PROTOCOLOS

Proyecto:
DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN DE POLEN DE MIEL

Proyecto:
DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN DE POLEN DE MIEL

DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 312. Circuito de la Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510

A) Descripción de características de las muestras de miel.

Se describe su color, aroma y la presencia/ausencia de cuerpos de abeja, otros insectos o sus restos, y anotar alguna observación que indique si la miel se encuentra en buen estado.

B) Manejo de la muestra, fraccionamiento y separación de polen

El procesamiento de la muestra de miel previo a su análisis, comienza por calentarla para homogeneizarla y filtrarla con el fin de separar las impurezas que pudiera contener, como son residuos sólidos de partes de insectos o insectos completos. Este proceso se describe a continuación:

1.- Colocar el recipiente con la miel en baño maría durante 20 minutos, en un baño digital (OAKTON) previamente ajustado a 50 °C.

2.- Retirar el recipiente del baño, destaparlo y filtrar su contenido en un embudo Büchner de porcelana de 8 cm de diámetro con 91 orificios de 1.2 mm, el cual deberá estar acoplado a un matraz Kitasato de 1L con un agitador magnético octahédrico (1, 1/2" x 5/16" pulgadas) en su interior.

3.- Una vez filtrada la miel, retirar el embudo y colocar el matraz sobre una parrilla de calentamiento con agitación moderada hasta que la miel alcance una temperatura de 60 °C. Retirar el matraz del calentamiento. Si no es necesario fraccionar, pasar al paso 5.

4.- Realizar el fraccionamiento colocando las mismas cantidades de miel en cada contenedor previamente lavado y esterilizado. El lavado y esterilizado de los contenedores se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Los recipientes limpios deben ser de un material resistente y con tapa de rosca para evitar derrames.
- Poner en contacto tapas y recipientes con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos. Sacar y escurrir sobre papel secante.
- A continuación, se colocan en una solución de etanol al 70% durante 10 minutos y nuevamente se escurren sobre papel absorbente.

- Colocar los recipientes y las tapas en una cámara oscura y someterlos a radiación UV durante 10 minutos.

5.- Pesar 12.5 g de muestra en un tubo cónico de 50 mL estéril por cuadruplicado para obtener 50 g totales repartidos en 4 tubos con 12.5 g cada uno. Repetir este paso a fin de contar con la réplica correspondiente.

5.1 - En caso de que la submuestra generada en el fraccionamiento de miel haya sido almacenada durante un tiempo prolongado, es necesario homogenizarla antes de realizar el pesado correspondiente, como a continuación se describe: colocar el recipiente con miel dentro de una estufa a 37°C durante 20-30 minutos a fin de disminuir su viscosidad y hacerla manejable. En caso de presentar cristalización parcial o total, se recomienda colocarla en una estufa a 50°C durante 20-30 minutos. Voltear el recipiente 10 veces lenta y pausadamente a fin de homogenizar perfectamente el contenido. Realizar diez movimientos más pero ahora con el recipiente ladeado.

6.- Agregar a cada tubo agua desionizada, filtrada y estéril (DFE) hasta alcanzar un volumen de 45 mL.

7.- Colocar los tubos dentro de una incubadora precalentada a 50°C con agitación de 400 rpm, durante 30 minutos.

8.- Retirar los tubos de la incubadora, balancearlos con agua, por pares, en una balanza de dos platos y colocarlos en una centrífuga con rotor específico para tubos cónicos de 50 mL bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 5,000 X g.

9.- Desechar el sobrenadante. Resuspender cada pellet en 1mL de agua DFE con ayuda de una micropipeta y juntar los contenidos de cuatro tubos en uno solo. De tal manera que por cada muestra se tendrán dos tubos con aproximadamente 5mL de líquido.

10.- Completar cada tubo con agua DFE hasta alcanzar un volumen de 30 mL, balancear nuevamente por pares y centrifugar 10 minutos a 5,000 X g.

11.- Desechar el sobrenadante por decantación y dejar escurrir sobre papel secante durante unos segundos. En este punto se tiene el polen aislado de la miel.

Notas:

Todo el material que se encuentre en contacto con la muestra debe estar estéril (agua, tubos, puntas para micropipeta).

El área de trabajo se deberá sanitizar antes y después del trabajo con una solución de hipoclorito al 10% y Etanol al 75%.

El analista deberá portar en todo momento guantes y se deberán desechar con frecuencia o sanitizar cada vez que sea necesario con agua, jabón y etanol al 70%.

REFERENCIAS

1. “Guideline on sampling and analysis for the detection of pollen from genetically modified plants in honey”. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Oficina Federal de Protección al Consumidor y de Seguridad Alimentaria Alemana) 2011.
2. Manual para la extracción del kit “Mericon Food” (QIAGENE).

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN DE POLEN DE MIEL

Proyecto:
DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN DE POLEN DE MIEL

DETECCIÓN DE POLEN DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 312. Circuito de la Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510

Una vez separado físicamente el polen de las mieles es posible extraer el ADN de calidad amplificable a partir de los gránulos utilizando los métodos de disrupción, extracción y purificación adecuados. Debido a la textura de los granos de polen y su dureza, es recomendable utilizar el equipo "Tissue Lyser" el cual somete al polen a una fuerte agitación con perlas de metal en pequeños contenedores, a fin de romper el tejido de los gránulos para liberar el material genético. Adicionalmente, es necesario usar kits de extracción que tienen detergentes que permiten eliminar otros componentes celulares y proteínas para dejar el ADN libre. Los que ensayamos en este trabajo tienen un paso de purificación de ADN que se basa en la adsorción del material genético en una membrana de sílica inserta en una columna, lo que permite realizar los pasos de lavado en la misma columna. Posteriormente, el ADN puro se desorbe a 60 °C.

A continuación se describe detalladamente el proceso:

A) Disrupción y extracción de ADN de los gránulos de polen de miel

1.- Con ayuda de una micropipeta resuspender el pellet de polen, obtenido como se describe en el Manual de Separación de Polen, en 1 mL de buffer de lisis del kit "Mericon Food" de QIAGEN y repartir la solución en partes iguales en dos tubos de lisis para el equipo "Tissue Lyser II". Es importante desechar las puntas de micropipeta entre muestras a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

2.- Etiquetar los tubos y agregar una perla de tungsteno de 3 mm a cada uno. Tapar los tubos adecuadamente y colocarlos en los adaptadores del equipo "Tissue Lyser". Independientemente del número de muestras a homogenizar, siempre deben colocarse los dos adaptadores con la perla de tungsteno para equilibrar. Ajustar los adaptadores al equipo asegurando que queden fijos y alineados.

3.- Homogenizar las muestras en el equipo "Tissue Lyser II" durante 2 minutos a 30 s^{-1}. Liberar los adaptadores y retirar los tubos.

4.- Juntar nuevamente ambas porciones en un tubo para centrífuga de 2 mL previamente rotulado.

5.- Agregar 2.5 µL de proteinasa K. Homogenizar en un vórtex a velocidad alta durante 3 segundos.

6.- Colocar los tubos en una incubadora con agitación e incubar durante 30 min a 60°C y 1,000 rpm.

7.- Nuevamente repartir la muestra en partes iguales en dos tubos de lisis con perlas de tungsteno y homogenizar en el equipo disruptor durante 2 minutos a 30 s^{-1}.

8.- Con ayuda de micropipeta, regresar las muestras a los tubos de 2 mL y centrifugar por 5 min a 2,500 X g.

9.- Colocar 500 µL de cloroformo en un nuevo tubo para centrífuga de 2 mL previamente rotulado y con cuidado transferir 650 µL del sobrenadante.

10.- Homogenizar en vórtex a velocidad alta por 15 s y centrifugar a 14,000 X g durante 20 min. Sacar con cuidado los tubos para evitar que se mezclen las fases.

11.- Colocar 350 µL de buffer PB en un nuevo tubo para centrífuga de 2 mL, rotular adecuadamente y transferir 350 µL de la fase superior de los tubos recién centrifugados evitando tocar la capa intermedia.

12.- Agitar en vórtex a velocidad alta durante 3 s y bajar el contenido con ayuda de una minicentrífuga.

13.- Transferir la mezcla a una columna con la membrana de sílica junto con su tubo recolector previamente rotulados y centrifugar 1 min a 17,000 X g . Descartar el líquido eluído.

14.- Lavar la columna con 500 µL de Buffer AW2 y centrifugar nuevamente 1 min a 17,000 X g. Desechar el líquido eluído.

15.- Secar la columna centrifugando nuevamente 1 min a 17,000 X g.

16.- Intercambiar el tubo colector por un tubo de centrifuga de 1.6 mL, rotulado adecuadamente, y agregar 100 µL de buffer EB, del kit de extracción, a 60°C.

17.- Incubar los tubos a 60°C por 10 minutos.

18.- Centrifugar 1 min a 17,000 X g para colectar el ADN de las columnas.

19.- Retirar la columna y conservar los extractos eluídos a una temperatura de -20°C hasta su cuantificación y análisis.

Tal procedimiento se lleva a cabo por duplicado con el fin de obtener 2 extracciones independientes de ADN por cada muestra de miel.

Notas:

Todo el material que se encuentre en contacto con la muestra debe estar estéril. (Agua, tubos, puntas para micropipeta).

El área de trabajo deberá sanitizarse antes y después del trabajo con una solución de hipoclorito al 10% y Etanol al 75%.

El analista deberá portar en todo momento guantes y desecharlos o sanitizarlos cada vez que sea necesario con agua, jabón y etanol al 70%.

Todos los buffers mencionados y la proteinasa K vienen en el kit de extracción de ADN de QIAGEN. Únicamente se deberá suministrar cloroformo grado analítico, dado que no está incluido en el kit.

B) Cuantificación de ADN

Una vez extraído el ADN es necesario cuantificarlo para estandarizar la cantidad que se va a analizar en cada ensayo de PCR. Adicionalmente la relación 260/280 proporciona información acerca de la pureza del extracto. Ésta debe ser entre 1.8 y 2.0.

Cualquier espectrofotómetro que realice lecturas entre 200 y 300 nm es de utilidad siempre y cuando se utilicen celdas de cuarzo. En la actualidad equipos como el Epoch Take 3 BIOTEK permiten obtener resultados rápidos y confiables utilizando únicamente 2 µL de muestra.

Para obtener los datos de cuantificación en este equipo se siguen los siguientes pasos:

1.- Colocar la placa Take 3 vacía en el portaplacas del equipo. Realizar la revisión de blancos para verificar que todos los pozos sean adecuados para realizar lecturas confiables.

2.- Colocar 2 µL de agua o buffer TE en cada pozo, realizar el barrido de lecturas de 200-300 nm a fin de verificar que los pozos se encuentren limpios y sin partículas que interfieran el haz de luz. En caso de ser necesario, realizar una limpieza profunda de los portaobjetos.

3.- Descongelar, atemperar a 20 °C y homogenizar las muestras en vórtex a velocidad moderada durante dos segundos y bajar el contenido en una minicentrífuga.

4.- Colocar 2 µL de agua o buffer TE en los pozos asignados como blancos y en el resto de los pozos cada una de las muestras por duplicado. Realizar el barrido de lecturas.

5.- Observar las curvas de absorbancia obtenidas. Automáticamente el software del equipo proporciona los valores de absorbancia a 260nm, 280nm, la relación 260/280 y el valor de concentración en nanogramos por microlitro.

6.- Verificar la reproducibilidad de las réplicas. En caso contrario, homogenizar las muestras y realizar la lectura nuevamente.

C) Acondicionamiento de la muestra para la reacción de qPCR

Con la finalidad de optimizar los tiempos de cargado de placa o tubos, para la qPCR, cada muestra de ADN deberá ajustarse a una concentración stock de 20 ng/µL. En caso de que la muestra tenga un valor menor, ésta deberá ser concentrada en un equipo adecuado para concentrar muestras de ADN, como el equipo DNA plus, que concentra aplicando vacío a las muestras, bajo las siguientes condiciones: 40 minutos a 45 °C y 200 mbar.

REFERENCIAS

1. "Guideline on sampling and analysis for the detection of pollen from genetically modified plants in honey". Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Oficina Federal de Protección al Consumidor y de Seguridad Alimentaria Alemana) 2011.
2. Manual para la extracción del kit "Mericon Food" (QIAGENE).
3. Operating Instructions Tissue Lyser II. 2007.

METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN POLEN DE MIEL

Proyecto:
DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN POLEN DE MIEL

DETECCIÓN DE POLEN DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL. FASE I

Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada Hernández y Amanda Gálvez Mariscal

Septiembre 2013

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 312. Circuito de la Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510

Una vez extraído el ADN de los gránulos de polen de las muestras de miel, y sabiendo que son adecuados en cantidad y calidad, éstos se analizan por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).

A) Preparación de la placa para el análisis.

En este caso las corridas se realizaron en el equipo Applied Biosystems 7500 siguiendo la química de Taqman con las siguientes concentraciones de reactivos:

Tabla 1. Concentración de los componentes para las reacciones de qPCR (ABI 7500)

Reactivo	Concentración final
Agua	--
Master mix TaqMan®	1X
Stock (Cebadores universales +Sonda)	1X
Cebador F	300nM
Cebador R	300nM
Sonda FAM o VIC	180nM
ADN	100 ng
Volumen final : 20 µL	

1.- En un microtubo de 0.6 mL se elabora una mezcla de reacción que contenga los componentes mencionados en la Tabla 1 con excepción del ADN. Los volúmenes adicionados dependerán del número de reacciones a evaluar (cada una con un volumen final de 20 µL). A continuación se describe un ejemplo para analizar una muestra:

a) Realizar por duplicado las reacciones de qPCR para el gen de referencia (endógeno) y por duplicado para el gen de la secuencia blanco (transgén) por cada extracción de ADN de cada muestra analítica. Ejemplo: si se realizaron dos extracciones de ADN independientes, se tendrán 4 reacciones para gen de referencia y 4 reacciones para transgén, siendo en total 8 reacciones.
b) Adicionalmente, considerar por duplicado: Control positivo (C+) lleva la mezcla de reacción más ADN de la secuencia blanco, Control negativo (C-) lleva la mezcla de reacción más ADN de una secuencia NO blanco y Control de Reacción (NTC-Not

Template Control) lleva la mezcla de reacción más agua estéril y/o grado biología molecular (BM). Con lo que se tendrán en total 6 reacciones de los controles.

c) En total para análisis de una muestra se prepara un ensayo para 15 reacciones (8 de la muestra descritas en el inciso (a), 6 de los controles descritos en el inciso (b) y una reacción extra para no tener faltante a causa del líquido sobrante que queda en las puntas de las pipetas.

Elaborar mezclas de reacción de acuerdo al número de reacciones programadas (en el ejemplo anterior son 15 reacciones) sin adicionar el ADN y a las concentraciones de los reactivos establecidos en la Tabla 1. En la Tabla 2, se da un ejemplo del cálculo:

Tabla 2: Concentración de los componentes para las reacciones de qPCR (ABI 7500)

	Reactivo	**Concen-tración inicial**	**Concentración final**	**Vol. para una reacción**	**Vol. para 15 reacciones**
1	Agua	--------- --	--	3.1 µL	46.5 µL
2	Master mix	2X	1X	10 µL	150 µL
4	Stock (Cebador F)	10 µM	0.3µM	0.6 µL	9 µL
5	Stock (Cebador R)	10 µM	0.3µM	0.6 µL	9 µL
6	Sonda	5 µM	0.18 µM	0.7 µL	10.5 µL
7	ADN	20 ng/µL	100ng	5 µL	-
Volúmenes				20 µL	V_T= 225 µL /15 pozos = 15 µL por pozo (los 5 µL faltantes corresponden a cada preparación de ADN a analizar)

1.- Se adicionan todos los componentes, a excepción del ADN, con las cantidades para 15 reacciones en un microtubo de 0.6 mL, en el orden indicado en la Tabla 2. La mezcla se homogeniza y se centrifuga a máxima velocidad en una microcentrifuga por 5 s.

2.- Repartir 15 µL de la mezcla de reacción descrita en el punto anterior a cada pozo en una microplaca para qPCR de 96 pozos para ABI 7500, hasta completar los 15.

3.-Adicionar 5 µL del ADN de cada muestra a analizar (stock de ADN de la muestra que se preparó con anterioridad[3], con una concentración de 20 ng/µL), del ADN control o agua en el caso del NTC, en cada mezcla de reacción contenida en cada pozo de la microplaca.
Precauciones: El ADN se encuentra almacenado en congelación, por lo que es importante descongelar perfectamente, atemperar y homogenizar la muestra antes de tomar el volumen indicado. Al terminar de utilizar el ADN de las muestras y de los controles almacenarlos a -20 °C.

4.- Una vez cargada la placa, se sella con la cubierta óptica, se homogeniza y centrifuga.

B) Condiciones de amplificación.

1.- Introducir la placa al termociclador de tiempo real ABI 7500, programar el equipo con las condiciones de amplificación mostradas en la Tabla 3 y correr la reacción.

Tabla 3.- Condiciones de amplificación.

No. de Ciclos	Condiciones
1 ciclo	50°C, 2 min
1 ciclo	95°C, 10 min
45 ciclos	95°C, 15 s y 60 °C, 1 min

C) Secuencias de cebadores y sonda utilizadas.

Los genes endógenos utilizados fueron: *hmg* (High mobility group) de maíz, *lec*[1] (lectina) para soya y universal de planta (*act*).

Los genes utilizados para la identificación de transgenes fueron*: 35-S* [2] (promotor 35S CaMV), *t-NOS* (terminador Nopalina Sintasa) y *MON Ø4Ø32-6* (Roundup Ready, RR)

Secuencias:

hmg Primer Forward 5' TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA 3'
hmg Primer Reverse 5' GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T 3'
hmg Sonda 5' FAM- CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA TAMRA-3'

lec Primer Forward 5' CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC 3'
lec Primer Reverse 5' GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC 3'
lec Sonda 5' FAM- CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC-TAMRA 3'

act Primer Forward 5' CAA GCA GCA TGA AGA TCA AGG T 3'
act Primer Reverse 5' CAC ATC TGT TGG AAA GTG CTG AG 3'
act Sonda 5' FAM-CCT CCA ATC CAG ACA CTG TAC TTY CTC TC TAMRA 3'

35-S Primer Forward 5' CGT CTT CAA AGC AAG TGG ATT G 3'
35-S Primer Reverse 5' TCT TGC GAA GGA TAG TGG GAT T 3'
35-S Sonda 5' FAM-TCT CCA CTG ACG TAA GGG ATG ACG CA- TAMRA 3'

t-nos Primer Forward 5' CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G 3'
t-nos Primer Reverse 5' TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T 3'
t-nos Sonda 5' VIC-ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A TAMRA 3'

RR Primer Forward 5' CCG GAA AGG CCA GAG GAT 3'
RR Primer Reverse 5' GGA TTT CAG CAT CAG TGG CTA CA 3'
RR Sonda 5' FAM- CCG GCT GCT TGC ACC GTG AAG TAMRA 3'

REFERENCIAS

1. Quantitative PCR method for detection of soybean event DP-305423-1. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 89.
2. Qualitative PCR method for detection of Cauliflower Mosaic Virus 35-S promoter. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 173
3. Metodología para la extracción y cuantificación de ADN a partir de muestras de miel. Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I. Peña M.C., Quirasco B.M., Estrada H.C.A., Gálvez M.A. Facultad de Química, UNAM. Septiembre, 2013.