

VALIDACIÓN DE UN SISTEMA DE CAPTURA DE OGM'S EN ILLUMINA

Maya-García F, Carvente-García RD, Perez-Agüeros SI, Santana Hernández ZI y Acatzi Silva AI
Subdirección de Secuenciación y Bioinformática, SENASICA-SAGARPA
Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Edo. México, Tecámac de Felipe Villanueva Centro C.P. 55740.
(55) 5905-100 Ext. 53037, ibqfmaya@gmail.com

Resumen: La Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés) es un método cualitativo no normalizado para el análisis y caracterización de Organismos Genéticamente Modificados a través de su ADN, el cual brinda mayor sensibilidad, especificidad y certeza en comparación a otros métodos moleculares. En el presente trabajo se realizaron las pruebas preeliminares para identificar y caracterizar eventos contenidos en maíz, algodón y soya genéticamente modificados, a través de un sistema de captura mediante sondas, así mismo, se establecieron los parámetros de desempeño necesarios para validar este sistema en la plataforma de secuenciación masiva MiSeq de Illumina.

1. INTRODUCCIÓN

En México, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados⁽¹⁾ (LBOGM) tiene como uno de sus objetivos regular la liberación al medio ambiente de OGM's, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que dichas actividades pudieran ocasionar a la salud humana, vegetal, animal y/o acuícola.

A pesar del impacto de estos organismos, actualmente sólo se cuenta con métodos moleculares basados en PCR para su caracterización, cuantificación e identificación. En respuesta a esto, la reciente aparición de un sistema de enriquecimiento específico o sistema de captura (*SeqCap*), basado en la hibridación de ácidos nucleicos en solución, permite aislar los eventos transgénicos del resto del genoma, para posteriormente ser secuenciados por NGS. Con esto se logra una caracterización más detallada del evento, para cumplir con todos los requerimientos establecidos en la LBOGM.

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) pretende implementar la NGS como una tecnología de vanguardia para la eficiente caracterización de OGM's, en apoyo a cumplir con el control de la inocuidad alimentaria en México.

Por otro lado, SENASICA tiene como obligación validar todos aquellos métodos empleados para asegurar la inocuidad de los alimentos, lo cual hace indispensable la demostración del desempeño de un sistema de captura a través de NGS que asegure que los resultados en los estudios de caracterización de OGMs satisfacen las necesidades de medición especificadas⁽²⁾.

Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto es proponer las pruebas de desempeño necesarias para validar el método de sistema de captura para la identificación y caracterización de OGMs a través de NGS en la plataforma Illumina para ser implementado en nuestro laboratorio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

Se emplearon 61 elementos transgénicos contenidos en 30 eventos genéticamente modificados entre los que se incluyen eventos para resistencia a sequía, así como protección contra insectos y herbicidas. Dichos elementos provinieron de 5 materiales de referencia diferentes (maíz, trigo, algodón, soya y papa). De cada material de referencia, se obtuvo su ADN y se emplearon 34 ng de ADN de cada uno de ellos. Posteriormente se continuó con la metodología para sistema de captura⁽³⁾.

2.2. Captura de elementos transgénicos

La captura de eventos transgénicos corresponde a un método cualitativo no normalizado; el cual se basa en su hibridación, captura y secuenciación. Para realizar la hibridación, el área de bioinformática del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) diseñó sondas de ARN complementarias a eventos GM, promotores y terminadores, así como algunos genes representativos⁽⁴⁾. La síntesis de dichas sondas estuvo a cargo de la compañía Agilent®, por lo cual para realizar la captura de las secuencias de interés se siguió su procedimiento. Bajo esta metodología, el sistema se probó en la plataforma 454 de Roche®

para posteriormente proponer los parámetros de desempeño de la validación en MiSeq de Illumina®.

3. RESULTADOS

Al realizar la corrida de secuenciación en la plataforma 454, se obtuvieron poco más de un millón de lecturas, las cuales correspondieron a secuencias de 47 elementos transgénicos, es decir, se logró la captura del 77% de ellos. Una vez que se obtuvieron resultados satisfactorios para esta metodología, el sistema de captura se empezó a utilizar para iniciar la validación en la plataforma MiSeq de Illumina.

Dado que la secuenciación es un método cualitativo no normalizado, en el cual se logra generar la sucesión nucleotídica contenida en una cadena de ADN, se ha determinado emplear como parámetros de desempeño: Repetibilidad y Reproducibilidad, Selectividad, Límite de detección, Especificidad, Sensibilidad analítica ⁽⁵⁾.

Repetibilidad/Reproducibilidad: Para medir la repetibilidad, se secuenciarán 3 veces la misma captura de eventos realizados por el mismo analista. En tanto que, para evaluar la reproducibilidad, se secuenciarán los mismos eventos por 3 analistas diferentes siguiendo las mismas condiciones de medición. En ambos parámetros se espera obtener una cantidad de información similar. La información obtenida también servirá para medir precisión y exactitud.

Selectividad: Su medición se efectuará incorporando ADN de bacterias durante el proceso de captura de OGM's, con lo cual el proceso tendrá que asegurar ser selectivo para tomar únicamente las secuencias de OGM's presentes en la mezcla.

Límite de detección y Límite de cuantificación: Se realizarán diferentes diluciones seriales de un evento transgénico y se verificará la dilución más baja en la cual el equipo es capaz aún de detectar la presencia del evento.

Especificidad y Selectividad: Su medición se realizará mezclando ADN de planta modificada con ADN de bacterias durante el proceso de secuenciación. El análisis deberá ser capaz de diferenciar entre ambos tipos de ADN.

Robustez: Se evaluará la captura en presencia de contaminantes (ADN bacteriano), así como la capacidad del método para capturar uno o más de un evento a diferentes concentraciones.

4. DISCUSIÓN

La LBOGM establece que para poder llevar a cabo la liberación experimental de un OGM es necesario conocer la secuencia detallada de la transformación

génica, la descripción de las secuencias flanqueantes, el número de copias insertadas y la localización de las mismas, sin embargo, la complejidad y tamaño de los genomas de la mayoría de las plantas hace que las estrategias de detección molecular actuales tales como la PCR, sean incapaces de dar cumplimiento a todos los rubros que esta ley establece; ya que no son capaces de detallar el evento transgénico de forma tal que pueda dar cumplimiento a la LBOGM.

La utilización del sistema de enriquecimiento específico nos permitió capturar únicamente aquellas secuencias de los eventos transgénicos, los cuales posteriormente se analizarán bioinformáticamente para lograr detallar cada uno de los parámetros que la LBOGM exige. Aunado a esto, con los resultados obtenidos se trabajará para validar el método de secuenciación masiva para la captura de OGM's en la plataforma MiSeq de Illumina.

5. CONCLUSIONES

Se logró capturar secuencias específicas de eventos transgénicos utilizando sondas diseñadas para este fin. Además, con base a estos experimentos se lograron establecer los parámetros de desempeño necesarios para dar inicio al proceso de validación en la plataforma Illumina.

6. REFERENCIAS

- [1] Ley Mexicana de Bioseguridad en Organismos Genéticamente Modificados, www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf
- [2] Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, NMX-EC-17025-IMNC-2006 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración", Junio 2006.
- [3] Ortega V. "Implementación del Sistema de Captura de ADN de OGM's por Sondas de ARN Acopladas a perlas Electromagnéticas para el Sistema de Pirosecuenciación". UNAM. 2013
- [4] Romero S. "Aplicación e Integración de Metodologías Bioinformáticas y de Secuenciación Masiva de ADN para el análisis y caracterización de OGM's". UNAM, 2012.
- [5] Charles M. "Development and Validation of a Next- Generation Sequencing Assay for BRCA1 and BRCA2 Variants for the Clinical Laboratory". PLoS One 20150 Aug 21, 13641