



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Detección de proteínas transgénicas en harinas de maíz comercializadas en Colombia**

**Lizeth Yazmin Tabima Cubillos**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá D.C., Colombia

2014



# **Detección de proteínas transgénicas en harinas de maíz comercializadas en Colombia**

**Lizeth Yazmin Tabima Cubillos**

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Microbiología**

Director:

Ph.D., Alejandro Chaparro Giraldo

Codirectora:

Ph.D., Martha Trujillo Güiza

Línea de Investigación:

Bioseguridad de cultivos transgénicos

Grupo de Investigación:

Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de biotecnología  
Bogotá D.C., Colombia

2014

## NOTA DE ACEPTACIÓN

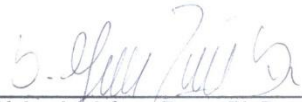
La presente tesis "Detección de proteínas transgénicas en harinas de maíz comercializadas en Colombia", fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 29 de abril de 2014.

En constancia firman:



---

**Orlando Acosta Losada Ph.D**  
Jurado  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia



---

**Alejandro López Pazos Ph.D**  
Jurado  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca



---

**Alejandro Chaparro Giraldo Ph.D**  
Director de Tesis  
Departamento de Biología  
Universidad Nacional de Colombia.

A MIS PADRES POR SU AMOR,  
PACIENCIA Y APOYO  
INCONDICIONAL.



## **Agradecimientos**

A Los integrantes de la Maestría en Ciencias -Microbiología por la formación recibida

A la Doctora Martha Trujillo, Investigadora de la Universidad Antonio Nariño por toda su colaboración, enseñanza, paciencia, dedicación y orientación en el desarrollo de este trabajo.

Al Doctor Alejandro Chaparro. Director del Grupo de investigación de Ingeniería genética de plantas de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración, enseñanza y orientación.

A Sebastián Sáenz por su ayuda y apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

A Socorro Prieto por su ayuda y amabilidad.

A mis compañeros del Grupo de Ingeniería genética de plantas Daniela Pórtela, Diana Gómez, Iván Barbosa y Jenny Jiménez por su ayuda y amabilidad.

A mis amigas Laura García, Melissa Rincón y Tatiana Rodríguez por su apoyo incondicional.





## Resumen

El maíz es el cultivo de mayor importancia agrícola en el mundo y en Colombia ocupa 478 992 hectáreas las cuales no suplen la demanda y se requiere de la importación que proviene de los tres países líderes en adopción de CGM. De este grano se fabrican varios productos de consumo humano como la harina de maíz, la cual se deriva directamente del grano y posiblemente pueda contener trazas de OGM. En Colombia las etiquetas de las harinas de maíz no contienen información sobre el origen del grano, ya que existe una resolución de etiquetado en la cual se estipula que todo envase o empaque de alimento derivado de OGM para consumo humano deberá ser etiquetado cuando se encuentre en las siguientes condiciones: 1) Los valores en la composición nutricional difieren de su homólogo, 2) Cambia la forma de preparación, cocción o almacenamiento del alimento frente al alimento sin el evento insertado, 3) Expresión de un alérgeno que los consumidores no esperan y 4) Existe diferencia en las propiedades organolépticas del alimento derivado de un OGM. Además el país no cuenta con un protocolo para la detección a nivel de proteína de este tipo de organismos ya que se realiza identificando la molécula de DNA. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de detección de proteínas transgénicas en harinas de maíz de consumo humano comercializadas en el país. Por tal razón se evaluaron 11 protocolos de extracción de proteína total en 17 harinas precocidas, dos no cocidas y tres controles positivos, posteriormente se realizó la detección de 7 proteínas transgénicas utilizando kits de ELISA comerciales. Se determinó que el mejor protocolo de extracción de proteína total fue el buffer con Tritón X-100 que permitió la obtención de concentraciones de proteína mayores a 0.5 mg/g y que no generó interferencia con la técnica de ELISA. Se detectaron cuatro proteínas transgénicas: Cry1F, Cry1Ab, Cry34Ab1 y CP4EPSPS en harinas precocidas y sin precocción con porcentajes que varían entre el 20 y 100 %.

**Palabras clave:** Maíz, ingeniería genética, proteínas, ELISA.

## Abstract

Maize is the most important agricultural crop in the world and in Colombia occupies 478 992 hectares which do not supply the consumption and requires imports coming from the three leading countries in adoption of CGM. Several products are made from maize grain for human consumption such as maize flour, which is directly derived from grain and may possibly contain traces of GMOs. In Colombia the labels of maize flours do not contain information about the origin of the grain, since there is a labeling resolution which states that any packaging or packaging of food derived from GMOs for human consumption should be labeled when in the following conditions: 1) the values in the nutritional composition different from its counterpart , 2 ) Change the way of preparation, cooking or storage of food versus food without the inserted event , 3) expression of an allergen that consumers would not expect and 4) There is difference in the organoleptic properties of the food derived from a GMO . Also, the country does not have a protocol for the detection of protein level since is done by identifying the DNA molecule. The aim of this study was to establish a protocol for detecting proteins in transgenic in maize flour for human consumption, marketed in the country. For that reason 11 extraction protocols of total protein were evaluated in 17 precooked flour, two uncooked and three positive controls. Subsequently 7 transgenic proteins were detected using commercial ELISA kits. It was determined that the best protocol for extraction of total protein was buffer with Triton X - 100 which allowed obtaining protein concentrations greater than 0.5 mg / g and does not generate interference with the ELISA technique . Four transgenic proteins were detected: Cry1F, Cry1Ab, CP4EPSPS Cry34Ab1 in precooked and without precooking flour with percentages between 20 to 100%.

**Keywords:** Maize, genetic engineering, proteins, ELISA.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XV
Introducción .....	1
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Organismo genéticamente modificado.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Alimentos genéticamente modificados.....	5
1.1.2 ¿Cómo se genera un organismo genéticamente modificado?.....	5
1.1.3 Genes utilizados para la modificación de plantas.....	6
1.1.4 Beneficios y posibles riesgos de los cultivos genéticamente modificados .....	8
1.1.5 Técnicas para la detección de organismos genéticamente modificados .....	10
<b>1.2 Harina de maíz.....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Tipos de harina de maíz .....	14
<b>1.3 Legislación Colombiana .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo general .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>17</b>
3.1 Muestras .....	17
3.2 Extracción de proteínas.....	17
3.3 Cuantificación de proteína total .....	19
3.4 Detección de proteínas OGM.....	19
3.5 Análisis estadístico .....	21
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>23</b>
4.1 Harinas de maíz comercializadas en Colombia.....	23
4.2 Lista de eventos de maíz GM liberados comercialmente en Colombia.....	25
4.3 Determinación del protocolo de extracción de proteína total.....	27
4.4 Detección de proteína transgénica .....	32
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>39</b>
5.1 Conclusiones.....	39

<b>5.2</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>40</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo: Tablas de la cantidad de proteína transgénica expresada en porcentaje en relación al control positivo de la técnica. ....</b>	<b>41</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Comparación de medias mediante la prueba de Tukey. ....</b>	<b>47</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Manuales para la detección de proteínas transgénicas .....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>73</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1 :</b> Concentración de proteína total obtenida con los diferentes métodos de extracción en las harinas B8, A5 y O4.....	30
<b>Figura 2:</b> Comparación de métodos de extracción de proteína total en harinas de maíz. (Tukey 95%).....	31

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Genes utilizados para la modificación de plantas .....	6
<b>Tabla 2.</b> Kits de Elisa que se utilizaron en la detección de proteínas transgénicas .....	20
<b>Tabla 3.</b> Harinas de maíz que se comercializaron en Bogotá D.C. Colombia en el año 2013 .....	24
<b>Tabla 4.</b> Eventos de Maíz GM autorizados en Colombia para uso en consumo humano .....	25
<b>Tabla 5.</b> Concentración de proteína total obtenida con los diferentes métodos de extracción en las harinas B8, A5 y O4 .....	28
<b>Tabla 6.</b> Comparación de medias de los diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey ..	29
<b>Tabla 7.</b> Proteína Total soluble de las diferentes harinas evaluadas .....	35
<b>Tabla 8.</b> Harinas de maíz detectado como positivas y cantidad del evento de transformación expresada como porcentaje .....	36
<b>Tabla 9.</b> Eventos de maíz GM identificados en las harinas de maíz comercializadas en Colombia. ....	38
<b>Tabla 10.</b> Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 1F.....	41
<b>Tabla 11.</b> Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 3bB1 - 1AB .....	42
<b>Tabla 12.</b> Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 2A.....	43
<b>Tabla 13.</b> Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación CP4-EPSPS .....	44
<b>Tabla 14.</b> Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 1AB-1A... ..	44
<b>Tabla 15.</b> Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 3Bb1. ....	45

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
CGM	Cultivo Genéticamente Modificado
GM	Genéticamente Modificado
MSPS	Ministerio de Salud y Protección Social





## Introducción

El maíz (*Zea mays*) es el cultivo de mayor importancia agrícola en el mundo, puesto que su producción entre los años 2009-2010 fue de 795 935 000 toneladas, superando las de trigo y arroz (1). En Colombia, el cultivo de maíz ocupa aproximadamente 478 992 hectáreas, que generan una producción de 1 683 858 toneladas al año (2). En cuanto al maíz genéticamente modificado (GM), en el mundo se sembraron 51 000 000 de hectáreas en el 2013, mientras que en Colombia el cultivo de maíz GM corresponde a 75 046 hectáreas entre maíz amarillo y blanco (3,4).

El maíz amarillo se utiliza en mayor proporción para consumo animal e industrial y una pequeña parte para consumo humano, mientras que el maíz blanco se emplea principalmente para este último (1). Según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en Colombia, el consumo del cereal supera las cinco millones de toneladas por lo que se requiere que sea importado. Para el año 2013, se importaron 3 495 886 toneladas, que provenían de Estados Unidos, Brasil y Argentina (2), correspondientes a maíz amarillo, el 96 % y a maíz blanco el 4 %. Este maíz importado puede contener semillas genéticamente modificadas. En Colombia está autorizado maíz GM con características tales como resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas (3).

Existe una gran cantidad de productos derivados total o parcialmente del maíz entre ellos están las arepas, cereales de desayuno, pastas, jarabes, endulzantes, galletas y harinas entre otros (1). La harina es uno de los productos derivados del maíz de mayor consumo, ya que se utiliza como ingrediente principal en diferentes preparaciones. Se obtiene de la molienda del grano por diferentes métodos, y el tamaño final del grano determina el tipo de harina. Este producto se utiliza principalmente para la preparación de arepas, sopas y coladas (1). La harina al ser derivada directamente del grano de maíz puede contener algunas trazas de proteínas introducidas por tecnología GM. Algunos autores han sugerido que la presencia de trazas puede causar algún impacto en la salud humana (5–7) . Los alimentos GM existentes en el mercado internacional han sido sometidos a la

evaluación de riesgo y desde que fue liberado el primer evento genéticamente modificado para consumo humano no ha sido reportado ningún caso de efectos adversos sobre la salud humana en el mundo. Desde otra perspectiva este tipo de cultivos pueden incrementar los niveles de producción, reducir el uso de insecticidas y mejorar la calidad nutricional de alimentos generando productos más nutritivos (8).

En Colombia la Ley 740 de 2002 ratifica el protocolo de Cartagena en Bioseguridad. En este protocolo se plantea como objetivo el garantizar la protección en la utilización de organismos vivos modificados (OVM), que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, como también riesgos para la salud humana.

El Laboratorio Central Interinstitucional de Detección y Monitoreo de OGM, resultado de una interacción entre el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) y el Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), es en Colombia, el sitio en el que se determina la ausencia o presencia de eventos GM en granos. En este laboratorio se utiliza la identificación de DNA de los eventos GM a través de la amplificación de secuencias específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, la detección de un OGM debe incluir además de la determinación del DNA insertado, la presencia de la proteína expresada (9).

En Colombia el etiquetado de OGM en alimentos está restringido al cumplimiento de ciertas condiciones, por tal razón las etiquetas de las harinas de maíz comercializadas en el país, no presentan información sobre la presencia de OGM. La resolución 4254 de 2011 del Ministerio de Salud y Protección Social, indica que solo deberá etiquetarse cuando: a) no haya equivalencia sustancial entre la planta con el evento y la que no lo tiene; b) cambie la forma de preparación o cocción del alimento frente al alimento sin el evento insertado; c) se exprese un alérgeno que los consumidores no esperan o, d) se presente diferencia en las propiedades organolépticas del alimento derivado de un OGM.

Teniendo en cuenta que no existe en el país información sobre la ausencia o presencia de proteínas derivadas de cultivos GM, se propuso en este trabajo llevar a cabo la detección de proteínas transgénicas en harinas de maíz de consumo humano comercializadas en Colombia, y establecer un protocolo para la determinación de proteína en estos eventos GM. Este trabajo puede ser un complemento a la técnica que

actualmente utiliza el laboratorio Central Interinstitucional de Detección y Monitoreo de OGM.



# **1.Marco teórico**

## **1.1 Organismo genéticamente modificado**

Es un organismo cuyo material genético ha sido modificado mediante la inserción de uno o varios genes, utilizando la tecnología de DNA recombinante. Este concepto incluye también aquellos productos o derivados que los contengan y que posean la capacidad de transmitir información genética (10).

### **1.1.1 Alimentos genéticamente modificados**

Aquellos alimentos GM que se consumen directamente sin que en ellos se lleve a cabo ninguna clase de procedimiento, o aquellos que tienen un procesamiento anterior a su comercialización (11).

Los alimentos que tienen entre sus ingredientes o materias primas un componente derivado a partir de OGM, es decir, algún ingrediente utilizados en la fabricación de un producto alimenticio y que se encuentran presentes en el producto acabado, eventualmente en una forma modificada y que fue obtenido de un OGM. Por ejemplo la salsa de soya GM (11).

### **1.1.2 ¿Cómo se genera un organismo genéticamente modificado?**

La transformación genética de plantas implica varios pasos: identificación del gen a utilizar, selección del vector, clonación del gen, inserción del vector y expresión en la planta. Se requiere del diseño de un constructo, con tres elementos: 1) el promotor, que determinará cuando y donde se activara la modificación genética 2) el transgen, que codifica una proteína específica y 3) la secuencia terminadora, que sirve como señal de parada para la transcripción (12,13) .

Posteriormente, se debe seleccionar el método de inserción que puede ser por transferencia directa mediante bombardeo con micro proyectiles, fusión de liposomas o micro inyección. El bombardeo con micro proyectiles, consiste en revestir con el constructo los micro portadores de tungsteno que se insertaran a gran velocidad en la célula objetivo y se expresará de forma transitoria o se integrara al DNA genómico del hospedero. También existe otro método a través de vectores biológicos basado en los plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens* que al ser insertados en plantas causan la formación de tumores en los que se lleva a cabo de forma natural la transferencia del DNA a las células vegetales (12).

### 1.1.3 Genes utilizados para la modificación de plantas

En la siguiente tabla se presentan los genes empleados en cultivos GM usados en alimentación humana, con su función y origen (13).

**Tabla 1.** Genes utilizados para la modificación de plantas.

GEN	FUNCIÓN	ORIGEN
CP4-EPSPS	Tolerancia al glifosato	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Cry34AB1	Resistencia a coleópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PS149B1
Cry35AB1	Resistencia a coleópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PS149B1
Cry3A	Resistencia a coleópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>
Cry3Bb1	Resistencia a coleópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>
mCry3A	Resistencia a coleópteros	Forma sintética de la proteína Cry 13A
BAR	Tolerancia al herbicida glufosinato	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
PAT	Tolerancia al herbicida glufosinato	<i>Streptomyces viridochromogene</i> strain
Gat4601	Tolerancia al glifosato	<i>Bacillus licheniformis</i>
Gat 4621	Tolerancia al glifosato	<i>Bacillus licheniformis</i>
Goxv 247	Tolerancia al glifosato	<i>Ochrobactrum anthropi</i> strain LBAA
mepsps	Tolerancia al glifosato	<i>Zea mays</i>
Cry1A	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1AB	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
CryAB-AC	Resistencia a lepidópteros	Fusión sintética del gen derivado de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1AC	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> strain HD73
Cry1C	Resistencia a lepidópteros	Forma sintética del gen de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1F	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>
Cry1Fa2	Resistencia a lepidópteros	Forma sintética de Cry 1F
Cry2Ab2	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>
Cry 2Ae	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i>
Cry 9C	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>
moCry 1F	Resistencia a lepidópteros	Forma sintética de Cry 1F <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>
Pin II	Mejora la defensa contra los depredadores de insectos, reduciendo la digestibilidad y calidad nutricional de	<i>Solanum tuberosum</i>

	las hojas	
<b>Vip3A</b>	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88
<b>Vip3Aa20</b>	Resistencia a lepidópteros	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88
<b>aad-1</b>	Desintoxica el herbicida 2,4-D	Forma sintética de aad-1 de <i>Sphingobium herbicidovorans</i>
<b>aad-12</b>	Cataliza la degradación de la cadena lateral del herbicida 2,4-D	<i>Delftia acidovorans</i>
<b>7crp</b>	Tolerancia inmunológica a los alérgenos del polen del cedro	Forma sintética de la proteína tolerogénica de <i>Cryptomeria japonica</i>
<b>aad</b>	Permite la selección para la resistencia de antibióticos aminoglucósidos.	<i>Escherichia coli</i>
<b>aph4 (hpt)</b>	Permite la selección para la resistencia higromicina B	<i>Escherichia coli</i>
<b>bla</b>	Desintoxica los antibióticos betalactámicos	<i>Escherichia coli</i>
<b>nptII</b>	Permite metabolizar neomicina y kanamicina	<i>Escherichia coli</i> Tn5
<b>spc</b>	Confiere resistencia a estreptomina	<i>Escherichia coli</i>
<b>pq</b>	Suprime la transcripción del gen de la poligalacturonasa	<i>Solanum lycopersicum</i>
<b>acc</b>	Suprime la expresión normal del gen de la ACC sintasa nativa	<i>Solanum lycopersicum</i>
<b>accd</b>	Metaboliza el precursor de la hormona de la maduración del fruto de etileno, lo que resulta en la maduración del fruto retardada	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
<b>anti-efe</b>	Causa retraso de la maduración mediante la supresión de la producción de etileno	<i>Solanum lycopersicum</i>
<b>sam-k</b>	Causa demora en la maduración mediante la reducción de la S-adenosilmetionina	<i>Escherichia coli</i> bacteriophage T3
<b>dmo</b>	Tolerancia al herbicida dicamba (ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b>cspB</b>	Mantiene las funciones celulares normales bajo condiciones de estrés hídrico	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>EcBetA</b>	Cataliza la producción del compuesto osmoprotector glicina betaína	<i>Escherichia coli</i>
<b>RmBetA</b>	Cataliza la producción del compuesto osmoprotector glicina betaína	<i>Rhizobium meliloti</i>
<b>barstar</b>	Restaura la fertilidad	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<b>ms45</b>	Restaura la fertilidad	<i>Zea mays</i>
<b>2mepsps</b>	Tolerancia al glifosato	<i>Zea mays</i>
<b>hppdPF W336</b>	Confiere tolerancia a los herbicidas inhibidores de HPPD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<b>barnase</b>	Causa esterilidad masculina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<b>dam</b>	Causa esterilidad masculina	<i>Escherichia coli</i>
<b>zm-aa1</b>	Polen estéril	<i>Zea mays</i>
<b>pmi</b>	Metabolismo de la manosa	<i>Escherichia coli</i>
<b>amy797E</b>	Aumenta la producción de bioetanol	<i>Thermococcales</i> spp.
<b>cordapA</b>	Aumenta la producción de lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<b>fad2-1A</b>	Suprime la transcripción del gen de la delta-12 desaturasa endógena	<i>Glycine max</i>
<b>fatb1-A</b>	Suprime la transcripción de la endógena fatb1	<i>Glycine max</i>
<b>gm-fad2-1</b>	Silenciamiento del gen delta-12 desaturasa endógena	<i>Glycine max</i>
<b>Nc.Fad3</b>	Desaturar ciertos ácidos grasos endógenos	<i>Neurospora crassa</i>
<b>Pj.D6D</b>	Desaturar ciertos ácidos grasos	<i>Primula juliae</i>

	endógenos	
<b>te</b>	Aumenta el nivel de triacilglicéridos	<i>Umbellularia californica</i>
<b>gbss</b>	Suprime la síntesis de amilosa	<i>Solanum tuberosum</i>
<b>API</b>	Confiere resistencia a una amplia gama de plagas de insectos	<i>Sagittaria saggitifolia</i>
<b>CpTI</b>	Confiere resistencia a una amplia gama de plagas de insectos	<i>Vigna unguiculata</i>
<b>ecry3.1Ab</b>	Confiere resistencia a una amplia gama de plagas de insectos	Forma sintética de la proteína Cry 3A y Cry 1AB
<b>bxn</b>	Elimina la actividad de los herbicidas oxinilo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Ozaenae</i>
<b>phyA</b>	Aumenta la descomposición de fitatos	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>van tieghen</i>
<b>phyA2</b>	degrada fósforo fítico	<i>Aspergillus niger</i>
<b>als</b>	Permite la síntesis de los aminoácidos esenciales en la presencia de herbicidas de sulfonilurea	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>csr1-2</b>	Confiere tolerancia a los herbicidas de imidazolinona	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>gm-hra</b>	Confiere tolerancia a las aplicaciones de la sulfonilurea	<i>Glycine max</i>
<b>S4-HrA</b>	Permite la síntesis de los aminoácidos esenciales en la presencia de herbicidas de sulfonilurea	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xhanti</i>
<b>surB</b>	Confiere tolerancia a las aplicaciones de la sulfonilurea	<i>Nicotiana tabacum</i>
<b>zm-hra</b>	Confiere tolerancia a herbicidas de acetolactato sintasa	<i>Zea mays</i>
<b>Ac1</b>	Inhibe la síntesis de la proteína de replicación viral del virus del mosaico dorado	Virus del Mosaico dorado
<b>cmv_cp</b>	Resistencia al virus del mosaico del pepino	Virus del mosaico del pepino
<b>plrv_orf1</b>	Resistencia al virus del enrollamiento de la papa	Virus del enrollamiento de la papa
<b>ppv_cp</b>	Resistencia al virus de la sharka (PPV)	Virus de la sharka (PPV)
<b>prsv_cp</b>	Resistencia al virus de la mancha anular del papayo (PRSV)	Virus de la mancha anular del papayo (PRSV)
<b>pvy_cp</b>	Resistencia a el virus de la papa Y (PVY)	Virus de la papa Y (PVY)
<b>wmv_cp</b>	Resistencia a potyvirus del mosaico de la sandía 2 (WMV2)	Potyvirus del mosaico de la sandía 2
<b>zymv_cp</b>	Resistencia a potyvirus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV)	Potyvirus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV)

### 1.1.4 Beneficios y posibles riesgos de los cultivos genéticamente modificados

Los cultivos genéticamente modificados (CGM) con mayor superficie sembrada son la soya con 75 400 00 millones de hectáreas, que representan el 47 % de la superficie agrobiotecnológica mundial, seguido del maíz con 51 000 000 hectáreas, que equivalen al 32 %; el algodón con 2 470 000 hectáreas (15 %) y la canola con 8 200 000 de hectáreas, equivalentes al 5 % (4). Con respecto al evento de transformación más



utilizado, el primero es la tolerancia a herbicidas, que ocupa el 59 % de la superficie mundial, le siguen aquellos eventos que presentan dos o más eventos de transformación en una misma semilla (26 %) y por último las variedades con resistencia a insectos con un 15 % (4).

El desarrollo de los CGM ha permitido la reducción en el uso de insecticidas y herbicidas. A nivel mundial la utilización de plaguicidas ha disminuido desde 1996 hasta el 2012 en 503 000 000 kg de ingrediente activo, lo que equivale a una reducción en la utilización de plaguicidas del 8.87 % (14). En Colombia estos estudios se han realizado evaluando los efectos en el medio ambiente de los cultivos de algodón y maíz convencional y GM, encontrando que el uso de maíz GM permite la reducción del 10 % en el uso de herbicidas e insecticidas (15).

Con respecto al medio ambiente, el impacto asociado al uso de insecticidas y herbicidas disminuyó en un 18.7 % desde 1996 hasta el 2012 en el mundo. Otro aporte ha sido la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero asociadas al cultivo, esto como consecuencia de la reducción en el uso de carros, equivalente a 11.88 millones de carros menos (14). Además los CGM han contribuido en la resistencia a plagas y reducción de pérdidas en términos económicos (14,16).

Los posibles riesgos que pueden ocasionar los CGM hacen referencia a los efectos negativos en especies no blanco, ya que se ha sugerido que pueden producir efectos tóxicos sobre organismos que no son plaga, y son benéficos para los diferentes cultivos (6).

También se ha sugerido que los CGM podrían aumentar las propiedades invasivas de algunas malezas agrícolas generando un problema más para el agricultor, además de la posible resistencia desarrollada por los insectos a la proteína insecticida que se encuentra en la plantas GM. Por último se encuentra el riesgo de la pérdida de biodiversidad, que hace referencia al flujo de genes entre especies (6), aunque en realidad no se ha demostrado que la pérdida sea mayor a la que se ha dado con la selección natural de cultivos que ha hecho el hombre según sus necesidades desde hace muchos años (6).

A pesar que en los últimos años la adopción de CGM se ha incrementado, las preocupaciones acerca del impacto sobre la salud humana han persistido. Existe una gran controversia sobre los riesgos y beneficios que pueda ocasionar el consumo de

alimentos derivados de CGM. Esto en cuanto a los riesgos de la introducción de proteínas con efectos adversos que puedan generar alergias y toxicidad para el organismo, o la transferencia horizontal de genes (5,6). Los alimentos GM existentes en el mercado internacional han sido sometidos a la evaluación de riesgo y desde que fue liberado el primer evento genéticamente modificado para consumo humano no ha sido reportado ningún caso de efectos adversos sobre la salud humana en el mundo. Desde otra perspectiva este tipo de cultivos pueden mejorar la calidad nutricional de alimentos, generando productos más nutritivos (8).

### **1.1.5 Técnicas para la detección de organismos genéticamente modificados**

La presencia de OGM se detecta utilizando la trazabilidad, que se define como la capacidad de hacer seguimiento a las trazas de OGM en un alimento GM o en los productos alimenticios elaborados a partir de estos o que los contengan. Por lo que se debe determinar un método o técnica de detección que depende del ente regulador de cada país (10).

La selección de una técnica se determina por su especificidad, exactitud, precisión, reproducibilidad y sensibilidad, pero también por su costo y rapidez en la obtención de resultados. Para los OGM a nivel mundial se utiliza la detección de DNA, ácido ribonucleico (RNA) y proteínas, que específicamente reconoce tanto los genes insertados, como sus transcritos y secuencias de aminoácidos traducidos (17). Sin embargo, la detección de OGM se ha centrado en la detección de moléculas de DNA y en menor cantidad se han desarrollado técnicas para la detección de proteínas y RNA en el contexto de los alimentos GM (17). Entre las técnicas utilizadas se encuentra PCR, inmunoensayos, espectrometría de masas, cromatografía y chip de DNA (microarrays), entre otras. Sin embargo, hasta ahora los inmunoensayos y la técnica de PCR son los métodos aceptados para llevar como base para la regulación de estos productos (12).

En el procedimiento de detección de OGMs se debe tener en cuenta los siguientes pasos (12):

1. Detección: consiste en determinar si un alimento o producto es derivado de OGM o no. El resultado obtenido es de presencia o ausencia, es decir positivo o negativo.

2. Verificación: el propósito es identificar si los eventos de transformación genética presentes en la muestra están autorizados o no en el país.
3. Cuantificación: determinación de la cantidad de transcrito o proteína expresada.

#### **1.1.5.1 Detección de ácido desoxirribonucleico (DNA)**

Los métodos de detección de DNA se basan en el principio de complementariedad de hebras de la doble hélice que se hibridan de una forma específica. La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se basa en la especificidad de la DNA polimerasa para permitir la amplificación de segmentos determinados de nucleótidos (16). El primer paso en la técnica de PCR es la separación de las dos hebras del DNA original, posteriormente se da la unión de los cebadores a los oligonucleótidos y el tercer paso, es la amplificación y la obtención de copias.

Debido a los diferentes procesos a los que son sometidos los alimentos como cocción, horneado, secado, esterilización y congelación entre otros, la cantidad y la calidad de DNA que se extrae es baja, la detección de esta molécula mediante PCR se ve afectada, ya que la detección es dependiente de las concentraciones efectivas de las secuencias de DNA amplificable (18).

#### **1.1.5.2 Detección de proteínas**

Para el estudio de la función, interacción y modificación de proteínas en un organismo, la proteómica es la técnica de elección. Sin embargo, existen varias técnicas que permiten analizar desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo el contenido proteico de las muestras biológicas, entre ellas la espectrofotometría, western blot, inmunoelectroforesis, inmunotinción e inmunoprecipitación (12,19,20).

Las determinaciones que se realizan más frecuentemente para estudiar la composición de los alimentos, incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos asimilables, en un protocolo conocido como “análisis proximal” (21). El método clásico más usado para la determinación de proteína total es el método Kjeldahl. Mediante esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos y se determinan los niveles de nitrógeno orgánico (21).

Dependiendo del objetivo del análisis, se llevan a cabo determinaciones relacionadas con la caracterización de algún grupo de nutrientes en particular, como es el caso del análisis

de las proteínas solubles, o en este estudio, la determinación de los niveles de proteína total y además de forma más específica los niveles de proteínas derivadas de OGM en harinas de maíz.

Para la determinación de proteínas derivadas de CGM se utilizan principalmente técnicas basadas en inmunoensayos, que se fundamentan en la reacción primaria de unión entre el anticuerpo y su antígeno . Para los OGM, la proteína codificada por el gen introducido actúa como antígeno (20). Algunos factores que determinan el éxito de un inmunoensayo, son la disponibilidad de anticuerpos dirigidos a la proteína que va hacer detectada, la expresión activa del gen y las características de la proteína objeto de estudio, como tamaño, hidrofobicidad y estructura terciaria. Una de las principales ventajas de emplear inmunoensayos es la alta especificidad, lo que permite el reconocimiento de una sustancia antigénica aun cuando haya presencia de sustancias contaminantes (19,22).

La técnica “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) es el inmunoensayo más utilizado para la detección de OGM. Es un ensayo tipo “sándwich” que se fundamenta en la reacción entre el analito que se intercala entre el anticuerpo o antígeno de fase sólida y el anticuerpo o antígeno marcado con una enzima, compuestos que al reaccionar generan un color que se puede medir fotométricamente (19). Una variación de la técnica ELISA es el desarrollo de tiras de flujo lateral, esta tira tiene inmovilizado anticuerpos específicos para la proteína a identificar, están acoplados a un reactivo cromógeno y se incorporan en una tira de nitrocelulosa, que cuando entra en contacto con un extracto que contiene la proteína transgénica genera una banda de color (19). Esta tiras se han desarrollado para ensayos en campo y permiten detectar la presencia de endotoxinas Cry expresadas por *Bacillus thuringiensis* como también la presencia de la proteína CP4EPSPS (19). Las tiras son cualitativas y presentan una baja sensibilidad. Por el contrario la técnica de ELISA puede ser cuantitativa o cualitativa, es altamente sensible, proporciona un alto rendimiento y es ideal para el análisis en laboratorios de alto volumen, ya que la proteína no se desnaturaliza (20).

Otra técnica que permite detectar y analizar proteínas es el Western blot, método altamente específico, con el que se determina si una muestra contiene la proteína de

interés. Sin embargo esta técnica es más dispendiosa, y no es práctica para los análisis de rutina que requieren rapidez (19).

## 1.2 Harina de maíz

El maíz es un cultivo tradicional de los pueblos originarios de América, fue introducido en Europa por los españoles y portugueses y en ambos países el pan de maíz sigue siendo muy popular, especialmente en Portugal. Además del uso de los granos tiernos de maíz, o utilizar la mazorca como hortaliza fresca, se pueden consumir los granos sometidos a molienda, con el fin de obtener su harina. La harina de maíz es un polvo fino que se obtiene de la molienda del grano de maíz blanco (refinada) o amarillo (integral), a través de diferentes métodos que generan varios grados de refinado (23)

El maíz no contiene gluten, lo que constituye una ventaja frente a otras harinas para personas con enfermedad celíaca o intolerancia al gluten. Se utiliza en la preparación de pan, mezclada con harina de otros cereales aportando textura y azúcares, lo que incrementa su sabor.

El grano de maíz está compuesto por pericarpio (capa exterior), endospermo y germen. Los niveles de proteína del maíz representan aproximadamente un 10 %, entre las materias nitrogenadas del maíz se encuentra la zeína (principal proteína del endospermo), la edestina y la maisina (24).

La harina de maíz es un ingrediente esencial en la elaboración de diversos platos de la gastronomía mundial. En Latinoamérica es ingrediente base en la preparación de platos tradicionales como las arepas y empanadas en Colombia y Venezuela, tamales en centro y Suramérica, tortillas en toda América, pero principalmente en el norte de Centroamérica, y otras preparaciones, como hallacas en Venezuela, nacatamal en Nicaragua, pupusas en El Salvador, bolitas y palitos de queso, en Colombia y Venezuela. Caso especial lo representa la polenta (sémola del maíz), una elaboración a base de la harina de maíz, generalmente de la harina de maíz gruesa. Es un plato tradicional italiano que se ha extendido por distintos países del mundo como Suiza, Austria, Cuba, Hungría, Venezuela, Argentina, Brasil, Perú, México, Rumanía y Japón (24).

### 1.2.1 Tipos de harina de maíz

- Harina precocida: producto obtenido del endospermo de maíz (*Zea mays*), para consumo humano, que han sido sometido a un proceso de limpieza, desgerminación, precocción y molienda (molturación) (23).
- Harina cruda: obtenida a partir de maíz seleccionado, libre de materia extraña y sometida a un proceso de sanitización para disminuir la carga microbiana del producto original.
- Fécula de maíz: producto obtenido por molienda húmeda del grano de maíz y que corresponde principalmente a un polímero constituido de grupos anhídrido de  $\alpha$  D-glucosa (25). Esta se obtiene cuando se separa el germen del maíz y se obtiene una harina con menor tendencia a volverse rancia, también se denomina maicena o almidón de maíz por su alto contenido de este carbohidrato (25)

## 1.3 Legislación Colombiana

En Colombia se estableció la Ley 740 del 2002, mediante la que se ratifica el “Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología” del Convenio sobre la Diversidad Biológica, que garantiza la protección en la esfera de la transferencia, manipulación y la utilización segura de los organismos vivos modificados, resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos. En esta ley se establece la evaluación de riesgo de OGM que hace referencia a la determinación y evaluación de los posibles efectos adversos de los OGM en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, en el probable medio receptor, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana (26).

Mediante el Decreto 4525 del 2005 se reglamenta la Ley 740 de 2002 y se establece que las Autoridades competentes en materia de OGM, son el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y el Ministerio de Salud y Protección Social, y también se determinan los Comités Técnicos Nacionales de Bioseguridad (10). Para el etiquetado de alimentos derivados de OGM se instauró la Resolución 4254 de 2011 donde se establece que todo envase o empaque de alimento

derivado de OGM para consumo humano que no sean sustancialmente equivalentes con su homólogo convencional y cuando se encuentre en las siguientes condiciones: 1) Los valores en la composición nutricional difieren de su homólogo, 2) Cambia la forma de preparación, cocción o almacenamiento del alimento frente al alimento sin el evento insertado, 3) Expresión de un alérgeno que los consumidores no esperan y 4) Existe diferencia en las propiedades organolépticas del alimento derivado de un OGM de OGM para consumo humano (11).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Detectar la presencia o ausencia de proteínas transgénicas derivadas de cultivos GM en harina de maíz comercializadas en Colombia.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar los tipos de harinas de maíz que se comercializan en Colombia.
- Determinar un protocolo de extracción de proteína total en harinas de maíz.
- Identificar las harinas de maíz comerciales que contienen proteínas transgénicas derivadas de maíz GM en Colombia.



## **3. Materiales y métodos**

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D.C., y fue cofinanciado como parte de un proyecto de investigación, aprobado por la Vicerrectoría de Investigación, Ciencia y Tecnología e Innovación (VCTI) de la Universidad Antonio Nariño en mayo de 2012.

### **3.1 Muestras**

Se realizó un muestreo de las diferentes harinas de maíz que se comercializaron en almacenes de cadena de Bogotá, D.C. en el año 2013 para consumo humano. Posteriormente se hizo una selección teniendo en cuenta el tipo de grano, el grado de procesamiento y su composición. Se evaluaron aquellas harinas que en su contenido solo presentaron maíz o algunas trazas de avena, trigo o soya, descartando las que contenían mezclas de otro tipo de harina. Las harinas evaluadas fueron harina cruda de grano partido (cuchuco de maíz) y harina precocida extrafina. El muestreo se realizó por triplicado verificando que las harinas no pertenecieran al mismo lote de producción.

### **3.2 Extracción de proteínas**

Se compararon diferentes protocolos de extracción de proteína total con el fin de seleccionar el método de extracción más adecuado, es decir que se obtuviera una gran cantidad de proteína y no se generara interferencia con la prueba inmunológica para la detección de OGM. Para esto se seleccionaron tres harinas de maíz, una harina blanca, una harina amarilla y una mezcla de harina amarilla y blanca (B8, A5 y O2).

**3.2.1 Extracción con buffer carbonato:** Se mezclaron 200 mg de harina y 1.5 mL de buffer carbonato 50 mM con 0.15 M de NaCl pH 9.6. Se homogenizó y

posteriormente se dejó en agitación constante durante 60 minutos a 1000 rpm. Los extractos se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos, los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C (27).

**3.2.2 Extracción con sonicación y buffer PBS:** Se pesaron 200 mg de harina y se mezclaron con buffer fosfato de sodio (PBS) y 0.5 % de Tween (pH 7.4). La suspensión se agitó durante 60 minutos y posteriormente se le aplicó sonicación durante 20 y 30 minutos (28). Los extractos se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

**3.2.3 Extracción con sonicación y buffer Carbonato:** Se mezcló 200 mg de harina y 1.5mL de buffer carbonato 50 Mm con 0.15 M de NaCl se agitó durante 60 minutos y posteriormente se le aplicó sonicación durante 20 y 30 minutos. Los extractos se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

**3.2.4 Extracción con sonicación y NaCl 1 M:** Se pesaron 200 mg de harina y se mezclaron con solución de NaCl 1 M La suspensión se agitó durante 60 minutos y posteriormente se le aplicó sonicación durante 20 y 30 minutos. Los extractos se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

**3.2.5 Extracción alcalina:** Para la extracción alcalina se disolvieron 200 mg de harina en 2mL de agua destilada pH 12 manteniendo una relación final harina/solución de extracción de 1:10 p/v. Después la mezcla se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 minutos y se conservó el sobrenadante -20 °C (29).

**3.2.6 Extracción con Tritón X-100:** Se mezclaron 200 mg de harina y 1.5 mL del buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 % Tritón X-100 10 % glicerol), la mezcla se agitó durante 90 minutos y seguidamente se mantuvo en hielo durante 30 minutos, luego se centrifugó para eliminar sustancias insolubles (13 000 rpm por 15min) y se conservó el sobrenadante -20 °C.

**3.2.7 Extracción con SDS:** La extracción con buffer fosfato sódico 0.05 M y 1 % SDS se realizó disolviendo 200 mg de harina en el buffer, se agitó durante 90 minutos

y posteriormente se centrifugaron los extractos a 13 000 rpm por 15 minutos; los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C (28).

**3.2.8 Extracción con buffer fosfato de sodio (PBS):** Se disolvieron 200 mg de harina en 1.5 mL de buffer fosfato de sodio y 0.5 % de tween 20, se agitó durante 60 minutos. Los extractos se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C.

### 3.3 Cuantificación de proteína total

A partir de las extracciones de proteína se hizo la cuantificación de proteína total, (OGM y no OGM) mediante espectrofotometría utilizando el método de Bradford (1976). Esta técnica se fundamenta en la unión del colorante azul de Coomassie a los enlaces peptídicos de las proteínas. Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar (30). Los procedimientos se realizaron por triplicado para cada harina.

### 3.4 Detección de proteínas OGM

Se determinó la presencia de proteína derivadas de CGM en harinas de maíz, mediante la técnica de ELISA. Se utilizaron kits comerciales fabricados por Agdia®, los cuales se basan en el fundamento de la prueba de ELISA tipo “sándwich”. Los anticuerpos recubren los pozos de la microplaca, posteriormente se adiciona la muestra. Si la proteína está presente en la muestra, el anticuerpo captura la proteína. Seguidamente se agrega un conjugado de enzima, que consiste en anti-anticuerpo químicamente ligado a una enzima el cual detectar cualquier proteína capturada. Usualmente son empleados para la detección de eventos de proteína en plantas GM, pero no en alimentos altamente procesados. Las determinaciones se realizaron por triplicado a cada uno de los extractos provenientes del protocolo seleccionado para cada proteína transgénica. Los controles positivos utilizados en las determinaciones fueron grano de maíz GM certificado por el INVIMA y autorizado en Colombia para consumo humano, NK603, NK603+MON810 y NK603+MON89034, además del control interno de cada kit utilizado.

Como control negativo se usaron semillas de maíz no-GM variedad local denominada Chicalá. Los granos enteros fueron sometidos a un proceso de precocción similar al que se lleva a cabo en la preparación de las harinas de maíz precocidas en términos de

presión y temperatura, es decir: 35 libras por pulgada cuadrada (PSI) y una temperatura de 100 °C durante 30 minutos (31).

En la tabla 2 se presentan los kits de ELISA Agdia® que se utilizaron para la detección de proteínas derivadas de CGM, en ella se describe la proteína y el evento de transformación que se detecta con cada kit.

**Tabla 2.** Kits de ELISA que se utilizaron en la detección de proteínas transgénicas.

Kit de ELISA	Proteína	Evento Detectado	Descripción
<b>Cry1Ab/1Ac ELISA Kit</b>	Cry1Ab- 1Ac	MON 810 y Bt-11	El kit se usa para la detectar la presencia de la proteína Cry1Ab- 1Ac expresada en cultivos transgénicos. La prueba no distingue entre Cry1Ab y Cry1Ac. Este ensayo es adecuado para semillas y hojas.
<b>Bt- Cry1F</b>	Cry1F	TC1507	El kit es utilizado para la detección de la proteína Cry1F en hojas y semillas de maíz.
<b>Bt- Cry2A</b>	Cry2A	MON 89034	El kit es utilizado para la detección de la proteína Cry 2A en hojas y semillas de maíz, expresada en el maíz MON89043
<b>Bt- Cry 34Ab1</b>	Cry 34Ab1	DAS-59122-7	Este kit es utilizado para la detección del maíz HERCULEX RW.
<b>Bt- Cry 3Bb1</b>	Cry 3Bb1	MON863 y MON88017	Este kit es utilizado para determinar la presencia de la proteína Cry 3Bb1 en YieldGard Rootworm, YieldGard Plus, YieldGard VT RootwormRR2.
<b>Bt- Cry 3Bb1 y Cry1Ab</b>	Cry 3Bb1 y Cry1Ab	MON810, MON863 y MON88017	Este kit es utilizado para determinar la presencia de la proteína Cry 3Bb1 y Cry1Ab en YieldGard Plus, YieldGard VT con Roundup Ready
<b>Roundup Ready</b>	CP4-EPSPS	Múltiples	El kit se usa para detectar la presencia de la proteína CP4-EPSPS en semillas se algodón, maíz y soya. Este kit puede detectar una semilla transgénica en 1000 (0.1 %) y 1 una hoja transgénica en 100 (1 %).

### **3.5 Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se seleccionó un diseño de bloques completos al azar, con tres repeticiones por tratamiento para evaluar el efecto de los diferentes métodos de extracción con las variaciones de las diferentes tipos de harinas (blanca, amarilla y mezcla).

Los resultados de los diferentes protocolos de extracción de proteínas fueron sometidos a pruebas de Bartlett y Shapiro Wilk para determinar homogeneidad de varianzas y normalidad. Se realizó un análisis de varianza y posteriormente, comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey al 95 % de confiabilidad. Para el análisis se empleó el programa estadístico SPSS.

Para los resultados de la detección de proteínas transgénicas mediante la técnica de ELISA, se relativizaron los datos de la densidad óptica (OD) expresándolos en porcentaje utilizando como referencia el valor de la absorbancia del control positivo de cada kit de ELISA.



## **4.Resultados y Discusión**

### **4.1 Harinas de maíz comercializadas en Colombia**

En el año 2013, se encontraron 12 marcas de harina de maíz de 25 tipos diferentes comercializadas en Bogotá D.C en cuatro almacenes de cadena. Se clasificaron según el grado de procesamiento en cruda y precocida y por el tipo de maíz en amarillo y blanco (tabla 3). De las 25 harinas encontradas, se descartaron para el proceso de detección de proteínas transgénicas las harinas M1, M2 y M3, debido a que presentaban en su contenido mezcla con harina de otros granos como arroz, avena y trigo. Tampoco se incluyeron las féculas de maíz debido a su alto contenido de almidón, ya que este afecta el proceso de extracción de proteína. De las 19 harinas seleccionadas el 42.10 % son harinas de maíz blanco, 26.31 % son de maíz amarillo, 10.52 % de grano partido y el 21.05 % corresponde a la mezcla entre maíz amarillo y blanco u otro componente, como azúcar o fibra.

De las 19 harinas evaluadas, ninguna refiere en la etiqueta si alguno de sus componentes proviene de CGM. Cabe destacar que en la legislación colombiana no existe ninguna norma que exija que los productos para consumo humano que contengan transgénicos deban ser etiquetados, como lo expresa la resolución 4254 de 2011 del Ministerio de Salud y Protección Social ( MSPS), que determina las disposiciones relacionadas con el rotulado o etiquetado de alimentos derivados de OGM, estableciendo que se debe etiquetar cuando: no haya equivalencia sustancial entre el alimento derivado de GM y el convencional, cuando la forma de almacenamiento, preparación o cocción del alimento difiera, si se presenta un alérgeno introducido que los consumidores no esperan lo presente, cuando haya diferencia en las propiedades organolépticas con respecto al alimento convencional. En Estados Unidos la ley no exige a los fabricantes de alimentos que etiqueten los empaques de los alimentos que posean ingredientes genéticamente modificados (32,33). Caso contrario ocurre en 64 países como: Rusia, Japón, China, Australia y la Unión Europea entre otros, en los que se debe etiquetar. En la Unión

Europea la legislación plantea que “Los productos alimenticios que contienen o están compuestos por OGM, producidos a partir de OGM o que contengan ingredientes producidos a partir de OGM que se suministren como tal al consumidor deben ser etiquetados [ EC) No 1829/2003 ] (13,32).

**Tabla 3.** Harinas de maíz comercializadas en Bogotá D.C. Colombia en el año 2013. A: harina de maíz amarillo, B: harina de maíz blanco, O: mezcla de harinas blanca y amarilla, C: harina de grano partido, M: mezcla de harinas y F: fécula de maíz.

Harinas de maíz	Tipo de maíz	Tipo de grano	Tipo de harina	Observaciones
A1		Extrafino	Pre cocida	Gluten
A2		Extrafino	Pre cocida	
A3		Extrafino	Pre cocida	
A4	Amarillo	Extrafino	Pre cocida	Trazas de soya, avena y trigo
A5		Extrafino	Pre cocida	Sal, sabor artificial a mantequilla y trazas de gluten
B1		Extrafino	Pre cocida	
B2		Extrafino	Pre cocida	
B3		Extrafino	Pre cocida	
B4		Extrafino	Pre cocida	Gluten
B5		Extrafino	Pre cocida	Gluten
B6	Blanco	Extrafino	Pre cocida	Trazas de soya, avena y trigo
B7		Extrafino	Pre cocida	Sal, sabor artificial a mantequilla y trazas de gluten
B8		Extrafino	Pre cocida	
C1	Blanco	Partido	Cruda	
C2	Blanco	Partido	Cruda	
F1	Blanco	Fécula		Almidón de maíz, harina de cereales (arroz, cebada y avena)
F2	Blanco	Fécula		
F3	Blanco	Fécula		
M1	Blanco	Extrafino	Pre cocida	Mezcla de maíz y arroz. Trazas de soya, avena y trigo
M2	Blanco	Extrafino	Pre cocida	Mezcla de maíz y arroz. Trazas de soya, avena y trigo
M3	Amarillo	Grueso	Pre cocida - Instantánea	
O1	Amarillo	Extrafino	Pre cocida	Trazas de soya, avena y trigo
O2	Blanco y Amarillo	Extrafino	Pre cocida	Adicionada con hierro
O3	Amarillo	Partido	Pre cocida	
O4	Blanco y Amarillo	Extrafino	Pre cocida	



## 4.2 Lista de eventos de maíz GM liberados comercialmente en Colombia.

Según datos del MSPS de enero de 2014 y la base de datos de cultivos GM del “Center for Environmental Risk Assessment” (CERA), en Colombia existen eventos de transformación genética para maíz autorizados para consumo humano, de los cuales en su mayoría presentan genes Cry que confieren resistencia a insectos, el gen que confiere tolerancia a glifosato (CP4-EPSPS) y el gen PAT que proporciona tolerancia a glufosinato. De los 28 eventos de transformación 12 son eventos individuales y 15 eventos apilados, es decir, que presentan una combinación de eventos que confieren tolerancia a herbicida y resistencia a insectos (tabla 4).

**Tabla 4.** Eventos de Maíz GM autorizados en Colombia para uso en consumo humano (34,35) .

Evento de transformación genética	Gen	Solicitante	Acto administrativo de autorización para consumo humano
<b>MON 810</b>	<i>cry1Ab</i>	Compañía Agrícola Colombiana	Acta 5 del 27 octubre 2003 - numeral 26 (MON-00810-6) de la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas ALCOHÓLICAS (SEABA) del INVIMA
<b>NK 603</b>	CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 2004005319 del 1 de abril de 2004 del INVIMA, mediante la cual se acoge el Acta 2 del 29 de marzo - numeral 8 (Maíz MON-00603-6) de la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas Alcohólicas (SEABA) del INVIMA
<b>LY 038</b>	cordapA	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 4585 2009 Ministerio de Salud
<b>Bt 11</b>	<i>cry1Ab</i>	Syngenta	Resolución 1078 de 2009 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 810 - NK 603</b>	<i>cry1Ab</i> CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 4583 de 2009 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 89034</b>	<i>cry 1A</i> <i>cry2AB</i>	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 2394 de 2010 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>TC1507 - NK603</b>	<i>cry1F</i> CP4-EPSPS PAT	Dupont	Resolución 506 de 2010 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 89034 - NK603</b>	<i>cry1A</i> <i>cry2Ab2</i> CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 2395 de 2010 Ministerio de Salud y Protección Social

<b>MON 89034 - TC 1507 - MON 88017 - DAS 59122</b>	<i>cry1A</i> <i>cry2Ab2</i> <i>cry1F</i> <i>cry3Bb1</i> <i>cry34Ab1</i> <i>cry35Ab1</i> CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana y Dow Agrosociencias	Resolución 2393 de 2010
<b>MON 863</b>	<i>cry3Bb1</i>	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 1711 de 2011 del Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 88017</b>	<i>cry3Bb1</i> CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 1712 de 2011 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 810 - MON 88017</b>	<i>cry1Ab</i> <i>cry3Bb1</i> CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 1904 de 2011 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 89034 - MON 88017</b>	<i>cry1A</i> <i>cry2Ab2</i> <i>cry3Bb1</i> CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 1710 de 2011 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>DAS 59122</b>	<i>cry34Ab1</i> <i>cry35Ab1</i> PAT	Dupont	Resolución 1708 de 2011 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MON 87460</b>	CspB nptII	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 1709 de 2011 Ministerio de Salud
<b>MIR 604</b>	<i>cry3A</i>	Syngenta	Resolución 00000118 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>MIR 162</b>	Vip3A	Syngenta	Resolución 1693 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>GA 21</b>	CP4-EPSPS	Syngenta	Resolución 1692 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>T25</b>	PAT	BAYER CROP SCIENCE	Resolución 00000121 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>T25 - NK603</b>	PAT CP4-EPSPS	Compañía Agrícola Colombiana	Resolución 00000115 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>TC1507- DAS59122- NK603</b>	CP4-EPSPS <i>cry34Ab1</i> <i>cry1F</i> pat <i>cry35Ab1</i>	Dupont	Resolución 1486 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>Bt 11 - MIR 162 - MIR 604 - GA21</b>	CP4-EPSPS PAT <i>cry1Ab</i> vip3Aa20 pmi- mcr3A <i>cry1Ab</i>	Syngenta	Resolución 00000119 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social

<b>Bt11 - GA21</b>	PAT CP4- EPSPS	Syngenta	Resolución 1695 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>Bt11 - MIR 162 - GA21</b>	Vip3A <i>cry1Ab</i> PAT CP4- EPSPS	Syngenta	Resolución 1694 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>TC1507xMON810</b>	<i>Cry 1F</i> <i>Cry 1Ab</i>	Dupont	Resolución 1488 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>Bt 11 - MIR 604</b>	<i>cry1Ab</i> PAT <i>cry3A</i>	Syngenta	Resolución 00000120 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>DAS1507 x MON810 x NK603</b>	<i>cry34Ab1</i> CP4- EPSPS <i>cry35Ab1</i> <i>Cry 1Ab</i> PAT <i>Cry 1F</i>	Dupont	Resolución 1488 de 2012 Ministerio de Salud y Protección Social
<b>TC1507</b>	<i>Cry 1F</i>	Dupont	Aprobada por la SEABA

### 4.3 Determinación del protocolo de extracción de proteína total.

Para la determinación del protocolo de extracción de proteína total más adecuado, con el que se obtuviera la mayor cantidad de proteína y que no mostrara interferencia con la prueba de ELISA, se seleccionaron tres harinas B8, A5 y O4, y fueron sometidas a once métodos de extracción, como se presenta en la tabla 5. Posteriormente los extractos fueron cuantificados y se hizo una prueba de ELISA para verificar si la solución donde se encontraba la proteína generaba interferencia.

Cuando se realizó la extracción con buffer carbonato, se obtuvo una concentración de proteína que osciló entre 0.30 y 2.30 mg/g. En la extracción alcalina se observaron valores entre 5.70 y 10.70 mg/g, con el buffer PBS no se detectó proteína en la harina A5 pero sí en las harinas B8 y O4. Valores entre 4.80 y 6.00 mg/g se detectaron con la extracción con Tritón X-100. En las extracciones donde se empleó sonicación luego de la agitación no se detectó proteína en la harina A5 pero sí en las harinas B8 y O4 que presentaron valores entre 0.10 y 3.00 mg/g. Las concentraciones más altas de proteína se obtuvieron con el buffer fosfato sódico más 1 % SDS (Tabla 5 y Figura 1). Cabe resaltar que la concentración de proteína total soluble obtenida con el tratamiento 4 es

similar a la conseguidas en un estudio realizado por Margarit y colaboradores en el 2006 (36), quienes determinaron la cantidad de proteína en alimentos procesados como polenta precocida y hojuelas de maíz obteniendo valores que oscilaban entre 0.16 y 4.88 mg/g de muestra, utilizando el kit comercial de Envirologix® que contiene buffer PBS para la extracción. La extracción con agua alcalina fue considerada en este estudio debido a los reportes en los que se utilizó este método, para la obtención de aislados proteicos en harinas de arroz integral utilizando diferentes valores de pH desde 9 hasta 12, encontrando concentraciones entre 0.20 y 12 mg/100 g harina siendo la concentración más alta la obtenida con agua a pH12 (0.13 mg/g harina) (29). Al comparar esta concentración con los datos obtenidos en el presente estudio se puede observar que la concentración detectada es mayor (8.46 mg/g), esto posiblemente se deba a la diferencia en el grano utilizado para hacer la harina (Tabla 5). Caso contrario ocurrió en los tratamientos donde se aplicó sonicación, ya que al comparar los datos obtenidos con el estudio realizado por Oszvald y colaboradores en el 2008 (28), quienes utilizaron la extracción en dos pasos, primero buffer fosfato sódico y 0.5 % de SDS con agitación por 30 minutos y posteriormente sonicación con amplitud del 50 % por 30 segundos, observando que se obtuvo el 90 % de las proteínas contenidas en la harina de arroz. En el presente estudio cuando se aplicó sonicación durante 30 y 20 minutos con diferentes buffers, no se alcanzó a recuperar más del 50 % de la cantidad de proteína que se registra en la etiqueta del producto analizado.

**Tabla 5.** Concentración de proteína total obtenida con los diferentes métodos de extracción en las harinas B8, A5 y O4.

Tratamiento	Método de extracción	Harina	Concentración mg/g
1	Buffer carbonato	B8	2.261 ( $\pm$ 0.4616)
		A5	0.301 ( $\pm$ 0.1218)
		O2	1.111 ( $\pm$ 0.2852)
2	Extracción alcalina	B8	9.061 ( $\pm$ 0.7550)
		A5	10.547 ( $\pm$ 0.2880)
		O2	5.780 ( $\pm$ 0.4480)
3	Extracción PBS	B8	1.549 ( $\pm$ 0.2660)
		A5	N.D
		O2	0.433 ( $\pm$ 0.5363)

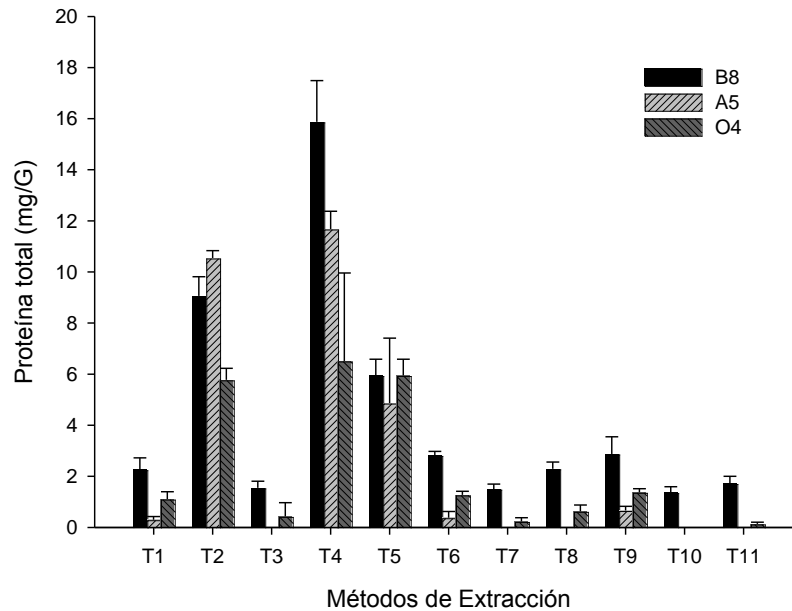
4	Extracción con SDS	B8	15.875 ( $\pm 1.6173$ )
		A5	11.683 ( $\pm 0.6910$ )
		O2	6.516 ( $\pm 3.4428$ )
5	Extracción con Tritón X-100	B8	5.699 ( $\pm 0.6361$ )
		A5	4.868 ( $\pm 2.5423$ )
		O2	5.946 ( $\pm 0.6361$ )
6	Carbonato + Soni 20	B8	2.821 ( $\pm 0.1941$ )
		A5	0.381 ( $\pm 0.3080$ )
		O2	1.275 ( $\pm 0.1439$ )
7	NaCl + Soni 20	B8	1.501 ( $\pm 0.2660$ )
		A5	N.D
		O2	0.235 ( $\pm 0.2535$ )
8	PBS+ Soni 20	B8	2.295 ( $\pm 0.6733$ )
		A5	N.D
		O2	0.627 ( $\pm 0.1383$ )
9	Carbonato + Soni 30	B8	2.875 ( $\pm 0.6733$ )
		A5	0.661 ( $\pm 0.1653$ )
		O2	1.375 ( $\pm 0.1383$ )
10	NaCl + Soni 30	B8	1.363 ( $\pm 0.2306$ )
		A5	N.D
		O2	N.D
11	PBS+ Soni 30	B8	1.716 ( $\pm 0.2829$ )
		A5	N.D
		O2	0.139 ( $\pm 0.0674$ )

- (N.D) no se detectó

**Tabla 6.** Comparación de medias de los diferentes tratamientos utilizando la prueba estadística de Tukey.

Tratamiento	N	Subconjuntos			
		A	B	C	D
1	3			1.225	1.225
2	3	8.463	8.463		
3	3				0.619
4	3	11.358			
5	3		5.504	5.504	
6	3			1.492	1.492

7	3			0.579
8	3			0.974
9	3		1.637	1.637
10	3			0.454
11	3			0.661
<b>Significancia</b>		0.424	0.395	0.061
				0.995

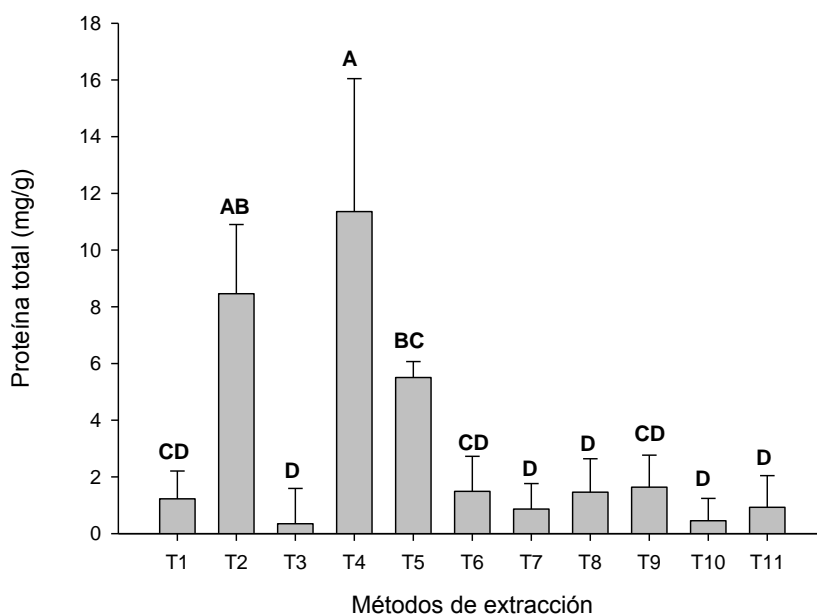


**Figura 1.** Concentración de proteína total obtenida con los diferentes métodos de extracción en las harinas B8, A5 y O4.

La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el método de extracción (T4) donde se utilizó buffer fosfato sódico más 1 % SDS y los demás métodos, a excepción de la extracción alcalina (T2), que no presentó diferencias significativa ( $p = 0.463$ ). También se determinó que la extracción alcalina (T2) y el buffer más 1 % Tritón X-100 (T5) no presentan diferencias ( $p = 0.434$ ), caso contrario ocurre con los demás métodos utilizados (Figura 2).

De acuerdo con el análisis estadístico los mejores métodos de extracción fueron el buffer fosfato sódico más 1 % SDS, la extracción alcalina y el buffer con 1 % Tritón X-100, correspondientes a los tratamientos T2, T4 y T5 respectivamente. Sin embargo al realizar

la prueba inmunológica ELISA con los controles positivos, utilizando las muestras de grano transgénico NK 603, MON 810+NK603 y MON 89034 +NK603 y el kit de detección de la proteína transgénica CP4EPSPS, el protocolo con 1 % SDS (T4) generó interferencia debido a la cantidad de SDS. De la misma forma el agua a pH 12 afectó el ELISA (T2), esto se evidenció ya que se observan valores negativos para dos de las muestras evaluadas. Por el contrario, con el buffer con 1 % Tritón X-100 (T5) se observaron absorbancias superiores a 0.2, lo que indicó presencia o detección positiva de proteína.



**Figura 2.** Comparación de métodos de extracción de proteína total en harinas de maíz. (Tukey 95 %). Las letras indican diferencias significativas, según los subconjuntos generados, con un valor  $p < 0.05$ .

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el tratamiento 5 que corresponde al protocolo con el buffer más 1 % Tritón X-100 para las extracciones de las demás muestras de harina a evaluar. Debido a que no generó interferencia con la prueba de ELISA, ya que el Tritón X-100 es un detergente no desnaturizante, que no penetra las proteínas solubles, por lo que no altera las interacciones ni estructuras de estas, caso contrario ocurre con el SDS, que es un detergente que actúa rompiendo los enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturizándolas, provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa. Cabe resaltar que este método de extracción con Tritón X-100 ha sido ampliamente utilizado para la extracción de proteínas a partir de

tejido animal y en algunos casos tejido vegetal, pero no alimentos procesados como las harinas de maíz.

#### 4.4 Detección de proteína transgénica

Se determinó la presencia de proteína derivadas de CGM en harinas de maíz, mediante la técnica de ELISA. Se utilizaron siete kits comerciales de Agdia®, para la identificación de las siguientes proteínas:

- CP4EPSPS que confiere tolerancia al pesticida glifosato
- Cry1AB, Cry1AC, Cry2A y Cry1F que generan resistencia a insectos de tipo lepidópteros
- Cry34Ab1 y Cry3Bb1 que confieren resistencia a coleópteros (13)

Para el análisis de los valores arrojados por la técnica de ELISA de tipo cualitativo se calculó el valor del punto de corte tomando en cuenta la suma de cuatro desviaciones estándar del promedio de las densidades ópticas de las muestras aparentemente negativas, es decir  $0.064 + (4 \times 0.03)$  lo que determina que las muestras serán positivas si presentan valores superiores a 0.2.

Se analizaron 28 muestras de harina de maíz (19 harinas comerciales, 3 controles positivos y un control negativo, estos últimos con y sin pre cocción) a las que se les extrajo la proteína soluble y se cuantificó por el método de Bradford. La proteína total soluble obtenida varió entre 4 y 11 mg/g, siendo las concentraciones más altas las obtenidas con la harina proveniente de los granos de maíz transgénico, maíz variedad Chicalá (Control negativo) y cuchuco de maíz con y sin pre cocción (tabla 7). Cabe resaltar que cuando el grano de maíz es sometido a pre cocción la cantidad de proteína disminuye entre el 20 % y 30 %, ya que a altas temperaturas las proteínas son desnaturalizadas.

En las 19 harinas comerciales evaluadas, no se detectó la presencia del evento de transformación Cry2A (tabla 8) , esto indica que posiblemente el grano de maíz utilizado en la preparación de la harina no es GM o las proteínas transgénicas se degradaron en el proceso de pre cocción, ya que el calentamiento y otros tratamientos a los que son sometidos los alimentos cambian la estructura terciaria de las proteínas Cry y por lo tanto



los epítopes reconocidos por los anticuerpos (27). Resultados similares obtuvieron De Luis y colaboradores en el 2009 (27), cuando realizaron un estudio del efecto de diferentes procesos a los que son sometidos los alimentos como nixtamalización, cocinar a la plancha y fritura, en la desnaturalización de Cry1Ab expresado en el maíz transgénico, en donde observaron que la proteína Cry1Ab se desnaturaliza con esos procesos y no es posible detectarla por la técnica de ELISA. Sin embargo en el estudio realizado por Margarit y colaboradores en el 2002 (36), detectaron proteína Cry1AB en polenta precocida utilizando un kit comercial de ELISA (93.9 ng Bt/g comida). Esto posiblemente se deba a que la concentración de proteína inicial era mayor o a que el proceso de precocción no es tan drástico como los realizados por De Luis y colaboradores en el 2009 (27), ya que el proceso de precocción se realiza a 100 °C, cocinar a la plancha a 250 °C y fritura a 190 °C.

En otro estudio en donde se usó una técnica de ELISA para detectar y cuantificar la proteína Cry9C en diferentes alimentos procesados, encontraron que la cantidad de proteína en alimentos como pan de maíz, muffins y polenta está entre 3 y 13.50 % de la que se encuentra en el grano de maíz transgénico. Caso contrario ocurre en alimentos como tortilla de maíz y hojuelas de maíz, donde la cantidad de Cry9C es muy baja o no fue detectada (37). En el presente estudio se obtuvieron porcentajes de proteínas transgénicas que variaron entre 7 y 100 % en harinas con y sin precocción (tabla 8).



**Tabla 7.** Proteína Total soluble de las diferentes harinas evaluadas.

Harinas de maíz	Concentración (mg/g)
B1	4.982
B2	5.835
B3	5.475
B4	5.290
B5	5.030
B6	5.482
B7	5.302
B8	5.300
A1	5.052
A2	4.622
A3	5.225
A4	5.345
A5	4.922
O1	5.705
O2	5.412
O3	6.090
O4	5.127
C1 P	6.580
C2 P	5.977
C1 SP	8.382
C2 SP	8.425
<b>Controles</b>	
NK603 P	8.865
NK603+MON810 P	7.570
nk603+MON89034 P	7.685
NK603 SP	10.755

<b>NK603+MON810 SP</b>	9.892
<b>NK 603+MON 89034 SP</b>	9.715
<b>Chicalá</b>	8.507

**Tabla 8.** Harinas de maíz detectadas como positivas y cantidad del evento de transformación expresada como porcentaje.

Evento	Harinas Positivas	% respecto a Control +		
		O.D		
<b>Cry 3Bb1</b>	O1	0.282	9.80	
<b>Cry 1AB - 1AC</b>	C2 P	0.550	23.45	
	C2 SP	1.266	53.95	
	nk603+mon810 P	0.835	35.57	
	nk603+mon810 SP	1.543	65.77	
<b>Cry 3Bb1 - 1AB</b>	nk603+mon810 P	0.589	30.84	
	nk603+mon810 SP	2.117	127.76	
	C2P	0.366	19.17	
	C2SP	1.534	80.38	
<b>Cry34Ab1</b>	A3	0.309	0.27	
<b>CP4EPSPS</b>	B2	0.950	81.19	
	A3	0.282	24.07	
	O3	0.254	21.70	
	C2P	0.372	31.79	
	C2SP	1.396	119.00	
	nk603 P	1.640	140.00	
	nk603 SP	1.574	134.00	
	nk603+mon810 P	0.307	26.21	
	nk603+mon810 SP	0.272	23.33	
	nk603+mon 89034 P	0.258	22.05	
	nk603+mon 89034 SP	0.273	23.33	
	<b>Cry 2A</b>	nk603+mon 89034 P	2.480	102.00
		nk603+mon 89034 SP	2.769	114.00
<b>Cry 1F</b>	B2	2.628	88.00	
	B8	0.363	12.16	
	A3	0.334	11.17	
	O3	0.257	8.62	

C1P	0.547	18.33
C1SP	2,735	91.63
C2P	0.234	7.84
C2SP	2.872	96.22

- Los valores de O.D fueron corregidos con el factor de dilución utilizado.

Las muestras B2, A3, O3 y C2 presentaron valores de densidad óptica superiores a 0.2 para la proteína CP4EPSPS, es decir que estas harinas contienen trazas de CGM. La concentración de proteína transgénica encontrada en la harina C2 sin precocción, es similar a la que se presenta en el grano transgénico NK603 utilizado como control positivo. Al compararlo con el control del ELISA se obtienen valores superiores al 100 % (tabla 8). La cantidad de proteína CP4EPSPS expresada en un grano de maíz es de 10.9 ug/mg, es decir que la harina presentaría la misma concentración (38). En cuanto a la proteína Cry1F fue detectada en las muestras B2, B8, A3, O3, C1 y C2, presentando la harina B2 88 %, C1SP 91.63 % y C2SP 96.22 % de la proteína (Tabla 8). El nivel de expresión de Cry1F en el grano de maíz transgénico TC1507 es de 110.9 pg/ $\mu$ g peso seco, la harina C2SP puede tener una concentración similar a la de este grano (39).

La harina C2 contiene la proteína Cry1AB (53.9 %) en un porcentaje similar al que presenta el grano de maíz transgénico NK603+MON810 (65.8 %), la cantidad de proteína es parecida al nivel de expresión del grano de maíz MON810 que es de 0.41 mg/g peso fresco (40). Para la proteína Cry34Ab1 se realizó ELISA de tipo cuantitativo. Se detectó presencia en la harina A3 en una concentración de 0.13 pg/mg, valor relativamente bajo ya que en grano de maíz (DAS-59122-7) el nivel de expresión de la proteína es de 49 700 pg/mg(41).

**Tabla 9.** Eventos de maíz GM identificados en las harinas de maíz comercializadas en Colombia

Harinas de maíz	Eventos de transformación genética	Cantidad de eventos detectados
B1	ND	0
B2	Cry 1f- CP4EPSPS	2
B3	ND	0
B4	ND	0
B5	ND	0
B6	ND	0
B7	ND	0
B8	Cry 1F	1
A1	ND	0
A2	ND	0
A3	Cry 1F- CP4EPSPS- Cry 34Ab1	3
A4	ND	0
A5	ND	0
O1	Cry 3Bb1	1
O2	ND	0
O3	Cry 1F- CP4EPSPS	2
O4	ND	0
C1 -Precocción	Cry 1F	1
C2- Precocción	Cry 1F- CP4EPSPS- Cry 1Ab	3
C1	Cry 1F	1
C2	Cry 1F- CP4EPSPS- Cry 1Ab	3
NK603+MON89034- Precocción	CP4EPSPS-Cry 2A	2
NK 603- Precocción	CP4EPSPS	1
NK603+MON810- Precocción	CP4EPSPS- Cry 1Ab	2
NK 603	CP4EPSPS	1
NK603+MON810	CP4EPSPS- Cry 1Ab	2
NK603+MON89034	Cry 2A - CP4EPSPS	2
Chicalá	-	0

## **5. Conclusiones y recomendaciones**

### **5.1 Conclusiones**

En la ciudad de Bogotá, se encontraron 22 tipos de harinas de maíz comercializadas durante el año 2013, en las que ninguna refiere en su etiqueta la procedencia del maíz.

En las condiciones del estudio se encontró que el mejor método de extracción de proteína total es la extracción con buffer con tritón X-100, debido a que no presenta interferencia con la prueba de ELISA y además permite la obtención de una concentración de proteína considerable.

Se observó que el tratamiento de precocción reduce entre 20 y 30 % la cantidad de proteína total, debido a que los procesos de calentamiento denaturan las proteínas.

Siete de las 19 harinas de maíz evaluadas contienen trazas de OGM (B2, B8, A3, O3, O1, C1 y C2) que confieren resistencia a lepidópteros o coleópteros y tolerancia al herbicida glifosato.

Las proteínas transgénicas encontradas en las harinas de maíz (CP4EPSPS- Cry 1Ab, Cry 1F, Cry 34Ab1y Cry 3Bb1) están aprobadas para el consumo humano de acuerdo al MSPS.

Este trabajo es importante ya que proporciona un protocolo de extracción y detección de proteínas transgénicas, que podría ser aplicado a diferentes tipos de alimentos por entidades reguladoras o de control.

En este estudio, la presencia de estas trazas de OGM en las harinas de maíz, puede deberse a que más del 50% del maíz utilizado proviene de tres países líderes en adopción de CGM, como también porque Colombia se cultivó 75 094 hectáreas de maíz GM, el cual se consume en el país. Lo que sugiere que en nuestro país, en el que se comercializan alimentos producidos con materias primas para consumo

humano provenientes de países productores de CGM, se pueden presentar trazas de OGM en muy variados productos, sin que estos requieran una etiqueta que los identifique, puesto que sus propiedades no se ven modificadas con respecto a los productos convencionales.

## **5.2 Recomendaciones**

Se recomienda utilizar kits específicos de proteínas transgénicas para alimentos altamente procesados, lo que facilitaría el proceso de extracción y detección.

Se recomienda utilizar kits de ELISA de tipo cuantitativo, si el fin del estudio es la cuantificación la proteína.

Se recomienda realizar un control de calidad de las muestras, para verificar la inocuidad del alimento y por tanto asegurar que el resultado positivo no proviene de contaminación cruzada.



## A.Anexo: Tablas de la cantidad de proteína transgénica expresada en porcentaje en relación al control positivo de la técnica.

**Tabla 10.** Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 1F.

Harinas de maíz	D.O	% respecto a Control +	Cry 1F presente
<b>Blanco</b>	0.000	0.00	
<b>Control +</b>	2.985	100.00	100
<b>B1</b>	0.002	0.05	ND
<b>B2</b>	2.628	88.02	88
<b>B3</b>	0.020	0.65	ND
<b>B4</b>	0.015	0.51	ND
<b>B5</b>	0.002	0.06	ND
<b>B6</b>	0.001	0.04	ND
<b>B7</b>	0.017	0.558	ND
<b>B8</b>	0.363	12.16	12,16
<b>A1</b>	0.001	0.03	ND
<b>A2</b>	0.007	0.23	ND
<b>A3</b>	0.334	11.17	11,17
<b>A4</b>	0.013	0.44	ND
<b>A5</b>	0.002	0.05	ND
<b>O1</b>	0.003	0.11	ND
<b>O2</b>	0.008	0.25	ND
<b>O3</b>	0.257	8.62	8.62
<b>O4</b>	0.006	0.19	ND
<b>C1 P</b>	0.547	18.33	18.33
<b>C2 P</b>	0.234	7.84	7.84
<b>C1 SP</b>	2.735	91.63	91.63
<b>C2 SP</b>	2.872	96.22	96.22

<b>nk603 P</b>	0.003	0.08	ND
<b>nk603+mon810 P</b>	0.002	0.05	ND
<b>nk603+mon 89034 P</b>	0.019	0.63	ND
<b>Control - P</b>	0.007	0.23	ND
<b>nk603 SP</b>	0.040	1.34	ND
<b>nk603+mon810 SP</b>	0.042	1.39	ND
<b>nk603+mon 89034 SP</b>	0.179	5.98	ND
<b>Control - SP</b>	0.032	1.08	ND

**Tabla 11.** Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 3Bb1 - 1Ab.

Harinas de maíz	D.O	% respecto a Control +	Cry 3Bb1 - 1Ab presente
<b>Blanco</b>	0.000	0.00	
<b>Control +</b>	1.909	100.00	100
<b>B1</b>	0.001	0.03	ND
<b>B2</b>	0.020	1.03	ND
<b>B3</b>	0.006	0.33	ND
<b>B4</b>	0.011	0.59	ND
<b>B5</b>	0.001	0.03	ND
<b>B6</b>	0.002	0.08	ND
<b>B7</b>	0.001	0.03	ND
<b>B8</b>	0.004	0.22	ND
<b>A1</b>	0.006	0.33	ND
<b>A2</b>	0.011	0.55	ND
<b>A3</b>	0.010	0.52	ND
<b>A4</b>	0.014	0.73	ND
<b>A5</b>	0.001	0.03	ND
<b>O1</b>	0.003	0.17	ND
<b>O2</b>	0.002	0.12	ND
<b>O3</b>	0.009	0.47	ND
<b>O4</b>	0.008	0.40	ND
<b>C1 P</b>	0.021	1.11	ND
<b>C2 P</b>	0.366	19.17	19.17
<b>C1 SP</b>	0.065	3.39	ND
<b>C2 SP</b>	1.534	80.38	80.38
<b>nk603 P</b>	0.026	1.38	ND
<b>nk603+mon810 P</b>	0.589	30.84	30.84
<b>nk603+mon 89034 P</b>	0.020	1.06	ND
<b>nk603 SP</b>	0.029	1.53	ND
<b>nk603+mon810 SP</b>	2.439	127.76	127.76

<b>nk603+mon 89034 SP</b>	2.117	110.93	ND
<b>Chicalá P</b>	0.018	0.96	ND
<b>Chicalá - SP</b>	0.006	0.31	ND

**Tabla 12.** Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 2A.

Harinas de maíz	D.O	% respecto a Control +	Cry 2A presente
<b>Blanco</b>	0.051	0.00	
<b>Control +</b>	2.415	100.00	100
<b>B1</b>	0.042	1.75	ND
<b>B2</b>	0.048	1.97	ND
<b>B3</b>	0.046	1.90	ND
<b>B4</b>	0.044	1.80	ND
<b>B5</b>	0.041	1.68	ND
<b>B6</b>	0.045	1.84	ND
<b>B7</b>	0.043	1.76	ND
<b>B8</b>	0.049	2.01	ND
<b>A1</b>	0.047	1.93	ND
<b>A2</b>	0.054	2.22	ND
<b>A3</b>	0.054	2.25	ND
<b>A4</b>	0.055	2.26	ND
<b>A5</b>	0.048	2.00	ND
<b>O1</b>	0.048	2.00	ND
<b>O2</b>	0.057	2.34	ND
<b>O3</b>	0.055	2.27	ND
<b>O4</b>	0.047	1.94	ND
<b>C1 P</b>	0.060	2.49	ND
<b>C2 P</b>	0.063	2.60	ND
<b>C1 SP</b>	0.067	2.76	ND
<b>C2 SP</b>	0.061	2.52	ND
<b>nk603 P</b>	0.050	2.07	ND
<b>nk603+mon810 P</b>	0.055	2.29	ND
<b>nk603+mon 89034 P</b>	2.480	102.66	102.66
<b>nk603 SP</b>	0.067	2.76	ND
<b>nk603+mon810 SP</b>	0.062	2.55	ND
<b>nk603+mon 89034 SP</b>	2.769	114.64	114.64
<b>Chicalá- P</b>	0.047	1.93	ND
<b>Chicalá- SP</b>	0.071	2.95	ND

**Tabla 13.** Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación CP4-EPSPS

Harina de maíz	D.O	% respecto a Control +	CP4-EPSPS presente
<b>Blanco</b>	0	0	
<b>Control +</b>	1.170	100.00	100
<b>B1</b>	0.063	5.41	ND
<b>B2</b>	0.950	81.19	81.19
<b>B3</b>	0.062	5.27	ND
<b>B4</b>	0.057	4.87	ND
<b>B5</b>	0.071	6.09	ND
<b>B6</b>	0.076	6.52	ND
<b>B7</b>	0.080	6.86	ND
<b>B8</b>	0.068	5.84	ND
<b>A1</b>	0.033	2.80	ND
<b>A2</b>	0.086	7.32	ND
<b>A3</b>	0.282	24.07	24.07
<b>A4</b>	0.066	5.67	ND
<b>A5</b>	0.062	5.29	ND
<b>O1</b>	0.067	5.69	ND
<b>O2</b>	0.106	9.06	ND
<b>O3</b>	0.254	21.70	21.7
<b>O4</b>	0.103	8.83	ND
<b>C1 P</b>	0.161	13.78	ND
<b>C2 P</b>	0.372	31.79	31.79
<b>C1 SP</b>	0.090	7.69	ND
<b>C2 SP</b>	1.396	119.31	119
<b>nk603 P</b>	1.640	140.17	140
<b>nk603+mon810 P</b>	0.307	26.21	26.21
<b>nk603+mon 89034 P</b>	0.258	22.05	22.05
<b>nk603 SP</b>	1.574	134.53	134
<b>nk603+mon810 SP</b>	0.273	23.33	23.33
<b>nk603+mon 89034 SP</b>	0.273	23.33	23.33
<b>Chicalá- SP</b>	-0.004	-0.37	ND
<b>Chicalá- P</b>	0.000	0.00	ND

**Tabla 14.** Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 1Ab-1Ac

Harinas de maíz	D.O.	% respecto a Control +	Cry 1AB- 1AC presente
<b>Blanco</b>	0.000		
<b>Control +</b>	2.347	100.0	Control +

<b>B1</b>	0.001	0.0	ND
<b>B2</b>	0.120	5.1	ND
<b>B3</b>	0.001	0.0	ND
<b>B4</b>	0.009	0.4	ND
<b>B5</b>	0.002	0.1	ND
<b>B6</b>	0.004	0.2	ND
<b>B7</b>	0.011	0.5	ND
<b>B8</b>	0.001	0.1	ND
<b>A1</b>	0.002	0.1	ND
<b>A2</b>	0.008	0.3	ND
<b>A3</b>	0.011	0.5	ND
<b>A4</b>	0.003	0.1	ND
<b>A5</b>	0.000	0.0	ND
<b>O1</b>	0.001	0.0	ND
<b>O2</b>	0.001	0.0	ND
<b>O3</b>	0.001	0.0	ND
<b>O4</b>	0.022	0.9	ND
<b>C1 P</b>	0.011	0.5	ND
<b>C2 P</b>	0.550	23.5	23.5
<b>C1 SP</b>	0.069	3.0	ND
<b>C2 SP</b>	1.266	53.9	53.9
<b>nk603 P</b>	0.098	4.2	ND
<b>nk603+mon810 P</b>	0.835	35.6	35.6
<b>nk603+mon 89034 P</b>	0.042	1.8	ND
<b>nk603 SP</b>	0.119	5.1	ND
<b>nk603+mon810 SP</b>	1.543	65.8	65.8
<b>nk603+mon 89034 SP</b>	0.073	3.1	ND
<b>Chicalá - SP</b>	0.033	1.4	ND
<b>Chicalá - P</b>	0.009	0.4	ND

**Tabla 15.** Harinas de maíz que presentan en el evento de transformación Cry 3Bb1.

Harina de maíz	D.O.	% respecto a Control +	Cry 3Bb1 presente
<b>Blanco</b>	0.000		
<b>Control +</b>	2.872	100.0	Control +
<b>B1</b>	0.024	0.8	ND
<b>B2</b>	0.039	1.4	ND
<b>B3</b>	0.027	1.0	ND
<b>B4</b>	0.037	1.3	ND
<b>B5</b>	0.038	1.3	ND
<b>B6</b>	0.033	1.2	ND

---

<b>B7</b>	0.035	1.2	ND
<b>B8</b>	0.034	1.2	ND
<b>A1</b>	0.025	0.9	ND
<b>A2</b>	0.055	1.9	ND
<b>A3</b>	0.028	1.0	ND
<b>A4</b>	0.027	0.9	ND
<b>A5</b>	0.046	1.6	ND
<b>O1</b>	0.282	9.8	9.8%
<b>O2</b>	0.040	1.4	ND
<b>O3</b>	0.012	0.4	ND
<b>O4</b>	0.025	0.9	ND
<b>C1 P</b>	0.028	1.0	ND
<b>C2 P</b>	0.038	1.3	ND
<b>nk603 P</b>	0.049	1.7	ND
<b>nk603+mon810 P</b>	0.038	1.3	ND
<b>nk603+mon 89034 P</b>	0.049	1.7	ND
<b>C1 SP</b>	0.021	0.7	ND
<b>C2 SP</b>	0.027	1.0	ND
<b>nk603 SP</b>	0.035	1.2	ND
<b>nk603+mon810 SP</b>	0.017	0.6	ND
<b>nk603+mon 89034 SP</b>	0.043	1.5	ND
<b>Chicalá - SP</b>	0.019	0.7	ND
<b>Chicalá - P</b>	0.007	0.3	ND

---

## B. Anexo: Comparación de medias mediante la prueba de Tukey.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia significativa (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	2.00	-7.2383	1.21680	0.000	-11.6335	-2.8430
	3.00	0.5636	1.21680	1.000	-3.8316	4.9589
	4.00	-10.1336	1.21680	0.000	-14.5288	-5.7383
	5.00	-4.2797	1.21680	0.061	-8.6749	0.1156
	6.00	-0.2679	1.21680	1.000	-4.6632	4.1273
	7.00	0.6456	1.21680	1.000	-3.7497	5.0408
	8.00	0.2505	1.21680	1.000	-4.1448	4.6457
	9.00	-0.4124	1.21680	1.000	-4.8077	3.9828
	10.00	0.7701	1.21680	1.000	-3.6251	5.1653
	11.00	0.6059	1.21680	1.000	-3.7893	5.0012
2.00	1.00	7.2383*	1.21680	0.000	2.8430	11.6335
	3.00	7.8019*	1.21680	0.000	3.4067	12.1971
	4.00	-2.8953	1.21680	0.424	-7.2905	1.4999
	5.00	2.9586	1.21680	0.395	-1.4366	7.3538
	6.00	6.9703*	1.21680	0.001	2.5751	11.3656
	7.00	7.8838*	1.21680	0.000	3.4886	12.2791
	8.00	7.4887*	1.21680	0.000	3.0935	11.8840
	9.00	6.8258*	1.21680	0.001	2.4306	11.2211
	10.00	8.0084*	1.21680	0.000	3.6131	12.4036
	11.00	7.8442*	1.21680	0.000	3.4490	12.2394
3.00	1.00	-0.5636	1.21680	1.000	-4.9589	3.8316
	2.00	-7.8019*	1.21680	0.000	-12.1971	-3.4067
	4.00	-10.6972*	1.21680	0.000	-15.0924	-6.3020
	5.00	-4.8433*	1.21680	0.023	-9.2385	-0.4481
	6.00	-0.8316	1.21680	1.000	-5.2268	3.5637

	7.00	0.0819	1.21680	1.000	-4.3133	4.4772
	8.00	-0.3132	1.21680	1.000	-4.7084	4.0821
	9.00	-0.9761	1.21680	0.999	-5.3713	3.4192
	10.00	0.2065	1.21680	1.000	-4.1888	4.6017
	11.00	0.0423	1.21680	1.000	-4.3529	4.4375

4.00	1.00	10.1336*	1.21680	0.000	5.7383	14.5288
	2.00	2.8953	1.21680	0.424	-1.4999	7.2905
	3.00	10.6972*	1.21680	0.000	6.3020	15.0924
	5.00	5.8539	1.21680	0.004	1.4587	10.2491
	6.00	9.8656	1.21680	0.000	5.4704	14.2609
	7.00	10.7791	1.21680	0.000	6.3839	15.1744
	8.00	10.3840	1.21680	0.000	5.9888	14.7793
	9.00	9.7211	1.21680	0.000	5.3259	14.1164
	10.00	10.9037	1.21680	0.000	6.5084	15.2989
	11.00	10.7395	1.21680	0.000	6.3443	15.1347
	5.00	1.00	4.2797*	1.21680	0.061	-0.1156
2.00		-2.9586*	1.21680	0.395	-7.3538	1.4366
3.00		4.8433	1.21680	0.023	0.4481	9.2385
4.00		-5.8539	1.21680	0.004	-10.2491	-1.4587
6.00		4.0117*	1.21680	0.093	-0.3835	8.4070
7.00		4.9252*	1.21680	0.020	0.5300	9.3205
8.00		4.5301*	1.21680	0.040	0.1349	8.9254
9.00		3.8672*	1.21680	0.116	-0.5280	8.2625
10.00		5.0498*	1.21680	0.016	0.6545	9.4450
11.00		4.8856*	1.21680	0.022	0.4904	9.2808
6.00		1.00	0.2679	1.21680	1.000	-4.1273
	2.00	-6.9703*	1.21680	0.001	-11.3656	-2.5751
	3.00	0.8316*	1.21680	1.000	-3.5637	5.2268
	4.00	-9.8656*	1.21680	0.000	-14.2609	-5.4704
	5.00	-4.0117	1.21680	0.093	-8.4070	0.3835
	7.00	0.9135	1.21680	0.999	-3.4817	5.3087
	8.00	0.5184	1.21680	1.000	-3.8768	4.9136
	9.00	-0.1445	1.21680	1.000	-4.5397	4.2507
	10.00	1.0380	1.21680	0.998	-3.3572	5.4333
	11.00	0.8739	1.21680	1.000	-3.5214	5.2691



7.00	1.00	-0.6456*	1.21680	1.000	-5.0408	3.7497
	2.00	-7.8838	1.21680	0.000	-12.2791	-3.4886
	3.00	-0.0819*	1.21680	1.000	-4.4772	4.3133
	4.00	-10.7791	1.21680	0.000	-15.1744	-6.3839
	5.00	-4.9252	1.21680	0.020	-9.3205	-0.5300
	6.00	-0.9135	1.21680	0.999	-5.3087	3.4817
	8.00	-0.3951	1.21680	1.000	-4.7903	4.0001
	9.00	-1.0580	1.21680	0.998	-5.4532	3.3372
	10.00	0.1245	1.21680	1.000	-4.2707	4.5198
	11.00	-0.0396	1.21680	1.000	-4.4349	4.3556
	8.00	1.00	-0.2505*	1.21680	1.000	-4.6457
2.00		-7.4887*	1.21680	0.000	-11.8840	-3.0935
3.00		0.3132	1.21680	1.000	-4.0821	4.7084
4.00		-10.3840	1.21680	0.000	-14.7793	-5.9888
5.00		-4.5301*	1.21680	0.040	-8.9254	-0.1349
6.00		-0.5184*	1.21680	1.000	-4.9136	3.8768
7.00		0.3951*	1.21680	1.000	-4.0001	4.7903
9.00		-0.6629*	1.21680	1.000	-5.0581	3.7323
10.00		0.5196*	1.21680	1.000	-3.8756	4.9149
11.00		0.3555*	1.21680	1.000	-4.0398	4.7507
9.00		1.00	0.4124	1.21680	1.000	-3.9828
	2.00	-6.8258*	1.21680	0.001	-11.2211	-2.4306
	3.00	0.9761*	1.21680	0.999	-3.4192	5.3713
	4.00	-9.7211*	1.21680	0.000	-14.1164	-5.3259
	5.00	-3.8672	1.21680	0.116	-8.2625	0.5280
	6.00	0.1445	1.21680	1.000	-4.2507	4.5397
	7.00	1.0580	1.21680	0.998	-3.3372	5.4532
	8.00	0.6629	1.21680	1.000	-3.7323	5.0581
	10.00	1.1825	1.21680	0.995	-3.2127	5.5778
	11.00	1.0184	1.21680	0.998	-3.3769	5.4136

10.00	1.00	-0.7701*	1.21680	1.000	-5.1653	3.6251
	2.00	-8.0084	1.21680	0.000	-12.4036	-3.6131
	3.00	-0.2065*	1.21680	1.000	-4.6017	4.1888
	4.00	-10.9037	1.21680	0.000	-15.2989	-6.5084
	5.00	-5.0498	1.21680	0.016	-9.4450	-0.6545
	6.00	-1.0380	1.21680	0.998	-5.4333	3.3572
	7.00	-0.1245	1.21680	1.000	-4.5198	4.2707
	8.00	-0.5196	1.21680	1.000	-4.9149	3.8756
	9.00	-1.1825	1.21680	0.995	-5.5778	3.2127
	11.00	-0.1642	1.21680	1.000	-4.5594	4.2311
	11.00	1.00	-0.6059*	1.21680	1.000	-5.0012
2.00		-7.8442*	1.21680	0.000	-12.2394	-3.4490
3.00		-0.0423	1.21680	1.000	-4.4375	4.3529
4.00		-10.7395	1.21680	0.000	-15.1347	-6.3443
5.00		-4.8856*	1.21680	0.022	-9.2808	-0.4904
6.00		-0.8739*	1.21680	1.000	-5.2691	3.5214
7.00		0.0396*	1.21680	1.000	-4.3556	4.4349
8.00		-0.3555*	1.21680	1.000	-4.7507	4.0398
9.00		-1.0184*	1.21680	0.998	-5.4136	3.3769
10.00		0.1642*	1.21680	1.000	-4.2311	4.5594

\*La diferencia media es significativa al nivel de 0.05.

# C.Anexo: Folletos para la detección de proteínas transgénicas mediante la técnica de ELISA utilizando kits comerciales de la marca Agdia®.

**Roundup Ready® CP4 EPSPS**  
PathoScreen kit for the detection of CP4 EPSPS protein  
Peroxidase Label  
Catalog number: PSP 74000

## Intended use

This kit is intended for seed quality purposes to determine the presence of the CP4 EPSPS protein in seed and leaves of corn, cotton, soybean and other crops. The expression of CP4 EPSPS transgenic protein in plants results in Roundup® herbicide resistance. Roundup® is a broad spectrum herbicide used to control weeds.

Currently this test is approved for use in cotton and corn. Using this test system, you can reliably detect 1 transgenic CP4 EPSPS seed in 1000 seeds (0.1%) and 1 transgenic CP4 EPSPS leaf in 100 leaves (1%) of cotton and corn.

## Test principle

This test is a double-antibody sandwich (DAS) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The anti-CP4 EPSPS antibody is coated to the testwells of a microplate. Extracted samples are added to the antibody coated testwells. If CP4 EPSPS protein is present in the sample, the coated antibody on the microplate captures the protein. The plate is then washed to remove all unbound material. An enzyme conjugate, consisting of anti-CP4 EPSPS antibody chemically linked to an enzyme, is added to detect any captured protein. The antibody portion of the conjugate will bind to captured protein on the plate. The plate is washed again to remove any unbound conjugated antibody. Finally, a substrate is added to the plate. If any enzyme is present a color will be produced signifying the presence of CP4 EPSPS protein. The color reaction is usually read with a spectrophotometer, or may be scored visually.

## Precautions

Prevent direct skin and eye contact with, or ingestion of, kit components. Obtain medical attention in case of accidental ingestion of kit components. Always wash hands thoroughly after using the kit. Please read these instructions carefully before performing the test.

## Limitations

Prepare only the amount of 1X buffers needed for the day. Dilute only the amount of enzyme conjugate necessary at the time of each test run. Do not store 1X buffers.

## Preparing for the test

Familiarize yourself with the kit components. Check that all components are present in the kit (refer to content list on page 1).

### Prepare buffers

Prepare PBST wash buffer, MEB sample extract buffer, and ECM conjugate buffer according to the instructions on the back page. Prepare just enough buffers for one day.

### Prepare testwells

If less than a full 96-well plate is used, remove any unused strips and seal them in the foil pouch with the desiccant and store at 4C. Using a permanent marker, number the strips in case a strip becomes separated from the frame.

Fold a paper towel to fit inside an airtight plastic box. Lay the folded paper towel in the bottom of the box, and then put in just enough water to wet the paper towel. Keeping the plate in this humid box during incubation steps will help prevent samples from evaporating.

Make a copy of the loading diagram and record the locations of your samples and controls.

**Roundup Ready® CP4 EPSPS**

PathoScreen kit for the detection of CP4 EPSPS protein  
Peroxidase Label  
Catalog number: PSP 74000

**Prepare samples**

Leaves, seedlings, or seeds must be ground and diluted in MEB sample extraction buffer. For best results, samples should be diluted in MEB buffer according to the ratios listed in the table below. After samples have been ground in buffer, let the extract sit for at least 30 seconds.

Crop	LEAF to MEB buffer ratio (weight/volume)	SEED to MEB buffer ratio (weight/volume)
Corn	1:10	1:2
Cotton	1:20	1:20
Soybean	1:20	1:20

Sample grinding in  
Agdia sample  
extraction  
Bags

**Leaf extraction**

For leaf samples use Agdia's disposable sample extraction bags, a clean mortar and pestle, or any other grinding device to help extract samples.

**Individual leaves**

A simple method for grinding a single leaf sample is by using Agdia's special sample extraction bags (Catalog No. ACC 00930). Use only one sample per bag and be sure to label each bag. Add the appropriate volume of buffer to an empty bag. A recommended 1:20 dilution, would require a 0.15 g leaf sample and 3 ml of buffer. Place the sample between the mesh linings of the pouch. Rub the pouch with a pen to completely crush the sample and to mix the contents uniformly.

Cork borer and leaf  
disc

**Multiple leaves**

For composite leaf samples (up to 100 leaves), taking a representative leaf disc or leaf punch is recommended. Stack the leaves on a clean surface and using a No. 2 cork borer (Fisher Scientific Catalog No. 07-845C) punch through the leaves to produce 100 leaf discs. Dislodge the discs from the cork borer with a clean metal wire, weigh and transfer the discs into Agdia's disposable sample extraction bags and extract in buffer according to the recommended ratios. The weight of the discs varies with the growing conditions, age, and variety of the plant. Determine the average weight of the leaf discs and add the appropriate volume of buffer.

Crop	LEAF to MEB buffer ratio (weight/volume)	Approximate weight of 100 discs	Volume of MEB Buffer
Corn	1:10	0.2 grams	2 ml
Cotton	1:20	0.2 grams	4 ml
Soybean	1:20	0.1 grams	2 ml

## Roundup Ready® CP4 EPSPS

PathoScreen kit for the detection of CP4 EPSPS protein

Peroxidase Label

Catalog number: PSP 74000

### Seed extraction

#### Single seeds

Single seeds can be crushed with a seed crusher or hammer. Determine the average weight of the seed and add the appropriate volume of MEB buffer. Let the extract sit for at least 30 seconds before testing with the ELISA.

#### Multiple seeds

For seed samples to be tested at 0.1% sensitivity level, it is recommended to use Osterizer® blender with "Mason" type jars to accommodate 1000 seeds. However, depending on the sample size other devices like coffee grinders, ball mill, other blenders, or seed crusher may be used to grind the samples. The guidelines provided are optimized for Osterizer® blender with "Mason" type jars.

Put the seed sample in a dry "Mason" jar and assemble the blade attachment. Grind the seed at high speed for about 45-60 seconds or until all the seeds are ground to a powder. Remove the jar from the blender and tap to collect all the powder. Shake the jar to mix and check for any unground seed.

Transfer the ground powder to a container and weigh the specified amount (sub sample) from the following table to a 500 ml disposable bottle. Add the buffer at the specified ratio, close the lid and shake the bottle for 10-15 seconds. Let the extract sit for at least 30 seconds before testing with the ELISA. Use only the supernatant (top layer of liquid) for testing.

Crop	SEED to MEB buffer ratio (weight/volume)	Sub sample weight	Volume of MEB Buffer
Corn	1:2	50 grams	100 ml
Cotton	1:20	20 grams	400 ml
Soybean	1:20	20 grams	400 ml

**Note:**  
It is very important to clean all the grinding equipment between the samples. Wash the equipment with detergent, rinse well, and completely dry with paper towel. Wiping the grinding device and work area with 20% methanol is also recommended between samples

### Prepare controls

#### Make control aliquots

Reconstitute the bottle of lyophilized positive control and negative control with 2.0 ml MEB sample extract buffer. The concentration of the reconstituted control is about 1% CP4 EPSPS seed.

After preparing the positive and negative control, divide them into aliquots, each sufficient for one use. Dispense aliquots into tubes that can be securely capped. Dispense 120 µl if one well is used for positive control or 220 µl if two wells are used per test. Each aliquot should be sufficient for the tests to be run plus a small additional volume to assure easy dispensing.

**Note:**  
Do not refreeze controls

Control aliquots must be stored frozen (-20C freezer or household freezer). Do not thaw until just before use. At the time of each test run, remove from storage only the aliquots that will be used. Allow the tubes to thaw, then mix the contents thoroughly. At the time you add sample extracts to testwells, add the same volume of negative and positive control to the appropriate control wells.



**Roundup Ready® CP4 EPSPS**  
 PathoScreen kit for the detection of CP4 EPSPS protein  
 Peroxidase Label  
 Catalog number: PSP 74000

**Test Procedure**

1. Dispense samples/controls  
 Following your loading diagram, dispense 100 µl of each prepared sample into the appropriate testwells of the ELISA plate. Add 100 µl of positive and negative control into the appropriate testwells.
2. Incubate plate  
 Set the plate inside the humid box and incubate for 1 hour at room temperature or overnight in the refrigerator (4°C).
3. Wash plate  
 When the incubation with the sample is complete, wash the plate. While squeezing the long sides of the frame to hold the strips in place, use a quick flipping motion to empty the contents of the wells into a sink or waste container. Fill all the wells to overflowing with 1X PBST wash buffer, and then quickly empty them again. Repeat 6-7 times.  
  
 If using an automatic plate washer, please be sure that the machine is set to properly wash the flat bottomed plates of this kit.
4. Soak plate  
 Fill each well with 1X PBST wash buffer and allow to sit for 3 minutes.  
  
 Empty the wells with a quick flipping motion. Then hold the frame upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove the remaining drops of buffer from the wells.
5. Dilute enzyme conjugate  
 The peroxidase enzyme conjugate is concentrated and must be diluted with ECM buffer before use. The total volume of ECM buffer required depends on the number of testwells used. 100 µl will be needed for each testwell, plus a small additional volume for liquid handling. Dilute only the amount of peroxidase enzyme conjugate needed for your test run. For example, if the dilution given on the label is 1:100, and you are preparing 10 ml of working enzyme conjugate, you should first measure 10 ml of ECM conjugate buffer, then add 100 µl of peroxidase enzyme conjugate. Mix the enzyme conjugate thoroughly.  
  
**Note:**  
 Always prepare enzyme conjugate within 10 minutes before use.
6. Add enzyme conjugate  
 Dispense 100 µl of prepared enzyme conjugate per well.
7. Incubate plate  
 Set the plate inside the humid box and incubate one hour at room temperature.
8. Wash plate  
 When the second incubation is complete, wash the plate. While squeezing the long sides of the frame to hold the strips in place, use a quick flipping motion to empty the contents of the wells into a sink or waste container. Fill all the wells to overflowing with 1X PBST wash buffer, and then quickly empty them again. Repeat 6-7 times.  
  
 If using an automatic plate washer please be sure that the machine is set to properly wash flat bottomed plates.
9. Soak plate  
 Fill each well with 1X PBST wash buffer and allow to incubate for 3 minutes. Remove the plate from the humid box. Empty the wells with a quick flipping motion. Then hold the frame upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove the remaining drops of buffer from the wells.

## Roundup Ready<sup>®</sup> CP4 EPSPS

PathoScreen kit for the detection of CP4 EPSPS protein  
Peroxidase Label  
Catalog number: PSP 74000

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| 10. Add substrate solution | Add 100 µl of the TMB substrate solution into each well of the plate.  |
| 11. Incubate plate         | Incubate the plate for 20 minutes in a humid box.  |
| 12. Measure color          | Measure the optical density of the testwells on a plate reader at 650 nm or visually. Wells in which a blue color develops indicate positive results. Wells that remain clear or very light blue indicate negative results. If either control well does not show the appropriate color, disregard results. |

### Interpreting results

Data gathered from validation tests performed by several operators in different labs on a variety of cotton lines was used to determine the following positive and negative cutoff O.D. values.

Optical Density	Test Result
Greater than 0.3	Positive
Less than 0.1	Negative
Between 0.1 – 0.3	Indeterminate result, requires more analysis

To interpret samples in the indeterminate OD range and to perform a more discriminating analysis of your data, perform the following analysis:

Sort all of the data from a single microplate into a series of increasing OD values. Plot the OD values either as a histogram or x,y scatter plot with no x axis input. From the plots determine visually the OD value of the high end of the apparent negative sample population. Compute the average [Avg] and standard deviation [SD] for the apparent negative population from the sorted data.

Then, positive sample OD (ODpos) should be  $> [\text{Avg}] + 4 \times [\text{SD}]$ .

After computing an ODpos threshold, check the ODpos determined above for consistency with the generated histogram and with known samples.

### Test Performance

This test shows no cross-reaction with Bt-Cry1Ab, Bt-Cry1Ac, Bt-Cry1C, Bt-Cry1F, Bt-Cry2A, Bt-Cry3A, or Bt-Cry9C.

A total of 1750 transgenic CP4 EPSPS seed (0.1%) and leaf samples (1%) and 1750 conventional CP4 EPSPS seed and leaf samples were tested by several operators using 3 separate plate and antibody conjugate lots of product. The results showed no false positives or false negatives.

### Technical Service

If you have any questions about using this kit, please contact Agdia, Inc. Monday - Friday by phone at 1-800-622-4342, 574-264-2014, or by e-mail at [info@agdia.com](mailto:info@agdia.com).

## Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA Kit

DAS ELISA for the detection of Bt-Cry1Ab/1Ac proteins  
Catalog number: PSP 06200

### List of contents

Lot number	Item	96 wells	288 wells	480 wells	4800 wells
	Antibody-coated 96-well microtiter plates	1 strip	3 strip	5 strip	50 solid
	Peroxidase enzyme conjugate, concentrated	0.150 ml	0.350 ml	0.550 ml	5 X 1.1 ml
	RUB6 enzyme conjugate diluent	15 ml	33 ml	55 ml	5 X 110 ml
	TMB substrate solution	25 ml	40 ml	60 ml	550 ml
	Positive control	1	1	1	5
	<i>The above items should be stored at 4 °C</i>				
	PBST wash buffer, powder or liquid	3	5	7	3 X 110 g
	<i>The above items should be stored at room temperature</i>				

### Materials required, but not provided

Some of the items in the list below may be necessary depending on the type of samples and the method necessary to process the samples. Please refer to sample preparation section for guidance.

- Distilled or purified water
- Paper towels
- Micropipette
- Micropipette tips
- Airtight container for incubations
- Negative control (Catalog number: LNC 06200 – Please specify seed or leaf tissue when ordering.)
- Seed and leaf extraction equipment.
  - Seed press or seed crusher and plate
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930) and rubber mallet
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930) and marker with bag stand
  - Mortar and pestle
  - Micro tube and pestle with tube rack
- Graduated cylinder
- Analytical Balance
- Micro tubes and tube rack
- Plate reader with 650 nm filter

### Storing the reagents

Store all kit components at the recommended temperature (above) to assure their full shelf life. Each ELISA plate pouch contains a desiccant packet. Keep the plate or unused testwells sealed in the pouch with the desiccant and store in the refrigerator (4 °C) between uses. Allow the components of the kit to warm to room temperature for about 30 minutes before using.

Once the concentrated enzyme conjugate has been diluted to 1X in RUB6, it can be stored for 2 weeks in the refrigerator (4 °C).

### Technical service

If you have any questions about using this kit, please contact Agdia, Inc. Monday – Friday by phone (574-264-2014 or 800-622-4342) or by email ([info@agdia.com](mailto:info@agdia.com)).



## Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA Kit

DAS ELISA for the detection of Bt-Cry1Ab/1Ac proteins  
Catalog number: PSP 06200

### Precautions

Prevent direct skin and eye contact with, or ingestion of, product components. Obtain medical attention in case of accidental ingestion of kit components. It is recommended that gloves be worn while performing the assay. Always wash hands thoroughly after using this product.

Please read these instructions carefully before performing the test.

### Intended Use

This kit is used to detect the presence of Bt-Cry1Ab protein or the Bt-Cry1Ac protein expressed in transgenic crops. The test does not distinguish between Bt-Cry1Ab and Bt-Cry1Ac proteins. This assay is suitable for testing both seed and leaf.

This test shows no cross-reaction with Bt-Cry1F, Bt-Cry2A, Bt-Cry9C, EPSPS (Roundup Ready® events GA21 and NK603), or PAT (Liberty Link®).

*Liberty Link® is a registered trademark of Bayer.*

*Roundup Ready® is a registered trademark of Monsanto.*

### Test Principle

The test system for Bt-Cry1Ab/Bt-Cry1Ac is a direct Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA. Antibodies specific to Bt-Cry1Ab/Bt-Cry1Ac have been coated to the testwells of a microplate. If Bt-Cry1Ab protein or Bt-Cry1Ac protein is present in the sample, some of it is bound by the antibodies and captured on the microplate. An enzyme conjugate, consisting of an antibody chemically linked to an enzyme, is added to detect any captured protein. The antibody portion of the conjugate will bind to captured protein on the plate.

After a short incubation the microplate is washed to remove any unbound enzyme conjugate and sample. TMB substrate is added to the microplate. If the peroxidase conjugate is present a color will be produced signifying the presence of Bt-Cry1Ab or Bt-Cry1Ac. The color reactions must be measured using a spectrophotometer and results interpreted.

### Limitations

The following is a description of factors that could limit test performance or interfere with proper test results.

**Expiration:** Test components expire one year from date of purchase.

**Storage:** Test results may be weak or the test may fail if the storage instructions are not followed properly.

**Sample Extraction Buffer:** The Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA must be used with 1X PBST wash buffer for optimal results. Do not use sample extraction buffers used with other ELISA kits.

**Sample Dilution:** ELISA performance is very dependent on the proper sample (tissue weight in g: buffer volume in ml) dilution.

**Substrate Solutions:** Protect substrate solutions from light. Light or contamination could cause background color in negative wells.

**Timing:** Please follow times provided for extraction and incubation. Timings have been optimized to give the best results for both negative and positive samples. **Not adhering to these exact times will interfere with achieving proper test results.**

**Event 176:** Bt-Cry1Ab protein levels are low in corn seeds of Event 176. It is recommended that corn seeds of Event 176 be germinated and the seedlings tested using this assay.

### Preparing for the test

Familiarize yourself with the kit components and check that all components are present in the kit. Please read these instructions carefully before performing the test.

### Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA Kit

DAS ELISA for the detection of Bt-Cry1Ab/1Ac proteins  
Catalog number: PSP 06200

<b>Prepare buffers</b>	Prepare only as much 1X buffers that will be needed for one day.				
<b>PBST wash buffer</b>	PBST is used as wash buffer and sample extraction buffer. PBST is supplied as either 20X concentrate or as a powder.				
20X concentrate	Prepare 1X PBST wash buffer by diluting one 20X pouch of PBST wash buffer with 950 ml of distilled water.				
powder	Prepare 1X buffer by dissolving PBST buffer powder in distilled water according to the table below:				
	<table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Buffer powder</td> <td style="text-align: right;">5 g</td> </tr> <tr> <td>Distilled water</td> <td style="text-align: right;">500 ml</td> </tr> </table>	Buffer powder	5 g	Distilled water	500 ml
Buffer powder	5 g				
Distilled water	500 ml				
<b>Prepare controls</b>	Reconstitute lyophilized positive control and lyophilized negative control with 2.0 ml 1X PBST wash buffer per bottle.				
<b>Make control aliquots</b>	<p>After preparing the positive and negative control, divide them into aliquots, each sufficient for one use. Dispense aliquots into tubes that can be securely capped. If you will be using a control in one well each time you run the test, prepare 120 <math>\mu</math>l aliquots. If you will be using a control in two wells, prepare 220 <math>\mu</math>l aliquots. Each aliquot should be sufficient for the tests to be run plus a small additional volume to assure easy dispensing.</p> <p>Control aliquots must be stored frozen (-20°C freezer or household freezer). Do not thaw until just before use. At the time of each test run, remove from storage only the aliquots that will be used. Allow the tubes to thaw and mix the contents thoroughly. At the time you add sample extracts to testwells, add the same volume of negative and positive control to the appropriate control wells.</p> <p>Do not refreeze controls.</p>				
<b>Prepare testwells</b>	<p>If you will be using less than a full 96-well plate, remove any unused strips and seal them in the foil pouch with the desiccant. Using a permanent marker, number the strips in case a strip becomes separated from the frame.</p> <p>Prepare a humid box by lining an airtight container with a wet paper towel. Keeping testwells in a humid box during incubation will help prevent samples from evaporating.</p> <p>Make a copy of the loading diagram and record the locations of your samples and controls. We recommend that you use a buffer well, negative control well and positive control well on each plate each time you run the test.</p>				
<b>Grind and dilute samples</b>					
<b>Leaf Samples</b>	Grind leaf in 1X PBST wash buffer at a ratio of 1:10 (tissue weight in g: buffer volume in ml). Leaves can be ground in Agdia mesh sample bags (ACC 00930) or with a mortar and pestle. If using a mortar and pestle be sure to wash and rinse it between samples.				

## Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA Kit

DAS ELISA for the detection of Bt-Cry1Ab/1Ac proteins  
Catalog number: PSP 06200

### Seed Samples

Weigh and record the average weight of each sample. Thoroughly crush seeds into a uniform powder. Single seeds can be crushed in a seed crusher or with a hammer. Wash and rinse the grinding equipment between samples.

Dilute the crushed seed sample in 1X PBST buffer at a ratio of 1:10 (tissue weight in g: buffer volume in ml), typically 1 seed in 3 ml of buffer. Mix the seed powder and buffer, and let stand for at least 5 minutes at room temperature.

Use only the supernatant (liquid layer) when adding sample extracts to testwells.

### Test Procedure

#### 1. Prepare enzyme conjugate

The enzyme conjugate is concentrated (100X) and must be diluted with RUB6 enzyme conjugate diluent before use. Prior to use gently shake each vial 10 seconds or vortex for 5 seconds before using.

*Add 110 µl of concentrated enzyme conjugate to 11 ml of RUB6 diluent, this will be sufficient for 1 plate.*

*Add 1.1 ml of concentrated enzyme conjugate to 110 ml of RUB6 diluent, this will be sufficient for 10 plates.*

Mix the enzyme conjugate thoroughly before adding it to the plate.

Any unused conjugate must be stored in the refrigerator and used within two weeks of diluting.

#### 2. Add enzyme conjugate

Dispense 100 µl of enzyme conjugate per well.

#### 3. Dispense samples and controls

Following your loading diagram, dispense 100 µl of each prepared sample into the appropriate testwells of the ELISA plate. Add 100 µl of each positive and negative control into the appropriate testwell. Mix the contents of the wells by gently swirling the plate on the bench-top.

#### 4. Incubate plate

Set the plate inside the humid box and incubate 2 hours at room temperature or overnight in the refrigerator (4° C).

#### 5. Wash plate

When the incubation with the sample and enzyme conjugate is complete, empty the testwells into a sink or waste container without allowing the contents of one testwell to mix with the contents of another testwell.

Fill all the testwells completely with 1X PBST, and quickly empty. Repeat 7 times. It is very important that all testwells are thoroughly washed. After washing, hold the plate upside down and tap firmly on a paper towel to remove any excess liquid.

Note: If using an automatic plate washer, please be sure that the machine is at the appropriate setting for washing flat bottom plates and at a wash volume of 300 µl per testwell.

#### 6. Add TMB substrate solution

Add 100 µl of the TMB substrate solution into each well of the plate.

#### 7. Incubate plate

Incubate the plate for 20 minutes.

**Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA Kit**DAS ELISA for the detection of Bt-Cry1Ab/1Ac proteins  
Catalog number: PSP 06200**8. Evaluate results**

Measure the optical density of the testwells on a plate reader at 650 nm or visually. Wells in which a blue color develops indicate positive results. Wells in which there is no significant color development indicate negative results. Test results are valid only if positive control wells give a positive result and buffer wells remain colorless.

**Buffer Formulations****PBST Buffer (Wash Buffer) (1X)**

Dissolve in distilled water to 1000 ml:

Sodium chloride	8.0 g
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 g
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2 g
Potassium chloride	0.2 g
Tween-20	0.5 g

Adjust pH to 7.4

## Bt-Cry34Ab1 ELISA Kit

Quantitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry34Ab1 transgenic protein

Catalog number: PSP 11500

### List of contents

Lot number	Item	96 wells	288 wells	480 wells
_____	Antibody-coated 96-well microtiter plates	1	3	5
_____	Peroxidase enzyme conjugate, concentrated	0.150 ml	0.350 ml	0.550 ml
_____	RUB6, enzyme conjugate diluent	15 ml	33 ml	55 ml
_____	TMB substrate solution	25 ml	40 ml	60 ml
_____	Positive control	1	1	1
	The above items should be stored at 4°C			
_____	PBST wash buffer	3	5	7
	The above items should be stored at room temperature.			

### Materials required, but not provided

Some of the items in the list below may be necessary depending on the type of samples and the method necessary to process the samples. Please refer to sample preparation section for guidance.

- Distilled or purified water
- Paper towels
- Micropipette
- Micropipette tips
- Airtight container for incubations
- Negative control (Agdia catalog number: LNC 11500 - *Please specify leaf or seed control when ordering.*)
- Scissors, marker, timer
- Additional sample extraction buffer (PBST Agdia catalog number: ACC 00501) will be required if most of the samples tested are grain samples.
- Seed and leaf extraction equipment.
  - Seed press or seed crusher and plate
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930) and rubber mallet
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930) and marker with bag stand
  - Mortar and pestle
  - Micro tube and pestle with tube rack
  - Graduated cylinder
  - Analytical balance
  - Micro tubes and tube rack
- Supplemental full grind sampling equipment.
  - Blender and accessories
    - Blender (at least 450 watts)—optimal results were obtained using an Osterizer® blender at high speed (Sunbeam Corporation Model Number 6641, 1-800-597-5978)
    - Blender jars 125ml, Nalgene ("Mason" type, Fisher Scientific Catalog Number 11-815-10C)
    - Blender blade pack assembly (Oster® Sunbeam Product Catalog Number 4961)
    - Threaded bottom cap (Oster® Sunbeam Product Catalog Number 4902)

### Storing the reagents

Store all kit components at the recommended temperature (above) to assure their full shelf life. Each ELISA plate pouch contains a desiccant packet. Keep the plate or unused testwells sealed in the pouch with the desiccant and store in the refrigerator (4°C) between uses. Allow the components of the kit to warm to room temperature for about 30 minutes before using.



## Bt-Cry34Ab1 ELISA Kit

Quantitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry34Ab1 transgenic protein  
Catalog number: PSP 11500

### Safety

Prevent direct skin and eye contact with, or ingestion of, kit components. Obtain medical attention in case of accidental ingestion of kit components. Always wash hands thoroughly after using the kit. It is recommended that gloves be worn when handling the enzyme conjugate solution.

### Intended Use

This kit has been validated and approved by Dow AgroSciences® for the quantitative analysis of the HERCULEX® RW trait.

*HERCULEX® RW is a registered trademark of Dow AgroSciences LLC.*

### Test Principle

The test system for Bt-Cry34Ab1 is a direct DAS ELISA. Polyclonal antibodies specific to Bt-Cry34Ab1 are coated to the testwells of a microplate. An enzyme conjugate solution has been included in this kit containing monoclonal antibodies specific to Bt-Cry34Ab1 conjugated to a peroxidase enzyme. Enzyme conjugate is added to the testwells followed by sample extracts. If Bt-Cry34Ab1 is present in the sample, it is bound by the antibodies and captured on the microplate. The plate is then washed to remove any unbound enzyme conjugate and sample. Finally, a substrate is added to the microplate. If peroxidase is present, a color will be produced signifying the presence of Bt-Cry34Ab1. The color reaction can be measured with a plate reader or observed visually.

Please read these instructions carefully before performing the test.

### Limitations

The following is a description of factors that could limit test performance or interfere with proper test results.

**Buffers:** Prepare only the amount of 1X buffers needed for the day. Dilute only the amount of enzyme conjugate necessary at the time of each test run. Do not store 1X buffers.

**Samples:** This test has been evaluated in corn only.

**Sample Extraction Buffer:** The Bt-Cry34Ab1 ELISA must be used with 1X PBST wash buffer for optimal results. Do not use sample extraction buffers used with other ELISA kits.

**Sample Dilution:** ELISA performance is very dependent on the proper sample dilution (tissue weight in g: buffer volume in ml).

**Expiration:** Test should be used within 6 months from date of purchase.

**Storage:** Test results may be weak or the test may fail if the storage instructions are not followed properly.

**Timing:** Please follow as closely as possible the recommended incubation times. Timings have been optimized to give the best results for both negative and positive samples. **Note: Please follow tables provided for extraction and incubation times. Not adhering to these exact times will interfere with achieving proper test results.**

### Technical service

If you have any questions about using this kit, please contact Agdia, Inc. Monday – Friday by phone (574-264-2014 or 800-622-4342) or by email ([info@agdia.com](mailto:info@agdia.com)).

## Bt-Cry34Ab1 ELISA Kit

Quantitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry34Ab1 transgenic protein  
Catalog number: PSP 11500

### Preparing for the test

Familiarize yourself with the kit components and check that all components are present in the kit.

#### Prepare buffer

Concentrated PBST is used as wash buffer and sample extraction buffer. PBST is supplied as either 20X concentrate or as a powder.

**20X concentrate** Prepare PBST wash buffer by diluting one 20X pouch of PBST wash buffer with 950 ml of distilled water.

**powder** Prepare 1X buffer by dissolving PBST buffer powder in distilled water according to the table below.

Buffer	5 g
Distilled water	500 ml

#### Hydrating control & Preparing standard curve

Each positive control is supplied with a technical note stating the average concentration of the supplied lot. Please make sure you have this information before proceeding as the concentration can vary between manufactured lots.

It is recommended that these controls be used only once. Do not aliquot and refreeze.

Hydrate the control with 2 ml of 1X PBST, recap and thoroughly mix by shaking or vortexing. Be sure to invert the bottle with the cap on to ensure that any protein attached to the cap during lyophilization has a chance to solubilize. After hydration, begin preparing your standard curve. It is recommended that you produce a five point curve starting at 20 ng/ml and dilute to 1.25 ng/ml.

All points in the standard curve should be plated at least in duplicate for the test to be valid. For more accurate results it is recommended to perform this 1:1 dilution outside of the testwell in an appropriate micro dilution tube using a minimum of 400 µl of total transfer per concentration.

#### Prepare testwells

All samples to be tested should be plated at least in duplicate for the test to be valid.

If you will be using less than a full 96-well plate, remove any unused strips and seal them in the foil pouch with the desiccant. Using a permanent marker, number the strips in case a strip becomes separated from the frame.

Prepare a humid box by lining an airtight container with a wet paper towel. Keeping testwells in a humid box during incubation will help prevent samples from evaporating.

Make a copy of the loading diagram and record the locations of your samples and controls. We recommend that you use a buffer well, negative control well and positive control well on each plate each time you run the test.

### Preparing Leaf and Seed Samples

Leaves, seedlings, or seeds must be ground and diluted in 1X PBST sample extraction buffer. For best results, samples should be diluted in 1X PBST buffer according to the ratios and times listed in the table below.

## Bt-Cry34Ab1 ELISA Kit

Quantitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry34Ab1 transgenic protein  
Catalog number: PSP 11500

### Leaves



Sample grinding in Agdia sample mesh bags.

For leaf samples use Agdia's sample mesh bags, a clean mortar and pestle, or any other grinding device that can break up leaf tissues and prevent contamination between samples.

A simple method for grinding a single leaf sample is by using Agdia's sample mesh bags. Use only one sample per bag and be sure to label each bag. Place the leaf sample between the mesh linings of the bag. Rub the bag with a marker to completely crush the sample and to mix the contents uniformly. Add the appropriate volume of 1X PBST buffer to the bag containing the crushed leaf following a 1:50 (tissue weight in g: buffer volume in ml) leaf to buffer ratio and massage the bag by hand for a few seconds to ensure good extraction. Let the extract sit for 3 minutes before the next dilution in 1X PBST at 1/20. Transfer diluted sample to the testwells of the ELISA plate.

Leaf Tissue	Sample to buffer ratio	Extraction Time
1 <sup>st</sup> dilution	1:50 g:ml	3 minutes
2 <sup>nd</sup> dilution	1:20 ml:ml	0 minutes
<b>Example</b>		
1 <sup>st</sup> dilution 1:50		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 3 ml of 1X PBST to a ground leaf sample weighing 0.06 g.</li> <li>• Mix and allow the extract to sit for 3 minutes.</li> </ul>		
2 <sup>nd</sup> dilution 1:20		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer 0.5 ml of extract to a tube containing 9.5 ml of 1X PBST.</li> </ul>		

### Seeds

#### Single seed

Single seeds can be crushed in a seed press, seed crusher or sample mesh bag and rubber mallet. Wash and rinse the grinding equipment between samples.

Determine the weight of the seed. Crush and add the appropriate volume of 1X PBST buffer following a 1:50 (tissue weight in g: buffer volume in ml) seed to buffer ratio. Mix or massage for a few seconds to ensure good extraction. Let the extract sit for 3 minutes before the next dilution in 1X PBST at 1/30. Transfer diluted sample to the testwells of the ELISA plate.

#### Fully ground seed

Put the seed sample (minimum of 25 seeds) in a dry "Mason" jar and assemble the blade attachment. A 125 ml jar is recommended for 25 seeds. Grind the seed at high speed for about 60 seconds. Remove the jar from the blender and tap to collect all the powder. Shake the jar to mix and check for any unground seeds. Weigh a determined amount of ground seed. Extract and test as for crushed single seed.

Seed Tissue	Sample to buffer ratio	Extraction Time
1 <sup>st</sup> dilution	1:50 g:ml	3 minutes
2 <sup>nd</sup> dilution	1:30 ml:ml	0 minutes
<b>Example</b>		
1 <sup>st</sup> dilution 1:50		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 15 ml of 1X PBST to a ground seed weighing 0.30 g</li> <li>• Mix and allow the extract to sit for 3 minutes.</li> </ul>		
2 <sup>nd</sup> dilution 1:30		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer 0.5 ml of extract to a tube containing 14.5 ml of 1X PBST.</li> </ul>		

#### Cleaning:

It is very important that the grinding equipment and workspace is cleaned well between each sample extraction. Wash blades, threaded caps and jars with detergent making sure all ground material is washed away. Be especially careful to clean crevices of the blade. Any remaining powder can contaminate the next sample.

#### Grinding:

Seed grinding guidelines described in this instruction are optimized for an Osterizer® blender with a power rating of 450 watts. Blenders of lower power may require a longer grinding time. Other devices like coffee grinders or ball mills may also be used to grind the seeds. Visually check that all seed has been ground to a fine powder.



## Bt-Cry34Ab1 ELISA Kit

Quantitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry34Ab1 transgenic protein  
Catalog number: PSP 11500

### Test Procedure

#### 1. Prepare enzyme conjugate

The enzyme conjugate is concentrated (100X) and must be diluted with RUB6 enzyme conjugate diluent before use. Prior to use gently shake each vial 10 seconds or vortex for 5 seconds before using. Dilute only what is needed for one day.

*Add 110 µl of concentrated enzyme conjugate to 11 ml of RUB6 diluent, this will be sufficient for 1 plate.*

Mix the enzyme conjugate thoroughly before adding it to the plate.

Any unused conjugate must be stored in the refrigerator and used within two weeks of diluting.

#### 2. Add enzyme conjugate

Dispense 100 µl of enzyme conjugate per well.

#### 3. Dispense samples, controls, and buffer

Following your loading diagram, dispense 100 µl of each prepared sample into sample wells. Dispense 100 µl of positive control into the positive control wells, 100 µl of negative control into the negative control wells, and 100 µl of 1X PBST buffer into the buffer wells.

Mix the contents of the wells by gently swirling the plate on the bench-top.

#### 4. Incubate plate

Set the plate inside the humid box and incubate at room temperature. Use the table to determine appropriate time for sample type.

Leaf Sample	Seed Sample
60 minutes	60 minutes

#### 5. Warm TMB substrate solution

About 15 minutes before the end of the above incubation step, measure the required amount of TMB substrate needed. Return the remaining TMB substrate to the refrigerator. Allow measured TMB substrate to warm to room temperature. Caution: TMB substrate is light sensitive, extra precautions are necessary to protect it from light sources when warming to room temperature.

You will need 100 µl of substrate for each testwell you are using. To estimate the volume needed, measure 1 ml for each 8 well strip used. A full plate will require about 10 ml.

## Bt-Cry34Ab1 ELISA Kit

Quantitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry34Ab1 transgenic protein  
Catalog number: PSP 11500

### 6. Wash plate

When the sample incubation is complete, wash the plate. Use a quick flipping motion to dump the wells into a sink or waste container without mixing the contents.

Fill all the wells completely with 1X PBST, and then quickly empty them again. Repeat 7 times.

After washing, hold the frame upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove all droplets of wash buffer.

**Note: If using an automatic plate washer, please be sure that the machine is at the appropriate settings for washing flat bottom plates.**

### 7. Add TMB substrate solution

Add 100 µl of the TMB substrate solution into each well of the plate.

Let the plate incubate according to the table below. Assure testwells are protected from strong light.

Leaf Sample	Seed Sample
30 minutes	30 minutes

### 8. Evaluate results

Measure O.D.'s on a plate reader at 650 nm. Air bubbles which are present at the time of reading can alter results, if in the light path. Agdia recommends that bubbles be eliminated prior to reading.

Wells in which a blue color develops indicate positive results. Wells in which there is no significant color development indicate negative results. Test results are valid only if positive control wells give a positive result and buffer wells remain colorless.

If either control well does not show the appropriate color, please repeat the test procedure. If the problem persists, contact Agdia for further assistance.

Optional: Stop solution may be added to terminate the peroxidase/TMB reaction. Add 1N HCl at 100 µl per testwell. Read at A450 up to one hour after addition. Use of the stop solution may require adjustment of the points on the standard curve or further dilution of the test sample.

### 9. Analyze Results

Replicate OD readings at each point of the standard curve should be averaged and the results analyzed using a second order polynomial fit. The concentration of the Bt-Cry34AB1 trait can then be calculated by referencing this curve.

**NOTE: If the R<sup>2</sup> value is below 0.9950, this could skew the ng/ml protein calculated value.**

### Buffer Formulations

The following buffer is a standard part of your kit. This formulation is for reference only.

#### PBST Buffer (Wash Buffer) (1X)

Dissolve in distilled water to 1000 ml:

Sodium chloride	8.0 g
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 g
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2 g
Potassium chloride	0.2 g
Tween-20	0.5 g

Adjust pH to 7.4

*HERCULEX® RW is a registered trademark of Dow AgroSciences LLC.*

## Bt-Cry1F ELISA Kit

Qualitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry1F transgenic protein  
Catalog number: PSP 10301

### List of contents

Lot number	Item	96 wells	288 wells	480 wells	4800 wells
	Antibody-coated 96-well microtiter plates	1	3	5	50 solid
	Peroxidase enzyme conjugate (1x, ready to use)	11 ml	33 ml	55 ml	550 ml
	TMB substrate solution	25 ml	40 ml	60 ml	550 ml
	Positive control	1	1	1	5
	The above items should be stored at 4°C				
	PBST wash buffer	3	5	7	3 X 110 g
	The above items should be stored at room temperature.				

### Materials required, but not provided

Some of the items in the list below may be necessary depending on the type of samples and the method necessary to process the samples. Please refer to sample preparation section for guidance.

- Distilled or purified water
- Paper towels
- Micropipette
- Micropipette tips
- Airtight container for incubations
- Negative control (Agdia catalog number: LNC 10301 - *Please specify leaf or seed control when ordering.*)
- Scissors, marker, timer
- Additional sample extraction buffer (PBST Agdia catalog number: ACC 00501) will be required if most of the samples tested are grain samples.
- Seed and leaf extraction equipment.
  - Seed press or seed crusher and plate
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930) and rubber mallet
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930) and marker with bag stand
  - Mortar and pestle
  - Micro tube and pestle with tube rack
  - Graduated cylinder
  - Balance 1-500 g
  - Micro tubes and tube rack
- Grain sampling equipment.
  - Balance 1-500 g
  - Blender and accessories
    - Blender (at least 450 watts)—optimal results were obtained using an Osterizer® blender at high speed (Sunbeam Corporation Model Number 6641, 1-800-597-5978)
    - Blender jars 125ml, Nalgene ("Mason" type, Fisher Scientific Catalog Number 11-815-10C)
    - Blender blade pack assembly (Oster® Sunbeam Product Catalog Number 4961)
    - Threaded bottom cap (Oster® Sunbeam Product Catalog Number 4902)

### Storing the reagents

Store all kit components at the recommended temperature (above) to assure their full shelf life. Each ELISA plate pouch contains a desiccant packet. Keep the plate or unused testwells sealed in the pouch with the desiccant and store in the refrigerator (4°C) between uses. Allow the components of the kit to warm to room temperature for about 30 minutes before using.

## Bt-Cry1F ELISA Kit

Qualitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry1F transgenic protein  
Catalog number: PSP 10301

### Safety

Prevent direct skin and eye contact with, or ingestion of, kit components. Obtain medical attention in case of accidental ingestion of kit components. Always wash hands thoroughly after using the kit. It is recommended that gloves be worn when handling the enzyme conjugate solution.

### Intended Use

This kit has been validated and approved by Dow AgroSciences® for the detection of the HERCULEX® trait.

This test system can be used to test individual corn seed and corn leaf or detect as little as 1 transgenic Bt-Cry1F seed in 600 non-gmo corn seeds.

### Test Principle

The test system for Bt-Cry1F is a direct DAS ELISA. Monoclonal antibodies specific to Bt-Cry1F are coated to the testwells of a microplate. An enzyme conjugate solution has been included in this kit containing monoclonal antibodies specific to Bt-Cry1F conjugated to a peroxidase enzyme. Enzyme conjugate is added to the testwells followed by sample extracts. If Bt-Cry1F is present in the sample, it is bound by the antibodies and captured on the microplate. The plate is then washed to remove any unbound enzyme conjugate and sample. Finally, a substrate is added to the microplate. If peroxidase is present, a color will be produced signifying the presence of Bt-Cry1F. The color reaction can be measured with a plate reader or observed visually.

Please read these instructions carefully before performing the test.

### Limitations

The following is a description of factors that could limit test performance or interfere with proper test results.

**Samples:** This test has been evaluated in corn only. The performance of this test with transgenic cotton samples has not been tested.

**Sample Extraction Buffer:** The Bt-Cry1F ELISA must be used with PBST wash buffer for optimal results. Do not use sample extraction buffers used with other ELISA kits.

**Sample Dilution:** ELISA performance is very dependent on the proper sample (tissue weight in g; buffer volume in ml) dilution.

**Expiration:** Test should be used within one year of purchase.

**Storage:** Test results may be weak or the test may fail if the storage instructions are not followed properly.

**Timing:** Please follow as closely as possible the recommended incubation times. Timings for each sample type have been optimized to give the best results for both negative and positive samples. **Note: Please follow tables provided for extraction and incubations times based upon tissue type. Not adhering to these exact times will interfere with achieving proper test results.**

**Color Development:** Sample testwells from very concentrated positive samples may develop from a deep blue color to a green color after the addition of substrate. The green color will result in low O.D. values when read at the recommended 650 nm. Consider these samples as off scale positives. This rare occurrence is most likely to occur in single seed or single leaf samples.

### Technical service

If you have any questions about using this kit, please contact Agdia, Inc. Monday – Friday by phone (574-264-2014 or 800-622-4342) or by email ([info@agdia.com](mailto:info@agdia.com)).  
m197.5



## Bt-Cry1F ELISA Kit

Qualitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry1F transgenic protein  
Catalog number: PSP 10301

### Preparing for the test

Familiarize yourself with the kit components and check that all components are present in the kit.

#### Prepare buffer

Concentrated PBST is used as wash buffer and sample extraction buffer. PBST is supplied as either 20X concentrate or as a powder.

20X concentrate Prepare PBST wash buffer by diluting one 20X pouch of PBST wash buffer with 950 ml of distilled water.

powder Prepare 1X buffer by dissolving PBST buffer powder in distilled water according to the table below:

Buffer	5 g
Distilled water	500 ml

#### Prepare controls

Reconstitute lyophilized positive control and lyophilized negative control with 2.0 ml of prepared PBST sample extraction buffer per bottle.

#### Make control aliquots

After preparing the positive and negative control, divide them into aliquots, each sufficient for one use. Dispense aliquots into tubes that can be securely capped. If you will be using a control in one well each time you run the test, prepare 120  $\mu$ l aliquots. If you will be using a control in two wells, prepare 220  $\mu$ l aliquots. Each aliquot should be sufficient for the tests to be run plus a small additional volume to assure easy dispensing.

Control aliquots must be stored frozen (-20°C freezer or household freezer). Do not thaw until just before use. At the time of each test run, remove from storage only the aliquots that will be used. Allow the tubes to thaw and mix the contents thoroughly. At the time you add sample extracts to testwells, add the same volume of negative and positive control to the appropriate control wells.

Do not refreeze controls.

#### Prepare testwells

If you will be using less than a full 96-well plate, remove any unused strips and seal them in the foil pouch with the desiccant. Using a permanent marker, number the strips in case a strip becomes separated from the frame.

Prepare a humid box by lining an airtight container with a wet paper towel. Keeping testwells in a humid box during incubation will help prevent samples from evaporating.

Make a copy of the loading diagram and record the locations of your samples and controls. We recommend that you use a buffer well, negative control well and positive control well on each plate each time you run the test.

## Bt-Cry1F ELISA Kit

Qualitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry1F transgenic protein  
Catalog number: PSP 10301

### Preparing Single Leaf and Seed Samples

Leaves, seedlings, or seeds must be ground and diluted in PBST sample extraction buffer. For best results, samples should be diluted in PBST buffer according to the ratios and times listed in the table below.

#### Individual leaves

Sample grinding in Agdia sample mesh bags.



For leaf samples use Agdia's sample mesh bags, a clean mortar and pestle, or any other grinding device that can break up leaf tissues and prevent contamination between samples.

A simple method for grinding a single leaf sample is by using Agdia's sample mesh bags. Use only one sample per bag and be sure to label each bag. Add the appropriate volume of buffer to an empty bag. Place the leaf sample between the mesh linings of the bag. Rub the bag with a marker to completely crush the sample and to mix the contents uniformly. Let the extract sit for 3 minutes before transferring sample to the testwells of the ELISA plate.

#### Single seeds

Single seeds can be crushed in a seed press, seed crusher or sample mesh bag and rubber mallet. Wash and rinse the grinding equipment between samples.

Determine the average weight of the seed and add the appropriate volume of PBST buffer following a 1:2 to 1:5 (tissue weight in g: buffer volume in ml) seed to buffer ratio. Let the extract sit for 3 minutes before transferring to the testwells of the ELISA plate.

Tissue	tissue to buffer ratio weight/volume - g/ml	Example	Extraction Time
Single leaf	1:20	0.15 g leaf: 3 ml buffer	3 minutes
Single seed	1:2 to 1:5	Typically 1 seed in 1 ml of buffer	3 minutes

### Preparing Grain Samples

For composite seed samples (up to 600 seeds), it is recommended to use a blender with a power rating of at least 450 watts in conjunction with "Mason" type jars. The guidelines provided are optimized for Osterizer® blender with "Mason" type jars.

#### Cleaning:

It is very important that the grinding equipment and workspace is cleaned well between each sample extraction. Wash blades, threaded caps and jars with detergent making sure all ground material is washed away. Be especially careful to clean crevices of the blade. Any remaining powder can contaminate the next sample.

#### Grinding:

Seed grinding guidelines described in this instruction are optimized for an Osterizer® blender with a power rating of 450 watts. Blenders of lower power may require a longer grinding time. Other devices like coffee grinders or ball mills may also be used to grind the seeds. Visually check that all seed has been ground to a fine powder.

Determine and record the average weight of 600 seeds. Put the seed sample in a dry "Mason" jar and assemble the blade attachment. A 1000 ml jar is recommended for 600 seeds. Grind the seed at high speed for about 60 seconds or until all the seeds are ground to a powder. Remove the jar from the blender and tap to collect all the powder. Shake the jar to mix and check for any unground seed.

Remove blade assembly and replace with threaded cap. Add the buffer at the specified ratio, close the lid and **vigorously shake** the bottle for 30 seconds. Let the sample settle for 3 minutes.

Use only the supernatant (liquid layer) when transferring the samples to testwells of the ELISA plate.

Sample	grain to buffer ratio weight / volume - g/ml	Example	Extraction Time
Grain	1:2	150 g seed: 300 ml buffer	3 minutes

## Bt-Cry1F ELISA Kit

Qualitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry1F transgenic protein  
 Catalog number: PSP 10301

### Test Procedure

**1. Add enzyme conjugate**

Dispense 100 µl of enzyme conjugate per well.

**2. Dispense samples, controls, and buffer**

Following your loading diagram, dispense 100 µl of each prepared sample into sample wells. Dispense 100 µl of positive control into the positive control wells, 100 µl of negative control into the negative control wells, and 100 µl of PBST buffer into the buffer wells.

Mix the contents of the wells by gently swirling the plate on the bench-top.

**3. Incubate plate**

Set the plate inside the humid box and incubate at room temperature. Use the table to determine appropriate time for sample type.

Single Leaf Sample	Single Seed Sample	Grain Sample
60 minutes	30 minutes	2 hours

**4. Warm TMB substrate solution**

About 15 minutes before the end of the above incubation step, measure the required amount of TMB substrate needed. Return the remaining TMB substrate to the refrigerator. Allow measured TMB substrate to warm to room temperature. Caution: TMB substrate is light sensitive, extra precautions are necessary to protect it from light sources when warming to room temperature.

You will need 100 µl of substrate for each testwell you are using. To estimate the volume needed, measure 1 ml for each 8 well strip used. A full plate will require about 10 ml.

**5. Wash plate**

When the sample incubation is complete, wash the plate. Use a quick flipping motion to dump the wells into a sink or waste container without mixing the contents.

Fill all the wells completely with 1X PBST, and then quickly empty them again. Repeat 7 times.

After washing, hold the frame upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove all droplets of wash buffer.

**Note: If using an automatic plate washer, please be sure that the machine is at the appropriate settings for washing flat bottom plates.**

**6. Add TMB substrate solution**

Add 100 µl of the TMB substrate solution into each well of the plate. Let the plate incubate according to the table below. Assure testwells are protected from strong light.

Single Leaf Sample	Single Seed Sample	Grain Sample
10 minutes	10 minutes	20 minutes

## Bt-Cry1F ELISA Kit

Qualitative DAS ELISA for the detection of the Bt-Cry1F transgenic protein  
Catalog number: PSP 10301

### 7. Evaluate results

Examine the wells by eye, or measure on a plate reader at 650 nm. Air bubbles which are present at the time of reading can alter results, if in the light path. Agdia recommends that bubbles be eliminated prior to reading.

Wells in which a blue color develops indicate positive results. Wells in which there is no significant color development indicate negative result. Test results are valid only if positive control wells give a positive result and buffer wells remain colorless.

If either control well does not show the appropriate color, please repeat the test procedure. If the problem persists, contact Agdia for further assistance.

### Buffer Formulations

The following buffer is a standard part of your kit. This formulation is for reference only.

#### PBST Buffer (Wash Buffer) (1X)

Dissolve in distilled water to 1000 ml:

Sodium chloride	8.0 g
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 g
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2 g
Potassium chloride	0.2 g
Tween-20	0.5 g

Adjust pH to 7.4

*HERCULEX® is a registered trademark of Dow AgroSciences LLC.*



## 6. Bibliografía

1. Venegas H. El Cultivo del maíz, historia e importancia. *El Cereal*. 2010;93:19.
2. FENALCE. Indicadores cerealistas. Bogotá; 2014.
3. Asociación de biotecnología vegetal agrícola. Transgenicos en el mundo [Internet]. *agrobio*. 2014 [cited 2014 Mar 5]. Disponible en: <http://agrobio.org.co/fend/index.php?op=YXA9I2JXbDQmaW09I016UT0>
4. James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. *ISAAA*. 2014;46:4–7.
5. Phillips T. Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology. *Nat Educ*. 2008;1:213.
6. Chaparro A. Cultivos transgénicos: entre los riesgos biológicos y beneficios ambientales y económicos. *Acta Biol Colomb*. 2011;16:231–52.
7. Food Safety Department. Modern food biotechnology, human health and development: an evidence-based study. 2005 p. 11–24.
8. Acosta O, Chaparro A. Genetically modified food crops and public health. *Acta Biol Colomb*. 2008;13:3–26.
9. Maldonado C, Álvarez E, Castellanos J. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; 2007.
10. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Decreto 4525. Colombia; 2005 p. 11.
11. Ministerio de Salud y Protección Social. *resolucion 4254 de2011.pdf*. Colombia; 2011 p. 7.
12. Tripathi L. Techniques for detecting genetically modified crops and products. 2005;4(13):1472–9.
13. Micheline E, Simoni P, Cevenini L, Mezzanotte L, Roda A. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Oct;392(3):355–67.

14. Brookes G, Barfoot P. Global impact of biotech crops: Environmental effects 1996-2009. *GM Crops*. 2011;2(1):34–49.
15. Avila K, Chaparro A, Reyes G. Environmental effect of conventional and GM crops of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Agron Colomb*. 2011;29:341–8.
16. Takeda S, Matsuoka M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat Rev Genet*. 2008 Jun;9(6):444–57.
17. Abdullah T, Radu S, Hassan Z, Hashim JK. Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. *Food Chem*. 2006 Jan;98(3):575–9.
18. Vijayakumar KR, Martin A, Gowda LR, Prakash V. Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing. *Food Chem*. Elsevier Ltd; 2009 Dec;117(3):514–21.
19. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2002 May;20(5):215–23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943377>
20. Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food Chem Toxicol*. 2004 Jul;42(7):1157–80.
21. Morón C, Zacarías I, Saturnino P. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Santiago de Chile: Dirección de Alimentación y Nutrición Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe; 1997.
22. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Van Den Eede G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*. 2002 Jan 1;214(1):3–26.
23. ICONTEC. Norma técnica colombiana para harina precocida de maíz para consumo humano. Colombia; 2007.
24. Peña J. La Harina De Maíz De América Para El Mundo [Internet]. 2009 [cited 2012 Nov 11]. Disponible en: <http://www.articuloz.com/alimentos-y-bebidas-articulos/la-harina-de-maiz-de-america-para-el-mundo-908638.html>
25. ICONTEC. Norma técnica colombiana para almidón de maíz sin modificar. Colombia; 1986.

26. Congreso de Colombia. Ley 740 de 2002 por medio de la cual se aprueba el "Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica." 2002 p. 25.
27. Luis R, Lavilla M, Sánchez L, Calvo M, Pérez MD. Immunochemical detection of Cry1A(b) protein in model processed foods made with transgenic maize. *Eur Food Res Technol.* 2009 Feb 17;229(1):15–9.
28. Oszvald M, Tömösközi S, Larroque O, Keresztényi E, Tamás L, Békés F. Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro z-arm mixer. *J Cereal Sci.* 2008 Jul;48(1):68–76.
29. Pincioli M. Extracción de proteínas totales. Proteínas de arroz propiedades estructurales y funcionales. Buenos Aires: CIDCA; 2010. p. 30.
30. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
31. Fenalce. Producción de harinas precocidas de maíz. Plan de negocios. Bogotá; 2007 p. 69–71.
32. Marmiroli N, Maestri E, Gullì M, Malcevschi A, Peano C, Bordoni R, et al. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Oct;392(3):369–84.
33. König a, Cockburn A, Crevel RWR, Debruyne E, Grafstroem R, Hammerling U, et al. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem Toxicol.* 2004 Jul;42(7):1047–88.
34. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database [Internet]. CERA. 2014 [cited 2013 Dec 21]. Disponible en: [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
35. Ministerio de Salud y Protección Social. Base de datos de eventos de transformación autorizados en Colombia para consumo humano. Bogotá; 2014.
36. Margarit E, Reggiardo MI, Vallejos RH, Permingeat HR. Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. *Food Res Int.* 2006 Mar;39(2):250–5.
37. Orlandi P, Lampel K, South P, Assar S, Carter L, Levy D. Analysis of flour and food samples for cry9C from bioengineered. *J Food Prot.* 2002;65:426–31.

38. Monsanto Agricultura España. Evaluación de la seguridad del maíz Roundup Reday®, evento NK603. Madrid; 2002 p. 13.
39. INVIMA. Híbridos de maíz genéticamente modificados con tecnología conjunta Herculex i (TC1507) x Roundup Ready (NK603) como alimento o materia prima para la elaboración de alimentos para consumo humano. Bogotá; 2008 p. 6.
40. Monsanto Agricultura España. Seguridad del maíz MON 810 (YIELDGARD®) genéticamente protegido contra taladros. Madrid; 2001 p. 52.
41. Dow AgroSciences. Solicitud de Liberación Experimental al ambiente de maíz genéticamente modificado con el evento: DAS-59122-7. Guadalajara; 2010 p. 39.

