



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## DETECCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS CP4EPSPS DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES PRESENTES EN UNA MEZCLA DE GRANOS DE SOYA.

Mirna González<sup>1</sup>, Rosario López<sup>2</sup>, Ana Calderón<sup>3</sup> y Amanda Gálvez<sup>1</sup>. Depto. Alimentos y Biotecnología. Fac. Química, UNAM. Conjunto "E". Circuito de la Investigación Científica, s/n. Cd. Universitaria. México DF 04510<sup>1</sup>, Departamento de Patología Experimental Facultad de Medicina UNAM<sup>2</sup>, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo Sonora<sup>3</sup>. Correo electrónico: [galvez@unam.mx](mailto:galvez@unam.mx)

*Palabras clave:* Roundup Ready®, CP4EPSPS, Soya RR

**Introducción.** La soya Roundup Ready® (RR) está diseñada para expresar la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato-sintasa (CP4-EPSPS) de *Agrobacterium tumefaciens*, la cual tiene un peso molecular (PM) de 47.6 kDa. Esta enzima es resistente a la inhibición del herbicida glifosato (N-(fosfometil) glicina), con lo que las plantas sobreviven a su aplicación. Se ha reportado la detección de 4 secuencias de mRNA que codifican para la proteína CP4 EPSPS, las cuales son transcritas a partir del trasngén insertado *cp4epsps* (1). Adicionalmente, en extractos proteínicos de una muestra comercial de granos de soya, se detectaron 4 proteínas, con pesos moleculares de entre 45 y 60 kDa, las cuales son positivas en una prueba de ELISA específica para CP4EPSPS (2). 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®.

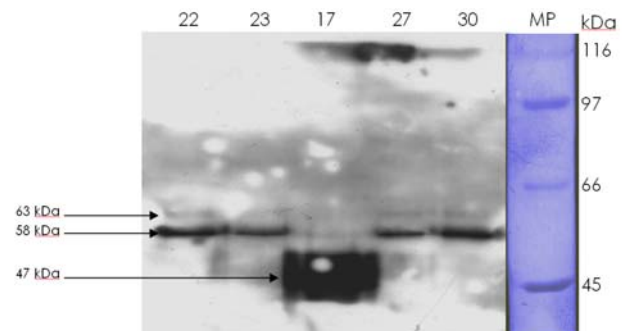
**Metodología.** Se preparó una harina a partir de una muestra de granos de soya en la que previamente se detectó la presencia del gen *cp4epsps* por PCR punto final. Se extrajeron las proteínas solubles con PBS pH 7.4. Este extracto se sometió a precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la fracción obtenida al 40% de saturación se dializó y ultrafiltró, para después someterla a electroforesis preparativa continua (EPC). Usando SDS-PAGE se seleccionaron las fracciones que mostraron bandas con peso molecular en el intervalo de 45 a 60kDa. Estas fracciones se analizaron con un kit de DAS-ELISA específico para CP4EPSPS (Agdia Inc.). Las fracciones positivas se transfirieron a membranas de PVDF (Perkin Elmer), para la detección se usaron anticuerpos específicos para la proteína CP4 EPSPS donados por la compañía Agdia Inc. (Indiana, USA). Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia usando el sistema biotina-peroxidasa. Se aplicó el mismo procedimiento a una muestra blanco de granos de soya en la que no había presencia del trasngén *cp4epsps*.

**Resultados.** Después de la EPC, se obtuvieron varias fracciones positivas en la prueba de ELISA. En ellas, se observaron en SDS-PAGE bandas de diferente peso molecular, estos resultados se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Fracciones de EPC. Se muestran los pesos moleculares de las bandas y la absorbancia DAS-ELISA.

Fracción	Peso molecular (kDa)	Abs <sub>595nm</sub>
17	46.06, 43.74	0.230
22	48.42	0.087
23	51.56	0.278
27	52.49, 54.78	0.001
30	52.85, 55.24, 59.40	0.001

Estas fracciones se sometieron a detección en Western blot, con el fin de determinar cuál de dichas bandas era la responsable de la señal positiva. En la figura 1 se muestra el resultado.



**Fig. 1.** Detección en Western blot. El número de los carriles corresponde a las fracciones de la Tabla 1. Las flechas señalan las bandas detectadas y sus pesos moleculares.

En una prueba de glicosilación (resultado no mostrado) se determinó que la diferencia de PM no se debe a glicosilaciones. En las pruebas aplicadas al control se tuvieron resultados negativos en todos los casos.

**Conclusiones.** Se detectaron tres bandas de pesos moleculares diferentes, positivas a reacción inmunológica anti-CP4EPSPS con anticuerpos monoclonales, cuando se esperaba una sola proteína a partir del trasngén. Para conocer de forma contundente la naturaleza de las tres bandas de proteína encontradas en este trabajo, es necesario purificar una mayor cantidad y obtener sus secuencias de aminoácidos.

**Agradecimientos.** Proyecto PAIP 5490-05 de FQ-UNAM.

**Bibliografía.** 1. Rang E., Linke B. and Jansen B. *Eur. Food Res. Technol.* (2005), 220: 438-443.  
2. Fong C. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. FQ-UNAM (2008).