

SAGARPA



**DIRECCIÓN GENERAL DE INOCUIDAD AGROALIMENTARIA,
ACUÍCOLA Y PESQUERA**

**DIRECCIÓN DE BIOSEGURIDAD PARA ORGANISMOS
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

Curso Regional para el Fortalecimiento
de Capacidades en Bioseguridad para
OGM:

CNRDOGM- Secuenciación



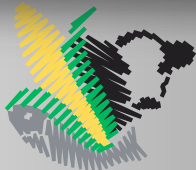
ema
entidad mexicana
de acreditación, a.c.

Acreditación No: SA-0338-005/11
Vigente a partir del 2011-12-12*



IMN
Instituto Mexicano
de Normalización y
Certificación, A.C.

Certificación en ISO 9001:2008 No. MX-RSGC-860
Vigente a partir del 2014-03-05



Senasica

13 de Mayo de 2014

Secuenciación de OGMs

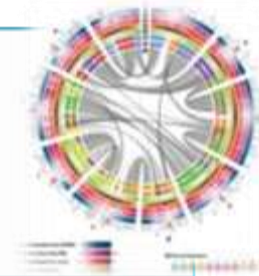


Secuenciación de genomas de bacterias patógenas

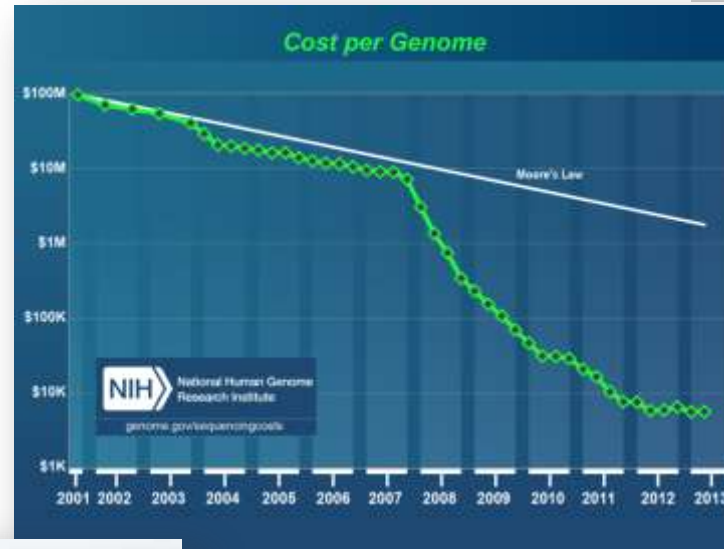


Análisis Bioinformático

- Mapeo de referencia
- Ensamble *de novo*

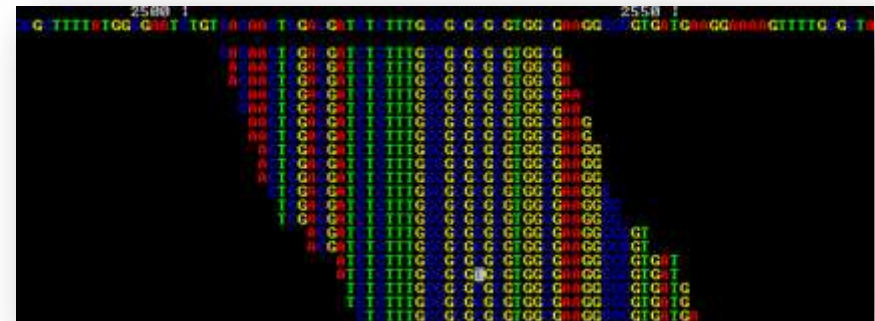


La NGS permite secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma rápida y a un precio mucho más barato en comparación con la tecnología tradicional.



A partir de 2008 y con el desarrollo de nuevos equipos se revolucionó la secuenciación de ADN.

La gran cantidad de información producida en cada secuenciación originó el desarrollo de una nueva área de estudio como es la **Bioinformática**.



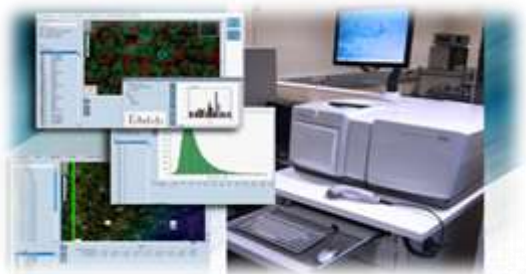
Resultados confiables para la identificación y caracterización de secuencias de ácidos nucleicos.



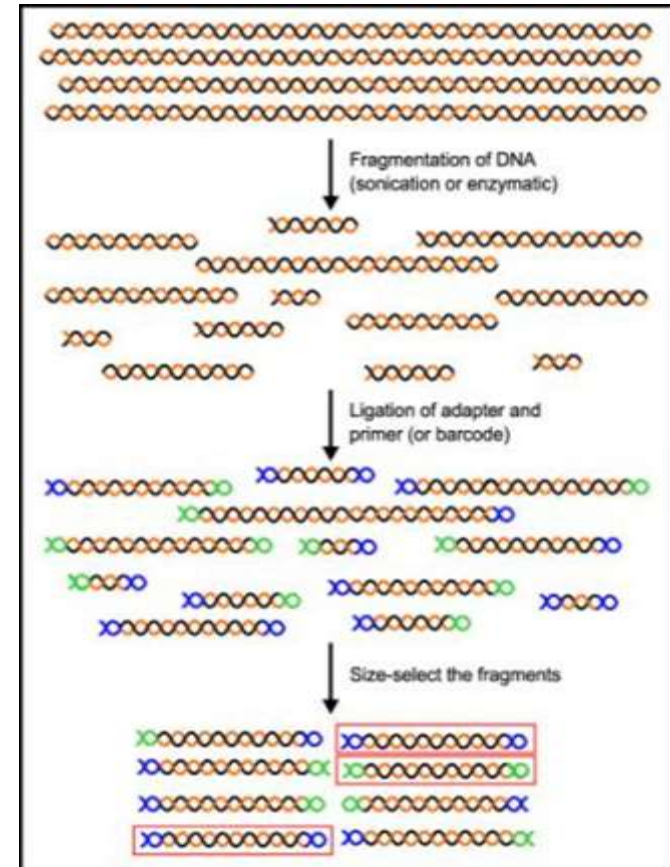
Capacidad del CNRDOGM

- Equipo de Secuenciación de Nueva Generación
- Manejo de las Plataformas 454, Ion Torrent y 3500 Sanger.
- Metodologías estandarizadas y validadas
- Se Trabaja con un sistema de calidad bajo la Norma NMX-EC 17025 y se encuentra acreditado.

Plataformas con tecnología ortogonal para la verificación de los resultados emitidos.



- **Tipo de Secuenciación:**
 - *shotgun* (individual o múltiplex)
 - Amplicones (individual y múltiplex)
 - Sistemas de captura de secuencias GM
- **Análisis Bioinformático:**
 - Mapeo a referencia
 - Ensamble *de novo* (*graphs De Bruijn*)
 - Programas
 - CLC Bio genomic workbench
 - Bionumerics
 - GSmapper/GSassembly
 - MAUVE
 - MUMMER
 - Lenguajes de programación (bio-perl)

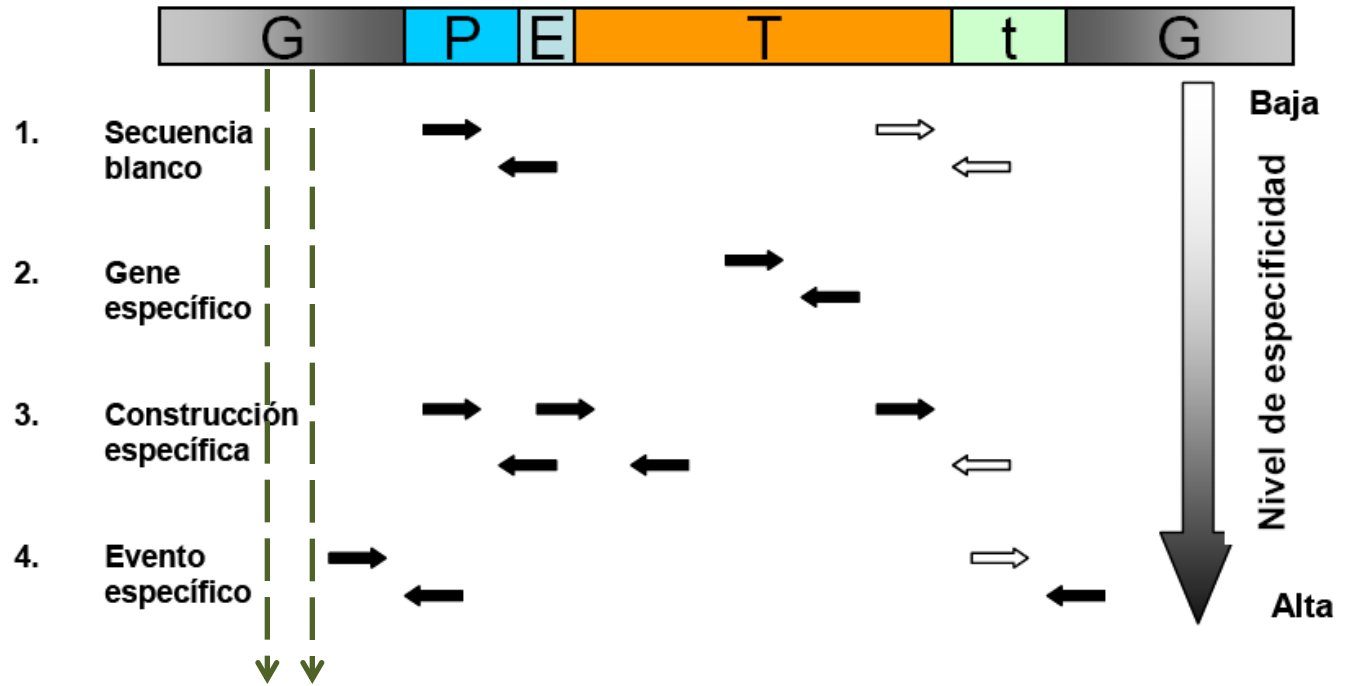


```
2500 | 2550 |
G TTTTATGG GAT TGT A AA T C G GAT T TTTG C G G GTGC GAGG GTGATGAGGAAAGTTTTC G T
A AA T C G GAT T TTTG C G G GTGC G
A AA T C G GAT T TTTG C G G GTGC G
AA T C G GAT T TTTG C G G GTGC GA
AA T C G GAT T TTTG C G G GTGC GA
AA T C G GAT T TTTG C G G GTGC GA
A T C G GAT T TTTG C G G GTGC GAGG
A T C G GAT T TTTG C G G GTGC GAGG
A T C G GAT T TTTG C G G GTGC GAGG
T C G GAT T TTTG C G G GTGC GAGG
T C G GAT T TTTG C G G GTGC GAGG
A GAT T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
A GAT T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
AT T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
AT T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
T T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
T T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
T T TTTG C G G GTGC GAGG CCGT
```

NGS

5. Secuencias evento específico = genoma + inserto

PCR
4
Niveles de especificidad
A
B



6. Especie específico

Representación esquemática (mapa) de la construcción de un gene. 1. B. Niveles de especificidad en la identificación de elementos dentro de una construcción genética. (Berdal K., et al., 2003). Las letras son: G; genoma del organismo, P; promotor; E; potenciador de la transcripción (del inglés *enhancer*). T; Gen insertado (transgene); t; terminador.

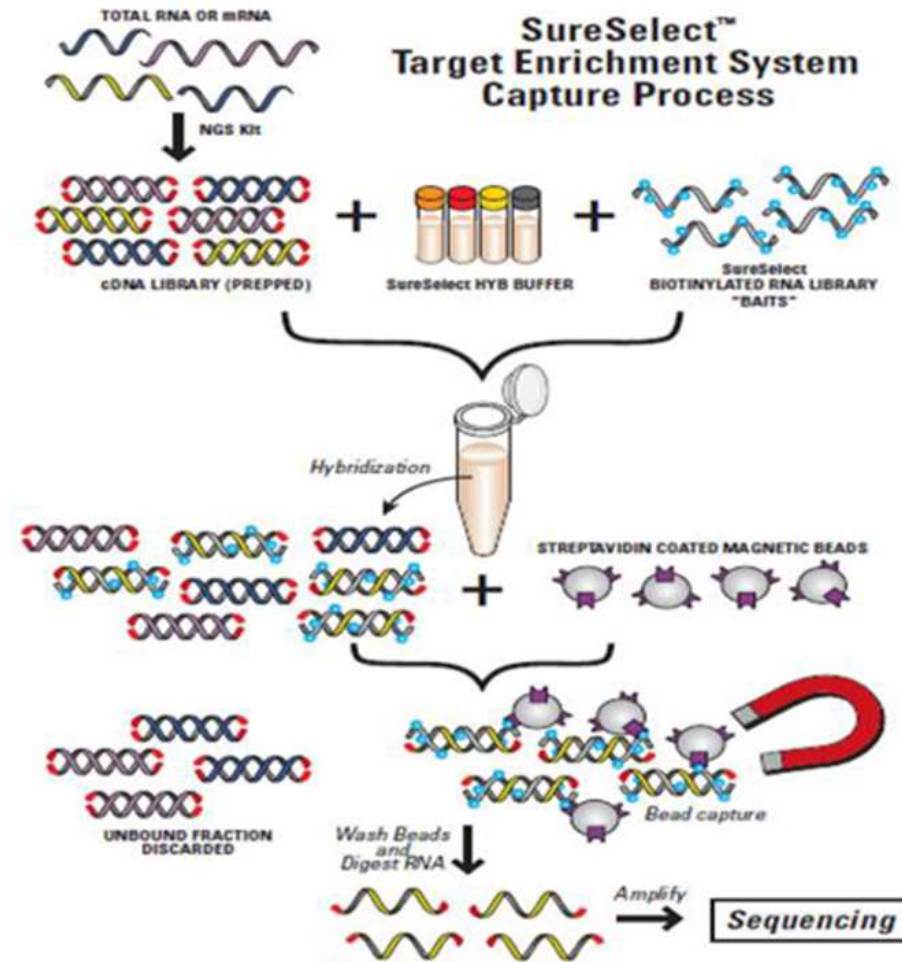
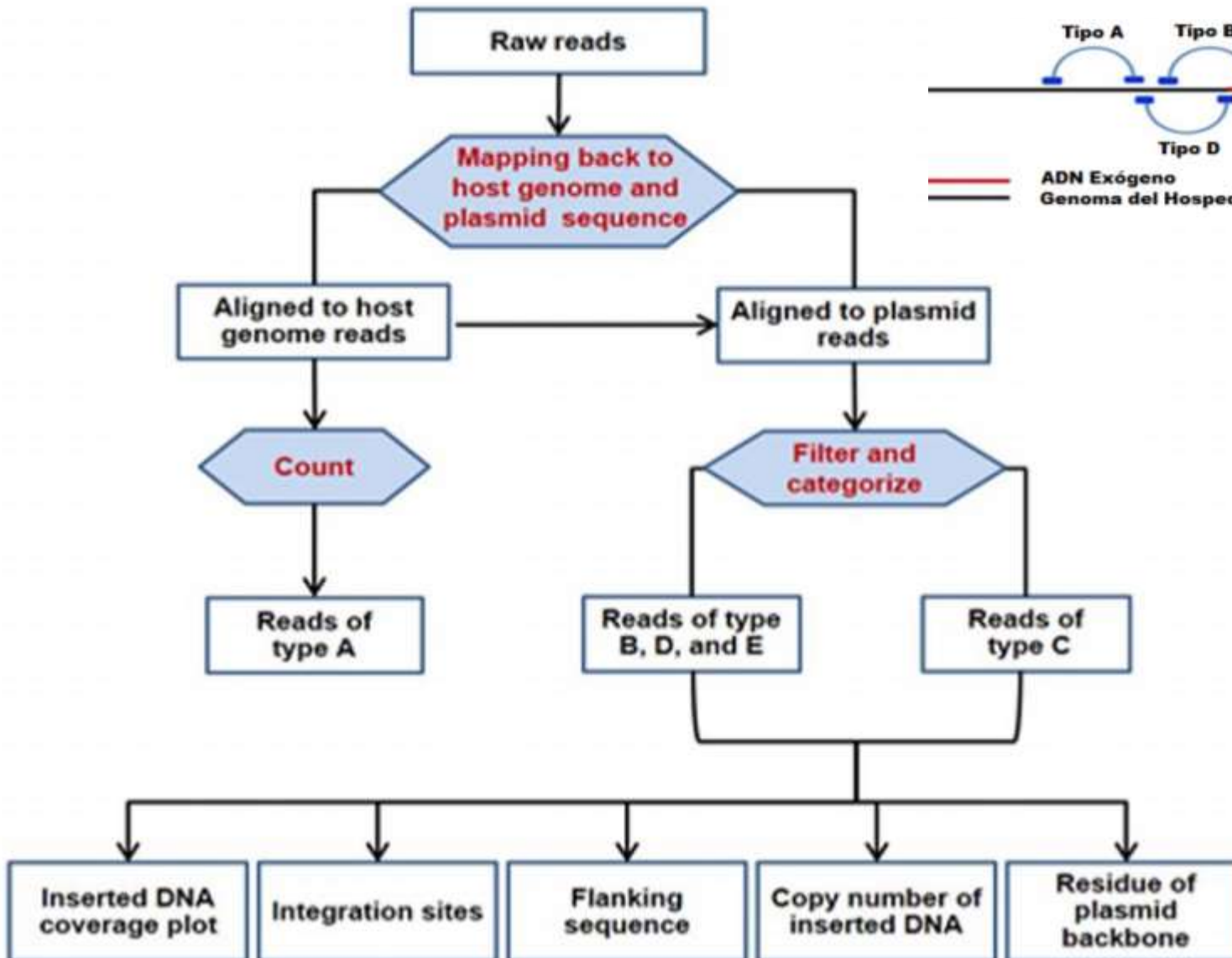
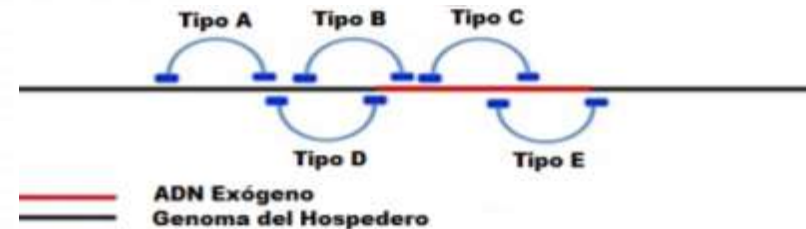
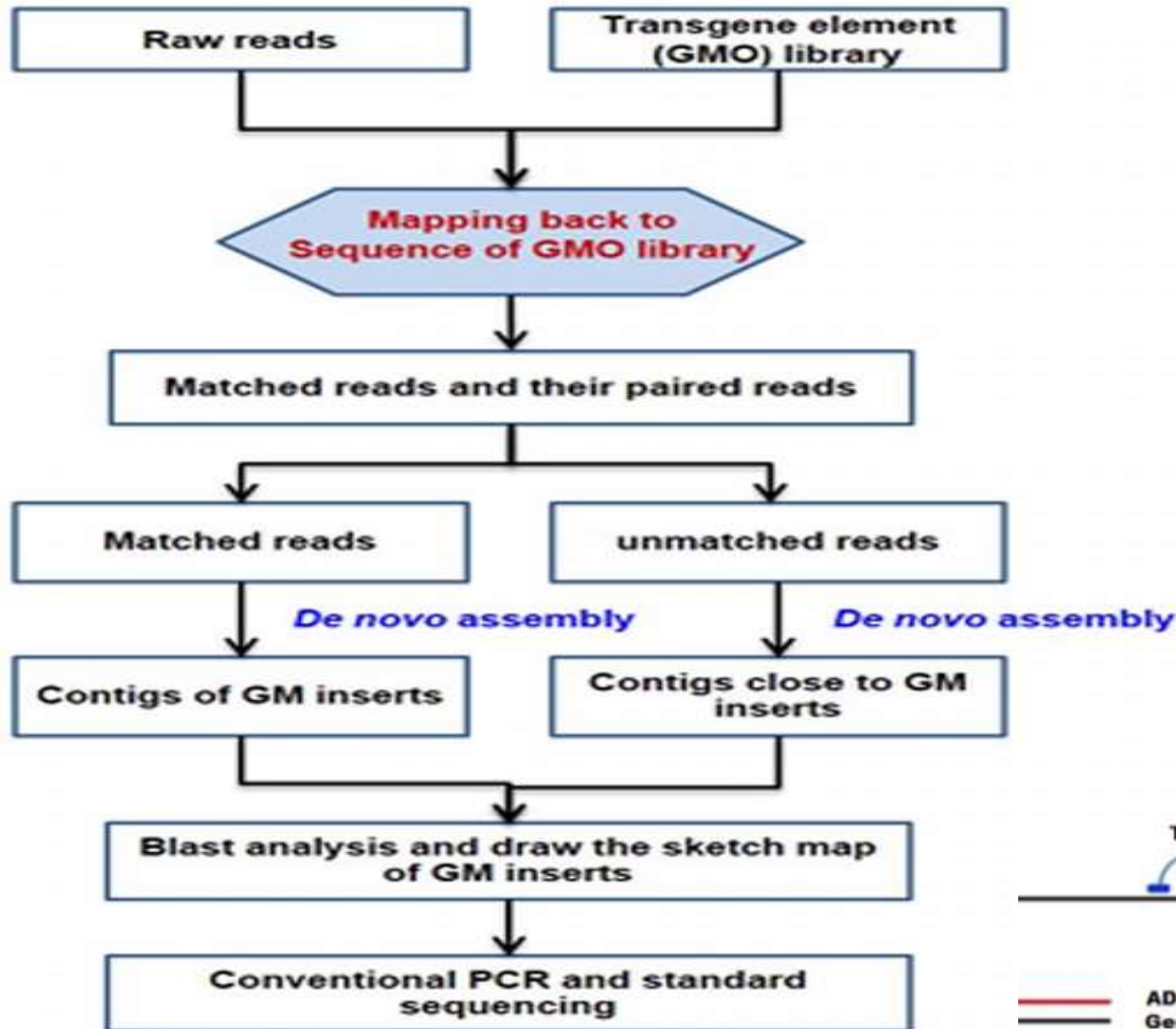


Diagrama del sistema de captura de ADN usando sondas de ARN o "baits". El sistema de captura consiste en que la muestra de ADN genómico (izquierda) se pone a incubar con sondas de ARN (derecha "baits"), esta incubación se le llama hibridación, en ella se forman híbridos de ARN-ADN los cuales son capturados con perlas electromagnéticas que contienen estreptavidina y después de la digestión de las sondas de ARN sigue el proceso para secuenciar, (Ernani, F. & LeProust, E., 2009).

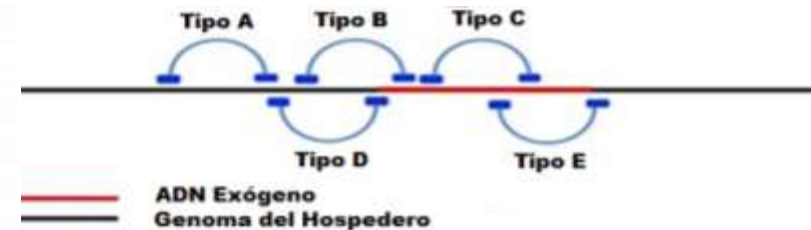
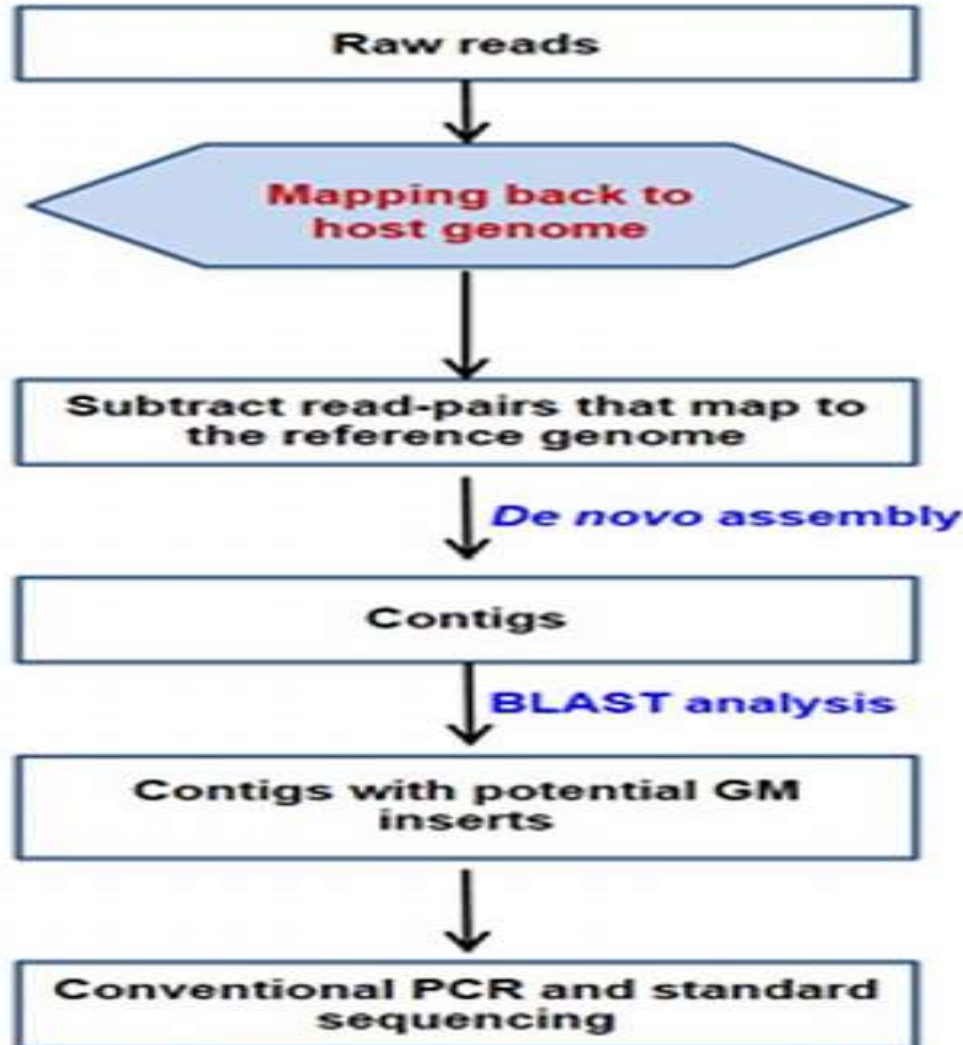
Modulo 1: Conocimiento de la secuencia del vector de inserción



Modulo 2: Conocimiento de una librería con secuencias insertadas de OGMs



Modulo 3: Sin información previa



Obtener la secuencia de ADN de los materiales liberados al medio ambiente

- Permite corroborar la secuencia del material GM liberado en México

- Se establece el seguimiento de la modificación genética durante la vigencia del permiso

- Se aportan elementos técnico-científicos para los tomadores de decisiones en materia de Bioseguridad de la SAGARPA



[Metrologia](#) > [Volume 51](#) > [Number 1](#)

Copy number ratios determined by two digital polymerase chain reaction systems in genetically modified grains

M Pérez Urquiza^{1,3} and A I Acatzi Silva²

[Show affiliations](#)

M Pérez Urquiza and A I Acatzi Silva 2014 *Metrologia* 51 61. doi:10.1088/0026-1394/51/1/61

Received 2 August 2013, revised 19 November 2013, accepted for publication 21 November 2013. Published 29 January 2014.

© 2014 BIPM & IOP Publishing Ltd

Abstract

Three certified reference materials produced from powdered seeds to measure the copy number ratio sequences of *p35S/hmgA* in maize containing MON 810 event, *p35S/Le1* in soybeans containing GTS 40-3-2 event and *DREB1A/acc1* in wheat were produced according to the ISO Guides 34 and 35. In this paper, we report digital polymerase chain reaction (dPCR) protocols, performance parameters and results of copy number ratio content of genetically modified organisms (GMOs) in these materials using two new dPCR systems to detect and quantify molecular deoxyribonucleic acid: the BioMark® (Fluidigm) and the OpenArray® (Life Technologies) systems. These technologies were implemented at the National Institute of Metrology in Mexico (CENAM) and in the Reference Center for GMO Detection from the Ministry of Agriculture (CNRDOGM), respectively. The main advantage of this technique against the more-used quantitative polymerase chain reaction (qPCR) is that it generates an absolute number of target molecules in the sample, without reference to standards or an endogenous control, which is very useful when not much information is available for new developments or there are no standard reference materials in the market as in the wheat case presented, or when it was not possible to test the purity of seeds as in the maize case presented here. Both systems reported enhanced productivity, increased reliability and reduced instrument footprint. In this paper, the performance parameters and uncertainty of measurement obtained with both systems are presented and compared.

SECUENCIACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

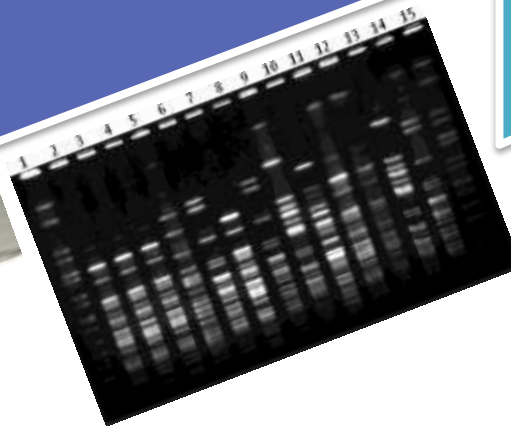
Métodos Convencionales

- Ausencia de concordancia entre características morfológicas y fenotípicas.
- Dificultad de aislamiento.
- Crecimiento lento.
- Medios de cultivo complejos.
- Difícil identificación de cepas con escasa descripción.
- Compleja la identificación entre cepas fenotípicamente parecidas
- Dificultad para intercambiar resultados.



PFGE

- Resolución del bandeo de Mb o Kb.
- Inadecuada resolución de ciertos organismos.
- Tiempo prolongados.
- Requiere cultivos aislados o puros.
- Seguimiento de protocolos estandarizados.



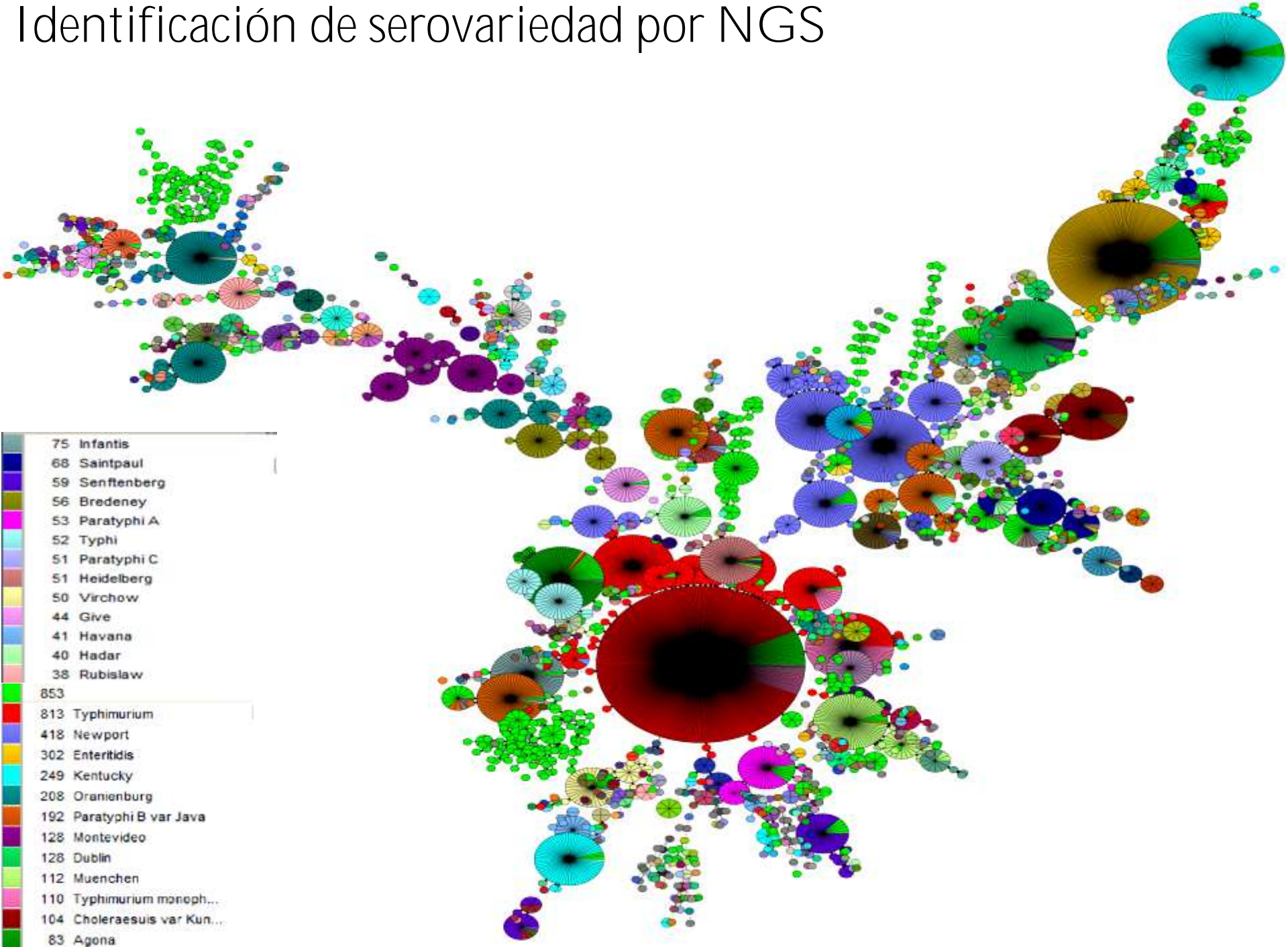
PCR tiempo real

- Sistemas cerrados.
- Detección limitado a un número pequeño de secuencias a la vez.
- Se necesita de secuencias previas para diseño de oligos.
- Detección de patógenos limitada a las secuencias y protocolos existentes.

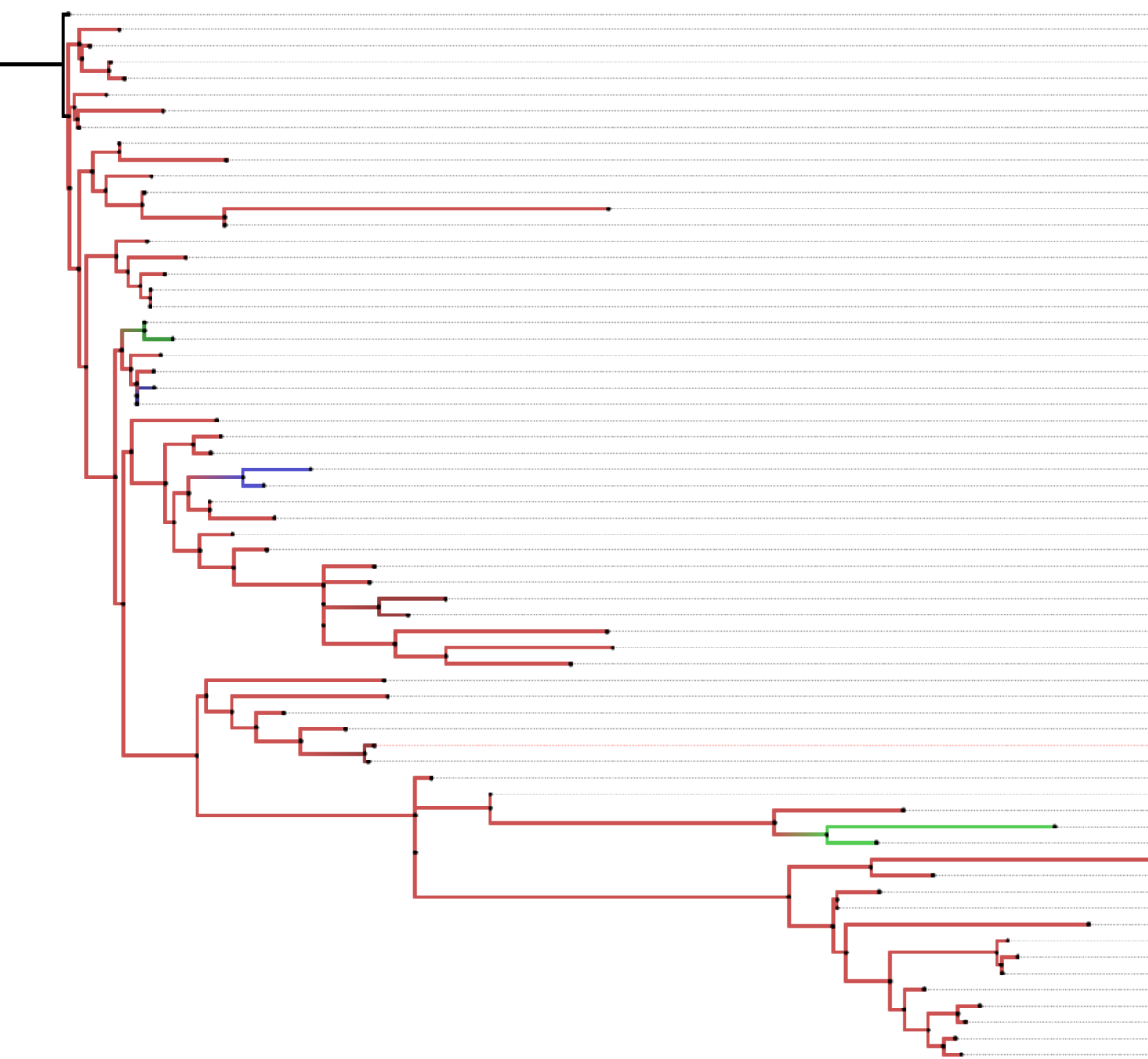


La secuenciación provee las herramientas para coadyuvar los métodos tradicionales para la detección e identificación de patógenos.

Identificación de serovariedad por NGS



Capacidades de detección



- S003710706 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. U288; CP003826
- S003277515 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Heidelberg* str. B182; CP003416
- S002287806 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Newport* str. SL254; CP001113
- S002287365 *Salmonella enterica* (T); LT2; SGSC 1412; ATCC 700720; AE006468
- S00152299 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Newport* str. SL254; CP001113
- S000927383 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi B*; B8; EU18089
- S000498243 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* str. SC B67; AE017220
- S00152331 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Schwarzengrund* str. CVM9533; CP001127
- S003612789 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Lexington*; 352; J0694407
- S002287711 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona* str. SL483; CP001138
- S000640786 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Manhattan*; D0344531
- S000640789 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Anatum*; D0344534
- S003612199 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum*; CUB 05/10; JN615011
- S003612785 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis*; 343; J0694375
- S002287828 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* str. CT_02021853; CP001144
- S000000641 *Salmonella typhimurium*; ATCC 13311; X80681
- S002355351 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. ST4/74; CP002487
- S00168750 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* str. CT_02021853; CP001144
- S000569964 *Salmonella typhimurium* LT2; LT2; SGSC 1412; ATCC 700720; AEO08881
- S003612782 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Give*; 336; J0694328
- S000389576 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Montevideo*; 47074; AF227867
- S00152360 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona* str. SL483; CP001138
- S00152311 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Heidelberg* str. SL476; CP001120
- S000628191 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* str. T12; AE014613
- S000540278 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi*; CT8; AL627279
- S002288211 *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* serovar *62:z4:z23...RSK2980*; CP000880
- S003264178 *Citrobacter rodentium*; NBRC 105723; AB682287
- S000427777 *Citrobacter farmeri* (T); CDC 2991-81; AF025371
- S000387081 *Klebsiella granulomatis*; KH 34; AF010253
- S000003122 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*; ATCC12961; Y17654
- S000458521 *Klebsiella singaporensis*; LX2F; AF250286
- S000001911 *nitrogen-fixing bacterium* CC262C; AF214641
- S002916094 *Citrobacter murliniae*; FRL6; JN092601
- S003264176 *Citrobacter werkmanii*; NBRC 105721; AB682285
- S000427773 *Citrobacter gillenii* (T); CDC 4693-86; AF025367
- S000427779 *Citrobacter werkmanii* (T); CDC 0876-58; AF025373
- S002988575 *Citrobacter braakii*; A8; HQ288930
- S000625865 *Citrobacter freundii*; 9; D0294287
- S003751217 *Citrobacter braakii*; Hb-7; KC139411
- S000653214 *Citrobacter* sp. Az0R-4; D0279751
- S000001311 *Citrobacter freundii* (T); DSM 30039; AJ233408
- S003612781 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Give*; 172; J0694327
- S003612763 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona*; 312; J0694192
- S000925443 *Salmonella enterica* subsp. *salamae*; GTC 1731; AB273734
- S000528802 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi A* str. ATCC 9150; CP000026
- Salmonella spp contig 141 selection**
- S002288580 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona* str. SL483; CP001138
- S000926443 *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*; DSM 9386; EU014683
- S002288455 *Escherichia coli* Q103.H2 str. 12009; AP010958
- S000003908 *Escherichia coli*; Z83205
- S000395963 *Escherichia coli*; AK108; AY098487
- S002288552 *Escherichia coli* SE11; AP009240
- S001094733 *Shigella boydii* CDC 3083-94; B5512; CDC 3083-94; CP001063
- S000598295 *Shigella sonnei* Ss1046; CP000038
- S000000828 *Shigella boydii*; X96965
- S000529103 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655; U00096
- S001044259 *Escherichia coli* str. K12 substr. DH10B; K-12; CP000948
- S00153157 *Erwinia psidii*; 8429; EU490597
- S001045919 *Shigella* sp. 121404; EU723874
- S000022314 *Escherichia coli*; PK3; X80729
- S000000637 *Shigella dysenteriae*; X80680
- S00153160 *Brenneria quercina*; 1895; EU490600
- S000617878 *Escherichia coli*; mothen C4; 10C4; AM157436
- S000629961 *Escherichia coli* str. K12 substr. W3110; AP009048
- S000457242 *Escherichia coli*; AB1157; AY831405

Nombre de la muestra	Confirmación serológica LDDOP	Confirmación por secuenciación CNRDOGM	Informe	Días
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> entérica typhimurium	Irsp-4-2013	5
<i>Salmonella agona</i> LEM 05036	<i>Salmonella agona</i>	<i>Salmonella</i> entérica agona	Irsp-3-2013	31
<i>Salmonella</i> spp M85	<i>Salmonella</i> spp	<i>Salmonella</i> entérica luciana	Irsp-5-2013	7
<i>Salmonella</i> spp M86	<i>Salmonella</i> spp	<i>Salmonella</i> entérica maricopa	Irsp-7-2013	31
<i>Salmonella</i> spp M118	<i>Salmonella poona</i>	<i>Salmonella</i> entérica poona	Irsp-1-2013	10
<i>Salmonella</i> spp M129	<i>Salmonella weltevreden</i>	<i>Salmonella</i> entérica weltevreden	Irsp-2-2013	10
<i>Salmonella</i> spp M165	<i>Salmonella infantis</i>	<i>Salmonella</i> entérica infantis	Irsp-2-2013	21
<i>Salmonella</i> spp M166	<i>Salmonella infantis</i>	Pendiente	Pendiente	21
<i>Salmonella</i> spp M167	<i>Salmonella give</i>	<i>Salmonella</i> entérica give	Irsp-8-2013	21
<i>Salmonella</i> spp M77 mediana	<i>Citrobacter braakii</i> (51%)	<i>Citrobacter</i>	Irsp-11-2013	14
	<i>Citrobacter freundii</i> (49%)			
<i>Salmonella</i> spp M77 chica	<i>Citrobacter braakii</i> (50%)	<i>Citrobacter</i>	Irsp-10-2013	14
	<i>Citrobacter freundii</i> (50%)			
<i>Salmonella</i> entérica subsp. entérica ser. Saint-paul	<i>Salmonella</i> Saint-paul	Pendiente	Pendiente	31
<i>Salmonella</i> entérica subsp. entérica ser. Braenderup	<i>Salmonella</i> Braenderup	<i>Salmonella</i> entérica Braenderup	Irsp-12-2013	32
<i>Salmonella</i> entérica subsp. entérica ser. Newport	<i>Salmonella</i> Newport	pendiente	Pendiente	33
<i>Salmonella</i> certificada	-----	<i>Salmonella</i> entérica Braenderup	Irsp-13-2013	34
			Promedio	21



**“México produce
alimentos sanos y de
calidad”**