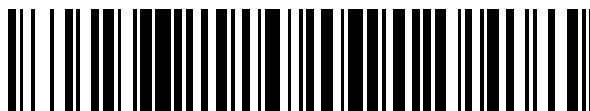


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 121**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010 E 10790234 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2443247**

54 Título: **Método mejorado para cuantificar ADN en una muestra biológica**

30 Prioridad:

18.06.2009 US 218155 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.08.2014

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Schwarzwaldallee 215
CH-4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

HART, HOPE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 483 121 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método mejorado para cuantificar ADN en una muestra biológica

ANTECEDENTES

5 La presente descripción se refiere a métodos mejorados para cuantificar ácidos nucleicos que son únicos para un suceso de maíz transgénico denominado Bt11 en una muestra biológica, y a composiciones útiles para llevar a cabo los métodos.

10 Como consecuencia de la implementación de normativas con respecto a plantas de cultivos transgénicas, por ejemplo la Normativa de la Comisión Europea (EC) 1139/98, Normativa EC 49/2000, y Normativa EC 50/2000, existe la necesidad de medir exactamente los niveles de ADN de una especie transgénica que puede estar presente en, por ejemplo, grano usado para alimento. Los métodos analíticos para detectar y cuantificar ADN procedente de estas plantas transgénicas han recibido gran atención, particularmente debido a que el valor umbral para el etiquetado, establecido por el European Commission's Standing Committee en 1999, es 1%.

15 Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier método de detección de ácido nucleico bien conocido, incluyendo, pero sin limitarse a, amplificación térmica (reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) usando cebadores polinucleotídicos, o hibridación de ADN usando sondas de ácidos nucleicos. Típicamente, en aras de la simplicidad y uniformidad de reactivos y metodologías para uso en la detección de un constructo de ADN particular que se ha usado para transformar diversas variedades vegetales, estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos usados frecuentemente, por ejemplo promotores, terminadores y genes marcadores, debido a que, para muchos constructos de ADN, la región de la secuencia codificante es intercambiable. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles a la hora de discriminar entre constructos que difieren solamente con referencia a la secuencia codificante. Además, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre sucesos transgénicos diferentes, particularmente aquellos producidos usando el mismo constructo de ADN.

20 Para distinguir entre sucesos transgénicos, se han desarrollado métodos de PCR específicos de los sucesos. La inserción de un constructo de ADN heterólogo en un genoma de la planta crea uniones únicas específicas de los sucesos entre la secuencia de ADN integrada y la secuencia genómica de la planta. Se han desarrollado para sucesos transgénicos métodos de PCR cuantitativa (qPCR) específicos de sucesos, incluyendo aquel para Bt11. Los factores que pueden limitar la aplicabilidad para tales métodos pueden incluir, por ejemplo, influencias de la concentración de ADN inicial, estándares establecidos por agencias normativas, selección de cebadores y protocolo de PCR, capacidad de repetición de una muestra a otra, reproducibilidad entre diferentes laboratorios, y umbrales para bajo nivel de detección y elevada sensibilidad.

25 Por las razones anteriores, existe una necesidad de mejorar la detección cuantitativa de ácidos nucleicos a partir del suceso de maíz transgénico Bt11 en una muestra biológica.

SUMARIO

35 La presente descripción se refiere a un suceso de maíz transformado (*Zea mays*), denominado Bt11, que comprende dos casetes de expresión heterólogos, uno que comprende una secuencia codificante *cry1Ab* que codifica una proteína insecticida Cry1Ab que confiere resistencia a insectos a plantas de maíz Bt11, y el otro que comprende una secuencia codificante *pat* que codifica una proteína PAT que confiere resistencia a herbicidas de glufosinato-amonio a plantas de maíz Bt11. La creación del suceso Bt11 se describe en la patente U.S. nº 6.114.608. Los dos casetes de expresión se insertaron en una región 15 cM en un brazo largo del cromosoma 8, cerca de la posición 117, y en el intervalo flanqueado por dos marcadores públicos: ZIB3 y UMC150a.

40 La presente invención proporciona composiciones y métodos mejorados para la detección cuantitativa de ADN específico de Bt11 en muestras biológicas con respecto a un gen *adh1* de maíz endógeno. Tal cuantificación de ADN de Bt11 en, por ejemplo una mezcla de grano de maíz que comprende grano de Bt11 y grano no de Bt11, se basa en un par de cebadores y en una sonda diseñada para detectar la secuencia de unión de 5' en Bt11.

45 En un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para cuantificar ADN del suceso Bt11 en una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos de maíz, en el que el método comprende (a) poner en contacto la muestra biológica con un primer par de cebadores, que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 1 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 2, y una sonda marcada con un colorante fluorescente que comprende SEC ID NO: 3, en el que el primer par de cebadores, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico procedente de maíz del suceso Bt11, produce un primer amplicón que comprende SEC ID NO: 4, y en el que el primer amplicón es de diagnóstico para el suceso Bt11; (b) poner en contacto la muestra biológica con un segundo par de cebadores, que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 5 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 6, y una segunda sonda marcada con colorante fluorescente

que comprende SEC ID NO: 7, en el que el segundo par de cebadores, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de maíz, produce un segundo amplicón que comprende SEC ID NO: 8, y en el que el segundo amplicón es indicativo de la presencia del gen *adh1* de maíz; (c) proporcionar una condición de reacción de amplificación de ácido nucleico y un instrumento de PCR capaz de llevar a cabo una PCR en tiempo real cuantitativa; (d) llevar a cabo la PCR en tiempo real cuantitativa usando los cebadores y sondas de (a) y (b), produciendo de ese modo el primer amplicón y el segundo amplicón; (e) detectar simultáneamente el primer amplicón y el segundo amplicón según se producen por dicho instrumento de PCR; y (f) calcular una cantidad relativa del primer amplicón en comparación con el segundo amplicón, con lo que la cantidad del primer amplicón es indicativa de la cantidad de ADN de Bt11 en la muestra biológica.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un par de cebadores que comprenden un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 1 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 2, en el que el par de cebadores, cuando se usa en una PCR con ADN genómico procedente de maíz del suceso Bt11, produce un amplicón que comprende SEC ID NO: 4 que es de diagnóstico para el suceso Bt11.

En todavía otro aspecto, la presente descripción proporciona una sonda polinucleotídica que consiste en SEC ID NO: 3 que, cuando está marcada con un colorante fluorescente en los extremos 5' y 3', es útil en una RT-qPCR para la detección y cuantificación del amplicón de Bt11.

Lo anterior y otros aspectos de la descripción serán más manifiestos a partir de la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN EL LISTADO DE SECUENCIAS

- SEC ID NO: 1 es el cebador de Bt11-5For.
- SEC ID NO: 2 es el cebador de Bt11-5Rev.
- SEC ID NO: 3 es la sonda de Bt11.
- SEC ID NO: 4 es el amplicón de Bt11 qPCR.
- SEC ID NO: 5 es el cebador de Zmadh1-F.
- SEC ID NO: 6 es el cebador de Zmadh1-R.
- SEC ID NO: 7 es la sonda de Zmadh1-P.
- SEC ID NO: 8 es el amplicón de *adh1* qPCR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las siguientes definiciones se proporcionan para definir mejor la presente descripción y guiar a aquellos de pericia normal en la técnica en la práctica de la presente descripción. Excepto que se señale de otro modo, los términos usados aquí se han de entender según el uso convencional por aquellos de pericia normal en la técnica pertinente. Las definiciones de términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1994. Se usa aquí la nomenclatura para bases de ADN y aminoácidos como se expone en 37 C.F.R. § 1.822.

“Exactitud” de un método de PCR significa la cercanía de concordancia entre un resultado de ensayo y un valor de referencia aceptado.

“Eficiencia de la amplificación” significa la tasa de amplificación que conduce a una pendiente teórica de -3,32 con una eficiencia de 100% en cada ciclo. La eficiencia de la reacción se puede calcular mediante la siguiente ecuación:
$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1.$$

Como se usa aquí, el término “amplificada” significa la construcción de múltiples copias de una molécula de ácido nucleico, o múltiples copias complementarias a la molécula de ácido nucleico, usando como molde al menos una de las moléculas de ácido nucleico. Los sistemas de amplificación incluyen, pero no se limitan a, el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el sistema de reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación a base de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario), sistemas Q-Beta Replicase, sistema de amplificación a base de transcripción (TAS), y la amplificación de desplazamiento de hebra (SDA). Véase, por ejemplo, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, D. H. Persing et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). El producto de la amplificación se denomina amplicón.

El “coeficiente de linealidad (R^2)” es el coeficiente de correlación de una curva estándar obtenida mediante análisis de regresión lineal.

“Intervalo dinámico”, como se usa aquí, significa el intervalo de concentraciones de ADN de Bt11 a lo largo del cual el método de la descripción se comporta de manera lineal con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

Como se usa aquí, el término “suceso” transgénico se refiere a una planta recombinante producida mediante transformación y regeneración de una célula o tejido vegetal con ADN heterólogo, por ejemplo un casete de expresión que incluye un gen de interés. El término “suceso” se refiere al transformante original y/o progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término “suceso” también se refiere a la progenie producida por una alogamia sexual entre el transformante y otra línea de maíz. Incluso después del retrocruzamiento repetido con un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante procedente del progenitor transformante está presente en la progenie del cruce en la misma localización cromosómica. El término “suceso” también se refiere a ADN procedente del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría que se transfiriese a una progenie que recibe ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado del cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie que resulta de la autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado. Normalmente, la transformación del tejido vegetal produce múltiples sucesos, cada uno de los cuales representa la inserción de un constructo de ADN en una localización diferente en el genoma de una célula vegetal. Un suceso particular se selecciona basándose en la expresión del transgén u otras características deseables. De este modo, “suceso Bt11”, “Bt11” o “suceso de Bt11” se pueden usar de forma intercambiable.

“Casete de expresión”, como se usa aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica particular en una célula hospedante apropiada, que comprende un promotor operablemente enlazado a la secuencia nucleotídica de interés que está operablemente enlazada a señales de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. El casete de expresión también puede comprender secuencias no necesarias en la expresión directa de una secuencia nucleotídica de interés pero que están presentes debido a sitios de restricción convenientes para la eliminación del casete desde un vector de expresión. El casete de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, queriendo decir que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser aquel que sea de origen natural pero que se ha obtenido de una manera recombinante, útil para la expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedante, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no aparece de forma natural en la célula hospedante y debe haber sido introducida en la célula hospedante o en un ancestro de la célula hospedante mediante un proceso de transformación conocido en la técnica. La expresión de la secuencia nucleotídica en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción sólo cuando la célula hospedante se expone a cierto estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico de un tejido particular, u órgano, o etapa de desarrollo. Un casete de expresión, o su fragmento, también se puede denominar “secuencia insertada” o “secuencia de inserción” cuando se transforma en una planta.

Un “gen” es una región definida que está situada en un genoma y que, además de una secuencia codificante, puede comprender otras secuencias, principalmente reguladoras, de ácido nucleico responsables del control de la expresión, es decir, la transcripción y traducción, de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias no traducidas de 5' y 3', y secuencias de terminación. Otros elementos que pueden estar presentes son, por ejemplo, intrones.

Una secuencia de ácido nucleico “heteróloga” es una secuencia de ácido nucleico no asociada naturalmente con una célula hospedante en la que se introduce, incluyendo múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ácido nucleico de origen natural.

“Límite de detección (LOD)” es la cantidad o concentración más baja de ADN en una muestra, que se puede detectar de forma fiable, pero no necesariamente cuantificar. El LOD de un método de la descripción será menor que 1/20 de la concentración diana. Experimentalmente, un método de la descripción detectará la presencia de ADN de Bt11 al menos 95% del tiempo en el LOD, asegurando $\leq 5\%$ de resultados de falsos negativos.

“Límite de cuantificación (LOQ)” es la cantidad o concentración más baja de ADN de Bt11 en una muestra que se puede cuantificar de forma fiable con un nivel aceptable de precisión y exactitud. El LOQ de un método de la descripción será menor que 1/10 del valor de la concentración diana con una $RSD_r \leq 25\%$. La concentración diana está destinada a ser el umbral relevante para los requisitos legislativos.

“Practicabilidad” significa la facilidad de operación, la factibilidad y eficiencia de la implementación, y/o los costes unitarios asociados (por ejemplo \$/muestra) de un método descrito aquí.

“Cebadores”, como se usa aquí, son ácidos nucleicos aislados que se hibridan a una hebra de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y después se extienden a lo largo de ADN diana mediante una polimerasa, tal como ADN polimerasa. Se pueden

usar pares o conjuntos de cebadores para la amplificación de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

Una “sonda” es un ácido nucleico aislado al que está unido un marcador detectable o molécula informadora, tal como un agente quimioluminiscente, isótopo radioactivo, ligando, o enzima. Tal sonda es complementaria a una hebra de ADN procedente del suceso Bt11 de maíz o una línea de maíz convencional. El ADN de Bt11 puede ser de una planta de maíz Bt11 o de una muestra que incluye ADN de Bt11. Las sondas según la presente descripción incluyen no sólo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas u otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y se pueden usar para detectar la presencia de una secuencia de ADN diana.

Los cebadores y sondas tienen generalmente una longitud entre 10 y 15 nucleótidos o más. Los cebadores y sondas también pueden tener una longitud de al menos 20 nucleótidos o más, o al menos 25 nucleótidos o más, o una longitud de al menos 30 nucleótidos o más. Tales cebadores y sondas se hibridan específicamente a una secuencia diana en condiciones de hibridación muy restrictivas. Los cebadores y sondas según la presente descripción pueden tener complementariedad de secuencia completa con la secuencia diana, aunque se pueden diseñar mediante métodos convencionales sondas que difieran de la secuencia diana y que retengan la capacidad para hibridarse a secuencias diana.

Como se usa aquí, la “desviación estándar de repetitividad (RSD_r)” es la desviación estándar de los resultados de ensayo obtenida en condiciones de repetitividad. “Condiciones de repetitividad” son condiciones en las que los resultados de ensayo se obtienen con el mismo método, en apartados de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, usando el mismo equipo en intervalos cortos de tiempo.

Como se usa aquí, la “desviación estándar de reproducibilidad (RSD_R)” es la desviación estándar de los resultados de ensayo obtenida en condiciones de reproducibilidad. Las condiciones de reproducibilidad son condiciones en las que los resultados de ensayo se obtienen con el mismo método, en apartados de ensayo idénticos, en diferentes laboratorios, con diferentes operarios, usando diferente equipo. La desviación estándar de reproducibilidad describe la variación entre laboratorios.

“Robustez” de un método es una medida de su capacidad para permanecer inafectado por desviaciones pequeñas pero deliberadas de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento.

“Especificidad” de un método se refiere a la propiedad de un método para responder exclusivamente a la característica o analito de interés. Por ejemplo, la especificidad del método de PCR descrito en el Ejemplo 1, que usa los cebadores descritos en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2, detecta exclusivamente ADN de Bt11.

La “exactitud” de un método es la cercanía de concordancia entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados de ensayo y un valor de referencia aceptado. La medida de exactitud se expresa típicamente en términos de sesgo porcentual. Un método de la descripción tiene una exactitud de $\pm 5\%$ a lo largo de todo el intervalo dinámico.

Como se usa aquí, el término “único” para Bt11 significa distintivamente característico de o diagnóstico para el suceso Bt11. Por lo tanto, los ácidos nucleicos únicos para el suceso Bt11 no se encuentran en otras plantas de maíz que no son Bt11.

Esta descripción se refiere a composiciones y a métodos mejorados para la detección cuantitativa de ADN específico de Bt11 en muestras biológicas con respecto a un gen *adh1* de maíz endógeno. Tal cuantificación de ADN de Bt11 en, por ejemplo una mezcla de grano de maíz que comprende grano Bt11 y no Bt11, se basa en un par de cebadores y en una sonda diseñada para detectar la secuencia de unión de 5' en Bt11.

En una realización, la presente descripción engloba un método para cuantificar ADN de un suceso Bt11 en una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos de maíz, comprendiendo el método (a) poner en contacto la muestra biológica con un primer par de cebadores, que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 1 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 2, y una sonda marcada con un colorante fluorescente que comprende SEC ID NO: 3, en el que el primer par de cebadores, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico procedente de maíz del suceso Bt11, produce un primer amplicón que comprende SEC ID NO: 4, y en el que el primer amplicón es de diagnóstico para el suceso Bt11; (b) poner en contacto la muestra biológica con un segundo par de cebadores, que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 5 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 6, y una segunda sonda marcada con un colorante fluorescente que comprende SEC ID NO: 7, en el que el segundo par de cebadores, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de maíz, produce un segundo amplicón que comprende SEC ID NO: 8, y en el que el segundo amplicón es indicativo de la presencia del gen *adh1* de maíz; (c) proporcionar una condición de reacción de amplificación de ácido nucleico y un instrumento de PCR capaz de llevar a cabo una PCR en tiempo real cuantitativa; (d) llevar a cabo la PCR en tiempo real cuantitativa usando los cebadores y sondas de (a) y (b), produciendo de ese modo el primer amplicón y el segundo amplicón; (e) detectar simultáneamente el primer amplicón y

el segundo amplicón según se producen por dicho instrumento de PCR; y (f) calcular una cantidad relativa del primer amplicón en comparación con el segundo amplicón, con lo que la cantidad del primer amplicón es indicativa de la cantidad de ADN de Bt11 en la muestra biológica.

5 En un aspecto de esta realización, el método tiene un límite de cuantificación (LOQ) menor o igual a una concentración de 0,08% de ADN de Bt11.

En otro aspecto de esta realización, el método tiene un límite de detección (LOD) menor o igual a una concentración de 0,04% de ADN de Bt11.

En todavía otro aspecto de esta realización, el método tiene un coeficiente medio de linealidad (R^2) de al menos 0,99.

10 En aún otro aspecto de esta realización, el método tiene una desviación estándar de reproducibilidad relativa (RSD_R) de 24% o menos a una concentración de ADN de Bt11 de 0,090%.

En otro aspecto de esta realización, el método tiene una desviación estándar de repetitividad relativa (RSD_r) de 17% o menos a una concentración de ADN de Bt11 de 0,090%.

En todavía otro aspecto de esta realización, el método tiene un valor de exactitud de $\pm 5\%$ o menos a lo largo de todo el intervalo dinámico.

15 En otra realización, la presente descripción engloba un par de cebadores que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 1 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 2 que funcionan juntos en una PCR en presencia de un molde de ADN del suceso Bt11 de maíz en una muestra biológica para producir un amplicón de diagnóstico para el suceso Bt11 de maíz.

En un aspecto de esta realización, el amplicón comprende SEC ID NO: 4.

20 En todavía otra realización, la presente descripción engloba una sonda marcada con un colorante fluorescente que comprende SEC ID NO: 3.

Los siguientes ejemplos están destinados solamente para ilustrar una o más realizaciones preferidas de la invención, y no se deben de interpretar como limitantes del alcance de la descripción.

EJEMPLOS

25 **Ejemplo 1. Desarrollo del método de RT-qPCR cuantitativa de Bt11**

Este Ejemplo describe un método de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) específico para Bt11 para la determinación de la cantidad relativa de ADN del suceso Bt11 con respecto a ADN de maíz total en una muestra biológica.

30 El ensayo TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) es una técnica de detección mediante RT-qPCR en la que la acumulación del producto de PCR se monitoriza directamente durante el progreso de la reacción de PCR. La degradación de las moléculas de la sonda específica de la diana por la actividad de exonucleasas de 5' a 3' de Taq ADN polimerasa durante cada ciclo de amplificación produce una acumulación de fluorescencia. Los mayores niveles de fluorescencia están directamente relacionados con la acumulación de producto de la PCR, y se detectan durante cada ciclo de amplificación mediante el uso de una máquina de PCR especializada, por ejemplo, sin limitación, ABI PRISM™ 770 o ABI PRISM™ 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA).

35 Los umbrales de los ciclos (Ct) se asignan automáticamente por el instrumento de PCR a cada muestra según el ciclo en el que la fluorescencia excede un nivel específico por encima de un valor de fondo. Las muestras con mayores niveles de molde al comienzo de la reacción se amplificarán hasta niveles detectables de forma más rápida, y producirán un menor Ct. Para la cuantificación de la cantidad de ADN del suceso Bt11 en una muestra de ensayo, se usan los valores ΔCt normalizados de muestras de calibración para calcular, mediante regresión lineal, una fórmula de ΔCt de la curva de referencia. Los valores ΔCt normalizados de las muestras desconocidas se miden entonces y, por medio de la fórmula de regresión calculada, se estima la cantidad relativa de ADN del suceso de Bt11 en la muestra desconocida. El ensayo TaqMan® descrito aquí se puede usar para cuantificar de forma exacta el nivel de ADN de Bt11 con respecto a un gen de maíz calibrador endógeno. Debido a que la secuencia calibradora endógena permanece constante con respecto al ADN genómico de maíz total, cualquier variación en el nivel relativo de ADN específico de Bt11 con respecto al gen endógeno es indicativa de una diferencia en el número de copias.

1.1 Sistema de PCR específico del suceso para maíz de suceso Bt11

Los sistemas de PCR derivados de ambas regiones de unión entre el inserto y el ADN genómico del suceso Bt11 se ensayaron basándose en la información de secuencia sobre el inserto de ADN y sus secuencias frontera de 5' y 3'

flanqueantes. Asistidos por software de diseño de oligonucleótidos (Primer Express™ V2.0), se diseñaron tres sondas y seis cebadores de amplificación para la frontera de 5', y se diseñaron una sonda y tres cebadores de amplificación para la frontera de 3'. Subsiguientemente, se ensayaron experimentalmente todas las posibles combinaciones de estos cebadores y sondas.

- 5 La comparación de los valores Ct, los valores ΔR_n , las formas de las gráficas de amplificación, y las eficiencias de la PCR condujeron a una combinación de par de cebadores/sonda que se escogió para la optimización posterior.

El par de cebadores y la sonda óptimos se localizaron en la unión de inserto con el genoma de 5' que produjo mejores resultados que los cebadores de la unión de 3'. El cebador directo estaba localizado en el ADN genómico, el sitio de unión para el cebador inverso estaba localizado en el inserto del suceso Bt11, mientras que la sonda abarca la unión de inserto con genoma de 5'. Para la detección específica de ADN del suceso Bt11, se amplifica un fragmento de ácido nucleico de 68 pb que solapa con el ADN del inserto heterólogo y el ADN genómico de maíz que flanquea el extremo 5' del inserto, usando los siguientes cebadores:

Bt11-ev-f1: 5'- TGTGTGGCCATTTATCATCGA-3' (SEC ID NO: 1)

Bt11-ev-r5: 5'-CGCTCAGTGGAACTC-3' (SEC ID NO: 2).

- 15 Los productos de la PCR se midieron en cada ciclo (tiempo real) por medio de la siguiente sonda oligonucleotídica específica de la diana:

Bt11-ev-p1: 5'-TTCCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGT-3' (SEC ID NO: 3) marcada con un colorante informador, fluoresceína (FAM), en su extremo 5', y un colorante extintor, tetrametilrodamina (TAMRA), en su extremo 3'.

- 20 Usando estos cebadores en una reacción con ADN de maíz Bt11 como molde se produce un amplicón que comprende SEC ID NO: 4, que es único para y de diagnóstico para el suceso Bt11.

1.2 Sistema de PCR de referencia específico del maíz (*Adh1*)

- Para la cuantificación relativa de ADN del suceso Bt11, se usó como sistema de referencia para la detección específica de secuencias de *Zea mays* un sistema de PCR de referencia específico del maíz preexistente (Hernandez et al. 2004. J. Agric. Food Chem. 52:4632-4637) que amplifica un fragmento de 135 pb del gen de *alcohol deshidrogenasa I* endógeno del maíz (*adh1*) (nº de acceso Genbank AY691949). Este sistema de referencia usa los siguientes cebadores:

Zmadh1-F: 5'-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCT-3' (SEC ID NO: 5)

Zmadh1-R: 5'-CCACTCCGAGACCCTCAGTC-3' (SEC ID NO: 6)

- 30 Los productos de la PCR se miden en cada ciclo (tiempo real) por medio de la siguiente sonda oligonucleotídica específica de la diana:

Zmadh1-P: 5'-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-3' (SEC ID NO: 7) marcada con colorante VIC™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3'.

Usando estos cebadores en una reacción con ADN de maíz como molde se produce un amplicón que comprende SEC ID NO: 8, que es indicativo de la presencia de *adh1* de maíz.

- 35 1.1 Cálculo de la curva de calibración

La curva de calibración consiste en cinco muestras que contienen porcentajes fijos de ADN de Bt11 en una cantidad total de 250 ng de ADN de maíz. La concentración de ADN de Bt11 en las muestras estándar osciló de 10% a 0,08%. Una curva de calibración se produce representando gráficamente los valores ΔCt de las muestras de calibración frente al logaritmo de la concentración de Bt11% respectiva; la pendiente (a) y la intersección (b) de la curva de calibración ($y = ax + b$) se usan entonces para calcular el contenido medio de Bt11% de las muestras ciegas basándose en sus valores ΔCt normalizados.

45 Durante la reacción de TaqMan™, el software que acompaña al instrumento ABI PRISM™ 7900 HT detecta la acumulación de producto de PCR mediante la acumulación de fluorescencia. La fluorescencia normalizada con respecto a niveles de valor base establecidos (ΔR_n) se representa gráficamente frente al número de ciclos. Se obtiene un valor Ct dibujando un corte arbitrario a lo largo de las reacciones, de manera que la línea pasa a través de la fase logarítmica de cada reacción. El software del sistema de detección de secuencias con el instrumento ABI PRISM™ 7900 HT proporciona el número de ciclos en el que la acumulación de la fluorescencia (producto de la PCR) de una reacción particular cruza el umbral (Ct). El valor FAM Ct (Bt11) se compara con el valor VIC Ct (*adh1*) para normalizar el valor FAM Ct de cada reacción al nivel de ácidos nucleicos totales presentes, para producir $\Delta Ct[\Delta Ct = Ct(FAM) -$

Ct(VIC)]. Este cálculo elimina cualquier variación contribuida por la entrada de molde desigual en las reacciones. Debido a que el número de copias del gen de maíz endógeno por genoma permanece constante, un cambio en ΔCt corresponde a un cambio en la cantidad (o copia) del ADN de Bt11. Comparando el valor ΔCt de las muestras desconocidas con el ΔCt de un control conocido, se obtiene $\Delta\Delta Ct$ [$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (desconocida) - ΔCt (conocida)]. El número de copias se puede calcular entonces usando el valor $\Delta\Delta Ct$ al usar la ecuación: Número de Copias = $2^{(\Delta\Delta Ct)}$.

5

1.2 Montaje de PCR en tiempo real

Las PCRs se llevan a cabo en placas de reacción de 96 pocillos. El procedimiento es un sistema simple, en el que el ensayo endógeno de *adh1* de maíz calibrador y el ensayo de Bt11 diana se llevan a cabo simultáneamente en pocillos separados. En dos tubos de reacción, uno para el sistema de Bt11 y uno para el sistema de *adh1*, en hielo, añádanse los componentes (excepto ADN) en las Tablas 1 y 2 en el orden enumerado para preparar las mezclas maestras. La 2X Sigma Jumpstart Ready Mix se suplementa con 550 μl de $MgCl_2$ 1M y 20 μl de 10000x sulforrodamina 101. Mézclase suavemente y centrifúguese brevemente. Prepárense dos tubos de reacción adicionales, uno para Bt11 y uno para las mezclas maestras de *adh1*, para muestras de ADN de la curva estándar, muestras de ADN desconocidas y muestras de ADN de control. Añádase a cada tubo de reacción la cantidad correcta de mezcla maestra (por ejemplo 20 x 3 = 60 μl de mezcla maestra para tres repeticiones de PCR). Añádase a cada tubo la cantidad correcta de ADN mostrada en las Tablas 1 y 2 (por ejemplo, 5 x 3 = 15 μl de ADN para tres repeticiones de PCR).

10

15

Tabla 1. Mezcla de reacción de amplificación en el volumen/concentración final por pocillo de reacción para el sistema de referencia de *adh1* de maíz.

Componente	Concentración final	μl /reacción
Sigma Jumpstart ReadyMix (2x)	1x	12,5
Cebador Zm <i>adh1</i> -F (10 μM)	300 nM	0,75
Cebador Zm <i>adh1</i> -R (10 μM)	300 nM	0,75
Zm <i>adh1</i> - P probe (10 μM)	200 nM	0,50
Agua libre de nucleasas	#	5,50
ADN molde (máx 250 ng)	#	5
Volumen de reacción total:		25

20

Tabla 2. Mezcla de reacción de amplificación en el volumen/concentración final por pocillo de reacción para el sistema específico de Bt11.

Componente	Concentración final	μl /reacción
Sigma Jumpstart ReadyMix (2x)	1x	12,5
Cebador Bt11-ev-f1 (10 μM)	200 nM	0,50
Cebador Bt11-ev-r5 (10 μM)	200 nM	0,50
Sonda Bt11-ev-p1 (10 μM)	150 nM	0,38
Agua libre de nucleasas	#	6,12

ADN molde (máx 250 ng)	#	5
Volumen de reacción total:		25

5 Sométase a cada tubo a vórtice durante aproximadamente 10 segundos para ayudar a reducir la variabilidad entre repeticiones de cada muestra. Háganse girar los tubos en una microcentrifugadora. Repártanse alícuotas de 25 µl en cada pocillo de reacción de PCR. Cíérrese herméticamente la placa de reacción con una cubierta óptima o tapas ópticas. Centrifúguese la placa a aproximadamente 250x g durante aproximadamente 1 minuto a un intervalo de 4°C hasta aproximadamente la temperatura ambiente. Colóquese la placa en un instrumento de PCR y realícese la PCR con condiciones de ciclos descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de ciclos para los sistemas de Bt11/*adhI* de maíz.

Etapa	Etapa	T°C	Tiempo (s)	Adquisición	Ciclos
1	UNG	50°C	120	No	1
2	Desnaturalización inicial	95°C	600	No	1
3	Desnaturalización	95°C	15	No	40
	Hibridación y alargamiento	60°C	60	Sí	

10

1.3 Análisis de los datos

Después de llevar a cabo el protocolo de la PCR en tiempo real descrito anteriormente, los resultados se analizaron mediante el siguiente procedimiento:

15 Para ajustar el umbral, preséntense las curvas de amplificación de un sistema (por ejemplo Bt11) en modo logarítmico. Localícese la línea del umbral en el área de la curva en la que los perfiles de amplificación son paralelos (fase exponencial de pCR). Actualícense los valores de Ct según sea necesario. Cámbiese al modo lineal al pinchar en el eje Y de la gráfica de amplificación, y compruébese que el umbral previamente asignado cae dentro de la fase geométrica de las curvas.

20 Para establecer la línea base, determínese el número de ciclos en el que la línea del umbral cruza la primera curva de amplificación, y establézcase la línea base tres ciclos antes de ese valor (por ejemplo, cuanto antes de Ct = 25, establézcase la línea base que cruza a Ct = 25 – 3 = 22).

Repítase el procedimiento descrito anteriormente en las gráficas de amplificación del otro sistema (por ejemplo sistema de *adhI*).

25 Después de haber definido un valor umbral dentro de la fase logarítmica de amplificación como se describe anteriormente, el software del instrumento calcula los valores de Ct para cada reacción. La curva de Ct de referencia se genera representando gráficamente los valores de Ct medidos para los puntos de calibración frente al logaritmo del contenido de Bt11%, y ajustando una recta de regresión lineal en estos datos. Después, la fórmula de regresión se usa para estimar la cantidad relativa de ADN de Bt11 en las muestras de ADN desconocidas.

30 La especificidad del ensayo de Bt11 (cebadores directo/inverso y sonda) se ensayó experimentalmente en PCR de tiempo real frente a ADN extraído de muestras que contienen maíz transgénico conocido en la técnica, incluyendo Bt11, Bt10, NK603, MON810, MON863, MON810 x MON863, TC1507, MIR604, Bt176, GA21, MON88017, T25 y Herculex® RW (DAS-59122-7).

Los resultados demuestran que ninguna de las líneas de maíz transgénico mencionadas anteriormente ensayadas,

excepto el control positivo Bt11, produjo amplicones en muestras replicadas cuando se usaron 100 ng de ADN total por reacción.

Ejemplo 2. Validación del método de RT-qPCR cuantitativa de Bt11

5 El método descrito en el Ejemplo 1 se optimiza para la cuantificación de ADN de Bt11 en muestras biológicas procedentes de mezclas de semillas de maíz Bt11 y convencional. El método aprovecha una secuencia de ADN única en la región entre el inserto y el genoma de la planta. La secuencia es específica para el maíz del suceso Bt11, y de este modo proporciona especificidad por el suceso al método.

2.1 Precisión/exactitud/intervalo dinámico/LOQ/LOD

10 A fin de determinar la precisión, exactitud, intervalo dinámico, LOQ y LOD, se llevó a cabo el siguiente diseño experimental en ocho experimentos independientes.

Las muestras de calibración (Std1 a Std6) se produjeron preparando disoluciones de 50 ng/μl (250 ng/reacción) de ADN genómico total con 100%; 10%; 5%; 1%; 0,5% y 0,1% de ADN del suceso Bt11 en antecedente de ADN de maíz no transgénico. El esquema de dilución del estándar de Bt11 y el contenido de ADN genómico total correspondiente en la reacción de PCR se muestra en la Tabla 4.

15

Tabla 4. Esquema de dilución de las muestras de calibración.

Código de la muestra	Cantidad en cada estándar (ng)					
	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6
Contenido de ADN total en la PCR	250	250	250	250	250	250
Contenido de ADN de Bt11 total en la PCR	250	25	12,5	2,5	1,25	0,25

20 Se produjo una curva de calibración representando gráficamente valores medios de ΔCT de las muestras de calibración frente al logaritmo de los contenidos de Bt11% respectivos; la pendiente (a) y la intersección (b) de la curva de calibración ($y = ax + b$) se usaron entonces para calcular el contenido medio de % Bt11 de las muestras de referencia basándose en sus valores de ΔCT normalizados.

Se llevaron a cabo tres controles negativos (NTC) por sistema para verificar la pureza de los reactivos. Cada muestra de referencia (que contiene diferentes relaciones de ADN del suceso Bt11 en antecedente de ADN de maíz no transgénico) se analizó a 250 ng de ADN genómico por reacción por triplicado.

25 El análisis de los datos se ha logrado usando un ajuste de línea base 3-19 para el sistema de *Adh1* y 3-21 para el sistema de detección específico del suceso Bt11. Los valores del umbral fueron: 0,4 (*Adh1*) y 0,7 (Bt11) en el sistema de detección de ABI 7900 HT.

30 Para cada una de las 5 muestras (que oscilan desde 5,0% hasta 0,08% de ADN del suceso Bt11 en ADN de maíz no transgénico), se calcularon el valor medio (MEAN), la desviación relativa con respecto al valor esperado (BIAS) así como la desviación estándar (STDEV) y la desviación estándar relativa (RSD) de los resultados de cuantificación, a fin de determinar la exactitud y repetitividad. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de 8 experimentos de PCR independientes en condiciones de repetitividad para el suceso Bt11.

Nivel de Bt11	Mean	Bias	Stdev	RSD _r
5,0%	5,4%	8,0%	0,32%	5,9%
2,0%	1,9%	-5,0%	0,18%	9,5%
0,90%	0,90%	0,0%	0,070%	7,8%
0,50%	0,53%	6,0%	0,076%	14,3%
0,080% ^a	0,068%	-15,0%	0,0111%	16,3%
0,040% ^b	Todos positivos			
^a Límite de cuantificación (LOQ)				
^b Límite de detección (LOD)				

5 La desviación relativa del valor medio con respecto del valor esperado (verdadero) osciló entre -13,8% y 0% a lo largo de todo el intervalo dinámico.

Los valores de precisión (desviación estándar de la repetitividad RSD_r) para todas las muestras entre 5,0% y 0,08% de concentración de Bt11 oscilaron desde 5,9% hasta 16,3% de la desviación estándar relativa.

El límite de detección (LOD) relativo del método se determinó que era menor o igual a 0,04% en 250 ng de ADN de maíz total.

10 El límite de cuantificación (LOQ) relativo del método es menor o igual a 0,08% en 250 ng de ADN de maíz total.

2.2 Eficiencia de la amplificación y coeficiente R²

15 A fin de evaluar la eficiencia (E) y el coeficiente R² del sistema de PCR (individual) específico del suceso Bt11, se llevó a cabo el análisis de regresión lineal de los valores de Ct del suceso Bt11 frente a log[contenido de %Bt11]. Se evaluaron las rectas de regresión de los estándar de 8 experimentos independientes (véase 2.1 anterior), y se determinaron los parámetros de regresión, incluyendo pendiente, intersección y R². La eficiencia de la amplificación se calculó mediante la siguiente ecuación: $E = [10^{(-1/pendiente)}] - 1$. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de regresión y eficiencias de PCR de las rectas de regresión específicas del suceso Bt11

	Pendiente	Intersección	R ²	E
Experimento 1	-3,48	31,7	1,000	0,94
Experimento 2	-3,61	31,9	0,999	0,89
Experimento 3	-3,48	31,7	0,999	0,94
Experimento 4	-3,53	31,8	0,999	0,92
Experimento 5	-3,51	31,7	0,999	0,93
Experimento 6	-3,40	31,5	1,000	0,97

Experimento 7	-3,57	31,6	0,999	0,90
Experimento 8	-3,55	31,5	1,000	0,91
MEDIA	-3,52	31,7	0,999	0,93

5 A fin de evaluar la eficiencia de la amplificación E y el coeficiente R^2 del método de detección del suceso Bt11 basado en ΔCt , se llevó a cabo un análisis de regresión lineal de los valores de ΔCt frente al $\log[\text{contenido de \%Bt11}]$. Se evaluaron las rectas de regresión de los estándares de 8 experimentos independientes (véase 4.3), y se determinaron los parámetros de regresión, incluyendo la pendiente, la intersección y R^2 . La eficiencia de la amplificación se calculó mediante la siguiente ecuación: $E = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros de regresión y eficiencias de la PCR de las curvas de calibración basadas en valores de ΔCt de las muestras de calibración.

	Pendiente	Intersección	R^2	E
Experimento 1	-3,43	9,2	1,000	0,96
Experimento 2	-3,55	9,3	0,999	0,91
Experimento 3	-3,42	9,2	0,999	0,96
Experimento 4	-3,45	9,2	0,999	0,95
Experimento 5	-3,46	9,5	0,999	0,95
Experimento 6	-3,34	9,4	0,998	0,99
Experimento 7	-3,50	9,5	1,000	0,93
Experimento 8	-3,50	9,4	0,999	0,93
MEDIA	-3,46	9,3	0,999	0,95

10 A fin de evaluar la robustez del método, se llevaron a cabo reacciones de PCR bajo concentraciones variables de mezcla maestra y temperaturas de hibridación.

15 La estabilidad de ambos sistemas de detección con respecto a cambios en la concentración de componentes de reacción principales, se llevó a cabo un experimento a +20% y a -20% de la concentración de la mezcla maestra. Se analizaron tres muestras (0,080%, 0,90% y 5,0% de ADN del suceso Bt11 en ADN de maíz no transgénico) a 250 ng de ADN genómico por reacción. En la Tabla 8 se muestra la media de los triplicados.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación a +/- 20% de la mezcla maestra

	Valor esperado (verdadero) (%Bt11)		
	0,080%	0,90%	5,0%
Mezcla maestra +20%			
Resultados de la cuantificación	0,056%	0,74%	4,7%
Desviación relativa del verdadero	-30,0%	-17,8%	-6,0%
Mezcla maestra -20%			
Resultados de la cuantificación	0,060% ^a	0,74%	5,3%
Desviación relativa del verdadero	-25,0%	-17,8%	6,0%
^a Un valor atípico excluido			

5 A fin de evaluar la influencia de la variación de la temperatura de hibridación, se analizaron tres muestras (0,080%, 0,90% y 5,0% de ADN del suceso Bt11 en un antecedente de ADN de maíz no GM) a 250 ng de ADN genómico por reacción, con temperaturas de hibridación de 58°C y 62°C en un sistema de detección de secuencias ABI 7900 HT. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la cuantificación usando diferentes temperaturas de hibridación

	Valor esperado (verdadero) (%Bt11)		
	0,080%	0,90%	5,0%
58°C			
Resultados de la cuantificación 1	0,057%	1,09%	5,9%
Desviación relativa del verdadero	-28,8%	21,0%	18,0%
Resultados de la cuantificación 2	0,060%	0,90%	5,5%
Desviación relativa del verdadero	-25%	0,0%	10,0%
62°C			
Resultados de la cuantificación 1	0,071%	0,89%	5,2%
Desviación relativa del verdadero	-11,3%	-1,1%	4,0%

ES 2 483 121 T3

Resultados de la cuantificación 2	0,056%	0,93%	5,6%
Desviación relativa del verdadero	-30,0%	3,3%	12,0%

5 A fin de evaluar la influencia de las plataformas de PCR en tiempo real diferentes, se analizaron tres muestras (0,080%, 0,90% y 5,0% de ADN del suceso Bt11 en un antecedente de ADN de maíz no GM) a 250 ng de ADN genómico por reacción, cada una en un sistema de detección ABI PRISM 7700, 7500 fast (modo no rápido del experimento m) y Stratagene Mx 3005P. Los dos resultados de la cuantificación obtenidos para cada muestra se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la cuantificación usando diferentes plataformas

	Valor esperado (verdadero) (%Bt11)		
	0,080%	0,90%	5,0%
ABI 7500 fast			
Resultados de la cuantificación 1	0,077%	0,82%	5,7%
Desviación relativa del verdadero	-3,75%	-8,9%	14,0%
Resultados de la cuantificación 2	0,072%	0,85%	5,6%
Desviación relativa del verdadero	-10,0%	-5,6%	12,0%
ABI PRISM® 770			
Resultados de la cuantificación 1	0,082%	0,85%	5,9%
Desviación relativa del verdadero	2,5%	-5,5%	18,0%
Resultados de la cuantificación 2	0,058%	0,92%	4,8%
Desviación relativa del verdadero	-27,5%	2,2%	-4,0%
Stratagene Mx 3005P			
Resultados de la cuantificación 1	0,057%	1,09%	4,7%
Desviación relativa del verdadero	-28,8%	21,1%	-6,0%
Resultados de la cuantificación 2	0,083%	0,81%	4,0%
Desviación relativa del verdadero	3,8%	-10,0%	-20,0%

5 A fin de evaluar los resultados de ensayo en condiciones de reproducibilidad, se llevaron a cabo dos experimentos de cuantificación en dos laboratorios diferentes, Lab 1 y Lab 2. Se analizaron diferentes muestras que contienen una concentración de ADN de Bt11 de 0,08%-5,0% (cada una por triplicado) a 250 ng de ADN genómico por reacción en diferentes sistemas de detección de secuencias. La Tabla 11 muestra los dos resultados de la cuantificación obtenidos para cada concentración de ADN de Bt11 en cada laboratorio. Se calculó que la desviación estándar de la reproducibilidad (RDS_R) es aproximadamente 9,0% a la concentración de Bt11 de 0,08%.

Tabla 11. Resultados de la cuantificación en condiciones de reproducibilidad (entre laboratorios)

	0,080%	0,50%	0,90%	2,0%	5,0%
Lab 1 (ABI PRISM 7900 HT)					
Resultados de la cuantificación 1	0,068%	0,49%	0,96%	2,1%	4,6%
Desviación relativa del verdadero	-15,0%	-2,0%	67%	5,0%	-8,0%
Resultados de la cuantificación 2	0,080%	0,57%	0,88%	2,1%	4,7%
Desviación relativa del verdadero	0%	14,0%	-2,2%	5,0%	-6,0%
Lab 2 (ABI PRISM 7700)					
Resultados de la cuantificación 1	0,076%	0,49%	0,96%	2,0%	5,0%
Desviación relativa del verdadero	-5,0%	-2,0%	6,7%	0%	0%
Resultados de la cuantificación 2	0,065%	0,51%	1,14%	2,3%	5,9%
Desviación relativa del verdadero	-18,8%	2,0%	26,7%	15,0%	18,0%

10 El método de cuantificación descrito aquí se sometió al European Commission Joint Research Centre (JRC, Biotechnology and GMOs Unit del Institute for Health and Consumer Protection) como Community Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (CRL-GMFF). El JRC organizó un estudio colaborador internacional que implica 12 laboratorios. Cada laboratorio ensayó cinco concentraciones de Bt11 que incluyen 0,09%, 0,40%, 0,90%, 5,00% y 8,00%. Los resultados de este estudio de validación de múltiples laboratorios se publicaron en la publicación de CRL CRLVL10/07VR (2008), que está disponible en la web mundial en gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/. El método tuvo un coeficiente medio de linealidad (R^2) de 0,99, una RSD_r de 17% a la concentración de Bt11 de 0,09%, una RSD_R de 24% a la concentración de Bt11 de 0,09%, y el mayor valor de sesgo (exactitud) de -5% a la concentración de Bt11 de 5%.

Ejemplo 3. Evaluación del método anterior

20 Se han publicado otros ensayos de cuantificación del suceso Bt11 (Ronning et al. 2003. Eur. Food Res. Technol. 216:347-354 y European Commission JRC Community Reference Laboratory (CRL) publicado el 2004, localizado en la web mundial en gmo-crl.jrc.it/summaries/Bt11-protocol.pdf, que se basa en el método de Ronning et al.).

25 Para evaluar este método de cuantificación, se llevaron a cabo ensayos de PCR por un laboratorio independiente sobre mezclas de ADN de Bt11 y ADN no transgénico como se describe en la publicación de CRL citada anteriormente. Este ensayo usa cebadores y sondas diseñados para unirse a la región de inserto del genoma de 3'. Los resultados de múltiples experimentos sugieren que la eficiencia de la PCR de las reacciones de Bt11 usando este método es inadecuada. Las pendientes de las rectas de regresión estándar de Bt11 sugieren una falta de eficiencia de la PCR, como se compara con las rectas de regresión estándar de *adh1*. En 5 de 6 experimentos, la correlación de las reacciones estándar de Bt11 fue peor que para las reacciones estándar de *adh1* cuando las disoluciones de ADN usadas para series estándar de Bt11 y *adh1* fueron idénticas. Los resultados sugieren además que el método anterior

puede tener igualmente deficiencias en precisión, repetitividad y robustez.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG Hart, Hope

<120> Método mejorado para cuantificar ADN

5 <130> 72563P1

<160>8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211>21

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de Bt11 directo Bt11-ev-f1

<400> 1

15 tgtgtggcca ttatcatcg a 21

<210>2

<211>21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador de Bt11 inverso Bt11-ev-r5

<400> 2

cgctcagtg aacgaaaact c 21

<210>3

25 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda de Bt11 Bt11-ev-p1

<400> 3

ttccatgacc aaaatccctt aacgtgagt 29

<210>4

5 <211> 68

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicón de 5' de Bt11

10 <400> 4

tgtgtggcca tttatcatcg acttccatga ccaaaatccc ttaacgtgag ctttcgttcc 60

actgagcgc 68

<210>5

<211>21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo ZmAdh1-F

<400> 5

cgtcgittcc catctcttcc t 21

20 <210>6

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador inverso Zmadh1-R

<400> 6

ES 2 483 121 T3

ccactccgag accctcagtc 20

<210>7

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda ZmAdh1-P

<400> 7

aatcagggct catttctcg ctctca 27

10 <210>8

<211> 134

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Amplicón Adh1

<400> 8

cgtcgtttcc catctcttcc tcctttagag ctaccactat ataaatcagg gctcattttc 60

tcgctctca caggctcacc tcgctttgga tcgattggtt tcgtaagtgg tgagggactg 120

agggtctgga gtgg 134

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar ADN de suceso Bt11 en una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos de maíz, comprendiendo el método:
 - 5 (a) poner en contacto dicha muestra biológica con un primer par de cebadores, que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 1 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 2, y una sonda marcada con un colorante fluorescente que comprende SEC ID NO: 3, en el que dicho primer par de cebadores, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico procedente de maíz del suceso Bt11, produce un primer amplicón que comprende SEC ID NO: 4, y en el que dicho primer amplicón es de diagnóstico para el suceso Bt11;
 - 10 (b) poner en contacto dicha muestra biológica con un segundo par de cebadores, que comprende un primer cebador que consiste en SEC ID NO: 5 y un segundo cebador que consiste en SEC ID NO: 6, y una segunda sonda marcada con un colorante fluorescente que comprende SEC ID NO: 7, en el que dicho segundo par de cebadores, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de maíz, produce un segundo amplicón que comprende SEC ID NO: 8, y en el que dicho segundo amplicón es indicativo de la presencia del gen *adh1* de maíz;
 - 15 (c) proporcionar una condición de reacción de amplificación de ácidos nucleicos y un instrumento de PCR capaz de llevar a cabo una PCR en tiempo real cuantitativa;
 - (d) llevar a cabo la PCR en tiempo real cuantitativa usando los cebadores y sondas de (a) y (b), produciendo de ese modo el primer amplicón y el segundo amplicón;
 - 20 (e) detectar simultáneamente dicho primer amplicón y dicho segundo amplicón según se producen por dicho instrumento de PCR; y
 - (f) calcular una cantidad relativa de dicho primer amplicón en comparación con dicho segundo amplicón, con lo que la cantidad de dicho primer amplicón es indicativa de la cantidad de ADN de Bt11 en dicha muestra biológica.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método tiene un límite de cuantificación (LOQ) menor o igual a una concentración de ADN de Bt11 de 0,08%.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método tiene un límite de detección (LOD) menor o igual a una concentración de ADN de Bt11 de 0,04%.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método tiene un coeficiente medio de linealidad (R^2) de al menos 0,99.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método tiene una desviación estándar de reproducibilidad relativa (RSD_R) de 24% o menos a una concentración de ADN de Bt11 de 0,090%.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método tiene una desviación estándar de repetitividad relativa (RSD_r) de 17% o menos a una concentración de ADN de Bt11 de 0,090%.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método tiene un valor de exactitud de $\pm 5\%$ o menos a lo largo de todo el intervalo dinámico.
8. Un par de cebadores que comprende un primer par que consiste en SEC ID NO: 1 y un segundo par que consiste en SEC ID NO: 2, que funcionan juntos en presencia de un molde de ADN de suceso Bt11 de maíz en una muestra biológica para producir un amplicón diagnóstico para el suceso Bt11 de maíz.
- 40 9. Una sonda polinucleotídica que consiste en SEC ID NO: 3.