitativo es fiable y se puede emplear para calcular el porcentaje de P35S.

Para el cálculo del porcentaje de P35S respecto al maíz total presente en una muestra se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ P35S} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de copias P35S} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de copias Maíz}}$$



En la siguiente tabla se representan gráficamente los resultados que se pueden obtener a partir del análisis de una muestra, así como la interpretación que se debe hacer a partir del resultado obtenido:

<b>Maíz</b>	<b>P35S</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Cuantificable	No detectado	No se ha detectado la presencia de P35S en la muestra.
Cuantificable	No cuantificable	La cantidad de P35S detectada en la muestra es inferior al límite de cuantificación.
Cuantificable	Cuantificable	La cantidad de P35S respecto al maíz total presente en la muestra es de X%
No cuantificable	No detectado	No se ha detectado la presencia de P35S en la muestra, la cantidad de maíz presente en la muestra es inferior al límite de cuantificación.
No cuantificable	No cuantificable	Las cantidades de maíz y de P35S detectadas en la muestra son inferiores al límite de cuantificación.
No detectado	No detectado	No se ha detectado la presencia de maíz ni la presencia de P35S en la muestra.*

\* Es posible que el hecho de no detectar ADN de maíz en una muestra, sea debido a la presencia de inhibidores en el ADN empleado. Para verificar la ausencia de inhibidores en la muestra, le aconsejamos que emplee un control de inhibición consistente en una amplificación con el Master Mix de Maíz en un pocillo donde se han mezclado, el ADN de la muestra problema con 1 µl del control de inhibición que se corresponde con la dilución de 20.000 copias del estándar. Paralelamente, se amplifica otro pocillo con 5 µl de agua y 1 µl del mismo control de inhibición. Si la amplificación de ambas reacciones es similar, se puede concluir que la muestra no está inhibida.

## 9. Control de calidad

Todos los productos comercializados por el Instituto de Medicina Genómica son sometidos a un riguroso control de calidad. El **TaqMan® GMO Maize Quantification Kit** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

## 10. Garantías y responsabilidades

El Instituto de Medicina Genómica le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de su fabricación. Esta garantía se hace extensible a un período de un año desde la fecha de envío del producto, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este Manual. **Nuestros productos están diseñados para uso en investigación.** El usuario de los productos es responsable de validar la utilidad de los protocolos propuestos por el Instituto de Medicina Genómica. Dichos protocolos se consideran únicamente una guía. El Instituto de Medicina Genómica no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este set. La única obligación del Instituto de Medicina Genómica, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. El Instituto de Medicina Genómica no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

## 13. Servicio de atención al cliente

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

**Teléfono:** 963 212 340  
**Mail:** [info@imegen.es](mailto:info@imegen.es)

