

EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN POR PCR DEL PROMOTOR 35S EN SOYA MODIFICADA

Javier A. Magaña, María A. Islas Osuna, Gloria Yepiz-Plascencia, Ana M. Calderón de la Barca.
CIAD, A.C. Carretera a La Victoria km 0.6, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Tel. (662)2892400 Ext. 288. Fax (662)2800094, Correo electrónico: amc@cascabel.ciad.mx

Palabras clave: transgénicos, detección, PCR.

Introducción. Los cultivares de soya se han modificado genéticamente para mejorar sus características (1). Uno de los métodos más sensibles para detectar dichas modificaciones, es la amplificación de secuencias específicas de nucleótidos por PCR (3,4). Sin embargo, el procesamiento industrial del grano y las técnicas de extracción del ADN (4,5), pueden afectar la reacción de amplificación. Por ello, el objetivo del trabajo fue probar diversos métodos de extracción de ADN y detectar el evento transgénico en ingredientes y alimentos que contienen soya.

Metodología. Los productos de soya analizados fueron los ingredientes: pasta (PS), grano (GS), dos harinas desgrasadas (HdS) con tratamiento térmico ligero y moderado, 3 aislados (AS), 2 de ellos 500E (de 1995 y de 2002) y uno EX de Protein Technologies International (ahora Dupond). También se evaluaron Protina®, Protemas®, galleta de soya y dos fórmulas enterales preparadas en el laboratorio, conteniendo 7.4 mg/mL de AS de 1995 y 2002. Se probaron 3 métodos de extracción de ADN (6,7,8) con diferencias en la forma de lisar las membranas celulares y separar las proteínas del ADN. La principal modificación a los métodos fue el uso de proteasas de *S. griseus* (Sigma) durante la lisis y centrifugaciones posteriores a la precipitación de proteínas. Para la extracción del ADN de los productos alimenticios se hizo solo con el método (C). El ADN extraído fue resuspendido en buffer TE junto con RNasa A. La presencia del gen de la β -conglucina subunidad β y el promotor 35S CaMV fue evaluada por PCR.

posible la detección de ninguno de los dos genes. Entre las ventajas de la metodología usada en este estudio, está la ausencia de fenol en el proceso y el no usar reactivos comerciales para purificar el ADN, abaratándolo. También la adición de la proteasa de *S. griseus*, junto con el uso de PVP y β -mercaptoetanol favoreció la eliminación de metabolitos secundarios de la planta que pueden inhibir la PCR.

Cuadro 1. Resultados de la detección del gen de la β -conglucina y del p35S en las muestras analizadas.

Muestra	β -conglucina	p35S CaMV
GS, HdS Trat. Ligero, PS, AS 500E 2002, Fórm liq. con AS 2002, Protemas®, Protina®.	+	+
AS 500 E 1995, HdS Trat. Moderado, Fórm liq. con AS 1995, AS EX 33	+	-
Galleta Helios®	-	-

Conclusiones. La metodología desarrollada para detectar el promotor 35S CaMV por PCR y para verificar la integridad del ADN, fue aplicable en fuentes proteicas de soya como ingrediente y en productos alimenticios terminados. Es una ventaja extraer por medio del mismo tratamiento, material genético de muestras de diversa naturaleza, ya que así se podrían trabajar muchas al mismo tiempo.

Agradecimiento. Al MC Adolfo Ruiz por las muestras de trabajo y a la MC Alma Peregrino por su apoyo técnico.

Bibliografía.

- Lin HY, Chiang JW, Shih DY. (2001) Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay Kits. *J Food Drug Anal* 9:160-166.
- Kuiper HA. (1999) Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organism. *Food Control* 10:339-349.
- Terry CF, Harris N, Parkes HC. (2002) Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *JAOAC Int* 85:768-774.
- Väitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, Brignon P. (1999) Real-Time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem* 47:5261-5266.
- Tozzini AC, Martínez MC, Lucca MF. (2000) Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electron J Biotechnol* 3:1-5.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP, Kumar S. (1999) Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol Biol Rep* 17:1-7.

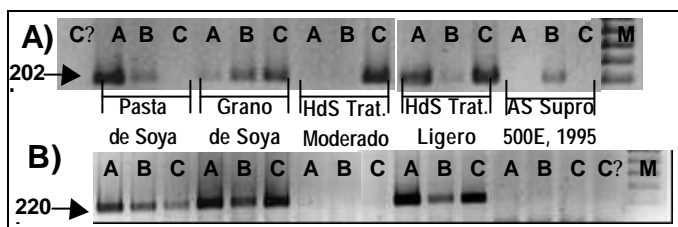


Figura. 1. Amplificación por PCR del gen de la β -conglucina [A] y del p35S [B] en extractos obtenidos por los tres métodos (A, B y C). Control negativo (C-); Marcador PCR 100 bp Low Ladder (M).

Resultados y discusión. Los mejores resultados fueron con el método (C), ya que permitió la extracción y amplificación del ADN del promotor 35S CaMV en ingredientes con el mayor procesamiento industrial y en productos alimenticios terminados. De las 12 muestras analizadas, 7 fueron positivas al p35S CaMV, 4 negativas y sólo en una no fue