



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HETERÓLOGA Roundup Ready® EN FRACCIONES DE SOYA TRANSGÉNICA

Ma. del Carmen Fong, Roberto Arreguín, Ana María Calderón y Amanda Gálvez. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. Circuito de la Investigación Científica s/n Ciudad Universitaria. México, D.F. 04510. Fax: 5622-5209. galvez@servidor.unam.mx

Palabras clave: Organismo Genéticamente Modificado OGM, Roundup Ready®, 5-enolpiruvylshikimato-3-fosfato sintasa EPSPS

Introducción. La soya Roundup Ready® (RR) sobreexpresa la enzima 5-enolpiruvylshikimato-3-fosfato sintasa EPSPS (~46KDa), que confiere tolerancia al herbicida glifosato (Roundup®). Existe la necesidad de profundizar en la bioquímica del comportamiento de la proteína heteróloga, sus funciones y sus efectos en los animales alimentados con ellas. El presente proyecto pretende caracterizar la(s) fracción(es) de la soya RR en las que se encuentre la proteína heteróloga, localizarla en dicha(s) fracción(es), purificarla e identificarla plenamente. Con esta información podrá generarse un aislado proteínico enriquecido en la proteína heteróloga, de forma que pueda garantizarse que, en los estudios de alimentación con animales de laboratorio, los posibles cambios observados en su histología sean debidos al consumo de la proteína heteróloga, en comparación con un aislado de las mismas fracciones pero obtenido a partir de harina de soya no-GM.

Metodología. Estrategia experimental de la purificación:

Caracterización de la muestra de soya RR
PCR y RTQ-PCR

↓

Extracción de proteína
en amortiguador fosfato salino (PBS)

↓

Isoelectroenfoque preparativo

↓

ELISA para proteína RR

↓

Cromatografía de Intercambio aniónico
Columnas Q y DEAE

↓

Espectrometría de Masas

Resultados y Discusión.

En experimentos preliminares de la purificación, se realizó un gel SDS-PAGE y se cortaron las bandas aledañas a la proteína de 46KDa (proteína de interés) indicadas por las flechas. Se analizaron mediante ELISA y las cuatro presentaron señal positiva. Rang, en 2005, reportó la existencia de cuatro mensajeros producto de la transcripción de la secuencia situada después del terminador. Esto apoya la posibilidad de que se exprese en la planta, no sólo una proteína, sino cuatro.

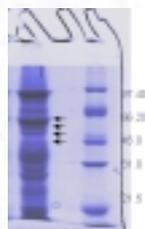


Fig.1 SDS-PAGE
A partir de extracto
proteínico de soya

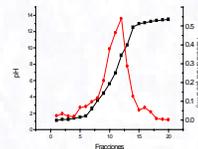


Fig.2 Isoelectroenfoque
Preparativo

A partir de una muestra de soya GM, se obtuvo el extracto proteínico y se realizó el isoelectroenfoque. Se obtuvieron 20 fracciones de las cuales, de la 7 a la 14 presentan señal positiva en ELISA. La fracción 9, se corrió en la columna de DEAE. Y posteriormente en la Q.

SDS-PAGE al 10%, teñido con plata, muestra la proteína separada después de las columnas de intercambio aniónico. Por densitometría se determinó un PM ~43.21KDa. Por espectrometría de masas, se evidenciaron más bandas, dando pie a la existencia de distintas isoformas o bien las proteínas de fusión antes mencionadas.

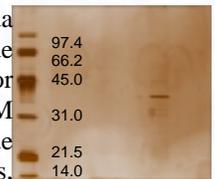


Fig. 3 Gel
posterior a la
purificación

Conclusiones.

Se purificó una proteína de 43.21KDa, corroborando por ELISA que se trata de la proteína buscada. De este trabajo experimental se concluye que pueden existir por lo menos cuatro péptidos heterólogos, ya que por ELISA, las cuatro bandas presentan señal positiva. Además que el trabajo reportado por Rang (1) demuestra la existencia de cuatro mRNAs, obtenidos a partir del salto del codón de término que realiza la polimerasa, sintetizándose parte del fragmento de menor tamaño que también se encuentra en la construcción de este evento, dando pie a la existencia de proteínas de fusión.

Agradecimientos

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por el préstamo del lector de placas de ELISA.
M. en C. Carmen Gómez por la realización de la espectroscopia de Masas.
Proyecto CONACYT-CIAD Soya GM. AM Calderón.

Bibliografía.

Rang, A., Linke, B. and Jansen, B. 2005. Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Round up Ready soybean. *Eur Food Res Technol.* 220: 438 – 443.