

OPTIMIZACIÓN DE ddPCR Y DESARROLLO DE MÓDULOS MULTIPLEX PARA EL ANÁLISIS DE EVENTOS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN MAÍZ

ddPCR OPTIMIZATION AND DEVELOPMENT OF MULTIPLEX MODULES FOR ANALYZING EVENTS OF GENETIC MODIFICATION IN MAIZE

Ángel de León **Márquez-Luna**, Ofelia Yadira **Lugo-Melchor***, Erika Nahomy **Marino-Marmolejo**, Martha Alicia **Rentería-Ledesma**

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A. C. Normalistas No. 800. Colonia Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, 44270 México.

***Autor para correspondencia:** Ofelia Yadira Lugo Melchor (ylugo@ciatej.mx).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2684-027>.

RESUMEN

La siembra, comercialización y consumo de maíz transgénico es motivo de debate en México, ya que es centro de origen y diversificación de variedades y razas de maíz nativo. La reacción en cadena de la polimerasa digital por goteo (droplet digital PCR, ddPCR) ha demostrado ser más eficiente que el estándar de oro para el análisis de maíz modificado genéticamente. Por tanto, el objetivo fue optimizar pruebas de ddPCR para el análisis de transgenes en maíz y generar módulos *multiplex* de detección. Por medio de un análisis bioinformático se evaluó la aplicabilidad de los iniciadores. Después, con gradientes se determinó una temperatura de hibridación y elongación óptima y se evaluó la concentración de iniciadores, la recuperación de gotas y el efecto “lluvia”. La optimización se verificó por medio de pruebas *dúplex*, y finalmente se desarrollaron módulos *multiplex*. La temperatura que permitió una separación clara entre clústeres de gotas positivas y negativas para las 11 pruebas *simplex* fue 58.5 °C, con concentraciones relativamente bajas de iniciadores y sondas. Las gotas recuperadas resultaron adecuadas según el propósito de los análisis y la “lluvia” obtenida resultó irrelevante. En las pruebas *dúplex* se confirmó el potencial para la cuantificación sin usar curvas de calibración; la mayoría de los ensayos concordaron con los reportes de validación o con los porcentajes teóricos de variabilidad genética. Por último, en los módulos *multiplex* se realizaron variaciones en la concentración de iniciadores y sondas para diferenciar clústeres de gotas positivas en un canal detector único. Las mejores diferencias se lograron con concentraciones con diferencias de 1:3. Los resultados mostraron que las pruebas optimizadas son adecuadas para la detección y posible cuantificación de 10 transgenes en maíz.

ABSTRACT

The planting, marketing and consumption of transgenic maize is a matter of debate in Mexico, since it is a centre of origin and diversification of native maize varieties and breeds. The droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) has proven to be more efficient than the gold standard test (qPCR) for the analysis of genetically modified maize. Therefore, the objective was to optimize ddPCR tests for transgene analysis in maize and to generate multiplex detection modules. The applicability of the primers was evaluated by bioinformatics analysis. Then, using gradients, an optimal hybridization and elongation temperature was determined and the primers concentration, droplet recovery and the “rain” effect were evaluated. Optimization was verified by duplex testing, and finally multiplex modules were developed. The temperature that allowed a clear separation between positive and negative droplet clusters for the 11 simplex tests was 58.5 °C, with relatively low concentrations of primers and probes. The recovered droplets were adequate for the purpose of the analyses and the “rain” obtained was irrelevant. In the duplex tests, the potential for quantification was confirmed without using calibration curves; most assays agreed with validation reports or with theoretical percentages of genetic variability. Finally, in the multiplex modules, variations in primers and probe concentration were performed to differentiate clusters of positive droplets in a single detector channel. The best differences were achieved at concentrations with 1:3 differences. The results showed that the optimized tests are suitable for the detection and possible quantification of 10 transgenes in maize.

Key words: modified maize, test optimization, ddPCR, multiplex, transgenes.

Recibido: marzo, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 663-680. 2021.

Palabras clave: maíz modificado, optimización de pruebas, ddPCR, *multiplex*, transgenes.

INTRODUCCIÓN

El avance biotecnológico y el desarrollo de técnicas como la del ADN recombinante generan un sin fin de posibilidades. Entre ellas la de obtener organismos genéticamente modificados, a los cuales se les ha insertado un fragmento de ADN con el fin de que expresen proteínas que les confieran cualidades de interés agrícola como la resistencia a plagas y herbicidas (Gutiérrez *et al.*, 2015b). En el maíz transgénico estas cualidades se reflejan de manera más común en la resistencia a herbicidas, plagas o ambientes desfavorables (Trejo *et al.*, 2015).

Sin embargo, la generación de variedades de maíz transgénico y el comercio internacional de las mismas es aún motivo de debate, de manera especial en México, no solo por ser un elemento estratégico en la soberanía y seguridad alimentaria del país (González *et al.*, 2016), sino también porque se considera a México como el centro de domesticación de este grano (Acosta, 2009). A partir de que iniciaron en México los procesos de investigación, desarrollo, liberación al ambiente y comercio de organismos genéticamente modificados (OGM), se hace necesario contar con leyes y organismos reguladores. Así como con métodos que permitan la detección, identificación y cuantificación de transgenes en alimentos.

En lo referente al comercio internacional, México importa maíz amarillo para cubrir la demanda interna. Casi el 100% de dicha importación proviene de Estados Unidos, país que es el mayor productor de OGM, donde aún no existen tratamientos especiales para maíces modificados y por tanto estas semillas terminan por mezclarse con variedades no modificadas (Trejo *et al.*, 2015). Las exportaciones de maíz mexicano se dirigen en gran parte a la Unión Europea en donde existen regulaciones estrictas de etiquetado si se sobrepasa un límite (0.9% de OGM) (Dobnik *et al.*, 2015).

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de transgenes en alimentos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se basa en la detección específica de una secuencia de ADN al delimitarla por un par de iniciadores y amplificarla millones de veces gracias a la capacidad de la ADN polimerasa (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Todavía el

INTRODUCTION

Biotechnological progress and the development of techniques such as recombinant DNA have generated endless possibilities. Among them is the possibility of obtaining genetically modified organisms, to which a DNA fragment has been inserted to express proteins that give them qualities of agricultural interest such as resistance to pests and herbicides (Gutiérrez *et al.*, 2015b). In transgenic maize these qualities are most commonly reflected in resistance to herbicides, pests or unfavourable environments (Trejo *et al.*, 2015).

However, the generation of transgenic maize varieties and their international trade is still a matter of debate, especially in Mexico, not only because they are strategic elements of food sovereignty and security in the country (González *et al.*, 2016), but also because Mexico is considered the centre of domestication of maize (Acosta, 2009). Since the research, development, environmental release and trade of genetically modified organisms (OGM) began in Mexico, it has become necessary to have laws and regulatory entities. It is also necessary to have methods that allow the detection, identification and quantification of transgenes in food.

In terms of international trade, Mexico imports yellow maize to cover domestic demand. Almost 100% of such imports come from the United States, a country that is the main producer of OGM, where there are still no special treatments for modified maize and therefore these seeds end up being mixed with non-modified varieties (Trejo *et al.*, 2015). Mexican maize exports are largely directed to the European Union where there are strict labelling regulations if a limit (0.9% OGM) in seeds content is exceeded (Dobnik *et al.*, 2015).

One of the most widely used techniques for the detection of transgenes in food is the polymerase chain reaction (PCR). This technique is based on the specific detection of a DNA sequence by delimiting it by a pair of primers and amplifying it millions of times due to the capacity of DNA polymerase (Tamay de Dios *et al.*, 2013). The gold standard test for transgene identification and quantification is still the qPCR, which additionally uses fluorescent probes that bind to the amplified product and are degraded by the action of the enzyme Taq polymerase to generate

estándar de oro para la identificación y cuantificación de transgenes es la qPCR, la cual usa además sondas fluorescentes que se unen al producto amplificado y se degradan por acción de la enzima Taq polimerasa para generar una señal detectable. Luego, para estimar el contenido del transgén se usan curvas de calibración construidas con muestras estándar de concentración conocida (Burns *et al.*, 2010).

En años más recientes, otra variante conocida como ddPCR ha ganado popularidad para el análisis de organismos genéticamente modificados (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a). Esta técnica consiste en la partición de la mezcla de reacción de PCR en miles de microgotas y la cuantificación por evento de las moléculas de ADN de interés encapsuladas en estas gotas. Las gotas positivas que contienen al menos una copia de la molécula de ADN de interés muestran un aumento de fluorescencia en comparación con las gotas negativas.

Para el análisis de OGM, la ddPCR ha demostrado tener grandes ventajas en comparación con la qPCR, porque ofrece resultados más exactos, es menos susceptible a contaminaciones e inhibiciones derivadas de la matriz y la determinación absoluta de las copias de ADN es inherente y cuantitativa; razón por la cual no se requiere una curva de calibración (Pecoraro *et al.*, 2019). Además, para el análisis de transgenes el costo en ddPCR es menor, ya que se gasta un aproximado de \$439 MXN (20.9 USD) por muestra, en lugar de los \$469 MXN (22.3 USD) por muestra en qPCR. Estos costos además se reducen en los análisis *multiplex* (Morisset *et al.*, 2013).

En la búsqueda de mejorar el sistema de trazabilidad, el objetivo de este estudio fue optimizar pruebas *simplex* y *dúplex* para la detección y cuantificación de 10 eventos de modificación genética en maíz aprobados para consumo humano y animal tanto en México como en la Unión Europea (Bt11, Nk603, Das59122, Das1507, Ga21, Mir604, Mir162, Mon810, Mon863 y Mon88017) y generar módulos *multiplex* a partir de estas pruebas para la detección simultánea de estos eventos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Para el estudio se utilizaron muestras de maíz molido provenientes de ensayos de aptitud internacionales organizados por

a detectable signal. Calibration curves constructed with standard samples of known concentration are then used to estimate the transgene content (Burns *et al.*, 2010).

In more recent years, another variant known as ddPCR has gained popularity for the analysis of genetically modified organisms (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a). This technique involves partitioning the PCR reaction mix into thousands of microdroplets and event-based quantification of DNA molecules of interest encapsulated in these droplets. Positive droplets containing at least one copy of the DNA molecule of interest show increased fluorescence compared to negative droplets.

For OGM analysis, ddPCR has proven to have great advantages compared to qPCR because it provides more accurate results, is less susceptible to matrix-derived contaminations and inhibitions, and the absolute determination of DNA copies is inherently quantitative; which is the reason why a calibration curve is not required (Pecoraro *et al.*, 2019). Furthermore, the cost in ddPCR is lower for transgene analysis, since an approximate of \$20.9 USD (439 MXN) per sample is spent, instead of \$22.3 USD (469 MXN) per sample in qPCR. These costs are further reduced with the multiplex analyses (Morisset *et al.*, 2013).

In the search to improve the traceability system, the objective of this study was to optimize simplex and duplex tests for the detection and quantification of 10 genetic modification events in maize approved for human and animal consumption in both Mexico and the European Union (Bt11, Nk603, Das59122, Das1507, Ga21, Mir604, Mir162, Mon810, Mon863 and Mon88017) and to generate multiplex modules from these tests for the simultaneous detection of these events.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Milled maize samples from international proficiency trials organized by the United States Department of Agriculture (USDA) containing one or more transgenes of interest at different concentrations were used for the study. Two certified reference materials (MRC) were used, which were obtained from the Joint Research Centre (JRC; Geel, Belgium), ERM-BF413d and IRMM-412R-5 for Mon810 and Bt11.

el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA) que contenían uno o más transgenes de interés en concentraciones distintas. Dos materiales de referencia certificados (MRC) se utilizaron, los cuales se obtuvieron del Joint Research Centre (JRC; Geel, Bélgica) ERM-BF413d e IRMM-412R-5 para Mon810 y Bt11.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de 200 mg de muestra con el kit comercial de extracción Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, Estados Unidos) con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN purificado se determinó por medio de espectrofotometría con el equipo NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Para la pureza se utilizó como referencia el índice 260/280. Cada muestra se ajustó a una concentración de 50 ng μL^{-1} y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Iniciadores

Las secuencias de los iniciadores y sondas se obtuvieron de una colección de la Unión Europea (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/default.htm>) (Cuadro 1 y Cuadro 2). El juego de iniciadores identificado como *Hmg* corresponde al gen endógeno. Las sondas se marcaron con FAM o HEX. El apagador en todas las sondas fue un *Black hole* sin emisión de fluorescencia.

Análisis bioinformático

Para confirmar la especificidad de los iniciadores y sondas se utilizaron las herramientas Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), JRC GMO *amplicons* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmoamplicons/>) y JRC GMO *matrix* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>).

La intención era generar módulos *multiplex* de hasta cuatro genes de interés por ensayo, por lo cual se verificó la posibilidad de formación de estructuras secundarias (heterodímeros) con la herramienta OligoAnalyzer (IDT) (<https://www.idtdna.com/calc/analizer>) y se realizaron PCR *multiplex in silico* con el software FastPCR (Kalendar *et al.*, 2017) para corroborar la hibridación correcta de cada juego de iniciadores y su aplicabilidad en ensayos *multiplex*.

ddPCR simplex

La mezcla de reacción consistió en 10.5 μL de ddPCR *supermix for probes*® (Bio-Rad, USA), 300 nM de cada iniciador, 180 nM de sonda y 100 ng de ADN, ajustado con agua estéril hasta un volumen final de 21 μL . Se depositaron 20 μL de la mezcla de

DNA extraction

DNA was extracted from 200 mg of sample with the commercial extraction kit Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, USA) according to the manufacturer instructions. The concentration and purity of the purified DNA was determined by spectrophotometry with a NanoDrop® 2000 unit (Thermo Fisher Scientific, USA). For purity, the 260/280 index was used as a reference. Each sample was adjusted to a concentration of 50 ng μL^{-1} and stored at -20°C until use.

Primers

The primers and probe sequences were obtained from a European Union collection (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/default.htm>) (Table 1 and Table 2). The primers set identified as *Hmg* corresponds to the endogenous gene. The probes were labelled with FAM or HEX. The quencher in all probes was a *Black hole* without fluorescence emission.

Bioinformatics analysis

The Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), JRC GMO *amplicons* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmoamplicons/>) and JRC GMO *matrix* (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>) tools were used to confirm the specificity of the primers and probes.

The intention was to generate multiplex modules of up to four genes of interest per assay, so the possibility of secondary structure formation (heterodimers) was verified with the OligoAnalyzer (IDT) tool (<https://www.idtdna.com/calc/analizer>) and multiplex *in silico* PCR was performed with FastPCR software (Kalendar *et al.*, 2017) to corroborate the correct hybridization of each set of primers and their applicability in multiplex assays.

Simplex ddPCR

The reaction mix consisted of 10.5 μL of ddPCR *supermix for probes*® (Bio-Rad, USA), 300 nM of each primer, 180 nM of probe and 100 ng of DNA, adjusted with sterile water to a final volume of 21 μL . Subsequently, 20 μL of this mix and 70 μL of droplet generator oil were deposited on an 8-well plate, which was then transferred to the QX200 droplet generator (Bio-Rad, USA). 40 μL of droplets were deposited on a PCR plate and amplified in the T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA). The thermal program consisted of a first denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles, each cycle consisting of a denaturation step at 95°C for 15 s and a hybridization and elongation step with temperature gradient from 58.5 to 65°C .

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores y sonda.
Table 1. Primer and probe sequence.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplícón (pb)
Hmg-f	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79
Hmg-r	GCTACATAGGGAGCCTTGTCTCT	
Hmg-p	HEX-CAATCCACACAAACGCACGCGTA	
Bt11-f	GCGGCTTATCTGTCTCAGGG	75
Bt11-r	CAACTGGTCTCCTCTCCGGA	
Bt11-p	6-FAM-CGTGTTCCCTCGGATCTCGACATGT	
Nk603-f	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTAA	108
Nk603-r	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT	
Nk603-p	HEX-TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC	
Mir604-f	GCGCACGCAATTCAACAG	76
Mir604-r	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT	
Mir604-p	6-FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG	
Mir162-f	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	92
Mir162-r	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA	
Mir162-p	HEX-TCTAGACAATTTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA	
Mon810-f	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	92
Mon810-r	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	
Mon810-p	6-FAM-AACATCCTTTGCCATTGCCCAGC	
Das59122-f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC	86
Das59122-r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG	
Das59122-p	6-FAM-TTTAACTGAAGCGGGAAACGACAA	
Das1507-f	TAGTCTTCGGCCAGAATGG	58
Das1507-r	CTTTGCCAAGATCAAGCG	
Das1507-p	6-FAM-TAACTCAAGGCCCTCACTCCG	
Ga21-f	CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA	101
Ga21-r	GCGATCCTCCTCGCGTT	
Ga21-p	6-FAM-TTTCTCAACAGCAGTGGGTCCGGGT	
Mon863-f	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT	84
Mon863-r	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC	
Mon863-p	6-FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA	
Mon88017-f	GAGCAGGACCTGCAGAAAGCT	95
Mon88017-r	GCCGGAGTTGACCATCCA	
Mon88017-p	6-FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT	

†F: hacia adelante; ‡R: en reversa; §P: sonda. ♦ †F: forward; ‡R: reverse; §P: probe.

reacción y 70 µL de aceite generador de gotas en un cartucho de 8 pozos, el cual se trasladó luego al generador de gotas QX200 (Bio-Rad, Estados Unidos). De esta mezcla se depositaron 40 µL de gotas se depositaron en una placa de PCR y se amplificaron en el termociclador T100 (Bio-Rad, USA). El programa térmico consistió en un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos, cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización a 95 °C por 15 s y un paso de hibridación y elongación con gradiente de temperatura de 58.5 a 65 °C por 1 min (58.5, 59.4, 60.7, 62.3, 63.6, 64.5, y 65 °C) para las pruebas con *Hmg*, *Bt11*, *Mir162*, *Mon810*, *Mon863*, *Nk603*, *Das59122* y *Das1507* y un gradiente de temperatura de 53.5 a 60 °C por 1 min (53.5, 54.3, 55.7, 57.3, 58.5, 59.5 y 60 °C para los ensayos

for 1 min (58.5, 59.4, 60.7, 62.3, 63.6, 64.5, and 65 °C) for the *Hmg*, *Bt11*, *Mir162*, *Mon810*, *Mon863*, *Nk603*, *Das59122*, and *Das1507* tests at a 53.5 to 60 °C gradient of temperature for 1 min (53.5, 54.3, 55.7, 57.3, 58.5, 59.5, and 60 °C) for the *Ga21*, *Mir604*, and *Mon88017* tests, after the 40 cycles continued with an incubation step at 98 °C for 10 min and then cooling to 4 °C. The plates were then transferred to the QX200 bead reader (Bio-Rad, USA).

Duplex ddPCR

In the duplex assays, the endogenous *Hmg* gene and a genetic modification event were analysed simultaneously (10

Cuadro 2. Modificaciones genéticas.
Table 2. Genetic modifications.

Evento específico	Objetivo de la modificación
DAS-Ø15Ø7-1*	Resistencia al lepidóptero <i>Ostrinia nubilalis</i> y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
MON-ØØ81Ø-6 *	Resistencia al lepidóptero <i>Ostrinia nubilalis</i>
MON-88Ø17-3 *	Resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp. y tolerancia al herbicida glifosato
MON-ØØ6Ø3-6 *	Tolerancia al herbicida glifosato
DAS-59122-7 *	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp.
SYN-BTØ11-1 *	Resistencia al lepidóptero <i>Ostrinia nubilalis</i> y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
MON-ØØØ21-9 *	Tolerancia al herbicida glifosato
MON-ØØ863-5 *	Resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp.
SYN-IR162-4 *	Resistencia a insectos lepidópteros
SYN-IR6Ø4-5 *	Resistencia al coleóptero <i>Diabrotica</i> sp.

Ga21, Mir604 y Mon88017, después de los 40 ciclos se continuó con un paso de incubación a 98 °C por 10 min y después enfriamiento a 4 °C. Después las placas se trasladaron al lector de gotas QX200 (Bio-Rad, Estados Unidos).

ddPCR *dúplex*

En los ensayos *dúplex* se analizaron de manera simultánea el gen endógeno Hmg y un evento de modificación genética (10 pruebas). El gen endógeno se detectó en el canal HEX en todas las pruebas. Mientras que el evento de modificación genética se detectó en el canal FAM en todas las pruebas con excepción del evento Nk603, el cual se detectó con el gen endógeno en el canal HEX.

En cada mezcla de reacción se agregó el juego de iniciadores adicional y se utilizaron las mismas concentraciones que en los ensayos *simplex* (300 nM de cada iniciadores y 180 nM de sonda) para lo cual se redujo la cantidad de agua estéril. En el caso del ensayo Hmg+Nk603, al detectarlos en el mismo canal de fluorescencia se modificaron las concentraciones de cada juego de iniciadores para aumentar la amplitud de las gotas positivas del evento Nk603. En este ensayo las concentraciones de iniciadores para el gen endógeno consistieron en 300 nM de cada iniciador y 100 nM de sonda, para el evento Nk603 consistieron en 900 nM de cada iniciador y 300 nM de sonda.

En el programa térmico se modificó la temperatura de hibridación y elongación de acuerdo con los resultados obtenidos de los gradientes de temperatura.

tests). The endogenous gene was detected in the HEX channel in all tests, while the genetic modification event was detected in the FAM channel in all tests except for the Nk603 event, which was detected with the endogenous gene in the HEX channel.

In each reaction mix the additional set of primer was added and the same concentrations were used as in the simplex assays (300 nM of each primer and 180 nM of probe) for which the amount of sterile water was reduced. In the case of the Hmg+Nk603 assay, upon detection in the same fluorescence channel, the concentrations of each set of primers were modified to increase the amplitude of the positive droplets of the Nk603 event. In this assay the oligos concentrations for the endogenous gene consisted of 300 nM of each primer and 100 nM of probe, for the Nk603 event consisted of 900 nM of each primer and 300 nM of probe.

In the thermal program, the hybridization and elongation temperature were modified according to the results obtained from the temperature gradients.

Multiplex ddPCR

As in the duplex tests, the optimal hybridization and elongation temperature obtained with the temperature gradients was used. Furthermore, different combinations of primers and probes were tested when analyzing two genes of interest for the same channel. The combinations tested were: 150 nM primers and 90 nM probe (*low*) and 300 nM primers and 180 nM probe (*high*); 300 nM primers and 150 nM probe (*low*) and 600 nM

ddPCR *multiplex*

Al igual que en las pruebas *dúplex*, se utilizó la temperatura de hibridación y elongación óptima obtenida con los gradientes de temperatura. Además, se probaron combinaciones de iniciadores y sondas distintas cuando se analizaron dos genes de interés para un mismo canal. Las combinaciones probadas fueron: 150 nM iniciadores y 90 nM sonda (*low*) y 300 nM iniciadores y 180 nM sonda (*high*); 300 nM iniciadores y 150 nM sonda (*low*) y 600 nM iniciadores y 300 nM sonda (*high*); y 300 nM iniciadores y 100 nM sonda (*low*) y 900 nM iniciadores y 300 nM sonda (*high*). En las pruebas en las cuales no fue necesario analizar dos genes por canal se utilizaron las concentraciones de iniciadores y sondas usadas en las pruebas *simplex* (300 nM y 180 nM). En cada grupo *multiplex* se incluyó el juego de iniciadores para el gen *Hmg*.

Análisis de resultados de ddPCR

El análisis de resultados se realizó con el programa QuantaSoft Analysis Pro v. 1.0 (Bio-Rad; <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/QuantaSoft-Analysis-Pro-v1.0-Manual.pdf>) para discriminar las gotas positivas de las gotas negativas por medio de un umbral de amplitud de fluorescencia establecido de forma manual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis bioinformático

La especificidad de los 11 juegos de iniciadores se evaluó *in silico*. Todos resultaron específicos para el gen para el cual están diseñados, esta característica ya se ha evaluado en los reportes de validación de la propia Comisión Europea (Mazzara *et al.*, 2005; Delobel *et al.*, 2007) y se reafirmó con las herramientas ya mencionadas. Así mismo cada iniciador hibridó correctamente en su templado específico y generó un amplicón del tamaño esperado de acuerdo con las pruebas PCR *in silico* realizadas con el software FastPCR.

Ya que un objetivo de este estudio fue el desarrollo de módulos *multiplex*, se comprobó esta capacidad para cada juego de iniciadores. En primer lugar, se evaluaron las interacciones entre cada iniciador y sonda (formación de heterodímeros) con la herramienta OligoAnalyzer. Con base en estos resultados, se generaron 4 grupos *multiplex* (1 *tetraplex* y 3 *triplex*). Grupo 1: Hmg, Nk603, Bt11 y Mon810; grupo 2:

primers and 300 nM probe (*high*); and 300 nM primers and 100 nM probe (*low*) and 900 nM primers and 300 nM probe (*high*). In the tests in which it was not necessary to analyze two genes per channel, the concentrations of primers and probes applied in the *simplex* tests (300 nM and 180 nM) were used. In each *multiplex* group, the set of primers for the *Hmg* gene was included.

Analysis of ddPCR results

Results analysis was performed with QuantaSoft Analysis Pro v. 1.0 (Bio-Rad; <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/QuantaSoft-Analysis-Pro-v1.0-Manual.pdf>) to discriminate positive from negative droplets by a fluorescence amplitude threshold set manually.

RESULTS AND DISCUSSION

Bioinformatics analysis

The specificity of the 11 sets of primers was evaluated *in silico*. All of them were specific for the gene for which they were designed; this characteristic has already been evaluated in the validation reports of the European Commission (Mazzara *et al.*, 2005; Delobel *et al.*, 2007) and was reaffirmed with the aforementioned tools. Likewise, each primer hybridized correctly to its specific template and generated an amplicon of the expected size according to the *in silico* PCR tests performed with FastPCR software.

Since one goal of this study was the development of *multiplex* modules, this capability was tested for each set of primers. First, the interactions between each primer and probe (heterodimer formation) were evaluated with the OligoAnalyzer tool. Based on these results, 4 *multiplex* groups (1 *tetraplex* and 3 *triplex*) were generated. Group 1: Hmg, Nk603, Bt11 and Mon810; group 2: Hmg, Mon88017 and Mon863; group 3: Hmg, Ga21 and Das59122; and group 4: Hmg, Mir604 and Das1507. These were constructed with the combination of primers and probe sets with the lowest number of interactions with each other and therefore lower probability of secondary structure generation. The primer set for Mon810 event was the only one with no interactions within its *multiplex* group (according to OligoAnalyzer standards).

In a previous study, Dobnik *et al.* (2015) evaluated the interactions of these same primer sets with the Autodimer program, in that study only

Hmg, Mon88017 y Mon863; grupo 3: Hmg, Ga21 y Das59122; y grupo 4: Hmg, Mir604 y Das1507. Estos se construyeron con la combinación de juegos de iniciadores y sondas con el menor número de interacciones entre sí y por lo tanto probabilidad menor de generación de estructuras secundarias. El juego de iniciadores para el evento Mon810 fue el único que no presentó interacciones dentro de su grupo multiplex (según los estándares de OligoAnalyzer).

En un estudio previo, Dobnik *et al.* (2015) evaluaron las interacciones de estos mismos juegos de oligos con el programa Autodimer, encontraron dos combinaciones (Das59122P-Mon88017P y Mir604P-Das59122R) que afectaron la eficiencia de las pruebas. Las diferencias entre ese estudio se deben probablemente al programa informático utilizado para evaluar las interacciones y sus reglas de decisión. En cualquier caso, la interacción *in vitro* de los iniciadores ya se había evaluado en aquel estudio (Dobnik *et al.*, 2015). Por lo tanto, los grupos formados se mantuvieron en este estudio.

Así mismo, con las pruebas PCR *multiplex in silico* realizadas con FastPCR se comprobó que los cuatro módulos *multiplex* formados eran adecuados. Esto debido a que cada iniciador hibridó de manera específica con la generación de los productos esperados y sin la formación de estructuras secundarias no deseadas.

ddPCR *simplex*

Gradiente de temperatura

La meta era obtener una amplitud que permitiera discriminar entre el clúster de gotas positivas y el clúster de gotas negativas. De modo que se ensayó con un primer gradiente de 65-58.5 °C (Figura 1).

Con la consideración de que todos los juegos de iniciadores tenían una temperatura de fusión similar (64 °C promedio) se probó un gradiente más bajo para observar el efecto en la amplitud. Por tal razón, para los ensayos restantes se probó con un gradiente menor (Figura 2).

La temperatura de hibridación y elongación de 58.5 °C (marcada en rojo) arrojó la diferencia mayor en la amplitud y permitió discriminar de manera clara y en todos los ensayos los clústers de gotas positivas y

two combinations (Das59122P-Mon88017P and Mir604P-Das59122R) were found to affect testing efficiency. The differences between that study and this study are probably due to the software used to evaluate the interactions and its decision rules. In any case, the *in vitro* interaction of the primers had already been evaluated in that study (Dobnik *et al.*, 2015). Therefore, the groups formed were maintained in this study.

Likewise, with *in silico* multiplex PCR tests performed with FastPCR, the four multiplex modules formed were found to be adequate. Because each primer hybridized in a specific manner with the generation of the expected products and without the formation of unwanted secondary structures.

Simplex ddPCR

Temperature gradient

The goal was to obtain an amplitude that would allow discrimination between the cluster of positive droplets and the cluster of negative droplets. Therefore, a first gradient of 65-58.5 °C was tested (Figure 1).

Considering that all sets of primers had a similar melting temperature (64 °C average), a lower gradient was tested to observe the effect on amplitude. For this reason, a lower gradient was tested for the remaining assays (Figure 2).

The hybridization and elongation temperature of 58.5 °C (marked in red) yielded the greatest difference in amplitude and allowed clear discrimination of positive and negative droplet clusters in all assays. Moreover, this temperature was not so far from the temperature at which these primers were validated in qPCR assays (60 °C) (Mazzara *et al.*, 2005).

The increase in amplitude as a consequence of reduced hybridization and elongation temperature is something already reported (Gerdes *et al.*, 2016; Lievens *et al.*, 2016). However, this has to be evaluated with special care, as the reduction in temperature may result in non-specificities (Lievens *et al.*, 2016). In this study, nonspecific co-amplifications were not observed in any of the tests. Therefore, the temperature of 58.5 °C was chosen for all subsequent tests.

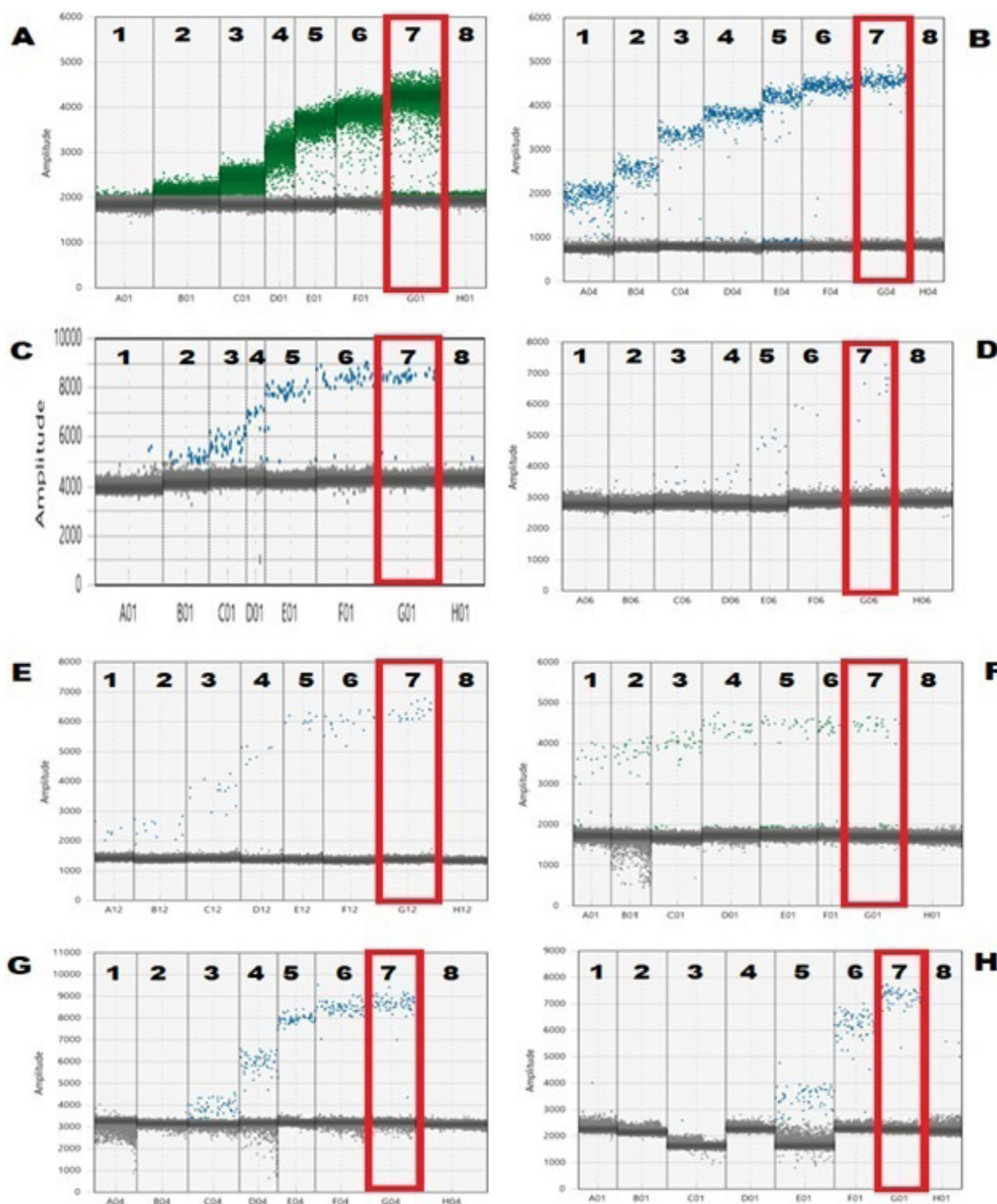


Figura 1. A) Ensayo Hmg, B) Ensayo Bt11, C) Ensayo Mir162, D) Ensayo Mon810, E) Ensayo Mon863, F) Ensayo Nk603, G) Ensayo Das59122 y H) Ensayo Das1507. Gradiente de temperatura (°C): 65(1), 64.5(2), 63.6(3), 62.3(4), 60.7(5), 59.4(6), 58.5(7); y NTC(8).

Figure 1. A) Hmg assay, B) Bt11 assay, C) Mir162 assay, D) Mon810 assay, E) Mon863 assay, F) Nk603 assay, G) Das59122 assay and H) Das1507 assay. Gradient of temperature (°C): 65(1), 64.5(2), 63.6(3), 62.3(4), 60.7(5), 59.4(6), 58.5(7); and NTC(8).

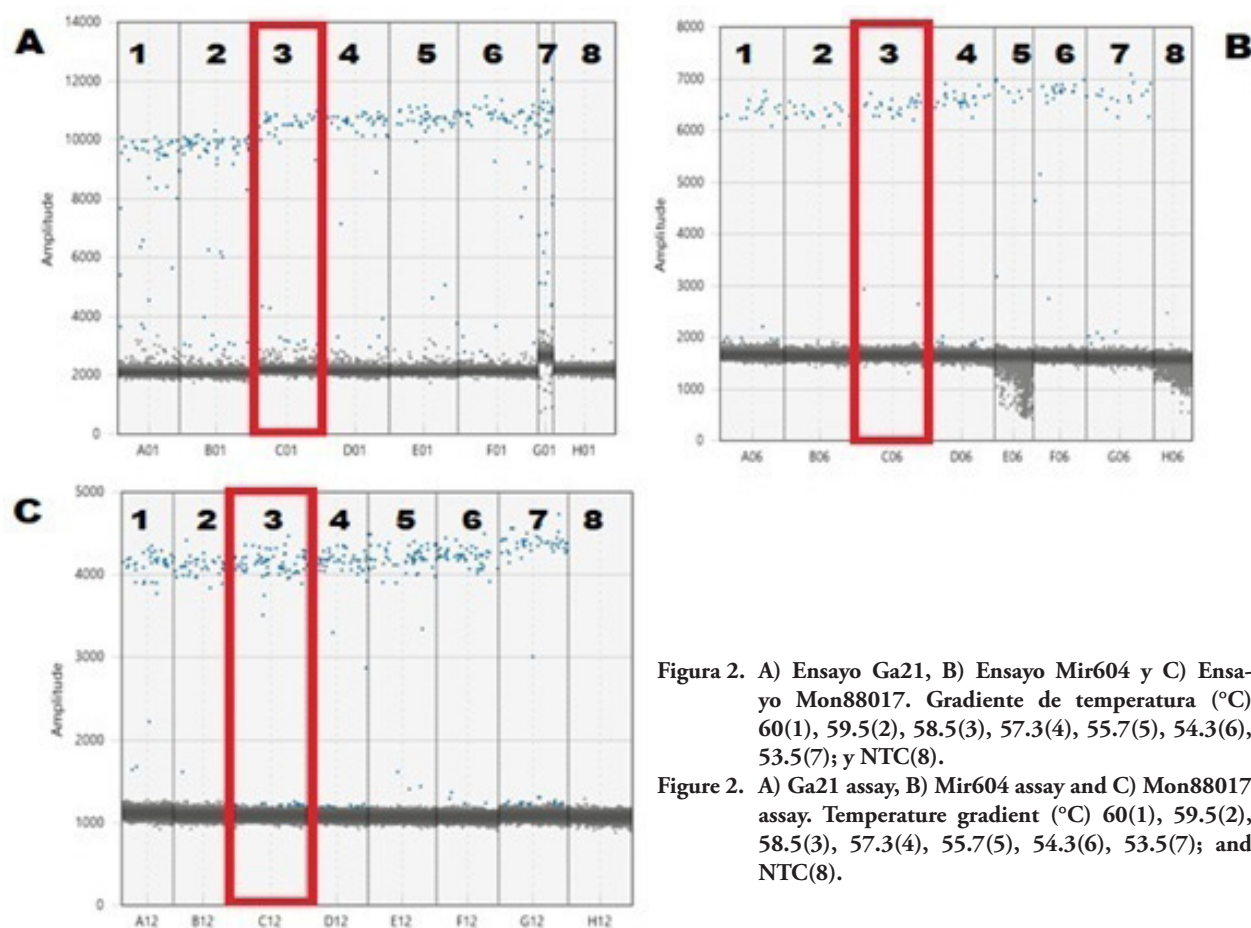


Figura 2. A) Ensayo Ga21, B) Ensayo Mir604 y C) Ensayo Mon88017. Gradiente de temperatura (°C) 60(1), 59.5(2), 58.5(3), 57.3(4), 55.7(5), 54.3(6), 53.5(7); y NTC(8).

Figure 2. A) Ga21 assay, B) Mir604 assay and C) Mon88017 assay. Temperature gradient (°C) 60(1), 59.5(2), 58.5(3), 57.3(4), 55.7(5), 54.3(6), 53.5(7); and NTC(8).

negativas. Además, esta temperatura no se alejó tanto de la temperatura con la que se validaron estos iniciadores en ensayos de qPCR (60°C) (Mazzara *et al.*, 2005).

El incremento en la amplitud como consecuencia de la reducción de la temperatura de hibridación y elongación es algo ya documentado (Gerdes *et al.*, 2016; Lievens *et al.*, 2016). Sin embargo, esto tiene que evaluarse con especial cuidado, ya que la reducción en la temperatura puede derivar en inespecificidades (Lievens *et al.*, 2016). En este estudio no se observaron co-amplificaciones inespecíficas en ninguna de las pruebas. Por lo tanto, se eligió la temperatura de 58.5 °C para todas las pruebas subsecuentes.

Concentración de iniciadores y sondas

Las recomendaciones en cuanto a las concentraciones de iniciadores rondan los 500 nM y en general se recomienda que sean mayores a las concentraciones

Concentration of primers and probes

Recommendations for primers concentrations hover around 500 nM and are generally recommended to be higher than the concentrations that would be used in qPCR assays (Pecoraro *et al.*, 2019). However, relatively low concentrations (300 nM for primers and 180 nM for probes) were used in this study. This was decided based on two considerations; to guarantee efficiency with low concentrations, due to the development of multiplex modules in which tests would be performed with combinations that would include these concentrations; and also, that there is evidence of the use of low concentrations of primers and probes in OGM detection tests without recorded problems (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a).

While an increase in primer concentration leads to higher fluorescence in positive droplets and thus better separation between this cluster of positive and

que se utilizarían en pruebas de qPCR (Pecoraro *et al.*, 2019). No obstante, en este estudio se utilizaron concentraciones relativamente bajas (300nM para oligos y 180nM para sondas). Lo anterior se decidió al tomar en cuenta dos consideraciones; garantizar la eficiencia con concentraciones bajas, debido al desarrollo de módulos *multiplex* en los cuales se harían pruebas con combinaciones que incluirían estas concentraciones; y también, que existe evidencia del uso de concentraciones bajas de iniciadores y sondas en pruebas de detección de OGM sin problemas registrados (Morisset *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015a).

Si bien, un aumento en la concentración de iniciadores provoca una fluorescencia mayor en las gotas positivas y por ello una separación mejor entre este clúster de gotas positivas y el de gotas negativas, no hay efectos en la reducción del efecto de “lluvia” ni en la cuantificación (Koppel *et al.*, 2017; Grelewska *et al.*, 2018). Con esta consideración aunada a la evidente separación de clústers con la concentración de iniciadores y sondas en combinación con la temperatura de hibridación y elongación (58.5 °C), no se evaluaron más concentraciones para los ensayos *simplex* y *dúplex*. Debido a que, además del buen desempeño obtenido al reducir las cantidades utilizadas de iniciadores y sondas, también se redujo el costo por reacción. Dicho costo es uno de los puntos más criticados en pruebas de ddPCR.

Conteo de gotas

El manual de usuario de ddPCR de Bio-Rad recomienda entre 12 000 y 16 000 gotas para cálculos de concentración, y al menos 10 000 para cualquier otra prueba. En las corridas de optimización (88 *runs*) el promedio de gotas correspondió a 12 655 gotas, con casos poco frecuentes de generación por debajo de las 10 000 gotas (14 *runs*). Este promedio resultó adecuado de acuerdo con el propósito de las pruebas y las recomendaciones del fabricante. Además, coincide con otras pruebas de detección de OGM (Koppel y Bucher, 2015; Koppel *et al.*, 2017).

Las diferencias con otras pruebas que promedian mayor recuperación de gotas (Gerdes *et al.*, 2016) se pueden explicar por el uso de micropipetas multicanal que facilitan la transferencia. Otro punto para considerar es la estandarización del proceso, que eventualmente mejorará el conteo de gotas.

negative droplets, there is no effect on reducing the “rain” effect or quantification (Koppel *et al.*, 2017; Grelewska *et al.*, 2018). With this consideration coupled with the evident cluster separation with the concentration of primers and probes in combination with the hybridization and elongation temperature (58.5 °C), no further concentrations were evaluated for the simplex and duplex assays. Because, in addition to the good performance obtained by reducing the amounts of primers and probes used, the cost per reaction was also reduced. This cost is one of the most criticized points in ddPCR assays.

Droplet count

The Bio-Rad ddPCR user manual recommends between 12 000 and 16 000 droplets for concentration calculations, and at least 10 000 for any other test. In the optimization runs (88 runs) the average number of drops corresponded to 12 655 drops, with rare cases of generation below 10 000 drops (14 runs). This average was adequate according to the purpose of the tests and manufacturer recommendations. In addition, it coincides with other OGM screening tests (Koppel and Bucher, 2015; Koppel *et al.*, 2017).

Differences with other tests that average higher droplet recovery (Gerdes *et al.*, 2016) can be explained by the use of multichannel micropipettes that facilitate transfer. Another point to consider is the standardization of the process, which shall eventually improve the droplet count.

“Rain” effect

“Rain” is referred to as droplets that have a fluorescence amplitude above the upper boundary of the negative droplet cluster and below the lower boundary of the positive droplet cluster; because of this, their classification is complicated (Deprez *et al.*, 2016). This effect can be clearly seen in the temperature gradient assay of the endogenous *Hmg* gene (Figure 1). Regardless, the possibility to manually adjust the fluorescence threshold allows to classify these droplets as positive and negative.

Lievens *et al.* (2016) evaluated modes of operation to reduce the amount of “rain” in ddPCR assays. The most prominent consisted of sonication of the reaction mix, increasing the number of cycles (which

Efecto “lluvia”

“Lluvia” se denomina a las gotas que tienen una amplitud de fluorescencia sobre el límite superior del clúster de gotas negativas y debajo del límite inferior del clúster de gotas positivas; debido a ello, su clasificación es complicada (Deprez *et al.*, 2016). Este efecto se puede apreciar de manera clara en el ensayo de gradiente de temperatura del gen endógeno *Hmg* (Figura 1). No obstante, la posibilidad de ajustar de forma manual el umbral de fluorescencia permite clasificar estas gotas como positivas y negativas.

Lievens *et al.* (2016) evaluaron modos de operación para reducir la cantidad de “lluvia” en ensayos de ddPCR; las más destacadas consistieron en la sonicación de la mezcla de reacción, el aumento del número de ciclos (el cual resultó poco significativo; en ensayos de hasta 90 ciclos se registró una cantidad considerable de “lluvia”) y por último el rediseño de iniciadores, ya que la “lluvia” parece ser dependiente de la secuencia de los iniciadores o del amplicón deseado.

No obstante, en un experimento realizado por Bio-Rad se probaron tres escenarios de ajuste manual del umbral (umbral alto: por debajo del límite inferior del clúster de gotas positivas, umbral bajo: por arriba del límite superior del clúster de gotas negativas y un umbral medio). Los resultados de este experimento mostraron que se mantiene una precisión de $\pm 5\%$ con independencia del umbral establecido en Bio-Rad, razón por la cual no habría sesgo. Entonces, la “lluvia” en el ensayo del gen endógeno *Hmg* puede ser tolerada con el establecimiento manual del umbral, sin la necesidad de invertir recursos para el rediseño y optimización de un nuevo juego de iniciadores.

Ensayos *dúplex*

Para verificar los ensayos optimizados se realizaron ensayos *dúplex*. En estos ensayos se analizaron de manera simultánea para el gen endógeno y un evento de modificación genética. Con dos materiales de referencia certificados ERM-BF413d e IRMM-412R-5 se realizaron los eventos respectivos Mon810 y Bt11. Para el resto de los ensayos se utilizaron muestras preparadas (peso/peso) correspondientes con pruebas de aptitud (USDA) que contenían uno o más eventos de interés (MRC) mezclados con variedades comerciales de maíz de las cuales se desconoce su composición biológica.

proved not very significant; in assays of up to 90 cycles a considerable amount of “rain” was recorded) and finally primers redesign, as the “rain” seems to be dependent on the sequence of the primers or the desired amplicon.

Regardless, in an experiment performed by Bio-Rad, three manual threshold setting scenarios were tested (high threshold: below the lower boundary of the positive droplet cluster, low threshold: above the upper boundary of the negative droplet cluster, and a medium threshold). The results of this experiment showed that an accuracy of $\pm 5\%$ is maintained regardless of the threshold set in Bio-Rad; hence, there would be no bias. Then, the “rain” in the endogenous *Hmg* gene assay can be tolerated with manual threshold setting, without the need to invest resources for the redesign and optimization of a new set of primers.

Duplex assays

To verify the optimized assays, duplex assays were performed. In these assays, the endogenous gene and a genetic modification event were analysed simultaneously. With two certified reference materials ERM-BF413d and IRMM-412R-5 the respective events Mon810 and Bt11 were performed. For the rest of the essays, prepared samples (w/w) were used, corresponding with ability tests (USDA) that contained one or more events of interest (MRC) mixed with commercial maize varieties of which their biological composition was unknown.

A conversion to genetic modification percentage (GM%) was performed according to the European Union Reference Laboratory (EURL) technical guide on the implementation of regulation 619/2011 with equation 1:

$$GM\% \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{GM \text{ copies}}{\text{Taxon-specific copies}} \times 100 \quad (1)$$

In addition, variation related to the biological composition of the maize (zygosity) was considered. In heterozygous maize, the variability ranges from approximately 40% if the hybrid is derived from a genetically modified male and a non-modified female, to approximately 60%, if the hybrid was derived from a non-modified male and a genetically modified female (EURL, 2011).

La conversión a porcentaje de modificación genética (MG%) se realizó de acuerdo con la guía técnica European Union Reference Laboratory (EURL) sobre la implementación del reglamento 619/2011 con la ecuación 1:

$$MG\% \left(\frac{m}{n} \right) = \frac{\text{Copias del GM}}{\text{Copias del taxón específico}} \times 100 \quad (1)$$

Además, se consideró la variación relacionada con la composición biológica del maíz (cigotidad). En maíz heterocigoto los intervalos de variabilidad oscilan de un 40% aproximado, si el híbrido se deriva de un macho con modificación genética y de una hembra no modificada, a un 60% aproximado, si el híbrido se derivó de un macho no modificado y de una hembra con modificación genética (EURL, 2011).

Los valores obtenidos con estas pruebas de ddPCR (Cuadro 3) se expresan en comparación con los valores teóricos descritos en los reportes de validación (Mon810 y Bt11) y en las pruebas de aptitud de USDA.

El reporte del material de referencia ERM-BF413d (Mon810) certifica el porcentaje (%) de copias para el evento Mon810, que corresponde a 0.57% (incertidumbre 0.17%), lo cual es comparable con el resultado obtenido en las pruebas de ddPCR; esto indicaría que el maíz del material de referencia Mon810 es heterocigoto. En el caso del reporte de certificación del material de referencia IRMM-412R-5 (Bt11 5%) se especifica en primer lugar que

Values obtained with the ddPCR tests (Table 3) are expressed in comparison with the theoretical values described in validation reports (Mon810 and Bt11) and USDA ability tests.

The report of the reference material ERM-BF413d (Mon810) certifies the percentage (%) of copies for the Mon810 event, which corresponds to 0.57% (uncertainty 0.17%); this is comparable with the result obtained in the ddPCR tests and it would indicate that the maize of the Mon810 reference material is heterozygous. In the case of the certification report of the reference material IRMM-412R-5 (Bt11 5%), it is specified in the first place that the real value corresponds to $4.89 \pm 0.21\%$. Also, it is specified that the reference material was elaborated from heterozygous maize samples. Therefore, the theoretical value of variability corresponds with the value obtained in the ddPCR test.

In the samples corresponding to the ability assays, a percentage of variation corresponding to that expected in hybrid samples was observed in most cases; except the Ga21, Mir162 and Nk603 events. However, all these samples were prepared with maize of which the biological composition is unknown and therefore the bias was expected. Although in these cases the accuracy of the tests could not be confirmed with these types of samples, tests were able to detect the absence/presence of the transgenes.

Bias arising from weight/weight prepared samples or those in which the biological composition of the seed is unknown has been evaluated in previous essays

Cuadro 3. Cuantificación de eventos de modificación genética por medio de pruebas dúplex de ddPCR.
Table 3. Quantification of genetic modification events by ddPCR duplex assays.

Evento	Concentración (copias μL^{-1})	Concentración (copias μL^{-1})	Porcentaje MG teórico	Porcentaje MG obtenido	Porcentaje de variación
	Transgén	Taxón			
Mon810	6.7	1192	1	0.562	43.8
Bt11	12.4	646	5	1.919	60.75
Ga21	0.509	310	0.5	0.124	75.2
Das59122	1.5	369	1	0.406	59.4
Mir604	1.87	505	0.8	0.37	53.75
Das1507	2.54	535	0.9	0.474	47.33
Mon863	2.06	370	1	0.556	44.4
Mon88017	1.91	418	0.8	0.456	43
Mir162	6.14	411	2	1.49	25.5
Nk603	1.64	370	1.5	0.443	70.46

[†]MG: modificación genética. ♦ [†]MG: genetic modification.

el valor real corresponde con $4.89 \pm 0.21\%$, y que el material de referencia se elaboró a partir de muestras de maíz heterocigoto. Por lo tanto, el valor teórico de variabilidad corresponde con el valor obtenido en la prueba de ddPCR.

En las muestras correspondientes a los ensayos de aptitud se observó en la mayoría de los casos un porcentaje de variación que corresponde al esperado en muestras híbridas; con excepción de los eventos Ga21, Mir162 y Nk603. Sin embargo, todas estas muestras se prepararon con maíz del cual se desconoce la composición biológica y por tanto el sesgo era esperado. Aunque en estos casos no se pudo confirmar la precisión de las pruebas con este tipo de muestras, las pruebas sirvieron para detectar ausencia/presencia de los transgenes.

El sesgo derivado de muestras preparadas peso/peso o aquellas en las cuales se desconoce la composición biológica de la semilla se ha evaluado en ensayos previos (Koppel and Bucher, 2015; Cottenet *et al.*, 2019). En esos ensayos el uso de factores de conversión teórico resultó adecuado en la mayoría; pero no en todos los casos, tal como ocurrió en este estudio.

Respecto a los estudios mencionados antes, existió coincidencia en que el sesgo correspondió a la variabilidad genética de la muestra y no al ensayo de ddPCR en sí; por lo tanto, este método persiste como una alternativa viable para la cuantificación precisa de transgenes en maíz sin la necesidad de una curva de calibración. Así mismo, es necesaria la determinación de un factor de conversión consenso para cada línea de modificación genética, con el objetivo de reducir el sesgo en muestras en las cuales se desconoce la composición biológica.

Ensayos multiplex

Dos de los métodos principales para hacer *multiplexing* de grado alto en la ddPCR son el basado en proporciones y el basado en amplitud. El *multiplexing* basado en amplitud es una alternativa para aprovechar las capacidades de detección y cuantificación de la ddPCR; consiste en distinguir clústers de gotas positivas marcados con el mismo reportero fluorescente al variar las concentraciones de los iniciadores y sondas, y por lo tanto detectar diferentes niveles de amplitud de fluorescencia (Dobnik *et al.*, 2016). Este tipo de *multiplexing* se ha realizado de manera satisfactoria, en pruebas en las cuales se han

(Koppel and Bucher, 2015; Cottenet *et al.*, 2019). In those trials the use of theoretical conversion factors proved adequate in most, but not all cases; as it was the case in this study.

Regarding the aforementioned studies, there was agreement that the bias corresponded to the genetic variability of the sample and not to the ddPCR assay *per se*; therefore, this method persists as a viable alternative for the accurate quantification of transgenes in maize without the need for a calibration curve. Likewise, it is necessary to determine a consensus conversion factor for each genetic modification line in order to reduce bias in samples in which the biological composition is unknown.

Multiplex assays

Two of the main methods for performing high-throughput multiplexing in ddPCR are ratio-based and amplitude-based multiplexing. Amplitude-based multiplexing is an alternative to take advantage of the detection and quantification capabilities of ddPCR; it consists of distinguishing clusters of positive droplets labeled with the same fluorescent reporter by varying the concentrations of the primers and probes, and thus detecting different levels of fluorescence amplitude (Dobnik *et al.*, 2016). This type of multiplexing has been performed successfully, in tests in which from four (Dobnik *et al.*, 2016) to 10 genes of interest have been detected (Dobnik *et al.*, 2015). In this study, we took advantage of that capability to perform tetraplex and three triplex assays.

Once a common hybridization temperature was generated for all sets of primers, the multiplex assays were performed by making arbitrary mixtures with the events of interest for each group. In the tetraplex assay (Hmg, Mon810, Bt11 and Nk603) concentrations were tested, equivalent to half of the standard concentrations with which the simplex assays were optimized. However, because the expected performance did not occur (Figure 3), it was necessary to increase the concentrations beyond the standard concentration in order to separate the highest cluster.

The best overall difference in separating positive droplet clusters at the same channel in the four multiplex assays was achieved with the concentrations of 900 nM (primers) and 300 nM (probe) for the

detectado desde cuatro (Dobnik *et al.*, 2016) hasta 10 genes de interés (Dobnik *et al.*, 2015). En este estudio se aprovechó dicha capacidad para realizar *tetraplex* y tres ensayos *triplex*.

Una vez generada una temperatura de hibridación en común para todos los juegos de iniciadores se procedió a realizar los ensayos *multiplex*, para esto se hicieron mezclas arbitrarias con los eventos de interés para cada grupo. En el ensayo *tetraplex* (Hmg, Mon810, Bt11 y Nk603) se probaron concentraciones equivalentes a la mitad de las concentraciones estándar con las cuales se optimizaron los ensayos *simplex*. Sin embargo, al no tener el rendimiento esperado (Figura 3), fue necesario aumentar las concentraciones más allá de la concentración estándar con el fin de separar el clúster más alto.

En términos generales la mejor diferencia al separar los clústers de gotas positivas en un mismo canal en los cuatro ensayos *multiplex* se logró con las concentraciones de 900 nM (iniciadores) y 300 nM (sonda) para el grupo *high* y 300 nM (iniciadores) y 100 nM (sonda) para el grupo *low* (Figura 4).

Estos resultados son comparables (en concentraciones) a los obtenidos en un estudio previo (Dobnik *et al.*, 2016), lo que indica que en términos generales las diferencias amplias en las concentraciones de iniciadores y sondas tienden a generar diferencias claras entre dos grupos positivos en un solo canal. Por lo tanto, el número de ensayos iterativos se podría reducir al probar combinaciones distintas de concentraciones, para ahorrar así tiempo y reactivos.

high group and 300 nM (primers) and 100 nM (probe) for the low group (Figure 4).

These results are comparable (in concentrations) to those obtained in a previous study (Dobnik *et al.*, 2016), which indicates that generally speaking wide differences in primers and probe concentrations tend to generate clear differences between two positive groups in a single channel. Therefore, the number of iterative assays could be reduced by testing different combinations of concentrations, thus saving time and reagents.

Finally, there are studies reporting a higher degree of multiplexing. Dobnik *et al.* (2015) performed a decaplex assay, in which 10 genes of interest were simultaneously analysed. However, in this type of study the accuracy is reduced, as it is difficult to discriminate so many clusters of positive droplets in a single detector channel. Therefore, it is considered preferable to be cautious with the degree of multiplexing, in order to guarantee accurate results that comply with current legislation in the countries in which these tests are applied.

CONCLUSIONS

In droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) analyses, on simplex tests with 10 genetic modification events in maize and one endogenous gene, it was possible to determine the appropriate hybridization and elongation temperature for clear differentiation of the cluster of positive and

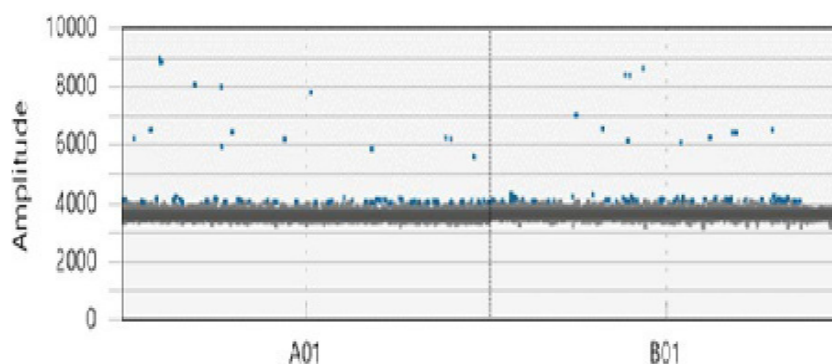


Figura 3. Eventos Mon810 y Bt11 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 1D. Concentraciones de 0.5x para Bt11 y 1x para Mon810. La discriminación de ambos clústers positivos resulta imposible.

Figure 3. Mon810 and Bt11 events (FAM Channel). 1D amplitude graphic. Concentrations of 0.5x for Bt11 and 1x for Mon810. Discrimination of both positive clusters is impossible.

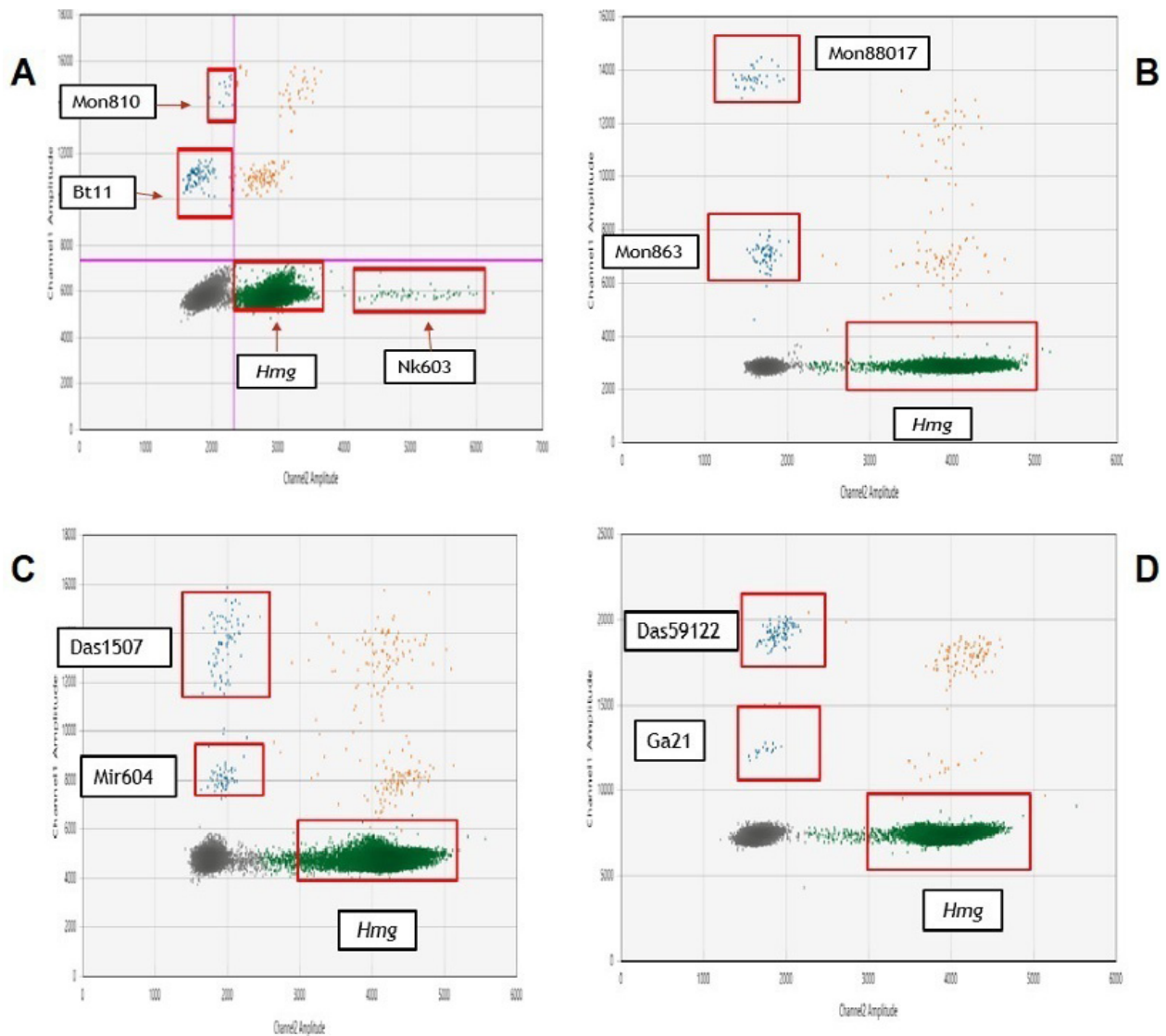


Figura 4. Módulos *multiplex*: A) Ensayo *tetraplex*: Hmg(HEX *low*), Nk603(HEX *high*), Bt11(FAM *low*) y Mon810(FAM *high*), B) Ensayo *triplex*: Hmg(HEX), Mon88017(FAM *high*) y Mon863(FAM *low*), C) Ensayo *triplex*: Hmg(HEX), Das1507(FAM *high*) y Mir604(FAM *low*), D) Ensayo *triplex*: Hmg(HEX), Das59122(FAM *high*) y Ga21(FAM *low*).

Figure 4. Multiplex modules: A) Tetraplex assay: Hmg(HEX *low*), Nk603(HEX *high*), Bt11(FAM *low*) and Mon810(FAM *high*), B) Triplex assay: Hmg(HEX), Mon88017(FAM *high*) and Mon863(FAM *low*), C) Triplex assay: Hmg(HEX), Das1507(FAM *high*) and Mir604(FAM *low*), D) Triplex assay: Hmg(HEX), Das59122(FAM *high*) and Ga21(FAM *low*).

Por último, existen estudios documentados con un grado de *multiplexing* más alto. Dobnik *et al.* (2015) realizaron un ensayo *decaplex*, en el cual se analizaron de manera simultánea 10 genes de interés. Sin embargo, en este tipo de estudios la precisión se reduce, ya que se dificulta discriminar tantos clústers de gotas positivas en un solo canal detector. Por lo tanto, se considera que es preferible ser medurado con el grado de *multiplexing*, para así garantizar resulta-

negative droplets. The duplex tests matched those of the simplex tests in hybridization and elongation temperature; as well as in the concentrations of primers and probes. They also showed potential for transgene quantification (Mon810 and BT11), in regard to validation documents of reference materials.

In multiplex tests, differences between primers and probe concentrations corresponding to the 1:3 ratio showed the best performance; they generated

dos precisos que cumplan con las legislaciones actuales en los países en los cuales esas pruebas se apliquen.

CONCLUSIONES

En las pruebas *simplex* de reacción en cadena de la polimerasa digital por goteo (ddPCR) con 10 eventos de modificación genética en maíz y un gen endógeno se logró determinar la temperatura de hibridación y elongación adecuada para diferenciación clara del clúster de gotas positivas y negativas. Las pruebas *dúplex* coincidieron con las *simplex* en la temperatura de hibridación y elongación, y en las concentraciones de iniciadores y sondas. También mostraron potencial para cuantificación de transgenes (Mon810 y BT11), respecto a documentos de validación de los materiales de referencia.

En las pruebas *multiplex*, las diferencias entre concentraciones de iniciadores y sondas correspondientes con la proporción 1:3 mostraron el rendimiento mejor; generaron grupos más compactos de gotas y discriminaron los clústeres de gotas positivas para dos eventos de modificación genética diferentes en un solo canal detector de fluorescencia.

Por último, las pruebas realizadas demostraron su potencial como métodos de rutina para la detección y cuantificación *simplex* y *multiplex* de eventos de modificación genética en maíz, con la referencia de los eventos probados.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) por el financiamiento otorgado para realizar este estudio.

LITERATURA CITADA

- Acosta, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Cultivos Tropicales 30: 113-120.
- Bio-Rad Laboratories. N.D. Droplet digital PCR Applications Guide. Bulletin 6407 Ver B US/EG Sig. 1216 https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf (Consulta: febrero 2019).
- Burns, M. J., A. M. Burrell, and C. A. Foy. 2010. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. European Food Research and Technology 231: 353-362. DOI 10.1007/s00217-010-1277-8
- Cottenet, G., C. Blancpain, and P. Chuah. 2019. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01692-7>

more compact groups of droplets and discriminated clusters of positive droplets for two different genetic modification events in a single fluorescence detector channel.

Finally, the tests performed demonstrated their potential as routine methods for simplex and multiplex detection and quantification of genetic modification events in maize, against the reference of the tested events.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) for the funding provided for this study.

—End of the English version—



- Delobel, C., S. Larcher, M. Savini, M. Mazzara, and G. Van den Eede. 2007. Event specific method for the quantification of maize line GA21 using real-time PCR. Validation report and protocol. EUR. Publications office of the European Union. <http://dx.doi.org/10.2788/62889>
- Deprez, L., P. Corbisier, A. Kortekaas, S. Mazoua, R. Beaz-Hidalgo, S. Trapmann, and H. Emons. 2016. Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. Biomolecular Detection and Quantification 9: 29-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2016.08.002>
- Dobnik, D., B. Spilsberg, A. Bogozalec, A. Holst-Jensen, and J. Zel. 2015. Multiplex Quantification of 12 European Union Authorized Genetically Modified Maize Lines with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. Analytical Chemistry 87: 8218-8226. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01208>
- Dobnik, D., D. Stebih, A. Blejec, D. Morisset, and J. Zel. 2016. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. Scientific Reports 6: 35451. <http://dx.doi.org/10.1038/srep35451>
- EURL (European Union Reference Laboratory). 2011. Technical guidance document from the European union reference laboratory for genetically modified food and feed on the implementation of commission regulation (EU) No 619/2011. Joint Research Centre. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC68082/technical%20guidance%20from%20eurl%20on%20llp.pdf> (Consulta: abril 2019).
- Gerdes, L., A. Iwobi, U. Busch, and S. Pecoraro. 2016. Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for

- quantification of genetically modified organisms. *Biomolecular Detection and Quantification* 7: 9-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2015.12.003>
- González, C. N., H. Silos, J. C. Estrada, J. A. Chávez, y L. Tejero. 2016. Características y propiedades del maíz criollo cultivado en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 669-680. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i3.326>
- Grelewski-Nowotko, K., M. Żurawska-Zajfert, E. Żmijewska, and S. Sowa. 2018. Optimization and Verification of Droplet Digital PCR Even-Specific Methods for the Quantification of GM Maize DAS1507 and NK603. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 185:207-220. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2634-x>
- Gutiérrez A., L. E., L. C. Castillo D, B. E. Gómez C., y A. I. Acatzi S. 2015a. Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR Y dPCR. *Agrocien- cia*. 49: 373-394.
- Gutiérrez G., D. F., R. Ruiz, y B. Xoconostle. 2015b. Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en Méxi- co y su contexto internacional. IPN. <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/Estado-actual-de-los-cultivos.pdf> (Consulta: febrero 2019).
- Kalendar, R., A. Muterko, M. Shamekova, K. Zhambakin. 2017. *In Silico* PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. *In: Domingues, L. (eds). PCR. Methods in Molecular Biology*. Springer. New York, NY, USA. 1-31. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_1
- Koppel, R., and T. Bucher. 2015. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis. *European Food Research and Technology* <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-015-2475-1>
- Koppel, R., T. Bucher, D. Bar, F. van Velsen, and A. Ganeshan. 2017. Validation of 13 duplex droplet digital PCR systems for quantitative GMO analysis of most prevalent GMO traits. *Eur Food Res Techno*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-017-2957-4>
- Lievens, A., S. Jacchia, D. Kagkli, C. Savini, and M. Querci. 2016. Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PLoS ONE* 11: e0153317. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153317>
- Mazzara, M., E. Grazioli, S. Larcher, and G. Van den Eede. 2005. Event-specific method for the quantification of maize line DAS-59122-7 using Real-time PCR. Validation report and Protocol. European Commission. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6440f5e2-5c30-4fd3-863b-fdea20b1479c/language-en> (Consulta: marzo 2019).
- Morisset, D., D. Stebih, M. Milavec, K. Gruden, and J. Zel. 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS ONE*. 8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062583>
- Pecoraro, S., G. Berben, M. Burns, P. Corbisier, M. De Giacomo, M. De Loose, E. Dagand, D. Dobnik, R. Eriksson, A. Holst-Jensen, D. M. Kagkli, J. Kreysa, A. Lievens, D. Mäde, M. Mazzara, A. Paternò, V. Peterseil, C. Savini, T. Sovová, S. Sowa, and B. Spilsberg. 2019. Overview and recommendations for the application of digital PCR. *EUR 29673 JRC* 115736. <http://dx.doi.org/10.2760/192883>.
- Tamay de Dios, L., C. Ibarra, y C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2: 70-78.
- Trejo, S. D. L., E. A. Rodríguez, y R. F. Rivera. 2015. Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria* 25: 24-39.