



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** **UN/M POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN SOYA:  
IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A :

**I Bt Mirna Olivia González  
Martínez**



Tutor: DRA. AMANDA GÁLVEZ MARISCAL

MÉXICO, D. F.

Abril 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **“Proteínas heterólogas en soya: identificación y aislamiento”**

### **Reconocimientos**

Esta tesis de Maestría fue dirigida por la Dra. Amanda Gálvez Mariscal en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del edificio "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Esta tesis contó con el apoyo del proyecto PAIP 54-09. La DGEP me otorgó la beca de Fomento a la Graduación durante el semestre 2009-I

El Comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros	Instituto de Química UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química UNAM
Dra. Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química UNAM

Se reconoce la asesoría de la Dra. Rosario López Vancell del Departamento de Patología Experimental de la Facultad de Medicina UNAM para la implementación de la electroforesis preparativa continua.

Se reconoce la asesoría del Dr. Elpidio García del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química UNAM por la asesoría para la detección en Western blot.

El jurado asignado para el examen de grado estuvo formado por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química UNAM
Vocal	Dr. Jorge Nieto Sotelo	Instituto de Biotecnología UNAM
Secretario	Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros	Instituto de Química UNAM
Suplente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química UNAM
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química UNAM

## **Agradecimientos**

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal por la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por confiar en mí y por los conocimientos de toda índole que he adquirido.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros por su apoyo en los experimentos de isoelectroenfoque y por sus aportaciones a la realización de esta tesis como parte del Comité tutorial.

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra por el tiempo dedicado como parte del Comité tutorial y por sus sugerencias para la mejora del proyecto.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por el préstamo del lector de microplacas para la prueba de DAS-ELISA.

A la Dra. Rosario López Vancell por su valiosa y sobre todo generosa ayuda y dedicación, por la confianza depositada en mí y por el apoyo durante las largas horas de trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Elpidio García Ramírez por la asesoría, tiempo y materiales prestados para la detección en Western blot.

A las Dras. Amelia Farrés González-Saravia y Maricarmen Quirasco Baruch por sus preguntas y sugerencias durante los seminarios de grupo.

A Israel García, quien ha sido un excelente amigo y compañero en la aventura de aprender a aprender.

A Pilar Vergara y Blanca Gómez por la amistad que me han brindado, por las alegrías y dificultades compartidas.

A la Dra. Carolina Peña y la M. en C. Denise Castro, por los conocimientos, consejos y momentos divertidos que han compartido conmigo.

A quienes han convivido conmigo durante mi estancia en el laboratorio 312, por el excelente ambiente durante los días de trabajo, y también por los momentos de convivencia fuera de él.

## **Dedicatorias**

A mis papas, Antonia Martínez y José González, quienes me han dado todo, lo material y espiritual, la enseñanza, alegría, ayuda, ánimo, y sobre todo un gran amor.

A mi mamá, gracias por el ejemplo de cómo ser una gran mujer, mostrarme el amor en las formas menos obvias, por darme total libertad de ser, y por el tesoro heredado del teatro y la lectura.

A mi papá, gracias por ser fuerte por y para todas, por enseñarme con el ejemplo el valor de la perseverancia, dedicación y generosidad hacia los demás, por la ternura velada y el cariño de todos los días.

A mis hermanas Alma y Ale, por confiar en mí aún en los momentos en los que yo misma no lo hacía, por nunca dudar de mí y por el amor incondicional.

A mi cuñis Rodrigo, a mis sobrinos Queztalli y Román, por llenar mi vida de felicidad pura e inocencia.

A Luis, mi amigo para siempre, confidente, asesor y también aprendiz junto conmigo en todo lo que respecta a todo, gracias por lo compartido todos estos años.

A Liliana, quien en cualquier circunstancia, estado de ánimo y lugar, está siempre conmigo y por compartir este camino.

A Aura, por enseñarme que en la vida hay otras rutas y traer a mí la alegría aún sin ella saberlo.

A mis amigos : Agustín, Diana, Carlos, Mario, Abraham, Carolina, Claudia, David, a quienes querré siempre a pesar del tiempo y la distancia, de los encuentros y desencuentros.

## Contenido

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
Proteínas de la soya	13
Variedades transgénicas de soya disponibles comercialmente	15
Soya Roundup Ready®	17
La enzima EPSPS	18
Efecto del glifosato en la EPSPS	21
Características de la CP4EPSPS	23
Caracterización molecular del Transgén en la soya Roundup Ready®	24
Aspectos de Bioseguridad	31
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS.	34
Muestras de soya y Conservación	34
Verificación de la naturaleza GM de la muestra	34
Extracción de grasa	36
Extracción de proteínas solubles	36
Precipitación fraccionada	37
Precipitación con Ácido Tricloro Acético	38
Isoelectroenfoque Preparativo	38
Electroelución	39
Electroforesis Preparativa Continua	40
Cuantificación de Proteínas	41
Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)	41
Perfil electroforético	41
Transferencia Western	43
Detección en Western-Blot de proteína CP4EPSPS	43
Detección y Diferenciación de glicosilación en Western blot	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Extracción de Proteínas Solubles	47
Precipitación de proteínas	51
Isoelectroenfoque	56
Electroelución	57
Electroforesis Preparativa Continua (EPC)	59
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

## Figuras

Figura 1 SDS-PAGE de 28 variedades de soya.	14
Figura 2. Ruta metabólica de la síntesis de aminoácidos aromáticos.	19
Figura 3. Estructura del fosfoenol piruvato y del glifosato.	21
Figura 4. Reacción catalizada por la enzima EPSPS.	22
Figura 5. Interacción del glifosato con el sitio activo de la CP4EPSPS.	24
Figura 6. Mapa del vector usado para la obtención de la soya Roundup Ready®.	25
Figura 7. Esquema comparativo de la secuencia del transgén.	27
Figura 8. Esquema del transgén.	28
Figura 9. Gel de agarosa de los productos de PCR.	28
Figura 10. Secuencias reportadas por Rang.	29
Figura 11. Gel de SDS-PAGE, teñido con azul de Coomasie.	30
Figura 12. Detección del transgén cp4epsps por PCR.	46
Figura 13. Detección gen de lectina por PCR punto final.	47
Figura 14. Extracción de proteínas solubles de la soya SFL.	48
Figura 15. Perfil electroforético de la extracción secuencial.	50
Figura 16. SDS-PAGE después de la precipitación con TCA.	52
Figura 17. SDS-PAGE al 10% de acrilamida de la precipitación fraccionada.	54
Figura 18. SDS-PAGE después de ultrafiltración.	55
Figura 19. SDS PAGE al 12.5 % de poliacrilamida adicionado con glicerol.	58
Figura 20. SDS-PAGE de las fracciones 1 a 14 electroeluidas.	59
Figura 21. Tinción con nitrato de plata de SDS-PAGE.	60
Figura 22. SDS-PAGE de las fracciones 15 a 30 obtenidas en EPC.	60
Figura 23. Detección Western blot de fracciones obtenidas en EPC.	62
Figura 24. Detección y diferenciación en Western blot de glicosilaciones.	66

## Tablas

Tabla I Proteínas de reserva de la soya.	14
Tabla II Variedades transgénicas de soya disponibles comercialmente.	16
Tabla III Elementos del plásmido PV-GMTG04.	17
Tabla IV. Variedades de soya transgénica con promotor CaMV35S.	18
Tabla V Primers usados por Rang.	27
Tabla VI Masas moleculares de proteínas predichas por Rang.	30
Tabla VII Condiciones de PCR.	35
Tabla VIII Formulación geles de poliacrilamida.	42
Tabla IX Lectinas usada para diferenciación de tipos de glicosilación.	45
Tabla X Extracción de albúminas y globulinas de soya SFL.	49

Tabla XI Extracción secuencial de albúminas y globulinas de soya SFL.	50
Tabla XII Precipitación de proteínas presentes en EC de soya SFL usando TCA al 20%.	51
Tabla XIII. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio de extracto crudo de proteínas de soya SFL.	53
Tabla XIV Precipitación con TCA al 20% de la fracción al 40% de sulfato de amonio.	54
Tabla XV. Recirculación en isoelectroenfoque.	56
Tabla XVI Prueba de DAS-ELISA de las fracciones EPC.	61



## ABREVIATURAS

CaMV35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Cauliflower mosaic virus 35S promoter)
cp4 epsps	Gen de la 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato-sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4
CP4 EPSPS	5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato-sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4
CTP4	Péptido de tránsito hacia el cloroplasto (chloroplaste transit peptide 4) de <i>Petunia híbrida</i>
[CP4EPSPS] <sub>cp</sub>	Factor de concentración aparente de CP4EPSPS
DAS-ELISA	Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay
EC	Extracto crudo de proteínas solubles
EPC	Electroforesis preparativa continua
EPSPS	5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato-sintasa
GM	Modificado genéticamente (genetically modified)
HRP	Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)
mRNA	RNA mensajero
NCBI	National center for biotechnology information
no-GM	No modificado genéticamente (non -genetically modified)
OsSK	Shikimato cinasa de <i>Oriza sativa</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
S3P	shikimato-3-fosfato
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos adicionado con cloruro de sodio. (Phosphate Buffered Saline)
PEP	Fosfoenol piruvato
PES	Polietil sulfona
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (polivinyliden difluoride)
RR	Roundup Ready®
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis)
SC	Muestra de granos de soya sin contenido de transgénicos
SFL	Muestra de granos de soya con contenido de transgénicos
TCA	ácido tricloroacético (trichloroacetic acid)

## RESUMEN

La soya Roundup Ready® (RR) está diseñada para expresar la enzima CP4-EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato-sintasa) unida a un péptido de tránsito de *Petunia hybrida* (CTP4), de un peso molecular de 47.6 kDa. Esta enzima es resistente a la inhibición del herbicida glifosato (N-(fosfonometil) glicina), sobre la ruta metabólica de producción de aminoácidos aromáticos, con lo que las plantas sobreviven a la aplicación del herbicida.

Para la soya Roundup Ready®, Rang *et al* en 2005 reportaron la detección de 4 secuencias de mRNA, codificadas por el transgén *cp4epsps*, en lugar de una sola como era esperado. Los cuatro mRNA hallados incluían la secuencia transcrita del gen *cp4epsps* completo y porciones transcritas de la secuencia repetida ubicada después del terminador, tal como fueron descritas por Windels *et al.*, en 2001. Dentro de nuestro grupo de trabajo, Fong, (datos no publicados) encontró cuatro bandas de masa molecular de entre 45 y 60 kDa, positivas en una prueba de DAS-ELISA específica para CP4EPSPS, en extractos proteínicos de una muestra de soya en la que previamente se detectó la presencia de secuencias transgénicas (promotor 35S) por medio de PCR tiempo real.

Considerando lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo la separación y purificación de las cuatro proteínas heterólogas que posiblemente se expresan en la soya transgénica Roundup Ready®.

Se extrajeron las proteínas solubles de una harina de soya elaborada a partir de una muestra de granos de soya en la que previamente se detectó la presencia del gen *cp4epsps* usando PCR punto final. Mediante precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ultrafiltración se obtuvo una fracción de proteínas que se sometió a electroforesis preparativa continua en la que se colectaron 80 fracciones.

Las fracciones en las que en SDS-PAGE se observaron bandas con masa molecular dentro del intervalo de interés (45 a 60 kDa), se analizaron inmunológicamente mediante una prueba de DAS-ELISA específica para la detección de la proteína CP4 EPSPS, para lo cual previamente se dializaron para cambiar el amortiguador.

Las fracciones que tuvieron un resultado positivo se sometieron a una detección inmunológica mediante transferencia Western, con el fin de determinar si en cada una de ellas había una o más bandas que dieran resultado positivo en la prueba de DAS-ELISA. Se usaron anticuerpos específicos para la proteína CP4 EPSPS donados por la compañía Agdia Inc. (Indiana, USA). La detección se realizó mediante quimioluminiscencia usando el sistema biotina-peroxidasa. De esta forma, se detectaron tres bandas de diferentes masas moleculares que tienen reacción positiva. Estas bandas mostraron masas de 47, 58 y 63 kDa, respectivamente.

El análisis mediante Western-blot permitió confirmar la presencia de al menos tres proteínas heterólogas con identidad de CP4EPSPS en una muestra de granos de soya comercializados en el D.F., con lo que se verificaron los hallazgos de Windels (2001) y Rang (2005).

## ABSTRACT

Roundup ready® soybean expresses the enzyme CP4 EPSPS (5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase) from *Agrobacterium tumefaciens*, attached to a chloroplast transit peptide (CTP4) from *Petunia hybrid*. The molecular mass of the functional enzyme is 47.6 kDa. This enzyme is non-sensitive to the herbicide glyphosate (N- phosphonomethyl glycine), an inhibitor of the metabolic pathway for aromatic amino acid production, which confers to the plant resistance against the application of the herbicide. Rang *et al*, (2005) detected, in Roundup Ready® soybean, four mRNA sequences whose origin was the *cp4epsps* transgene, instead of a single messenger as expected. Those four mRNA molecules, contain the complete sequence of *cp4epsps* gene and fragments transcribed from a *cp4epsps* repeated sequence, as described earlier by Windels *et al*. (2001), which sequences are found after the terminator of transcription. In a previous work of our group, Fong C. found four protein bands with molecular masses from 45 to 60 kDa, which had positive signal in a DAS-ELISA test specific for CP4 EPSPS detection (data not published). This was observed in protein extracts of a soybean sample, containing transgenic *cp4epsps* verified using Real Time PCR. Considering all of the above, the objective of this work was the separation and purification of the four heterologous proteins possibly expressed in Roundup Ready® soybean. A flour was prepared with the same sample studied by Fong and soluble proteins were extracted. By means of precipitation and ultrafiltration, a protein concentrate was obtained. It was run in a continuous preparative electrophoresis system, and 80 fractions were collected. Those fractions, where protein bands of molecular masses within the 45-60 kDa interval were observed in SDS-PAGE, were dialyzed for buffer exchange and analyzed in a DAS-ELISA test specific for CP4 EPSPS detection. Fractions positive for DAS-ELISA were analyzed by Western blot immunodetection, in order to determinate if there were more than one band responsible for the positive reaction. This procedure was made using monoclonal antibodies specific for CP4 EPSPS, donated by Agdia Inc. (Indiana, USA). Detection was made by chemiluminescent reaction using a biotin-peroxidase system. By this means three protein bands of different molecular masses were detected as

positive for this immunodetection. The molecular mass of this bands were 48, 58 y 63 kDa respectively. Western blot analysis allowed the confirmation of the presence of at least three heterologous proteins with CP4 EPSPS identity, in a soybean seed sample commercially distributed in Mexico City. These results verify Windels (2001) and Rang (2005) findings.

## INTRODUCCIÓN

### PROTEÍNAS DE LA SOYA

La soya (*Glycine max*) es originaria de Asia, en donde se pueden encontrar variedades silvestres endémicas en China, Corea, y Japón. La introducción de esta especie a América del norte y Europa es, relativamente, reciente. El incremento sustancial en el cultivo de la soya se inició en la década de 1990, cuando sus propiedades nutricionales empezaron a ser aprovechadas para la alimentación humana fuera de Asia. En el año 2007, la producción estimada de soya fue de 220 millones de toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009).

Los granos de la soya tienen un elevado contenido de proteínas de alta calidad nutricional y han sido ampliamente estudiadas debido a su importancia en la industria alimentaria. El conjunto de las diversas proteínas contenidas en la soya, le confieren su versatilidad y valor nutricional.

En la figura 1 se muestra una comparación de los perfiles proteínicos en SDS-PAGE de extractos de proteínas solubles de 28 variedades de soya. En ella se aprecia que no hay diferencias notables entre los perfiles de estas variedades, a la vez que se hace evidente su complejidad.

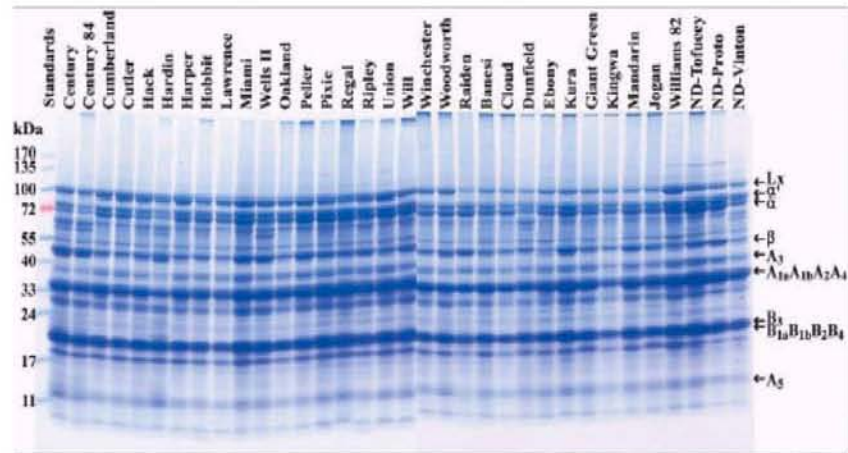


Figura 1 SDS-PAGE de 28 variedades de soya, se señalan las subunidades de la glicina (A1, A2, A3, A4 y A5) y de la conglicinina ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ ) (Tomado de Sathe et al, 2009).

Sathe et al, en 2009, reportan que las diferencias entre las variedades de soya estudiadas, se encuentran en la secuencia de aminoácidos de las proteínas y en la cantidad presente de cada una de ellas. Sin embargo, el tipo e identidad de las mismas se conserva entre las 28 variedades estudiadas por ellos.

De entre todas las proteínas de la soya, las que están presentes en mayor cantidad son la glicinina y la conglicinina. Ambas son globulinas y, en conjunto, representan el 70-80% del total de las proteínas de la soya. Los puntos isoeléctricos de estas dos proteínas y sus subunidades se muestran en la Tabla I.

Tabla I Proteínas de reserva de la soya			
Glicinina		Conglicinina	
Subunidad	Punto isoeléctrico	Subunidad	Punto isoeléctrico
A	4-7	$\alpha$	4.92-5.32
B	6-11	$\alpha'$	5.23
		$\beta$	5.67

Fuente : Natarajan et al., 2006

La glicinina está constituida por 5 subunidades, cada una formada por dos cadenas polipeptídicas. Las cadenas A tienen un carácter ácido con masas moleculares de 38,000-40,000 Da. Las cadenas B son de carácter básico y masas moleculares de entre 18,000 a 20,000 Da, dependiendo de la variedad de la que se trate.

La conglicinina, es un trímero formado por las subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ , las cuales tienen pesos moleculares aproximados de 84,000 Da, 72,000 Da y 51,000 Da, respectivamente (Herald T.J., 2001).

#### **VARIETADES TRANSGÉNICAS DE SOYA DISPONIBLES COMERCIALMENTE**

El aumento en el consumo de soya a nivel mundial, ha propiciado que se busque mejorar el rendimiento de los cultivos. Entre los métodos probados, está el desarrollo de variedades transgénicas de soya con características que permitan obtener mejores rendimientos en el cultivo y hacer más eficiente su producción.

El éxito comercial de estas variedades es evidente: en el año 1996, cuando se aprobó por primera vez el cultivo comercial de una variedad transgénica de soya resistente a herbicida, el área cultivada fue de el 5% de la producción total de soya de Estados Unidos de Norteamérica, mientras que en el año 2008, la producción de soya resistente a herbicida representó 58% del total de soya cosechado a nivel mundial (James C., 2009).

Actualmente, hay en el mercado variedades de soya que son resistentes al glifosato y a otros herbicidas, además, algunas a las que se ha modificado el contenido de ácidos grasos. En la tabla II se enlistan las variedades transgénicas comerciales disponibles hasta el momento.



**Tabla II Variedades transgénicas de soya disponibles comercialmente**

<b>Variedad</b>	<b>Compañía desarrolladora</b>	<b>Efecto de la transformación</b>
A2704-12, A2704-21, A5547-35	Aventis	Tolerancia al herbicida de amplio espectro glufosinato de amonio.
A5547-127	Bayer	Tolerancia al herbicida de amplio espectro glufosinato de amonio.
DP-305423	Pioneer Hi-Bred International Inc	Mayor contenido de ácido oleico, menor contenido de ácido linoléico
DP-356043	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Tolerancia al herbicida glifosato, y a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa.
G94-1, G94-19, G168	DuPont	Mayor contenido de ácido oleico.
GTS 40-3-2	Monsanto	Tolerancia al herbicida de amplio espectro glifosato.
GU262	Bayer	Tolerancia al herbicida de amplio espectro glufosinato de amonio.
MON89788	Monsanto	Tolerancia al herbicida de amplio espectro glufosinato de amonio.
OT96-15	Agriculture	Menor contenido de ácido linoléico
W62, W98	Bayer	Tolerancia al herbicida glufosinato.

Fuente: Agbios (2010)

Las variedades transgénicas de soya resistentes a herbicidas, son capaces de crecer en presencia de concentraciones que erradiquen el crecimiento de flora no deseada, sin que se observe algún efecto negativo sobre el crecimiento de dichos cultivos. La eliminación de malezas permite que los nutrientes y recursos de los terrenos de cultivo sean aprovechados mayoritariamente por el cultivo de interés.

La variedad GTS 40-3-2, desarrollada por la compañía Monsanto es comercializada bajo el nombre Roundup Ready®. Ésta es la variedad transgénica de soya con mayor participación en el mercado. Es resistente al herbicida glifosato, el cual es el ingrediente activo del herbicida Roundup®, también

producido por la compañía Monsanto. Se trata de un herbicida no selectivo, por lo que su aplicación elimina el crecimiento de las plantas y microorganismos sensibles.

#### SOYA ROUNDUP READY®

La soya transgénica Roundup Ready® fue obtenida mediante la modificación de la variedad no transgénica A5403 con la introducción del gen *cp4epsps*, proveniente de *Agrobacterium sp.* La soya fue transformada mediante la inserción del plásmido PV-GMTG04 (ver Figura 6 más adelante) por el método de biobalística (bombardeo de partículas). Los elementos genéticos incorporados a la soya son los mostrados en la tabla III:

**Tabla III Elementos del plásmido PV-GMTG04**

Promotor	CaMV35, promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor.
Péptido de tránsito	CTP4 de EPSPS de <i>Petunia hybrida</i> .
Región codificante	Gen <i>cp4epsps</i> de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa CP4
Terminador	Región terminadora del gen de la Nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

El gen *cp4epsps* codifica una enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfosintasa (EPSPS) de baja sensibilidad al glifosato. La enzima EPSPS forma parte de la ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos y está presente en todas las plantas, bacterias y hongos.

En las plantas, la síntesis de aminoácidos aromáticos se lleva a cabo en el cloroplasto, por lo que el CTP4 de *Petunia hybrida* se introdujo como péptido señal para su traslocación al plastidio.

La estructura del transgén de la soya RR es única, pues de entre las variedades genéticamente modificadas comercializadas a nivel mundial, es la única que cuenta con la construcción promotor/ péptido de tránsito con los elementos

CaMV 35S-CTP4. En la Tabla IV se muestran las variedades comerciales de soya transgénica que tienen como promotor al CaMV 35S:

**Tabla IV. Variedades de soya transgénica con promotor CaMV35S**

<b>Variedad</b>	<b>Compañía desarrolladora</b>	<b>Efecto de la transformación</b>	<b>Elementos insertados</b>
ACS-GM005-3*	Bayer CropScience (antes Aventis )	Resistencia a glufosinato	<i>pat</i> , señal de poliadenilación de CaMV35S
ACS-GM006-4*	Bayer CropScience (antes Aventis )	Resistencia a glufosinato	<i>pat</i> , <i>bla</i> , señal de poliadenilación de CaMV35S
DD-026005-3	DuPont	Mayor producción de Ac. Oleico	<i>GmFad2-1</i> , <i>gus</i> , <i>bla</i> , terminador NOS
GTS40-3-2*	Monsanto	Resistencia a glufosinato	CP4 <i>epsps</i> , CTP4, terminador NOS
ACS-GM003-1	Bayer	Resistencia a glufosinato	<i>pat</i> , <i>bla</i> , señal de poliadenilación de CaMV35S
ACD-GM001-8	Bayer	Resistencia a glufosinato	<i>bar</i> , <i>gus</i>

Fuente: AGBIOS, 2010

\*Variedades aprobadas para consumo humano en México.

#### LA ENZIMA EPSPS

De entre los 20 aminoácidos que en la naturaleza se usan para formar proteínas, existen algunos que sólo son producidos por plantas, bacterias y algunos hongos. Los animales no producen dichos aminoácidos, por lo que es necesario que se abastezcan de ellos a través de su dieta. Debido a ello, son llamados aminoácidos esenciales.

Entre los aminoácidos esenciales, se encuentran los aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptofano. Los organismos que los producen, lo hacen a través de la ruta del shikimato o ácido shikimico, la cual fue descrita por primera vez en 1959.

El precursor de la ruta metabólica de la síntesis de aminoácidos aromáticos es el 7P-2-dehidro-3-desoxi-D-arabino-heptanoato, formado de la condensación de una molécula de fosfoenol piruvato (PEP) y una eritrosa-4P, esta última

proveniente de el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato. La ruta metabólica es la mostrada en la figura 2.

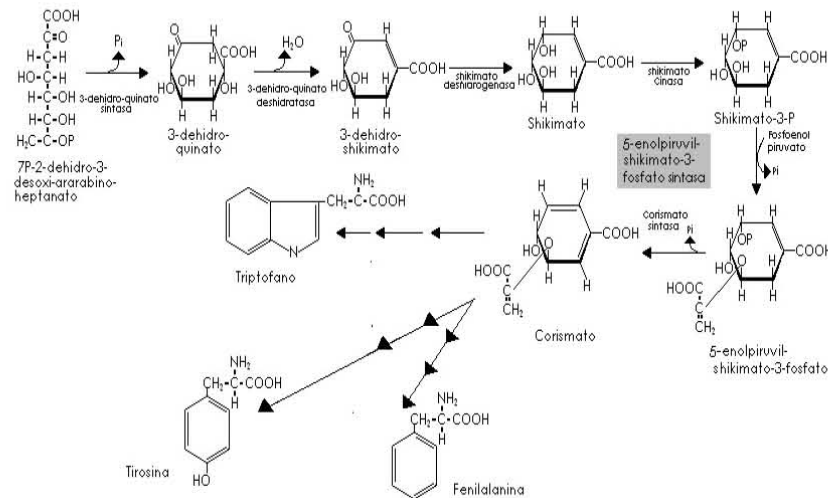


Figura 2. Ruta metabólica de la síntesis de aminoácidos aromáticos. El recuadro señala a la EPSPS (Modificada de Nicholson D.E, 2003)

La síntesis de corismato está regulada negativamente por el efecto de las concentraciones de corismato, fenilalanina, tirosina y prefeanato (intermediario de la tirosina) sobre la enzima shikimato deshidrogenasa. Otro punto de regulación está a nivel de la enzima corismato mutasa, la cual inicia la síntesis de fenilalanina y tirosina, otro más es la antranilato sintasa, enzima que inicia la síntesis de triptofano, a partir del corismato.

La enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, (E.C.2.5.1.19) también conocida como 3-fosfoshikimato-1-carboxiviniltransferasa, cataliza la transferencia del grupo enol piruvato del fosfoenolpiruvato al shikimato-5-fosfato. La mayor parte de las EPSPS de diferentes especies conocidas son monoméricas, hasta el momento, sólo se ha encontrado una forma dimérica, en la cianobacteria *Spirulina platensis* (Forlani G., 2001). La masa molecular de la enzima EPSPS varía entre especies, las reportadas hasta ahora están entre 42,000 Da para *Escherichia*

*coli* (Duncan K.,1984), hasta 59,000 Da, en el caso de *Euglena gracilis* (Reinbothe *et al.* 1994).

En el caso de la CP4 EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens*, la masa molecular es de 47,800 Da y su punto isoeléctrico teórico es de 5.13 . Estas características, son semejantes a las de la subunidad  $\beta$  de la conglucina (pI 5.67, PM 51,000 Da), de la soya, por lo que, en cualquier proceso de purificación, se puede dificultar la separación de la CP4 EPSPS que se expresa en la soya Roundup Ready®

En diferentes especies, se han podido separar dos o más proteínas que tienen actividad de EPSPS, estas isoformas pueden estar expresadas de forma diferenciada con respecto al tejido del que se trate como en el caso de *E. gracilis*, o bien, en estados diferenciados del crecimiento, como se ha encontrado en cultivos sumergidos de células de maíz, en los que se han reportado dos isoformas de la EPSPS. Una de ellas se expresa durante la fase de crecimiento exponencial y la otra lo hace a lo largo de todo el ciclo celular (Forlani G, 1994).

En el caso del sorgo, *Sorghum bicolor* (Ream J. E., 1988), no se ha determinado si las tres isoformas de la enzima, encontradas en semillas, se expresan en forma diferenciada durante alguna etapa del crecimiento. Hasta el momento, no se han reportado cepas de *Agrobacterium sp.* que expresen isoformas de esta enzima.

Se han identificado especies que tienen más de un gen que codifica para EPSPS, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, la cual tiene un gen codificante en el cromosoma 1 y otra en el 2 (Theologis *et al.*, 2000).

Existen también isoformas reportadas de otras enzimas de la ruta del shikimato, tal es el caso del arroz, en el que se han encontrado tres genes diferentes, el OSK1, OsSK2 y OsSK3 que codifican, cada uno, para una enzima shikimato cinasa, encargada de transferir un grupo fosfato al shikimato para formar el shikimato 3

fosfato. La expresión de estas enzimas es diferenciada durante el crecimiento y desarrollo de las espigas (Koji K. *et al*, 2005. )

#### EFFECTO DEL GLIFOSATO EN LA EPSPS

El glifosato es un compuesto organofosforado (N-(fosfonometil) glicina), (ver Figura 3) de estructura similar al fosfoenolpiruvato. Inhibe la catálisis llevada a cabo por la enzima EPSPS. Sin embargo, no se ha observado el mismo efecto sobre otras enzimas que metabolizan fosfoenolpiruvato, tales como la piruvato cinasa o la fosfoenolpiruvato carboxinasa (Heldt, 2005).

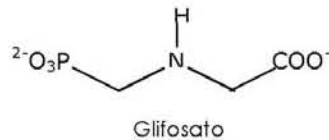
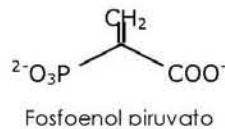


Figura 3. Estructura del fosfoenol piruvato y del glifosato.

En estudios con la enzima EPSPS de *Neurospora crassa*, se encontró que el glifosato es un inhibidor de tipo competitivo con respecto al fosfoenol piruvato (PEP) y acompetitivo con respecto al shikimato-3-fosfato(S3P) (Coggins J.R., 1983). El PEP y el glifosato tienen el mismo sitio de unión a la EPSPS y se unen a ésta, una vez que se ha formado el complejo EPSPS-S3P. (Funke 2006). Esta reacción se muestra en la Figura 4:

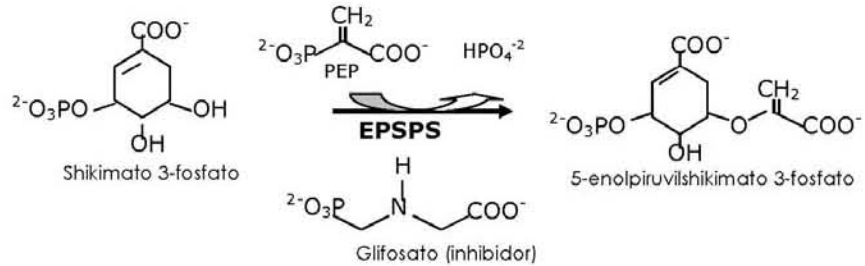


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima EPSPS

La inhibición de esta enzima, detiene la síntesis de aminoácidos y metabolitos secundarios derivados de estos. Dicha inhibición es letal para las plantas y otros organismos en los que está presente. Por lo anterior, el glifosato se ha empleado como un herbicida de amplio espectro y, desde su introducción al mercado en 1974, ha sido empleado de manera intensiva.

Debido a los humanos no cuentan con ésta ruta metabólica para la producción de aminoácidos aromáticos y, a que el glifosato no interacciona con otras enzimas que catalizan PEP, la aplicación del glifosato en los campos de cultivo ha sido considerada segura para la salud humana, ya que no se esperaba encontrar ningún efecto negativo sobre el metabolismo (Duke *et al*, 2008). Sin embargo, en años recientes, se han publicado estudios en los que se reporta que tanto el glifosato puro, como las presentaciones comerciales del herbicida, a las que se añaden surfactantes y otros coadyuvantes, tienen efectos citotóxicos y toxicológicos en cultivos celulares de hígado (Gasnier *et al*, 2009), cordón umbilical, células embrionarias de riñón y placenta humanos (Benachour, *et al*, 2009)). Se ha encontrado que las formulaciones comerciales provocan mayores efectos adversos que el glifosato por sí solo, lo que se atribuye a la presencia de los coadyuvantes, pues también se han encontrado efectos como muerte celular

Lo anterior es relevante pues el aumento en la producción de variedades de soya y cultivos de otras especies resistentes al glifosato, ha propiciado el incremento de el uso de éste herbicida, por lo que es probable que los reportes de efectos negativos del mismo en la salud humana aumenten.

#### **CARACTERÍSTICAS DE LA CP4EPSPS**

Las EPSPS de diferentes especies se agrupan en Clase I y Clase II. Las enzimas pertenecientes a la Clase I son inhibidas por el glifosato, mientras que las de la Clase II son insensibles o tienen una baja sensibilidad y pueden catalizar la transferencia del grupo fosfoenolpiruvato, aún en presencia de altas concentraciones de glifosato, tal es el caso de la CP4EPSPS. En estudios cinéticos de la enzima CP4 EPSPS, se ha encontrado que el valor del  $IC_{50}$  es de 11 mM, mientras que, para *E. coli*, el  $IC_{50}$  es de 2.5  $\mu$ M (Funke et. al., 2006).

En el caso específico de la enzima CP4 EPSPS, se ha propuesto que la baja sensibilidad al glifosato se debe a que en el sitio activo, en la posición 100 se encuentra un residuo de alanina, mientras que en las enzimas sensibles al glifosato existe un residuo de glicina en esta misma posición (ver Figuras 5a y 5b). La interacción del grupo metilo de la cadena lateral de la alanina con el glifosato, propicia que el carbón del grupo fosfonato del glifosato interaccione con la cadena lateral del residuo de ácido glutámico ubicado en la posición 354 (ver Figura 5a). Esta interacción provoca la contracción o condensación de la molécula del glifosato y evita su unión al sitio activo (Figura 5c)(Funke et al., 2006).



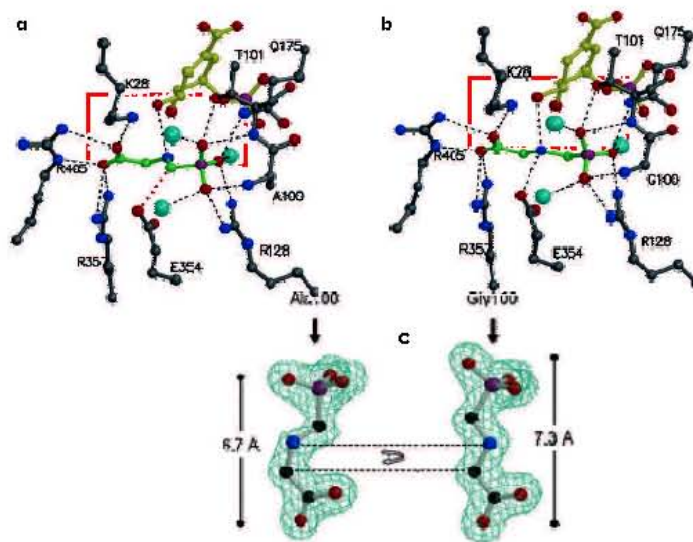


Figura 5. Interacción del glifosato con el sitio activo de la CP4EPSPS. a) Sitio activo de CP4EPSPS unido a shikimato 3P y al glifosato, enmarcado en rojo, b)mutación en el residuo 100 de la CP4 EPSPS unido a shikimato-3P y glifosato, c) cambio en la conformación del glifosato debido al cambio de residuo. (Tomado de Funke 2006).

Como resultado, la enzima CP4 EPSPS no es inhibida por la aplicación del herbicida. La expresión de la enzima en las especies vegetales en las que ha sido insertada, permite que la planta sobreviva, pues la síntesis de aminoácidos aromáticos y de otros metabolitos secundarios no se ve afectada, a pesar de que la EPSPS endógena sí sea inhibida por el glifosato.

#### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL TRANSGÉN EN LA SOYA ROUNDUP READY®

El mapa del vector PV-GMTG04, usado en la transformación de la soya se muestra en la figura 6

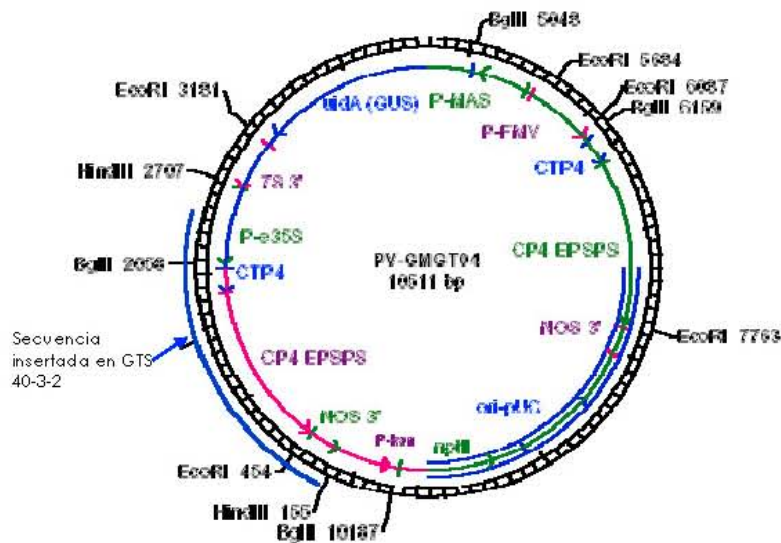


Figura 6. Mapa del vector usado para la obtención de la soya Roundup Ready®. La zona marcada con una línea exterior azul es la insertada en el evento GTS 40-3-2MON. (Monsanto,2000).

En este vector se incluyeron dos construcciones genéticas funcionales para la expresión de la enzima CP4 EPSPS, cada una con las secuencias correspondientes al promotor, péptido de tránsito, gen *cp4 epss* y el terminador de la transcripción.

En el momento de la liberación al mercado de la soya Roundup Ready®, Monsanto, la compañía desarrolladora, hizo pública la caracterización molecular de las secuencias heterólogas presentes en dicha soya. En ese reporte se indica que únicamente se insertó una construcción funcional del gen CP4 EPSPS de las dos presentes en el vector. La construcción insertada es la que está bajo el control del promotor CaMV35S (resaltada en azul en la figura 6), (Monsanto, 2000). Sin embargo, en el año 2001, Windels et al. demostraron que, además de esta copia, hay un fragmento de 250 pb insertado después del terminador NOS que corresponde a un segmento repetido del gen de CP4 EPSPS. Además, en el extremo 5', también se encontró una secuencia no reportada de 75 pb.

El principal objetivo del trabajo de Windels fue secuenciar los sitios de unión entre el DNA insertado y el correspondiente al genoma de la soya, con el fin de establecer un método de identificación específico para la soya Roundup Ready®.

Para ello, se usó DNA genómico extraído de semillas de soya Roundup Ready®. La secuencia correspondiente a la unión entre el extremo 3' del trasngén y el genoma de la soya (Número de acceso AJ308515 en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)) es la que se muestra a continuación:

```

1  tgcgcggtgt catctatggt actagatcgg ggatogatcc ccccccgggc cttcatgttc
61 ggcgggtctcg cgagcgggtga aacgcgcctc accggccttc tggaaaggcga ggacgtcctc
121 aatacgggca aggccatgca ggccatgggc gccaggatcc gtaaggaagg cgccacotgg
181 atcatgatg gcgtaggcaa tggcggcctc ctggcgcctg aggcgcctgt cgattttggc
241 aatgcgcgca cgggctgccc cttgaccatg ggcctcctcg gggtctacga tttcaagcgc
301 atcatgctgg gaaattttag cgagattata agtatcttcc tggggatctc tgctgttact
361 ggtgaatagt gagacagagt cttctgagct cataggataa aataaattat aattagtaaa
421 ttttttaatt aaataaatca attacttcat aaataatfff ttttatagaa tatgttgaca
481 ttctagccgg atatagaact aatgtaaaga aacottaaaa atttgtttg gaagaatâtg
541 ttattgaaag acaaatctaa ttaagtttat cagggtcatt tgttgaagat aggaaacctt
601 cagcaatttg aatattaagt aactgcttot cccagaatga tccggagtffc tcctcctgct
661 attacatgag caaaaataaa aaataaataa aagataagat taagcttcaa catgtgaagg
721 agtagtacac tcaccagtga ccctaatagg caacagcatg aaaaaaaaata aaaaagaata
781 aaaatagcat ctacatatag cttctcgttg ttagaaaaac aaaactatff gggatcggag
841 aagsaactgff tgaggcgcaat ggcctggtcg tgcgggctat cgctcagagaag ttcgtgaga
901 agctcgaatg cggtgagaag gtagttctct tccaacagaa âgttcaccac gcaattgcaac
961 agcgaagatc tctccacgtc cattttctct ctctgtctct gatcttaagc cattcattca
1021 agacaagaca agagaagaga agaga

```

En la secuencia arriba mostrada, en letras color naranja se marca el fragmento repetido de la CP4EPSPS, en azul la secuencia de 540 pb correspondiente al genoma de la soya que presenta rearrreglos, y en verde, el DNA genómico de la soya. En la figura 7 se muestra un esquema del transgén propuesto por Windels(2001).

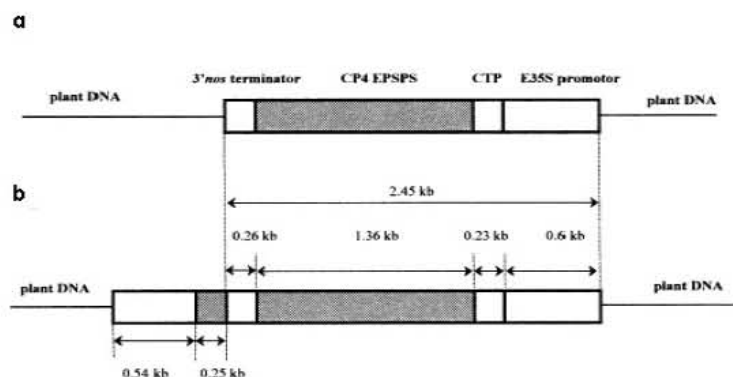


Figura 7. Esquema comparativo de la secuencia del transgén reportada por a) Padgett et al.(1995) y b) la reportada por Windels(2001).

En respuesta al trabajo de Windels, la compañía Monsanto (2001) emitió un comunicado en el que aclara que, si bien estas secuencias están presentes, no se transcriben y, por lo tanto, no afectan a las características funcionales del transgén y de la soya Roundup Ready®.

En el año 2005, Rang y colaboradores publicaron un estudio en el que se buscaba determinar si era posible que la secuencia repetida descrita por Windels, ubicada después del terminador, fuera transcrita. Para ello, se trabajó con cDNA construido mediante retrotranscripción del RNA de hojas de soya Roundup Ready® y hojas de soya no modificada como control negativo. Se hizo PCR punto final usando para ello los primers mostrados en la tabla V (ver también Figura 8):

Tabla V Primers usados por Rang		
Nombre	En figura 8	Región amplificada
PP-A	P-32 y P-33	Terminador NOS
PP-B	P-32 y P-150	Terminador y secuencia repetida
PP-C	P-140 y P123	Fin del gen completo, terminador NOS y secuencia repetida

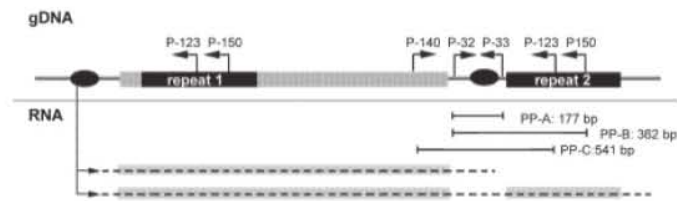


Figura 8. Esquema del transgén, los óvalos corresponden a el promotor CaMV 35S y el terminador NOS respectivamente. La secuencia en gris corresponde al gen de la CP4EPSPS, y en ella se marca en negro (repeat 1) el segmento cuya secuencia es igual al fragmento insertado después del terminador (repeat 2) (Rang, 2005).

En la Figura 9 se muestran los geles de agarosa obtenidos para las reacciones de PCR usando los primers indicados en la Tabla IV y Figura 8. La detección de los amplicones generados por los primers PP-A y PP-B, tanto en el DNA genómico (gDNA) como en el cDNA de la soya Roundup Ready® (Figura 9a), indica que el terminador y los elementos ubicados después del mismo sí son transcritos. Para el caso del PP-C (Figura 9b), la detección del amplicón esperado en cDNA es indicio de que, en la soya RR, la secuencia repetida se transcribe junto con la secuencia del gen CP4EPSPS completo. En el carril correspondiente, se observan cuatro bandas de diferentes tamaños, cuando en este experimento, únicamente se esperaba observar una banda, por lo que Rang *et al* (2005), decidieron analizarlas.

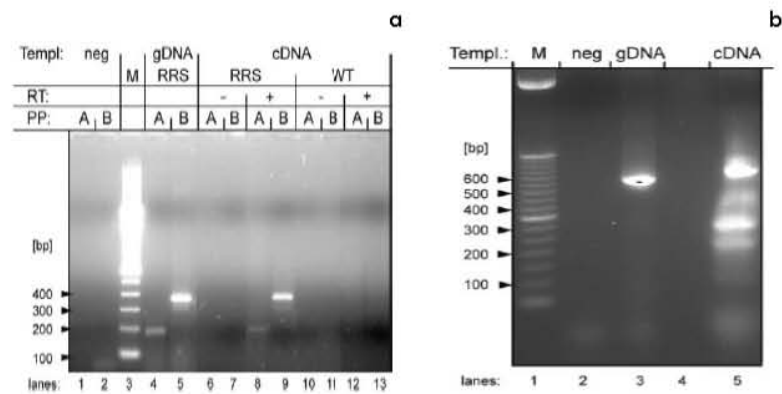


Figura 9. Gel de agarosa de los productos de PCR usando: a) primers A y B, b) únicamente C, para soya Roundup Ready® (RRS) y soya no transgénica (WT). Los controles negativos son las mezclas de reacción sin polimerasa (Rang, 2005).

Para caracterizar estos fragmentos, se extrajeron las bandas correspondientes del gel para purificarlos y se insertaron cada uno en un vector pGEM. La secuenciación de cada una de éstos mostró la existencia de 4 moléculas de cDNA con diferentes secuencias. Se encontró que esta diferencia en la secuencia se debía a la ablación de fragmentos de DNA y no a rearrreglos del mismo. Esto se muestra en la figura 10.

```

1359
gDNA   TCGTGTCCGAAAACCCCTGTCAACGGTGGACGATGCCACGATGATGCCACGAGCTTCCCGGAGTTCATGGACCTGATGGCCGGGCTGGGGCCGAAGATCGAACTCTCCGA
cDNA #3 TCGTGTCCGAAAACCCCTGTCAACGGTGGACGATGCCACGATGATGCCACGAGCTTCCCGGAGTTCATG-----
cDNA #4 TCGTGTCCGAAAACCCCTGTCAACGGTGGACGATGCCACGATGATGCCACGAGCTTCCCGGAGTTCATGGACCTGATGGCCGGGCTGGGGCCGAAGATCGAACTCTCCGA
cDNA #5 TCGTGTCCGAAAACCCCTGTCAACGGTGGACGATGCCACGATGATGCCACGAGCTTCCCGGAGTTCATGGACCT-----
cDNA #6 TCGTGTCCGAAAACCCCTGTCAACGGTGGACGATGCCACGATGATGCCACGAGCTTCCCGGAGTTCATGGACCT-----

1468
gDNA   TACGAAGGCTGCCGATGAGCTCGAATTCGAGCTCGGTACCGGATCCCAATTCGCGATCGTTCACAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCGCTGTCGGGCTC
cDNA #3 -----
cDNA #4 TACG-----
cDNA #5 -----
cDNA #6 -----

1577
gDNA   TTGGCATGATTATCATATAAATTCGTGTAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCA
cDNA #3 -----
cDNA #4 -----
cDNA #5 -----
cDNA #6 -----

1686
gDNA   ATTATACATTTAATACGGGATAGAAAACAAAATATAGCGGCAACFAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCACTATGTTACTAGATCGGGATCGATCCCCACCGG
cDNA #3 -----
cDNA #4 -----
cDNA #5 -----
cDNA #6 -----

1795                                     1901
gDNA   TCCTTCATGTTCCGGCGGTCTCGCGAGCGGTGAAACCGCGCATCACCGGCCTCTGGGAAGCGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGGCCATGCAGGCCATGGGGCCCA
cDNA #3 -----TTCCGGCGGTCTCGCGAGCGGTGAAACCGCGCATCACCGGCCTCTGGGAAGCGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGGCCATGCAGGCCATGGGGCCCA
cDNA #4 -----GGCAAGGCCATGCAGGCCATGGGGCCCA
cDNA #5 -----CATGTTCCGGCGGTCTCGCGAGCGGTGAAACCGCGCATCACCGGCCTCTGGGAAGCGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGGCCATGCAGGCCATGGGGCCCA
cDNA #6 -----TCTGGGAAGCGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGGCCATGCAGGCCATGGGGCCCA

```

Figura 10. Secuencias reportadas por Rang et al (2005), para los cuatro cDNAs encontrados en soja Roundup Ready®. En cursivas se indica la secuencia del terminador de la transcripción NOS, en negritas el sitio de codón de término de la traducción

En la figura 10, se muestra la secuencia de cada uno de los cDNA reportados por Rang, comparadas con el gDNA. Se observa que las diferencias de tamaño entre las secuencias de cDNA se deben a que en ellas, no están presentes fragmentos de diferentes tamaños, comprendidos entre las bases 1430–1873. Entre ellas, se encuentra el codón de terminación de la traducción, que sí está presente en la secuencia del gDNA. La ausencia de este codón, abre la posibilidad de que durante la síntesis de proteínas, se continúe la traducción hacia la región repetida, con lo que pudieran producirse una o más proteínas de fusión.

A partir de las secuencias de los transcritos encontrados, en el trabajo de Rang se proponen cuatro proteínas, en la Tabla VI se muestran las masas moleculares calculados para ellas, usando el programa Compute pI/Mw, disponible en la página electrónica expasy.org.

<b>Tabla VI Masas moleculares de proteínas predichas por Rang</b>	
<b>Secuencia*</b>	<b>Masa molecular (kDa)</b>
cDNA #3	56,506
cDNA #4	55,687
cDNA #5	56,863
cDNA #6	55,371

\*Nomenclatura de Rang *et al* (2005).

Por otro lado, usando una muestra de soya comercial en la que se había detectado la presencia de soya Roundup Ready®, C. Fong (comunicación personal) encontró cuatro bandas de masas moleculares de 45,000-60,000 Da, observadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En la figura 11, se muestra el perfil electroforético obtenido y se resaltan las bandas que fueron positivas en el análisis inmunológico.

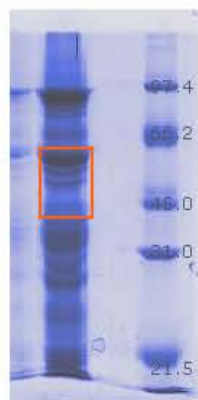


Figura 11. Gel de SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie, las bandas enmarcadas por el recuadro rojo fueron positivas para CP4EPSPS en DAS-ELISA. Fuente: C. Fong.

Las bandas fueron electroeluidas y sometidas a una prueba de DAS-ELISA para detectar la presencia de la proteína CP4 EPSPS. Las cuatro bandas señaladas en la figura 11 fueron positivas en dicha prueba.

#### **ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD**

El cultivo de soya Roundup Ready®, está aprobado en un gran número de países. En México se autorizó el cultivo de esta variedad desde 1998. Actualmente la soya Roundup Ready® cuenta con la mayor área de siembra entre todos los cultivos genéticamente modificados que se producen en el mundo (James C, 2009).

Desde la introducción al mercado de la soya Roundup Ready®, numerosos grupos han hecho estudios acerca de los riesgos asociados a ésta. Principalmente, se trata de estudios de composición del grano, calidad nutricional, alergenicidad y de posible flujo de genes a otras especies, además de estudios de adquisición de resistencia al glifosato en las especies, plantas de otras especies, bacterias y animales debido a una exposición prolongada.

En cuanto a seguridad ambiental, se ha evaluado la estabilidad de los genes en campos de cultivo (McCann M.C, 2005) y su persistencia en el suelo después de las cosechas. Se ha encontrado que, después de un año de haber sido cosechado el grano, es posible encontrar en el suelo fragmentos de DNA con la secuencia de la CP4EPSPS.

También se ha evaluado la posibilidad de que haya flujo del trasngén de plantas GM con el gen *cp4epsps* hacia especies No GM de la misma especie debido a polinización cruzada. En un estudio con soya, se encontró que el flujo de genes se daba en un 0.7% de los casos en plantas separadas por 1 m de terreno; se encontró que este porcentaje descendía hasta ser de 0% a 10 m (Abud et. al. 2007)).



En los últimos años, se ha evaluado también el efecto de la aplicación, periódica y en grandes cantidades, de glifosato en los campos de cultivo sobre las especies endémicas de las regiones donde se cultiva soya Roundup Ready® consideradas malezas. En dichos estudios, se han reportado algunas especies vegetales, tales como *Lolium rigidum*, *Eleusine indica* y *Conyza canadensis*, que han desarrollado resistencia al glifosato debido a la sobreexposición al herbicida y que, como consecuencia, requieren de mayores cantidades del mismo para ser eliminadas (Sandermann, 2006).

En el aspecto de riesgos a la salud, se ha evaluado la alergenicidad de los granos de soya Roundup Ready® y el destino del transgén una vez que es consumido (Jennings J.C., 2003; Ying Chen *et al.*, 2005). Estos estudios se han hecho principalmente en ratas, ganado porcino y humanos. En términos generales, se concluye que las secuencias del transgén no sobreviven a la digestión y que éstas no pueden ser detectadas en tejidos de animales alimentados con productos elaborados con soya Roundup Ready®. Estos reportes sólo confirman lo que se espera en cuanto al destino de cualquier secuencia de ADN presente en los alimentos, pues no es el genotipo de un alimento el que se debe evaluar en un estudio de riesgos a la salud, sino el fenotipo.

Con respecto a esto, pocos los estudios en los que se evalúa el efecto de la proteína heteróloga sobre el consumidor final. Es importante hacer notar que en la mayor parte de los estudios toxicológicos y de alergenicidad, se usa proteína CP4EPSPS que ha sido purificada de cultivos de cepas de *Escherichia coli* a las que se les ha insertado el gen CP4EPSPS y lo sobre expresan (Padgett, 1995., Doo Hyun Nam, 2002). Debido a que durante la síntesis de proteínas en las plantas se realizan modificaciones post traduccionales que no se llevan a cabo en bacterias y ya que, la proteína CP4 EPSPS que es consumida es en realidad la que se produce en la soya, sería necesario que los estudios de evaluación de riesgos se hicieran con la enzima purificada directamente de los granos de soya. Hasta el momento, no existen reportes de trabajos en los que se haya usado la enzima purificada directamente del grano de soya.

## HIPÓTESIS

En extractos proteínicos de soya Roundup Ready® será posible encontrar proteínas heterólogas con identidad de CP4 EPSPS con diferentes masas moleculares, además de la reportada de 47.6 kDa.

## OBJETIVOS

- Detectar al transgén *cp4epsps* en una muestra de granos de soya.
- Obtener una fracción proteínica en la que se concentre a la proteína heteróloga CP4 EPSPS
- Separar a las proteínas de los extractos proteínicos de granos de soya con base en las diferencias de punto isoeléctrico y/o masa molecular.
- Identificar a la proteína heteróloga CP4 EPSPS mediante métodos inmunológicos en las fracciones de proteína obtenidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

#### MUESTRAS DE SOYA Y CONSERVACIÓN

Se trabajó con una muestra de soya comercializada en la Ciudad de México por "Productos Naturistas y Soya, S.A. de C.V." que se designará a lo largo de este trabajo con las siglas SFL. Dicha muestra fue caracterizada en nuestro laboratorio por Carmen Fong (2010) por PCR- Tiempo real (RTq-PCR) mediante la detección del promotor 35S. Se cuantificó su contenido de transgénicos de 10.04%. Para los controles negativos en todas las determinaciones, se empleó una muestra libre de transgénicos, también evaluada por PCR-Tiempo Real, designada aquí como SC. Los granos se conservaron a -10 °C.

#### VERIFICACIÓN DE LA NATURALEZA GM DE LA MUESTRA

La presencia del transgén *cp4epsps* en la muestra se corroboró mediante PCR punto final. Se extrajo el ADN usando el kit de extracción de ADN genómico Fast ID (marca Genetic ID, Núm. cat. K1-0001-0200). Para realizar la extracción, los granos se molieron y se pesaron 0.5 g de cada muestra.

Las extracciones de ADN se realizaron por duplicado para cada muestra de granos en procedimientos independientes. El contenido de ADN en los extractos fue cuantificado, leyendo la absorbancia a 260 nm. Para todos los casos, se obtuvieron también valores del índice de pureza con las lecturas a 280 nm:

$$I = \frac{Abs_{260nm}}{Abs_{280nm}} \text{ de entre 1.0 y 1.2. Este valor indica que hay una relación aceptable}$$

entre la cantidad de proteínas residuales después de la extracción y la cantidad de ADN en cada muestra.

Se usaron primers específicos para la detección de soya Roundup Ready®. La región blanco de éstos es la unión entre la secuencia del promotor CaMV 35S y del péptido de tránsito CTP4, el amplicón esperado es de 74 pb (Hsu-Yang Lin, 2006). La secuencia de los primers es la siguiente:

RR1-F 5' -CATTGGAGAGGACACGCTGA-3'  
 RR1-R 5' -GAGCCATGTTGTTAATTTGTGCC-3'

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Núm. cat. 10966-018), en un termociclador marca Techne modelo TC-312. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Tabla VII Condiciones de PCR		
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	94	45 s
Anillamiento	60	45 s
Elongación	72	60 s
34 ciclos		
Extensión final		5 min

Tomado de C. Fong (2010)

Como gen de referencia, se amplificó el gen de la lectina de soya, para ello se usaron los primers GM1, los cuales tienen la siguiente secuencia:

GM1-F 5' -CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC-3'  
 GM1-R 5' -GAAGCAAGCCCATCTGCAAGCC-3'

El amplicón esperado fue de 74 pb. Las condiciones para la reacción de PCR fueron las mismas que para el caso de la amplificación del transgén, sin embargo, las reacciones se hicieron por separado con el fin de evitar contaminación cruzada.

Para cada reacción de PCR se usaron 100 ng de ADN extraído de la muestra correspondiente como ADN molde. Una vez finalizada la reacción de amplificación, los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa teñidos con

bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador UV marca Cole-Parmer modelo 9814-SERIES, los resultados se registraron fotográficamente.

#### **EXTRACCIÓN DE GRASA**

Los granos de soya se molieron hasta obtener un polvo fino, el cual se mezcló con hexano en proporción soya:hexano 1:3 peso:volumen y se mantuvo en agitación orbital a 250 rpm durante 30 min en agitadora Orbit Shaker (Lab-line Instruments Inc., modelo 3518) a temperatura ambiente en campana de extracción. El hexano se recuperó por decantación y se realizó la misma operación tres veces más. El sobrenadante, compuesto de hexano y grasa, se conservó para su tratamiento y adecuada disposición de los residuos. La pasta obtenida se secó en charola a temperatura ambiente durante 24 h, en campana de extracción

El polvo obtenido se tamizó usando una malla 40, la cual tiene un tamaño de partícula de 0.425 mm. Las partículas retenidas se molieron hasta que todas pasaron por el tamiz. La harina obtenida de esta forma se usó para la extracción de proteínas solubles y se conservó en refrigeración a 4°C.

### **MÉTODOS DE PURIFICACIÓN**

#### **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES**

Para cada una de las extracciones, se pesaron 10 g de la muestra desgrasada y se le adicionó el medio de extracción correspondiente, en una proporción 1:10. Esta mezcla se sometió a agitación orbital a 250 rpm. Una vez finalizado el tiempo de agitación, se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos, a 4° C, en una centrífuga Marca Beckman J2-MC. El sobrenadante se recuperó y filtró usando papel filtro marca Whatman (Núm. cat. 1422 110), a esta fracción de proteínas solubles se le llama Extracto Crudo (EC) y fue sometida inmediatamente al proceso de precipitación. Se conservaron alícuotas a -20 °C.

#### **PRECIPITACIÓN FRACCIONADA**

Para la precipitación de las proteínas contenidas en el EC, se usó el método de "salting out", usando sulfato de amonio (J.T. Baker). La cantidad de sal necesaria para cada concentración, se calculó usando una tabla de soluciones saturadas con sulfato de amonio (Simpson, 2004).

La precipitación se realizó, a 4° C, adicionando muy lentamente el sulfato de amonio en polvo al EC. Una vez adicionada la cantidad total de la sal, se dejó en agitación magnética, manteniéndolo a 4° C durante toda la noche para garantizar la precipitación completa de las proteínas.

Pasado este tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, el botón se resuspendió en la menor cantidad de amortiguador que permitiera solubilizarlo y se centrifugó nuevamente para eliminar partículas insolubles. El sobrenadante se recuperó para continuar con la precipitación fraccionada, usando el mismo procedimiento.

Las fracciones resuspendidas se dializaron usando membranas de la marca Spectrum de 12-14000 MWCO (Núm. cat. 132678), con agua durante 8h. Transcurrido este tiempo, se cambió por PBS a pH 7.4 dejándolo toda la noche en refrigeración a 4°C con agitación.

El sobrenadante obtenido al finalizar la precipitación fraccionada se dializó, para ello previamente se concentró por ultrafiltración en una celda agitada Amicon modelo 8050 (marca Millipore), usando una membrana de polietil sulfona (PES) con un tamaño de corte de 10,000 kDa marca Millipore, con la finalidad de disminuir el volumen y retirar la mayor cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  posible. Se concentró hasta una quinta parte del volumen inicial y, posteriormente, se dializó de la misma forma que la fracción precipitada.

#### **PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO TRICLORO ACÉTICO**

Las proteínas contenidas en el EC se precipitaron usando ácido tricloroacético (TCA, de J.T. Baker) al 20% peso/volumen. El uso de TCA, permite precipitar las proteínas de PM por arriba de 1500 Da, sin precipitar carbohidratos presentes en el EC (Nandakumar, *et al.*, 2003). El TCA se adicionó al EC como una solución saturada al 100%, esta mezcla se mantuvo en refrigeración (4°C) toda la noche. El precipitado fue recuperado por centrifugación durante 20 min a 8500 rpm a 4 °C. El botón obtenido se lavó 4 veces con acetona al 90 % con el fin de eliminar residuos de TCA, después de los lavados se secó a temperatura ambiente en campana de extracción hasta que se evaporó totalmente la acetona.

El polvo obtenido se resuspendió adicionando 5 mL de NaOH 0.2 M y se mantuvo en baño maría a 37 °C, con agitación suave. De esta forma, fue posible resuspender completamente el polvo de acetona.

Para eliminar los residuos de TCA y de acetona, cada muestra se dializó con 00 volúmenes del amortiguador de diálisis correspondiente. Una vez dializada, cada muestra se ultrafiltró con membrana de tamaño de corte de 30 kDa YM-30 (membrana de nitrocelulosa marca Millipore Núm. cat. No.13722 ).

#### **ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO**

Esta técnica se implementó con el fin de separar las proteínas contenidas en las muestras con base en las diferencias de punto isoeléctrico. Para ello, se usó un equipo Rotofor marca Bio-Rad (Núm. cat. 170-2986).

En él, las proteínas presentes en una muestra líquida migran a través de un gradiente de pH generado por la aplicación de un campo eléctrico que pasa a través de dicha muestra. Para generar el gradiente de pH se adiciona a la muestra una mezcla de anfolinas. Una vez que se aplica la corriente al medio, las proteínas migran hasta alcanzar la región dentro del gradiente de pH, en la que su carga neta es cero (punto isoeléctrico, pI). En este equipo, se generan 20

regiones dentro del gradiente, separadas por una membrana de poliéster. Éstas 20 fracciones se colectan todas a la vez usando vacío.

En cada corrida se cargaron 35 mL de cada muestra, obtenidas tanto de la precipitación con sulfato de amonio como con TCA, más 1.4 mL de anfolinas Pharmalyte 3-10 (marca Amersham-Pharmacia, Núm. cat 17-0456-01). Las condiciones de trabajo se establecieron en 320 V y 12 W. El tiempo de operación del equipo fue de 3 a 4.5 h, hasta que ya no se registró variación en la intensidad de corriente (mA). Durante todo el tiempo de corrida, el equipo se refrigeró mediante un sistema de recirculación de agua a 4° C.

Todas las fracciones obtenidas se analizaron por DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ver Métodos de detección en esta misma sección). Aquéllas que fueron positivas se colectaron, el volumen se ajustó a 15 mL y se sometieron a una nueva corrida en el Rotofor siguiendo el procedimiento de las corridas anteriores.

#### **ELECTROELUCIÓN**

Para la electroelución, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor al 10 y 12.5 % adicionados con glicerol. Estos geles fueron sometidos a electroelución usando el equipo Mini Whole Gel Eluter marca Bio-Rad (Núm. cat. 165-1255). De esta manera, las bandas de proteína generadas durante la electroforesis en gel son eluidas mediante la aplicación de una corriente trasversal al mismo, las proteínas migran hacia el exterior y son colectadas en 14 carriles que contienen amortiguador de corrida para electroforesis según el sistema de Laemmli. Con ello, en cada fracción se tienen proteínas de la misma masa molecular, o en su defecto con valores muy cercanos. La electroelución se realizó a potencia constante en refrigeración (4°C). Una vez pasado este tiempo, las fracciones fueron colectadas manualmente y conservadas en refrigeración para su posterior análisis.



#### **ELECTROFORESIS PREPARATIVA CONTINUA**

Esta técnica se basa en la separación de las proteínas con base en el tamaño de las mismas. La mezcla de proteínas se hace pasar por un gel de poliacrilamida de forma cilíndrica, lo que hace posible usar una cantidad de muestra mayor que la usada en otros tipos de electroforesis de menor formato. Debido a la aplicación de una corriente eléctrica, las proteínas migran hasta el final del gel y, una vez que salen de éste, son colectadas en amortiguador de corrida. Las proteínas de diferentes masas moleculares, migran a través del gel a diferentes velocidades, la velocidad de cada proteína depende de su tamaño, ya que el gel por el cual atraviesan tiene un tamaño de poro definido, que depende de la concentración de poliacrilamida con la que fue elaborado. De esta forma, en cada fracción colectada hay proteínas con pesos dentro de un intervalo definido, obteniendo en las fracciones tempranas las de baja masa molecular, mientras que las proteínas de mayor tamaño son colectadas en las fracciones tardías.

Para esta técnica, se usó un equipo de electroforesis preparativa Prep Cell 409 marca Bio Rad (Núm. cat. 170-2989), usando un gel de poliacrilamida al 10% y potencia de 10 W para el gel concentrador y 12 W para el gel separador, en refrigeración a 4°C. La altura del gel separador y concentrador fue de 6 y 1 cm, respectivamente. Una vez que el frente iónico salió del gel, se colectaron 80 fracciones de 6 mL cada 8 min, las cuales se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10%. Las fracciones en las que se observaron bandas con masas moleculares dentro del intervalo de interés (45 a 60 kDa), se seleccionaron para ser analizadas inmunológicamente mediante una prueba de DAS-ELISA, para lo cual previamente se diáfiltraron usando una celda Amicon con membrana de ultrafiltración marca Millipore de 10 kDa (Núm. cat. PLGC02510), para cambiar el amortiguador de elución por PBS pH 7.4 .

## **MÉTODOS ANALÍTICOS Y DE DETECCIÓN**

### **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Para cada etapa de la purificación, se hicieron cuantificaciones de proteína total en cada uno de los pasos. Para ello, se usó el método de Bradford, en volumen reducido (volumen total 1 mL), usando el reactivo Protein assay dye reagent concentrate marca Bio-Rad, (Núm. cat. 500-0203), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación se usó como estándar albúmina sérica bovina (ABS). Se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D marca Milton Roy.

### **DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (DAS-ELISA)**

Para la detección de la proteína heteróloga CP4 EPSPS en las fracciones proteínicas provenientes de los pasos de purificación, se usó un prueba comercial de DAS-ELISA, específica para la detección de CP4 EPSPS (Agdia Núm. cat. PSP74000). En ella, los pozos se encuentran cubiertos por un anticuerpo anti-CP4 EPSPS, de forma que, si la muestra probada contiene moléculas de CP4 EPSPS, éstas se unirán a él. Después los pozos se lavan y se incuban con un segundo anticuerpo anti-CP4 EPSPS acoplado a peroxidasa alcalina. La detección se basa en el desarrollo de color debido a la reacción de la peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas Benchmark marca Bio-Rad (Hercules, Ca, USA).

Como control positivo para estas pruebas, se usó el aislado proteínico con 1% de proteína heteróloga expresada en *E. coli* que provee el fabricante y como control negativo, una muestra de soja no-GM denominada SC.

### **PERFIL ELECTROFORÉTICO**

Para cada paso de la purificación, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), con el fin de dar seguimiento a los cambios posibles en el perfil de proteínas. Se usaron geles de 1 mm de grosor, los cuales se corrieron en una cámara de electroforesis MiniProtean

III de la marca Bio-Rad. Se usaron diferentes concentraciones de poliacrilamida en distintos procesos, las formulaciones usadas fueron las que se muestran en la Tabla VIII.

<b>Tabla VIII Formulación geles de poliacrilamida*</b>						
<b>Componente</b>	<b>Concentración final de poliacrilamida</b>					
	<b>10 %</b>		<b>12.5%</b>		<b>15%</b>	
	<b>Concentrador</b>	<b>Separador</b>	<b>Concentrador</b>	<b>Separador</b>	<b>Concentrador</b>	<b>Separador</b>
Acrilamida 30 %	0.64 mL	3.33 mL	0.64 mL	4.16 mL	1 mL	5 mL
Agua	3.05 mL	4.015 mL	3.05 mL	2.02 mL	2.67	0.745 mL
Glicerol	∅	1.6 mL	∅	1.6 mL	∅	1.6
Amortiguador	1.25	2.5	1.25	2.5	1.25	2.5
SDS 10%	50 µL	100 µL	50 µL	100 µL	50 µL	100 µL
APS 10%	25 µL	50 µL	25 µL	50 µL	25 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

\*Cantidades calculadas para 2 geles de 1 mm de grosor.

Las condiciones de corrida para todos los geles, a menos que se indique lo contrario, fueron de 80 V constantes para el gel concentrador y 140 V para el gel separador. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o con nitrato de plata (Protein PlusOne Silver Staining Kit, marca General Electric) según las necesidades de cada caso. Todos los geles se corrieron en refrigeración a 4 °C.

Para la determinación de las masas moleculares de las proteínas contenidas en cada muestra, en cada gel se corrieron marcadores de masa moleculares. Los geles ya teñidos se procesaron usando un equipo Densitometer GS700 (Biorad) y empleando el software Quantity one.

### **TRANSFERENCIA WESTERN**

Las muestras se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida y se corrieron a 80 V hasta que el frente iónico salió del gel. En seguida se transfirió a membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) PolyScreen® (marca Perkin-Elmer) a 12 V durante 50 minutos en un equipo Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell marca Bio-Rad (Hercules, CA), usando como amortiguador de transferencia Tris 25 mM, Glicina 190 mM en metanol al 10%.

### **DETECCIÓN EN WESTERN-BLOT DE PROTEÍNA CP4EPSPS**

La detección de la proteína heteróloga CP4EPSPS en las membranas de PVDF transferidas se hizo mediante quimioluminiscencia usando un sistema de peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) acoplado a 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona (luminol).

Una vez terminada la transferencia, se bloquearon los sitios vacíos de la membrana con una solución de leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.1% en PBS pH 7.4, en agitación a 4°C durante toda la noche, posteriormente, se lavaron 3 veces con Tween 20 0.1% en PBS pH 7.4 en agitación a temperatura ambiente durante 10 min.

Como anticuerpo primario se usó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CP4EPSPS donado por la compañía Agdia Inc., (Indiana, USA), en una dilución 1:10,000 en solución de bloqueo incubando a temperatura ambiente durante 3 horas, pasado este tiempo se lavó de la forma anteriormente descrita. Enseguida, se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a biotina (Immuno Pure®, marca Thermo Scientific Núm. cat. 3188) en una dilución 1: 20,000 en solución de bloqueo durante 3 h con agitación constante a temperatura ambiente. La membrana nuevamente se lavó tres veces y se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (ExtrAvidin® -Peroxidase, marca Sigma Núm. cat. E2886), en una dilución 1:20.000 en Tween 20 al 0.1% en PBS pH 7.4, durante 1 hora, a temperatura ambiente con agitación. Se lavó nuevamente y se

analizó por quimioluminiscencia usando el kit Immobilon™ Western de la marca Millipore (Núm. cat. WBKLS0100), en el cual el sustrato de la peroxidasa está acoplado a luminol. La oxidación del sustrato, catalizada por la peroxidasa, oxida al luminol, el cual, en esta forma oxidada, emite una señal luminosa que puede ser registrada en placas de rayos X. Para el revelado cada membrana se incubó con 1 mL del conjugado del kit durante 10 min. y se revelaron en cuarto oscuro en placas de rayos X.

#### **DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE GLICOSILACIÓN EN WESTERN BLOT**

La detección y diferenciación de glicosilaciones se hizo en membranas de transferencia Western, usando el kit DIG Glycan Differentiation (Roche), en el que se usa a la fosfatasa alcalina para la visualización de las bandas de proteína glicosilada.

La detección se logra mediante la unión de una lectina a la cadena de carbohidrato de las probables glicoproteínas. La lectina está acoplada a digoxigenina, una molécula esteroidea que es reconocida a su vez por un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. Al incubar con el sustrato de la fosfatasa alcalina, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP por sus siglas en inglés) en presencia de cloruro de 4- nitrotetrazolio (NBT por sus siglas en inglés), la hidrólisis del BCIP propicia la reducción del NBT, generando un compuesto colorido, lo que permite la detección de glicoproteínas como bandas de color azul (Gallagher *et al*, 208) .

La diferenciación entre lo tipos de glicosilaciones se hace probando a la misma muestra con diferentes lectinas, cada una de las cuales tiene afinidad por un tipo específico de glicosilación. Las lectinas usadas en esta prueba y el tipo de glicosilación que detectan se muestran en la tabla IX:

**Tabla IX Lectinas usada para diferenciación de tipos de glicosilación**

Lectina	Glicosilación detectada	Proteína control
Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manosa (N-glicanos)	Carboxipeptidasa
Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i> (SNA)	Ácido siálico (2-6) galactosa, ácido siálico (2-6) N-acetilgalactosamina. (N- y O-glicanos)	Transferrina
Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i> (MAA)	Ácido siálico (2-3)/galactosa (N- y O-glicanos)	Fetuina
Aglutinina de cacahuete (PNA)	Galactosa $\beta$ (1-3)/N-acetilgalactosamina (O-glicanos)	Asialofetuina
Aglutinina de <i>Datura stramonium</i> (DSA)	Galactosa $\beta$ (1-4) N-acetilglucosamina (N- y O-glicanos)	Fetuina y asialofetuina

Después de la transferencia Western, la membrana se incubó a 4° C en una solución de bloqueo con agitación durante toda la noche. Pasado este tiempo éste tiempo, se lavó dos veces con TBS 0.5 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 en agitación a temperatura ambiente durante 10 min. Se hizo otro lavado con se lavó con TBS 0.5 M, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5 en agitación a temperatura ambiente durante 10 min.

Posteriormente se incubó con la lectina marcada con digoxigenina que le correspondía, en una dilución 1: 10,000 en TBS 0.5 M, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5 durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se lavó tres veces con TBS 0.5 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 en agitación a temperatura ambiente durante 10 min. Enseguida, se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1: 10,000 en TBS 0.5 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5, durante 1 h con agitación constante a temperatura ambiente. La membrana nuevamente se lavó tres veces con TBS 0.5 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 y se incubó con NBT/BCIP en una dilución 1:100, en 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, pH 9.5. Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta la aparición del color. Una vez finalizada la tinción, la reacción se detuvo lavando con agua destilada en cantidad abundante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IDENTIFICACIÓN DEL TRANSGÉN

En la figura 12 se muestra el gel de agarosa de los productos de PCR usando como ADN molde el extraído de soya SFL y soya SC (Soya Cajeme, No GM) y los primers RRT1 específicos para la detección de la variedad de soya Roundup Ready®. La obtención, del amplicón esperado en la soya SFL confirmó la presencia de soya Roundup Ready® en dicha muestra. En cambio, en la Soya Cajeme (SC), no se detectó la presencia del transgén, lo que confirmó la naturaleza No-GM de esta soya, por lo que fue usada como control negativo en los experimentos y determinaciones siguientes.

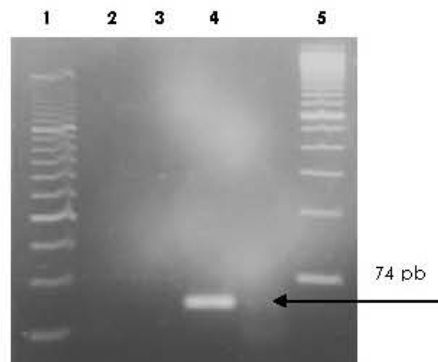


Figura 12. Detección del transgén *cp4epsps* por PCR punto final. Carril 1) marcador molecular 50 pb, 2) control de reactivos, 3)soya SC, 4)soya SFL, 5)marcador molecular 100 pb. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

La especificidad de la prueba de detección del transgén está dada por las características de la región blanco de los primers RRT1, pues la conjunción entre el promotor CaMV 35S y el péptido de tránsito CTP4 es única entre las variedades de

soya modificadas genéticamente que actualmente son comercializadas a nivel mundial. Además debe mencionarse que esta secuencia blanco y la secuencia de los primers utilizados han sido reportados previamente y utilizados en la Unión Europea para la identificación / cuantificación de la soya RR (Foti N. European Comission).

Por otro lado, en la amplificación del gen de referencia, se detectó el producto de PCR esperado en ambas muestras (SFL y SC). La obtención del amplicón esperado de 74 pb para las dos muestras, indica que en cada una de las extracciones se obtuvo ADN con la integridad suficiente para ser usado en las reacciones de PCR. En la figura 13 se muestra el gel de agarosa correspondiente.

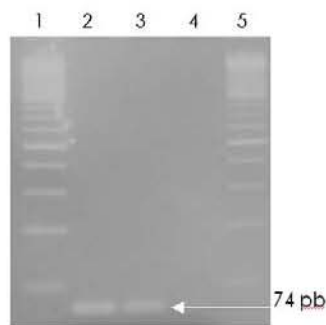


Figura 13. Detección gen de lectina por PCR punto final. Carril 1) marcador molecular 100 pb, 2) soya SC, 3)soya SFL, 4)control de reactivos, 5)marcador 100 pb. Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

Estos resultados confirmaron que la muestra de granos de soya SFL, está compuesta de soya Roundup Ready® y que dicha muestra es apropiada para purificar a la proteína heteróloga CP4 EPSPS.

#### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES

Una vez identificadas las muestras GM y no-GM, se preparó una harina desgrasada con cada una de ellas, como se indica en la sección de Métodos. En la muestra SFL la grasa extraída fue equivalente al 18.96 % del peso inicial de la muestra. De acuerdo a los datos del análisis proximal realizado a esta muestra (ver



Anexo I), este porcentaje es del orden de magnitud de la cantidad de grasa esperada (20.3%). En el caso de la soya SC, se obtuvo un porcentaje de grasa de 20%. Después del tamizado, estas harinas se usaron para la extracción de proteínas en todos los experimentos descritos.

Debido a que la mayor parte de las proteínas de reserva de la soya son globulinas (proteínas solubles en soluciones salinas), se intentó extraer por separado a las albúminas de las globulinas. Se esperaba que en alguna de estas dos fracciones se obtuviera una mayor cantidad de la proteína CP4 EPSPS, la cual debería ser identificada como positiva en la prueba de DAS-ELISA específica para esta proteína heteróloga. Los experimentos descritos a continuación se realizaron usando la muestra de harina de soya SFL.

Para la extracción de albúminas se usó agua desionizada y para las globulinas PBS pH 7.4, con NaCl 150mM siguiendo el procedimiento de extracción descrito en la metodología. El perfil electroforético de ambos extractos se muestra en la figura 14.

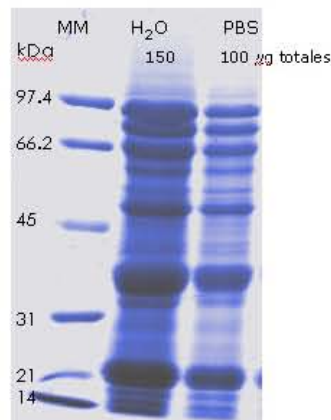


Figura 14. Extracción de proteínas solubles de la soya SFL con agua desionizada y PBS pH 7.4 . SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie.

El resultado de las determinaciones de proteína y de la prueba de DAS-ELISA de estos mismos extractos se muestra en la tabla X. Para tener un parámetro que permitiera conocer la cantidad relativa de la proteína CP4EPSPS en cada uno de los extractos y así compararlos, se usaron los valores de absorbancia de la prueba de DAS-ELISA y la concentración de proteína para calcular un **Factor de concentración aparente de CP4 EPSPS**, abreviado como **[CP4EPSPS]<sub>ap</sub>**, el cual se obtuvo dividiendo el valor de absorbancia a 595 nm entre la cantidad total de proteína usada en cada prueba.

<b>Tabla X Extracción de albúminas y globulinas de soya SFL</b>			
<b>Extraída con</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>ELISA (Abs<sub>595 nm</sub>)</b>	<b>[CP4EPSPS]<sub>ap</sub></b>
Agua	7.54	1.113	1.47
PBS	7.637	1.358	1.788

En los patrones de bandeado mostrados en la figura 14, así como en los valores de concentración de proteína de la tabla X, no se observaron diferencias apreciables entre los medios de extracción probados. Debido a lo anterior, se intentó una extracción secuencial con ambos medios: agua y NaCl 0.5 M. Después de la centrifugación, el extracto acuoso crudo se reservó y el botón obtenido se resuspendió nuevamente en 100 mL de NaCl 0.5 M, seguido de 2 h en agitación y centrifugación. En este extracto salino se esperaba recuperar las globulinas. En la figura 15 se muestra el perfil electroforético de la extracción secuencial.

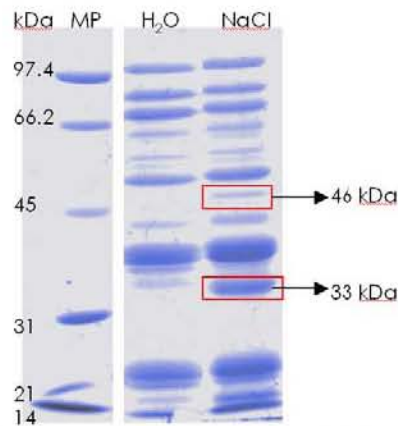


Figura 15. Perfil electroforético de la extracción secuencial. En cuadros rojos se destacan las bandas encontradas únicamente en el extracto con NaCl 0.5 M. Tinción con azul de Coomassie.

En la figura 15 se observa que la mayor parte de las bandas de proteína están conservadas en ambas extracciones. Sin embargo, en el extracto con NaCl 0.5 M, se pueden ver dos bandas que no aparecen en el extracto con agua desionizada, de masas moleculares de 33 y 46 kDa respectivamente. Es probable que estas bandas correspondan a las subunidad B de la glicinina y la subunidad  $\beta$  de la conglucina reportadas con masas moleculares de 33 y 47 kDa (Sathe *et al* 2009), y que aparezcan, únicamente en el extracto con NaCl 0.5M, debido a que las globulinas son preferentemente solubles en soluciones salinas. Los resultados de las pruebas de DAS-ELISA y de proteína de los extractos arriba indicados se muestran a continuación:

Tabla XI Extracción secuencial de albúminas y globulinas de soya SFL.			
Extraída con	Proteína (mg/ml)	ELISA (Abs <sub>595nm</sub> )	[CP4EPSPS] <sub>ap</sub>
Agua	7.33	1.366	1.863
NaCl 0.5 M	6.5	0.838	1.28

Los datos mostrados en la tabla XI, indican que, con los tres medios de extracción probados (agua, NaCl 0.5 M y PBS pH7.4) se obtuvieron resultados similares en cuanto a: cantidad de proteína extraída, patrón de bandeo en SDS-PAGE y [CP4EPSPS]<sub>ap</sub>. Por lo tanto, se decidió implementar las pruebas de precipitación de proteínas usando los extractos obtenidos con todos ellos, con lo que se buscaba encontrar el método de extracción y precipitación que más conviniera a nuestros fines. Estos experimentos se describen en la siguiente sección.

### PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Con los diferentes extractos obtenidos anteriormente, y como un paso inicial de la purificación, se realizó una precipitación de las proteínas presentes en cada uno de ellos. Se ensayaron dos métodos: con ácido tricloroacético (TCA) y precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Con este procedimiento se buscaba obtener una fracción de proteínas concentrada y en la que se hubiera enriquecido la presencia de la proteína heteróloga CP4 EPSPS, detectable mediante la prueba de DAS-ELISA.

Para los experimentos de precipitación con TCA se probaron los EC obtenidos en la sección anterior: PBS pH 7.4, NaCl 0.5M y las fracciones solubles en agua y NaCl 0.5 M obtenidas en la extracción secuencial. Los resultados se muestran en la tabla XII:

Tipo de extracción	Antes de precipitación			Después de precipitación		
	Proteína mg/mL	ELISA Abs <sub>595 nm</sub>	[CP4EPSPS] <sub>ap</sub>	Proteína mg/mL	ELISA Abs <sub>595 nm</sub>	[CP4EPSPS] <sub>ap</sub>
PBS pH 7.4	7.637	1.358	1.788	5.02	1.064	2.119
NaCl 0.5 M	10.46	1.372	1.311	2.096	0.004	0.019
Agua	7.33	1.366	1.863	2.085	0.007	0.003
NaCl 0.5 M (después de agua)	6.5	0.838	1.28	1.038	0	---

Las celdas sombreadas corresponden a la extracción secuencial.

En la tabla XII se muestra que sólo es posible detectar inmunológicamente después de la precipitación a la proteína heteróloga en el extracto hecho con PBS. Sin embargo los patrones de bandeos en SDS-PAGE de las muestras después de la precipitación son muy parecidos entre sí (ver Figura 16) y no se observa en ellos algún indicio de degradación de proteínas.

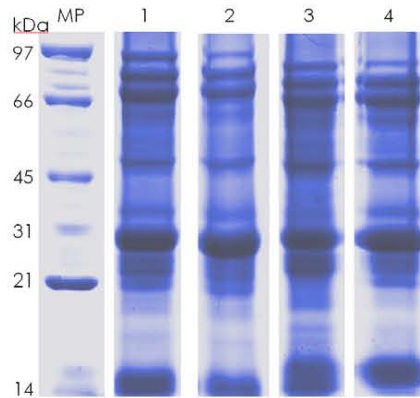


Figura 16. SDS-PAGE después de la precipitación con TCA de los EC de soja SFL con diferentes medios de extracción: 1) PBS pH 7.4, 2) NaCl 0.5 M, 3) agua y 4) NaCl 0.5 M después de agua. Tinción con azul de Coomassie

La ausencia de reacción positiva al anticuerpo en los otros extractos se atribuye a que las muestras que no fueron tratadas con amortiguador pudieron no haberse renaturalizado adecuadamente después de la precipitación con TCA y resuspensión con NaOH 0.1 M, y debido a ello, no interaccionar con los anticuerpos en la prueba de DAS-ELISA. Lo anterior se corrobora al considerar los resultados de la muestra tratada con PBS, la cuál fue la única en la que fue posible incrementar el valor de **[CP4EPS<sub>PS</sub>]<sub>ap</sub>**, de 1.788 a un valor de 2.119.

Los experimentos arriba reportados permitieron descartar el uso de agua y NaCl 0.5 M, por lo que, todos los experimentos que se describen a continuación, en ésta y las secciones siguientes, se realizaron usando PBS pH 7.4 como medio de extracción y solución amortiguadora de trabajo para prevenir en lo posible la desnaturalización de la proteína heteróloga.

Para la precipitación fraccionada con sulfato de amonio se probaron diferentes pasos de concentración de esta sal, en PBS. Los resultados de estas precipitaciones se resumen en la Tabla XIII:

<b>Prueba</b>	<b>Gradiente</b>	<b>Proteína mg/mL</b>	<b>ELISA Abs<sub>595 nm</sub></b>	<b>[CP4EPSPS]<sub>ap</sub></b>
1	EC	4.97	0.618	1.243
	0-50%	6.14	0.562	0.915
	50-100%	0.01	0.261	0.0038
2	EC	4.86		
	0-20%	2.66	0.581	2.206
	20-60%	8.96	0.461	0.514
3	EC	4.31	0.685	1.58
	0-40%	3.75	1.271	3.38

Además de un incremento en el valor de **[CP4EPSPS]<sub>ap</sub>**, se buscaba que en el perfil electroforético en SDS-PAGE hubiera una disminución de la complejidad del mismo, indicando una mejor separación de la proteína heteróloga. La comparación de dichos perfiles se muestra en la figura 17. En ella se puede ver que en la fracción obtenida al 60% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se conserva la mayor parte de las proteínas presentes en el extracto crudo (EC), mientras que en la precipitación al 30% se observa un menor número de bandas. Sin embargo, tomando en cuenta los resultados de la prueba de DAS-ELISA mostrados en la Tabla XIII se determinó que la mejor recuperación se obtuvo con sulfato de amonio al 40%, fracción en la que se obtiene la mayor concentración de proteína heteróloga.

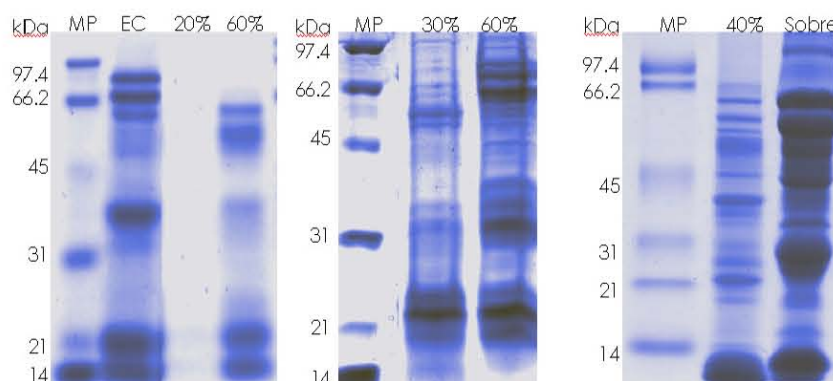


Figura 17. SDS-PAGE al 10% de acrilamida de la precipitación fraccionada con diferentes concentraciones de sulfato de amonio. Teñidos con azul de Coomassie.

Una vez seleccionadas las condiciones de precipitación con 40% de sulfato de amonio, la fracción obtenida se trató con TCA de la misma manera que las anteriores, con el fin de separar a la fracción proteínica de los carbohidratos aún presentes en la muestra. Los resultados de esta prueba están en la Tabla XIV:

<b>Tabla XIV Precipitación con TCA al 20% de la fracción al 40% de sulfato de amonio</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Conc. prot. (mg/mL)</b>	<b>ELISA (Abs<sub>595 nm</sub>)</b>	<b>[CP4EPSPS]<sub>ap</sub></b>
Fracción de 40%	1.26	0.758	6.01

La fracción obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 40%, y la sometida únicamente a precipitación con TCA (ver Tabla XII tipo de extracción PBS), fueron ultrafiltradas en una celda agitada con membrana de 30 kDa para concentrarlas. Con este procedimiento, se obtuvieron muestras enriquecidas en proteínas de masa moleculares de 30, 48 y 60 kDa, según se muestra en la figura 18 A. Aún cuando en esta muestra se conservan otras proteínas de diferentes masas moleculares (Fig. 18 B), los resultados de la detección inmunológica permitieron decidir cuáles fracciones de las obtenidas con este procedimiento se utilizarían en los experimentos posteriores.

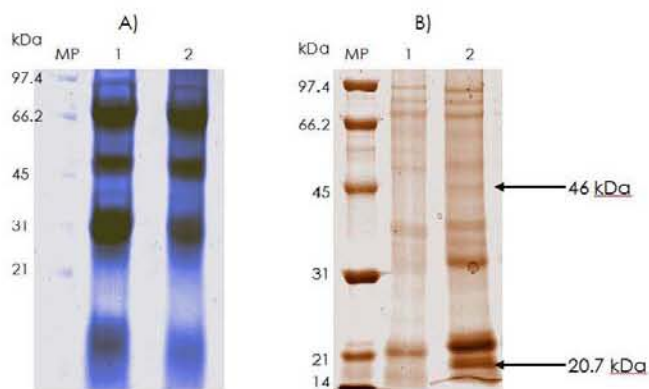


Figura 18. SDS-PAGE después de ultrafiltración de: 1) precipitación con TCA, 2) precipitación con sulfato de amonio al 40% seguida de precipitación con TCA. A) 40  $\mu$ g de proteína por carril, teñido con azul de Coomassie. B) 1  $\mu$ g de proteína por carril, teñido con nitrato de plata.

En la figura 18 A, se observa un patrón de bandeo similar en ambas fracciones: la proveniente de la precipitación con TCA (carril 1) y la precipitación con sulfato de amonio seguida de TCA (carril 2). Sin embargo el gel teñido con nitrato de plata mostrado en la figura 18 B permite detectar que existen diferencias entre ellas. Con respecto a la región de 45 a 60 kDa, que es el intervalo de masa molecular en el que se esperaría encontrar las posibles proteínas de fusión propuestas por Rang (2005), en la figura 18 B se muestra lo siguiente: todas las bandas observadas en el carril 1 se observan en el carril 2, sin embargo en este último se detectó una banda de 46 kDa que no se observa en el carril 1, además de una banda de 20.7 kDa.

Los valores de  $[CP4EPSPS]_{op}$  de las fracciones presentadas en la figura 18 son de 2.11 y 6.01 respectivamente (en tablas XII y XIV), lo que indica que en ellas se ha podido concentrar a la proteína heteróloga CP4 EPSPS. Por lo tanto, se decidió seguir la purificación usándolas en los procedimientos posteriores.



## ISOELECTROENFOQUE

En un experimento preliminar, la fracción obtenida por precipitación con sulfato de amonio 40% fue sometida a isoelectroenfoque. Se hicieron tres corridas con dicha muestra. Se aplicó la prueba de DAS-ELISA a cada una de las fracciones colectadas y se encontró que aquellas con un valor de pH entre 5 y 10 fueron positivas. Éstas fueron colectadas en una sola muestra, la cual se llevó nuevamente al equipo de isoelectroendoque. En la Tabla XV se muestran los resultados obtenidos después de la recirculación.

A pesar de que se obtuvieron fracciones positivas en la prueba de DAS-ELISA (resaltadas en azul en la tabla XV), en el intervalo de pH de 6.28 a 10.49, en los perfiles electroforéticos en SDS-PAGE (no mostrados) de dichas fracciones, no se logró observar separación de bandas con respecto al gradiente de pH. Se esperaba que en las fracciones de pH diferentes se obtuvieran bandas de proteína distintas, debido a que al ser sometidas a isoelectroenfoque, las proteínas deben migrar hacia la fracción en la que el pH sea el de su punto isoelectrónico.

Fracción	Abs 280 nm	pH	ELISA	Fracción	Abs 280 nm	pH	ELISA
1	0.044	2.14	0.037	11	0.059	8.9	0.161
2	0.043	2.25	0.038	12	0.037	9.31	0.166
3	0.08	2.67	0.042	13	0.019	9.77	0.172
4	0.081	4.69	0.038	14	0.03	10.49	0.165
5	0.034	6.28	0.286	15	0.027	12	0.047
6	0.09	6.84	0.252	16	0.012	12.27	0.039
7	0.075	7.22	0.196	17	0.017	12.47	0.036
8	0.017	7.61	0.203	18	0.015	12.59	0.037
9	0.06	8.06	0.193	19	0.013	12.67	0.039
10	0.038	8.49	0.143	20	0.022	12.7	0.04

Por otro lado, cuando se sometió a isoelectroenfoque y recirculación en isoelectroenfoque, a la fracción obtenida mediante precipitación con TCA, ninguna de las fracciones colectadas tuvo resultado positivo en la prueba de DAS-ELISA. Además de esto, en los perfiles electroforéticos de cada una de estas fracciones (imagen no mostrada), se observó que a pesar de las diferencias en las mediciones de pH y absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones, en todas se conserva el mismo patrón de bandeo.

Es importante mencionar que durante estos experimentos el equipo se calienta considerablemente, a pesar de estar refrigerado, y la temperatura de la muestra se eleva. Además se encontró que en todas las fracciones se obtiene el mismo patrón de bandeo. Teniendo en cuenta que en la prueba de DAS-ELISA ninguna de las fracciones tuvo resultados positivos, se descartó esta metodología.

#### **ELECTROELUCIÓN**

Las fracciones positivas para la prueba de DAS-ELISA que se muestran en el gel de electroforesis desnaturizante de la Fig. 18, presentan un patrón de bandeo complejo, y no es posible determinar cuál o cuáles de las bandas correspondientes a las proteínas presentes en dichas muestras, generan señal positiva en dicha prueba. Por ello se decidió electroeluir las bandas separadas en un gel de electroforesis, para determinar por DAS-ELISA si se tenían proteínas con identidad de CP4EPS de diferente masa molecular. Se usó un equipo Mini Whole gel eluter (Bio-Rad) en el que las bandas de proteína son eluidas al aplicar una corriente transversal al gel.

Para éste procedimiento, era necesario tener geles de electroforesis en los que hubiera una buena separación entre las bandas y que éstas se observaran completamente rectas al teñir con azul de Coomassie, con la finalidad de que, al aplicar la corriente transversal, las bandas de proteínas del mismo o similar masa molecular fueran eluidas en la misma fracción. Para ello que fue necesario

encontrar la concentración de poliacrilamida en el gel y la potencia que debería aplicarse durante la electroforesis.

Las concentraciones de poliacrilamida probadas para SDS-PAGE fueron 10%, 12.5% y 15% con adición de glicerol, también se ensayaron dos valores de potencia, 10 y 12 W. Se encontró que las mejores condiciones para una buena separación de las bandas en la muestra precipitada con sulfato de amonio seguida de TCA fueron: 12.5% de poliacrilamida, con adición de glicerol, corridas a potencia constante de 10 W. En la figura 19, se muestra un gel obtenido en estas condiciones.

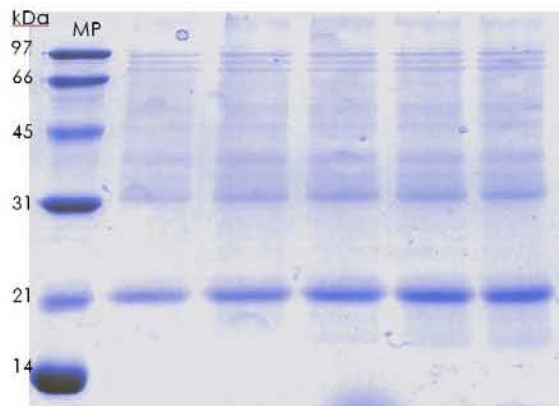


Figura 19. SDS PAGE al 12.5 % de poliacrilamida adicionado con glicerol de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40% y TCA. Tinción con azul de Coomasie.

Al terminar la electroforesis, el gel se cortó para ajustar su tamaño al equipo de electroelución. Al terminar la elución, se colectaron 14 fracciones, éstas fueron sometidas a SDS-PAGE con el fin de identificar aquellas en las que hubiera proteínas con masas moleculares dentro del intervalo de interés de 45 a 60 kDa, estos geles se muestran en la figura 20.

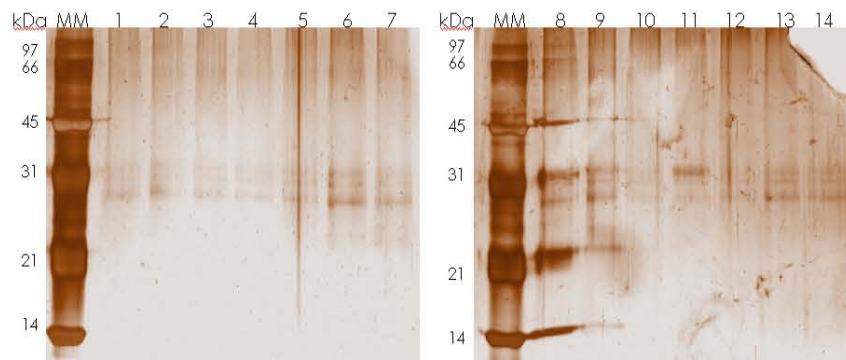


Figura 20. SDS-PAGE de las fracciones 1 a 14 electroeluidas de un gel cargado con muestra de soya SFL. Teñido con nitrato de plata.

En los geles mostrados en la figura 20, se observa que todas las fracciones colectadas se observan bandas de 29, 31 y 33 kDa respectivamente. Además en las fracciones 8 y 9, hay bandas de 14, 23 y 48 kDa. En las repeticiones de este experimento se obtuvieron resultados similares al aquí mostrado, por lo que se decidió probar otro método de separación.

#### **ELECTROFORESIS PREPARATIVA CONTINUA (EPC)**

Para esta metodología se usó 1 mL de una muestra proveniente de la precipitación con sulfato de amonio al 40 % seguida de TCA y ultrafiltrada hasta tener una concentración de 18 mg/mL, ya que para este procedimiento, era necesario que la concentración de proteína fuera por lo menos de 14 mg/mL.

Los experimentos se realizaron en el Departamento de Patología Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Rosario López Vancell, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se colectaron 80 fracciones de 6 mL a una velocidad de 0.75 ml/min. Para identificar, de entre las fracciones colectadas, aquellas en las que se tuvieran proteínas con masas moleculares dentro del intervalo de interés, que va

de 45 a 60 kDa, algunas de ellas se corrieron en SDS-PAGE al 10% adicionados con glicerol. Este gel se muestra en la figura 21.

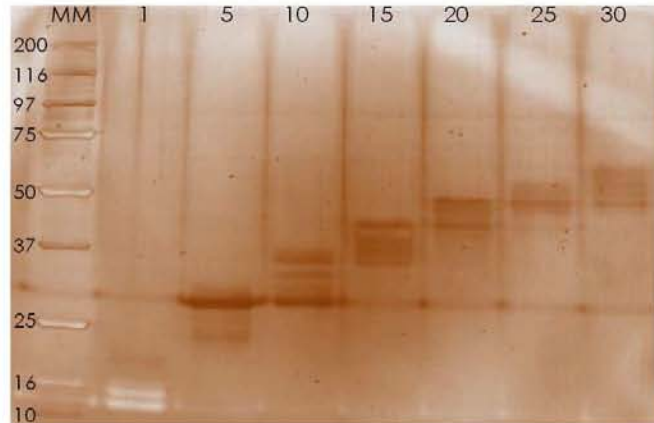


Figura 21. Tinción con nitrato de plata de SDS-PAGE de algunas fracciones, en cada carril se indica el número de la fracción colectada en EPC.

En la figura 21 se observa que entre las fracciones 15 y 30 se tuvieron proteínas con masa molecular de entre 40 y 60 kDa, por lo que todas las fracciones comprendidas en este intervalo se corrieron en SDS-PAGE al 10% adicionado con glicerol. En la figura 22 se muestran las imágenes de estos geles.

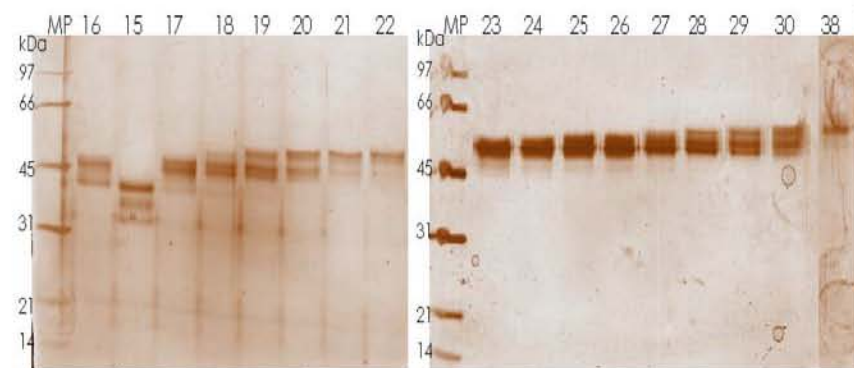


Figura 22. SDS-PAGE de las fracciones 15 a 30 obtenidas en EPC. Tinción con nitrato de plata.

En la figura 22 se observa que todas las fracciones, a partir de la número 16, contienen al menos una banda que está dentro del intervalo de masa molecular buscado, por lo que se seleccionaron para ser analizadas por DAS-ELISA. Antes de someterlas a dicha prueba, el amortiguador de elución se cambió por PBS pH 7.4 mediante diafiltración en celda agitada para eliminar en lo posible el SDS que interferiría en la determinación inmunológica. En la tabla XVI se muestran los valores para las muestras positivas.

<b>Fración</b>	<b>Masa molecular (kDa)</b>	<b>Abs<sub>595nm</sub></b>
17	46.06, 43.74	0.230
22	48.42	0.087
23	51.56	0.278
38	59.75	0.06

Para determinar si en cada una de las fracciones de la EPC había una o más bandas de proteína responsables del valor positivo en la prueba de DAS-ELISA, se hizo una detección mediante Western Blot usando anticuerpos monoclonales anti-CP4 EPSPS. En la figura 23 se muestran los resultados de esta inmunodetección (a), sus repeticiones (b) y los controles: el positivo del kit de DAS-ELISA y el negativo, que corresponde a la soya SC no-GM (c).

En la placa mostrada en la figura 23a se observa que todas las fracciones corridas tienen resultados positivos, ya que las bandas de pesos calculados de 47, 58 y 63 kDa reaccionan inmunológicamente a los anticuerpos anti- CP4 EPSPS. Resalta el hecho de que las fracciones 27 y 30, no tuvieron señal positiva en la prueba de DAS-ELISA, mientras que en la detección mediante Western-blot sí presentaron reacción inmunológica, ello debido a la mayor sensibilidad de la detección mediante quimioluminiscencia comparada con la colorimétrica de la prueba de DAS-ELISA (Roda *et al*, 2006).

En la figura 23b se muestra el resultado de las repeticiones de estos experimentos. Es importante señalar que cada una de las muestras allí analizadas provienen de repeticiones independientes del proceso completo de separación y purificación, partiendo desde la harina desgrasada que se preparó en el laboratorio, y fueron sometidas a la EPC, separadamente. La detección de tres bandas de proteína CP4 EPSPS (Fig. 23 b) confirma la presencia de tres proteínas de diferentes masas moleculares con identidad de CP4 EPSPS. El uso de anticuerpos monoclonales permite asegurar la identidad de las proteínas detectadas usando Western-blot.

Para descartar la posibilidad de que proteínas endógenas de la soya hubieran generado falsos positivos en estas pruebas, se aplicó el mismo procedimiento (extracción-precipitación-ultrafiltración-EPC-western blot) para el control negativo, la soya SC, cuyos resultados se muestran en la figura 23c. Tanto en las pruebas de DAS-ELISA como en las placas de quimioluminiscencia de las fracciones obtenidas en EPC de esta soya, se observó la ausencia de señales positivas para la detección de la proteína CP4 EPSPS, lo que demuestra que no hay unión inespecífica a otras proteínas endógenas de la soya y avala la especificidad de los anticuerpos.

El epítope al que se une el anticuerpo monoclonal usado en esta prueba no se conoce (comunicación personal con Agdia Inc.), sin embargo, debido a que las proteínas de fusión que probablemente se expresan en soya Roundup Ready® conservan completa la secuencia de aminoácidos de la enzima CP4EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens*, se espera que los anticuerpos monoclonales desarrollados para reconocerla, también se unan a las proteínas de fusión propuestas por Rang (2005).

La masa molecular reportada para la CP4 EPSPS expresada en la soya Roundup Ready® es de 47.6 kDa (Padgett, 1996); la presencia de esta proteína en la muestra de soya SFL se confirma con la detección de una banda de 47 kDa en las fracciones probadas, como se muestra en las figuras 23 a y b.

La detección de bandas de 58 y 63 kDa, que no habían sido reportadas en la soya Roundup Ready®, refuerza la probabilidad de que en esta soya se estén produciendo proteínas de fusión derivadas de la transcripción del fragmento del gen *cp4 epsps* adyacente al extremo 3' del transgén descrito por Windels (2001), tal como fue propuesto por Rang *et al* (2005) quien describió la secuencia de cuatro transcritos del gen hallados en soya Roundup Ready®.

Además de la existencia de proteínas de fusión, las modificaciones postraduccionales a las que son sometidas las proteínas en organismos eucariontes, podrían causar la detección de bandas de proteína de diferentes pesos, sin que se trate de proteínas provenientes de mensajeros distintos. Se sabe que la glicosilación y la fosforilación ocasionan heterogeneidad en la masa molecular de una proteína sometida a métodos electroforéticos (Kleinert *et al*, 2007). De estos dos tipos de modificación postraduccional, la glicosilación es la que ocasiona un cambio mayor en la masa molecular aparente de una proteína, dichos cambios pueden ser observados usando electroforesis de una dimensión (Steinberg *et al*, 2001). En el caso de la fosforilación, esta heterogeneidad en el



valor de masa molecular se observa con mayor frecuencia en la electroforesis de doble dimensión. (Yan et al, 1998).

Para dilucidar si la detección de bandas de proteína de diferente masa molecular en la prueba de quimioluminiscencia se debe a la glicosilación de las mismas, se hizo una prueba de detección y diferenciación de glicanos unidos a proteínas transferidas a membranas de Western blot. Esta prueba se aplicó a una fracción de EPC en la que previamente se había detectado la presencia de las tres bandas, como control positivo se usaron las proteínas glicosiladas proporcionadas por el fabricante, además, se incluyó el extracto crudo (EC) de la soya no transgénica, usada como control negativo en todos los experimentos anteriores. El EC de soya se incluyó como un control de glicosilación de las proteínas endógenas de la soya. En esta prueba se esperaba la detección de la manosa, asociada a todas las subunidades ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ ) de la conglucina en forma de oligómeros unidos a residuos de asparagina (N-glicanos) (Murayama et al, 1998). En la figura 24 se muestran los resultados de dicha prueba.

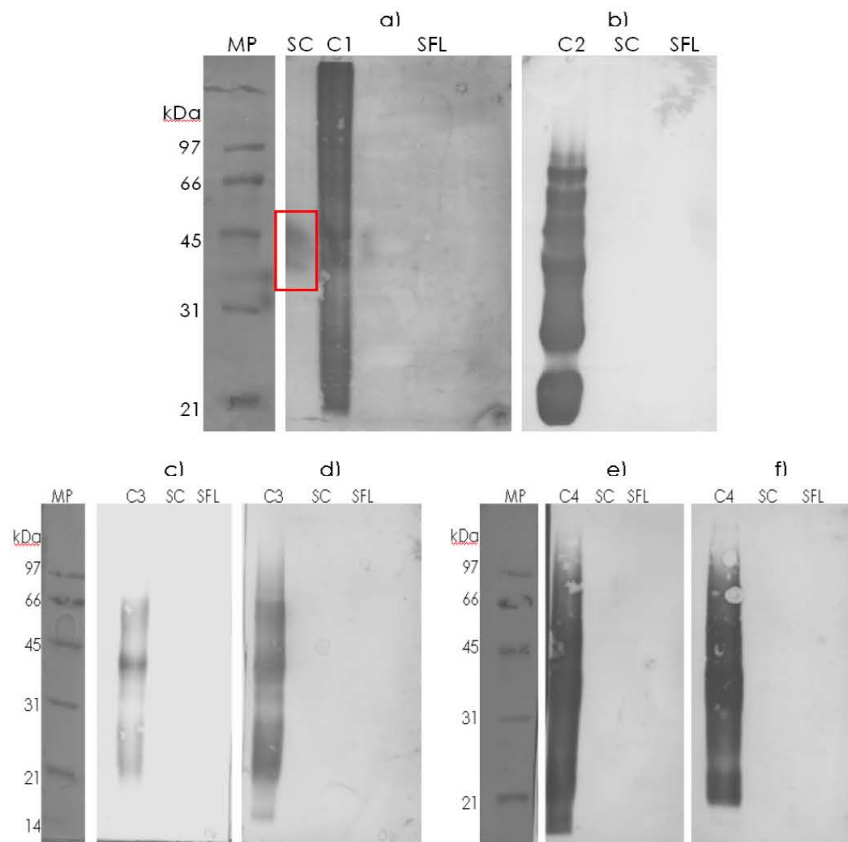


Figura 24. Detección y diferenciación en Western blot de glicosilaciones: a) manosa (N-glicanos), b) ácido siálico (2-6)/ galactosa y ácido siálico (2-6)/ N-acetilgalactosamina (N- y O-glicanos), c) ácido siálico (2-3)/galactosa (N- y O-glicanos), d) Galactosa B(1-4) N-acetilglucosamina (N- y O-glicanos e) Galactosa  $\beta$ (1-3)/ N-acetilgalactosamina (O-glicanos) y f) Galactosa B(1-4) N-acetilglucosamina (N- y O-glicanos). Para cada una de ellas, se probó: SC) extracto proteínico de soja no transgénica y SFL) fracción de EPC en la que previamente se detectaron 3 bandas de CP4 EPSPS de diferente masa molecular. C1, C2, C3 y C4 son los controles positivos e indican respectivamente, carboxipeptidasa, transferina, fetuina y asialofetuina.

En ninguna de las prueba mostradas en la figura 24, se detectó glicosilación en la muestra proveniente de EPC, carriles marcados en dicha figura como SFL, lo que indica que las diferencias de masa molecular en las bandas identificadas en la prueba de quimioluminiscencia, no se debe a heterogeneidad causada por glicosilaciones no esperadas de la proteína CP4 EPSPS. En el caso de la soya no transgénica (SC en figura 24), se observó, como se esperaba, reacción positiva en la prueba de detección de oligómeros de manosa.

Las bandas encontradas en las fracciones de soya SFL, son de mayor masa molecular que las proteínas de fusión predichas por Rang (2005) (ver tabla VI en la sección introducción). Las diferencias en el peso podrían deberse a que las secuencias de cDNA estudiadas por Rang, abarcan sólo una parte de la secuencia de 250 pb repetida, pues los primers usados para la detección y secuenciación de los transcritos, no amplifican todo el fragmento repetido, por lo que, para obtener las secuencias de las proteínas de fusión presentadas en dicho trabajo, se usó un análisis informático en el que se predijo un probable marco de lectura. En cambio, en este trabajo se presentan resultados de proteínas aisladas de granos de soya, es decir que son resultado de la transcripción y traducción *in vivo*.

Para caracterizar las proteínas encontradas en este trabajo y conocer cuáles son las diferencias entre éstas y las predichas por Rang, es necesario aislar y/o purificar una mayor cantidad de ellas, esto con el fin de secuenciarlas y obtener información acerca de su extremo carboxilo terminal, en el que se esperaría, de acuerdo con Rang, encontrar las diferencias que causarían la heterogeneidad en los valores de masa moleculares.

## CONCLUSIONES

En la muestra de soya SFL se identificaron tres bandas de masas moleculares de 47, 58 y 63 kDa CP4 EPSPS, positivas a reacción inmunológica anti-CP4EPSPS usando anticuerpos monoclonales.

En este trabajo se lograron identificar sólo tres de las cuatro posibles proteínas diferentes predichas por Rang en 2005. Esto podría deberse a que las presentadas aquí son las expresadas en granos, mientras que las predichas se caracterizaron por análisis informático.

Para conocer de forma contundente la naturaleza de las tres bandas de proteína encontradas en este trabajo, es necesario purificar una mayor cantidad de éstas y obtener la secuencia de aminoácidos.

Aún cuando el origen de dichas proteínas no se conoce de manera exacta, es importante el hecho de que no habían sido reportadas en la soya Roundup Ready®. Su presencia, hace evidente la necesidad de hacer las evaluaciones de efectos sobre la salud del consumidor final aislando la proteína directamente del organismo en el que se expresa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abud S., de Souza P.I.M., Vianna G.R., Leonardez E., Moreira C.T., Faleiro F.G., Júnior J.N., Monteiro P.M.F.O., Rech E.L., Aragão F.J.L. "Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil". *Genet. Mol. Res.* Vol. 6 (2): pp 445-452 (2007).
2. Benachour N., Seralini G. E. "Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells". *Chem. Res. Toxicol.* Vol. 22 (1): pp 97-105. (2009).
3. Bollag D.M., Rozycki M. D., Edelman S.J. "Protein methods". Editorial Wiley-Liss. Segunda edición, USA (1996).
4. Coggins J.R. and Boocock M. "Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate" *FEBS letters*, Vol. 154 (1): pp 127,133 (1983).
5. Della-Cioppa, Bauer S.C., Klein B.K., Shah D.M., Fraley R.T., Kishore G.M. "Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83 (18): pp. 6873-6877 (1986).
6. Doo Hyun Nam *et al.*, "The 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of glyphosate tolerant soybean expressed in *Escherichia coli* shows no severe allergenicity" *Mol. Cells* Vol 15 (1) : pp 20-26 (2002).
7. Duke S. O., Powles S. B. "Glyphosate: a once-in-a-century herbicide" *Pest Manag Sci* 64 (4) pp :319-325 (2008).
8. Duncan K., Lewendon A, Coggins J.R. "The purification of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from an overproducing strain of *Escherichia coli*". *FEBS* Vol. 165 (1): pp 121-127 (1984).
9. Fong, Carmen. "Identificación y caracterización de la proteína heteróloga Roundup Ready® en fracciones proteínicas de soja" Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM (2010).
10. Forlani G., Parisi B. and Nielsen E. "5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from *Zea mays* cultured cells". *Plant Physiol.* 103: 1107-1114 (1994).
11. Forlani, G.; Campani, A. "A dimeric 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from the cyanobacterium *Spirulina platensis*" *New Phytol.* Vol. 151 (2): 443-450 (2001).
12. Foti N. "Quantitative detection of Roundup Ready® soybean by real time PCR". The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms Session 11. Institute for health and consumer protection. European Commission, Joint Research.
13. Funke T., Han H., Healy-Fried M.L., Fischer M. and Ernst Schönbrunn "Molecular bases for the herbicide resistance of Roundup Ready® crops" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 103 (35): pp 13010-13015 (2006).
14. Gallagher S., Winston S.E., Fuller S.A., Hurrell J. "Immunoblotting and Immunodetection" *Current Protocols in Molecular Biology*, pp 10.8.1-10.8.28 (2008).
15. Gasnier C., Dumont C., Benachour N., Clair E., Chagnon M.C. "Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines" *Toxicol.* Vol 262 (3): pp 184-191 (2009).
16. Heldt H.W. "Plant biochemistry" Elsevier Academic Press. Burlington USA. 3ª Edición, 2005.
17. Herald T.J., Riblett A. L., Schmidt K.A. and Tilley K.A. "Characterization of  $\beta$ -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes" *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49 (10) : pp 4983-4989 (2001).

18. Herrmann K.M. and Weaver L.M. "The shikimate pathway". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 50 : pp 473-503 (1999).
19. Hsu-Yang Lin, Hsiu-An Weil, Fu-Pang Lin and Daniel Yang-Chih Shih. "Study of PCR Detection Methods for Genetically Modified Soybeans with Reference Molecules". *J. Food and Drug Analysis* Vol. 14 (2): pp 194-202 (2006).
20. James, C. "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008". ISAAA Briefs No. 36. ISAAA: Ithaca, NY. (2009).
21. Jennings J. C. *et al.* " Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready® soybean meal". *J. Anim. Sci.* Vol. 81 (6) : pp 1447-1455 (2003).
22. Kleinert P., Kuster T., Arnold D., Jaeken J., Heizmann C.W., Toxler H. " Effect of glycosilation on protein pattern in 2-D electrophoresis" *Proteomics* Vol. 7: pp 15-22 (2007).
23. Koji Kasai, Takuya Kanno, Mitruru Akita, Yasuko Ikejiri-Kanno, Kyo Wakasa, Yuzuru Tozawa. "Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins" . *Planta* Vol. 222 (3): pp 438-447 (2005).
24. McCann M, Keshun Liu, Trujillo W., Doberst R. "Glyphosate-tolerant soybeans remain compositionally equivalent to conventional soybeans (*Glycine max* L.) during three years of field testing". *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53 (13) : pp 5331-5335. (2005).
25. Monsanto company. "Updated molecular characterization and safety assessment of Roundup Ready® soybean event 40-3-2" (2000).
26. Monsanto comments on Windels *et al.* (2001) publication regarding Roundup Ready® soybeans August 16 (2001).
27. Maruyama N., Katsube T., Wada Y., Oh M.H., Barba De La Rosa P., Okuda E., Nakagawa S., Utsumi S. "The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean  $\beta$ -conglycinin folding, assembly and structural features" *Eur. J. Biochem.* Vol. 258 (2): pp 854-862 (1998).
28. Natarajan S.S., Xu C., Bae H., Caperna T.J. and Garrett W.M. "Characterization of storage proteins in Wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis" *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54 (8): pp 3114-3120 (2006).
29. Nandakumar, M. P., Jie Shen, Babu Raman, Marten, Mark R." Solubilization of Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitated Microbial Proteins via NaOH for Two-Dimensional Electrophoresis" *J. Proteome Res.* Vol. 2 (1): pp 89-93 (2003).
30. Nicholson D.E. "Metabolic Pathways" Sigma Aldrich 2003.
31. Padgett *et al.* "Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line" *Crop Sci.* Vol. 35 (5) : pp 1451-1461 (1995).
32. Padgett *et al.* " The expressed protein in glyphosate tolerant soybean 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4 is Rapidly Digested In Vitro and is Not Toxic to Acutely Gavigated Mice" *J. of Nutrition* Vol.126 (3): pp. 728 (1996).
33. Pipke R., Amrheint N. "Degradation of the Phosphonate Herbicide Glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752" *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54 (5): pp 1293-1296 (1988).
34. Rang E., Linke B. and Jansen B. "Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready® soybean" *Eur. Food Res. Technol.* Vol. 220 : 438-443 (2005).
35. Ream J. E., Steinrücken H.C, Porter C.A. and Sikorski J.A. "Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of *Sorghum bicolor*". *Plant Physiol.* Vol. 87(1): pp 232-238 (1988).
36. Reinbothe C., Orthel B., Partier B. and Reinbothe S. "Cytosolic and plastid forms of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Euglena gracilis* are differentially

- expressed during light-induced chloroplast development". *Mol. Gen. Genet* Vol. 245 (5): pp 616-22 (1994).
37. Roda A., Mirasoli M., Guardigli M., Michelini E., Simoni P., Magliulo M. "Development and validation of a sensitive and fast chemiluminescent enzyme immunoassay for the detection of genetically modified maize" *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 384 (6): 1269-1275 (2006).
  38. Sandermann H. "Plant biotechnology: ecological case studies on herbicidal resistance". *Trends in Plant Science* Vol. 11 (7): pp 324-328. (2006).
  39. Sathe S.K., Sharma S.M., Kshirsagar H.H., Su M., and Roux K.H. "Effects of Long-Term Frozen Storage on Electrophoretic Patterns, Immunoreactivity, and Pepsin *in Vitro* Digestibility of Soybean (*Glycine max* L.) Proteins" *J. Agric. Chem.* Vol. 57(4): pp 1312-1318 (2009).
  40. Simpson R.J. "Purifying proteins for proteomics: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA (2004).
  41. Steinberg TH, Pretty On Top K, Berggren KN, Kemper C, Jones L, Diwu Z, et al. "Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots". *Proteomics* Vol. 1 (7): pp 841-55 (2001).
  42. Theologis *et al.* "Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*" *Nature* Vol. 408: pp 816-820 (2000).
  43. Weaver L.M. and Herrmann K.M. "Dynamics of the shikimate pathway in plants". *Trends in plant science.* Vol. 2 (9): pp. 346-35 (1997).
  44. Windels P., Tavewrniers I., Depicker A., Van Bockstaele E., De Loose M. "Characterisation of the Roundup Ready® soybean insert". *Eur. Food Res. Technol.* Vol. 213 (2): pp 107-112 (2001).
  45. Yan J.X., Packer N. H., Gooley A. A., Williams K. L. "Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids" *Journal of Chromatography A.* Vol 808 (1): pp 32-41 (1998).
  46. Ying Chen *et al.* "Degradation of endogenous and exogenous genes of Roundup-Ready® soybean during food processing". *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53 (26): pp 10239-10243 (2005).