
NORMA CUBANA

NC

ISO 21569: 2012
(Publicada por la ISO en 2005)

**PRODUCTOS ALIMENTICIOS—MÉTODOS DE ANÁLISIS
PARA LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE
MODIFICADOS Y PRODUCTOS DERIVADOS—MÉTODOS
CUALITATIVOS BASADOS EN ÁCIDOS NUCLEICOS
(ISO 21569: 2005, IDT)**

**Foodstuffs—Methods of analysis for the detection of genetically modified
organisms and derived products—Qualitative nucleic acid based methods**

ICS: 67.020

1. Edición Diciembre 2012
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO 21569: 2012

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN-91 de Alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, el cual está integrado por las siguientes entidades.
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA)
 - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimentaria
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos
 - Ministerio de la Agricultura
 - Instituto de Farmacia y Alimentos. (IFAL)
 - Centro de ingeniería genética y biotecnología.
 - Instituto de Biotecnología de las Plantas .Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
 - Centro Nacional de Toxicología. (CENATOX.)
 - Centro de Seguridad Biológica. (CSB)
 - Centro Nacional de sanidad agropecuaria (CENSA)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la norma ISO 21569:2005 *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods* Productos alimenticios.
- Incluye los Anexos A, B, C y D informativos.
- Comienza con el pie de página a partir del número 2 para mantener el orden de la original, ya que el pie número 1 hacía referencia al proceso de elaboración de la ISO 24276 la cual fue publicada en el 2006.

© NC, 2012

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 4 |
| 1 Objeto y campo de aplicación | 5 |
| 2 Referencia normativa | 5 |
| 3 Términos y definiciones..... | 5 |
| 4 Principio del método..... | 5 |
| 5 Reactivos | 6 |
| 6 Aparatos y equipos..... | 6 |
| 7 Procedimiento | 7 |
| 8 Interpretación | 10 |
| 9 Expresión de resultados y control de calidad..... | 10 |
| 10 Informe del análisis..... | 11 |
| Anexo A_(informativo)..... | 12 |
| Anexo B_(informativo)..... | 31 |
| Anexo C_(informativo)..... | 49 |
| Anexo D_(informativo)..... | 74 |
| Bibliografía..... | 79 |

Introducción

La búsqueda de ingredientes procedentes de una fuente modificada genéticamente se realiza mediante las etapas consecutivas siguientes. Después de la recogida de la muestra, los ácidos nucleicos se extraen de la porción para análisis. Los ácidos nucleicos extraídos pueden adicionalmente ser purificados, simultáneamente o después del proceso de extracción. Posteriormente, son cuantificados (si es necesario), diluidos (si es necesario) y sometidos a los procedimientos analíticos (tales como PCR). Estas etapas están detalladas en esta norma y en otras con el título general *Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos modificados genéticamente y productos derivados*.

- Muestreo (Norma ISO 21568);
- Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos (Norma ISO 21570);
- Extracción de ácidos nucleicos (Norma ISO 21571).

Información adicional sobre los requisitos generales y las definiciones relacionadas con etapas citadas anteriormente se recogen en la Norma ISO 24276.

La detección cualitativa de secuencias diana de ADN se realiza para obtener una respuesta si o no a la pregunta sobre si una cierta secuencia diana es detectada o no en relación con los controles apropiados y dentro de los límites de detección del método analítico utilizado y de la porción para análisis analizada.

La especificidad de los métodos, como se describe en los anexos A al D, varía desde métodos de cribado a detectar secuencias de ADN comunes características de OMGs, para la identificación específica de una construcción genética o de un evento de transformación específico.

PRODUCTOS ALIMENTICIOS—MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS Y PRODUCTOS DERIVADOS—MÉTODOS CUALITATIVOS BASADOS EN ÁCIDOS NUCLEICOS

1 Objeto y campo de aplicación

Esta norma internacional describe el procedimiento para la detección cualitativa de organismos modificados genéticamente (OMGs) y productos derivados analizando los ácidos nucleicos extraídos de la muestra en estudio. El objetivo principal, son los métodos de amplificación, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El método proporciona requisitos generales para la detección específica e identificación de las secuencias diana de ácidos nucleicos (ADN) y para la confirmación de la identidad de las secuencias amplificadas de ADN.

Las directrices, requisitos mínimos y los criterios de actuación establecidos en esta norma, aseguran que los resultados obtenidos en diferentes laboratorios sean comparables, exactos y reproducibles.

Esta norma ha sido establecida para matrices de alimentos, pero también podría ser aplicada a otras matrices (por ejemplo alimentos para animales y plantas recogidas del medio ambiente).

Los ejemplos específicos de los métodos se proporcionan en los anexos A al D.

2 Referencia normativa

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de esta norma. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de ésta).

ISO 21571:2005 *Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos.*

ISO 24276:2006 *Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones.*

3 Términos y definiciones

Para los fines de este documento, son de aplicación los términos y definiciones recogidos en la Norma ISO 24276.

4 Principio del método

4.1 Generalidades

El análisis cualitativo consiste en la detección específica de secuencias diana de ácidos nucleicos en la muestra para análisis. Cada método, debe especificar la secuencia diana.

Un resultado cualitativo debe demostrar claramente la presencia o ausencia del elemento genético bajo estudio, en relación con los controles apropiados y dentro de los límites de detección del método analítico utilizado y de la porción para análisis analizada.

4.2 Amplificación PCR

La amplificación de la secuencia diana se produce *in vitro* a través de una reacción catalizada por una ADN polimerasa en presencia de los oligonucleótidos cebadores y los desoxirribonucleósidos trifosfatos en un tampón de reacción adecuado^{[1],[2]}. Un prerequisite importante para la amplificación de la secuencia diana es que la mezcla de la reacción no contenga inhibidores de la polimerasa. La amplificación del ADN es un proceso cíclico que consiste en:

- desnaturalización mediante calentamiento, de la doble hebra de ADN en las hebras sencillas de ácidos nucleicos;
- anillamiento de los cebadores con la secuencia diana a la temperatura adecuada; y
- extensión de los cebadores, que se han unido a ambas hebras sencillas, por medio de la ADN polimerasa adecuada para PCR y a una temperatura apropiada.

4.3 Detección y confirmación de los productos de PCR

Los productos de PCR se detectan mediante electroforesis en gel o mediante un procedimiento alternativo apropiado, si fuera necesario, después de su aislamiento mediante un procedimiento de separación adecuado.

La identidad de la secuencia diana detectada puede verificarse mediante una técnica apropiada (por ejemplo, análisis con enzimas de restricción, por hibridación o por análisis de la secuencia de ADN).

En el caso de análisis por PCR en tiempo real, la amplificación y la detección se producen simultáneamente.

5 Reactivos

Todos los materiales y reactivos utilizados en los análisis deberían ser idénticos o equivalentes a los especificados en el método. En caso contrario, todos los reactivos y materiales deberían ser de calidad para biología molecular. Estos reactivos deben ser almacenados y utilizados según las recomendaciones del proveedor o conforme a las especificaciones de garantía de calidad del laboratorio. La lista de reactivos se puede encontrar en los anexos específicos.

5.1 Solución tampón del PCR

La solución tampón de PCR se suministra generalmente junto con la enzima ADN polimerasa, que puede contener o no $MgCl_2$ en la concentración indicada por el fabricante. Las concentraciones finales de $MgCl_2$ en la reacción son específicas de cada método y por consiguiente son indicadas en cada anexo. Puede haber reactivos para uso inmediato, disponibles comercialmente. Se deberían tener en cuenta las instrucciones del fabricante para su utilización.

6 Aparatos y equipos

Los detalles pueden encontrarse en la Norma ISO 24276 y los anexos A al D.

7 Procedimiento

7.1 Calidad, integridad y amplificabilidad de los ácidos nucleicos extraídos

La solución de ácidos nucleicos debe ser suficientemente pura para el análisis posterior^[3]. La calidad y cantidad del ácido nucleico extraído utilizando un método determinado sobre una matriz determinada, deben ser repetibles y reproducibles.

NOTA La cantidad, calidad e integridad del ADN molde influye en el resultado de PCR y por lo tanto en los resultados analíticos obtenidos. El límite de detección de un método específico, puede por lo tanto depender de si el material que va a ser analizado ha sido procesado o refinado y del grado de degradación del ADN allí presente.

Los ácidos nucleicos que se van a utilizar en PCR deberían estar sustancialmente libres de inhibidores de PCR^[4]. Se deben incluir controles de inhibición de PCR tal y como se describe en la Norma ISO 24276.

7.2 Criterios de actuación

Los criterios generales de actuación se describen en la Norma ISO 24276.

Los valores para las características de actuación están descritos para cada método como se indica en los anexos A al D y debería tener en cuenta los tamaños del genoma; véase la Referencia ^[5].

Las condiciones de la reacción, especialmente la concentración de MgCl₂ y las condiciones de termociclado deberían optimizarse para cada par de cebadores y/o sistema. Cuando se vaya a utilizar algún sistema de cebadores por primera vez, es necesario demostrar de antemano que las condiciones de ciclos elegidas para la matriz particular que se va a estudiar, eviten productos competitivos indeseables que de otro modo podrían reducir la sensibilidad de la detección por PCR.

En una reacción óptima se requieren menos de 40 ciclos para amplificar > 10 moléculas diana para producir un producto fácilmente detectable por métodos estándar. Si se incrementa el número de ciclos, se podrían acumular productos no específicos. La PCR optimizada debería ser capaz de amplificar en 40 ciclos de PCR, desde una muestra pura de referencia conteniendo 100 copias de ADN molde, suficientes copias del producto PCR detectable. Se debe cumplir estrictamente el perfil de características temperatura/tiempo para cada sistema de cebadores, la mezcla de reacción apropiada para los aparatos utilizados y el número de ciclos.

En general, la especificidad de la reacción debería mejorarse todo lo posible (por ejemplo, utilizando PCR activada por calor (*Hot-start PCR*)). La PCR activada por calor se recomienda como medida de reducción de las reacciones paralelas como la amplificación de secuencias no dianas en ADN secundario (mispriming) y oligomerización de los cebadores (esto, en consecuencia, incrementa la especificidad).

Los valores obtenidos del estudio de validación no pueden aplicarse a rangos de concentración del analito y matrices diferentes de los especificados en los respectivos anexos.

7.3 Aspectos del diseño de PCR

7.3.1 Generalidades

Debido a que la ejecución de cada PCR específica debería ser comparable con otras PCR específicas, se deben tomar en consideración los siguientes aspectos en el diseño de PCR.

7.3.2 Tamaño de los productos de PCR

El tamaño de la secuencia diana debe seleccionarse para encajar en el rango de la masa molecular disponible en el extracto de ácido nucleico que se va a analizar.

EJEMPLO: Para ADN altamente degradado procedente de alimentos procesados, el tamaño ideal del producto para PCR debería estar en el rango de 60 bp a 150 bp. Para materiales crudos se puede aplicar un rango más amplio de productos de PCR hasta, por ejemplo 250 bp.

Sin embargo, si se han llevado a cabo estudios experimentales preliminares para determinar la validez del conjunto de cebadores produciendo productos de PCR de diferente tamaño, éstos se pueden utilizar sobre la matriz para la que han sido validados.

7.3.3 Cebadores

7.3.3.1 Generalidades

La información sobre la secuencia de los cebadores está incluida en los anexos A al D.

7.3.3.2 Diseño de los cebadores

Cuando sea posible, las secuencias de los cebadores, deberían preferiblemente tener las siguientes características:

- longitud de cada cebador: de 18 a 30 nucleótidos;
- temperatura óptima de anillamiento ≈ 60 °C (debería ser establecida experimentalmente), es decir, temperatura de fusión estimada ≤ 65 °C;
- si es posible, una proporción GC: AT = 50:50 o alguna lo más cerca posible;
- estabilidad interna alta (evitar concentración de Gs y Cs en segmentos cortos de los cebadores);
- complementariedad mínima en el extremo 3', para evitar la formación de dímeros entre los cebadores;
- mínima formación de estructuras secundarias;
- mínima formación de dímeros con las sondas de detección específicas diseñadas para PCR. Hay disponibles programas para ayudar al diseño de los cebadores.

7.3.3.3 Validación de los cebadores

7.3.3.3.1 Generalidades

La capacidad de los cebadores para detectar la secuencia diana debe validarse.

La validación de los cebadores debería llevarse a cabo en dos etapas: una primera evaluación teórica y una segunda evaluación experimental.

7.3.3.3.2 Evaluación teórica de la especificidad

La evaluación teórica debe llevarse a cabo como mínimo realizando una búsqueda de similitud de secuencias (por ejemplo, FastA, Blast²⁾) frente a una de las principales bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, EMBL, GenBank²⁾). Las secuencias de genes homólogos se pueden recuperar de las bases de datos de secuencias y alinearse para obtener una estimación de la posibilidad de encontrar secuencias similares en el taxón diana o en otros organismos.

7.3.3.3 Evaluación experimental de la especificidad

Independientemente del criterio utilizado para el diseño, la especificidad de los cebadores debe ser siempre evaluada experimentalmente para confirmar la capacidad de los cebadores para discriminar entre secuencias diana y secuencias no diana estrechamente relacionadas.

²⁾Los cebadores diseñados para detectar una secuencia diana taxón-específica, deberían mostrar especificidad para detectar estas secuencias en un número representativo de diferentes miembros del taxón.

7.4 Descripción de las dianas de PCR

Para la detección e identificación cualitativa de OMGs, se pueden realizar varios ensayos de PCR, dependiendo del tipo de matrices bajo estudio y/o de los requisitos del análisis. Estos análisis pueden ir dirigidos a secuencias específicas para taxones diana, construcciones genéticas y eventos de transformación, así como elementos apropiados para los propósitos de cribado.

7.5 Controles

Debido al riesgo de obtener resultados falsos positivos y/o falsos negativos, se deben incluir controles apropiados en cada ensayo de diagnóstico de PCR (véase la Norma ISO 24276).

Si hay materiales de referencia certificados disponibles y apropiados, se deberían utilizar como controles positivos y negativos.

7.6 Preparación de PCR, detección y confirmación de los productos de PCR

Los anexos A al D contienen los detalles de las etapas de los procedimientos específicos de PCR.

NOTA En el caso de la detección de productos de PCR por electroforesis en gel, el tamaño de los productos de PCR se pueden estimar utilizando un marcador de tamaño de ADN adecuado y longitud conocida que corre en paralelo con el producto de PCR objeto de estudio.

En ciertos casos puede ser deseable confirmar los resultados positivos o negativos para una modificación genética determinada. Esto puede lograrse utilizando cebadores para una secuencia diana alternativa; esto es particularmente aconsejable para la confirmación de los resultados de ensayos de cribado.

²⁾ Blast y GeneBank son ejemplos de productos adecuados y disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes si se demuestra que pueden proporcionar resultados similares.

La identificación positiva de una secuencia diana de ADN específica puede ser confirmada mediante la utilización de un método apropiado diferente al de la determinación del tamaño del producto de PCR, por ejemplo:

- por hibridación del producto de PCR con sondas específicas; o
- mediante análisis de restricción del producto de PCR; la longitud de los fragmentos resultantes debe corresponder con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN después de la restricción; o
- por secuenciación del producto de PCR; o
- otra confirmación equivalente.

Si los cebadores utilizados han sido diseñados para detectar secuencias procedentes de organismos infecciosos (que se encuentran de forma natural en organismos no modificados genéticamente como los virus y las bacterias), entonces está altamente recomendado verificar que el ADN detectado deriva efectivamente de un OMG. Esto puede realizarse demostrando la ausencia de otro ADN derivado del organismo infeccioso.

EJEMPLO: El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y consecuentemente la detección del promotor CaMV 35S podría deberse a la presencia de algún derivado OMG y/o a ADN derivado de CaMV^[6]. Mediante la búsqueda de la presencia de otro ADN derivado de CaMV es posible que se confirme que el origen del promotor CaMV 35S es derivado de un OMG si no se detecta otro ADN derivado de CaMV.

8 Interpretación

8.1 Generalidades

El resultado de PCR puede ser cualquiera de los siguientes:

- a) positivo si se ha detectado un producto específico de PCR y todos los controles dan resultados como se especifica en la Norma ISO 24276:-, tabla 2; o
- b) negativo si no se ha detectado un producto específico de PCR y todos los controles dan resultados como se especifica en la Norma ISO 24276:-, tabla 2.

NOTA Las secuencias diana evento específico están algunas veces presentes junto con otras secuencias evento específico en un único OMG (por ejemplo debido a genes apilados^[7]).

Si los resultados son ambiguos, el procedimiento debe repetirse; véase la Norma ISO 24276.

8.2 Verificación

La verificación de resultados positivos o negativos para las secuencias diana puede tratarse como se describe en el apartado 7.6.

9 Expresión de resultados y control de calidad

9.1 Generalidades

Los resultados deben expresarse sin ambigüedad, es decir, no como "±".

Un resultado negativo nunca debe ser expresado como "OMG no presente".

De forma ideal el límite de detección (LD) debería proporcionarse en referencia a la muestra problema. Sin embargo, esto requiere materiales particulares, ADN de altísima calidad y/o equipos de laboratorio sofisticados no disponibles en todos los laboratorios. Consecuentemente, el análisis puede llegar a ser muy laborioso y/o caro y por lo tanto y en la práctica no aplicable para propósitos de rutina.

Como mínimo el (LD) debe estar proporcionado en referencia a un material de referencia y a un valor relativo basado en una matriz específica (preferiblemente una cantidad determinada de solución de ADN genómico, por ejemplo, 100 ng de ADN del 0,01% de GTS 40-3-2).

9.2 Expresión de un resultado negativo

El siguiente texto, debe aparecer en el informe del análisis: "Para la muestra X, la secuencia diana Y, no fue detectada.

El LD del método es $x\%$ determinado con ABC (identificar el material de referencia)".

Si no se puede demostrar que la cantidad de ADN diana incluida en PCR es suficiente para que el LD sea aplicable, entonces se debe añadir la siguiente frase:

"Sin embargo, la cantidad de ADN diana extraído de la especie X puede ser/fue insuficiente para que el LD sea aplicable en esta muestra".

NOTA El LD de la muestra se determina por la cantidad de ADN de las especies incluidas en la reacción analítica (número de copias) y de la proporción relativa del GM diana (número de copias) respecto del LD absoluto^[7].

9.3 Expresión de un resultado positivo

El siguiente texto debe aparecer en el informe del análisis: "Para la muestra X, la secuencia diana Y fue detectada". Se puede incluir la identidad del OMG, si se conoce".

9.4 Requisitos del control de calidad

Los resultados obtenidos en dos porciones para análisis deben ser consistentes. Si el análisis de una porción para análisis da un resultado positivo y la otra porción un resultado negativo, entonces el análisis debe repetirse (véase la Norma ISO 24276), si es posible, incrementando la cantidad de ácido nucleico molde en la reacción, para obtener resultados consistentes en ambas porciones analizadas. Además, como mínimo, la pureza del ácido nucleico molde debería comprobarse incluyendo un control de inhibición de PCR. Otros controles para comprobar la longitud y la integridad del ácido nucleico molde pueden ser de gran utilidad.

10 Informe del análisis

El informe del análisis debe escribirse de acuerdo con la Norma ISO 24276 y debe incluir al menos la siguiente información adicional:

- el límite de detección y la matriz utilizada para identificar el límite de detección;
- descripción de la especificidad del método analítico;
- el resultado expresado de acuerdo al capítulo 9.

Anexo A (informativo)

Métodos con diana específica de taxón

A.1 Método con diana específica de taxón para la detección de componentes derivados de granos de soya.

A.1.1 Generalidades

El método describe un procedimiento de rutina para la detección de un gen de copia única específico de especie, presente en la soya (*Glycine max*).

Este método se puede utilizar para valorar la amplificabilidad del ADN de productos derivados de los granos de soya.

A.1.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

A.1.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en estudios colaborativos^{[8][9]} organizados por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by using genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética") del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine (BgVV) de acuerdo con el Artículo 35 del Germán Federal Foodstuffs Act. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A. 3 de la Norma ISO 21571:2005 (pero con una porción para análisis de 100 mg).

Los datos de los estudios colaborativos se recogen en la tabla A.1.

Tabla A.1— Resultados del estudio colaborativo

| Año del estudio colaborativo | 1997 ^[8] | 1998/1999 ^[9] |
|--|---------------------|--------------------------|
| Número de laboratorios | 25 | 27 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 22 | 20 |
| Número de muestras por laboratorio | 10 | 3 |
| Número de resultados aceptados | 220 | 60 |
| Número de muestras conteniendo habas de soja | 220 | 50 |
| Resultados falsos positivos | 0 | 1 (2%) |
| Resultados falsos negativos | 0 | 1 (2%) |

A.1.2.2 Especificidad molecular

A.1.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana una secuencia descrita en la base de datos GenBank®³⁾, con número de acceso K00821 = M30884.

A.1.2.2.2 Teórica

Como secuencia diana se eligió el gen de la lectina *Lef*^[10] de granos de soja, obtenido de las bases de datos de genes.

No se ha encontrado similitud entre la secuencia diana y las secuencias de ADN de otras plantas cultivadas (leguminosas, cereales y vegetales) en las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda NCBI BlastN®²⁾, *European Molecular Biology Laboratory (EMBL)* base de datos, 28 de septiembre, 2001). Sin embargo, GM03 muestra el 100% de similitud con los siguientes accesos de las bases de datos: AX033509 (secuencia 17 de patente DE19906169), AX033507 (secuencia 15 de patente DE19906169) y AX033501 (secuencia 9 de patente DE19906169) mientras que el cebador GM04 es sólo similar al número de acceso AX033509 (secuencia 17 de patente DE 19906169). El número de acceso M30884 es el mismo que el K00821, que corresponde a una entrada en GenBank® enviada originalmente en 1993.

EL número de copias de la secuencia diana no ha sido determinado, pero se ha supuesto que es un gen de una única copia.

A. 1.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación utilizando ADN de otras plantas cultivadas (leguminosas, cereales, vegetales) o de carne de vaca o cerdo. El ensayo de PCR para la detección de granos de soja parece presentar alta especificidad para ADN de granos de soja^{[10][11]}

A.1.2.3 Límite de detección (LD)

El LD absoluto no ha sido determinado, pero se ha demostrado que el método es capaz de detectar al menos 0,1 ng de ADN de granos de soja, determinado fluorométricamente.

A.1.3 Adaptación

No hay información específica disponible.

A. 1.4 Principio

Mediante PCR se amplifica un fragmento de 118 bp del gen de la lectina de haba de soja y posteriormente se separa mediante electroforesis en gel de agarosa.

A. 1.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

A. 1.5.1 Agua

³⁾ GenBank® y BlastN son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

A. 1.5.2 Tampón de PCR 10 x⁴⁾ (sin MgCl₂).

A. 1.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂)= 25 mmol/l.

A. 1.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cada uno).

A.1.5.5 Oligonucleótidos

A.1.5.5.1 Cebador directo

Gen lectina de haba de soja (GenBank® con número de acceso K00821).

Cebador GM03: 5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C -3'.

A.1.5.5.2 Cebador inverso

Gen lectina de haba de soja (GenBank® con número de acceso K00821).

Cebador GM04: 5'-gCC CAT CTg CAÁ gCC TTT TTg Tg-3'.

A.1.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5 UI/µl.

A. 1.5.7 Sonda de hibridación (GM)

5'-ggT AgC gTT gCC AgC TTC g-3'.

A. 1.5.8 Tampón de citrato sódico salino (SSC) 5x, pH 7,0

La solución SSC concentrada 5 veces es una solución que contiene 0,75 mol/l de NaCl y 0,075 mol/l de citrato sódico.

A. 1.5.9 Solución de prehibridación

Conteniendo 5x SSC, 0,1% (concentración de masa) de N-laurilsarcosina, 0,02% (concentración de masa) de dodecil sulfato sódico (SDS) y 1% de Reactivo de Bloqueo⁵⁾ o 5% (concentración de masa) de leche desnatada en polvo^[12]

A.1.5.10 Solución de hibridación

Conteniendo 10 pmol de sonda de hibridación en 2,5 ml de solución de prehibridación (A.1.5.9). La temperatura de hibridación es de 50 °C. En la Referencia^[12] se recoge información adicional sobre las condiciones para la hibridación.

⁴⁾ 10 x significa concentrado 10 veces, es decir, un tampón de reacción de PCR conteniendo 1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8.3.

⁵⁾ El Reactivo de Bloqueo de Boehringer, Mannheim es un ejemplo de producto adecuado disponible comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares

A. 1.6 Aparatos**A.1.6.1 Termociclador****A.1.6.2 Cubeta de electroforesis para seles, con fuente eléctrica.****A. 1.7 Procedimiento****A. 1.7.1 Preparación de PCR**

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla A. 2. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes más grandes ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla A.2 ha resultado ser óptima.

Tabla A.2—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|----------------------------|---------------------------------|
| ADN de la muestra | 10 ng a 50 ng | 1 |
| Agua | | 15,9 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | Lx | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,8 mmol/l | 2 |
| Cebador GM03, 5 µmol/l | 0,2 µmol/l | 1 |
| Cebador GM04, 5 µmol/l | 0,2 µmol/l | 1 |
| Taq polimerasa, 5 UI/µl | 0,5 UI | 0,1 |

^a Si la solución tampón de PCR contiene ya MgCl₂, la concentración final de MgCl₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l.

A.1.7.2 Controles dePCR

Como control positivo se pueden utilizar materiales de referencia certificados de GTS 40-3-2 producidos por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM) Geel, Bélgica (IRMM-410).

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

A. 1.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla A. 3 ha sido el utilizado en los estudios de validación usando termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa⁶⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, deben respetarse las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

Tabla A.3—Programa de temperatura-tiempo

I

| | |
|--|--|
| Activación/desnaturalización inicia | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/60 °C 60 s/72 °C |
| Número de ciclos | 35 |
| Extensión final | 3 min./72 °C |

A.1.8 Identificación

Debido a que este método, sólo puede ser considerado como un método de control para determinar la calidad del ADN extraído, la identificación está basada sólo en el tamaño de los productos de PCR.

Si el método se utiliza con otra finalidad diferente a la mencionada anteriormente, la identidad del producto amplificado puede ser determinada por hibridación Southern usando una sonda GM marcada con digoxigenina (apartados A. 1.5.7 a A.1.5.10) o por secuenciación de los productos de PCR y comparación con las entradas recogidas en GenBank® referidas en el apartado A. 1.5.5.

A.1.9 Garantía de calidad general e interpretación de los resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de materiales de referencia preparados de GTS 40-3-2 (por ejemplo, series IRMM-410 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para fines de identificación, véase el apartado A.1.8.

La detección de un fragmento de un tamaño de 118 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable procedente de habas de soja con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado A.1.2.2.

⁶⁾ GeneAmp® 2400 y 9600 y AmpliTaq Gold® DNA polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Para los detalles sobre los pasos de la electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

A.2 Método con diana específica de taxón para la detección de secuencias de ADN multicopias generalmente presente en el cloroplasto de plantas

A.2.1 Generalidades

Éste es un procedimiento de rutina para la detección de secuencias de ADN multicopias presente en el cloroplasto de plantas (intrón trnL del cloroplasto).

Este método es adecuado para comprobar si la extracción de ADN de una muestra de alimento fue satisfactoria y para comprobar si la muestra contiene ADN amplificable de plantas. En el caso de materiales procesados, la aplicabilidad del método depende del grado de degradación del ADN.

Una célula de planta normalmente contiene múltiples copias de esta secuencia de ADN y el tamaño de la secuencia elegida como diana es sustancialmente mayor que la secuencia de ADN utilizada para la detección de modificaciones genéticas específicas. Por lo tanto, este método no se puede utilizar como control con propósitos de cuantificación.

El número de copias por célula puede variar entre las especies de plantas y los tejidos.

A.2.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

A.2.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en un estudio colaborativo ^[13] organizado por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética") del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) de acuerdo con el Artículo 35 del Germán Federal Foodstuffs Act. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A. 3 de la Norma ISO 21571:2005 (pero con una porción para análisis de 100 mg).

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla A. 4.

Tabla A.4—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 1995 |
|--|--------|
| Número de laboratorios | 18 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 18 |
| Número de muestras por laboratorio | 10 |
| Número total de muestras | 180 |
| Número de resultados aceptados | 180 |
| Número de muestras conteniendo papas B33-INV | 71 |
| Número de muestras conteniendo papas no OMG | 109 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

A.2.2.2 Especificidad molecular

A.2.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana secuencias descritas en la Referencia [14], por ejemplo, GenBank®, con número de acceso Z00044, S54304, XI5901.

A.2.2.2.2 Teórica

No se ha encontrado semejanza significativa de la secuencia con secuencias de ADN de otros organismos diferentes a las plantas en las búsquedas realizadas en bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN®, base de datos EMBL, 28 de septiembre, 2001).

Los cebadores han sido diseñados para amplificar una única secuencia de cloroplasto (el intrón de parada del gen *trnL*), que no muestra similitud conocida con secuencias no diana.

A.2.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación utilizando ADN de animales, hongos o bacterias^[14].

La amplificación ha sido demostrada utilizando ADN de algas, cianobacterias, briofitos, pteridofitos, gimnospermas y angiospermas^[14].

El número de copias de la secuencia diana es múltiple, dependiendo de la especie de la planta y del tipo de tejido.

A.2.2.3 Límite de detección (LD)

El LD absoluto no ha sido determinado, pero se ha demostrado que el método es capaz de detectar al menos 0,1 ng de ADN de haba de soja, determinado fluorométricamente.

A.2.3 Adaptación

No hay información específica disponible.

A.2.4 Principio

Un fragmento de ADN de 500bp a 600bp presente en el gen tRNA de cloroplastos ^[14], se amplifica mediante PCR y posteriormente se separa mediante electroforesis en gel de agarosa.

A.2.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

A.2.5.1 Agua

A.2.5.2 Tampón de PCR 10x (sin MgCl₂).

A.2.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂)= 25 mmol/l.

A.2.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cada uno).

A.2.5.5 Oligonucleótidos

A.2.5.5.1 Cebador directo

Gen tRNA de cloroplasto (GenBank® con número de acceso Z00044, X15901).

Cebador c^[14]: 5'-CgA AAT Cgg TAg ACg CTA **Cg-3'**.

A.2.5.5.2 Cebador inverso

Gen tRNA de cloroplasto (GenBank ® con número de acceso Z00044,X15901).

Cebador d^[14]: 5'-ggg gAT AgA ggg ACT TgA **AC-3'**.

A.2.5.6 ADN polimerasa termoestable, 5 UI/μl.

A.2.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en el apartado A.1.6.

A.2.7 Procedimiento

A.2.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 μl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla A.5. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla A. 5 ha resultado ser óptima.

Tabla A.5—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|---|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | 10ng a 50ng | 1 |
| Agua | | 13,9 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1 X | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ , 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,8 mmol/l | 2 |
| Cebador c, 10 µmol/l | 0,8 µmol/l | 2 |
| Cebador d, 10 µmol/l | 0,8 µmol/l | 2 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 0,5 UI | 0,1 |
| ^a Si la solución tampón de PCR contiene ya MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l. | | |

A.2.7.2 Controles de PCR

Como control positivo se pueden utilizar materiales de referencia certificados de GTS 40-3-2 producidos por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM) Geel, Bélgica (IRMM-410).

Deberían incluirse otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

A.2.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla A. 6 ha sido el utilizado en los estudios de validación usando termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq® ADN polimerasa⁷⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, deben respetarse las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

⁷⁾ GeneAmp® 2400 y 9600 y AmpliTaq® ADN polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares

Tabla A.6—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|---|
| Activación/desnaturalización inicial | 4 min./95°C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/55 °C 120 s/72 °C |
| Número de ciclos | 35 |
| Extensión final | 5 min./72 °C |

A.2.8 Identificación

Debido a que este método, sólo puede ser considerado como un método de control para determinar la calidad del ADN extraído, el tamaño exacto de los fragmentos no es relevante en este método. Hasta ahora, la identificación está basada sólo en el tamaño de los productos de PCR dentro del rango esperado de 500 bp a 600 bp.

A.2.9 Garantía de calidad general e interpretación de los resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN.

Para fines de identificación, véase el apartado A.2.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 500 bp a 600 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable procedente de plantas con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado A.2.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

A.3 Método con diana específica de taxón y método de cribado de OMG para la detección de ADN derivado de tomate y/o tomate modificado genéticamente Zeneca

A.3.1 Generalidades

Éste es un procedimiento de rutina para la detección de una secuencia de ADN de copia única específica de especie presente en el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mili).

El método puede también utilizarse como método de cribado para la detección de tomates modificados genéticamente de maduración retardada (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mili cultivos Ailsa Craig cepa Nema 282F).

No se han descrito procedimientos para verificar la identidad de los productos de PCR. Por tanto, el método no puede ser considerado como un método de identificación. Puede ser utilizado para evaluar la amplificabilidad del ADN extraído de tomate.

A.3.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

A.3.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en un estudio colaborativo^[15] organizado por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by using genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética") del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) de acuerdo con el Artículo 35 del Germán Federal Foodstuffs Act. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005.

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla A. 7.

Tabla A.7—Resultados del primer estudio colaborativo

| Año | 1998 |
|---|--------|
| Número de laboratorios | 19 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 18 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 90 |
| Número de muestras conteniendo <i>Lycopersicon esculentum</i> Mili cv. Ailsa Craig cepa Nema 282F | 43 |
| Número de muestras conteniendo <i>Lycopersicon esculentum</i> Mili cv. Ailsa Craig cepa Nema 282C (no modificado genéticamente) | 47 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

Otro estudio colaborativo de acuerdo al criterio especificado en la Norma ISO 5725-2 fue llevado a cabo por el Germán Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) dentro de un Proyecto Europeo SMT4-CT96-2072. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005 (pero con una porción para análisis de 100 mg).

Tabla A.8—Resultados del segundo estudio colaborativo

| Año | 1998 |
|---|--------|
| Número de laboratorios | 21 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 19 |
| Número de muestras por laboratorio | 10 |
| Número de resultados aceptados | 190 |
| Número de muestras conteniendo <i>Lycopersicon esculentum</i> Mili cv. Ailsa Craig cepa Nema 282F (Zeneca) | 88 |
| Número de muestras conteniendo <i>Lycopersicon esculentum</i> Mili cv. Ailsa Craig cepa Nema 282C (no modificado genéticamente) | 102 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

A.3.2.2 Especificidad molecular

A.3.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana secuencias descritas en, por ejemplo, GenBank® con número de acceso X04583.

A.3.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN®, EMBL base de datos, 28 de septiembre, 2001), no se ha encontrado homología con secuencias de ADN que no sean de especies de plantas. Ambos cebadores coinciden en un 100% con los siguientes accesos de las bases de datos: X14074 (gen de poligalacturonasa de tomate para la degradación de la pared celular), X05656 (mRNA de poligalacturonasa de tomate), M37304 (gen (PG) poligalacturonasa de tomate), X04583 (mRNA de poligalacturonasa-2a de tomate), A24194 (clon poligalacturonasa de *L. esculentum*), A15981 (mRNA de poligalacturonasa-2a de *L. esculentum*), 101809 (Secuencia de nucleótido 1 de la patente US4801540), y AX062336 (secuencia 1 de la patente WO0078982).

A.3.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación utilizando ADN de otras plantas cultivadas ^[16].

No se ha determinado el número de copias de la secuencia diana, pero se supone que es un gen de una sola copia.

A.3.2.3 Límite de detección (LD)

El LD absoluto no ha sido determinado, pero se ha demostrado que el método es capaz de amplificar al menos 0,1 ng de ADN (determinado fluorométricamente), extraído de tomate fresco.

A.3.3 Adaptación

Cuando se utilizan muestras muy procesadas, podría dar lugar a resultados negativos debido a la ausencia potencial de fragmentos diana de 383 bp de longitud.

La detección de un fragmento de tamaño de 383 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable procedente de tomate, mientras que fragmentos de 180 bp indican que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable procedente de tomate modificado genéticamente (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mili cultivos Ailsa Craig cepa Nema 282F).

A.3.4 Principio

El gen de la poligalacturonasa (gen PG) codifica para una enzima PG que está asociada con la maduración. Este método amplifica el gen endógeno PG^[17], produciendo un fragmento de un tamaño de 383bp. En el tomate modificado genéticamente Zeneca, se puede amplificar un segundo fragmento de 180 bp, procedente del cDNA truncado del genPG^{[18][19]}.

A.3.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

A.3.5.1 Agua

A.3.5.2 Tampón de PCR IOx (sin MgCl₂).

A.3.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

A.3.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cada uno).

A.3.5.5 Oligonucleótidos

A.3.5.5.1 Cebador directo

Gen PG (GenBank ® con número de acceso X04583).

Cebador PG34L: 5'-ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT --3'.

A.3.5.5.2 Cebador inverso

Gen PG (GenBank ® con número de acceso X04583).

Cebador PG34R: 5'-CgT Tgg TgC ATC CCT gCA Tgg-3'.

A.3.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5UI/μl.

A.3.6 Aparatos

Como se especifica en el apartado A.1.6.

A.3.7 Procedimiento

A.3.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de 25 µl por reacción de PCR, compuesto por los reactivos recogidos en la tabla A.9. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla A.9 ha resultado ser la óptima.

Tabla A.9—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | 10ng a 50ng | 1 |
| Agua | | 16,8 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1x | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,4 mmol/l | 1 |
| Cebador PG34L, 10 µmol/l | 0,4 µmol/l | 1 |
| Cebador PG34R, 10 µmol/l | 0,4 µmol/l | 1 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 1UI | 0,2 |
| ^a Si el tampón de PCR contiene ya MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l. | | |

A.3.7.2 Controles de PCR

Como control positivo para el método con diana específica de taxón puede utilizarse ADN de tomate fresco. Sin embargo, no existe disponible comercialmente control positivo para la versión del gen truncado presente en el tomate modificado genéticamente⁸⁾.

Deberían incluirse otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

A.3.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla A. 10 ha sido el utilizado en los estudios de validación usando termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® ADNpolimerasa⁹⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, deben respetarse las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

⁸⁾ Para disponer de material de control apropiado, contactar con su organismo nacional de normalización

⁹⁾ GeneAmp® 2400 y 9600 y AmpliTaq Gold® polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla A.10—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/94 °C 60 s/60 °C 60 s/72 °C |
| Número de ciclos | 35 |
| Extensión final | 6 min./72 °C |

A.3.8 Identificación

Hasta ahora, la identificación está basada sólo en el tamaño de los productos de PCR.

A.3.9 Garantía de calidad general e interpretación de los resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de materiales de referencia preparados de tomate.

Para propósitos de identificación, véase el apartado A.3.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 383 bp y 180 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable de tomate y de tomate modificado genéticamente Zeneca, respectivamente, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado A.3.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

A.4 Método con diana específica de taxón para la detección de componentes derivados de maíz

A.4.1 Generalidades

Éste es un procedimiento de rutina para la detección de la secuencia del gen de copia única específico de especie de la invertasa en maíz (*Zea mays*).

No se han descrito procedimientos para verificar la identidad de los productos de PCR. Por tanto, el método no puede ser considerado como un método de identificación. Puede ser utilizado para evaluar la amplificabilidad de ADN extraído de maíz.

A.4.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

A.4.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by using genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética") del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) de acuerdo con el Artículo 35 del Germán Federal Foodstuffs Act en varios estudios colaborativos. Para la

extracción de ADN, la mitad de los participantes utilizaron el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005 y el resto utilizó Wizard® DNA-Clean-Up-System¹⁰⁾.

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla A.11.

Tabla A.11—Resultados del estudio colaborativo ^[20]

| Año | 1999 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 18 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 16 |
| Número de muestras por laboratorio | 6 |
| Número de resultados aceptados | 96 |
| Número de muestras conteniendo Bt-176 | 32 |
| Número de muestras conteniendo Bt-11 | 32 |
| Número de muestras conteniendo maíz no MG | 32 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

A.4.2.2 Especificidad molecular

A.4.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana una secuencia descrita en la base de datos GenBank® con número de acceso U1 6123.

A.4.2.2.2 Teórica

Como secuencia diana se eligió el gen de la invertasa de maíz obtenida de las bases de datos de secuencias de ADN.

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN®, EMBL base de datos, 28 de septiembre, 2001), se ha encontrado cierta semejanza con secuencias de ADN de otras plantas relevantes en agricultura (leguminosas, cereales, vegetales) y con secuencias de ADN humanas y de insectos.

Resultado obtenido con el Cebador IVR1-F:

- AF171874 *Zea mays* invertasa ácido soluble IVR1 (100% coincidencia);

¹⁰⁾ Wizard® DNA-Clean-Up-System es un ejemplo de un producto disponible comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de este producto por parte de ISO.

- AX033517 Secuencia 25 de la Patente DE19906169 (coinciden 21 nucleótidos contiguos);
- AX033514 Secuencia 22 de la Patente DE19906169 (coinciden 21 nucleótidos contiguos). Resultado obtenido con el Cebador IVR1-R:
- AF171874 *Zea mays* invertasa ácido soluble IVR1 (100% coincidencia);
- AX150234 Secuencia 30 de la Patente WO0132919 (100% coincidencia);
- AJ224681 *Triticum aestivum* mRNA de beta-fructosidasa (coinciden 20 nucleótidos contiguos);
- AF062735 *Saccharum officinarum* invertasa ácido soluble (coinciden 19 nucleótidos contiguos);
- AF062734 *Saccharum robustum* invertasa ácido soluble (coinciden 19 nucleótidos contiguos).

No ha sido determinado el número de copias de la secuencia diana, pero se supuso que es un gen de una sola copia.

A.4.2.2.3 Experimental

El ensayo de PCR de maíz parece ser altamente específico para ADN de maíz ^[21].

A.4.2.3 Límite de detección (LD)

El LD absoluto no ha sido determinado, pero se ha demostrado que el método es capaz de amplificar < 0,1 ng de ADN de maíz (determinado fluorométricamente), extraído de granos de maíz^[20]

A.4.3 Adaptación

No hay información específica disponible.

A.4.4 Principio

El gen de la invertasa de maíz codifica para una enzima del metabolismo de carbohidratos.

Mediante PCR se amplifica un fragmento de ADN de 226 bp del gen de la invertasa de maíz y es posteriormente separado por electroforesis en gel de agarosa.

A.4.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

A.4.5.1 Agua

A.4.5.2 Tampón de PCR IOx (sin MgCl₂).

A.4.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

A.4.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cada uno).

A.4.5.5 Oligonucleótidos

A.4.5.5.1 Cebador directo

Gen invertasa de maíz (GenBank ® con número de acceso U16123).

Cebador IVR1-F: 5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'.

A.4.5.5.2 Cebador inverso

Gen invertasa de maíz (GenBank ® con número de acceso U16123).

Cebador IVR1-R: 5'-ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'.

A.4.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5UI/μl.

A.4.6 Aparatos

Como se especifica en el apartado A.1.6.

A.4.7 Procedimiento

A.4.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla por reacción de PCR de 25 μl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla A.12. La reacción PCR puede también realizarse en volúmenes más grandes ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla A.12 ha resultado ser óptima.

Tabla A.12—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (μl) |
|---|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | 10ng a 50ng | 2 |
| Agua | | 15,3 |
| Tampón de PCR 10 x (sin MgCl ₂) | 1 X | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ , 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,4 mmol/l | 1 |
| Cebador IVR1-F, 10 μmol/l | 0,5 μmol/l | 1,25 |
| Cebador IVR1-R, 10 μmol/l | 0,5 μmol/l | 1,25 |
| Taq ADN polimerasa, 5 IU/μl | 1UI | 0,2 |
| ^a Si la solución tampón de PCR contiene ya MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l. | | |

A.4.7.2 Controles de PCR

Como control positivo, puede utilizarse material de referencia certificado de IRMM de, por ejemplo, maíz Bt 11 (IRMM-412) o maíz Evento 176 (Bt 176) (IRMM-411).

Deberían incluirse otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

A.4.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla A. 13 ha sido el utilizado en los estudios de validación usando termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa¹¹⁾ La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, deben respetarse las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

Tabla A.13—Programa de temperatura-tiempo

| Activación/desnaturalización inicial 12 min./95 °C | |
|---|--|
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/64 °C 60 s/72 °C |
| Número de ciclos | 35 |
| Extensión final | 10min/72°C |

A.4.8 Identificación

Hasta ahora, la identificación está basada sólo en el tamaño de los productos de PCR.

A.4.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de materiales de referencia certificados preparados de maíz (por ejemplo, series IRMM- 412 [maíz Btl 1] o IRMM-411 [maíz Evento 176] de IRMM, Geel, Bélgica).

Para propósitos de identificación, véase A.4.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 226 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable procedente de maíz, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado A.4.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véasele capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

¹¹⁾ GeneAmp® 2400 y 9600 y AmpliTaq Gold® polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Anexo B (informativo)

Métodos de cribado

B.1 Método de cribado para la detección de ADN de plantas modificadas genéticamente (promotor CaMV 35S)

B.1.1 Generalidades

El método describe la detección de un número variable de copias de la secuencia de ADN del promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Debido a la presencia del promotor CaMV 35S en muchas plantas modificadas genéticamente, este método puede ser utilizado como cribado para la presencia ADN derivado de plantas MG ^[22] ^[23].

B.1.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

B.1.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en varios estudios colaborativos con diferentes matrices de alimentos crudos y procesados ^[24]^[25]

El método ha sido validado en un estudio colaborativo^[24] bajo la coordinación del Germán Federal Instituto for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005 (pero con 100 mg de cantidad de muestra).

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla B.1.

Tabla B.1—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 1999 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 27 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 23 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 115 |
| Número de muestras conteniendo GTS 40-3-2 | 59 |
| Número de muestras conteniendo soja no MG | 56 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

B.1.2.2 Especificidad molecular

B.1.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana una secuencia descrita en, por ejemplo, la base de datos GenBank® con número de acceso V00141.

En el anexo de Referencias se suministra una lista de plantas modificadas genéticamente que contienen el promotor CaMV 35S ^[24].

Puesto que la secuencia amplificada se derivada del virus del mosaico de la coliflor que infecta la coliflor y otros miembros de la familia *Brassicaceae* (*Cruciferae*) así como *Resedaceae* y *Solanaceae* ^{[26] [27]}, puede darse el caso de algún resultado falso positivo.

Por tanto, los resultados positivos en muestras derivadas de *Brassicaceae*, *Resedaceae* y *Solanaceae* deberían ser tratados con cautela. Los resultados positivos pueden indicar la presencia de productos derivados de plantas MG pero no deberían ser interpretados como prueba de la presencia de productos derivados de plantas MG sin una confirmación adicional.

Con el fin de poder distinguir entre una infección viral y material MG, pueden utilizarse métodos de detección del virus del mosaico de la coliflor ^[6].

B.1.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN®, EMBL base de datos, 28 de septiembre, 2001), no se han encontrado semejanzas con secuencias de ADN de plantas cultivadas no MG. Sin embargo, ambos cebadores coinciden con un acceso que no se refiere al virus del mosaico de la coliflor, vectores recombinantes o patentes: S70105 cp (proteína de cubierta) [virus del mosaico de pepino]. Los cebadores también coinciden con más de 100 entradas referidas al virus del mosaico de la coliflor, vectores recombinantes y patentes.

B.1.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de plantas cultivadas no modificadas genéticamente en ausencia de ADN del virus ^{[22] [24] [25] [28]}

Se ha observado amplificación con ADN de muchas de las plantas modificadas genéticamente, por ejemplo, GTS 40-3-2 (habas de soja Roundup Ready®), las líneas de maíz Evento 176 (Bt 176), Bt 11, MON810, MON809 y tomates de maduración retardada (Zeneca) ^{[22] [24] [25] [28]}.

El número de copias de la secuencia de ADN es variable.

B.1.2.3 Límite de detección (LD)

El LD absoluto no ha sido determinado. Se ha demostrado ^[25] un LD relativo de 0,1% de habas de soja modificadas genéticamente en harina de granos de soja IRMM-410 y de 0,1% de maíz Evento 176 (Bt 176) IRMM-411 modificado genéticamente en harina de maíz (fracción de masa) (materiales de referencia certificados, CRMs).

B.1.3 Adaptación

No hay información específica disponible.

B.1.4 Principio

Mediante PCR se amplifica un fragmento de ADN de 195 bp de la secuencia del promotor CaMV 35S y posteriormente se detecta mediante la separación por electroforesis en gel de agarosa. Para la identificación de los productos de PCR, debería realizarse una etapa de verificación.

Los promotores son secuencias de reconocimiento o unión para la RNA-polimerasa, las cuales son responsables de la expresión de los genes. El promotor constitutivo 35S del CaMV es utilizado frecuentemente en plantas modificadas genéticamente.

B.1.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

B. 1.5.1 Agua

B. 1.5.2 Tampón de PCR IOx (sin MgCl₂).

B. 1.5.3 Solución de MgCl₂, c (MgCl₂) = 25 mmol/l.

B. 1.5.4 Solución de dNTP, c (dNTP) = 2,5 mmol/l (cada uno).

B. 1.5.5 Oligonucleótidos

B.1.5.5.1 Cebador directo

Promotor CaMV 35S, 35s-1 ^{[24][28]}: 5'-gCT CCT ACÁ AAT gCC ATC A-3'.

Diseñado junto con el correspondiente cebador inverso para amplificar secuencias como se describe en el acceso número V00141.

B.1.5.5.2 Cebador inverso

Promotor CaMV 35S, 35s-2 ^{[24][28]} 5'-gAT AgT ggg ATT gTg CgT CA-3'.

Diseñado junto con el correspondiente cebador directo para amplificar secuencias como se describe en el acceso número V00141.

B.1.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5UI/μl.

B.1.5.7 Enzima de restricción: *Xmn* I (=Asp 700).

B.1.6 Aparatos y equipos

B. 1.6.1 Termociclador

B.1.6.2 Cubeta de electroforesis para geles, con fuente eléctrica.

B.1.7 Procedimiento (Preparación de PCR)

B. 1.7.1 Generalidades

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla B.2. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla B.2 ha resultado ser óptima.

Tabla B.2—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | 10ng a 50ng | 1 |
| Agua | | 15,9 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1 X | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,8 mmol/l | 2 |
| Cebador 35s-1, 5 µmol/l | 0,2 µmol/l | 1 |
| Cebador 35s-2, 5 µmol/l | 0,2 µmol/l | 1 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 0,5 UI | 0,1 |
| ^a Si el tampón de PCR contiene ya MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l. | | |

B.1.7.2 Controles de PCR

Como control positivo, puede utilizarse material de referencia certificado de GTS 40-3-2 (material conteniendo 0,1% de ingredientes de planta modificada genéticamente) (IRMM-410), producido por IRMM Geel, Bélgica.

Deberían incluirse otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

B.1.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla B.3 ha sido el utilizado en los estudios de validación usando termocicladores GeneAmp® PCR-systems 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa¹²⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, deben respetarse las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

¹²⁾ GeneAmp® PCR-systems 2400 y 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla B.3—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 20 s/94 °C 40 s/54 °C 60 s/72 °C |
| Número de ciclos | 40 |
| Extensión final | 3 min./72 °C |

B.1.8 Identificación

La identidad de los productos obtenidos de la reacción de PCR puede verificarse mediante el análisis de restricción del producto obtenido de PCR *oonXmn* I, del cual se espera la producción de dos fragmentos (115 bp y 80 bp) ^[24].

B.1.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados del material de referencia certificado (preparado de, por ejemplo, serie IRMM-410 [GTS 40-3-2] de IRMM, Geel, Bélgica).

Para propósitos de identificación, véase el apartado B.1.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 195 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificaba de CaMV o de una fuente MG, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado B.1.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

B.2 Método alternativo de cribado para la detección de ADN de plantas modificadas genéticamente (promotor CaMV 35S)

B.2.1 Generalidades

Este método describe la detección de un número variable de copias de la secuencia de ADN del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en matrices de alimentos procesados. Debido a la presencia del promotor 35S CaMV en la mayoría de las plantas modificadas genéticamente, este método puede ser utilizado como cribado para la presencia de ADN derivado de plantas MG ^{[22] [23] [29]}.

No se describen herramientas para verificar la identidad del producto de PCR. Por consiguiente, este método no puede ser considerado como un método de identificación. Puede ser utilizado para evaluar la amplificabilidad del ADN que contiene la secuencia diana.

B.2.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

B.2.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado siguiendo los criterios especificados en la Norma ISO 5725-2. El estudio colaborativo involucró a 23 laboratorios europeos y fue coordinado por el EC JRC ^[29]^[30]. El método ha sido evaluado para la detección de OMGs en varias matrices de alimentos procesados (sémola de maíz cocida, fórmulas infantiles, galletas, harina de granos de soya acidificada) conteniendo cada una 0%, 2% y 100% (10% en vez de 100% en el caso de galletas) de GST 40-3-2 o Evento 176. Cada participante recibió 4 muestras control y 30 duplicados independientes de muestras desconocidas, de los cuales 10 correspondían a muestras 0% OMG y 20 contenían varios porcentajes de los eventos modificados genéticamente. Todos los participantes recibieron una descripción detallada del método para la extracción de ADN bien con el método CTAB o con un kit comercial disponible. Sin embargo, los laboratorios fueron libres para aplicar el método de su elección para la extracción de ADN mientras que las condiciones de PCR tuvieron que ser optimizadas específicamente para su equipamiento local. Se pidió a los laboratorios que analizaran cada muestra una vez y que especificaran si se consideraba OMG positiva o negativa. Ya que la mayoría de los laboratorios remitieron resultados correctos (14 laboratorios enviaron entre el 90% y 100% de puntuación correcta y 3 laboratorios entre el 80% y 90% de puntuación correcta) y ninguno remitió resultados correctos en el rango de 70% al 80%, el punto de corte se estableció en el 80% de los resultados correctos enviados. En consecuencia, 5 laboratorios fueron excluidos tras un análisis estadístico posterior. Se obtuvo una media de 96,1% de resultados correctos para las muestras que no contenían OMG (3,9% de resultados falsos positivos) y una media de 98,1% de resultados correctos para las muestras conteniendo OMGs (1,9% de resultados falsos negativos) ^[30]. Los resultados se muestran en la tabla B.4.

Tabla B.4—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 1999 |
|------------------------------------|-------------|
| Número de laboratorios | 30 |
| Número de laboratorios que envían | 18 |
| Número de muestras por laboratorio | 12 |
| Número total de muestras | 360 |
| Número de resultados aceptados | 540 |
| Resultados falsos positivos | 3,9% |
| Resultados falsos negativos | 1,9% |

B.2.2.2 Especificidad molecular

B.2.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana la secuencia descrita en, por ejemplo, la base de datos GenBank® con número de acceso V00141. Para consultar la lista de plantas modificadas genéticamente que contienen el promotor CaMV 35S véanse las Referencias [23] y [24].

Puesto que la secuencia amplificada deriva del virus del mosaico de la coliflor que infecta a la coliflor y otros miembros de la familia *Brassicaceae* (*Cruciferae*) así como *Resedaceae* y *Solanaceae* ^{[26][27]}, puede darse el caso de algún resultado falso positivo.

Por tanto, los resultados positivos en muestras derivadas de *Brassicaceae*, *Resedaceae* y *Solanaceae* deberían ser tratados con cautela. Los resultados positivos pueden indicar la presencia de productos derivados de plantas MG pero no deberían ser interpretados como prueba de la presencia de productos derivados de plantas MG sin una confirmación adicional.

Con el fin de poder distinguir entre una infección viral y material MG, pueden utilizarse métodos de detección del virus del mosaico de la coliflor ^[6].

B.2.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN®, EMBL base de datos, 28 de septiembre, 2001) no se han encontrado semejanzas con secuencias de ADN de plantas cultivadas no MG. Los cebadores coinciden con una extensa lista de accesos referidos al virus del mosaico de la coliflor, vectores recombinantes y patentes.

B.2.2.2.3 Experimental

En los ensayos realizados con anterioridad al estudio colaborativo no se ha observado amplificación utilizando ADN de habas de soja no MG ^[29].

B.2.2.3 Límite de detección (LD)

Con este método no se ha determinado el límite de detección absoluto, pero se ha demostrado que detecta al menos 50 copias de ADN de GTS 40-3-2 ^[29]

El LD relativo no fue determinado, pero en el estudio colaborativo ^[28] el 2% de OMG [GTS 40-3-2 (habas de soja Roundup Ready®) y/o maíz Evento 176 (Bt 176 de maíz)] podría ser detectado en galletas, fórmulas infantiles y habas de soja acidificadas con un 100% de resultados correctos ^[30].

B.2.3 Adaptación

No se dispone de información específica.

B.2.4 Principio

Mediante PCR se amplifica un fragmento de ADN de 123 bp de la secuencia del promotor CaMV 35S y posteriormente se detectada por electroforesis en gel. Puede verificarse la identidad de los productos de PCR, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. Sin embargo, no se ha validado ningún procedimiento de verificación.

Los promotores son secuencias de reconocimiento o unión para la RNA-polimerasa, responsable de la expresión de los genes. El promotor constitutivo 35S de CaMV es utilizado frecuentemente en plantas modificadas genéticamente ^[22].

B.2.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

B.2.5.1 Agua

B.2.5.2 Tampón de PCR IOx, $c(\text{MgCl}_2) = 15\text{mmol/l}$.

B.2.5.3 Solución de dNTP, $c(\text{dNTP}) = 4\text{ mmol/l}$ (de cada uno).

B.2.5.4 Oligonucleótidos

B.2.5.4.1 Cebador directo

Promotor CaMV 35S, 35s-cf3: 5'-CCA CgT CTT CAÁ AgC AAg Tgg-3'.

Diseñado para amplificar el promotor CaMV 35S, por ejemplo, número de acceso V00141.

B.2.5.4.2 Cebador inverso

Promotor CaMV 35S, 35s-cr4: 5'-TCC TCT CCA AAT gAA ATg AAC TTC C-3'.

Diseñado para amplificar el promotor CaMV 35S, por ejemplo, número de acceso V00141.

B.2.5.5 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5 UI/ μl .

B.2.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en el apartado B.1.6.

B.2.7 Procedimiento

B.2.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 μl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla B.5. La reacción de PCR puede realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla B.5 ha resultado ser óptima.

Tabla B.5—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | | 5 |
| Agua | | 14,84 |
| Tampón de PCR IOx (conMgCl ₂ 15 mmol/l) ^a | 1x | 2,5 |
| Solución de dNTP, 16 mmol/l | 0,64 mmol/l | 1 |
| Cebador 35s-cf3, 20 µmol/l | 0,6 µmol/l | 0,75 |
| Cebador 35s-cr4, 20 µmol/l | 0,6 µmol/l | 0,75 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 0,8 UI | 0,16 |
| ^a Si el tampón de PCR utilizado no contiene MgCl ₂ , los volúmenes y las concentraciones deberían ajustarse en consecuencia. | | |

B.2.7.2 Controles de PCR

Como control positivo, puede utilizarse material de referencia certificado de GTS 40-3-2 (material conteniendo 0,1% de ingredientes de planta modificada genéticamente) (IRMM-410), producido por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM) Geel, Bélgica.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

B.2.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla B.6 ha sido utilizado en los estudios de validación cuando se usan sistemas termocicladores Perkin Elmer 2400/9600/9700 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa¹³⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por el calor, las recomendaciones del fabricante deberían respetarse cuidadosamente, a no ser que el protocolo indique de otra forma de utilización.

Tabla B.6—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|---|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 25 s/95 °C 30 s/62 °C 45 s/72 °C |
| Número de ciclos | 50 |
| Extensión final | 7 min./72 °C |

¹³⁾ GeneAmp® 2400, 9600 y 9700 y AmpliTaq Gold® polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

B.2.8 Identificación

Se recomienda verificar la identidad de los productos de PCR derivados de muestras desconocidas mediante, por ejemplo, restricción, secuenciación del ADN o hibridación de ADN.

B.2.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia certificado que contengan la secuencia diana de ADN (por ejemplo, serie IRMM-410 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para fines de identificación, véase el apartado B.2.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 123 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable del promotor CaMV 35S, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado B.2.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

B.3 Método de cribado para la detección de ADN de plantas modificadas genéticamente (*Agrobacterium tumefaciens* terminador-NOS)

B.3.1 Generalidades

El método describe la detección de un número variable de copias de la secuencia de ADN terminador (NOS) nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Debido a la presencia del terminador-NOS en la mayoría de las plantas modificadas genéticamente, este método puede utilizarse como método de cribado para la detección de componentes derivados de plantas MG ^[22] _{[23]. [29] [30].}

No se describen herramientas para verificar la identidad del producto de PCR. Por consiguiente, este método no puede ser considerado como un método de identificación. Puede utilizarse para valorar la amplificabilidad del ADN que contiene la secuencia diana.

B.3.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

B.3.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado siguiendo los criterios especificados en la Norma ISO 5725-2. El estudio colaborativo involucró a 23 laboratorios europeos y fue coordinado por la UE JRC^[29] _[30]. El método ha sido evaluado para la detección de OMGs en varias matrices de alimentos procesados (sémola de maíz cocida, fórmulas infantiles, galletas, harina de granos de soya acidificada) conteniendo cada una 0%, 2% y 100% (10% en vez de 100% en el caso de galletas) de GST 40-3-2 o Evento 176. Puesto que el Evento 176 no contiene secuencias del terminador-NOS, las muestras que contengan Evento 176 no deberían ser evaluadas con este método. Sin embargo, puesto que el estudio colaborativo fue organizado simultáneamente con el método 35S, todas las muestras fueron enviadas y evaluadas por los laboratorios. Los resultados de la sémola de maíz cocida fueron excluidos en el análisis estadístico, en una etapa posterior.

Cada participante recibió 4 muestras control y 30 duplicados independientes de muestras desconocidas, de los cuales 10 correspondían a muestras 0% OMG y 20 contenían varios porcentajes de los eventos modificados genéticamente. Todos los participantes recibieron una descripción detallada del método para la extracción de ADN bien con el método CTAB o con un kit comercial disponible. Sin embargo, los laboratorios fueron libres para aplicar el método de su elección para la extracción de ADN, mientras que las condiciones de PCR tuvieron que ser optimizadas específicamente para su equipamiento local. Se pidió a los laboratorios que analizaran cada muestra una vez y que especificaran si se consideraba OMG positiva o negativa. Ya que la mayoría de los laboratorios remitieron resultados correctos (14 laboratorios enviaron entre el 90% y 100% de puntuación correcta y 3 laboratorios entre el 80% y 90% de puntuación correcta) y ninguno remitió resultados correctos en el rango de 70% al 80%, el punto de corte se estableció como el 80% de los resultados correctos enviados. En consecuencia 5 laboratorios fueron excluidos tras un análisis estadístico posterior. Puesto que el Evento 176 no contiene secuencias terminador-NOS, todos los resultados analíticos de las preparaciones de sémola de maíz cocida deberían ser negativos. Los resultados de las muestras de sémola de maíz cocida tuvieron un alto porcentaje (100%) de resultados correctos y se excluyeron de la evaluación estadística.

Se obtuvo una media de 98,2% de resultados correctos para muestras sin OMG (1,8% de resultados falsos positivos) y una media de 97,9% de resultados correctos de muestras **conteniendo** OMG (2,1% de resultados falsos negativos) ^[29] Los datos quedan recogidos en la tabla B.7.

Tabla B.7—Resultados de el estudio colaborativo

| Año | 1999 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 30 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 18 |
| Número de muestras por laboratorio | 12 |
| Número total de muestras | 360 |
| Número de resultados aceptados | 540 |
| Resultados falsos positivos | 1,8% |
| Resultados falsos negativos | 2,1% |

B.3.2.2 Especificidad molecular

B.3.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana la secuencia del terminador nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* descrita en la base de datos GenBank® con número de acceso V00087.

Puede darse el caso de algún resultado falso positivo ya que la secuencia amplificada deriva de *Agrobacterium*, que es una bacteria del suelo presente en la naturaleza. Los resultados positivos pueden indicar la presencia de productos derivados de plantas MG pero no se deben interpretar

sin una confirmación adicional. Se debería considerar la posible contaminación del material con *Agrobacterium* o bacterias relacionadas.

B.3.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN®, EMBL base de datos, 28 de septiembre, 2001) no se han encontrado semejanzas con secuencias de ADN de plantas cultivadas no MG. Nótese que el cebador inverso coincide al 100% con el acceso, AF15682, polimerasa del virus RRSV (Rice Ragged Stunt Virus). Ambos cebadores coinciden con una larga lista de accesos referidos a vectores de clonación y patentes, al igual que la nopalina sintetasa.

B.3.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación usando ADN de plantas cultivadas no MG y matrices de alimentos procesados derivados de plantas no MG, en los ensayos realizados antes del estudio colaborativo ^[30].

B.3.2.3 Límite de detección (LD)

El límite de detección absoluto no ha sido determinado, pero se ha demostrado que el método detecta 50 copias de ADN de GTS 40-3-2 ^[29].

En un estudio colaborativo, se detectó el 2% de GTS 40-3-2 (habas de soja Roundup Ready®) en galletas, fórmulas infantiles y habas de soja acidificadas con al menos el 96,4% de resultados correctos ^[29].

B.3.3 Adaptación

No se dispone de información específica.

B.3.4 Principio

Mediante PCR se amplifica un fragmento de ADN de 118 bp de la secuencia del terminador-NOS y se detecta posteriormente por electroforesis en gel. La identidad de los productos de PCR se puede verificar por ejemplo, mediante secuenciación del ADN. Sin embargo, no se ha validado ningún procedimiento de verificación.

B.3.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

B.3.5.1 Agua

B.3.5.2 Tampón de PCR, IOx c(MgCl₂) = 15 mmol/l.

B.3.5.3 Solución de dNTP, c(dNTP) = 4mmol/l (de cada uno).

B.3.5.4 Oligonucleótidos

B.3.5.4.1 Cebador directo

Terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, HA-nosl 18f: 5'-gCA TgA CgT TAT TTA TgA gAT ggg-3'.

Diseñado para amplificar una secuencia descrita con número de acceso V00087.

B.3.5.4.2 Cebador inverso

Terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, HA-nosl 18r: 5'-gAC ACC gCg CgC gAT AAT TTA TCC-3'.

Diseñada para amplificar una secuencia descrita con número de acceso V00087.

B.3.5.5 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5 UI/μl.

B.3.6 Aparatos y equipos

Como se ha especificado en el apartado B. 1.6.

B.3.7 Procedimiento (Preparación de PCR)

B.3.7.1 Generalidades

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 μl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla B.8. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla B.8 ha resultado ser la óptima.

Tabla B.8—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (μl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | | 5 |
| Agua | | 14,84 |
| Tampón de PCR 1 Ox (con MgCl ₂ , 15 mmol/lf | 1 X | 2,5 |
| Solución de dNTP, 16 mmol/l | 0,64 mmol/l | 1 |
| Cebador HA-nos 118f, 20 μmol/l | 0,6 μmol/l | 0,75 |
| Cebador HA-nosl 18r, 20 μmol/l | 0,6 μmol/l | 0,75 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/μl | 0,8 UI | 0,16 |
| ^a Si el tampón de PCR utilizado no contiene MgCl ₂ , los volúmenes y concentraciones deberían ajustarse en consecuencia. | | |

B.3.7.2 Controles de PCR

Como control positivo, puede utilizarse material de referencia certificado de GTS 40-3-2 (material conteniendo 0,1% de ingredientes de planta modificada genéticamente) (IRMM-410), producido por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM) Geel, Bélgica.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

B.3.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla B.9 ha sido utilizado en los estudios de validación cuando se usan sistemas de termocicladores Perkin Elmer 2400/9600/9700 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa¹⁴⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, las recomendaciones del fabricante deberían respetarse cuidadosamente, a no ser que el protocolo indique otra forma de utilización.

Tabla B.9—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 25 s/95 °C 30 s/62 °C 45 s/72 °C |
| Número de ciclos | 50 |
| Extensión final | 7 min./72 °C |

B.3.8 Identificación

Se recomienda verificar la identidad de los productos de PCR derivados de muestras desconocidas mediante, por ejemplo, restricción, secuenciación del ADN o hibridación de ADN.

B.3.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, cuando el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia certificado conteniendo la secuencia diana (por ejemplo, series IRMM-410 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para propósitos de identificación, véase el apartado B.3.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 118 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificaba de una fuente que contiene el terminador-NOS, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado B.3.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

B.4 Método de cribado para la detección de ADN de plantas modificadas genéticamente (gen *npt II*)

¹⁴⁾ GeneAmp® 2400, 9600, 9700 y AmpliTaq Gold® polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

B.4.1 Generalidades

El método describe el procedimiento para la detección de un gen que codifica la neomicina fosfotransferasa (*npt II*). Debido a la inserción de este gen en las construcciones integradas en muchas de las plantas modificadas genéticamente, este elemento genético, puede ser utilizado como método de cribado para detección de material OMG derivado de plantas.

B.4.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

B.4.2.1 Estudio colaborativo

El método fue validado en un estudio colaborativo con productos crudos^[24] bajo la coordinación del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2.

Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005. (Pero con una porción para análisis de 100 mg).

Los datos del estudio colaborativo están recogidos en la tabla B.10.

Tabla B.10—Resultados del estudio colaborativo

| Muestra | Tomate Zeneca |
|--|------------------------|
| Cebador | APH2short/APH2 reverse |
| Año | 1998 |
| Número de laboratorios | 10 |
| Número de laboratorio que envían resultados | 9 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 45 |
| Número de muestras conteniendo el gen de la neomicina fosfotransferasa (tomate Zeneca) | 22 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

B.4.2.2 Especificidad molecular

B.4.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método ha sido diseñado para reconocer como diana una secuencia descrita en la base de datos GenBank® con número de acceso AF269238.

La neomicina fosfotransferasa procede de *E.coli* K12 y se encuentra presente en varios organismos modificados genéticamente.

El gen *npt* II procede de *E.coli* K12 y se encuentra en varios organismos modificados genéticamente.

Puesto que la secuencia diana procede de *E.coli* K12, puede darse el caso de resultados falsos positivos. Los resultados positivos no deberían interpretarse como prueba de la presencia de productos derivados de plantas MG.

B.4.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (búsqueda en NCBI BlastN® EMBL base de datos, 28 de septiembre, 2001) no se ha encontrado semejanza con secuencias de ADN de plantas cultivadas no modificadas genéticamente. Los cebadores recuperan solo el transposón Tn5, y secuencias sintéticas y patentadas.

B.4.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de plantas cultivadas no MG y matrices de alimentos procesados derivados.

B.4.2.3 Límite de detección (LD)

La validación sólo se ha realizado con 0% y 100% de material MG.

B.4.3 Adaptación

No se dispone de información específica.

B.4.4 Principio

Un fragmento de ADN de 215 bp de la secuencia del gen de la neomicina fosfotransferasa es amplificado mediante PCR y detectado mediante electroforesis en gel. La identidad de los productos de PCR, puede verificarse mediante, por ejemplo, restricción.

La neomicina fosfotransferasa produce resistencia bacteriana a los antibióticos neomicina/kanamicina y el gen ha sido introducido solo como marcador.

B.4.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

B.4.5.1 Agua

B.4.5.2 Tampón de PCR, IOx $c(\text{MgCl}_2) = 15 \text{ mmol/l}$.

B.4.5.3 Solución de dNTP, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cada uno).

B.4.5.4 Oligonucleótidos

B.4.5.4.1 Cebador directo

APH2 short: 5'-CTC AAC TTg CTC CTg CCg AgA-3'.

B.4.5.4.2 Cebador inverso

APH2 reverse: 5'-CgC CTT gAg CCT ggC gAA CAg-3'.

B.4.5.5 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5UI/ul.

B.4.5.6 Enzima de restricción: *Rsa I*.

B.4.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en el apartado B.1.6.

B.4.7 Procedimiento (Preparación de PCR)**B.4.7.1 Generalidades**

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla B.11. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla B.11 ha resultado ser óptima.

Tabla B.11—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | | 5 |
| Agua | | 14,6 |
| Tampón de PCR 1 Ox (con MgCl ₂ 15 mmol/l) | 1 x | 2,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,2 mmol/l | 0,5 |
| Cebador APH2 short, 10 µmol/l | 0,4 µmol/l | 1 |
| Cebador APH2 reverse, 10 µmol/l | 0,4 µmol/l | 1 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 2UI | 0,4 |

B.4.7.2 Controles de PCR

No hay material de referencia disponible comercialmente¹⁵⁾.

B.4.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura recogido en la tabla B. 12 ha sido utilizado en los estudios de validación utilizando termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmphTaq

¹⁵⁾ Para disponer de material control apropiado, contactar con el organismo nacional de normalización.

Gold® ADN polimerasa¹⁶⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, las recomendaciones del fabricante deberían respetarse cuidadosamente, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

Tabla B.12—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 25 s/95 °C 30 s/60 °C 45 s/72 °C |
| Número de ciclos | 35 |
| Extensión final | 7 min./72 °C |

B.4.8 Identificación

Está recomendado verificar la identidad de los productos de PCR obtenidos de ADN de muestras desconocidas mediante, por ejemplo, restricción, secuenciación de ADN o hibridación de ADN. El análisis de restricción de los productos de PCR *con Rsa I* debería producir dos fragmentos (122 y 93 bp, respectivamente) ^[24].

B.4.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados del material de referencia apropiado (por ejemplo, plásmidos comerciales conteniendo AND de la secuencia diana).

Para propósitos de identificación, véase el apartado B.4.8.

La detección de fragmentos con un tamaño de 215 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable procedente de *npt II* con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado B.4.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

B.5 Método de cribado para la detección de ADN derivado de tomate modificado genéticamente (Zeneca F282)

Este método está descrito detalladamente en el capítulo A.3.

¹⁶⁾ GeneAmp® 2400 y 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Anexo C (informativo)

Métodos específicos de construcción

C.1 Método específico de construcción para la detección de secuencias de ADN modificadas de GTS 40-3-2 (granos de soya Roundup Ready®) modificada genéticamente

C.1.1 Generalidades

Este método describe el procedimiento para la detección de granos de soya modificada genéticamente, resistente a glifosato GTS 40-3-2 (Roundup Ready®¹⁷⁾) en productos crudos y procesados ^[8] ^[11] mediante amplificación de 127 bp de una copia simple de la secuencia formada por la región de unión entre el promotor CaMV 35 S y la secuencia de codificación del péptido de transición del cloroplasto de *Petunia hybrida* que precede a la secuencia EPSPS de *Agrobacterium*.

La misma construcción ha sido utilizada en otros OMGs.

No es posible utilizar este método para distinguir entre GTS 40-3-2 y cultivos con apilamiento de genes (gene staking) procedentes de cruces entre GTS 40-3-2 y otros evento(s) de habas de soja, excepto en un único grano y plantas donde la presencia/ausencia de secuencias derivadas de otros eventos pueda verificarse.

C.1.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

C.1.2.1 Estudio colaborativo

El método fue validado en un estudio colaborativo ^[8] bajo la coordinación del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes, así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005 (pero con una porción para análisis de 100 mg).

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla C.1.

Tabla C.1—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 1998 |
|--|--------|
| Número de laboratorios | 25 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 24 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 105 |
| Número de muestras conteniendo GTS 40-3-2 | 56 |
| Número de muestras conteniendo habas de soja no MG | 49 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

¹⁷⁾ Roundup Ready es una marca registrada de Monsanto. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de este producto por parte de ISO.

C.1.2.2 Especificidad molecular

C.1.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método está descrito en la Referencia [8]. La información sobre la construcción genética introducida en el genoma del haba de soja se encuentra disponible en la Referencia [31].

C.1.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (GenBank® base de datos; búsqueda en BlastN® 2.2.1, 1 de julio, 2001) no se han encontrado semejanzas con secuencias de ADN de granos de soja no MG y otras plantas cultivadas. Además, la pareja de cebadores fue diseñada para amplificar una secuencia específica de ADN de una región de unión artificial, la cual no se espera que pueda ocurrir en la naturaleza.

C. 1.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de habas de soja no MG, papas, tomates, maíz, y remolachas^[32] o con las líneas de maíz modificadas genéticamente Evento 176 (Bt 176), Bt 11, T 25 y MON 810.

C.1.2.3 Límite de detección (LD)

Basándose en la suposición de que solo hay una copia de la construcción genética por genoma haploide (AGBIOS base de datos: <http://www.agbios.com/>) y que el tamaño del genoma haploide de granos de soja es $1,13 \times 10^9$ bp (véase la Referencia [5]), el LD absoluto con 50 ng de ADN de haba de soja, con un contenido relativo de fracción de masa de 0,1% de OMG en semillas molidas, es equivalente a 40 genomas haploides^[32].

Se ha determinado que el LD relativo es mayor o igual a 0,1% de fracción de masa de haba de soja en harina de haba de soja (material de referencia certificado IRMM-410R producida por IRMM, Geel, Bélgica¹ Con este método también se ha demostrado que puede detectarse harina de soja conteniendo 0,45% de GTS 40-3-2 después de cocinada^[33].

C.1.3 Adaptación

No hay disponible ninguna información específica.

C.1.4 Principio

La tolerancia de habas de soja GTS 40-3-2 al glifosato es debida a una construcción genética que codifica para enolpiru-vilsikinato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 unida a la secuencia del péptido de tránsito de cloroplasto procedente de *Petunia hybrida* (secuencia de señal de tránsito, CTP para la transición de EPSPS dentro del cloroplasto). El glifosato inhibe la EPSPS en las plantas. Un fragmento de ADN de 172 bp que abarca la unión entre la secuencia del promotor CaMV 35S y la secuencia CTP es amplificado mediante PCR y detectado mediante electroforesis en gel. Para la identificación de los productos de PCR se describe y puede ser utilizada una sonda de hibridación.

C.1.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

C. 1.5.1 Agua

C. 1.5.2 Tampón de PCR, IOx (sinMgCL).

C. 1.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

C. 1.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (de cada uno).

C.1.5.5 Oligonucleótidos**C.1.5.5.1 Cebador directo**

35s-f2: 5'-TgA TgT gAT ATC TCC ACT gAC g-3'.

Número de acceso (GenBank®): V00141, J02048.

C. 1.5.5.2 Cebador inverso

petu-rl : 5'-TgT ATC CCT TgA gCC ATg ATg TTg T-3'.

Número de acceso (GenBank®): M21084, J03227.

C. 1.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5UI/μl.

C. 1.5.7 Sonda de hibridación

H-35s-ar1: 5'-ggg TCT TgC gAA ggA TAg Tg-3'.

C.1.5.8 Solución de prehibridación, conteniendo 5x SSC, 0,1% (concentración de masa) N-laurilsarcosina, 0,02% (concentración de masa) SDS, 1% de Reactivo de Bloqueo™.

C. 1.5.9 Solución de hibridación, conteniendo 10 pmol de sonda de hibridación en 2,5 ml de solución de prehibridación (C.1.5.8). La temperatura de hibridación es de 50 °C. Hay información adicional sobre las condiciones para la hibridación recogida en la Referencia [12].

C.1.6 Aparatos y equipos**C. 1.6.1 Termociclador**

C. 1.6.2 Cubeta de electroforesis para seles, con fuente eléctrica.

C.1.6.3 Equipo de hibridación**C.1.7 Procedimiento****C. 1.7.1 Preparación de PCR**

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla C.2. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores ajustando las soluciones adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla C.2 ha resultado ser adecuada.

Tabla C.2—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|---|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | De 10 ng a 50 ng | 1 |
| Agua | | 15,9 |
| Tampón de PCR IOx (sin | 1x | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,8 mmol/l | 2 |
| Cebador 35s-f2, 5 µmol/l | 0,2 µmol/l | 1 |
| Cebador petu-rl, 5 µmol/l | 0,2 µmol/l | 1 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 0,5 UI | 0,1 |

^a Si el tampón de PCR contiene ya MgCl₂, la concentración final de MgCl₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l.

C.1.7.2 Controles de PCR

Como control positivo, se puede utilizar material de referencia certificado de GTS 40-3-2 (material conteniendo 0,1% de ingredientes de planta modificada genéticamente) (IRMM-410), producido por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM) Geel, Bélgica.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

C. 1.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura que se indica en la tabla C.3 ha sido el utilizado en los estudios de validación cuando se usan termocicladores GeneAmp™ 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa¹⁸⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación / desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada.

¹⁸⁾ GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® DNA polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla C.3—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/60 °C 25 s/72 °C |
| Número de ciclos | de 35 a 40 |
| Extensión final | 3 min./72 °C |

C.1.8 Identificación

La especificidad del producto amplificado puede demostrarse mediante hibridación Southern utilizando una sonda con oligonucleótidos marcados con fluorescencia, sonda H35s-ar1 (C.1.5.7 a C.1.5.9). Muestras no modificadas genéticamente deben dar negativas en el ensayo de hibridación [8]

C.1.9 Garantía de calidad general e interpretación de los resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia certificado preparado de GTS 40-3-2 (por ejemplo, series IRMM- 410 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para propósitos de identificación, véase el apartado C. 1.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 172 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificado de una fuente que contiene GTS 40-3-2, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado C.1.2.2. Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

C.2 Método específico de construcción para la detección de secuencias de ADN modificadas de tomates modificados genéticamente (Zeneca® F282)

C.2.1 Generalidades

Este método describe la detección de tomates modificados genéticamente de maduración retardada (Zeneca) en productos crudos mediante la amplificación por PCR de la región de unión entre una única copia de la secuencia formada por elementos procedentes de *Agrobacterium tumefaciens* (terminador-NOS) y el gen de la poligalacturonasa (PG) de *Lycopersicon esculentum* Mili, los cuales han sido unidos mediante recombinación *in vitro*.

La misma construcción podría utilizarse en el futuro en otros OMGs.

No es posible utilizar este método para distinguir entre tomates Zeneca 282F y cultivares con apilamiento de genes (gene stacking) procedentes de cruces entre tomates Zeneca 282F y otros evento(s) de tomates, excepto en un único grano y plantas donde la presencia/ausencia de secuencias derivadas de otros eventos pueda ser verificada.

C.2.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

C.2.2.1 Estudio colaborativo

El método fue validado en un estudio colaborativo^[15] bajo la coordinación del Germán Federal Instituto for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras fue establecido siguiendo el criterio de la Norma ISO5725-2. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005, (pero con 100 mg de cantidad de muestra).

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla C.4.

Tabla C.4—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 1999 |
|--|--------|
| Número de laboratorios | 18 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 18 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 90 |
| Número de muestras conteniendo tomates modificados genéticamente (Zeneca 282F) | 43 |
| Número de muestras conteniendo tomates no MG (Zeneca 282C) | 47 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

C.2.2.2 Especificidad molecular

C.2.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método está descrito en las Referencias [15] y [16]. La información sobre la construcción genética introducida en el genoma del tomate se encuentra disponible en la Referencia [18].

C.2.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (GenBank® base de datos, búsqueda en BlastN® 2.2.1, 1 de julio, 2001) no se ha encontrado similitud significativa con secuencias de tomates no MG u otras plantas cultivadas. Además, la pareja de cebadores fue diseñada para amplificar una secuencia de ADN específica de una región de unión artificial que no se espera pueda ocurrir en la naturaleza.

C.2.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de tomates no MG con fenotipos similares: Tomates *Long-Life* del tipo Selfesta FI, Seduro FI, Lioba FI y Harzglut FI (producción de semillas Quedlmburg, Germany) ^[15].

C.2.2.3 Límite de detección (LD)

Basándose en la suposición de que solo hay una copia de la construcción genética por genoma haploide (AGBIOS base de datos: <http://www.agbios.com/>) y que el tamaño del genoma haploide de tomate es $1,0 \times 10^9$ bp (véase la Referencia [5]), el LD absoluto con 10 pg de ADN de tomate con un contenido relativo de fracción de masa de 100% de OMG en (tomate crudo) es equivalente a 10 genomas haploides ^[19].

C.2.3 Adaptación

Para la identificación de una alteración genética en pasta de tomate, es aconsejable hacer la extracción de ácidos nucleicos de cinco veces la cantidad especificada en la Norma ISO 21571. La combinación de la extracción de ácidos nucleicos y una posterior etapa de purificación utilizando QIAquick PCR Purification Kit¹⁹⁾ producirá una cantidad suficiente de ADN adecuada para PCR.

C.2.4 Principio

La variedad de tomate modificado genéticamente (*Lycopersicon esculentum* Mili.) desarrollado por Zeneca es un fruto de maduración retardada, basada en la inhibición de la producción de poligalacturonasa (PG).

La modificación genética de los tomates modificados genéticamente está basada en la introducción de un gen adicional incompleto de la poligalacturonasa (PG) como cADN en el genoma. La presencia de este gen produce una drástica reducción de la enzima PG endógena del tomate. Esta enzima es la principal responsable del ablandamiento de los tomates ^[17].

El método amplifica un fragmento de ADN de 350 bp que abarca la unión artificial entre un segmento del fragmento cADN del gen de PG y la secuencia del terminador NOS que esta sólo presente en los tomates modificados genéticamente. Los productos obtenidos de PCR se detectan por electroforesis en gel. Para la identificación se ha descrito y se puede utilizar una sonda de hibridación.

C.2.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

C.2.5.1 Agua

C.2.5.2 Tampón de PCR IOx (sin MgCl₂)

¹⁹⁾ QIAquick PCR Purification Kit es una marca comercial de un producto suministrado por QIAGEN, Hilden, Germany. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

C.2.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

C.2.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (de cada uno).

C.2.5.5 Oligonucleótidos

C.2.5.5.1 Cebador directo

PG34L: 5'-ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT-3'.

Número de acceso X04583.

C.2.5.5.2 Cebador inverso

t-NOS: 5'-CAT CgC AAg ACC ggC AAC Ag -3'.

Número de acceso NC002147.

C.2.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por el calor), 5UI/μl.

C.2.5.7 Sonda de hibridación, Tomate-2

La sonda de ADN (Tomate-2) marcada con Digoxigenina (Dig), tiene la siguiente secuencia:

5'-Dig-CCT CTA gAg Tcg ACC TgC Agg TCg-3'.

C.2.5.8 Solución de prehibridación, conteniendo 5x SSC, 0,1% (concentración de masa) de N-laurilsarcosina, 0,02% (concentración de masa) de SDS y 1% de Reactivo de Bloqueo ^[15].

C.2.5.9 Solución de hibridación, conteniendo 10 pmol de sonda de hibridación en 2,5 ml de solución de prehibridación (C.2.5.8).

La temperatura de hibridación es de 60 °C. En la Referencia [12] se facilita información adicional sobre las condiciones para la hibridación.

C.2.5.10 Enzimas de restricción: *Eae* I o *Mwo* I.

C.2.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en el apartado C.1.6.

C.2.7 Procedimiento

C.2.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 μl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla C.5. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores si las soluciones se ajustan adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla C.5 ha resultado ser la adecuada.

Tabla C.5—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | De 10 ng a 50 ng | 0,5 |
| Agua | | 17,3 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1 X | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l cada | 0,4 mmol/l | 1,0 |
| Cebador PG34L, 10 µmol/l | 0,4 µmol/l | 1,0 |
| Cebador t-NOS, 10 µmol/l | 0,4 µmol/l | 1,0 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 1UI | 0,2 |
| ^a Si el buffer de PCR contiene ya MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l. | | |

C.2.7.2 Controles de PCR

No existe material de referencia disponible comercialmente para ser utilizado como control positivo²⁰⁾.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

C.2.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura que se indica en la tabla C.6 ha sido el utilizado en los estudios de validación cuando se usan termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa²¹⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada.

Tabla C.6—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|---|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 10 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/94 °C 60 s/60 °C 60 s/72 °C |
| Número de ciclos | 35 |
| Extensión final | 6 min./72 °C |

²⁰⁾ Para disponer de material de control apropiado, contactar con su organismo nacional de normalización.

²¹⁾ GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

C.2.8 Identificación

La especificidad del producto amplificado puede demostrarse mediante hibridación Southern utilizando la sonda toma-te-2 de oligonucleótidos marcados con digoxigenina (C.2.5.7 a C.2.5.9). Las muestras no modificadas genéticamente deben dar negativas en el ensayo de hibridación⁵¹.

La especificidad del producto amplificado se puede demostrar mediante análisis de restricción utilizando *Eae* I o *Mwo* I. La digestión con *Eae* I produce dos fragmentos de 126 bp y 224 bp respectivamente. La digestión con *Mwo* I produce tres fragmentos de 8 bp, 164 bp y 178 bp, respectivamente.

C.2.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia apropiado.

Para fines de identificación, véase el apartado C.2.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 350 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable de una fuente que contiene tomate modificado genéticamente Zeneca, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado C.2.2.2. Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

C.3 Método de construcción específica para la detección de secuencias de ADN modificadas de maíz Bt 11 modificado genéticamente

C.3.1 Generalidades

El método describe la detección de maíz modificado genéticamente Bt 11, productor de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Syngenta, anteriormente Novartis) en productos crudos mediante la amplificación por PCR de la región de unión entre secuencias de elementos de copia única procedentes de maíz *adh* IS-Intron2 (IVS2) y el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*.

La misma construcción puede utilizarse en el futuro en otros OMGs.

No es posible utilizar este método para distinguir entre maíz BT11 y otros cultivares con apilamiento de genes (gene stacking) procedentes de cruces entre BT11 y otros evento(s) de maíz, excepto en un único grano y plantas donde pueda verificarse la presencia/ausencia de secuencias derivadas de otros eventos.

C.3.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

C.3.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en diferentes estudios colaborativos^[20] bajo la coordinación del Germán Federal Instituto for Health Protection of Consumere and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2. Para la extracción de ADN, la mitad

de los participantes utilizaron el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005 y la otra mitad utilizó el sistema Wizard* DNA-Clean-Up-Systems²²⁾.

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla C.7.

Tabla C.7—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 2000 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 18 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 16 |
| Número de muestras por laboratorio | 6 |
| Número de resultados aceptados | 96 |
| Número de muestras conteniendo Bt 11 | 32 |
| Número de muestras conteniendo maíz Evento | 32 |
| Número de muestras conteniendo maíz no MG | 32 |
| Resultados falsos positivos | 3 (5%) |
| Resultados falsos negativos | 3 (10%) |

Además, 14 laboratorios recibieron muestras de ADN extraído de maíz Bt 11 modificado genéticamente conteniendo 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, y 0,05 ng de ADN. Los resultados se muestran en la tabla C.8 ^[20]:

Tabla C.8—Resultados del estudio colaborativo

| Cantidad de ADN | Resultados | | Comentario |
|------------------------|-------------------|--------------|-------------------|
| | Correcto | Falso | |
| 50 ng | 14 | - | |
| 5ng | 14 | - | |
| 0,5 ng | 12 | 1 | Falso negativo |
| | | 1 | Ambiguo |
| 0,05 ng | 7 | 5 | Falso negativo |
| | | 2 | Ambiguo |

C.3.2.2 Especificidad molecular

C.3.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

²²⁾ Wizard® DNA-Clean-Up-Systems es un ejemplo de producto comercial disponible. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO.

El método está descrito en la Referencia [20].

La información sobre la construcción de ADN introducida en el genoma de maíz está disponible en la Referencia [34]. La construcción de ADN es la construcción descrita en EMBL/GenBank® con número de acceso AR110602 (patentada), que contiene los mismos elementos y en el mismo orden que los descritos para el Bt 11.

C.3.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (GenBank® base de datos, búsqueda en BlastN® 2.2.1, 1 de julio, 2001) no se ha encontrado semejanza con secuencias de maíz no modificadas genéticamente u otras plantas cultivadas. Además, la pareja de cebadores fue diseñada para amplificar una secuencia de ADN específica para una región de unión artificial que no ocurre en la naturaleza.

C.3.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de maíz no MG o de GTS 40-3-2 (habas de soja Roundup Ready®) modificada genéticamente o líneas de maíz, maíz Evento 176 (Bt 176), T25 y MON 810.

El número de secuencias diana es una.

C.3.2.3 Límite de detección (LD)

Basándose en la suposición de que solo hay una copia de la construcción genética por genoma (AGBIOS base de datos: <http://www.agbios.com/>) y que el tamaño del genoma de maíz es de $2,65 \times 10^9$ bp (véase la Referencia [5]), el LD absoluto con 50 ng de ADN de maíz con un contenido relativo de 0,1% de OMG en semillas molidas es equivalente a 20 genomas^[34]. El LD relativo es mayor o igual a 0,1% en semillas de maíz molidas^[34].

C.3.3 Adaptación

No hay disponible ninguna información específica.

C.3.4 Principio

El gen Bt procede de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*; la proteína así producida en el tejido de la planta lo protege de ser atacado por la larva del taladro europeo del maíz. La proteína Bt se activa en el intestino de estos insectos, hace que se formen poros en la membrana celular y conduce a una interrupción en el balance osmótico produciendo la lisis celular.

El gen *pat* procede de la bacteria del suelo *Streptomyces viridochromogenes* y codifica para la enzima fosfotricin-N-acetiltransferasa que confiere a la planta tolerancia al herbicida glufosinato amónico. El glufosinato amónico interrumpe la síntesis de la glutamina en plantas. Un fragmento de ADN de 189 bp comprendido en la secuencia de la región de unión del intrón IVS2 *adh* y el gen *pat* es amplificado mediante PCR y detectado por electroforesis en gel. Para la identificación de los productos de PCR se describe y puede ser utilizada una sonda de hibridación.

C.3.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

C.3.5.1 Agua

C.3.5.2 Tampón de PCR 10 x (sin MgCl₂).

C.3.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

C.3.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (de cada uno).

C.3.5.5 Oligonucleótidos

C.3.5.5.1 Cebador directo

Intron IVS2-2: 5'-CTg ggA ggC CAÁ ggT ATC TAA T-3'.

Número de acceso AR110602.

C.3.5.5.2 Cebador indirecto

Región codificante de la proteína PAT, PAT-B:5'-gCT gCT gTA gCT ggC CTA ATC T-3'.

Número de acceso: AR110602.

C.3.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por calor), 5 UI/μl.

C.3.5.7 Sonda de hibridación, sonda Bt marcada en 5' (por ejemplo con digoxigenina) Bt: 5'-TAT CTg TCT CAg ggg CAg ACT C -3'; c = 20 Limol/l.

C.3.5.8 Solución de prehibridación, conteniendo 5 x SSC, 0,1% (concentración de masa) de N-laurilsarcosina, 0,02% (concentración de masa) de SDS y 1% de Reactivo de Bloqueo.

C.3.5.9 Solución de hibridación, conteniendo 10 pmol de sonda de hibridación en 2,5 ml de solución de prehibridación (C.3.5.8). La temperatura de hibridación es de 60 °C. En la Referencia [12] se recoge información adicional sobre las condiciones para la hibridación.

C.3.5.10 Enzima de restricción

Hinf I.

C.3.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en el apartado C.1.6.

C.3.7 Procedimiento

C.3.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla C.9. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores si las soluciones son ajustadas adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla ha resultado ser adecuada.

Tabla C.9—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | Del0nga50ng | 1 |
| Agua | | 15,8 |
| Tampón de PCR IOx | 1x | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 2 mmol/l | 2,0 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,4 mmol/l | 1,0 |
| Cebador IVS2-2, 10 µmol/l | 0,5 µmol/l | 1,25 |
| Cebador PAT-B, 10 µmol/l | 0,5 µmol/l | 1,25 |
| Taq ADN polimerasa, 5 UI/µl | 1UI | 0,2 |
| ^a Si el tampón de PCR ya contiene MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 2 mmol/l. | | |

C.3.7.2 Controles de PCR

Como control positivo se puede utilizar, material de referencia certificado, por ejemplo, material conteniendo 1% de maíz modificado genéticamente Bt 11 (IRMM-412), producido por IRMM, Geel, Bélgica.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

C.3.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura que se indica en la tabla C.10 ha sido el utilizado en los estudios de validación cuando se usan termocicladores GeneAmp® 2400 o GeneAmp® 9600 y AmpliTaq Gold® AND polimerasa²³⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada.

²³⁾ GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® DNA polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla C.10—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 12 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/64 °C 30 s/72 °C |
| Número de ciclos | 38 |
| Extensión final | 10min/72°C |

C.3.8 Identificación

La identidad del producto amplificado puede verificarse mediante hibridación Southern utilizando una sonda Bt de oligonucleótidos marcados con digoxigenina (C.3.5.7 a C.3.5.9). Las muestras no modificadas genéticamente deben dar negativo en el ensayo de hibridación ^[20].

La identidad del producto amplificado puede demostrarse mediante análisis de restricción utilizando *Hin*I, que produce dos fragmentos de 116 bp y 73 bp respectivamente ^[20].

C.3.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia certificado preparado con maíz Bt 11 (por ejemplo, series IRMM-412 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para fines de identificación, véase el apartado C.3.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 189 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificado de una fuente de maíz Bt 11, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado C.3.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

C.4 Método específico de construcción para la detección de secuencias de ADN modificadas de maíz modificado genéticamente Evento 176 (maíz Bt 176)

C.4.1 Generalidades

El método describe el procedimiento para la detección de maíz modificado genéticamente Evento 176 (Syngenta) en productos crudos/procesados mediante la amplificación por PCR de una región de unión artificial entre dos copias de la construcción genética integradas en el genoma de la planta. El maíz ha sido modificado para producir la toxina Bt (tipo cryIA(b)) de *Bacillus thuringiensis* mediante la inserción de un gen sintético Bt regulado por el promotor CDPK de *Zea mays*.

La misma construcción podría utilizarse en el futuro en otros OMGs.

Cultivos con genes apilados no se pueden distinguir mediante este método excepto sobre un único grano y plantas.

C.4.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

C.4.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en diferentes estudios colaborativos ^[20] bajo la coordinación del Germán Federal Instituto for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2. Para la extracción de ADN, la mitad de los participantes utilizaron el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005 y la otra mitad utilizó el sistema Wizard® DNA-Clean-Up-Systems²⁴⁾.

Los datos del estudio colaborativo se recogen en la tabla C.11.

Tabla C.11—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 2000 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 18 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 16 |
| Número de muestras por laboratorio | 6 |
| Número de resultados aceptados | 96 |
| Número de muestras conteniendo maíz Evento | 32 |
| Número de muestras conteniendo maíz Btl 1 | 32 |
| Número de muestras conteniendo maíz no MG | 32 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

Además, 13 laboratorios recibieron muestras de ADN extraído de una fracción de masa de 0,1% de maíz modificado genéticamente Evento 176 (maíz Bt 176) en polvo de maíz seco [fracción de masa] (material de referencia certificado CRMs, preparado por IRMM, Geel, Bélgica). Doce laboratorios determinaron las muestras como positivas para el Evento 176 (Bt 176) y un laboratorio obtuvo resultados ambiguos en los duplicados ^[20].

C.4.2.2 Especificidad molecular

C.4.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7.

El método está descrito en las Referencias [20] y [35].

²⁴⁾ Wizard® DNA-Clean-Up-Systems es un ejemplo de producto comercial disponible. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO.

La información sobre la construcción de ADN introducida en el genoma de maíz esta disponible en la Referencia [35].

C.4.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (GenBank® base de datos, búsqueda en BlastN® 2.2.1, 1 de julio, 2001) no se ha encontrado semejanza con secuencias de maíz no modificadas genéticamente u otras plantas cultivadas. Además, la pareja de cebadores fue diseñada para amplificar una secuencia de ADN específica para la región de unión artificial que no ocurre en la naturaleza.

C.4.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de soja MG (GTS 40-3-2) y líneas de maíz Bt 11, T25 y MON810^[11], o de maíz no MG^{[11][20]},

El número de copias de la secuencia es dos.

C.4.2.3 Límite de detección (LD)

Basándose en la suposición de que hay dos copias de la construcción genética por genoma (AGBIOS base de datos: <http://www.agbios.com/>) y que el tamaño del genoma de maíz es de $2,65 \times 10^9$ bp (véase la Referencia [5]), el LD absoluto con 50 ng de ADN de maíz con un contenido relativo de 0,1% de OMG en semillas molidas es equivalente a 20 genomas^[34]. El LD relativo es mayor o igual a 0,1% en semillas de maíz molidas^[34].

C.4.3 Adaptación

No hay disponible ninguna información específica.

C.4.4 Principio

La toxina (Bt) de *Bacillus thuringiensis* es un insecticida de origen bacteriano. Las plantas modificadas genéticamente que contienen el gen Bt producen un pesticida endógeno. El maíz Evento 176 (maíz BÜ76) contiene un gen sintético, gen Bt, del tipo CryIA(b) bajo el control del promotor CDPK6. Un fragmento de ADN de 211 bp, comprendiendo la unión entre el promotor CDPK6 y la secuencia del gen Bt es amplificada mediante PCR y el producto de PCR detectado por electroforesis en gel. Para la identificación se describe y se puede utilizar una sonda de hibridación.

C.4.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

C.4.5.1 Agua

C.4.5.2 Tampón de PCR 10 x (sin MgCl₂)

C.4.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

C.4.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (de cada uno).

C.4.5.5 Oligonucleótidos

C.4.5.5.1 Cebador directo

Cry03: 5'-CTC TCg CCg TTC ATg TCC gT-3'.

El número de acceso no está disponible. El cebador está localizado en el promotor CDPK6. Los cebadores coinciden al 100% con el CDPK de maíz con número de acceso L27484.1.

C.4.5.5.2 Cebador inverso

Cry04: 5'-ggT CAg gCT Cag gCT gAT gT-3'.

Número de acceso 41419 (de acuerdo a la Referencia [36]). El cebador está localizado en el gen sintético CryIA(b).

C.4.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por el calor), 5 UI/ μ l.

C.4.5.7 Sonda de hibridación (CryOI)

5-ATggACAACAACCCCAACATC-3'.

C.4.5.8 Solución de prehibridación, conteniendo 5 x SSC, 0,1% (concentración de masa) de *N-laurilsarcosina*, 0,02% (concentración de masa) de SDS, 1% de Reactivo de Bloqueo.

C.4.5.9 Solución de hibridación, conteniendo 10 pmol de sonda de hibridación en 2,5 ml de solución de prehibridación (C.4.5.8).

La temperatura de hibridación es de 50 °C. En la Referencia [12] se recoge información adicional sobre las condiciones para la hibridación.

C.4.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en el apartado C.1.6.

C.4.7 Procedimiento

C.4.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 μ l compuesto por los reactivos recogidos en la tabla C. 12. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores si las soluciones son ajustadas adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla C.12 ha resultado ser adecuada.

Tabla C.12—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | De 10 ng a 50 ng | 2 |
| Agua | | 15,4 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1x | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l | 1,5 mmol/l | 1,5 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,4 mmol/l | 1,0 |
| Cebador Cry03, 5 µmol/l | 0,25 µmol/l | 1,25 |
| Cebador Cry04, 5 µmol/l | 0,25 µmol/l | 1,25 |
| Taq ADN polimerasa, 5 IU/µl | 0,5 UI | 0,1 |
| ^a Si el tampón de PCR ya contiene MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 1,5 mmol/l. | | |

C.4.7.2 Controles de PCR

Como control positivo puede utilizarse, material de referencia certificado, por ejemplo, [0,1% de maíz modificado genéticamente Evento 176 (Bt 176)] (IRMM-411, MZ-0,1), producido por IRMM, Geel, Bélgica.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

C.4.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura que se indica en la tabla C.13 ha sido el utilizado en los estudios de validación cuando se usan termocicladores GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa²⁵⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación / desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por calor, las recomendaciones del fabricante deberían tenerse en cuenta, a no ser que el protocolo indique de otra forma de utilización.

²⁵⁾ GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems, son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla C.13—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 12 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/63 °C 30 s/72 °C |
| Número de ciclos | 38 |
| Extensión final | 6 min./72 °C |

C.4.8 Identificación

La identidad del producto amplificado puede verificarse mediante hibridación Southern utilizando una sonda CryOI de oligonucleótidos marcados con digoxigenina (C.4.5.7 a C.4.5.9). Las muestras no modificadas genéticamente deben dar negativo en el ensayo de hibridación ^[20].

La identidad del producto amplificado puede verificarse mediante análisis de restricción utilizando alguna de las siguientes enzimas *Hae* III, *Taq* I, *Dde* I. La digestión con *Hae* III produce dos fragmentos de 162bp y 49 bp respectivamente. La digestión con *Taq* I produce tres fragmentos de 168, 22, y 21 bp respectivamente ^[20]. Y la digestión con *Dde* I produce tres fragmentos de 128,72 y 11 bp respectivamente ^[20].

C.4.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia certificado preparados a partir de maíz Evento 176 (Bt 176) (por ejemplo, series IRMM-411 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para fines de identificación, véase el apartado C.4.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 211 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable de una fuente que contiene maíz Evento 176 (Bt 176), con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado C.4.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

C.5 Método específico de construcción para la detección de secuencias de ADN modificadas de maíz modificado genéticamente T 25

C.5.1 Generalidades

El método describe la detección de maíz/"LibertyLink" modificado genéticamente resistente al herbicida T25 en productos crudos mediante la amplificación por PCR de una única copia de la secuencia de ADN que comprende la región de unión entre el promotor 35S procedente del CaMV y el gen *pat* que han sido unidos mediante recombinación *in vitro*.

La misma construcción podría utilizarse en el futuro en otros OMGs.

Los cultivares con apilamiento de genes (Gene Stacking) no se pueden distinguir mediante este método excepto para un único grano y plantas.

C.5.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

C.5.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en un estudio colaborativo^[20] bajo la coordinación del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005.

Para el estudio colaborativo se prepararon muestras de harina (grano molido) de T25 (0,1%, 1%), MON 810 (0,1%, 1%) y maíz no OMG.

Los datos del estudio colaborativo se recogen en las tablas C.14 y C.15.

Tabla C.14—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 2001 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 16 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 16 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 75 |
| Número de muestras conteniendo maíz T25 | 33 |
| Número de muestras conteniendo MON 810 | 31 |
| Número de muestras conteniendo maíz no MG | 11 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 4(12%) |

Tabla C.15—Resultados detallados del estudio colaborativo

| Clase de muestra | Número de muestras | Correcto | Falso |
|---|--------------------|----------|----------------------|
| Muestras T25 negativas | | | |
| 0% OMG | 11 | 11 | 0 |
| 0,1% MON 810 | 13 | 13 | 0 |
| 1% MON 810 | 18 | 18 | 0 |
| Muestras T25 positivas | | | |
| 0,1% T25 | 18 | 15 | 3 (neg) ^a |
| 1% T25 | 15 | 14 | 1 (neg) |
| ^a Todos los resultados falsos negativos se obtuvieron en un mismo laboratorio. | | | |

C.5.2.2 Especificidad molecular

C.5.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7. El método está descrito en la Referencia [20].

NOTA: La información sobre la secuencia para el desarrollo de este método fue proporcionada por Bayer Crop Science (anteriormente Aventis Corp Science).

La información sobre la construcción de ADN introducida en el genoma de maíz está disponible en la Referencia [37].

C.5.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (base de datos GenBank®' búsqueda en BlastN® 2.2.1, 1 de julio, 2001) no se ha encontrado semejanza con secuencias de maíz no modificadas genéticamente u otras plantas cultivadas. Además, la pareja de cebadores fue diseñada para amplificar una secuencia de ADN específica para la región de unión artificial que no ocurre en la naturaleza.

C.5.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de maíz no MG, de habas de soja modificada genéticamente GTS 40-3-2 (Roundup Ready®) o de líneas de maíz MG Evento 176 (Bt 176), Bt 11 y MON 810.

El número de copias de la secuencia es una.

C.5.2.3 Límite de detección (LD)

Basándose en la suposición de que hay una sola copia de la construcción genética por genoma (AGBIOS base de datos: <http://www.agbios.com/>) y que el tamaño del genoma de maíz es de

2,65 x 10⁹ bp (véase Referencia [5]), el LD absoluto con 50 ng de ADN de maíz con un contenido relativo de 0,1% de OMG en semillas molidas es equivalente a 20 genomas^[34]. El LD relativo es mejor o igual a 0,1% en semillas de maíz molidas^[34]

C.5.3 Adaptación

No hay disponible ninguna información específica.

C.5.4 Principio

El gen pat procede de la bacteria de suelo *Streptomyces viridochromogenes* y codifica la enzima fosfotricin-N-acetil-transferasa que confiere a la planta tolerancia al herbicida glufosinato amónico. El glufosinato amónico interrumpe la síntesis de la glutamina en plantas.

Un fragmento de ADN de 209 bp que comprende la unión del promotor 35S de CaMV y el gen[^]ai es amplificada mediante PCR y detectada por electroforesis en gel. Para la identificación de los productos de PCR se ha descrito un procedimiento por restricción que se puede utilizar.

C.5.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

C.5.5.1 Agua

C.5.5.2 Tampón de PCR 10x (sin MgCl₂)

C.5.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

C.5.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (de cada uno).

C.5.5.5 Oligonucleótidos C.5.5.5.1 Cebador directo

T25-F7: 5'-ATg gTg gAT ggC ATg ATg TTg -3'.

El número de acceso (GenBank®) es NC001497. El cebador está localizado en el promotor CaMV 35S.

C.5.5.5.2 Cebador inverso

T25-R3: 5'-TgAgCgAAACCC TAT AAgAACCC-3'.

No se dispone del número de acceso. El cebador está localizado la región que codifica la proteína PAT.

C.5.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por el calor), 5 UI/μl.

C.5.5.7 Enzimas de restricción: *Hinf* I y *Mwo* I.

C.5.6 Aparatos y equipos

Como se especifica en los apartados C.1.6.1 y C.1.6.2.

C.5.7 Procedimiento

C.5.7.1 Preparación de PCR

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla C. 16. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores si las soluciones son ajustadas adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla C.16 ha resultado ser adecuada.

Tabla C.16—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | De 10 ng a 50 ng | 2 |
| Agua | | 14,8 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1x | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 2 mmol/l | 2,0 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,4 mmol/l | 1,0 |
| Cebador T25-F7 10 µmol/l | 0,5 µmol/l | 1,25 |
| Cebador T25-R3 10 µmol/l | 0,5 µmol/l | 1,25 |
| Taq ADN polimerasa, 5 IU/µl | 1UI | 0,2 |
| ^a Si el tampón de PCR ya contiene MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 2 mmol/l. | | |

C.5.7.2 Controles de PCR

No existe material de referencia disponible comercialmente²⁶⁾.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

C.5.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura que se indica en la tabla C.17 ha sido el utilizado en los estudios de validación cuando se usan termocicladores GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa²⁷⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por el calor, se deberían seguir las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo indique de otra forma de utilización.

²⁶⁾ Para la disponibilidad de material de control adecuado, contactar con su organismo nacional de normalización.

²⁷⁾ GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla C.17—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 12 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/64 °C 30 s/72 °C |
| Número de ciclos | 40 |
| Extensión final | 10min/72°C |

C.5.8 Identificación

La identidad del producto amplificado puede verificarse mediante análisis de restricción utilizando alguna de las enzimas *HinI* o *Mwo* I. La digestión *conHinI* produce dos fragmentos de 121 y 88 bp respectivamente. La digestión con *Mwo* I produce dos fragmentos de 141 y 68 bp respectivamente [20].

C.5.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia apropiado preparado a partir de maíz T25.

Para propósitos de identificación, véase el apartado C.5.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 209 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificable de una fuente que contiene maíz T25, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado C.5.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 de la Norma ISO 21571:2005.

Anexo D
(informativo)

Métodos evento-específico

D.1 Método específico de evento para la detección de secuencias de ADN modificadas de maíz modificado genéticamente MON 810

D.1.1 Generalidades

El método describe la detección de maíz modificado genéticamente protegido contra insectos MON 810/"YieldGuard" en productos crudos mediante la amplificación por PCR de una única copia de ADN de la región entre el extremo de integración del genoma de la planta y la secuencia insertada procedente del promotor 35S CaMV mediante recombinación *in vitro*.

Los cultivares con apilamiento de genes (Gene Stacking) no se pueden distinguir mediante este método, excepto con granos sueltos y plantas.

D.1.2 Condiciones de validación y criterios de actuación

D.1.2.1 Estudio colaborativo

El método ha sido validado en un estudio colaborativo^[20] bajo la coordinación del Germán Federal Institute for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine (BgVV) por el grupo de trabajo "Development of methods for identifying foodstuffs produced by means of genetic engineering techniques" ("Desarrollo de métodos para la identificación de alimentos producidos mediante técnicas de ingeniería genética"). El número de participantes así como el número de muestras se eligieron de acuerdo con la Norma ISO 5725-2. Para la extracción de ADN, se utilizó el método CTAB como se describe en el capítulo A.3 de la Norma ISO 21571:2005.

Para el estudio colaborativo se prepararon muestras de harina (grano molido) de "MON 810 DK 513/59179" (0,1%, 1%) T25 (0,1%, 1%) y maíz no OMG. Los datos del estudio colaborativo se recogen en las tablas D.1 y D.2.

Tabla D.1—Resultados del estudio colaborativo

| Año | 2001 |
|--|-------------|
| Número de laboratorios | 16 |
| Número de laboratorios que envían resultados | 16 |
| Número de muestras por laboratorio | 5 |
| Número de resultados aceptados | 75 |
| Número de muestras conteniendo maíz MON 810 | 31 |
| Número de muestras conteniendo T25 | 33 |
| Número de muestras conteniendo maíz no MG | 11 |
| Resultados falsos positivos | 0 (0%) |
| Resultados falsos negativos | 0 (0%) |

Tabla D.2—Resultados detallados del estudio colaborativo

| Clase de muestra | Número de muestras | Correcto | Falso |
|----------------------------|--------------------|----------|-------|
| Muestras MON 810 negativas | | | |
| 0% OMG | 11 | 11 | 0 |
| 0,1% T25 | 18 | 18 | 0 |
| 1% T25 | 15 | 15 | 0 |
| Muestras MON 810 positivas | | | |
| 0,1% MON 810 | 13 | 13 | 0 |
| 1% MON 810 | 18 | 18 | 0 |

D.1.2.2 Especificidad molecular

D.1.2.2.1 Generalidades

Este anexo cumple los requisitos descritos en el capítulo 7. El método ha sido descrito en la Referencia [20].

NOTA La información sobre la secuencia para el desarrollo de este método fue proporcionada por Monsanto.

La información sobre la construcción de ADN introducida en el genoma de maíz está disponible en la Referencia [38].

D.1.2.2.2 Teórica

En las búsquedas realizadas en las bases de datos (GenBank® base de datos, búsqueda en BlastN® 2.2.1, 2001-07-01) no se ha encontrado semejanza con secuencias de maíz no modificado genéticamente u otras plantas cultivadas. Además, la pareja de cebadores fue diseñada para amplificar una secuencia de ADN específica de la unión artificial (región del extremo de integración) que no ocurre en la naturaleza.

D. 1.2.2.3 Experimental

No se ha observado amplificación con ADN de maíz no MG, de GTS 40-3-2 modificada genéticamente (habas de soja Roundup Ready®) o de líneas de maíz modificadas genéticamente Evento 176 (Bt 176), Bt 11 y T25.

El número de copias de la secuencia es una.

D.1.2.3 Límite de detección (LD)

Basándose en la suposición de que hay una sola copia de la construcción genética por genoma (AGBIOS base de datos: <http://www.agbios.com/>) y que el tamaño del genoma de maíz es de $2,65 \times 10^9$ bp (véase la Referencia [5]), el LD absoluto con 50 ng de ADN de maíz con un

contenido relativo de 0,1% de OMG en semillas molidas es equivalente a 20 genomas^[34]. El LD relativo es mejor o igual a 0,1% en semillas de maíz molidas^[34].

D.1.3 Adaptación

No hay disponible ninguna información específica.

D.1.4 Principio

El gen Bt procede de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kwstaki*. La proteína producida en el tejido de la planta lo protege de ser atacado por la larva del taladro europeo del maíz. La proteína Bt se hace activa en el intestino de estos insectos, hace que se formen poros en la membrana celular y conduce a una interrupción en el balance osmótico produciendo la lisis celular.

Un fragmento de ADN de 170 bp comprendiendo la secuencia entre el extremo de integración del promotor CaMV 35S en el ADN genómico del maíz es amplificada mediante PCR y detectada por electroforesis en gel. Para la identificación, se describen perfiles de digestión y deberían utilizarse (véase el apartado D.1.8).

D.1.5 Reactivos

Para la calidad de los reactivos utilizados, véase la Norma ISO 24276.

D. 1.5.1 Agua

D. 1.5.2 Tampón de PCR IOx (sin MgCl₂).

D. 1.5.3 Solución de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

D. 1.5.4 Solución de dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (de cada uno).

D.1.5.5 Oligonucleótidos

La región del extremo de integración ha sido publicada^[38] con número de acceso AF434709.

D.1.5.5.1 Cebador directo

VW01: 5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA Cg-3'.

Número de acceso AF434709. El cebador está localizado en el genoma del maíz.

D. 1.5.5.2 Cebador inverso

VW03: 5'-TCC ATC TTT ggg ACC ACT get g-3'.

El número de acceso (GenBank®) es V00141, J02048. El cebador está localizado en el promotor CaMV 35S.

D. 1.5.6 ADN polimerasa termoestable (para PCR activada por el calor), 5 UI/μl.

D.1.5.7 Enzimas de restricción: *Mwo* I y *Hae* III.**D.1.6 Aparatos y equipos****D. 1.6.1 Termociclador****D. 1.6.2 Cubeta de electroforesis para geles, con fuente eléctrica.****D.1.7 Procedimiento****D. 1.7.1 Preparación de PCR**

El método está descrito para un volumen total de mezcla de reacción de PCR de 25 µl compuesto por los reactivos recogidos en la tabla D.3. La reacción de PCR puede también realizarse en volúmenes mayores si las soluciones son ajustadas adecuadamente. La concentración final de los reactivos en la reacción indicada en la tabla D.3 ha resultado ser adecuada.

Tabla D.3—Mezcla de reactivos

| Reactivo | Concentración final | Volumen por muestra (µl) |
|--|---------------------|--------------------------|
| ADN de la muestra | De 10 ng a 50 ng | 2 |
| Agua | | 14,8 |
| Tampón de PCR IOx (sin MgCl ₂) | 1x | 2,5 |
| Solución de MgCl ₂ 25 mmol/l | 2 mmol/l | 2,0 |
| Solución de dNTP, 10 mmol/l | 0,4 mmol/l | 1,0 |
| Cebador VW01, 10 µmol/l | 0,5 µmol/l | 1,25 |
| Cebador VW03, 10 µmol/l | 0,5 µmol/l | 1,25 |
| Taq ADN polimerasa, 5 IU/µl | 1UI | 0,2 |
| ^a Si el tampón de PCR ya contiene MgCl ₂ , la concentración final de MgCl ₂ en la mezcla de reacción debe ajustarse a 2 mmol/l. | | |

D.1.7.2 Controles de PCR

Como control positivo puede utilizarse material de referencia certificado IRMM, IRMM-413.

Se deberían incluir otros controles apropiados como se describe en la Norma ISO 24276.

D. 1.7.3 Programa de tiempo y temperatura

El programa de tiempo y temperatura que se indica en la tabla D.4. ha sido leído utilizado en los estudios de validación cuando se usan termocicladores GeneAmp® 2400, 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa²⁸⁾. La utilización de otros termocicladores puede hacer necesario un proceso de adaptación. El tiempo de activación/desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada. Si se utiliza una polimerasa activada por el calor, se deberían seguir las recomendaciones del fabricante, a no ser que el protocolo especifique otra forma de utilización.

²⁸⁾ GeneAmp® 2400 9600 y AmpliTaq Gold® ADN polimerasa de Applied Biosystems, anteriormente conocido como Perkin Elmer/Applied Biosystems son ejemplos de productos adecuados disponibles comercialmente. Esta información se facilita por su conveniencia para los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una recomendación de estos productos por parte de ISO. Pueden utilizarse productos equivalentes siempre que se demuestre que pueden proporcionar resultados similares.

Tabla D.4—Programa de temperatura-tiempo

| | |
|--------------------------------------|--|
| Activación/desnaturalización inicial | 12 min./95 °C |
| Amplificación | 30 s/95 °C 30 s/64 °C 30 s/72 °C |
| Número de ciclos | 40 |
| Extensión final | 10min/72°C |

D.1.8 Identificación

La identidad del producto amplificado puede verificarse mediante análisis de restricción utilizando alguna de las enzimas *Hae* III o *Mwo* I. La digestión con *Hae* III produce dos fragmentos de 126 y 44 bp respectivamente. La digestión con *Mwo* I produce dos fragmentos de 109 y 61 bp respectivamente ^[20].

D.1.9 Garantía de calidad general e interpretación de resultados

Se puede suponer que la secuencia diana ha sido detectada, si el tamaño del producto obtenido de PCR corresponde con la longitud esperada de la secuencia diana de ADN, determinada por comparación con los productos derivados de material de referencia certificados preparados de maíz MON 810 (por ejemplo, series IRMM-413 de IRMM, Geel, Bélgica).

Para fines de identificación, véase el apartado D.1.8.

La detección de fragmentos de un tamaño de 170 bp indica que la solución de ADN de la muestra contiene ADN amplificado de una fuente que contiene maíz MON 810, con las limitaciones de especificidad descritas en el apartado D.1.2.2.

Para los detalles sobre el paso de electroforesis, véase el capítulo B.2 en la Norma ISO 21571:2005.

Bibliografía

- [1] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of P-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230, pp 1350-1354
- [2] Mullis, K.B. and Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol*, 1987, 155, pp 335-350
- [3] Heaton, P.A.: Quantification of total DNA by spectroscopy. In *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, ed. Saunders, G.S and Parkes, H.C. RSC publications, 1999, U.K
- [4] Bickley and Hopkins: Inhibitors and enhancers of PCR in *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, ed. Saunders, G.S and Parkes, H.C. RSC publications, 1999, U.K
- [5] Arumuganathan, K. and Earle, E.D.: Nuclear content of some important plant species, *PlantMol. Biol. Rep.*, 9(3), 1991, pp 208-218
- [6] Wolf, C, Scherzinger, M., Wurz, A., Pauli, U., Hübner, P., and Lüthy, J.: Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur. Food Res. Technol*, 2000, 210, pp 367-372
- [7] Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A. and Berdal, K.G.: PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 375, pp 985-993
- [8] Faltan autores Detection of a genetic modification of soybeans by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe, No. L 23.01.22-1. Collection of official methods under article 35 of the Germán Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of March 1998, Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
- [9] Report of the EU tender No. XXIV/98/A3/001. Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize. http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/biotech/biotech02_en.html, 2000
- [10] Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P., and Lüthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of Soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1996, 203, pp 339-344
- [II] Broll, H., Wagner, U., Spiegelberg, A., Zagon, J., and Schauzu, M.: Anwendung von Methoden zum Nachweis von gentechnisch veränderten Sojabohnen und gentechnisch verändertem Mais in im Handel befindlichen Lebensmitteln, *Bundesgesundheitsblatt*, 1998, 12, pp 560-562
- [12] Sambrook, J. and Russell, D.W.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- [13] Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe, No. L 24.01-1: Collection of official methods under article 35 of the Germán Federal

Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of January 1997, Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH

- [14] Taberlet, P., Gelly, L., Pautou, G., and Bouvet, P.: Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 1991, 17, pp 1105-1109
- [15] Detection of a genetic modification of tomatoes by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe or restriction analysis of the PCR product, No. L 25.03.01. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of November 1999, Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
- [16] Busch, U., Mühlbauer, B., Schulze, M., and ZAGON, J.: Screening- und spezifische Nachweismethode für transgene Tomaten (Zeneca) mit der Polymerasekettenreaktion *Deutsche Lebensmittelrundschau*, 1999, Heft 2, 52-56
- [17] Glerson, E., Tucker, G.A., Keen, J., Ray, J., Bird, C.R., and Schuch, W.: Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucleic Acid Research*, 1986, 14, pp 8595-8603
- [18] Smith, C.J.S., Watson, C.F., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W., and Glerson, D.: Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 1990, 224, pp 477-481
- [19] Broll, H., Jansen, B., Spiegelberg, A., Leffke, A., Zagon, J., and Schanz, M.: DNA-analytische Nachweismethoden für gentechnisch veränderte Tomaten in Tomatenprodukten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1999, 95, 48-51
- [20] Detection of a genetic modification of maize (*Zea mays* L.) by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe or restriction analysis of the PCR product, No. L 15.05-1. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of May 2002, Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
- [21] Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H., Maidhof, H., Bendiek, J., Appel, B. and Buhk, H.-I.: Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundhbl.*, 1997, 4, pp 118-121
- [22] Pletsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P. and Wurz, A.: Screening method for the detection of genetically modified plants, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 1997, 93, pp 35-38
- [23] Hemmer, W.: Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. In: BATS-report (Agency for Biosafety research and assessment of technology Impacts of the Swiss priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland), 1997, 2/97, pp 40-44
- [24] Screening procedure for the detection of genetically modified DNA sequences in foods by identification of DNA sequences that frequently occur in genetically modified organisms. No L

- 00.00-31. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
- [25] Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, P., and Anklam, E.: IUPAC Collaborative trial of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder, *J. AOAC Int.*, 1999, 82, pp 923-928
- [26] Brunt, A, Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., Watson, L.: *Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDED database*. 1996, 1484 pp. C.A.B. International, U.K
- [27] Qiu, S.G., Wintermantel, W.M., Sha, Y. and Schoelz, J.E.: Light-Dependent Systemic Infection of Solanaceous Species by Cauliflower Mosaic Virus Can Be Conditioned by a Viral Gene Encoding an Aphid Transmission Factor. *Virology*, 1997, 227, pp 180-188
- [28] Schweizerisches Lebensmittelhandbuch Kapitel 52B, Eidgenössische Drucksachen- und Materialienzentrale, Bern, 1998.
- [29] Van den Eede, G., Lipp, M., Eyquem, F. and Anklam, E.: Validation of an analytical method for the detection of GMO-derived DNA in processed foodstuffs. EUR 19677 EN, Report issued by the IHCP ISPRA, 2000
- [30] Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schtmmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, 212, pp 497-504
- [31] Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delanny, X., Re, D.B., LaVelle, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Bary, G.F., Eichholtz, D.A, Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M.: Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.*, 35, 1995, pp 1451-1461
- [32] Wurz, A., Willmund, R.: Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans. In: G.A. Schreiber, K.W. Bögl (Eds.). *Foods produced by means of genetic engineering — 2nd status report*. BgW-Heft 1/1997 (BgVV, Berlin) pp. 115-117
- [33] Straub, J.A., Hertel, C. and Hammes, W.P.: Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. *Z Lebensm Unters Forsch A.*, 208, 1999, pp. 77-82
- [34] Zimmermann, A., Lüthy, I, Pauli, U.: Event specific transgene detection in Bt 1 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm.- Wiss. U. Technol.*, 33, 2000, pp. 210-216
- [35] Hupfer, C, Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.-H.: Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Lm. Unters. Forsch.*, 206 (Band A), 1998, pp. 203-207
- [36] Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. and Brignon, P.: Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1999, pp. 5261-5266

- [37] Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., HIÑO, A.: A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Journal of Food Hygienic Society of Japan*, 41, 2000, pp. 137-143
- [38] Holck, A., Vaitilingom, M., Didierjean, L., Rudi, K.: 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *Eur Food Res Technol*, 214, 2002, pp. 449-454
- [39] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precisión) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of standard measurement method.
- [40] ISO 21568 Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Toma de muestras.
- [41] ISO 21570 Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos modificados genéticamente y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos.