

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HETERÓLOGA CP4EPSPS PRESENTE EN UNA MEZCLA DE GRANOS DE SOYA.

Mirna González-Martínez, Amanda Gálvez-Mariscal. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química UNAM. Edificio E. Lab. 312. Circuito de la investigación científica s/n. Ciudad universitaria. México D.F. C.P. 04510. Tel. 56225305. Fax 56225309. Correo electrónico: galvez@unam.mx

Palabras clave: soya, CP4EPSPS, purificación

Introducción. La soya transgénica Roundup Ready™, producida por la compañía Monsanto, es resistente al herbicida glifosato debido a la expresión de la enzima de origen bacteriano, CP4EPSPS (E.C. 2.5.1.19), la cual es insensible a este. Los estudios de evaluación de calidad nutricional y riesgos como alergenicidad y posible flujo de genes a otras especies de plantas, estudian preferentemente a la proteína CP4EPSPS expresada en *Escherichia coli* (Doo Hyun Nam, 2002). Para la soya Roundup Ready™, se ha reportado la detección de 4 secuencias de mRNA que codifican para la proteína CP4 EPSPS, las cuales son transcritas a partir del gen *cp4epsps* (Rang, 2005), cuyos pesos moleculares teóricos son de entre 55.3 y 56.8 kDa. Adicionalmente, en el perfil electroforético en SDS-PAGE de extractos protéicos de una muestra comercial de granos de soya, se han detectado 4 bandas, con pesos moleculares de entre 45 y 60 kDa, las cuales son positivas en una prueba de ELISA específica para CP4EPSPS (Fong, 2008).

Tomando en consideración lo anterior, en este trabajo se realizó la purificación de las proteínas heterólogas que posiblemente se expresan en la soya transgénica Roundup Ready™.

Metodología. 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 usando PCR punto final la presencia del gen *cp4epsps*. Mediante precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de diálisis (MWCO 12-14 kDa), y ultrafiltración (30 kDa), se obtuvo una fracción de proteínas a la que se aplicó electroforesis preparativa continua (EPC) usando un equipo Prep Cell 409 (Bio-Rad 170-2989). La proteína heteróloga se detectó en cada uno de los pasos descritos usando una prueba de ELISA específica para la misma (Agdia PSP 74000).

Resultados y discusión. El extracto de proteínas solubles se sometió a precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la fracción obtenida al 40% de saturación se dializó y ultrafiltró. La fracción obtenida se corrió en EPC. Se seleccionaron las fracciones que en SDS-PAGE (Figura 1), mostraron la presencia de bandas con peso molecular dentro del intervalo de interés (45-60kDa).

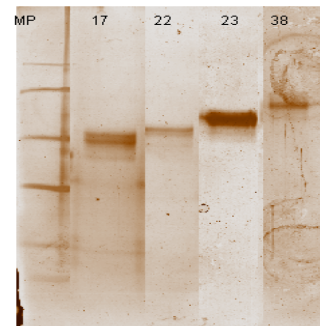


Figura 1. Perfil proteínas en SDS-PAGE 12% teñido con plata de las fracciones obtenidas en EPC con peso molecular de 45-60 kDa (17, 22, 23 y 38).

Estas fracciones fueron diafiltradas y concentradas en una celda AMICON (10 kDa) usando buffer PBS pH 7.4. Se analizaron con un kit de ELISA específico para CP4EPSPS, los resultados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados de la prueba de ELISA para las fracciones seleccionadas.

Fracción	Peso molecular	Abs _{595nm}
17	46.06, 43.74	0.230
22	48.42	0.087
23	51.56	0.278
38	59.75	0.06

Se probó el límite de detección del kit de ELISA usando diluciones del control positivo, y se determinó que las fracciones 17, 22, 23 son positivas.

Conclusiones. Se logró la obtención de 3 fracciones, cada una con 1 proteína de diferente peso molecular. Inmunológicamente se detectó que las 3 corresponden a la proteína CP4EPSPS. Sin embargo, estas deben ser sometidas a secuenciación para corroborar su identidad y establecer las diferencias que existen entre ellas.

Agradecimientos. Proyecto PAIP 5490-05 de FQ-UNAM otorgado a la Dra. Amanda Gálvez Mariscal.

Bibliografía.

Doo Hyun Nam *et al.*, *Mol. Cells* Vol 15 (1) pp 20-26 (2002).
Fong C. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas.FQ-UNAM(2008).
Rang E., Linke B. and Jansen B. *Eur. Food Res. Technol.* (2005), 220: 438-443.