

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 706**

51 Int. Cl.:

B01D 59/44 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2010 E 10784066 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2437869**

54 Título: **Análisis multiplex de proteína transgénica apilada**

30 Prioridad:

03.06.2009 US 183777 P

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

03.09.2015

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**LAWRY, JOHN y
FLOOK, JOSHUA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 544 706 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

Análisis multiplex de proteína transgénica apilada

Campo técnico

5 La invención se relaciona en general con análisis de alto rendimiento de características de plantas. En particular, la invención se relaciona con un método de análisis de alto rendimiento y cuantificación de proteínas de plantas determinadas por espectrometría de masas con una inyección sencilla de muestras de proteínas complejas derivadas a partir de plantas y tejidos vegetales.

Antecedentes

10 El uso creciente de la tecnología de ADN recombinante para producir plantas transgénicas de uso comercial e industrial requiere el desarrollo de métodos de alto rendimiento de análisis de líneas vegetales transgénicas. Tales métodos son necesarios para mantener las variedades de plantas transgénicas a través de generaciones sucesivas, con el fin de evitar el escape de transgenes hacia el ambiente, y para ayudar en el desarrollo rápido de plantas transgénicas con fenotipos deseables u óptimos. Además, las guías actuales para la definición de la seguridad de plantas GM propuestas para consumo humano requieren la caracterización a nivel de ADN y proteína entre el cultivo original y el transformado.

15 Sesikeran and Vasanthi (2008) *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 Suppl. 1:241-44. Nuevas variedades de plantas que son desarrolladas consisten de modificaciones genéticas crecientemente complejas incluyendo, *inter alia*, genes y características apilados.

20 Los métodos actuales para análisis de plantas transgénicas que son preferidos en la técnica son: técnicas basadas en ADN (por ejemplo, PCR); RT-PCR; el uso de genes informadores; inmunoprecipitación Southern; e inmunoquímica. Todas estas metodologías sufren de diversas limitaciones, y se desea un método superior que sea ampliamente capaz de identificar rápidamente y sin costos elevados y cuantificar productos genéticos transgénicos múltiples de una forma con alto rendimiento a partir de una muestra limitada de una planta transgénica.

25 Las técnicas basadas en ADN para el análisis de plantas transgénicas sufre de varias deficiencias notables. A pesar del hecho de que la transformación mediada por *Agrobacterium* es el método más preferido de transformación genética de plantas, los genotipos de plantas transformadas por *Agrobacterium* son difíciles de analizar por metodologías basadas en PCR. Véase Nain et al. (2005) *Plant Mol. Biol. Rep.* 23:59-65. La presencia incluso de cantidades traza de *Agrobacterium* en tejidos transformados produce resultados de PCR desviados. *Id.* Los formatos de amplificación de ADN también requieren la prueba empírica de cebadores específicos para el gen y condiciones de termociclización. De la manera más significativa, las metodologías basadas en ADN para la selección de plantas transgénicas no determinan realmente la expresión de la proteína producto genético. De la misma manera, el análisis por RT-PCR o inmunoprecipitación Northern puede ser utilizado para confirmar la presencia de transcritos transgénicos en material vegetal transgénico. Alwine et al. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5350-54; *Toplak et al. (2004) Plant Mol. Biol. Rep.* 22:237-50. Ninguno de estos métodos confirma la presencia de la expresión real de proteína en el material vegetal fuente. Estas técnicas también requieren el uso de materiales radioactivos y/o grandes cantidades de tejido y tiempo de procesamiento.

30

35

40 Los genes informadores, tales como los genes que modifican las proteínas fluorescentes, también pueden ser cotransformados en plantas transgénicas para proveer una herramienta para identificar transformantes. Sin embargo, los genes informadores son solamente informadores indirectos de la recombinación genética. La expresión del constructo del gen informador no confirma la expresión del transgén acompañante. Adicionalmente, bien sea el gen transportador o el transgén pueden perderse en generaciones sucesivas de la planta hospedera, desacoplando por lo tanto la presencia del informador del transgén de interés. De la misma manera, los transgenes pueden escaparse de la planta hospedera hacia plantas vecinas, por ejemplo por polinización cruzada, sin el escape concurrente del gen informador. Cuando se apilan múltiples genes en una planta transgénica, un número igual de genes informadores tendría que ser introducido para analizar el proteoma transgénico, y por lo tanto la función del gen informador es solamente un informador indirecto de la función transgénica, y no se detectarían cambios en la expresión de un transgén en respuesta a la presencia de un transgén adicional.

45

50 A diferencia de los métodos delineados anteriormente, la inmunoquímica puede ser utilizada para identificar productos de expresión transgénica en una planta transgénica. Aunque la inmunoquímica es útil para este propósito, el método requiere muestras de proteína altamente purificadas para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos resultantes deben ser probados en cuanto a su especificidad, y deben desarrollarse condiciones de ensayo específicas del reactivo. Los altos niveles de expresión y purificación requeridos para llevar a cabo la inmunoquímica, así como el problema

relacionado de eliminar los contaminantes del tejido vegetal, son limitaciones para la utilidad de este método.

5 La espectrometría de masas también puede ser utilizada para analizar el proteoma de una planta transgénica. Sin embargo, las técnicas espectrométricas reconocidas por el arte requieren mezclas complejas de proteínas vegetales para ser separadas primero por electroforesis en gel 2-D. Rajagopal and Ahern (2001) Science 294(5551):2571-73; Véase también Domon and Aebersold (2006) Science 312(5771):212-17,214. Las bandas individuales de la muestra de proteínas separadas en gel pueden ser digeridas con una proteasa y sometidas a espectrometría de masas para identificar la proteína única presente originalmente en la banda no digerida. Véase, por ejemplo, Chang et al. (2000) Plant Physiol. 122(2):295-317. La etapa de separación en gel en este método es un proceso que consume tiempo que impide el uso de espectrometría de masas en aplicaciones de alto rendimiento. La WO2007/132164 describe un método para detectar la presencia de una proteína transgénica, EPSPS, en un material derivado de plantas que comprende proveer un extracto vegetal, enriquecer el extracto y digerirlo usando una proteasa antes de llevar a cabo la espectrometría de masas. Los ensayos descritos requieren todos el enriquecimiento de la proteína, por ejemplo, a través de fraccionamiento, antes de llevar a cabo la MS.

15 Bhushan et al (Plant and Cell Physiology Vol 46, No. 6, 1 January 2005 p985-996) describe la identificación y caracterización de una proteasa de degradación de péptidos novedosa, A#PreP2.

20 Hay una necesidad en el arte por un método de alto rendimiento para detectar y cuantificar la presencia de productos de la expresión transgénica en plantas que no requiera proteína purificada o altamente expresada, o reactivos específicos para el método. Este método será útil en ayudar a los cultivadores y agricultores de plantas transgénicas a mantener el fenotipo de la variedad de planta transgénica objetivo a través de generaciones sucesivas de reproducción sexual y/o asexual. El método también será útil en analizar rápidamente las plantas producidas de un procedimiento de transformación para identificar aquellas plantas producidas que son plantas transgénicas y expresan la proteína introducida en los tejidos deseados. Adicionalmente, el método puede ser utilizado para seleccionar rápidamente plantas en riesgo de ser contaminadas con transgenes de una planta transgénica, con el fin de alcanzar el bioconfinamiento de la planta transgénica.

25 Divulgación de la invención

La presente invención provee un método de alto rendimiento para detectar la presencia de dos o más proteínas de interés con secuencias de aminoácidos conocidas en una muestra basada en plantas a partir de una planta transgénica, comprendiendo el método:

30 i) proveer datos espectrales de masas para dos o más proteínas que son productos esperados de la expresión transgénica en la planta transgénica;

ii) proveer una primera inyección de una muestra compleja basada en plantas que comprende proteínas, en donde la muestra es una matriz vegetal cruda extraída de un tejido de interés;

iii) poner en contacto la matriz vegetal cruda con una proteasa para digerir las proteínas a péptidos;

iv) inyectar la matriz vegetal cruda digerida en un dispositivo de LC-MS;

35 v) obtener datos espectrales de masa simultáneos para los péptidos;

vi) comparar los datos espectrales de masa simultáneos de v) con los datos espectrales de masas provistos por las dos o más proteínas de interés, determinando por lo tanto la presencia o ausencia de las dos o más proteínas de interés. En particular, las dos o más proteínas de interés son dos proteínas de interés o cuatro proteínas de interés.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 muestra la detección multiplex LC\MS\MS de AAD-1.

FIG. 2 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de AAD-12.

FIG. 3 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de Cry1F.

FIG. 4 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de Cry34.

FIG. 5 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de Cry35.

FIG. 6 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de PAT.

FIG. 7 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de Cry1F, con expresión en tejido de maíz endogénico.

5 FIG. 8 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de Cry34, con expresión en tejido de maíz endogénico.

FIG. 9 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de Cry35, con expresión en tejido de maíz endogénico.

FIG. 10 muestra detección multiplex por LC\MS\MS de PAT, con expresión en tejido de maíz endogénico.

Modos para llevar a cabo la invención

10 La especificidad permitida en una metodología de espectrometría de masas para identificar una proteína individual a partir de una muestra compleja es única en cuanto solo la secuencia de la proteína de interés es requerida con el fin de identificar la proteína de interés. En comparación con otros formatos de multiplexión, la espectrometría de masas es única por su capacidad de explotar la longitud completa de una secuencia de aminoácidos primaria de la proteína para direccionar porciones únicas tipo identificador de una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína para eliminar virtualmente detecciones no específicas. En algunas realizaciones de la presente invención, un fragmento proteolítico o conjunto de fragmentos proteolíticos que identifican únicamente unas proteínas de interés se utiliza para detectar las proteínas de interés en una muestra de proteínas compleja.

20 En términos amplios, los métodos particulares de la invención permiten que cualquier proteína sea monitorizada y cuantificada directamente a partir del tejido de interés requiriendo solamente un conocimiento previo de la secuencia de aminoácidos de las proteínas. El método puede llevarse a cabo de una manera con alto rendimiento sin necesidad de desarrollar/probar un reactivo de detección específico para el método. Tener proteína purificada como reactivo para el desarrollo del método siempre es beneficioso, pero para este análisis una proteína que solamente puede ser purificada, por ejemplo, hasta el 60%, puede ser todavía adecuada para el desarrollo del método. Los métodos de acuerdo con la presente divulgación pueden eliminar la necesidad de que una persona experimentada en la técnica desarrolle métodos frecuentemente retadores para preparar muestras de proteína altamente purificadas para uso en la producción de anticuerpos. Por lo tanto, los métodos de la presente divulgación pueden ahorrar tiempo y recursos. Además, los métodos proveen más variedad de reactivos para proteínas adecuados para análisis multiplex, puesto que los esfuerzos para eliminar, por ejemplo, el 30-40% final de contaminantes, pueden no ser requeridos. Los métodos divulgados también representan una mejora necesaria sobre las metodologías multiplex basadas en amplificación de ADN, las cuales requieren una prueba empírica de los cebadores específicos del gen y de las condiciones del termociclador, y además crean situaciones donde cualquier carencia de especificidad al objetivo puede disminuir significativamente la exactitud del método debido a la amplificación exponencial requerida para la detección de ADN.

35 En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención permiten una ingeniería inversa de la proteína para determinar por qué una proteína particular tiene sus propiedades únicas sin requerir de la proteína real para empezar un estudio. Por ejemplo, las modificaciones de secuencia y/o las modificaciones post traducción de las proteínas objetivo que son asociadas con características vegetales deseables o indeseables pueden ser identificadas a partir de datos espectrales de masas a partir de una muestra compleja de proteínas a partir de una planta que expresa la característica deseable o indeseable.

40 En algunas realizaciones, los métodos divulgados permiten la cuantificación o determinación de relaciones de proteínas múltiples en una muestra de proteínas compleja mediante un análisis por espectrometría de masas, en oposición a la medición de cada proteína de interés individualmente múltiples veces y compilando los resultados individuales en un resultado de muestra.

45 En aun otras realizaciones, la presente divulgación también provee métodos para el desarrollo y uso de la tecnología de plantas transgénicas. Específicamente, los métodos divulgados pueden ser utilizados para mantener el genotipo de plantas transgénicas a través de generaciones sucesivas. También, algunas realizaciones de los métodos divulgados aquí pueden ser utilizadas para proveer análisis de alto rendimiento de plantas no transgénicas que están en riesgo de ser contaminadas con transgenes de plantas vecinas, por ejemplo, por polinización cruzada. Mediante estas realizaciones, el bioconfinamiento de los transgenes puede ser facilitado y/o logrado. En otras realizaciones, los métodos

divulgados aquí pueden ser utilizados para seleccionar los resultados de un procedimiento de transformación de plantas en una forma de alto rendimiento para identificar transformantes que exhiben características de expresión deseadas.

I. abreviaturas

La presente invención será descrita con referencia a las siguientes abreviaturas:

- 5 AAD-1 (R)-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa
AAD-12 (S)-2,4-diclorofenoxipropionato/alfacetoglutarato dioxigenasa
CID Disociación inducida por colisión
Cry1F Proteína cristalina pesticida cry1F (delta-endotoxina insecticida Cry1F(a))
Cry34 Proteína cristalina ET79 (*Bacillus thuringiensis*)
10 Cry35 Similar a Cry35Ab (*Bacillus thuringiensis*)
CE electroforesis capilar
DNA ácido desoxirribonucleico
ELISA ensayo inmunsorbente enlazado a enzima
EPI ión producido potenciado
15 GM genéticamente modificado
IDA adquisición dependiente de la información
LC\MS\MS cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas
MRM monitorización de reacción múltiple
MS espectrometría de masas
20 MSMS espectrometría de masas en tándem
PAT fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa)
PCR reacción en cadena de polimerasa
RT-PCR reacción en cadena de polimerasa con transcripción reversa

II. Términos

- 25 Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se provee la siguiente explicación de términos específicos:

30 Bioconfinamiento: tal como se utiliza aquí, el término "bioconfinamiento" se refiere a la restricción del movimiento de plantas modificadas genéticamente o de su material genético a áreas designadas. El término incluye confinamiento físico, fisicoquímico, biológico, así como otras formas de confinamiento que eviten la supervivencia, dispersión o reproducción de plantas modificadas genéticamente en el ambiente natural o en condiciones de crecimiento artificiales.

Muestra compleja de proteína: tal como se utiliza aquí, el término "muestra compleja de proteína" se utiliza para distinguir una muestra a partir de una muestra de proteína purificada. Una mezcla compleja de proteínas contiene múltiples

proteínas, y puede contener adicionalmente otros contaminantes.

5 Espectrometría de masas: tal como se utiliza aquí, el término general “espectrometría de masas” se refiere a cualquier método, dispositivo o configuración de espectrometría de masas incluyendo, por ejemplo, ionización por electroaspersión (ESI), desorción-ionización de matriz asistida por láser (MALDI), MS, MALDI-tiempo de vuelo (TOF) MALDI MS a presión atmosférica (AP), MALDI MS al vacío, MS en tándem, o cualquier combinación de los mismos. Los dispositivos de espectrometría de masas miden la masa molecular de una molécula (como función de la relación masa de la molécula a carga) midiendo la ruta de vuelo de la molécula a través de un conjunto de campos magnéticos y eléctricos. La relación masa a carga es una cantidad física que se utiliza ampliamente en la termodinámica de partículas cargadas. La relación masa a carga de un péptido particular puede ser calculada, a priori, por una persona experimentada en la técnica. Dos partículas con diferentes relaciones masa a carga no se moverán en el mismo camino en un vacío cuando se someten a los mismos campos eléctricos y magnéticos. La presente invención incluye, *inter alia*, el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) seguida por análisis por MS en tándem de los péptidos.

15 Los instrumentos de espectrometría de masas consisten de tres módulos: una fuente de iones, la cual divide las moléculas de la muestra en iones; un analizador de masas, el cual selecciona los iones por sus masas aplicando campos electromagnéticos; y un detector, el cual mide el valor de una cantidad indicativa y así provee datos para calcular las abundancias de cada ión presente. La técnica tiene aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas. Estas incluyen la identificación de compuestos desconocidos, la determinación de la composición isotópica de elementos en una molécula, la determinación de la estructura de un compuesto observando su fragmentación, y la cuantificación de la cantidad de un compuesto en una muestra.

20 Una revisión detallada de las metodologías y dispositivos de espectrometría de masas puede encontrarse en las siguientes referencia: Carr and Annan (1997) Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. En: Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.21.1-10.21.27; Paterson and Aebersold (1995) Electrophoresis 16: 1791-1814; Patterson (1998) Protein identification and characterization by mass spectrometry. En: Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.22.1-10.22.24; y Domon and Aebersold (2006) Science 312(5771):212-17. □

Multiplex: tal como el término es utilizado aquí, las proteínas y/o péptidos están “en multiplexión” cuando dos o más proteínas y/o péptidos de interés están presentes en la misma muestra.

Característica de la planta: tal como se utiliza aquí, una “característica de la planta” se puede referir a cualquier característica individual o medición cuantificable de una planta.

30 Péptido: péptidos son polímeros cortos formados a partir del enlace, en un orden definido, de aminoácidos. Los péptidos también pueden ser generados por la digestión de polipéptidos, por ejemplo proteínas, con una proteasa.

35 Proteína: las proteínas son compuestos orgánicos hechos de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de los residuos de aminoácidos adyacentes. La secuencia de aminoácidos en una proteína es definida por la secuencia de un gen, el cual está codificado en el código genético. En general, el código genético especifica 20 aminoácidos estándar; sin embargo en ciertos organismos el código genético puede incluir selenocisteína – y en ciertas archaea – pirrolisina. Los residuos en una proteína son observados frecuentemente como modificados por medios químicos por modificación post traducción, lo cual puede suceder bien sea antes de que la proteína sea utilizada en la célula, o como parte de mecanismos de control. Los residuos de proteína también pueden ser modificados por diseño, de acuerdo con técnicas familiares para los expertos en la técnica. Tal como se utiliza aquí, el término “proteína” abarca cadenas lineales que comprenden aminoácidos de origen natural, aminoácidos sintéticos, aminoácidos modificados, o combinaciones de cualquiera o de todos los anteriores

45 Inyección sencilla: tal como se utiliza aquí, el término “inyección sencilla” se refiere a la etapa inicial en la operación de un dispositivo de MS o LC-MS. Cuando se introduce una muestra de proteína en el dispositivo en una inyección sencilla, la muestra completa es introducida en una etapa sencilla.

Apilado/apilación: tal como se utiliza aquí, el término “apilado” se refiere a la presencia de múltiples polinucleótidos heterólogos incorporados en el genoma de una planta.

Espectrometría de masas en tándem: en la espectrometría de masas en tándem, un ión original generado a partir de una molécula de interés puede ser filtrado en un instrumento de MS, y el ión original es fragmentado subsecuentemente para

producir uno o más iones hijos que son analizados entonces (detectados y/o cuantificados) en un segundo procedimiento de MS.

5 Planta transgénica: tal como se utiliza aquí, el término “planta transgénica” incluye referencia a una planta que comprende dentro de su genoma un polinucleótido heterólogo. En general, el polinucleótido heterólogo está integrado de manera estable dentro del genoma de tal forma que el polinucleótido es pasado a generaciones sucesivas. El polinucleótido heterólogo puede estar integrado en el genoma solo o como parte de un casete de expresión recombinante. “Transgénico” se utiliza aquí para incluir cualquier célula, línea celular, callus, tejido, parte de una planta o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de ácidos nucleicos heterólogos que incluyen aquellas plantas transgénicas inicialmente tan alteradas como las creadas por cruces sexuales o propagación asexual a partir de la planta transgénica inicial.

III. Selección de proteína transgénica por análisis multiplex

15 Cualquier proteína introducida en una planta a través de la tecnología de expresión transgénica puede ser analizada utilizando métodos de la invención. Las proteínas adecuadas para el análisis multiplex de acuerdo con la invención pueden conferir una característica generada que hace que la planta transgénica sea superior a su contraparte no transgénica. Ejemplos no limitantes de características deseables que pueden ser conferidas incluyen resistencia a herbicidas, resistencia a tensión ambiental, rendimiento potenciado, valor nutricional mejorado, vida útil mejorada, contenido de aceite alterado, composición de aceites alterada, contenido de azúcar alterado, contenido de almidón alterado, producción de agentes farmacéuticos basados en la planta, producción de productos industriales (por ejemplo, polihidroxialcanoatos: macromoléculas de poliésteres considerados ideales para reemplazar plásticos derivados del petróleo) y potencial para biorremediación. Además, la expresión de una o más proteínas transgénicas dentro de una especie de plantas individual puede ser analizada utilizando métodos de la presente divulgación. La adición o modulación de dos o más genes o características deseadas en una especie sencilla de interés es conocida como apilamiento genético. Además, la expresión de una o más proteínas transgénicas puede ser analizada concurrentemente en los análisis multiplex divulgados aquí con una o más proteínas de plantas endógenas.

25 La preferencia por las proteínas particulares que se van a analizar está a discreción del técnico. Tales proteínas pueden ser, pero no se limitan a, aquellas de plantas, animales, levadura y similares que pueden ser proteínas bien sea no encontradas en una célula no transformada o encontradas en una célula transformada. Proteínas particularmente adecuadas que son expresadas en plantas transgénicas son aquellas que confieren tolerancia a herbicidas, insectos, o virus, y genes que proveen valor nutricional mejorado, rendimientos incrementados, tolerancia a la sequía, utilización de nitrógeno, producción de compuestos industriales útiles, características de procesamiento de la planta, o potencial para biorremediación. Ejemplos de proteínas útiles incluyen el gel insecticida de *Bacillus thuringiensis* para conferir resistencia a insectos, y el gen del 5'-enolpiruvil-3'fosfoshikimato sintasa (EPSPS) y cualquier variante de los mismos para conferir tolerancia a herbicidas de glifosato. Como lo entenderán fácilmente los experimentados en la técnica, cualquier proteína que confiera una característica deseada puede ser expresada en una célula vegetal utilizando la tecnología de ADN recombinante.

IV. Selección de fragmentos de péptidos

40 Las proteínas objetivo pueden ser identificadas de acuerdo con la presente divulgación determinando la presencia de fragmentos peptídicos proteolíticos de las proteínas objetivo en espectros de MS a partir de una mezcla compleja de proteínas vegetales. Las enzimas proteasa escinden las proteínas en secuencias de aminoácidos específicas que pueden ser establecidas fácilmente dentro de la secuencia completa de una proteína objetivo. Por lo tanto, el conjunto de fragmentos peptídicos que va a ser producido por una digestión con una o más proteasas puede deducirse a priori. Una relación masa a carga única de un péptido deducido en particular puede ser determinada por su secuencia de aminoácidos primaria.

45 Los fragmentos peptídicos también pueden ser establecidos empíricamente a través de espectros de MS de proteínas objetivo digeridas. Una realización particular de la invención podría ser la selección de un péptido cuya secuencia es interna de sitios de escisión proteolíticos predichos. Para la selección empírica de fragmentos peptídicos para una identificación de proteínas objetivo, las muestras de proteínas digeridas pueden ser sometidas a espectrometría de masas para determinar fragmentos peptídicos que provean la sensibilidad de detección y especificidad para la identificación de proteínas multiplex requeridas. En general, los péptidos ionizados más abundantes son preferidos para la selección. La abundancia de un péptido ionizado en particular es una función de la abundancia del péptido y de la eficiencia de la ionización del péptido.

Las proteínas de interés en un producto apilado serán expresadas en diferentes niveles uno con respecto a otro. Los péptidos detectados derivarán de las proteínas individuales que están siendo expresadas en concentraciones variables y algunas veces desconocidas. La detección de péptidos y proteínas variará desde las concentraciones attomolares a micromolares. La muestra puede ser una matriz de planta cruda extraída de diversos tejidos de interés.

5 V. Análisis por MRM direccionado

Una vez que uno o más fragmento polipeptídicos de una proteína objetivo son identificados para ser determinados durante el análisis multiplex, se desarrolla un análisis por MRM direccionado para la proteína objetivo. Preferiblemente, el análisis por MRM direccionado para una proteína objetivo dada identificará aquellos péptidos seleccionados previamente que son los iones fragmentarios más abundantes. Cada péptido objetivo que va a ser determinado de un análisis multiplex puede, por lo tanto, tener un análisis por MRM específico que se desarrolla para identificar iones fragmentarios únicos de ese péptido objetivo. El análisis multiplex ocurre a través de un análisis por MRM concurrente que incluye fragmentos de péptidos tipo identificador únicos específicos para dos o más proteínas objetivo en la muestra de tejido vegetal. Preferiblemente, el análisis multiplex identificará concurrentemente aquellos péptidos específicos de la proteína objetivo que muestran ionización y fragmentación eficiente por análisis tanto en presencia como en ausencia de la matriz compleja. Una proteína objetivo incluida en el análisis multiplex puede ser identificada con uno o más pares de transición de iones originales/hijos más específicos.

Un análisis multiplex MS/MS puede ser llevado a cabo entonces para múltiples proteínas objetivo en una mezcla compleja de proteínas. Debido a la sensibilidad y selectividad de la espectrometría de masas, una muestra de proteína compleja que va a ser sometida a análisis multiplex por MS/MS no necesita estar tan pura o ser tan abundante como una muestra que va a ser analizada por técnicas convencionales, tales como inmunquímica o PCR. Se divulgan métodos para preparar una muestra compleja de proteínas que va a ser sometida a análisis multiplex por MS/MS tal como, *inter alia*, extracción con sales (por ejemplo, bicarbonato de amonio), extracción con sales en la presencia de urea, y extracción con detergentes (por ejemplo, CHAPS), u otros métodos de tipo enriquecimiento.

El material vegetal a partir del cual se prepara una muestra de proteínas en multiplexión es un tejido de interés a partir de una planta transgénica.

El análisis multiplex por MS se lleva a cabo sobre la muestra de proteína compleja. La muestra de proteína compleja es inyectada en una cámara de ionización del MS en la cual se introduce un primer ión (original). El ión original puede ser detectado directamente en una primera MS, o puede ser aislado por la primera MS, fragmentado en iones hijos característicos, y uno o más de los iones hijos es detectado en una segunda MS (MS/MS).

Los iones pueden ser detectados utilizando varios modos de detección. Por ejemplo, los iones seleccionados pueden ser detectados usando un modo de monitorización de iones selectivo (SIM) el cual incluye monitorización de reacciones múltiples (MRM) o monitorización de reacciones seleccionadas (SRM). Alternativamente, los iones pueden ser detectados utilizando un modo de barrido.

La relación masa a carga puede ser determinada utilizando un analizador de cuadrupolo. Por ejemplo, en un instrumento de "cuadrupolo" o "trampa de iones de cuadrupolo", los iones en un campo de frecuencia de radio oscilante experimentan una fuerza proporcional al potencial DC aplicado entre los electrodos, la amplitud de la señal RF y m/z. El voltaje y amplitud pueden ser seleccionados de tal manera que solo los iones que tengan un m/z particular viajen a través de la longitud del cuadrupolo, mientras que otros iones son objeto de deflexión. Así, los instrumentos de cuadrupolo pueden actuar como un "filtro de masa" y "detector de masa" para los iones inyectados en el instrumento.

La disociación inducida por colisión ("CID") se utiliza frecuentemente para generar los iones hijos para detección posterior. En CID, los iones originales ganan energía a través de colisiones con un gas inerte, tal como argón, y subsecuentemente son fragmentados por un proceso denominado como "descomposición unimolecular". Debe depositarse suficiente energía en el ión original de tal manera que ciertos enlaces dentro del ión puedan ser rotos debido a la energía vibracional incrementada.

En MS/MS, los iones originales son seleccionados en el primer análisis por MS. Estos iones originales seleccionados son pasados entonces a la celda de colisión para generar los iones hijos específicos del péptido para identificación y cuantificación. Bajo un conjunto dado de condiciones de ionización/fragmentación, los iones originales e hijos son producidos de una manera reproducible dando a la técnica MS/MS una capacidad analítica extremadamente poderosa.

El espectrómetro de masas provee típicamente al usuario con un barrido de iones; esto es, la abundancia relativa de

5 cada m/z en un rango dado (por ejemplo, 10 a 1200 amu). Los resultados de un ensayo con analito, esto es, un espectro de masas, pueden ser relacionados con la cantidad del analito en la muestra original por métodos numerosos conocidos en la técnica. Por ejemplo, dado que los parámetros de toma de muestra y análisis son controlados cuidadosamente, la abundancia relativa de un ión dado puede ser comparada con una tabla que convierte la abundancia relativa a una cantidad absoluta de la molécula original. Numerosos otros métodos para relacionar la presencia o cantidad de un ión con la presencia o cantidad de la molécula original son bien conocidos para las personas de experiencia normal en la técnica.

10 La selección del método de ionización puede determinarse con base en el analito que va a ser medido, tipo de muestra, el tipo de detector, la selección de modo positivo versus negativo, etc. Los iones pueden ser producidos utilizando una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, ionización de electrones, ionización química, bombardeo de átomos rápido, desorción de campo, e ionización de matriz asistida por desorción con láser (MALDI), ionización por desorción con láser potenciada en superficie (SELDI), ionización por electroaspersión con desorción (DESI), ionización de fotones, ionización por electroaspersión, y plasma inductivamente acoplado. La ionización por electroaspersión se refiere a métodos en los cuales una solución se hace pasar a través de una longitud corta de tubo capilar, cuyo extremo es aplicado a un potencial eléctrico altamente positivo o negativo. La solución que alcanza el extremo del tubo, es vaporizada (nebulizada) en un chorro o aspersión de gotitas muy pequeñas de solución en un vapor de solvente. Esta niebla de gotitas fluye a través de una cámara de evaporación la cual es calentada para evitar la condensación y para evaporar el solvente. A medida que las gotitas se hacen más pequeñas la densidad de carga superficial eléctrica se incrementa hasta el momento tal en que la repulsión natural entre cargas similares hace que los iones así como las moléculas neutras sean liberados.

20 El efluente de un LC puede ser inyectado directa y automáticamente (esto es, "en línea") en el dispositivo de electroaspersión. En algunas realizaciones, las proteínas contenidas en un efluente de LC son ionizadas primero por electroaspersión a un ión original. El primer cuadrupolo del MSMS es sintonizado para hacer un filtro de masas para los iones originales de las proteínas sometidas a multiplexión.

25 Los iones originales que pasan a través del primer cuadrupolo son ionizados entonces y/o fragmentados antes de pasar hacia el segundo cuadrupolo. En algunas realizaciones, los iones colisionan con una molécula de gas inerte en un proceso de disociación inducida por colisión (CID). Gases inertes adecuados incluyen, por ejemplo, argón, helio, nitrógeno, etc. De manera deseable, los iones originales de proteínas objetivo sometidos a multiplexión son fragmentados en iones hijos que son detectados subsecuentemente.

30 VI. Mantenimiento de una variedad de planta transgénica

Los métodos de la presente divulgación pueden ser utilizados para mantener el genotipo de variedad de planta transgénica. Las muestras de proteína complejas preparadas a partir de una generación siguiente de una planta transgénica pueden ser sometidas a análisis multiplex por MSMS para determinar la presencia o ausencia de una proteína de interés. Las muestras de proteína complejas pueden comprender proteínas transgénicas expresadas en una planta transgénica. Al propagar estas plantas en donde la presencia de una proteína transgénica de interés está confirmada, la expresión de la proteína transgénica de interés en sus generaciones sucesivas está garantizada. De la misma manera, aquellas plantas de una siguiente generación en donde la presencia de una proteína transgénica de interés no puede ser confirmada no pueden ser propagadas.

40 El método incluye: (i) proveer datos espectrales de masas para uno o más productos esperados de expresión transgénica en la variedad de plantas transgénicas de acuerdo con la presente invención, y subsecuentemente (vii) proveer una primera inyección de una muestra compleja que comprende proteínas de una segunda generación de la variedad de planta transgénica; (viii) repetir las etapas (iii)-(vi) con la muestra compleja que comprende proteínas de la segunda generación de la variedad de planta transgénica; y (ix) dejar de propagar la segunda generación de la variedad de planta transgénica si la presencia de los productos esperados de expresión transgénica no puede ser confirmada en los datos espectrales de masas para los péptidos de la muestra de proteína compleja de la segunda generación de la variedad de planta transgénica, manteniendo por lo tanto el genotipo de la variedad de planta transgénica.

45 VI. Selección de resultados de un procedimiento de transformación de plantas

Los métodos de la presente divulgación también pueden ser usados para seleccionar rápidamente los resultados de un procedimiento de transformación de planta con alto rendimiento. Debido a la variabilidad en las características del genotipo y expresión en plantas GE y en células vegetales producidas por recombinación de ADN, las plantas y las células vegetales producidas por un procedimiento de transformación de plantas no comprenderán necesariamente los

mismos o similares perfiles de expresión de las proteínas transgénicas introducidas, por ejemplo, proteínas heterólogas. Adicionalmente, las proteínas endógenas pueden exhibir perfiles de expresión alterados de manera diferencial. En algunas realizaciones de la presente divulgación, las muestras de proteína compleja se preparan a partir de plantas, tejidos vegetales o células vegetales producidas por un procedimiento de transformación de plantas. Las muestras de proteína complejas preparadas pueden ser sometidas entonces a un análisis multiplex por MS/MS. Los espectros de MS de las diferentes muestras son analizados entonces para identificar aquellas muestras que exhiben características de expresión deseables. La planta, tejido vegetal o células vegetales fuente de las muestras identificadas pueden ser propagados entonces para seleccionar las características de expresión deseables.

VIII. Obtención del bioconfinamiento de los transgenes

- 10 Los transgenes pueden escaparse de una planta transgénica e integrarse en el genoma de plantas circundantes no transgénicas en el ambiente, por ejemplo, por polinización cruzada. En la mayoría de los casos, esto es indeseable. Los métodos de la presente divulgación pueden ser utilizados para alcanzar el bioconfinamiento de transgenes en una planta transgénica. En estas y en realizaciones adicionales, las muestras de proteína complejas pueden ser preparadas a partir de plantas, tejidos vegetales o células vegetales que están en riesgo de ser contaminadas por material genético de una planta transgénica. Las muestras de proteína complejas preparadas pueden ser sometidas entonces a un análisis multiplex por MS/MS. Los espectros de MS de las diferentes muestras son analizados entonces para determinar aquellas muestras que contienen una proteína transgénica objetivo, por ejemplo, una proteína transgénica expresada en la planta transgénica. La presencia de la proteína transgénica de una muestra está correlacionada con el escape del transgén a las plantas, tejidos vegetales o células vegetales fuente. Por destrucción, confinamiento, u otra limitación del crecimiento de las plantas, tejidos vegetales o células vegetales contaminados, puede lograrse el bioconfinamiento.

Ejemplos

Ejemplo I

- 25 Se seleccionaron seis proteínas transgénicas separadas (Cry1F, Cry34, Cry35, AAD-1, AAD-12 y PAT) para desarrollar un análisis multiplex por LC\MS\MS. Las proteínas individuales fueron detectadas e identificadas por espectroscopia de masas en una inyección sencilla de una mezcla de proteínas compleja.

- 30 La primera versión del análisis multiplex fue llevada a cabo por digestión proteolítica de las seis proteínas individualmente, y luego fortificando los péptidos de proteína resultantes en extractos de tejidos vegetales digeridos proteolíticamente y utilizando LC\MS\MS para la detección de los iones de precursor/fragmentos específicos para cada una de las seis proteínas en una inyección sencilla. La metodología desarrollada durante esta primera versión multiplex fue aplicada entonces hacia la detención multiplex de cuatro proteínas expresadas en material de reproducción de maíz endogámico corriente.

Ejemplo II

Detección multiplex por LC\MS\MS en planta

- 35 La Tabla 1 presenta una lista de concentraciones de cada proteína de reserva individual recibida, y las diluciones resultantes de cada proteína por digestión con tripsina. Antes de la digestión con la proteasa tripsina, todas las proteínas fueron intercambiadas por regulación en bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7.9 (SIGMA) para asegurar condiciones de digestión eficientes. Una alícuota de cada una de las proteínas de reserva (véase la Tabla 1) fue transferida a un tubo de eppendorf estéril de 1.5 mL y llevada a 100 μ L utilizando bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7.9. Se utilizaron columnas Zeba Desalt Spin (Pierce # 89882) para el intercambio regulado de cada proteína según las recomendaciones del fabricante. Se llevaron a cabo tres lavados por rotación de la columna Zeba, utilizando en cada lavado 300 μ L de bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7.9, y rotación a 1500 g durante un minuto. La alícuota de 100 μ L para cada proteína de la muestra fue aplicada entonces a la superficie de la resina de la columna Zeba y se hizo rotar a 1500 g durante 2 minutos. Este material intercambiado con regulador fue luego utilizado directamente para la digestión con tripsina para la generación de fragmentos peptídicos de proteína. La digestión inicial con tripsina de las seis proteínas no incluyó una etapa de protocolo para alquilar los residuos del aminoácido cisteína. Esta etapa de alquilación puede ser incorporada posteriormente, pero con un análisis de alto rendimiento como meta, dejando la etapa de alquilación por fuera se ahorraría tiempo y esfuerzo significativos hacia el análisis final. Cada muestra de proteína intercambiada con regulador de 100 μ L fue llevada a DTT 5 mM con la adición de 1 μ L de DTT 0.5 M, luego desnaturalizada por calor a 95°C durante 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente (25°C). La tripsina modificada de grado secuenciamiento fue resuspendida en bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7.9, hasta una concentración de 0.4 μ g/ μ L. La enzima tripsina fue

agregada a cada muestra de proteína para un rango de relación de enzima final a sustrato de 1:20 a 1:50. La digestión con tripsina fue llevada a cabo en un termociclador utilizando un perfil de temperatura de 37°C durante 16 horas, y luego enfriada a 4°C. Después de la digestión con tripsina, se agregaron 3µL de ácido fórmico al 10% a cada digestión de proteína.

5 Tabla 1: concentraciones de proteína y diluciones para cada digestión con tripsina de proteína multiplex-6 por LC\MS\MS

Nombre	[reserva] ug/ml	Volumen de reserva digerido (ml)	Digestión con tripsina Cantidad de proteína digerida (ug's)	volumen final de digestión 100ul factor de dilución de digestión	[digestión con tripsina] [proteína] de digestión (ug/ml)
Cry1F	160	0.01	1.6	1:10	16
Cry34	500	0.025	12.5	1:4	125
Cry35	187	0.045	8.415	1:2.2	85.0
AAD-1	4200	0.005	21	1:20	210
AAD-12	1000	0.02	20	1:5	200
PAT	300	0.033	9.9	1:3	100

10

Inicialmente, cada una de las seis muestras de proteína digeridas con tripsina fue analizada individualmente a través de ESI- LC\MS\MS para determinar los fragmentos de péptidos tripticos que proveerían la sensibilidad y especificidad de detección para la identificación multiplex simultánea de todas las seis proteínas en un análisis sencillo. El espectrómetro de masas usado para el desarrollo del método fue un Applied Biosystems MDS Sciex 4000 Q Trap de cuadrupolo triple híbrido (Foster City, CA modelo # 1004229-V), utilizando una carcasa fuente Turbo V ESI provista con una sonda TSI. Las muestras fueron introducidas en el espectrómetro de masas a través de un sistema de HPLC Agilent 1100. La Tabla 2 incluye el número de modelo y versión de firmware específicos para los diferentes componentes de la instrumentación.

Tabla 2: Información de modelo/versión de firmware para componentes del instrumento.

Espectrómetro de masas	4000 Q TRAP
Versión de Firmware	M401402 B4T0301 M3L1412 B3T0300
Nombre del Componente	Espectrómetro de masas LC/MS/MS con Cuadrupolo con Trampa de Iones Lineal
ID del Componente	4000 Q TRAP
Fabricante	AB Sciex Instruments
Modelo	1004229-V
Automuestreador	Agilent 1100 G1367A
Versión de Firmware	A.05.04

Bomba Enlazada	G1312A
Horno de Columna	Agilent 1100 G1316A
Versión de Firmware	A.05.05
Válvula	Instalado
Bomba	Agilent 1100 G1312A
Versión de Firmware	A.05.04

5 La cromatografía en fase reversa fue llevada a cabo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Phenomenex Jupiter Proteo 50 X 2.0 mm 4 µM con una condición de carga de 95% a (H₂O/0.1% de ácido fórmico)/5% B (acetonitrilo/0.1% de ácido fórmico) durante 1 minuto, y con un gradiente hasta 90% de B durante 5 minutos. La columna fue regenerada con 2 minutos manteniendo a B en 90%, y luego reequilibrando a B en 5% durante 5 minutos. Para la selección inicial de péptidos proteínicos individuales, se cargaron aproximadamente 10-50 fmol de cada proteína se cargó sobre la columna para análisis.

10 Se ejecutó un método de adquisición IDA que incorpora dos barridos EPI sobre los dos iones más abundantes detectados a partir de una lista de transiciones MRM específicas a cada una de las seis proteínas que iban a ser sometidas a multiplexión. Estos datos de fragmentación eran informativos para seleccionar los iones fragmentarios que demuestran la abundancia más alta de cada péptido detectado. En general, los tres fragmentos mayores de un péptido precursor detectados fueron seleccionados para el desarrollo posterior del método. Para esta adquisición IDA, el Sciex 4000 Q TRAP incorporó las siguientes condiciones: voltaje IS 5500, DP 75, EP 10, CXP 12, CUR 10, CAD HIGH, TEM 450, GS1 35, GS2 35, unidad RES Q1 y unidad RES Q3. Los valores de CE para cada péptido fueron probados empíricamente con un valor óptimo utilizado para cada péptido. Al utilizar los datos de fragmentación de péptidos acumulados a partir de los análisis IDA individuales de cada una de las seis proteínas, se llevó a cabo entonces un análisis por MRM de cada proteína individual para identificar los iones precursores de cada proteína con buenas eficiencias de ionización. Para cada proteína multiplex se utilizó una lista MRM de todos los péptidos trípticos para crear un método de análisis MRM individual. Utilizando los datos de análisis MRM para proteína individuales como medida de la eficiencia de la ionización se seleccionaron péptidos para cada proteína que sirvieran como iones precursores en un formato multiplex. Los péptidos multiplex aparecen en la lista de la tabla 3.

Tabla 3: Péptidos seleccionados para el método LC\MS\MS multiplex-6 inicial.

Proteína/péptidos en multiplexión	
AAD-1 ((R)-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa)	
T6	FGPVDPVPLLK
T7	SIEGYPEVQMIR
T12	VFGSLYQAQNR
AAD-12 ((S)-2,4-diclorofenoxipropionato/alfa-cetoglutarato dioxigenasa)	
T4	IGGGDIVAISNVK
T9	AAYDALDEATR
T19	AEPWDFK

Cry1F (Proteína cristalina de pesticida cry1Fa (delta-endotoxina Cry1F(a) Insecticida))	
T22	TYPIQTSSQLTR
T46	IFAGQFNK
Cry34 (proteína en cristal ET79 [<i>Bacillus thuringiensis</i>])	
T7	TSPTNVANDQIK
Cry35 (similar a Cry35Ab [<i>Bacillus thuringiensis</i>])	
T9	VLTAGTGQALGLIR
T17	YQYWQR
PAT (Fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa))	
T2	TEPQTPQEWIDDLER
T8	LGLGSTLYTHLLK
T10	SVVAVIGLPNDPSVR

Ejemplo III

5 Un análisis de MRM direccionado multiplex sencillo por LC\MS\MS para todas las seis proteína DAS fue creado entonces utilizando los datos de iones de precursor/fragmentos generados a partir de análisis de proteínas individual. Estos péptidos fueron primero detectados por LC\MS\MS multiplex fortificando con regulador de bicarbonato de amonio (25 mM pH7.9), material digerido con tripsina para cada una de las seis proteínas. Se inyectaron aproximadamente 5-20 fmol de cada proteína sobre la columna para análisis multiplex-6 inicial del regulador fortificado.

10 Las figuras 1-6 muestran los cromatogramas de iones extraídos para cada una de las seis proteínas detectadas en una inyección sencilla. Específicamente, la figura 1 muestra la detección multiplex por LC\MS\MS de AAD-1. Los datos son un cromatograma de iones por LC\MS\MS extraídos para AAD-1 ((R)-2,4-dichlorofenoxipropionato dioxigenasa), detectado en una inyección sencilla con AAD-12, Cry1F, Cry34, Cry35, y PAT en extracto de semillas de maíz.

La figura 2 muestra la detección multiplex por LC\MS\MS de AAD-12. Los datos son un cromatograma de iones por LC\MS\MS extraídos para AAD-12 ((S)-2,4-diclorofenoxipropionato/alfa-cetoglutarato dioxigenasa), detectados en una inyección sencilla con AAD-1, Cry1F, Cry34, Cry35, y PAT en extracto de semillas de maíz.

15 La figura 3 muestra la detección multiplex por LC\MS\MS de Cry1F. Los datos son un cromatograma de iones por LC\MS\MS extraídos para CRY1F (Proteína cristalina pesticida cry1Fa delta-endotoxina insecticida Cry1F(a)), detectados en una inyección sencilla con AAD-1, AAD-12, Cry34, Cry35, y PAT en extracto de semillas de maíz.

20 La figura 4 muestra la detección multiplex por LC\MS\MS de Cry34. Los datos son un cromatograma de iones por LC\MS\MS extraídos para Cry34 (proteína cristalina ET79 [*Bacillus thuringiensis*]), detectados en una inyección sencilla con AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry35, y PAT en extracto de semillas de maíz.

La figura 5 muestra la detección multiplex por LC\MS\MS de Cry35. Los datos son un cromatograma de iones por LC\MS\MS extraídos para Cry35 (similar a Cry35Ab [*Bacillus thuringiensis*]), detectado en una inyección sencilla con AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry34, y PAT en extracto de semillas de maíz.

La figura 6 muestra la detección multiplex por LC\MS\MS de PAT. Los datos son un cromatograma iónico por LC\MS\MS para Cry35 (Fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa)), detectado en una inyección sencilla con AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry34, y Cry35 en extracto de semillas de maíz.

- 5 Después de confirmar la detección multiplex por LC\MS\MS de todas las seis proteínas, la mezcla de péptidos en bicarbonato de amonio fue diluida en un extracto digerido con proteasa de tejidos de semilla de maíz para la detección en matriz de semillas. El tejido de semillas utilizado fue de material endógeno corriente. La muestra fortificada fue diluida 1:10 en bicarbonato de amonio y luego 1:2 en extracto de semillas de maíz con aproximadamente 0.2 a 1 fmol de cada proteína siendo inyectada en la columna y detectada utilizando el método multiplex LC\MS\MS.

Ejemplo IV

- 10 Cuatro proteínas transgénicas separadas (Cry1, Cry34, Cry35 y PAT) fueron detectadas e identificadas por espectrometría de masas en una inyección sencilla en una muestra de proteína compleja a partir de materiales vegetales endógenos (5XH751XT). La proteína fue detectada en tejido de hojas y de semillas.

- 15 La metodología multiplex-6 en la lista más arriba fue utilizada para detectar la presencia de cuatro proteínas transgénicas separadas (Cry1F, Cry34, Cry35, y PAT) en una inyección sencilla de una muestra de proteínas compleja a partir de material vegetal de línea endógena (5XH751XT). En este esfuerzo, se desarrolló un método multiplex 4 de inyección sencilla para medir la presencia de las cuatro proteínas tanto en tejido de semillas de maíz como de hojas de maíz. Los controles experimentales involucraron la comparación con extracto 5XH751 nulo maximizado con proteínas transgénicas enteras antes de la digestión, y por comparación con extracto 5XH751 nulo.

- 20 Para este experimento, también se tuvo en consideración la metodología de extracción requerida para el rendimiento analítico robusto del método multiplex. Puesto que la detección multiplex es simultáneamente la medición de proteínas múltiples a partir de cada muestra individual, el método de extracción de proteínas usado necesita ser eficiente para todas las proteínas para una medición exacta. Como se muestra en la figura 11, las condiciones de extracción fueron probadas en tejidos tanto de hojas de maíz como de sus semillas. Se probaron tres condiciones de extracción separadas en un intento de comenzar a entender cómo estas cuatro proteínas se comportarían con respecto al hallazgo de un método de extracción sencillo para acomodar factores tales como estabilidad, solubilidad, hidrofobicidad de la proteína.

- 25 Lo atractivo de una extracción de proteínas sencilla con bicarbonato de amonio es la capacidad de ir directamente desde la etapa de extracción a la digestión con proteasa sin preocuparse de la supresión de señales de vida a un componente del regulador durante el análisis por MS. Esto podría reducir los costes pero, lo que es más importante reduce el tiempo de preparación y la variabilidad posible en la que se incurrió durante el intercambio con regulador. El regulador de urea 8M fue probado para determinar si se requería un método de solubilización agresivo para detectar todas las cuatro proteínas en tejidos vegetales. Se utilizó el PBS-T como es convencional en los métodos de detección por ELISA.

- 30 Tejido de hoja 5XH751XT: el tejido de hojas fue recolectado a partir de una planta de invernadero V6-V7 y triturado bajo nitrógeno líquido. Cada peso de prueba de muestra de hojas fue de 1.5 g. Cada regulador de extracción (figura 11) fue probado en una relación 2:1 regulador/muestra (3mL). Las muestras fueron sometidas a vórtex durante 2 minutos, y luego se hicieron rotar durante 2 minutos, y se recolectaron los sobrenadantes.

- 35 Tejido de semilla 5XH751XT: el tejido de semillas maduras fue obtenido y pulverizado en un molino de bolas. Cada peso de prueba de muestra de semilla fue de 1.5 g. Cada regulador de extracción (figura 11) fue probado a una relación 2:1 regulador/muestra (3mL). Las muestras fueron sometidas a vórtex durante 2 minutos, y luego se hicieron rotar durante 2 minutos, y se recolectaron los sobrenadantes.

- 40 Las muestras extraídas en urea 8M o PBS-T fueron intercambiadas con regulador en bicarbonato de amonio 25 mM utilizando filtros de rotación Pierce Zeba. Para todas las muestras, 50 µL de extracto de tejido fueron digeridos con tripsina con 10 µg de tripsina (eliminar) en un volumen total de 110 µL de bicarbonato de amonio. La digestión de la proteína fue llevada a cabo a 37°C durante 16 horas y luego enfriada a 4°C. Para servir como control positivo para cada una de las cuatro proteínas que iban a ser detectadas por multiplex, se preparó una mezcla cóctel que contenía aproximadamente 50 µg/mL de cada una de las proteínas enteras individuales utilizando estándares de proteína purificados. Se hizo una dilución final 1:10 del cóctel tanto en la muestra de extracto de hojas nula como en la muestra de extracto de semillas nula para una concentración de control positiva de matriz de aproximadamente 5 µg/mL. Estos nulos fortificados sirvieron como controles positivos produciendo tiempos de retención por LC de péptidos exactos y datos de fragmentación en secuencia por MS/MS cuando se compararon con controles de tejidos nulos (control negativo) y las extracciones de tejido de maíz 5XH751XT. Puesto que todas las cuatro proteínas que iban a ser

sometidas a multiplexión detectadas en 5XH751XT fueron proteínas también utilizadas para desarrollar el método LC/MS/MS multiplex-6 anterior, no se requirió de un desarrollo adicional para determinar cuáles iones de péptidos/fragmentos específicos de la proteína detectar y bajo qué condiciones de instrumentación.

5 El método de multiplex-6 descrito más arriba fue utilizado para analizar los extractos de tejido de hoja y de semilla 5XH751XT. Las figuras 7-10 son un subconjunto de los datos adquiridos utilizando el análisis por inyección sencilla multiplex-4 LC-MS/S para detectar las proteínas Cry1F, Cry34, Cry35 y PAT expresadas en tejido de hojas y semillas de maíz endogénico.

10 Específicamente, la figura 7 muestra la detección multiplex por LC-MS/MS de Cry1F, expresado en tejido de maíz endogénico. Los datos son un espectro de MS/MS específico para Cry1F multiplex identificado en tejido de hojas de maíz 5XH751 extraído con bicarbonato de amonio 25 mM. Se detectaron tres iones de fragmentos específicos de Cry1F T22, solo un fragmento de los cuales se muestra aquí. Después se muestran controles positivos y negativos para la transición MS/MS.

15 La figura 8 muestra la detección multiplex LC-MS/MS de Cry34, expresado en tejido de maíz endogénico. Los datos son espectros MS/MS específicos para Cry34, identificado por multiplex en tejido de hoja de maíz 5XH751 extraído con bicarbonato de amonio 25 mM. También se muestran controles positivos y negativos para la transición MS/MS. Se detectaron 5 iones de fragmentos específicos de Cry34 T7, de los cuales solo uno se muestra aquí. El ligero desplazamiento en el tiempo de retención entre la muestra de 5XH751XT y el control positivo fortificado con Cry34 no es inesperado para una proteína que eluye en la región temprana más hidrofílica del gradiente de fase reversa. El pico mostrado en el panel de control de hoja nula es un pico no específico según se determina por el gran desplazamiento
20 (~7 minutos) en el tiempo de retención desde la columna. Ninguno de los otros cuatro iones de fragmentos de Cry34 tuvo picos no específicos.

25 La figura 9 muestra la detección multiplex por LC-MS/MS de Cry35, expresado en tejido de maíz endogénico. Los datos son un espectro de MS/MS específico para Cry35, identificado por multiplex en tejido de hoja de maíz. También se muestran controles positivos y negativos para la transición MS/MS. Los datos mostrados son de tejido de hoja 5XH751 extraída con bicarbonato de amonio 25 mM. Se detectaron tres iones de fragmentos específicos de Cry35 T9, solo uno de los cuales se muestra aquí.

La figura 10 muestra detección multiplex por LC-MS/MS de PAT, expresado en tejido de maíz endogénico. Los datos son un espectro de MS/MS específico para PAT, identificado por multiplex en tejido de hoja de maíz. También se muestran los controles positivo y negativo para la transición MS/MS.

30 Para cada proteína, se detectó y fragmentó un péptido precursor específico, con tres a cinco iones fragmentarios correspondientes detectados para asegurar la configuración de la secuencia de proteínas. Las figuras 7, 8, 9 y 10 demuestran cada una un espectro MS/MS específico para una de las cuatro proteínas multiplex identificadas en tejido de maíz. Cada figura también demuestra el control positivo y negativo apropiado para la transición MS/MS particular. Dos de las cuatro proteínas fueron detectadas en el tejido de semilla. La incapacidad para detectar dos de las cuatro
35 proteínas fue debida probablemente a una baja expresión, como lo demuestran los datos históricos de expresión más baja de estas cuatro proteínas en semillas en comparación con el tejido de hoja.

Ejemplo V

40 Una variedad de planta transgénica es mantenida confirmando la presencia de dos proteínas de interés en una siguiente generación de la variedad vegetal. Se selecciona una planta transgénica en donde la planta transgénica comprende dos proteínas transgénicas de interés (A y B). Las muestras de las proteínas A y B son preparadas y sometidas a análisis por LC/MS/MS. A partir de los espectros de MS resultantes, los iones peptídicos fragmentarios de las proteínas originales son seleccionados para análisis direccionado por MS/MS.

45 Una muestra de proteína compleja es preparada a partir de una primera generación de la planta transgénica, y la muestra de proteína compleja es sometida a un análisis multiplex por LC/MS/MS, en donde los iones peptídicos fragmentarios seleccionados de las proteínas A y B son identificados determinando la presencia de los iones peptídicos fragmentarios seleccionados en los espectros MS. Las muestras de proteína complejas son preparadas entonces a partir de plantas de una siguiente generación de la planta transgénica. Las muestras de proteína complejas de estas plantas de la siguiente generación son sometidas a un análisis multiplex por LC/MS/MS. Aquellas plantas de la siguiente generación, de las cuales las muestras de proteína complejas preparadas produjeron los espectros MS en donde la
50 presencia de ambas proteínas A y B fue identificada a partir de la presencia de los iones peptídicos fragmentarios

seleccionados, son propagadas para mantener la variedad de la planta transgénica. Aquellas plantas de la siguiente generación, de las cuales las muestras de proteína preparadas produjeron espectros en donde la presencia de ambas proteínas A y B no fue identificada, no son propagadas para mantener la variedad de la planta transgénica.

Ejemplo VI

- 5 Los transformantes resultantes de un procedimiento de transformación de plantas son seleccionadas para determinar la presencia de dos proteínas objetivo de interés. Dos proteínas objetivo (A y B) son sometidas a análisis por LC/MS/MS. A partir de los espectros MS resultantes, se seleccionan los iones peptídicos fragmentarios de las proteínas objetivo originales para el análisis por MS/MS direccionado.
- 10 Los transformantes putativos son obtenidos a partir de un procedimiento de transformación de plantas. Las muestras de proteínas complejas son preparadas a partir de cada uno de los transformantes putativos. Las muestras de proteína complejas de estos transformantes putativos son sometidas a un análisis multiplex por LC/MS/MS, en donde la expresión de las proteínas objetivo es determinada estableciendo la presencia de los iones peptídicos fragmentarios seleccionados. Esos transformantes, a partir de los cuales se producen los espectros MS de muestras de proteínas complejas preparadas en donde las características de expresión deseables de las proteínas A y B fueron determinadas a partir de la presencia de los iones peptídicos fragmentarios seleccionados, son propagados.
- 15

Ejemplo VII

Se logra el bioconfinamiento de transgenes en una planta transgénica. Dos proteínas objetivo (A y B) expresadas por una planta transgénica son sometidas al análisis por LC/MS/MS. A partir de los espectros de MS resultantes, los iones peptídicos fragmentarios de las proteínas objetivo originales son seleccionados para el análisis direccionado por MS/MS.

- 20 Se recolecta material vegetal de plantas que crecen en el ambiente que circunda la planta transgénica. Se preparan muestras de proteínas complejas a partir de este material vegetal. Las muestras de proteínas complejas de estos materiales vegetales son sometidas a análisis multiplex por LC/MS/MS, en donde la presencia de un transgén contaminante es determinada estableciendo la presencia de los iones peptídicos fragmentarios seleccionados de la proteína transgénica expresada. Las plantas a partir de las cuales se recolectó material que demostró mediante el análisis multiplex por LC/MS/MS contener la proteína transgénica contaminante son destruidas.
- 25

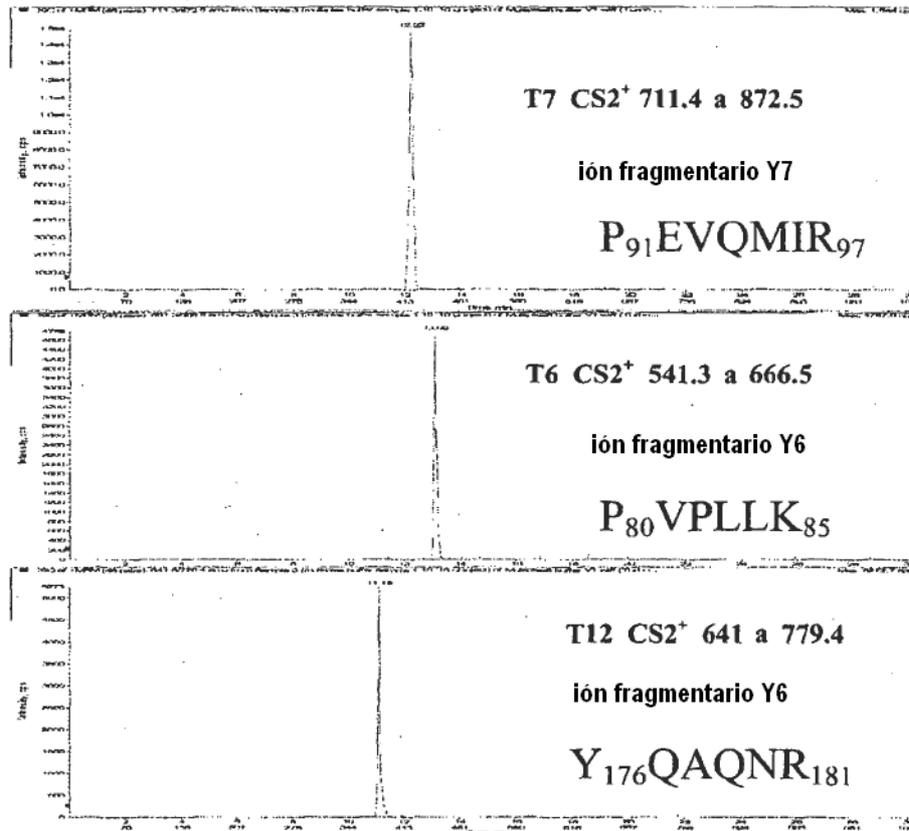
- 30 Alwine et al. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74:5350-54; Baldwin (2004) Mol. Cell. Proteomics 3(1):1-9; Carr and Annan (1997) Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. En: Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.21.1-10.21.27; Chang et al. (2000) Plant Physiol. 122(2):295-317; Domon and Aebersold (2006) Science 312(5771):212-17; Nain et al. (2005) Plant Mol. Biol. Rep. 23:59-65; Patterson (1998) Protein identification and characterization by mass spectrometry. En: Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.22.1-10.22.24; Paterson and Aebersold (1995) Electrophoresis 16: 1791-1814; Rajagopal and Ahern (2001) Science 294(5551):2571-73; Sesikeran and Vasanthi (2008) Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17 Suppl. 1:241-44; y Toplak et al. (2004) Plant Mol. Biol. Rep. 22:237-50.
- 35

Reivindicaciones

1. Un método de alto rendimiento para detectar la presencia de dos o más proteínas de interés con secuencias de aminoácidos conocidas en una muestra de origen vegetal a partir de una planta transgénica, comprendiendo el método:
- 5 i) proveer datos espectrales de masas para dos o más proteínas que son productos esperados de la expresión transgénica en la planta transgénica;
- ii) proveer una primera inyección de una muestra basada en plantas complejas que comprende proteínas, en donde la muestra es una matriz vegetal cruda extraída de un tejido de interés;
- iii) poner en contacto la matriz vegetal cruda con una proteasa para digerir las proteínas a péptidos;
- iv) inyectar la matriz vegetal cruda digerida en un dispositivo de LC-MS;
- 10 v) obtener datos espectrales de masas simultáneos para los péptidos;
- vi) comparar los datos espectrales de masas simultáneos de v) con los datos espectrales de masas provistos por las dos o más proteínas de interés, determinando de esta manera la presencia o ausencia de las dos o más proteínas de interés.
- 15 2. El método de la reivindicación 1 en donde las dos o más proteínas de interés son dos proteínas de interés o cuatro proteínas de interés.

FIG. 1

Detección de péptidos en multiplexión de proteína AAD-1/ iones fragmentarios



Proteína / Péptidos en multiplexión

AAD-1 ((R)-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa

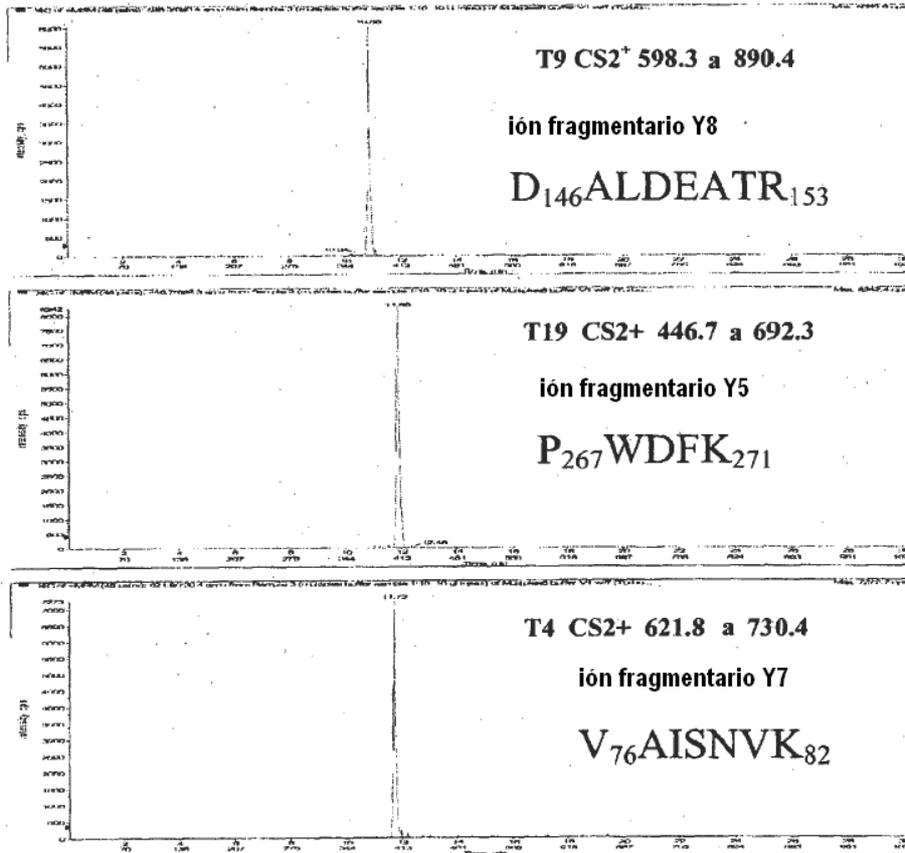
T6 FGPVDPVPLLK

T7 SIEGYPEVQMIR

T12 VFGSLYQAQNR

FIG. 2

Detección de péptidos en multiplexión de proteína AAD-12 / iones fragmentarios



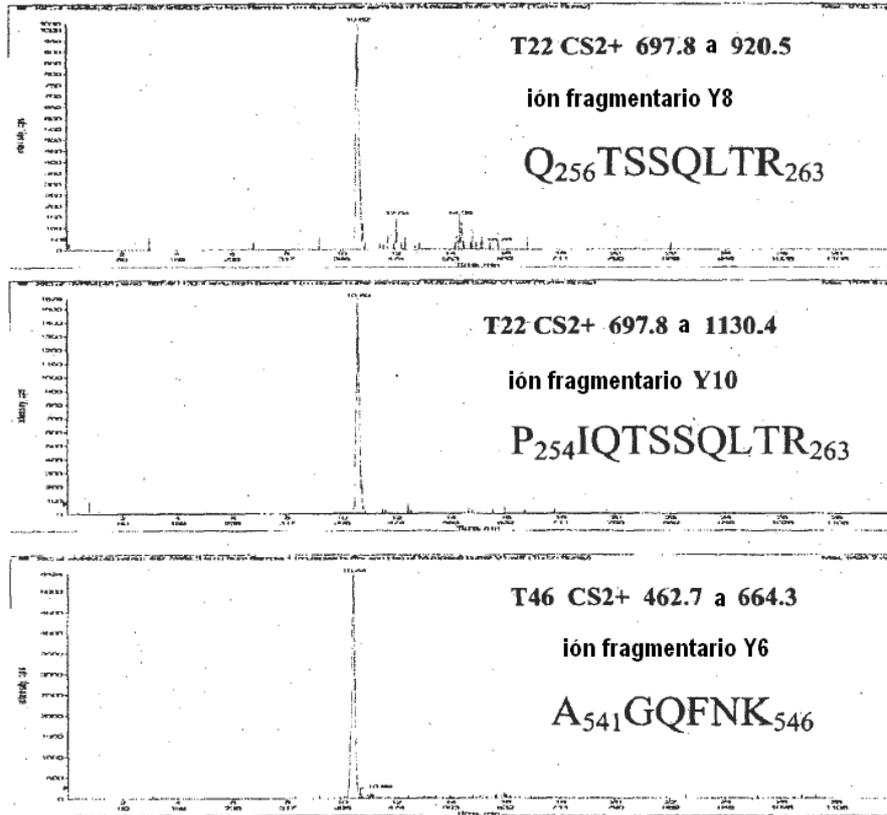
AAD12 (S)-2,4-diclorofenoxipropionato/alfa-cetoglutarato dioxigenasa

- T4 IGGDIVAISNVK
- T9 AAYDALDEATR
- T19 AEPWDFK

3/10

FIG. 3

Detección de péptidos en multiplexión de proteína Cry1F / iones fragmentarios



Cry1F (Proteína cristalina pesticida cry1Fa(delta-endotoxina insecticida Cry1F(a))

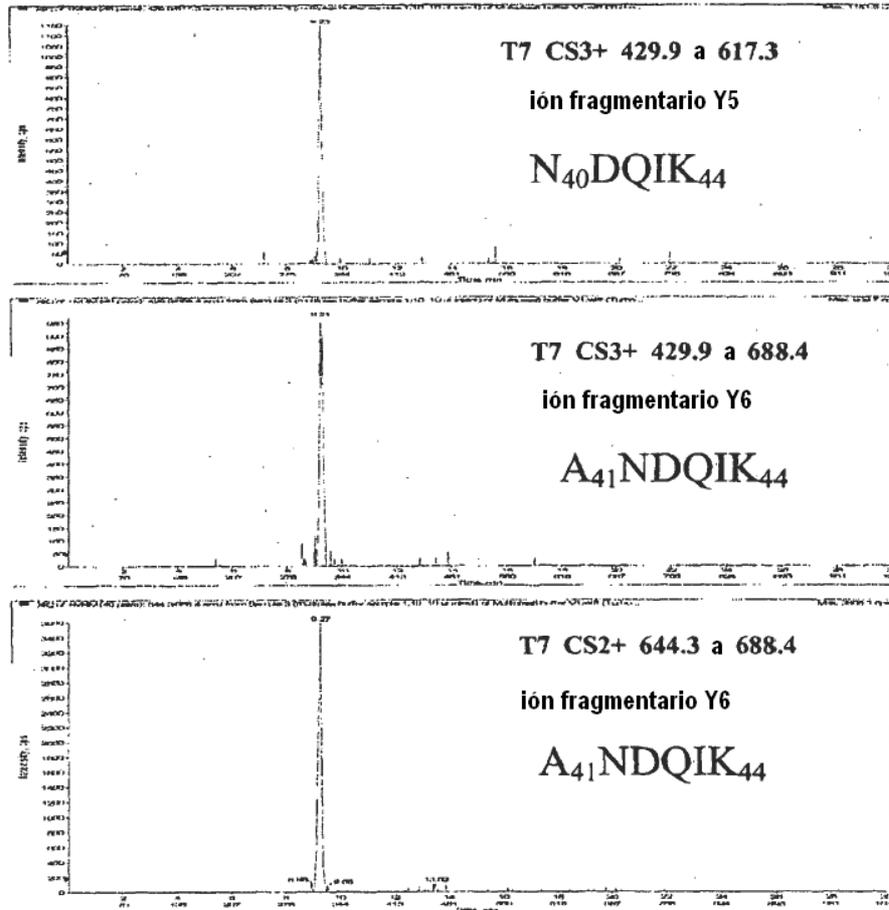
T22 TYPIQTSSQLTR

T46 IFAGQFNK

4/10

FIG. 4

Detección de péptido en multiplexión de proteína Cry34 y iones fragmentarios

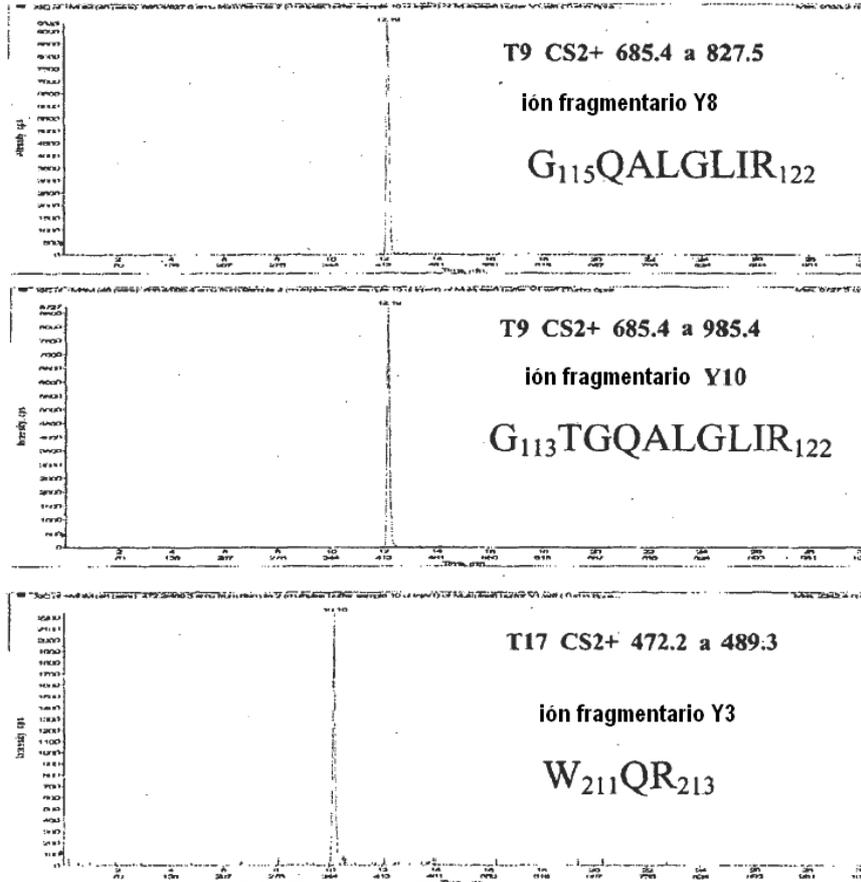


Cry34 (Proteína cristalina ET79 [Bacillus thuringiensis])

T7 TSPTNVANDQIK

FIG. 5

Detección de péptidos en multiplexión de proteína Cry35 / iones fragmentarios



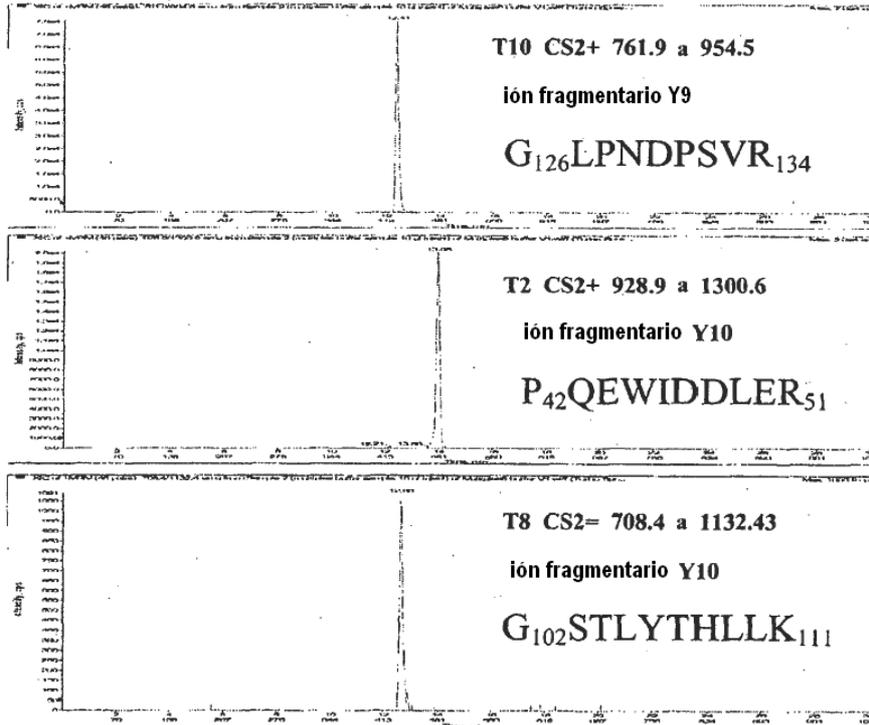
Cry35 (Similar a Cry35Ab [Bacillus thuringiensis])

T9 VLTAGTGQALGLIR

T17 YQYWQR

FIG. 6

Detección de péptidos en multiplexión de proteína PAT / iones fragmentarios



PAT (fosfotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa))

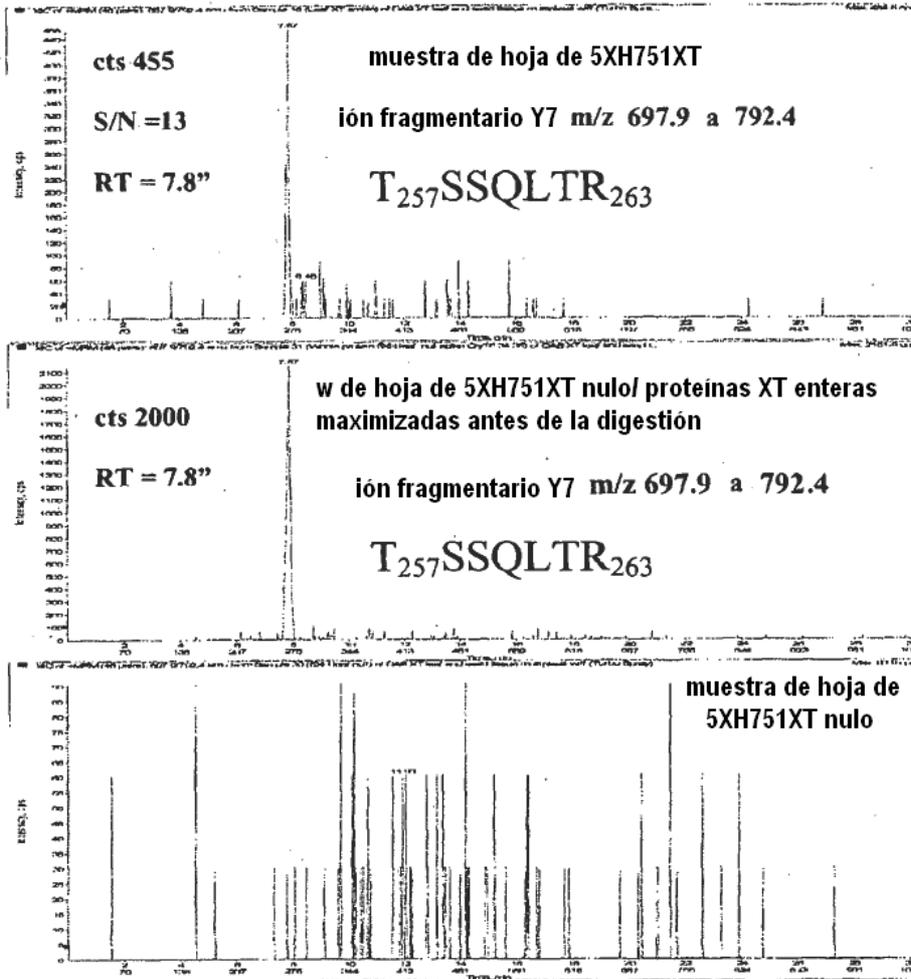
T2 TEPQTPQEWIDDLER

T8 LGLGSTLYTHLLK

T10 SVVAVIGLPNDPSVR

FIG. 7

Detección de Cry1F en 5XH751XT endogámico

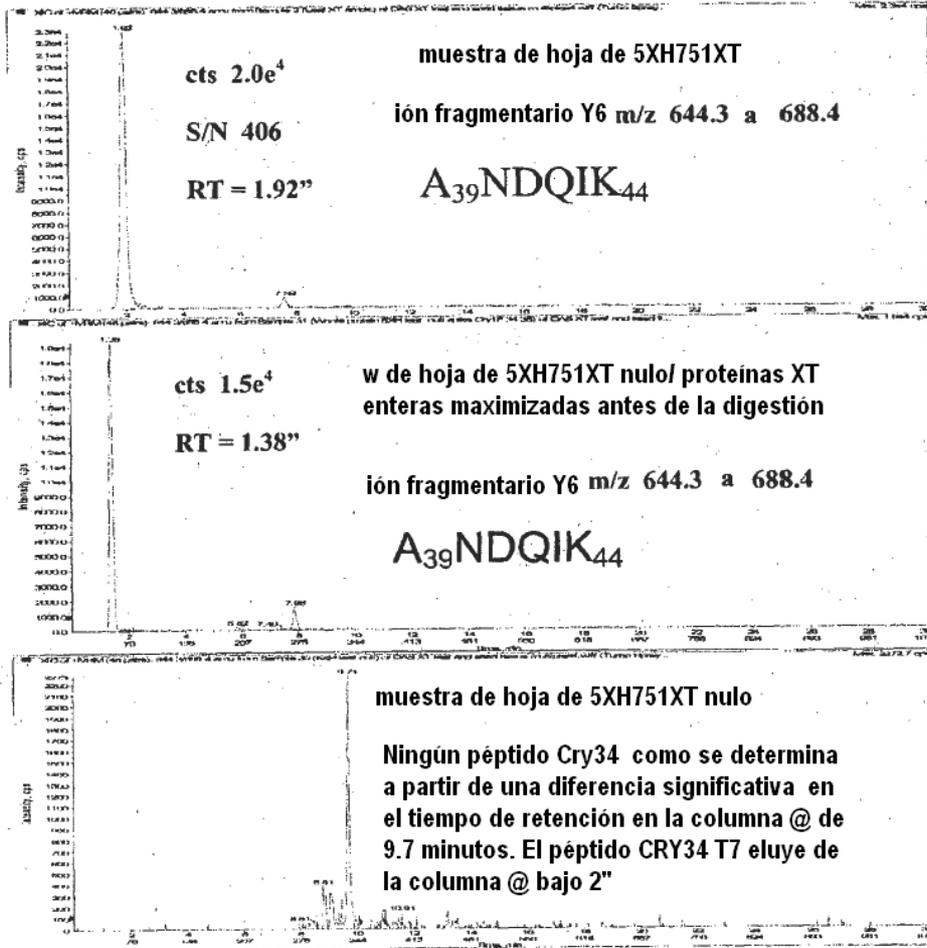


Cry1F (Proteina cristalina pesticida cry1Fa(delta-endotoxina insecticida Cry1F(a)))

T22 TYPIQTSSQLTR

FIG. 8

Detección de Cry34 en 5XH751XT endogámico



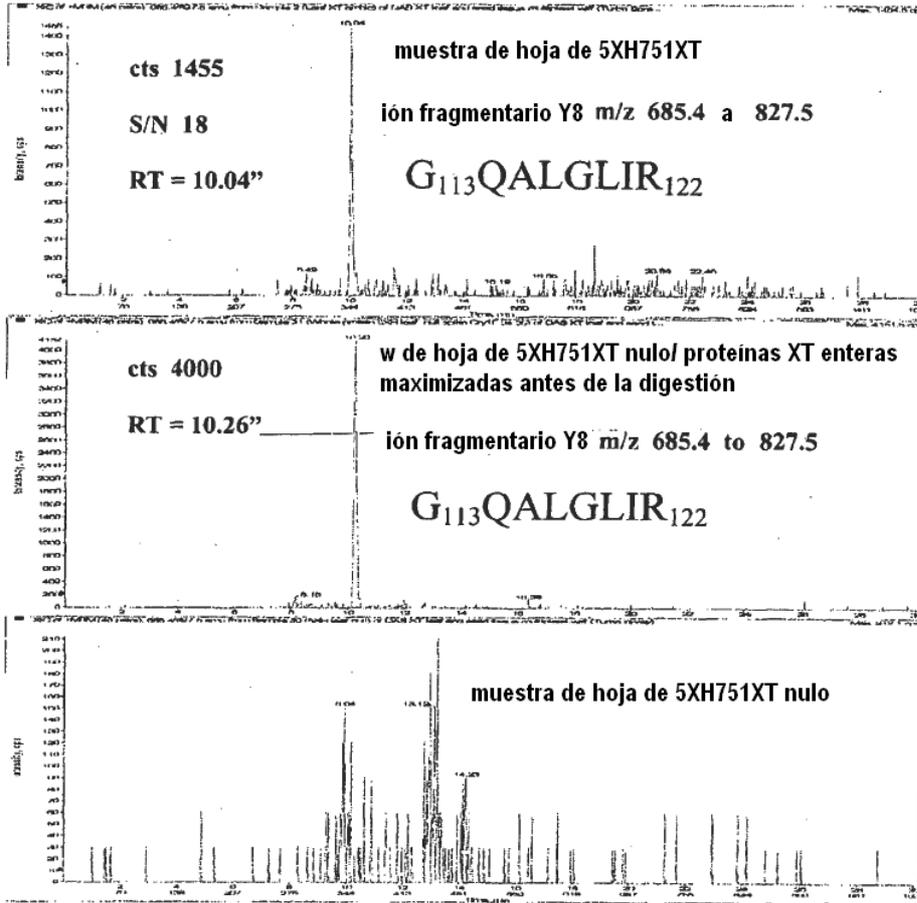
Cry34 (Proteína cristalina ET79 [Bacillus thuringiensis])

T7 TSPTNVANDQIK

9/10

FIG. 9

Detección de Cry35 en 5XH751XT endogámico

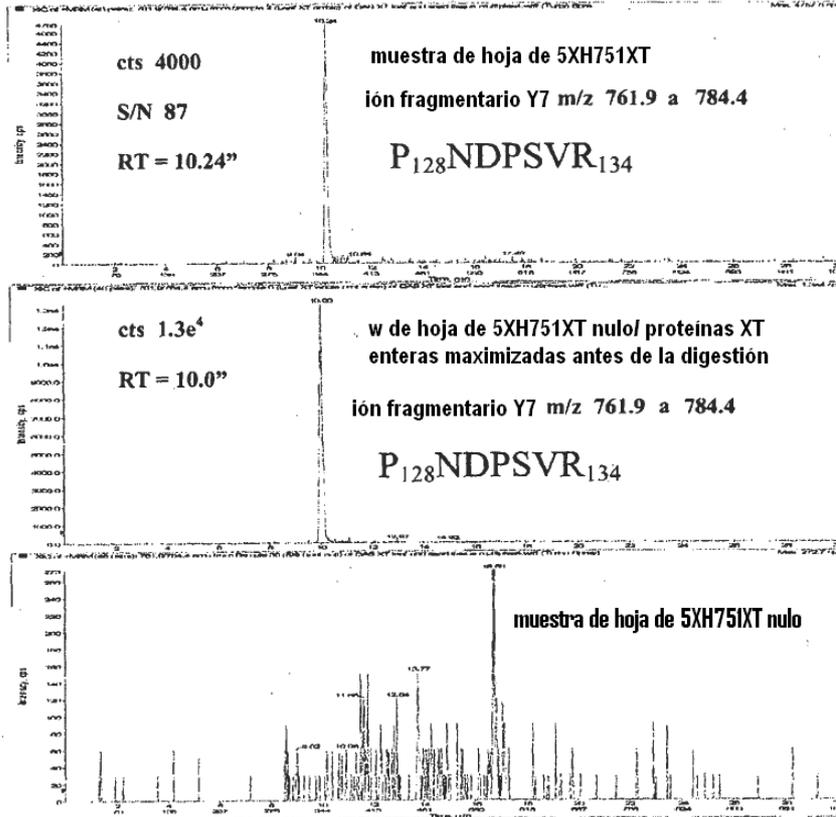


Cry35 (Similar a Cry35Ab [Bacillus thuringiensis])

T9 VLTAGTGQALGLIR

FIG. 10

Detección de PAT en 5XH751XT endogámico



PAT (fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa))

T10 SVVAVIGLPNDPSVR