

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 819**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07743162 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2019136**

54 Título: **Método para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno y método para determinar el índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo**

30 Prioridad:

15.05.2006 JP 2006135835

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.04.2014

73 Titular/es:

**NISSHIN SEIFUN GROUP INC. (100.0%)
25, KANDA-NISHIKI-CHO 1-CHOME CHIYODA-KU
TOKYO 101-8441, JP**

72 Inventor/es:

**IMAI, SHINJIRO y
TANAKA, KEIKO**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 452 819 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno y método para determinar el índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo

- 5 **[0001]** La presente invención hace referencia a un método para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo, y más concretamente, a un método para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno que ha de usarse cuando se determine el índice de contaminación del trigo modificado genéticamente contenido en un material alimentario o alimentos procesados.
- 10 **[0002]** En Japón, más de 50 variedades de cultivos modificados genéticamente (de aquí en adelante “organismo modificado genéticamente” u “OMG”), entre los que se incluyen maíz, soja y patatas, han experimentado la valoración de seguridad y se han aprobado para importación y venta. En consecuencia, un producto alimentario que contiene un OMG debe etiquetarse de acuerdo con las “Normas de etiquetado para alimentos modificados genéticamente publicadas por el Ministerio de agricultura, bosques y pesca que se establecieron de acuerdo con el artículo 7, párrafo 1 de las Normas de calidad de etiquetado para alimentos procesados y el artículo 7, párrafo 1 de las “Normas de calidad de etiquetado para alimentos frescos” (notificación nº 517 del Ministerio de agricultura, bosques y pesca, 31 de marzo de 2000), y la “Aplicación de la ordenanza ministerial que corrige en parte la ordenanza ministerial sobre la aplicación de la ley de sanidad alimentaria, reglamentos y patrones composicionales, etc. para leche y productos lácteos” (Notificación nº 79 del Departamento de sanidad alimentaria, Oficina de seguridad médica y farmacéutica, Ministerio de sanidad, trabajo y bienestar, 15 de marzo de 2001).
- 15 **[0003]** Sin embargo, en países extranjeros, los cultivos OMG pueden cultivarse en algunos casos conjuntamente con cultivos no OMG una vez se ha completado la evaluación de seguridad y puede aparecer contaminación después de la recolección durante el proceso de distribución. Los fabricantes de productos alimentarios y similares a menudo subcontratan la fabricación de alimentos procesados en plantas de fabricación, y aunque el contrato pueda estipular que debe usarse un material no OMG, pequeñas cantidades de un OMG pueden contaminar los alimentos procesados si también se usa un OMG en la misma planta. En consecuencia, para cumplir las obligaciones de etiquetado, los fabricantes de productos alimentarios deben examinar y analizar los productos alimentarios procesados finales para verificar que no están contaminados con un OMG.
- 20 **[0004]** Los métodos para detectar un OMG en una muestra de ensayo de un alimento procesado, la materia prima del mismo, etc. incluyen la detección de ADN recombinante por la reacción en cadena de la polimerasa (de aquí en adelante “PCR”) y la detección de una proteína recombinante por ELISA. Sin embargo, en el caso de alimentos procesados, las proteínas a menudo se han desnaturalizado por el calor y la presión y no pueden detectarse con exactitud por ELISA. Por lo tanto, normalmente se emplea la detección por PCR.
- 25 **[0005]** Los métodos de análisis de laboratorio incluyen los métodos descritos en el Manual de análisis analítico según la norma agrícola japonesa (JAS Analytical Test Handbook), “Genetically Modified Food Test and Analysis Manual for Individual Products”, segunda edición revisada (Documento que no es una patente 1) y los descritos en “Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques” (revisado parcialmente) (Notificación nº 0618002 del Departamento de sanidad alimentaria, Ministerio de salud, trabajo y bienestar, 18 de junio de 2003). Estos documentos describen que, en el ensayo y análisis de un OMG, es necesario efectuar la PCR usando un par de cebadores que reconozca el ADN endógeno de cada producto agrícola y verificar que se obtiene un producto de PCR de la longitud esperada, para verificar que el ADN extraído de la muestra de ensayo puede amplificarse mediante PCR. Cuando se cuantifica un OMG contenido en una muestra de ensayo, se usa el método de medir el índice de contaminación del cultivo modificado basándose en la ratio de ADN recombinante y ADN endógeno que está siempre presente en ese cultivo.
- 30 **[0006]** En el caso del maíz, por ejemplo, se han desarrollado pares de cebadores que reconocen cada una de las 5 cepas de variedades de OMG aprobadas, junto con un par de cebadores que reconoce la región génica SSIB como ADN de maíz endógeno (Documento que no es una patente 1).
- 35 **[0007]** En “Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques (revisado parcialmente)” (notificación nº 1113001 del Departamento de sanidad alimentaria, Ministerio de salud, trabajo y bienestar, 13 de noviembre de 2003), durante el proceso de ejecución de la PCR cuantitativa, los productos de amplificación amplificados por pares de cebadores específicos dirigidos a ADN endógeno y a ADN recombinante de maíz o soja están ligados a un plásmido y se usan como material de referencia estándar. Al llevar a cabo la PCR utilizando este material de referencia estándar, la ratio del número de copias de ADN recombinante y el número de copias de ADN endógeno puede determinarse de forma exacta en una muestra de ensayo mediante PCR cuantitativa de tiempo fijo.
- 40 **[0008]** Cuando existe una pluralidad de cepas de OMG, como en el caso del maíz, es una técnica particularmente útil usar un material de referencia estándar común para medir el índice de contaminación de
- 45
- 50
- 55

cada cepa, lo cual puede realizarse usando un material de referencia estándar que tiene ADN endógeno y ADN específico de cada cepa incorporado a una sola molécula de ADN circular.

5 **[0009]** Es generalmente difícil obtener genes específicos de cada cepa, pero una vez se ha preparado el ADN replicable que incorpora estos genes, se puede proporcionar de forma estable ADN específico de la cepa mediante la replicación del mismo.

[0010] Aunque ningún producto modificado genéticamente de trigo común ha pasado todavía la valoración de seguridad, se espera que aparezcan en el mercado en el futuro próximo. En consecuencia, tienen que desarrollarse métodos para detectar y cuantificar ADN de trigo endógeno y pares de cebadores de PCR para usarse en dichos métodos con el fin de prepararse para la distribución de trigo OMG.

10 **[0011]** Las formas de los genes encontrados en trigo presentan diversas variaciones comparados con otros granos. Esto se debe a que los genotipos diploides, tetraploides y hexaploides aparecen dependiendo de la variedad del trigo. Por ejemplo, el trigo común general es hexaploide (AA, BB, DD) y aunque cada uno de los genes es similar, se encuentran diferencias parciales debido a la translocación y similares. Por otro lado, el trigo duro es tetraploide y no contiene DD genómico.

15 **[0012]** En términos de su estructura genómica y la secuencia nucleotídica de sus genes codificados, el trigo comparte un alto grado de homología con otros granos de cereales tales como cebada, centeno y avena. Estos granos tienen un alto nivel de homología con el trigo común y, por lo tanto, la posibilidad de una falsa detección es alta.

20 **[0013]** Bajo estas circunstancias, ha sido difícil encontrar en el trigo una secuencia de ADN que cumpla las siguientes cuatro condiciones: a) está presente universalmente en las variedades de trigo; b) la cantidad presente (cantidad detectada) no se verá afectada dependiendo de la variedad de trigo; c) incluso aunque existan otros granos, solo se detectará el trigo sin reactividad cruzada y d) se amplificará de forma cuantitativa mediante la reacción PCR.

25 **[0014]** WO 2005/097989 (Documento de patente 1) revela que una secuencia parcial del gen Waxy (véase el documento que no es una patente 2), etc., puede usarse como ADN de trigo endógeno que cumple tales condiciones.

Documento de patente 1: WO 2005/097989

Documento que no es una patente 1: JAS Analytical Test Handbook, "Genetically Modified Food Test and Analysis Manual for Individual Products, Segunda edición revisada"

30 Documento que no es una patente 2: Ainsworth C, *et al.*, *Plant Mol Biol.* 1993 abril;22(1):67-82

Divulgación de la invención

35 **[0015]** Sin embargo, el trigo céreo, un mutante que carece del gen Waxy ya se conoce y en muestras de ensayo que contienen trigo céreo es imposible analizar el ADN de trigo endógeno de forma exacta detectando la secuencia parcial del gen Waxy expuesto en el documento de patente 1. Además, puesto que se cree que el gen Waxy está presente en el genoma D del trigo, no estará presente en el genoma de trigo duro, que carece del genoma D. Por lo tanto, aunque el método expuesto en el documento de patente 1 es útil cuando el objetivo es distinguir entre trigo duro y trigo común, existen muchos casos en los que es necesaria la detección de un total de trigo duro y trigo común como la detección de "trigo" y, bajo esas circunstancias, una secuencia de ADN de trigo duro endógeno debe descubrirse, detectarse y cuantificarse por separado.

40 **[0016]** Por lo tanto, un objeto de la presente invención es descubrir una secuencia de trigo endógeno adicional que cumpla las condiciones de a) a d) anteriores y un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para detectar o cuantificar de forma exacta ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

45 **[0017]** Los inventores llevaron a cabo una laboriosa investigación para resolver el problema anterior y descubrieron que una región parcial del gen de la proteína rica en prolina (PRP) (C. A. Raines, *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 16: 663-670, 1991) en el ADN genómico de trigo está presente universalmente en todas las variedades de trigo y no presenta una reacción cruzada con otras plantas en reacciones PCR y que es posible detectar y cuantificar de forma específica una secuencia de ADN de trigo endógeno amplificando esa región, por consiguiente se completó la presente invención.

50 **[0018]** Más concretamente, la presente invención hace referencia a:

(1) Un método para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, método que comprende: usar una molécula de ácido nucleico en la muestra o una molécula de ácido nucleico extraída de la muestra como molde para amplificar de forma

específica la molécula de ácido nucleico de una región que consiste en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma, en la que la secuencia parcial de la misma presenta al menos 80 bases de largo, con un par de cebadores capaz de amplificar esa región y detectar o cuantificar la molécula de ácido nucleico amplificada;

5 (2) Método según el punto (1) anterior, en el que la región que consiste en la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 es una región consistente en cualquiera de las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOs: 11 a 18;

10 (3) Método según el punto (1) anterior, en el que el par de cebadores mencionado anteriormente es un par de cebadores elegidos de un grupo que consiste en: (i) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4; (ii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4; (iii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6; (iv) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6; (v) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7; (vi) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 8; (vii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 8; (viii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7; (ix) un par de cebadores consistente en un par de moléculas de ácido nucleico donde cada molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos en común con al menos un 80 % de secuencia de nucleótidos continua de cada molécula de ácido nucleico en los pares de cebadores (i) a (viii) anteriores;

20 (4) Método según cualquiera de los puntos (1) al (3) anteriores, en el que cada cebador en el par de cebadores es una molécula de ácido nucleico que presenta de 15 a 40 bases de largo;

25 (5) Método según cualquiera de los puntos (1) al (4) anteriores, en el que la región amplificada en la reacción en cadena de la polimerasa anterior se detecta usando una sonda identificada como SEQ ID NO: 9 o 10;

30 (6) Un kit para detectar o cuantificar una secuencia de ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, que contiene al menos un par de cebadores de los pares de cebadores según el punto (3) anterior;

35 (7) Un vector de ADN que comprende: una secuencia de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma como ADN endógeno común tanto para trigo modificado genéticamente como para trigo no modificado genéticamente y una o más secuencias de ADN que comprenden secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente;

40 (8) Un vector de ADN que comprende: una secuencia de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que presenta al menos un 80 % de homología con el ADN consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma como ADN endógeno común tanto para trigo modificado genéticamente como para trigo no modificado genéticamente y una o más secuencias de ADN que consisten en secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente;

45 (9) El vector de ADN según los puntos (7) u (8) anteriores, en el que el ADN consistente en la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 es ADN consistente en cualquiera de las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOs: 11 a 18;

50 (10) Un vector de ADN que comprende: ADN consistente en una secuencia capaz de ser amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cualquiera de los pares de cebadores según el punto (3) anterior como ADN endógeno común tanto para trigo modificado genéticamente como para trigo no modificado genéticamente y una o más secuencias de ADN que consisten en secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente;

55 (11) Un método para determinar un índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo, método que comprende: una etapa que consiste en preparar dos o más tipos de series de diluciones de concentraciones de soluciones que contienen ADN según cualquiera de los puntos (7) al (10) anteriores, llevar a cabo reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas para cada uno, amplificar el ADN de trigo endógeno anterior y al menos un tipo del anterior ADN específico de trigo modificado genéticamente y determinar una curva de calibración para cada región parcial; una etapa que consiste en llevar a cabo, para la muestra de ensayo, una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa bajo las

65

5 mismas condiciones que en la etapa anterior para la determinación de las curvas de calibración y determinar el número de las anteriores moléculas de ADN de trigo endógeno y el número de las anteriores moléculas de ADN específico de trigo modificado genéticamente presentes en la muestra de ensayo usando la curva de calibración anterior; y donde la amplificación del anterior ADN de trigo endógeno se lleva a cabo usando al menos un par de cebadores elegido de los pares de cebadores según el punto (3) anterior y una etapa que consiste en determinar el índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en la muestra de ensayo mediante el cálculo de una fórmula $100 \times A/B$ usando: la ratio A obtenida al dividir el número de las anteriores moléculas de ADN específico de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de ADN de trigo endógeno presentes en la muestra de ensayo anterior y la ratio B obtenida al dividir el número de moléculas de ADN específico de cada cepa de trigo modificado genéticamente determinado al llevar a cabo reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas usando las semillas estándares de cada cepa de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de ADN de trigo endógeno. Efecto de la invención

15 **[0019]** Según la presente invención, se puede detectar y cuantificar de forma específica ADN de trigo endógeno sin reacción cruzada de otros cultivos en una muestra de ensayo tal como material alimentario, alimentos procesados y similares mediante amplificación por PCR de una región parcial del gen PRP.

20 **[0020]** Además, se puede determinar con buena precisión el índice de contaminación de cada cepa del OMG en una muestra de ensayo por PCR cuantitativa utilizando el material de referencia estándar para detectar trigo modificado genéticamente (de aquí en adelante, a veces denominado "trigo MG") proporcionado por el método de la presente memoria.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021]

25 La figura 1 muestra las regiones de unión en SEQ ID NO: 2 de los cebadores identificados como SEQ ID NOs: 3 a 8;
 La figura 2 muestra la curva de amplificación y las curvas de fusión cuando se realiza una PCR en tiempo real mediante el procedimiento SYBR usando el plásmido estándar pWIG03 como molde en las regiones amplificadas de los genes Waxy y PRP;
 La figura 3 muestra los resultados de cuando se realiza la PCR en tiempo real mediante el procedimiento SYBR usando ADN extraído de semillas de trigo como molde y usando los pares de cebadores de PRP01-F y PRP01-R, PRP03-F y PRP03-R y PRP03-F y PRP07-R mostrados en la tabla 10;
 30 La figura 4 muestra la eficacia de detección mediante PCR en tiempo real usando las combinaciones de los cebadores mostrados en la tabla 11;
 La figura 5 muestra los ejemplos de detección en 20 de 40 variedades de trigo en los que se detectó PRP03;
 La figura 6 muestra los resultados de cuando se determinó el índice de contaminación del trigo MG hipotético usando los resultados obtenidos cuando se extrajo ADN de una muestra en la que el trigo MG hipotético se mezcló de forma arbitraria con trigo pulverizado por separado (variedad Yecora Rojo) y usando este ADN como molde y siguiendo el método de la presente invención, se cuantificó el gen de trigo endógeno y el gen resistente a Roundup®; y
 35 La figura 7 muestra los resultados de la prueba de verificación para reactividad cruzada con otros cultivos llevada a cabo usando dos tipos de pares de cebadores, PRP03-F y PRP03-R y PRP03-F y PRP07-R, y PRP-Taq2 como sonda.
 40

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 **[0022]** A continuación, se definen los significados de los términos usados en la presente descripción y se describe con detalle la presente invención. En esta descripción, el término "trigo" hace referencia a trigo común, trigo duro y trigo céreo a menos que se indique lo contrario.

[0023] El método de la presente invención detecta una parte específica del gen PRP (nº de acceso GenBank X52472, SEQ ID NO: 1) en el genoma de trigo y, más concretamente, la región que consiste en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma, en la que la secuencia parcial de la misma presenta al menos 80 bases de largo, como la secuencia de ADN de trigo endógeno.

50 **[0024]** Cuando la región Wx012 expuesta en el documento de patente 1 y una pluralidad de regiones parciales del gen PRP se amplificaron mediante PCR, se halló que, en las diferentes variedades de trigo, la ratio del producto de amplificación de la región Wx012 y los productos de amplificación de las diferentes regiones del gen PRP varía entre 1:1 y 1:3. Puesto que se cree que las ratios distintas de 1:1 se deben a la presencia de más de dos regiones en el gen PRP que se amplifican mediante el mismo cebador, estas regiones no son adecuadas para usarse como la secuencia de trigo endógeno usada en la presente invención. Por lo tanto, los inventores siguieron con su investigación y hallaron que si se amplifica una región consistente en la secuencia de
 55

nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma (siempre que sea una región de 80 bases o más), ese producto de amplificación y el producto de amplificación Wx012 se obtienen con una ratio de 1:1.

5 **[0025]** Además, se verificó que la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma se detecta también en trigo duro. Por lo tanto, se puede suponer que el gen PRP está presente en el genoma de trigo A o B. Puesto que el trigo que actualmente se distribuye en el mercado incluye trigo común, trigo duro, trigo céreo, etc., como el gen de trigo endógeno que ha de detectarse, se prefiere que el gen esté presente de forma universal en estas variedades de trigo y la cantidad presente no varíe dependiendo de la variedad. A este respecto, como los genomas A y B deben estar ambos presentes en estas variedades de trigo, se prefiere la región consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 como un gen de trigo endógeno.

10 **[0026]** Por otro lado, se confirmó que existe un pseudogén que es extremadamente similar al gen PRP. Por lo tanto, en el proceso de amplificar el genoma de trigo en un alimento procesado, si se emplea un cebador que amplifique una secuencia parcial elegida aleatoriamente de toda la longitud del gen PRP, es posible que la secuencia parcial del pseudogén también se amplifique de forma simultánea. En otras palabras, se asume que dependiendo de la variedad de trigo, habrá casos en los que la cantidad de ADN amplificado por unidad de trigo será inconsistente. Sin embargo, los inventores han verificado que si se realiza la PCR usando un cebador que amplifica la región consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma, en la que la secuencia parcial de la misma presenta al menos 80 bases de largo, solo se amplificará esa región del gen PRP sin reactividad cruzada del pseudogén.

[0027] Además, la región consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 es un extremadamente corto de 330 pb en comparación con la longitud total del genoma y, por lo tanto, se puede detectar y cuantificar ADN de trigo endógeno a partir de una muestra de un alimento procesado, etc., en el que el ADN puede estar fragmentado.

25 **[0028]** La longitud de la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 es al menos de 80 bases. Se prefiere cualquiera de las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOs: 11 a 18. Estas secuencias pueden amplificarse con PCR mediante la combinación adecuada de cebadores consistentes en moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOs: 3 a 8.

30 La figura 1 muestra las regiones de unión de los cebadores identificados como SEQ ID NOs: 3 a 8 en SEQ ID NO: 2.

35 **[0029]** Al cambiar la longitud de la base de los cebadores identificados como SEQ ID NOs: 3 a 8 o mediante un ligero cambio de la región de unión del cebador, la secuencia amplificada se convierte en una región ligeramente desplazada de la región que comprende las secuencias de nucleótidos identificadas en SEQ ID NOs: 11 a 18, pero esas regiones están incluidas dentro de "la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2" en la presente invención. Un ejemplo de una región como tal es una región que presenta al menos un 80 % o más, y preferiblemente un 90 % o más, en común con las secuencias de nucleótidos identificadas en SEQ ID NOs: 3 a 8.

40 **[0030]** El par de cebadores usado en el método por PCR en la presente invención no está limitado especialmente siempre que un par de cebadores pueda amplificar una región consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma, y el par de cebadores puede diseñarse de acuerdo con la reglas básicas para la preparación de cebadores según la secuencia de nucleótidos de la región que ha de amplificarse. Durante ese proceso se debería tener en cuenta la unificación de los valores Tm de los cebadores. La longitud de cada cebador debería ser normalmente de 15 a 40 pb, y preferiblemente de 15 a 30 pb.

45 **[0031]** En el método de la presente invención, si el par de cebadores que se emplea tiene una reacción cruzada con un cultivo distinto de trigo, no solo surgirá la posibilidad de una detección falsa positiva de trigo, sino que también será imposible cuantificar de forma exacta la secuencia de ADN de trigo endógeno en la muestra de ensayo. El método de la presente invención proporciona información exacta sobre la presencia de trigo en una muestra de ensayo tal como material alimentario, alimentos procesados, etc., y la cantidad del mismo. Por lo tanto, el par de cebadores para la PCR usado en el método de la presente invención no debe tener una reacción cruzada con otros cultivos tales como arroz, cebada, centeno, avena, semilla de colza, maíz, panizo común, mijo común, alforfón, etc.

50 **[0032]** Entre los ejemplos de los pares de cebadores se incluyen (i) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4; (ii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos

identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4; (iii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6; (iv) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6; (v) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7; (vi) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 8; (vii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 8; (viii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7; (ix) un par de cebadores consistente en un par de moléculas de ácido nucleico donde cada molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos continua que presenta al menos un 80 % o más, preferiblemente un 90 % o más, y más preferiblemente un 85 %, en común con la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico en cada par de cebadores (i) a (viii) anteriores. Estos pares de cebadores pueden amplificar de forma específica una región que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma sin reacción cruzada con cultivos distintos de trigo.

[0033] En el método de la presente invención, la sonda para detectar la región que ha de amplificarse mediante PCR no está limitada especialmente siempre que pueda detectar el producto de amplificación de forma cuantitativa, pero se prefiere llevar a cabo la detección usando una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 9 o 10. Estas sondas se unen con alta especificidad al producto de amplificación, es decir, parte de la región consistente en cualquiera de las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOs: 11 a 18 y, por lo tanto, pueden detectar el producto de amplificación de forma cuantitativa. La figura 1 muestra la región a la que se unirá una sonda consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 9 o 10.

[0034] La muestra de ensayo usada en la presente invención es un material alimentario o alimento procesado que contiene o puede contener trigo y los ejemplos incluyen materiales alimentarios y materiales intermedios procesados de los mismos, tal como granos crudos de trigo, granos secos, harina de trigo, harina mixta y similares y alimentos procesados como pan, fideos y similares. El material alimentario o producto alimentario no solo incluye productos alimentarios para humanos, sino también comida para mascotas y pienso animal. Además, el término cultivos distinto de trigo hace referencia a todos los cultivos que pueden usarse como material alimentario o material alimentario crudo e incluyen, por ejemplo, los cultivos mencionados anteriormente.

[0035] Una muestra de ensayo puede someterse a la extracción de una molécula de ácido nucleico cuando se pulveriza o después o puede someterse a la extracción de una molécula de ácido nucleico tras lavarse, secarse y después pulverizarse. La molécula de ácido nucleico extraída de la muestra de ensayo usada en el análisis es normalmente ADN. El ADN puede extraerse mediante un método deseado conocido públicamente. Actualmente, hay muchos kits de extracción de ADN en el mercado y la extracción puede llevarse a cabo usando tal kit. Por ejemplo, el ADN puede extraerse de una muestra de ensayo usando un DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN GmbH) según el método de Koppel, *et al.*, (Kopell, E. *et al.*, Mitt. Gebiete Levensm, Hyg., 88, 164). La concentración del ADN extraído puede determinarse mediante una medición de absorbancia, etc., y se diluye preferiblemente a una concentración óptima para PCR y se usa.

[0036] En el método de la presente invención, la PCR puede realizarse según la forma convencional teniendo en cuenta los cebadores y la polimerasa de ADN que ha de usarse. Durante ese proceso, se puede preparar la solución amortiguadora de la PCR, dNTP, reactivos como $MgCl_2$ y similares o se puede usar un kit de PCR disponible comercialmente. En la PCR se pueden usar uno o dos o más de los pares de cebadores anteriores. Un ejemplo de las condiciones de PCR es 40 ciclos siendo un ciclo de 30 s a 95 °C, 30 s a 63 °C y 30 s a 72 °C, con la reacción final de 7 min a 72 °C. Sin embargo, se pueden variar estas condiciones de forma adecuada teniendo en cuenta la T_m de los cebadores que han de usarse, la longitud de la región que ha de amplificarse, la concentración del ADN molde y similares.

[0037] La detección de la molécula de ácido nucleico amplificada (producto PCR) puede llevarse a cabo usando un método deseado que puede identificar un fragmento de ADN específico, más concretamente, métodos que incluyen la electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis capilar, hibridación, métodos inmunológicos y similares. Generalmente, el resultado se verifica mediante el patrón de migración de la electroforesis llevada a cabo con el producto PCR. Por ejemplo, la electroforesis en un 0,8 % de gel de agarosa que contiene bromuro de etidio puede llevarse a cabo y la detección se puede conseguir mediante verificación de

banda.

[0038] La presente invención incluye los pares de cebadores usados en el método de cuantificación y detección mencionado anteriormente y un kit que contiene esos pares de cebadores. Los cebadores pueden producirse mediante métodos convencionales. Además de los pares de cebadores, el kit puede contener otros reactivos, p. ej., dNTP, MgCl₂, una polimerasa como Taq ADN polimerasa, solución amortiguadora (por ejemplo, Tris-HCl), glicerol, DMSO, ADN de control positivo, ADN de control negativo, agua destilada y similares. Estos reactivos pueden proporcionarse en paquetes individuales en el kit, o pueden proporcionarse dos o más tipos de reactivos como una mezcla de estos. Las concentraciones de cada uno de los reactivos en el kit no están particularmente limitadas en la presente invención a condición de que estén dentro de un intervalo permitido para la realización del método de PCR en la presente invención. La información sobre las condiciones de PCR óptimas y similares también puede incluirse en el kit o el kit puede contener solo los reactivos de cebadores.

[0039] La presente invención proporciona un material de referencia estándar útil a la hora de medir el índice de contaminación del trigo MG mediante PCR cuantitativa. Este material de referencia estándar se realiza ligando ADN endógeno común tanto a trigo no MG y trigo MG, que es una secuencia de ADN consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2, o una secuencia parcial de la misma, y ADN específico de al menos un trigo MG en un vector de ADN único. Puede usarse el ADN que comprende una secuencia de nucleótidos identificada como cualquiera de las SEQ ID NOs: 11 a 18 como la secuencia parcial mencionada anteriormente.

[0040] El material de referencia estándar de la presente invención también puede ser un vector de ADN que comprende ADN consistente en una secuencia de nucleótidos que presenta al menos un 80 % de homología con el ADN consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma como ADN endógeno y una o más secuencias de ADN consistentes en secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente.

[0041] El vector de ADN puede ser un vector disponible comercialmente tal como un vector de la serie pBR (p. ej., pBR322, pBR328, etc.), un vector de la serie pUC (pUC19, pUC18, etc.), un vector de la serie de fase λ (λ gt10, λ gt11, etc.) o puede usarse una forma modificada de los mismos.

[0042] En el caso de detectar trigo MG, no es solo necesario amplificar y detectar una secuencia de ADN extraño insertada en el genoma de trigo normal mediante ingeniería genética, sino también amplificar una región que contiene secuencias endógenas cadena arriba y cadena abajo del ADN extraño. Como los OMG se preparan en otros cultivos insertando también la misma secuencia de ADN extraño, si solo se detecta la secuencia de ADN extraño, es aún imposible juzgar si se origina en trigo MG o en otro cultivo modificado genéticamente. Por lo tanto, los cebadores para detectar una secuencia específica de una cepa OMG deben ser cebadores que puedan amplificar la región que contiene la secuencia de ADN extraño insertada en cada cepa de trigo MG y también cadena arriba y cadena abajo de las secuencias endógenas. Estos tipos de cebadores se preparan, por ejemplo, siguiendo el método mencionado anteriormente de Koppel *et al.*, indicado para soja, el método de Wurz *et al.*, (Wurz, A. *et al.*; 2nd Status report. BgW, BgW-Heft, 1/199797,118), o un método basado en el mismo. La secuencia específica de cada cepa de trigo MG insertada en el material de referencia estándar mencionado anteriormente se elige de secuencias de ADN que pueden amplificarse con estos cebadores.

[0043] Una vez se ha determinado el ADN de trigo endógeno y el ADN específico de trigo MG que ha de insertarse en el material de referencia estándar, se realiza la PCR utilizando el genoma de trigo normal o el genoma de trigo MG como molde, se clonan el ADN endógeno y el ADN específico de trigo MG y mediante el corte de los fragmentos de ADN clonados y el lugar de clonación del ADN replicable mencionado anteriormente con la misma enzima de restricción, los fragmentos de ADN pueden ligarse en el lugar de corte en el ADN replicable. Las enzimas de restricción conocidas públicamente pueden elegirse y usarse de forma adecuada y entre los ejemplos se incluyen EcoRI, SpeI, EcoRV, SmaI, SacI, NotI, HindIII, XhoI, etc.

[0044] Si dos o más tipos de series de dilución de la solución anterior que contiene el material de referencia estándar se preparan y se realiza la PCR cuantitativa en cada una, se pueden determinar las curvas de calibración para las regiones parciales tanto de la secuencia de ADN de trigo endógeno como de la secuencia de ADN específico de OMG. El material de referencia estándar de la presente invención puede también usarse como control positivo para la secuencia de ADN de trigo endógeno y la secuencia de ADN específico de OMG en la PCR cualitativa.

La presente invención incluye un método para determinar el índice de contaminación del trigo MG en una muestra de ensayo preparando dos o más tipos de series de diluciones de concentraciones de soluciones que contienen el anterior material de referencia estándar, realizando la PCR cuantitativa para cada una, amplificando el ADN de trigo endógeno y al menos un tipo de ADN específico de trigo modificado genéticamente, determinando la curva de calibración para cada región parcial, realizando para una muestra de ensayo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa bajo las mismas condiciones usadas al determinar la curva de

calibración, determinando el número de moléculas de ADN de trigo endógeno y el número de moléculas de ADN específico de trigo MG presentes en la muestra de ensayo utilizando la curva de calibración, en la que la amplificación del ADN de trigo endógeno se lleva a cabo utilizando al menos un par de cebadores del punto (3) anterior. El método también comprende la etapa que consiste en determinar el índice de contaminación del trigo MG en una muestra de ensayo, calculando la fórmula $100 \times A/B$. Primero se determina la ratio A: la ratio A se obtiene al dividir el número de moléculas de la región parcial de la secuencia de ADN específico de trigo MG por el número de moléculas de la región parcial de la secuencia de ADN de trigo endógeno. A continuación, se determina la ratio B: la ratio B se obtiene al dividir el número de moléculas de la región parcial de la secuencia de ADN específico de cada cepa de trigo MG, que se obtiene al llevar a cabo una PCR cuantitativa usando un grano estándar de trigo modificado genéticamente, por el número de moléculas de la región parcial de la secuencia de ADN de trigo endógeno. La ratio B anterior se denomina "ratio estándar interna" en el documento que no es una patente 1 y es la ratio que significa (gen recombinante)/(gen endógeno) en el ADN extraído de los granos de cada cepa MG pura.

[0045] Cada etapa de la PCR llevada a cabo en el método para determinar el índice de contaminación del trigo MG en la presente invención puede llevarse a cabo por separado, pero se pueden realizar de forma simultánea. Se prefiere que cada etapa de la PCR se lleve a cabo bajo condiciones en las que la reacción de amplificación de la molécula de ácido nucleico tenga lugar aproximadamente con la misma velocidad que la PCR realizada para preparar las curvas de calibración. Ejemplos de unas condiciones como tales son aquellas en las que las temperaturas y los ciclos son los mismos que en la PCR realizada para preparar las curvas de calibración. El cálculo del índice de contaminación del trigo MG puede realizarse mediante la medición de las cantidades de ADN endógeno y ADN recombinante por separado y calculando esos resultados medidos, pero también se puede realizar la amplificación con un aparato de PCR en tiempo real según el método descrito en el documento que no es una patente 1 y calcular así el índice de contaminación del trigo MG. En la presente invención, el término "ADN recombinante" hace referencia a una molécula de ADN extraño arbitraria insertada de forma artificial en el trigo, y entre los ejemplos se incluyen ADN de una región que codifica un gen extraño, una región sin transcribir o sin traducir, una región conectora o una parte de vector.

EJEMPLOS

[0046] La presente invención se explica con más detalle a través de los siguientes ejemplos, pero la presente invención no se limita a eso de ningún modo y cabe la posibilidad de una variedad de formas de realización de las mismas. Por lo tanto, debe entenderse que la presente invención abarca todas las formas de realización de la misma como tales siempre que sean según los conceptos expuestos mediante la descripción y dibujos del presente documento.

[0047] Se utilizan las siguientes muestras, reactivos y dispositivos en los ejemplos a continuación.

(1) Muestras

[0048] Trigo (*Triticum aestivum*): se usaron semillas secas de las siguientes variedades: Hank, Scarlet, Tara, Yecora Rojo, Finch, Lewjain, Rod, Weatherford, Estica, Buchanan, Finley, Garland, TAM 107, Declo, Hatton, Morgan, Neely, Ramp, Amidon, Ernest, McNeai, AC-Barrie, AC-Splendor, CDC-Teal, Laura, Nishikaze, Nishihonami, Chikugo Izumi, Tsugaru HDC, Shirogane, Shirasagi, Bihoro HDN, Hokushin, Bandowase, Kita HDI, Norin No. 61, Hatsumochi, Mochiotome, Kanto 107 y Bai Huo.

[0049] Trigo duro (*Triticum durum*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: AC Navigator.

[0050] Maíz (*Zea mays*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: maíz dentado.

[0051] Soja (*Glycine max*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: variedad descendiente de la soja modificada genéticamente Roundup Ready®.

[0052] Arroz (*Oryza sativa*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: Koshihikari.

[0053] Cebada (*Hordeum vulgare*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: Benkei.

[0054] Avena (*Avena sativa*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: producto comercial.

[0055] Centeno (*Secale cereale*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: producto comercial.

[0056] Semilla de colza (*Brassica napus*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: Canola.

[0057] Panizo común (*Setaria italica* Beauvois): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: Mochiawa.

[0058] Mijo común (*Panicum miliaceum* Panicum): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: Mochikibi.

[0059] Sorgo (*Sorghum subglabrescens*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: producto comercial.

[0060] Alforfón (*Fagopyrum esculentum*): se usaron semillas secas de la siguiente variedad: variedad doméstica.

(2) Reactivos

5 **[0061]** (2-1) Se usaron los siguientes reactivos para la extracción de ADN de las muestras.

Dodecilsulfato sódico (SDS) (grado reactivo especial) (Sigma Chemical Co.)

QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN GmbH)

QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH)

Se usaron los siguientes reactivos para la electroforesis de ADN.

10 Ácido acético (grado reactivo especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Tris (hidroximetilo) aminometano (Tris) (grado reactivo especial) (Sigma Chemical Co.)

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (grado reactivo especial) (Sigma Chemical Co.)

Polvo de agarosa "TaKaRa LO3" (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.)

Bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.)

15 Azul de bromofenol (Sigma Chemical Co.)

Xileno cianol (Sigma Chemical Co.)

Marcador de ADN "1 kb ladder" (New England Biolabs Inc.)

Marcador de ADN "100 pb ladder" (New England Biolabs Inc.)

[0062] (2-2) Se usaron los siguientes reactivos para PCR cualitativa.

20 ADN Polimerasa "AmpliTaq Gold" (Applied Biosystems)

Tampón II de PCR X 10 (Applied Biosystems)

[0063] (2-3) Se usaron los siguientes reactivos para la preparación del plásmido y la purificación.

ADN Polimerasa "AmpliTaq Gold" (Applied Biosystems)

Tampón II de PCR X 10 (Applied Biosystems)

25 ADN Polimerasa "KOD" (TOYOBO Co., Ltd.) x 10 tampón PCR II (TOYOBO Co., Ltd.)

Kit de clonación TOPO TA con células TOP10F (Invitrogen Co.)

Extracto de levadura (Difco Laboratories)

Triptona Peptona (Difco Laboratories)

NaCl (grado reactivo especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) polvo de agarosa (TAKARA BIO, Inc.)

30 D[-]- α -Aminobencilpenicilina (Ampicilina) Sal de sodio (Sigma Chemical Co.) QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN GmbH)

Etanol (grado reactivo especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 2-Propanol (grado reactivo especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) (grado reactivo especial) (Sigma Chemical Co.)

35 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (grado reactivo especial) (Sigma Chemical Co.)

Enzima de restricción "EcoRI" (TaKaRa Shuzo CO., LTD.)

Enzima de restricción "SacI" (New England Biolabs Inc.)

Enzima de restricción "XbaI" (New England Biolabs Inc.)

Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Invitrogen)

40 Fenol (grado reactivo especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) Cloroformo (grado reactivo especial)

(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) alcohol de isoamilo (grado reactivo especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[0064] (2-4) Se usó el siguiente reactivo para la PCR cuantitativa.

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

45 (3) Equipo

[0065] (3-1) Se usó el siguiente equipo para la extracción de ADN de las muestras.

Pulverizador "Multi Beads Shocker MB301" (Yasui Kikai Co., Ltd.)

[0066] (3-2) Se usó el siguiente equipo para la electroforesis de ADN. Dispositivo de electroforesis "Mupid 2"

(Advance Co., Ltd.)

50 **[0067]** (3-3) Se usó el siguiente equipo para la PCR cualitativa.

Termociclador "PTC-200" (MJ Research Inc.)

[0068] (3-4) Se usó el siguiente equipo para la PCR cuantitativa.

Dispositivo de PCR cuantitativa "ABI PRISM 7700 Sequence Detector System" (Applied Biosystems)

La síntesis de los cebadores y sondas se mandó a Operon Biotechnologies.

[Ejemplo 1] Construcción de plásmido

5 **[0069]** Se extrajo el ADN genómico de los granos de la variedad cultivada de trigo Ernest y se realizó la PCR usando este ADN como molde. La tabla 1 muestra las dianas de amplificación y la amplificación se realizó para dos tipos de candidatos de genes de trigo endógeno (gen PRP y gen Waxy) y para el gen RRS como gen de trigo MG hipotético. La tabla 2 muestra los cebadores que se usaron. Como se explica a continuación, el gen RRS es un gen resistente a Roundup®.

[0070]

[Tabla 1]

Gen	Nombre genérico	Tamaño (pb)
PRP	Proteína rica en prolina	259
Waxy	WaxyD1	529
RRS	5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa	1886

10

[0071]

[Tabla 2]

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño amplicón
PRP	prp04-F	5'-GCCTCCGAAGGGCAAGC-3' (SEQ ID NO: 5)	259 pb
	prp06-R	5'-GAACATATACCAACACGCAAATG-3' (SEQ ID NO: 6)	
RRS	RRS-F	5'-TGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTAC-3' (SEQ ID NO: 23)	1919 pb
	RRS-R	5'-GGGAATTGGATCCGGTACCGA-3' (SEQ ID NO: 24)	
	RRS Sac-F	5'-AGAGCTCTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTAC-3' (SEQ ID NO: 25)	1926 pb
	RRS Sac-R	5'-CGGAATTCGATCCGGTACCGA-3' (SEQ ID NO: 26)	
Waxy	Wx-F	5'-TTTTGTTGTGCCGCTTGCCCT-3' (SEQ ID NO: 27)	529 pb
	Wx-R	5'-AGTTTAGCGCG'TCACAGACTCA-3' (SEQ ID NO: 28)	
	Wx Xba-F	5'-TCTCTAGATTTTGTGTTGTGCCGCTTGCCCT-3' (SEQ ID NO: 29)	545 pb
	Wx Wba-R	5'-TCTCTAGAGTTTAGCGCGTCACAGACTCA-3' (SEQ ID NO: 30)	

15

A continuación, se realizó de nuevo la PCR usando el ADN amplificado obtenido como molde con un cebador que presenta un lugar de corte de la enzima de restricción añadido al mismo. Una vez se había realizado la digestión con la enzima de restricción en el ADN amplificado obtenido, los fragmentos purificados se ligaron a vectores pUC19 y de este modo se transformaron *E. coli*. De forma alternativa, se realizó la clonación TA en un vector pCR4. Después de la inserción, se verificaron los fragmentos mediante el mapeo de la enzima de restricción, todas las secuencias de los clones obtenidos se verificaron mediante secuenciación.

20

[0072] Tras la digestión con la enzima de restricción de cada uno de los clones TA, los fragmentos purificados se ligaron a vectores pUC19 y de este modo se transformaron *E. coli*. Los plásmidos se extrajeron a partir de los transformados y se purificaron y las secuencias se verificaron.

25

[0073] Los plásmidos se construyeron según el proceso descrito anteriormente. Más concretamente, la región WaxyD1 amplificada con un cebador que presenta un sitio de corte de la enzima de restricción añadido al mismo se digirió con XbaI y, a continuación, se ligó a pUC19 que había sido sometido a digestión con XbaI del mismo modo y se desfosforiló para crear pWIG01.

30

[0074] La clonación TA se llevó a cabo una vez sobre el gen RRS amplificado por PCR, el pRRS plásmido obtenido se digirió con EcoRI y SacI y el fragmento RRS se purificó. Del mismo modo, pWIG01 se digirió con EcoRI y SacI y, después de que el plásmido se purificara, se ligó el fragmento RRS al mismo para construir pWIG02.

[0075] La clonación TA se llevó a cabo una vez sobre el gen PRP amplificado por PCR, el pPRP plásmido

obtenido se digirió con EcoRI y el fragmento PRP se purificó. Del mismo modo, pWIG02 se digirió con EcoRI y se desfosforiló y, a continuación, se ligó el fragmento PRP al mismo para construir pWIG03.

[0076] Se llevó a cabo la secuenciación de los plásmidos construidos y se verificaron las secuencias de inserción. Todas las secuencias verificadas se correspondían con las secuencias diana.

5 **[0077]** El procedimiento usado en los ejemplos 1 a 3 se describe de forma específica a continuación.

(1) Digestión con enzima de restricción

[0078] Los procedimientos se realizaron siguiendo los manuales para cada enzima de restricción. Más concretamente, cada solución de ADN se mezcló con la enzima de restricción, agua destilada y el tampón x10 para la enzima y la reacción normalmente se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C.

10 (2) Purificación del fragmento de ADN tras la digestión

[0079] Los fragmentos de ADN se separaron usando electroforesis en gel de agarosa. El kit de QIAGEN se usó para la purificación a partir del gel. En otras palabras, se calentó el gel que contiene el ADN diana y se disolvió y el ADN se unió a una película de sílice. Después de enjuagar la película de sílice con una solución que contenía etanol, etc., el ADN se eluyó con agua destilada.

15 (3) Desfosforilación de plásmidos digeridos con enzimas de restricción

[0080] Los plásmidos se sometieron a la digestión con enzima de restricción y se desalaron. A continuación, se mezclaron los plásmidos con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, GIBCO BRL) y con una solución amortiguadora destinada y reaccionaron durante 30 minutos a 37 °C. El CIAP se desactivó tras la reacción mediante el tratamiento con fenol y el plásmido desfosforilado se recuperó por precipitación con etanol.

20 (4) Ligación de ADN

[0081] Se usó un kit de ligación de ADN (TAKARA BIO INC.) ver. 2. Más concretamente, el ADN diana se mezcló en la solución, se añadió un volumen equivalente de la solución de la reacción del kit (solución I) y se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos a 16 °C para llevar a cabo la ligación de ADN.

(5) Transformación

25 **[0082]** Se usaron células competentes *E. coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd.). Se mezcló una suspensión descongelada de 10 a 50 μ L de células competentes con ADN y se dejó reposar en hielo durante 30 min y, tras un choque térmico durante 50 segundos a 42 °C, se volvió a colocar la mezcla en hielo, se añadieron 450 μ L del medio SOC calentado a 37 °C después de que pasaran 2 minutos y se incubó la mezcla durante 1 h a 37 °C. A continuación, se extendió el incubado a 100 μ L/placa sobre placas del medio Amp+ Circlegrow® y se cultivó durante 16 h a 37 °C

30 (6) Cultivo

[0083] El cultivo para la purificación del plásmido se llevó a cabo usando el medio Circlegrow®. La resistencia a ampicilina se usó para la presión de selección de producción del plásmido y se utilizó una concentración final de 100 μ g/mL de ampicilina. El cultivo se llevó a cabo durante un periodo de 14 a 16 h a 37 °C usando un agitador de tubo de ensayo.

35 (7) PCR

[0084] Se usó la polimerasa AmpliTaq Gold de Applied Biosystems. La composición mostrada en la tabla 3 se utilizó como la composición de reacción. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la tabla 4.

40 **[0085]**

[Tabla 3]

	μ L
Tampón 10 x	2,5
25 mM MgCl ₂	1,5

ES 2 452 819 T3

2,5 mM dNTP	2,0
Par de cebadores	2,5
5 u/mL Taq	0,25
MQ H ₂ O	15,75
50 ng/μL ADN	0,5
Total	25,0

[0086]

[Tabla 4]

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo (min)	Nº ciclo
1	95	10 min	
2	95	30 s	40
3	60	30 s	
4	72	2 min	
5	72	7 min	
6	10	ad infinitum	

5 (8) Clonación TA

[0087] La clonación TA se llevó a cabo usando el sistema de clonación TOPO TA de Invitrogen según el manual del fabricante.

(9) Secuenciación de ADN

10 **[0088]** La secuenciación de ADN se realizó usando un modelo CEQ8000 de Beckman Coulter según el manual del fabricante. Se usó DTCS Quick Start Master Mix de Invitrogen como kit.

(10) Procedimiento SYBR por PCR en tiempo real

[0089] La PCR en tiempo real se realizó usando un kit de TAKARA BIO (TAKARA SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) N° código: RR041 A).

- 15
- 1) El ADN molde (plásmido) se diluyó según la tabla 5 (Se usó una solución de 5 ng/μL de ColE1 para la dilución)
 - 2) Se preparó ADN desconocido a 4 puntos en una serie de diluciones que varían de 1:10 a 1:2 (Se usó una solución de 5 ng/μL de ColE1 para la dilución).
 - 3) Se preparó la mezcla de reacción Master Mix para cada cebador según la tabla 5.
 - 4) Se mezclaron la Master Mix y el ADN molde.
 - 5) Se inició la reacción bajo las condiciones mostradas en la tabla 6.

20 **[0090]**

[Tabla 5]

Etapa	Temp.	Tiempo	Ciclo	Tiempo rampa
1	50°C	2 min	1	Auto
2	95°C	10 min	1	Auto
3	95°C	5 s	40	Auto
	60°C	30 s		Auto
4	95°C	15 s	1	Auto
5	60°C	20 s	1	Auto
6	95°C	15 s	1	20 min

ES 2 452 819 T3

7	20°C	1 min	1	Auto
---	------	-------	---	------

[0091]

[Tabla 6]

	Conc.	µL
SYBR Premix		5
Par de cebadores	5 µM cada uno	0,4
ROX	×50	0,2
MQ H ₂ O		0,4
Molde		4,0
Total		10,0

5 (11) Procedimiento TaqMan® por PCR en tiempo real

[0092] La PCR en tiempo real se realizó usando un kit de TAKARA BIO (TAKARA Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) N° código: RR039A).

- 10
- 1) El ADN genómico de cada variedad se usó como molde sin dilución.
 - 2) Se preparó la mezcla de reacción Master Mix mezclándola con Premix, ROX, cebador y sonda según la tabla 7.
 - 3) La Master Mix a 16 µL/pozo se mezcló con ADN molde a 4 µL/pozo.
 - 4) Se inició la reacción bajo las condiciones mostradas en la tabla 8.

[0093]

[Tabla 7]

	Conc.	µL
Premix	×2	10
ROX	×50	0,4
Sonda	10 M	0,8
Par de cebadores	5 M cada uno	0,8
H ₂ O		4,0
Total		16,0

15

[0094]

[Tabla 8]

Etapa	Temp.	Tiempo	Ciclo	Tiempo rampa
1	50°C	2 min	1	Auto
2	95°C	10 min	1	Auto
3	95°C	5 s	40	Auto
	60°C	30 s		Auto
4	20°C	1 min	1	Auto

[0095] El ADN molde (plásmido) se diluyó según la tabla 9 (Se usó una solución de 5 ng/μL de ColE1 para la dilución).

[0096]

[Tabla 9]

Conc. solución madre		2ª Conc. solución madre		Pozo						
10 ⁷ copy/μl		10 ⁵ copy/μl		2	3	4	5	6	7	8
Vol. (μL) solución madre	→	4	→	20	→	20	→	20	→	20
Vol. (μL) solución diluida		396		180		180		180		180
Vol. (μL) solución madre			→	20	→	20	→	20	→	20
Vol. (μL) solución diluida				136.8		180		180		180
Conc. Final copia/μL		10⁵		3.16 × 10⁴	10⁴	3.16 × 10³	10³	3.16 × 10²	10²	3.16 × 10¹

5

(12) Pulverización de semillas (pequeña cantidad)

[0097] Se utilizó el pulverizador mencionado anteriormente, Multi Beads Shocker MB301.

- 1) Se colocó una semilla en un tubo de 2 mL, se añadió un cono de metal y el tubo se tapó.
- 2) Se realizó la pulverización dos veces a 2000 rpm durante 10 s.
- 3) Se extrajo el ADN directamente del polvo pulverizado.

10

(13) Pulverización de semillas (gran cantidad)

[0098] Se utilizó un molino para la pulverización.

- 1) Se colocaron las semillas (30 g) en el molino y se fijó la tapa.
- 2) La pulverización se llevó a cabo dos veces durante 30 s.
- 3) Se almacenó el polvo pulverizado.

15

(14) Preparación de ADN genómico

[0099] Se usó un kit de QIAGEN (QIAGEN Plant Mini Kit). El procedimiento se llevó a cabo según el manual del kit.

- 1) Se añadieron 400 μL de solución AP1 y 4 μL de RNasa A a la semilla pulverizada y se agitó la mezcla.
- 2) La mezcla se incubó durante 10 min a 65 °C y se mezcló 2 o 3 veces durante la incubación.
- 3) Se añadieron 130 μL de AP2 y, tras la agitación, se dejó la mezcla reposando en hielo durante 10 min.
- 4) Se llevó a cabo una separación centrífuga (15.000 rpm = 20.000 g, 5 min, temperatura ambiente).
- 5) Todo el volumen del sobrenadante se colocó en un QIAshredder y se llevó a cabo una separación centrífuga (15.000 rpm, 2 min, temperatura ambiente).
- 6) El sobrenadante pasante de la decantación se transfirió a un recipiente independiente, se añadieron 1,5 volúmenes (675 μL) de AP3/E y se agitó la mezcla.
- 7) La mitad del volumen se aplicó a una columna de centrifugación y se realizó la separación centrifugación (10.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente).
- 8) El flujo pasante se desechó y se realizó el mismo tratamiento en la cantidad residual.
- 9) La columna se colocó en un nuevo tubo, se añadieron 500 μL de AW y se realizó la separación centrífuga (10.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente).
- 10) Después del retratamiento, se desechó el flujo pasante y se realizó la separación centrífuga (15.000 rpm, 2 min, temperatura ambiente).

20

25

30

[0100] La columna se colocó en un tubo fresco de 1,5 mL, se añadieron 50 μL de AE y después de dejar que la mezcla reposara durante 5 min a temperatura ambiente, se realizó la separación centrífuga (10.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente).

35

[0101] A partir de ahí, se repitió la etapa anterior.

(15) Cuantificación de ADN

[0102] Se usó GeneSpec como instrumento y se realizó la cuantificación de ADN según el manual del instrumento.

40

[0103] La celda era 5 mm, la tasa de dilución era 1:1 y el control era la solución de elución del kit (AE).

[Ejemplo 2] Verificación de la tasa de amplificación por PCR

5 [0104] Para las regiones de amplificación de los genes Waxy y PRP, se llevó a cabo una PCR en tiempo real mediante el procedimiento SYBR utilizando el plásmido estándar pWIG03 como molde. Se observó amplificación dependiente de la concentración del molde para todos los genes y todas las regiones PCR bajo las mismas condiciones. Según las curvas de fundición de los productos de amplificación, cada producto de amplificación tenía un pico principal que presentaba un punto de alta fusión y no se observó ninguna formación de dímeros de cebadores. La figura 2 muestra la curva de amplificación y las curvas de fusión. La tabla 10 muestra una lista de las secuencias de cebadores usadas en el ejemplo 2 y posteriormente.

10 [0105]

[Tabla 10]

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)
PRP	prp03-F	5'-aag cca ccg atg act gac aat-3' (SEQ ID NO: 3)	231 (SEQ ID NO: 11)
	prp07-R	5'-cgc aaa tga taa tta cag aat agt agt ac-3' (SEQ ID NO: 4)	
	prp04-F	5'-gcc tcc gaa ggg caa gc-3' (SEQ ID NO: 5)	244 (SEQ ID NO: 12)
	prp07-R	5'-cgc aaa tga taa tta cag aat agt agt ac-3' (SEQ ID NO: 4)	246 (SEQ ID NO: 13)
	prp03-F	5'-aag cca ccg atg act gac aat-3' (SEQ ID NO: 3)	
	prp06-R	5-gaa cat ata cca aca cgc aaa tg-3' (SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 14)
	prp04-F	5'-gcc tcc gaa ggg caa gc-3' (SEQ ID NO: 5)	
	prp06-R	5-gaa cat ata cca aca cgc aaa tg-3' (SEQ ID NO: 6)	121 (SEQ ID NO: 15)
	prp03-F	5'-aag cca ccg atg act gac aat-3' (SEQ ID NO: 3)	
	prp03-R	5'-cgc taa ccg gat act atg cca-3' (SEQ ID NO: 7)	88 (SEQ ID NO:16)
	prp03-F	5'-aag cca ccg atg act gac aat-3' (SEQ ID NO: 3)	
	prp04-R	5'-ata gca cat cgt ggc tcc gg-3' (SEQ ID NO: 7)	101 (SEQ ID NO: 17)
	prp04-F	5'-gcc tcc gaa ggg caa gc-3' (SEQ ID NO: 5)	
	prp04-R	5'-ata gca cat cgt ggc tcc gg-3' (SEQ ID NO: 8)	
	prp01-F	5'-gcg aca ccc cat cca ctt ta-3' (SEQ ID NO: 19)	
	prp01-R	5'-cac ggc aag gag gct gtg-3' (SEQ ID NO: 20)	102 (SEQ ID NO: 18)
Waxy	Wx012-F	5'-ggt cgc agg aac aga ggt gt-3' (SEQ ID NO: 21)	
	Wx012-R	5'-ggt gtt cct cca ttg cga aa-3' (SEQ ID NO: 22)	

[Ejemplo 3] Búsqueda de regiones amplificadas en el gen PRP

15 [0106] Se realizó una búsqueda de regiones en el gen PRP del cual la cantidad detectada no varía dependiendo de la variedad de trigo. Se usó el gen Waxy como control positivo y se realizó una búsqueda de regiones que proporcionan la cantidad de investigación equivalente a las regiones amplificadas Wx012. Los pares de cebadores usados fueron PRP01-F y PRP01-R, PRP03-F y PRP03-R y PRP03-F y PRP07-R mostrados en la tabla 10. La PCR en tiempo real se realizó mediante el procedimiento SYBR usando ADN extraído de las semillas de trigo como molde.

20 [0107] Los resultados se muestran en la figura 3. Cuando se usaron los pares de cebadores de PRP03-F y PRP03-R y PRP03-F y PRP07-R; se confirmó que la cantidad detectada de PRP era aproximadamente la misma que la de Wx012. Sin embargo, cuando se usaron como cebadores PRP01-F y PRP01-R, la cantidad detectada era aproximadamente tres veces mayor que Wx012.

25 [0108] A partir de este hallazgo, se confirmó que un gen homólogo al gen PRP está presente en la región cadena arriba del gen PRP (el lado amino-terminal como una secuencia de proteína después de la traducción) en ADN de trigo y esta región cadena arriba es indeseable como ADN endógeno.

[Ejemplo 4] Búsqueda de sonda

[0109] A partir de las investigaciones en los ejemplos 1 a 3 se confirmó que la región de PRP04-F a PRP06-R se prefiere como región de un gen de trigo endógeno para una amplificación por PCR. A continuación, se diseñaron las sondas que eran adecuadas a cada tipo de par de cebadores para esta región. Para el diseño de las sondas se usó el software de asistencia de diseño de cebadores Primer Express o Primer3 (El desarrollo de Primer3 o de la web Primer3 fue fundado por Howard Hughes Medical Institute y por el National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute. Bajo las concesiones R01-HG00257 (a David C. Page) y P50-HG00098 (a Eric S. Lander): http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Se sintetizó una sonda marcada de forma fluorescente a partir de la secuencia de sondas diseñada. El extremo 5' se marcó con FAM y el extremo 3' se marcó con TAMRA como marcadores fluorescentes. Al usar estas sondas, las condiciones de PCR en tiempo real se establecieron para el procedimiento TaqMan usando el plásmido estándar como molde. Después de determinar las condiciones óptimas, se llevó a cabo una comparación de diferentes combinaciones de sondas y cebadores (véase la tabla 10). Se obtuvo una amplificación satisfactoria con cada una de las combinaciones y la eficacia de detección fue aproximadamente la misma.

[0110] La tabla 11 muestra las secuencias de las sondas diseñadas. La figura 4 muestra los resultados obtenidos usando cada tipo de sonda.

[0111]

[Tabla 11]

Nombre sonda	Secuencia
PRP-Taq1	5'-TCGACCCCGTCCGGAGCCAC-3' (SEQ ID NO: 9)
PRP-Taq2	5'-AGCTGAAGGAGGAGATCGACCCC-3' (SEQ ID NO: 10)

[Ejemplo 5] Establecimiento de las condiciones de la PCR en tiempo real

[0112] Al seguir el procedimiento de la PCR en tiempo real en el ejemplo 1 y usar las sondas descritas en el ejemplo 4, los parámetros de concentración del cebador, concentración de la sonda, temperatura de reacción de la PCR y tiempo variaron al descubrir las condiciones óptimas. Las tablas 12 y 13 muestran las condiciones elegidas.

[0113]

[Tabla 12]

	Conc.	µL
Premix	2x	10
ROX	50x	0,4
Sonda	10 µ M	0,8
Par de cebadores	5 µ M cada uno	0,8
H ₂ O		4,0
Total		16,0

[0114]

[Tabla 13]

Etapa	Temp.	Tiempo	Ciclo	Tiempo rampa
1	50 °C	2 min	1	Auto
2	95 °C	10 min	1	Auto
3	95 °C	5 s	40	Auto
	60 °C	30 s		Auto
4	20 °C	1 min	1	Auto

[Ejemplo 6] Verificación de la universalidad en variedades de trigo

[0115] Se llevó a cabo una comparación de la cantidad detectada mediante PCR en tiempo real usando el procedimiento TaqMan para 40 variedades de trigo. Como control comparativo se usó el producto de amplificación Wx012 (SEQ ID NO: 31) amplificado por los cebadores Wx012-F y Wx012-R. Se usaron PRP03-F y PRP03-R como cebadores y PRPTaq-1 como sonda. El producto de amplificación PRP03 (SEQ ID NO: 15) amplificado por los cebadores PRP03-F y PRP03-R se detectó en las 40 variedades. Wx012 se detectó en todas las variedades excepto en las variedades de trigo céreo y trigo duro. En la comparación con PRP03, la ratio Wx012: PRP03 era aproximadamente 1:1 en todas las variedades en las que se detectó Wx012.

[0116] La figura 5 muestra los ejemplos de detección de 20 de las 40 variedades de trigo en las que se detectó PRP03. En la figura 5, los términos Hatsumochi y Mochiotome indican variedades de trigo céreo y AC-Navi hace referencia a la variedad AC Navigator de trigo duro. Todas estas se detectaron.

[Ejemplo 7] Prueba de estimación del índice de contaminación mediante trigo MG hipotético

[0117] Actualmente, el trigo MG lo produce Monsanto, etc., pero es muy difícil de conseguir. Por lo tanto, se llevó a cabo una prueba usando un trigo MG hipotético con el fin de verificar si era posible o no una estimación del índice de contaminación del trigo MG mediante cuantificación del gen de trigo endógeno descubierto por la presente invención.

[0118] Como el trigo MG producido por Monsanto se proporciona con un gen resistente a Roundup®, se decidió usar soja MG, que es un OMG proporcionado con el mismo gen resistente a Roundup®. En otras palabras, se pulverizaron semillas de soja MG, se pulverizaron semillas de trigo de la variedad AC Barrie y se mezclaron entre ellas y se usó como trigo MG hipotético. La ratio de la mezcla de ambos se investigó en ensayos preliminares de forma que la ratio estándar interna se acercara a 1 y la ratio de la mezcla de la soja MG y trigo se determinó como 6:94. Se llevó a cabo la cuantificación del gen resistente a Roundup® y el gen endógeno (región PRP) mediante PCR en tiempo real con una sonda TaqMan usando ADN extraído del trigo MG hipotético como molde bajo las condiciones mostradas en el ejemplo 5. (Se usó PRP-Taq2 como la sonda y los cebadores mostrados en la tabla 14 se usaron como cebadores. En la tabla, RRS hace referencia al gen resistente a Roundup®). La secuencia amplificada en ese momento se identifica como SEQ ID NO: 32. El valor numérico que resulta cuando el valor cuantitativo RRS obtenido se dividió por el valor cuantitativo del gen de trigo endógeno se usó como una ratio estándar interna (1,0).

[0119]

[Tabla 14]

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)
PRP	prp03-F	5'-aag cca ccg atg act gac aat-3' (SEQ ID NO: 3)	231
	prp07-R	5'-cgc aaa tga taa tta cag aat agt agt ac-3' (SEQ ID NO: 4)	
RRS	RRS2-F	5'-cct tta gga ttt cag cat cag tgg-3' (SEQ ID NO: 33)	121
	RRS2-R	5'-gac ttg tcg ccg gga atg-3' (SEQ ID NO: 34)	

El ADN se extrajo a partir de una muestra obtenida mediante la mezcla de trigo MG hipotético con trigo pulverizado por separado (variedad Yecora Rojo) y usando este ADN como molde y siguiendo el método de la presente invención, se cuantificaron el gen de trigo endógeno y el gen resistente a Roundup®. La figura 6 muestra el índice de contaminación del trigo MG hipotético determinado a partir de esos resultados. Se confirmó que el índice de contaminación determinado mediante un cálculo según el método de la presente invención muestra una alta correlación con la ratio de la mezcla actual. Más concretamente, la cantidad detectada de trigo MG (concentración de número de copia: copia/μL) por volumen de la solución molde obtenida se dividió por la cantidad detectada (concentración de número de copia: copia/μL) por volumen de la solución molde obtenida del gen de trigo endógeno. Ese cociente se dividió por la ratio estándar interna de 1,0 y se multiplicó por 100 y el cociente resultante se usó como el índice de contaminación MG.

[Ejemplo 8] Prueba de verificación de especificidad

[0120] Se realizó una prueba de especificidad para verificar que el método según la presente invención no presenta reactividad cruzada con otros cultivos. Se usó cebada, avena, centeno, arroz, sorgo, semilla de colza, maíz, alforfón y mijo común como los otros cultivos. Se extrajo el ADN de estos cultivos y se realizó una PCR en tiempo real usando el ADN como molde bajo las condiciones establecidas según el método presentado en el ejemplo 5.

[0121] Se usaron dos tipos de pares de cebadores, PRP03-F y PRP03-R y PRP03-F y PRP07-R y se usó PRP-Taq2 como sonda.

[0122] La figura 7 muestra los resultados. Cuando se usó el par de cebadores de PRP03-F y PRP07-R, se detectaron 140 copias por 1 µg de ADN en trigo, pero en los cultivos anteriores no se detectaron más de 0,2 copias. En otras palabras, la tasa de detección no específica en esos cultivos no era superior al 0,05 % y como este valor es mucho menor que el error estándar en la detección de trigo, se confirmó que estos cultivos no afectan a la cuantificación del gen de trigo endógeno. Cuando se usó el par de cebadores de PRP03-F y PRP03-R, aunque se encontró en la cebada una detección del 0,3 % con respecto al trigo, la tasa no era superior al 0,05 % en otros cultivos. Por lo tanto, incluso cuando se usó ese par de cebadores, el valor era mucho menor que el error estándar en la detección de trigo y se confirmó que estos cultivos no afectan a la cuantificación del gen de trigo endógeno.

LISTA DE SECUENCIAS

[0123]

<110> NISSHIN SEIFUN GROUP INC.

15 <120> Método para detectar y cuantificar ADN de trigo endógeno y método para determinar el índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo.

<130> EPP101290

<140> EP07743162.5

<141> 2007-05-11

20 <150> JP 2006-135835

<151> 2006-05-15

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

25 <211> 1487

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (2)..(122)

<223> la región amplificada por los cebadores PRP01-F y PRP01-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (1158)..(1487)

35 <223> la región que ha de amplificarse por el método de la presente invención

<400> 1

ES 2 452 819 T3

ggcgacaccc catccacttt atctcagttg agaggtttag aagcgcgcg tgaagcacia 60
 agtgcagcaa gagctgcgag aaggagcgag cagcaatggc gaggcacagc ctccttgccg 120
 tgctcctcgt cgggctggtc gcggcctccg gcttcagcca ggcgccgccc gctggccggg 180
 gccttgctga gaagctcccc gagccggagc ccaagccgac gccgtacca gagcccaagc 240
 cgcaacccaa gccagagcca atgcctaagc ctgaacccat gccaaagcca gagcctaagc 300
 ctctgcctaa acctgaacct atgcaaaac cagagcctaa gcctctgccc aaacctgaac 360
 ccatgccaaa gccagagccc aaaccggagc cgaagccgga gccgatccca aagcccgaac 420
 caaagcctga gcccaagcct gaccgatgc ccaaacctga gcctaagcct gagcccaagc 480
 cagagccgat gcccaaaccc gaaccaaagc cagagcccaa gcccgagcct atgcaaaac 540
 ctgaaccaa gcccgagccc aaaccggagc cgatgaagcc tgagcctaag ccgatgcaa 600
 aaccggaacc gaagccagag cccaagcccc agccgatgcc taaaccagaa ccaagccag 660
 agcccaaacc cgagccgata aagcctgagc ctaagccgat gccgaaaccc gaacctaac 720
 cagagcccaa gcctgagccg atgcaaaac cggaaaccaa gcctgagccc aagcctgagc 780
 cgatgccaaa accggagccc aagcccagc ccaagcccga gccgatgcca aaaccggaac 840
 caaagcctga gcccaagcct tacccaatgc ccaaacctga gcctaagcct gagcccaaac 900
 ccgagccgat gcccaaacca gaaccaaagc cagagcccaa acccgagccg atgcaaaagc 960
 cggaaaccaa gccagagccc aaaccggagc ccaagccaga gccgatgcca aagccggaac 1020
 caaagcccga gcccaagccc gagccaatgc cgaagccaga accgaagcca gagcccaagc 1080
 ctgagccgat gccaaagcca gagcctaagc ccaaacatt gcctaaacca gagcctaagc 1140
 ctgaacctat gcctaagcca gagcccaagc ctgagcccga accgaagccg gagccgctc 1200
 cgaagggcaa gccaccgatg actgacaatt gatgtgatac tcacatatga cagctgaagg 1260
 aggagatcga ccccgctccg agccacgatg tgctatttct agaataagtg gcatagtatc 1320
 cggttagcga gatagtgatg atgcatcttt ttgtattcct tgtattccac cattcctttt 1380
 agtttctgtt gttccatgca cccatgatga gtactactat tctgtaatta tcatttgcgt 1440
 gttggtatat gttcatctgt gcacatgact cagttgttct ttcgtgt 1487

<210> 2
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> misc_feature
 <223> la región que ha de amplificarse por el método de la presente invención

<400> 2

ccagagccca agcctgagcc cgaaccgaag ccggagccgc ctccgaaggg caagccaccg 60
 atgactgaca attgatgtga tactcacata tgacagctga aggaggagat cgaccccgtc 120
 cggagccacg atgtgctatt tctagaataa gtggcatagt atccggttag cgagatagtg 180
 atgatgcac tttttgtatt ccttgattc caccattcct tttagtttct gttgttccat 240
 gcacccatga tgagtactac tattctgtaa ttatcattg cgtgttgta tatgttcatc 300
 tgtgcacatg actcagttgt tcttctgtgt 330

<210> 3
 <211> 21

<212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR PRP03-F
 5 <400> 3
 aagccaccga tgactgacaa t 21

 <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR PRP07-R

 <400> 4
 cgcaaatgat aattacagaa tagtagtac 29
 15 <210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> cebador PRP PRP04-F

 <400> 5
 gcctccgaag ggcaagc 17

 <210> 6
 <211> 23
 25 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR PRP06-R

 <400> 6
 30 gaacatatac caacacgcaa atg 23

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial

 35 <220>
 <223> cebador PCR PRP03-R

 <400> 7
 cgctaaccgg atactatgcc a 21

 <210> 8
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR PRP04-R

 <400> 8
 45 atagcacatc gtggtccgg 20

 <210> 9

ES 2 452 819 T3

<211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial

5 <220>
 <223> sonda PCR PRP-Taq1

<400> 9
 tcgaccccg t cggagccac 20

10 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> sonda PCR PRP-Taq2

15 <400> 10
 agctgaagga ggagatcgac ccc 23

<210> 11
 <211> 231
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> la región amplificada por los cebadores PRP03-F y PRP07-R

<400> 11
 aagccaccga tgactgacaa ttgatgtgat actcacatat gacagctgaa ggaggagatc 60
 gaccccgctcc ggagccacga tgtgctatct ctagaataag tggcatagta tccggttagc 120
 gagatagtga tgatgatct ttttgattc cttgtattcc accattcctt ttagtttctg 180
 ttgttccatg cacccatgat gagtactact attctgtaat taccatttgc g 231

25 <210> 12
 <211> 244
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

30 <220>
 <221> misc_feature
 <223> la región amplificada por los cebadores PRP04-F y PRP07-R

<400> 12
 gcctccgaag ggcaagccac cgatgactga caattgatgt gatactcaca tatgacagct 60
 gaaggaggag atcgaccccg tccggagcca cgatgtgcta tttctagaat aagtggcata 120
 gtatccggtt agcgagatag tgatgatgca tctttttgta ttccttgat tccaccattc 180
 cttttagttt ctggtgttcc atgcacccat gatgagtact actattctgt aattatcatt 240
 tgcg 244

35 <210> 13
 <211> 246
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 452 819 T3

<223> la región amplificada por los cebadores PRP03-F y PRP06-R

<400> 13

aagccaccga tgactgacaa ttgatgtgat actcacatat gacagctgaa ggaggagatc 60
gaccccgctcc ggagccacga tgtgctattt ctagaataag tggcatagta tccggttagc 120
gagatagtga tgatgcatct ttttgatttc cttgtattcc accattcctt ttagtttctg 180
ttgttccatg cacccatgat gactactact attctgtaat taccatttgc gtgttggtat 240
atgttc 246

<210> 14

<211> 259

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> misc_feature

10 <223> la región amplificada por los cebadores PRP04-F y PRP06-R

<400> 14

gcctccgaag ggcaagccac cgatgactga caattgatgt gatactcaca tatgacagct 60
gaaggaggag atcgaccccg tccggagcca cgatgtgcta tttctagaat aagtggcata 120
gtatccggtt agcgagatag tgatgatgca tctttttgta ttccttgat tccaccattc 180
cttttagttt ctgttgttcc atgcacccat gatgagtact actattctgt aattatcatt 240
tgcgtgttgg tatatgttc 259

<210> 15

<211> 121

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> misc_feature

<223> la región amplificada por los cebadores PRP03-F y PRP03-R

20 <400> 15

aagccaccga tgactgacaa ttgatgtgat actcacatat gacagctgaa ggaggagatc 60

gaccccgctcc ggagccacga tgtgctattt ctagaataag tggcatagta tccggttagc 120

g 121

<210> 16

25 <211> 88

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> misc_feature

30 <223> la región amplificada por los cebadores PRP03-F y PRP04-R

<400> 16

aagccaccga tgactgacaa ttgatgtgat actcacatat gacagctgaa ggaggagatc 60
gaccccgctcc ggagccacga tgtgctat 88

<210> 17

<211> 101

ES 2 452 819 T3

<212> DNA
 <213> Triticum aestivum

 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> la región amplificada por los cebadores PRP04-F y PRP04-R

 <400> 17

gcctccgaag ggcaagccac cgatgactga caattgatgt gatactcaca tatgacagct 60
gaaggaggag atcgaccccg tccggagcca cgatgtgcta t 101

 <210> 18
 <211> 134
 10 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> la región amplificada por los cebadores PRP04-F y PRP03-R

 15 <400> 18

gcctccgaag ggcaagccac cgatgactga caattgatgt gatactcaca tatgacagct 60
gaaggaggag atcgaccccg tccggagcca cgatgtgcta tttctagaat aagtggcata 120
gtatccggtt agcg 134

 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR PRP01-F

 <400> 19
 gcgacacccc atccactta 20

 25 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 30 <223> cebador PCR PRP01-R

 <400> 20
 cacggcaagg aggctgtg 18

 <210> 21
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR wx012-F

 <400> 21
 40 ggtcgcagga acagaggtg 20

 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA

<213> artificial
 <220>
 <223> cebador PCR wx012-R
 <400> 22
 5 ggtgttcctc cattgcgaa 19
 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador PCR RRS-F
 <400> 23
 tggaaaagga aggtggctcc tac 23
 <210> 24
 15 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador PCR RRS-R
 20 <400> 24
 gggaattgga tccgtaccg a 21
 <210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador PCR RRS-Sac-F
 <400> 25
 agagctctgg aaaaggaagg tggctcctac 30
 30 <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> cebador PCR RRS-Sac-R
 <400> 26
 gggaattgga tccgtaccg a 21
 <210> 27
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador PCR Wx-F
 <400> 27
 45 tttgttgctg ccgcttgct 20
 <210> 28
 <211> 22

ES 2 452 819 T3

<212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR Wx-R
 5 <400> 28
 agtttagcgc gtcacagact ca 22

 <210> 29
 <211> 28
 <212> DNA
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador PCR wx-xba-F

 <400> 29
 tctctagatt ttgttgccc gctgcct 28
 15 <210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> cebador PCR wx-xba-R

 <400> 30
 tctctagagt ttagcgcgc acagactca 29

 <210> 31
 <211> 102
 25 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> la región amplificada por los cebadores wx012-F y wx012-R
 30 <400> 31

ggtcgcggga acagaggtgt tcaaggcggc cgaaataggt tgccgcctgc ggcggaatcg 60
ccaccaccg tgaagtccac cgtttcgcga tggaggaaca cc 102

 <210> 32
 <211> 121
 <212> DNA
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> la región amplificada por los cebadores RRS-F y RRS-R; secuencia específica de gen resistente a roundup

 <400> 32

cctttaggat ttcagcatca gtggctacag cctgcatgct tcacggtgca agcagccggc 60
ccgcaaccgc ccgcaaatcc tctggccttt ccggaaccgt ccgcattccc ggcgacaagt 120
 40 c 121

 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA

ES 2 452 819 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cebador PCR RRS2-F

<400> 33 24

5 cctttaggat ttcagcatca gtgg 24

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador PCR RRS2-R

<400> 34 18

gactgtcgc cggaatg 18

Reivindicaciones

1. Un método para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, método que comprende:

5 usar una molécula de ácido nucleico en la muestra o una molécula de ácido nucleico extraída de la muestra como molde para amplificar de forma específica la molécula de ácido nucleico de una región que consiste en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma, en la que la secuencia parcial presenta al menos 80 bases de largo, con un par de cebadores capaz de amplificar esa región y detectar o cuantificar las moléculas de ácido nucleico amplificadas.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la región que consiste en la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 es una región consistente en cualquiera de las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOS: 11 a 18.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el par de cebadores es un par de cebadores elegido de un grupo que consiste en:

15 (i) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4;

 (ii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4;

20 (iii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6;

 (iv) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6;

25 (v) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7;

 (vi) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 8;

30 (vii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 8;

 (viii) un par de cebadores consistente en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 7;

35 (ix) un par de cebadores consistente en un par de moléculas de ácido nucleico donde cada molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos en común con al menos un 80 % de secuencia de nucleótidos continua de cada molécula de ácido nucleico en los pares de cebadores (i) a (viii) anteriores.

40
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en el que cada cebador en el par de cebadores es una molécula de ácido nucleico que presenta de 15 a 40 bases de largo.
- 45 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, en el que la región amplificada en la reacción en cadena de la polimerasa se detecta usando una sonda identificada como SEQ ID NO: 9 o 10.
6. Un kit para detectar o cuantificar una secuencia de ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, que contiene al menos un par de cebadores de los pares de cebadores según la reivindicación 3.
7. Un vector de ADN que comprende:

50 una secuencia de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma como ADN endógeno común tanto para trigo modificado genéticamente como para trigo no modificado genéticamente y una o más secuencias de ADN que comprenden secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente.

8. Vector de ADN que comprende:

5 una secuencia de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que presenta al menos un 80 % de homología con el ADN consistente en la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 o una secuencia parcial de la misma como ADN endógeno común tanto para trigo modificado genéticamente como para trigo no modificado genéticamente y una o más secuencias de ADN que consisten en secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente.

9. Vector de ADN según la reivindicación 7 u 8, en el que el ADN consistente en la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 es ADN consistente en cualquiera de las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NOs: 11 a 18.

10. Vector de ADN que comprende:

15 ADN consistente en una secuencia capaz de ser amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cualquiera de los pares de cebadores según la reivindicación 3 como ADN endógeno común tanto para trigo modificado genéticamente como para trigo no modificado genéticamente y una o más secuencias de ADN que consisten en secuencias que son específicas de cada cepa de trigo modificado genéticamente como ADN específico de trigo modificado genéticamente.

11. Método para determinar un índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo, método que comprende:

20 una etapa que consiste en preparar dos o más tipos de series de diluciones de concentraciones de soluciones que contienen ADN según cualquiera de las reivindicaciones de la 7 a la 10, llevar a cabo reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas para cada uno, amplificar el ADN de trigo endógeno y al menos un tipo del ADN específico de trigo modificado genéticamente y determinar una curva de calibración para cada región parcial;

25 una etapa que consiste en llevar a cabo, para la muestra de ensayo, una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa bajo las mismas condiciones que en la etapa para la determinación de las curvas de calibración y determinar el número de moléculas de ADN de trigo endógeno y el número de moléculas de ADN específico de trigo modificado genéticamente presentes en la muestra de ensayo usando la curva de calibración,

30 donde la amplificación del ADN de trigo endógeno se lleva a cabo usando al menos un par de cebadores elegido de los pares de cebadores según la reivindicación 3 y

una etapa que consiste en determinar el índice de contaminación del trigo modificado genéticamente en la muestra de ensayo mediante el cálculo de una fórmula $100 \cdot A/B$ usando:

35 una ratio A obtenida al dividir el número de moléculas de ADN específico de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de ADN de trigo endógeno presentes en la muestra de ensayo y

40 una ratio B obtenida al dividir el número de moléculas de ADN específico de cada cepa de trigo modificado genéticamente determinado al llevar a cabo reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas usando las semillas estándares de cada cepa de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de ADN de trigo endógeno.

FIG. 1

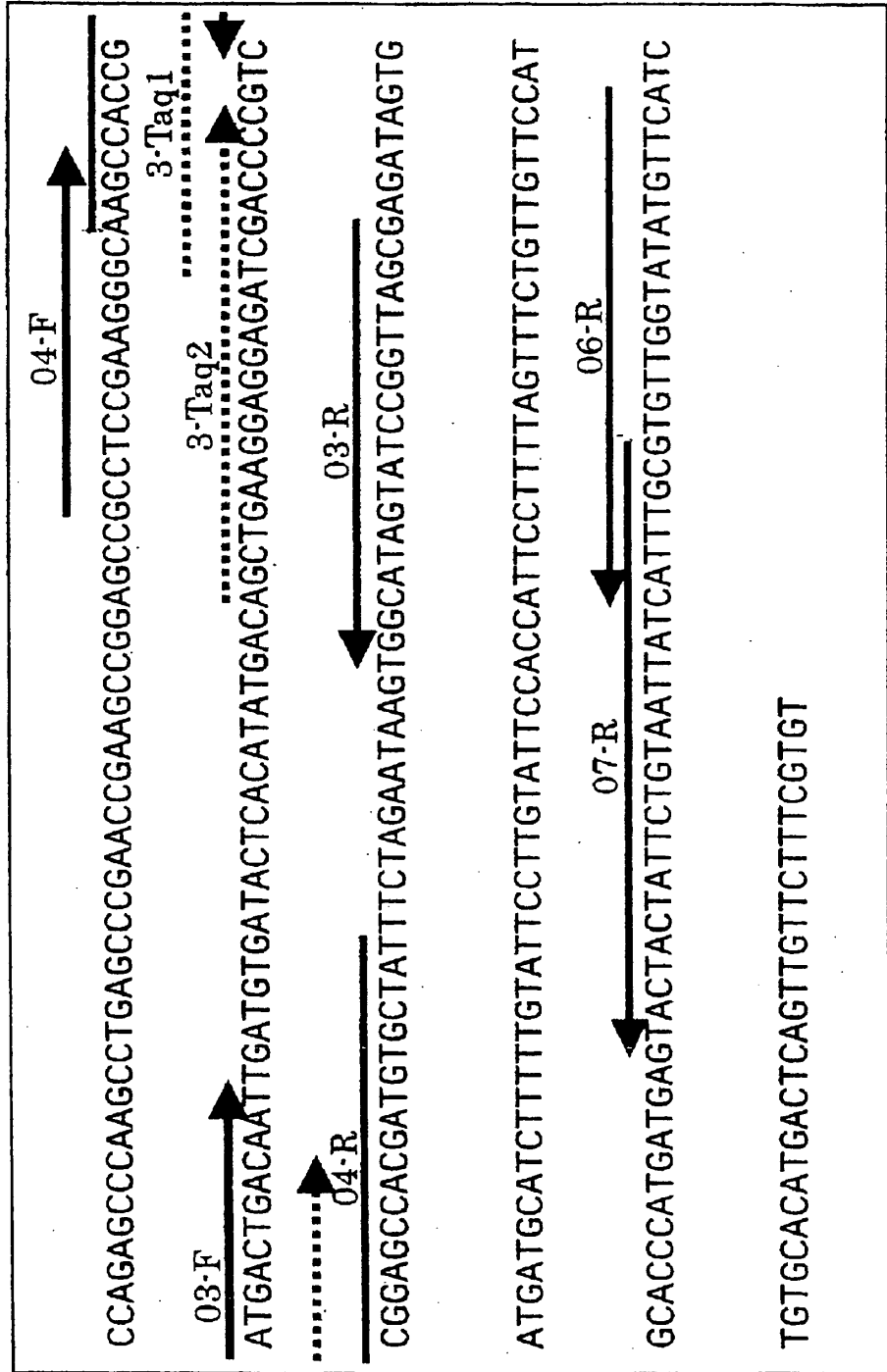


FIG. 2

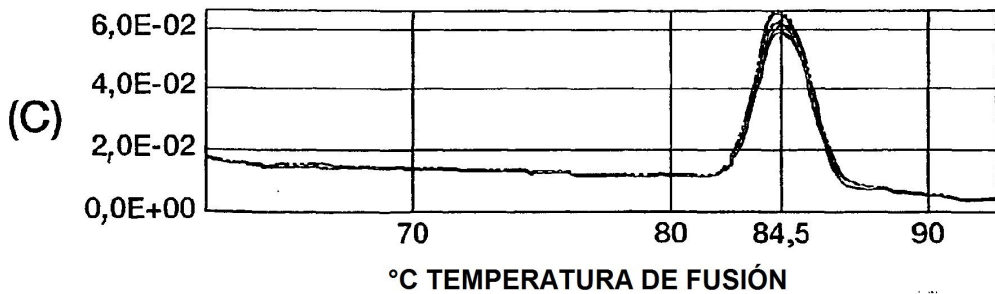
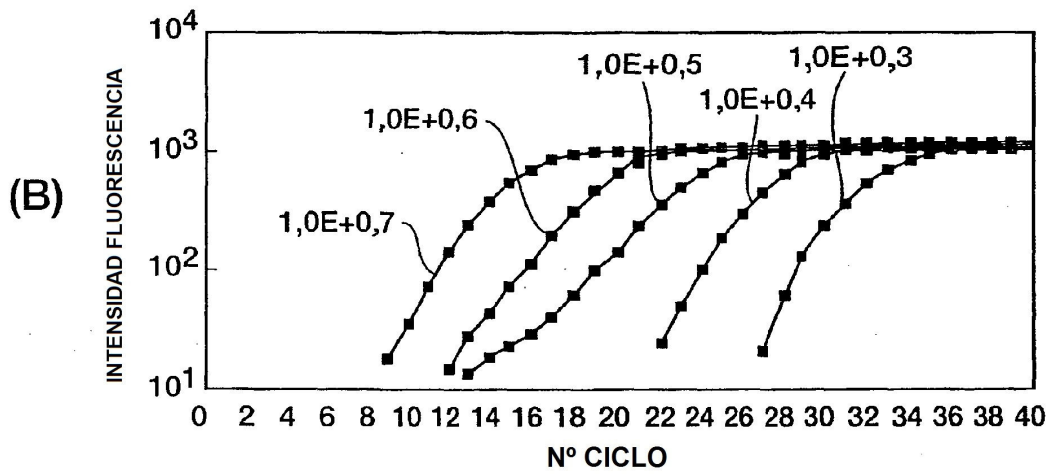
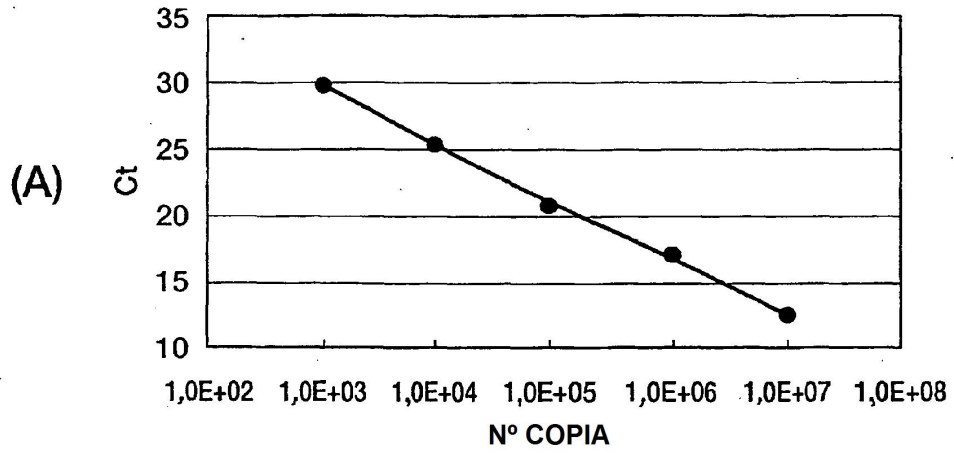


FIG. 3

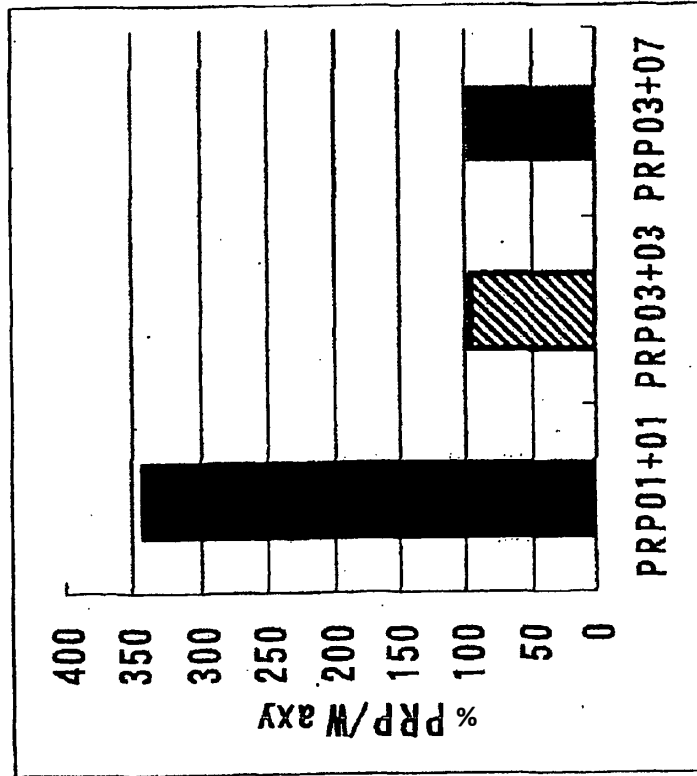


FIG. 4

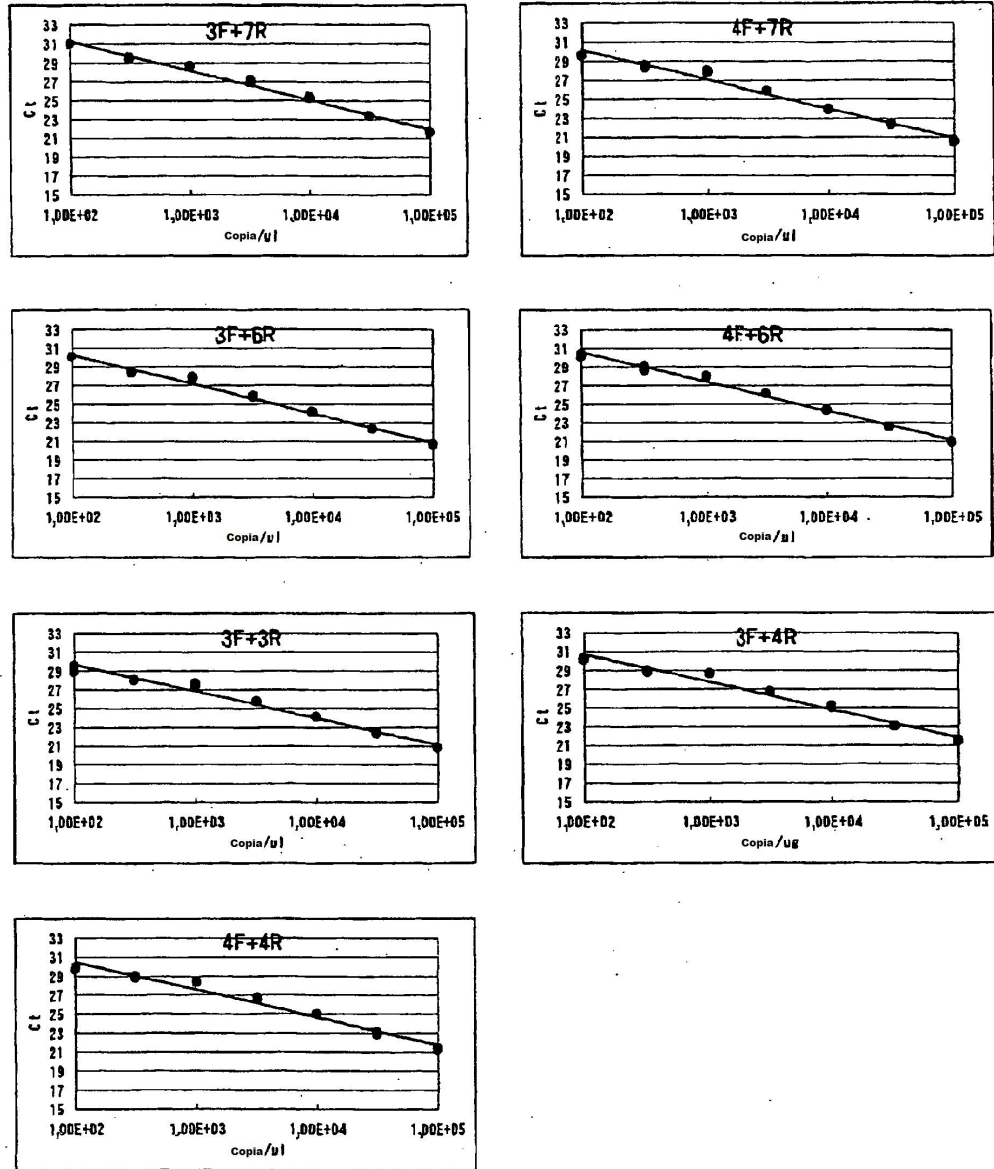


FIG. 5

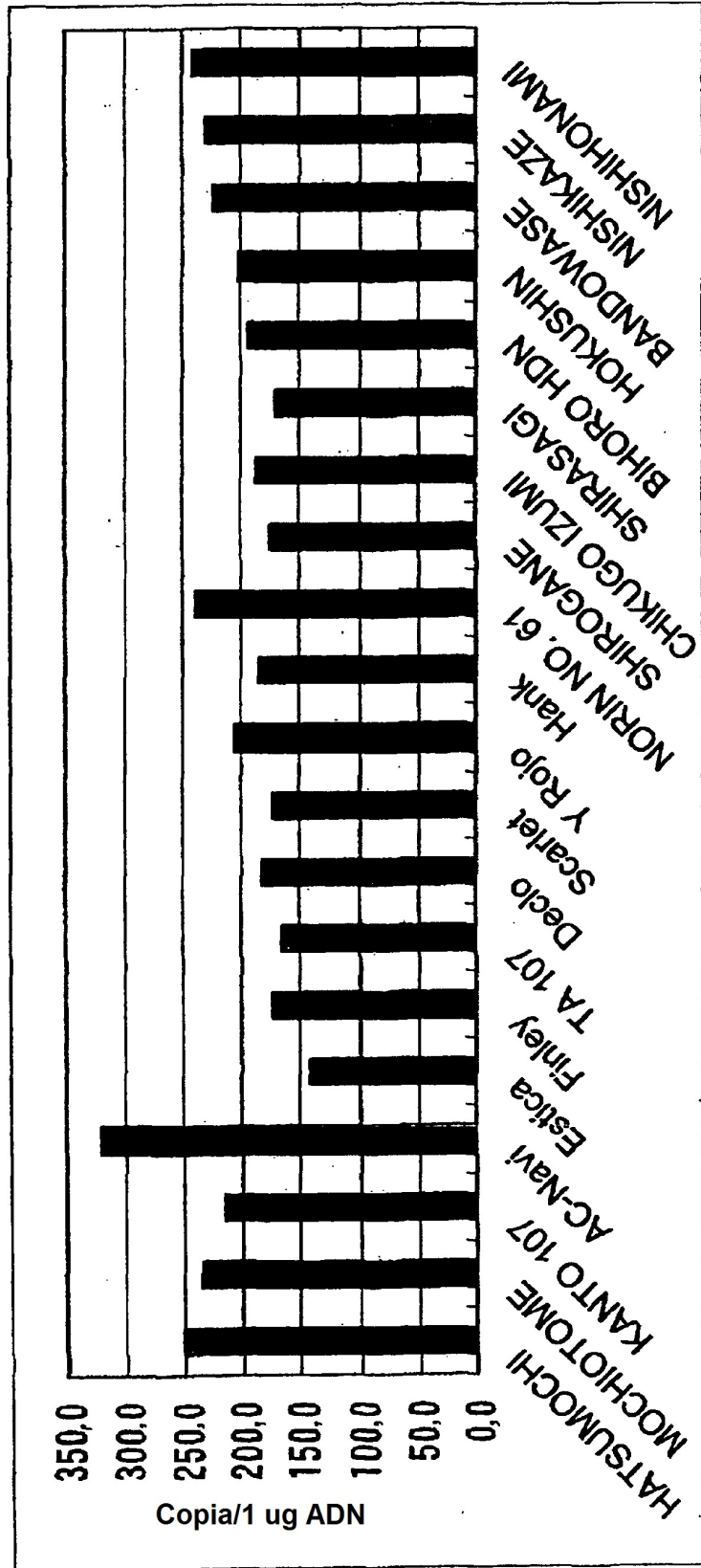


FIG. 6

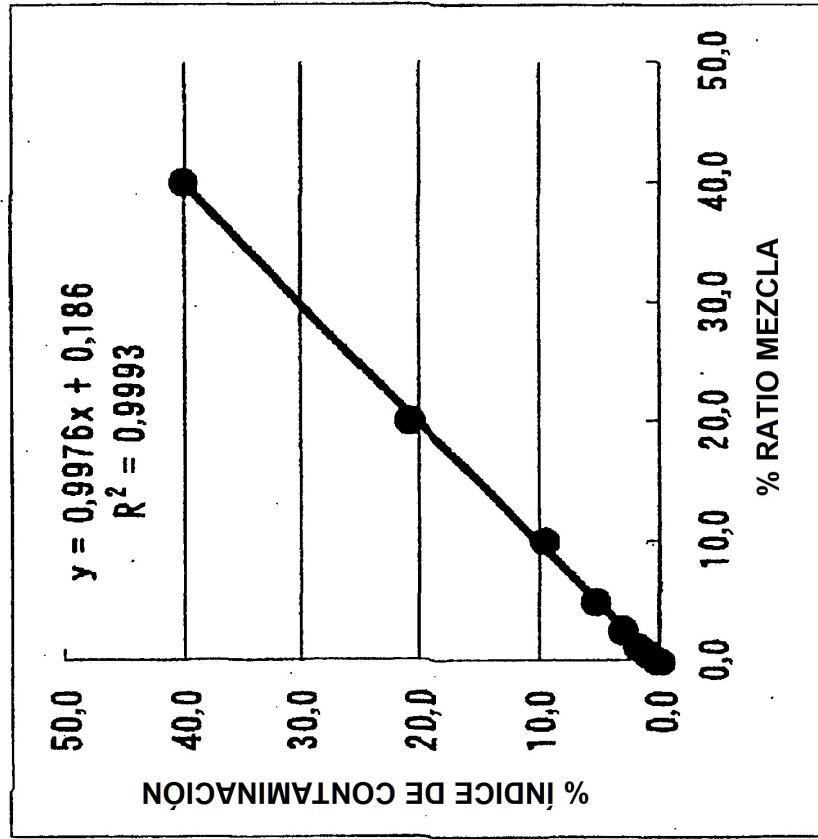


FIG. 7

