

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 479**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2011** **PCT/US2011/065322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO2012083099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011** **E 11849627 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017** **EP 2651966**

54 Título: **Cry1Fa radiomarcada biológicamente activa y métodos de ensayo de unión al receptor**

30 Prioridad:

16.12.2010 US 423844 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

EVANS, STEVEN, L.;
LI, JIANQUAN y
SHEETS, JOEL, J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 620 479 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

Cry1Fa radiomarcada biológicamente activa y métodos de ensayo de unión al receptor

Antecedentes de la invención

El campo general de la invención es el área de las ciencias de la vida, particularmente las ciencias de la agricultura y los métodos de ensayo. Específicamente, el campo de la invención es la bioquímica y el modo de acción de las endotoxinas cristalinas (Cry) de *Bacillus thuringiensis* y sus interacciones con los receptores de la toxina Cry del insecto.

Las proteínas insecticidas Cry son endotoxinas producidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria Gram positiva que se encuentra mundialmente distribuida en diferentes tipos de suelo. Varias clases de proteínas Cry son selectivamente tóxicas contra determinadas plagas de insectos. La endotoxina se encuentra normalmente en forma de una proteína cristalina localizada en grandes cuerpos de inclusión de la bacteria. Las toxinas Cry tienen una secuencia de considerable diversidad (Crickmore *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003), pero la mayoría de las toxinas que tienen actividad contra plagas de lepidópteros tienen protoxinas de 130 kDa que tienen una estructura de toxina con un núcleo activo de triple dominio (de Maagd *et al.*, *supra.*).

El objetivo de la presente invención se refiere a la toxina Cry1Fa, una proteína Cry de dominio triple. Esta toxina ha demostrado actividad insecticida contra varios insectos lepidópteros, incluyendo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (gusano cogollero del maíz) y *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (piral del maíz), las cuales son dos de las plagas de insectos del maíz más importantes económicamente. Cry1Fa es el componente de la toxina de dos plaguicidas incorporados en plantas transgénicas desregulados del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, de sus siglas en inglés), conocidos como asunto TC1507 en el maíz (HERCULEX®) y el asunto 281-24-236 en el algodón (WIDESTRIKE®).

La proteína holotoxina Cry1Fa de longitud completa, como otras toxinas Cry de triple dominio, requiere de la ruptura proteolítica de ambos extremos N-terminal y C-terminal para la activación de su actividad insecticida. Los intestinos medios de los insectos lepidópteros contienen una variedad de proteasas similares a tripsina y quimotripsina que procesan la holotoxina de longitud completa liberando una estructura de toxina central (también llamada núcleo en este documento) que tiene un tamaño de aproximadamente 68 kDa (Christeller *et al.*, 1992; Gatehouse *et al.*, 1997; Bernardi *et al.*, 1996). El procedimiento implica eliminar aproximadamente 28 aminoácidos del extremo N-terminal y aproximadamente 530 aminoácidos del extremo C-terminal (segmento de la protoxina), y el segmento de toxina central resultante se libera y se une a receptores específicos localizados dentro del intestino del insecto.

Los insectos pueden desarrollar resistencia a la actividad de las toxinas de las proteínas Cry a través de cambios en los receptores localizados en el intestino medio que se unen a la toxina central de las proteínas Cry (Heckel *et al.*, 2007; Van Rie *et al.*, 1990b). Además, se han documentado otros mecanismos de desarrollo de resistencia, que incluyen: activación reducida de la protoxina, cambios en el número de receptores Cry en el intestino medio del insecto, y la pérdida de la capacidad para responder a la toxina por formación de poros en la membrana que contribuyen a la mortalidad del insecto (véanse Griffiths y Aroian, 2005; y Van Rie *et al.*, 1990b).

Antes de esta invención, no se han dado a conocer estudios para caracterizar la unión de la proteína de la toxina central Cry1Fa a diferentes receptores de los insectos. La razón era que los métodos de radio-marcado tradicionales que implicaban isótopos de yodo oxidado que reaccionaban con restos de tirosina en la toxina Cry1Fa producían proteína de toxina central radiomarcada que perdía su capacidad para unirse a los receptores de las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV, por sus siglas en inglés) preparados a partir de los intestinos medios de *Spodoptera exigua* y *Spodoptera frugiperda* (Luo *et al.*, 1999). Además, se encontró que la proteína de la toxina central Cry1Fa radiomarcada tradicionalmente perdía su actividad insecticida y era inactiva en bioensayos dietéticos contra estas especies de *Spodoptera*. Se han intentado otros métodos de marcado proteico tales como el marcado fluorescente, y otros métodos para medir la unión receptor-ligando tales como la calorimetría isotérmica, pero se ha encontrado que son o bien demasiado insensibles, o los métodos ópticos demasiado difíciles de usar debido a las propiedades particulares de las BBMV de los insectos.

Palmer *et al.* (1997) describieron un método indirecto de marcado radiactivo de proteínas específicamente en restos de cisteína. En este método, primero se hace reaccionar un compuesto intermedio, fluoresceína-5-maleimida, con radio-yodo, después la fluoresceína-5-maleimida radiomarcada se usa para modificar químicamente la proteína en los restos de cisteína disponibles. Esta invención describe el uso del método altamente específico de Palmer *et al.* para radiomarcarse la proteína Cry1Fa usando como diana un solo resto de cisteína (C205) localizado en el Dominio I de la toxina central Cry1Fa.

Más sorprendente fue encontrar que la introducción de esta 5-maleimida radiomarcada, estéricamente impedida, en la proteína de la toxina central Cry1Fa, preparada por este método, no dio como resultado una pérdida de unión a su receptor o causó la inactivación de la toxina. Como resultado, esta toxina central Cry1Fa radiomarcada de forma no tradicional mantuvo una estructura proteica terciaria suficiente para retener tanto su actividad insecticida como su capacidad para unirse específicamente a receptores en preparaciones de BBMV a partir de una variedad de insectos.

Se encontró que la proteína Cry1Fa radiomarcada de forma no tradicional se unía a los receptores de una manera saturable, y se empleó en un ensayo de unión competitiva para determinar si otras toxinas Cry competían con su unión. Empleando este ensayo se demostró que la resistencia en campo a la toxina Cry1Fa, que se desarrolló en una población de *S. frugiperda* recolectada en Puerto Rico, es debida a la pérdida de la capacidad de los receptores en las BBMV de estos insectos para unirse a la proteína de la toxina central Cry1Fa.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un bioensayo de Cry1Fa truncada por tripsina y Cry1Fa truncada por tripsina marcada con fluoresceína-5-maleimida, contra larvas de *S. frugiperda*. La figura resume los resultados de los bioensayos dietéticos del insecto con larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* utilizando la proteína de la toxina central Cry1Fa yodada (no radiactiva) preparada mediante el método de la presente invención.

La Figura 2 muestra las curvas de unión a saturación de la proteína de la toxina central Cry1Fa radio-yodada a las BBMV del piral del maíz (de sus siglas en inglés, ECB). La figura representa la unión hasta saturación de la proteína de la toxina central Cry1Fa radio-yodada, preparada mediante el método de la presente invención, a las BBMV preparadas a partir de los intestinos medios larvales de *Ostrinia nubilalis*.

Breve descripción de los identificadores de secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de ADN sintética que codifica la holotoxina Cry1Fa.

SEQ ID NO:2 es la holotoxina Cry1Fa.

Descripción detallada de la invención

Tres dominios estructurales de la proteína Cry1Fa están localizados dentro del “núcleo triptico” que es resistente a la digestión adicional por tripsina. El Dominio I se compone de siete hélices- α , las cuales se cree que se insertan en la membrana del intestino medio del insecto y forman una estructura similar a un poro (Ballester *et al.*, 1999). El Dominio II consiste en tres láminas- β antiparalelas, y el Dominio III forma una estructura β -sándwich (Pigott y Ellar, 2007). Se cree que las regiones expuestas de los Dominios II y III interaccionan con receptores específicos localizados en la superficie luminal del intestino medio del insecto y se unen fuertemente a estos receptores (Bravo *et al.*, 2007; de Maagd *et al.*, 1996; de Maagd *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1999). La unión de la toxina a un receptor es un requerimiento necesario para la actividad insecticida, y proporciona la especificidad y selectividad de las toxinas (Pigott y Ellar, 2007; Rausell *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la especificidad de la actividad de las diferentes proteínas Cry frente a diferentes especies de insectos está relacionada en parte con diferencias en los receptores que se encuentran en diferentes insectos (Gómez *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2007; Van Rie *et al.*, 1990a).

Ensayos bioquímicos cuantitativos proporcionan un medio para medir la interacción de toxinas Cry con proteínas receptoras que se encuentran en los intestinos medios de los insectos. En los ensayos de unión de tipo saturación, la proteína de toxina Cry marcada (ligando) se incubaba en disoluciones tampón que promueven la unión de la proteína de toxina Cry a una proteína receptora del insecto. En una realización de un ensayo de unión de tipo saturación, una cantidad fija de la proteína receptora del insecto (normalmente vesículas de membrana del borde en cepillo preparadas a partir de intestinos medios de insectos) se mezcla (en tubos separados) con cantidades crecientes de la proteína de toxina Cry yodada, y se les dejó reaccionar durante un período de tiempo determinado. La proteína Cry no unida (es decir, que no se une a una proteína receptora del insecto) se separa de la proteína unida mediante uno de los diferentes métodos, y la cantidad de radiactividad en la fracción de proteína unida proporciona una indicación de la cantidad de proteína Cry unida al receptor del insecto. Un experto en el campo de la bioquímica comprenderá que la observación de poca o ninguna radiactividad unida indicará la falta de un receptor para la toxina Cry particular que se está estudiando en la especie de insecto que se utilizó para hacer la preparación del receptor.

Una segunda realización de un ensayo de unión es un ensayo de competencia. En un ensayo de unión competitiva, la proteína de toxina Cry radiactiva se mezcla con un exceso de una segunda proteína Cry no radiactiva, y se deja a las proteínas Cry unirse bajo condiciones estándar a las proteínas receptoras del insecto. Si la segunda proteína de toxina Cry no radiactiva, es capaz de competir con la proteína de toxina Cry radiactiva para unirse al receptor del insecto, entonces la proteína radiactiva será desplazada del sitio de unión del receptor, y se recuperará una pequeña radiactividad en el estado unido. Si las proteínas de las toxinas Cry radiactiva y no radiactiva se unen a diferentes proteínas receptoras de insectos, entonces no competirán entre ellas para unirse a la misma proteína receptora del insecto. En este caso, la cantidad de radiactividad recuperada en la fracción proteica unida será la misma, o casi la misma, que cuando la segunda proteína de toxina Cry no radiactiva no estaba presente en la reacción de unión. Están disponibles varios métodos para cuantificar la cantidad de radiactividad en la fracción de proteína unida.

Ensayos de unión competitivos empleando una proteína de toxina central ^{125}I -Cry1Fa y, o bien una proteína de toxina central Cry1Fa no radiactiva (reacción control) o una proteína de toxina central Cry1Ab, demostraron que ambas proteínas de las toxinas Cry centrales no radiactivas eran capaces de desplazar la toxina central Cry1Fa marcada de su sitio receptor en las BBMV de *S. frugiperda*. Por el contrario, el ensayo de unión competitiva

demostró que la proteína de la toxina central Cry1Ca no competía con la unión de la toxina central Cry1Fa. Los resultados de estos ensayos de unión demuestran que la resistencia del insecto a la toxina Cry1Fa observada en estudios de campo en una población de *S. frugiperda* recogida en Puerto Rico se puede explicar por la incapacidad de los receptores de las vesículas de membrana del borde en cepillo de estos insectos para unirse a la toxina central Cry1Fa.

Las secuencias de los ácidos nucleicos se presentan en la dirección 5' a 3' estándar, y las secuencias proteicas se presentan en la dirección estándar extremo amino (N) terminal a extremo carboxi (C) terminal.

A menos que se indique específicamente o se dé a entender implícitamente, los términos "un", "una", "el" o "la" como se emplean en la presente invención, significan "al menos uno".

A continuación se dan algunos ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no se deben interpretar como una limitación. Todos los porcentajes se dan en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes están en volumen a menos que se indique de otra manera. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

Ejemplo 1

Construcción de plásmidos de expresión que codifican la proteína de la toxina Cry1Fa y la expresión en huéspedes bacterianos

Se utilizaron métodos de clonación estándar (como los proporcionados, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, (1989) y Ausubel *et al.*, (1997), y en actualizaciones de los mismos) en la construcción de pDAB1817, un plásmido de expresión genéticamente modificado de *Pseudomonas fluorescens* (Pf), para producir una proteína de toxina quimérica (referida en la presente memoria como toxina Cry1Fa; SEQ ID NO:2) que comprende un segmento de toxina central Cry1Fa (del aminoácido 1 al 603) y un segmento de protoxina Cry1Ab (del aminoácido 604 al 1148), codificados por una secuencia codificadora optimizada para la planta (CDS; SEQ ID NO:1).

pDAB1817 se obtiene a partir de pMYC1803 (Patente de EE.UU N° 7338794). La estrategia básica de clonación requería ligar un fragmento de ADN, flanqueado por sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para *SpeI* y *KpnI* y que conteneían la CDS de la toxina Cry1Fa, al fragmento grande de pMYC1803 preparado por escisión del ADN de pMYC1803 con las enzimas de restricción *SpeI* y *KpnI*. El plásmido pMYC1803, es un plásmido de copia medio obtenido a partir del plásmido pTJS260, basado en RSF1010, (véase la Patente de EE.UU N° 5169760), y porta un marcador de resistencia a tetraciclina regulado y los loci de replicación y movilización del plásmido RSF1010. Por este medio, la CDS de la toxina Cry1Fa se localizó bajo el control de la expresión del promotor *Ptac* y el terminador *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). El plásmido de expresión pDAB1817 se transformó por electroporación en una cepa MB217 de *P. fluorescens* (un derivado de una cepa MB101; *P. fluorescens* biovar I), con selección de resistencia a tetraciclina. Se identificaron colonias recombinantes mediante digestión por restricción del ADN plasmídico miniprep.

Análisis de Expresión y Crecimiento en Fermentadores: La producción de la proteína de la toxina Cry1Fa para la manipulación bioquímica y el bioensayo en insectos fue realizada por el aislado DR1649 de la cepa de expresión de *P. fluorescens* cultivada en fermentador. Se dejó crecer un cultivo siembra durante 20 horas (Densidad Óptica final a 600 nm = 14) a 32°C en un matraz de agitación que contenía 600 mL de medio Ps20 enriquecido con 15 µg/mL de tetraciclina, y se empleó para inocular 6,6 L de un medio DGMp2.2 con tetraciclina en un tanque fermentador de 20 L (New Brunswick Scientific BioFlo 4500, Edison, NJ). La fermentación se llevó a cabo a 32°C con agitación de 200 a 1000 rpm. Los detalles de las manipulaciones microbiológicas para *P. fluorescens* están disponibles en Squires *et al.* (2004), Solicitud de Patente de EE.UU N° 20060008877, Patente de EE.UU N° 7681799, Solicitud de Patente de EE.UU N° 20080058262, y Huang *et al.* (2007). El glicerol se introdujo por lotes periódicamente a 10 g/L en respuesta a la concentración de oxígeno disuelto. La expresión de la CDS de la toxina Cry1Fa a través del promotor *Ptac* se indujo mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Los cultivos se monitorearon durante todo el tiempo de fermentación posterior a la inducción para determinar la densidad celular, el nivel de la expresión del gen diana, y otros parámetros. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (de sus siglas en inglés, SDS-PAGE) y los análisis de inmunotransferencia, se congelaron alícuotas de 0,1 mL del caldo completo de fermentación para el análisis posterior. En el momento final de 48 horas después de la inducción con IPTG (Densidad Óptica a 600 nm = 222; volumen de cultivo final = 13,5 L), se recogieron las células a partir de 4 L de cultivo por centrifugación a 10000 x g durante 90 minutos. Los sedimentos celulares se congelaron a -20°C o -80°C para su posterior procesamiento.

Análisis SDS-PAGE de las muestras de fermentación: Los caldos celulares del fermentador congelados (0,1 mL) se diluyeron 5 veces en agua fría y 200 µL se sometieron a ultrasonidos en hielo durante 10 minutos utilizando un Sonicador Branson 250 (Branson Ultrasonics, Danbury CT) empleando una micro punta de 3,2 mm (1/8 pulgadas) de diámetro con una producción constante de 20 unidades. Los lisados se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos (4°C) y se separaron los sobrenadantes (fracción soluble). A continuación se resuspendieron los sedimentos en 200 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Na₂HPO₄ 11,9 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se realizaron además diluciones de hasta 20 veces de ambas fracciones solubles e

insolubles de un caldo de fermentación original en PBS. Estas fracciones se mezclaron después 1:1 con una muestra tampón Laemmli (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) que contenía 5% de β -mercaptoetanol y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargar de 10 μ L a 20 μ L de un gel estándar 10% Bis-Tris con tampón MOPS (Bio-Rad Inc.). Los geles se tiñeron con Simply Blue SafeStain™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante.

5 Inmunotransferencia: Para los análisis de inmunotransferencia y aislamiento de proteínas, se emplearon métodos bioquímicos estándar (como se proporcionan, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, (1989) y Ausubel *et al.*, (1997), y en actualizaciones de los mismos). Se prepararon las muestras y se separaron las proteínas mediante electroforesis a través de geles NuPAGE 4-12% Bis-Tris en tampón de migración MES según el protocolo sugerido por el fabricante para electroforesis de desnaturalización (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 80 minutos a 30 V en un tampón de transferencia NuPAGE. Las transferencias se bloquearon durante una 10 1 hora a temperatura ambiente en 5% de leche/PBST (PBS con 0,05% de Tween-20) y después se sondaron con un anticuerpo primario (específico para el segmento de la toxina central Cry1Fa) y a continuación con anticuerpos secundarios durante una hora cada uno a temperatura ambiente en disolución bloqueadora, y se enjuagaron con PBST entre cada anticuerpo durante 15 minutos. El desarrollo de las transferencias se hizo utilizando el sustrato de transferencia Western ECL de Pierce según el protocolo del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL).

Ejemplo 2

Purificación de la proteína de la toxina central Cry1Fa a partir de cuerpos de inclusión producidos por *Pseudomonas*

Preparaciones del cuerpo de inclusión: Los cuerpos de inclusión proteicos (IB) se prepararon a partir de células DR1649 de *P. fluorescens* que contenían la proteína de toxina Cry1Fa insoluble, como se demostró mediante SDS-PAGE y MALDI-MS (Espectrometría de Masas con Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz). Se utilizó un Espectrómetro de masa MALDI-R (Reflectron) de Micromass (Milford, MA) para medir las masas peptídicas de acuerdo con los métodos y recomendaciones indicados por el fabricante. Los sedimentos celulares congelados se descongelaron en un baño de agua a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en tampón de lisis al 10% p/v (Tris HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 200 mM; 5% de Glicerol; sal disódica de EDTA 2 mM (ácido etilendiaminotetraacético); 0,5% de Triton X-100; y DTT 1 mM (ditiotritol-añadido justo antes del uso)). Se añadieron 25 mL de un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich) por cada 100 g de pasta celular tratada. La suspensión se pasó dos veces a través de un Microfluidificador Microfluidics a 84+ kg/cm² (1200+ psi) (Microfluidics Inter. Corp., Newton, MA). El lisado se centrifugó a 18000 x g a 4°C durante 30 minutos, y se conservó el sobrenadante. El sedimento de inclusión se lavó en tampón de lisis sin cóctel inhibidor de proteasa hasta que no quedaron olores bacterianos (usualmente 2 ó 3 lavados), mediante homogeneización suave utilizando una espátula o un mezclador mecánico (hasta aproximadamente 10% p/v de sólidos) y se centrifugó como se describe. Los sobrenadantes y el sedimento final resultante se conservaron y almacenaron a -20°C. Se tomaron y almacenaron pequeñas alícuotas de cada muestra en un tubo de microcentrifugación para análisis SDS-PAGE. Después, los sedimentos de preparación de los cuerpos de inclusión se liofilizaron utilizando un liofilizador Virtis Advantage (Viopharma Process Systems LTD, Winchester, Reino Unido) a temperatura ambiente y a un vacío máximo durante 2 días. Los polvos resultantes se almacenaron después a -20°C hasta su análisis.

Análisis SDS-PAGE y cuantificación de preparaciones IB; Se resuspendieron veinticinco mg de sedimento IB en 1 mL de tampón HTS (Tris HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 50 mM; 5% v/v de glicerol, sal disódica EDTA 10 mM; 0,5% v/v de Triton X-100) y se sometió a ultrasonidos como anteriormente durante 1 minuto sobre hielo. Las muestras resuspendidas se diluyeron después 1:1 en tampón de muestra Laemmli que contenía DTT 0,2 M. Las muestras se diluyeron después 10X y 20X con tampón de muestra Laemmli sin DTT y se cargaron 10 μ L en un pocillo Criterion 18 10% gel Tris-Tris (Bio-Rad Inc.) hecho correr con tampón MES 1X NuPAGE (Invitrogen). Los geles se hicieron correr durante 5 minutos a 100V y después 45 minutos a 200V. Los geles se enjuagaron y lavaron en agua durante 20 minutos y se tiñeron con Simply Blue SafeStain™. La cuantificación de las bandas diana se realizó mediante comparación de los valores densitométricos de las bandas frente a una serie de muestras estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA, de sus siglas en inglés) hechas correr sobre el mismo gel, y escaneadas para generar una curva estándar densitométrica.

Truncado y purificación de la proteína de la toxina central Cry1Fa: Los cuerpos de inclusión purificados se lavaron con agua estéril, después se solubilizaron en CAPS 20 mM, pH 11 (ácido 3-(ciclohexamino)-1-propanosulfónico) que contenía DTT 10 mM, agitando la disolución proteica durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eliminar el material insoluble mediante centrifugación (30000 x g durante 30 minutos a 4°C), la tripsina tratada con 0,5% (p/v) de tosil fenilalanil-clorometilcetona (TPCK) (Sigma-Aldrich) se añadió al sobrenadante. Esta disolución se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se filtró y concentró 5 veces utilizando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerada Amicon Ultra-15 (Punto de corte Peso Molecular 30000; Millipore), después se cargó en una columna Pharmacia Mono Q 1010 equilibrada con 20 mM CAPS pH 10,5. Después de lavar la columna cargada con 2 volúmenes de columna tampón, la proteína de toxina truncada se eluyó utilizando un gradiente lineal de 0 a 0,5 M de NaCl en CAPS 20 mM pH 10,5 en 15 volúmenes de columna hasta una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La toxina central Cry1Fa truncada con tripsina y purificada se eluyó en aproximadamente 0,2 mM a 0,3 M de NaCl. La pureza de las proteínas se chequeó mediante SDS-PAGE con visualización utilizando tinte azul brillante de Coomassie (debajo). En algunos casos, las fracciones combinadas de la toxina purificada se concentraron y cargaron en una columna de Superose 6 (1,6 cm diámetro, 60 cm de longitud; GE Healthcare Life Sciences), y se

purificaron además mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se combinaron y concentraron las fracciones que comprenden un pico único, que corresponden al tamaño monomérico de la toxina central truncada (ca. 69 kDa), dando como resultado una preparación que era 95% más homogénea para una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 68 kDa, como se evaluó mediante SDS-PAGE.

- 5 Análisis SDS-PAGE de la toxina central Cry1Fa purificada: El análisis SDS-PAGE de la proteína de la toxina Cry1Fa truncada con tripsina se realizó bajo condiciones de reducción y desnaturalización mediante el método de Laemmli (según Sambrook *et al.*, *supra*). La reducción de las proteínas se consiguió usando β-mercaptoetanol al 5%, y la desnaturalización se realizó por calor a 90°C durante 5 minutos en presencia de SDS al 2%. Las proteínas se cargaron en pocillos de un gel de poliacrilamida Tris-glicina del 4% al 20% (Invitrogen) y se separaron a 200 voltios durante 60 minutos. Las bandas proteicas se tiñeron con Azul Brillante Coomassie R-250 (Bio-Rad) durante una hora, y después se tiñeron con una disolución 5% de metanol en 7% de ácido acético en presencia de esponjas de celulosa. Los geles se visualizaron y analizaron utilizando un Bio-Rad Fluoro-S Multi Imager™ con un programa informático de imagen Quantity One™. Los pesos moleculares relativos de las bandas proteicas se determinaron mediante la inclusión de una muestra de proteína de Escalera BenchMark™ (Life Technologies, Rockville, MD) o un marcador de peso molecular pre-teñido See Blue™ (Invitrogen) en un pocillo del gel.

Ejemplo 3

Preparación de la proteína de la toxina central Cry1Fa radio-yodada específicamente

- Yodación de la proteína de la toxina central Cry1Fa: Trabajos anteriores demostraron que la yodación de la proteína de la toxina Cry1Fa destruía la capacidad de la proteína yodada para unirse a su receptor (o receptores) en las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV), así como la toxicidad de la proteína en el insecto (Luo *et al.*, 1999). En este estudio, la proteína de la toxina Cry1Fa se irradió con yodo utilizando un método de perlas de yodación estándar (Pierce Iodination beads; Thermo Fisher Scientific), y los estudios de unión revelaron que la proteína había perdido toda su capacidad para unirse a un receptor o receptores específicos en las BBMV de *S. exigua* y *S. frugiperda*. Además, cuando se empleó Nal no-radiomarcada para yodar la proteína de la toxina Cry1Fa empleando el método de Perla de Yodación, se encontró que la Cry1Fa yodada había perdido su actividad insecticida frente a la larva *Spodoptera* en bioensayos de dieta.

- La yodación de proteínas mediante los protocolos de Perla de Yodación tiene lugar en las posiciones orto al grupo hidroxilo de tirosina; puede aparecer mono- o di-sustitución. Por tanto, las posiciones de yodación dependen de la ubicación de los restos de tirosina en la proteína sujeto, y yodaciones múltiples pueden tener como consecuencia la alteración de la estructura y/o función de la proteína. Cabe destacar que el segmento de la toxina central Cry1Fa comprende 20 restos de tirosina, los cuales pueden servir como dianas de yodación.

- Este ejemplo enseña un método alternativo para el marcado de la toxina central Cry1Fa con yodo radiactivo. Los ejemplos posteriores muestran que la toxina central proteica radio-marcada se une a las BBMV del insecto, y que la proteína de la toxina central Cry1Fa es activa en bioensayos de dieta de insectos. Además, estos ejemplos enseñan que la proteína de la toxina central Cry1Fa truncada con tripsina se puede marcar específicamente por fluorescencia de la cisteína que corresponde al resto C205 de la proteína de la toxina Cry1Fa utilizando fluoresceína-5-maleimida, y que la proteína marcada por fluorescencia es activa biológicamente, causando la mortalidad del insecto a igual dosis que la toxina central Cry1Fa truncada con tripsina no marcada.

- El segmento de la toxina central Cry1Fa contiene tres restos del aminoácido cisteína, en posiciones 9, 14, y 205. El truncado de la proteína mediante el tratamiento con tripsina elimina el C9 y C14, proporcionando un segmento de la toxina central que mantiene la cisteína que corresponde al resto C205. Palmer *et al.* (1997) demostraron que los anillos fenilo de la fluoresceína-5-maleimida se pueden radio-yodar y hacer reaccionar después con proteínas que contienen grupos sulfhidrilo (por ejemplo, como los que se proporcionan mediante los restos cisteína libres), dando como resultado la alquilación de las tres cisteínas en la proteína, y proporcionando por tanto una proteína marcada radiactivamente. La toxina central Cry1Fa truncada con tripsina contiene un único resto de cisteína en la posición que corresponde al C205, y proporciona por tanto un sustrato para la alquilación y radiomarcado de la proteína en un sitio único (específico).

- Se disolvió la fluoresceína-5-maleimida (F5-M) a 10 mM en DMSO (Dimetil Sulfóxido), después se diluyó a 1 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5), como se determinó mediante el coeficiente de extinción molar de F5-M ($68.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A una disolución de 70 µL de PBS que contenía dos Perlas de Yodación de Pierce (Thermo Fisher Scientific), se le añadió 0,5 mCi de Na^{125}I , detrás de una protección de plomo. (Se realizó un procedimiento análogo empleando Nal no-radiactivo para preparar la proteína de la toxina central Cry1Fa marcada fluorescentemente (yodada, no radiactiva)). Se dejó a la disolución que se mezclase a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se añadieron 10 µL de la disolución 1 mM de F5-M. Después de reaccionar durante 10 minutos, la disolución se sacó de la yodación mediante pipeteado y se añadieron 2 µg de la proteína de la toxina central Cry1Fa truncada con tripsina altamente purificada en PBS a la disolución. La proteína se incubó a 4°C con la disolución de F5-M yodada durante 48 horas, cuando la reacción se terminó mediante la adición de β-mercaptoetanol hasta 14 mM de concentración final. La mezcla de reacción se añadió a una columna Zebra™ (Invitrogen) equilibrada en 20 mM CAPS, 150 mM KCl, pH 9, y se centrifugó a 1500 x g

durante 2 minutos para separar de la proteína el tinte yodado que no reaccionó. La toxina central Cry1Fa-fluoresceína proteica radiomarcada con ^{125}I se contabilizó en un contador gamma para determinar su radiactividad específica, suponiendo una recuperación del 80% de la aportación de la proteína de la toxina.

La actividad específica de la proteína de la toxina central Cry1Fa radiomarcada fue aproximadamente 1,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ proteína. Esta actividad específica era más baja comparada con los niveles típicos esperados de proteínas de tamaño similar empleando el procedimiento de Perla de Yodación. Esto es presumiblemente debido a un único sitio de marcado (que corresponde al C205), y a la (posiblemente) relativa inaccesibilidad de este sitio, que se presume que se localiza en la profundidad del Dominio I del segmento de toxina central (en base a la localización empleando una comparación de la estructura cristalina de la proteína Cry1Aa).

La proteína radiomarcada se caracterizó también mediante SDS-PAGE y se visualizó mediante la obtención de imágenes con fósforo para validar que la radiactividad medida estaba covalentemente asociada con la proteína de la toxina central Cry1Fa. Se determinó la radio-pureza de la proteína de la toxina central Cry1Fa radio-yodada (y posterior detección de la unión de Cry1Fa a su receptor BBMV) mediante SDS-PAGE, obtención de imágenes con fósforo y recuento gamma. Se obtuvieron imágenes de los geles teñidos con azul Coomassie envolviéndolos en una lámina MylarTM (12 μm de espesor), y exponiéndolos bajo una pantalla con fósforo almacenado Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) (35 cm x 43 cm) durante 1 hora. Las láminas se revelaron empleando un generador de imágenes de fósforo Molecular Dynamics Storm 820 y la imagen se analizó empleando un programa informático ImageQuantTM. Se cortaron las bandas radiactivas del gel junto con las áreas inmediatamente por encima y por debajo de la banda empleando una cuchilla de afeitar y se contabilizaron en un contador gamma. Se detectó radiactividad en la banda de la proteína de la toxina central Cry1Fa y en las áreas debajo de la banda. No se detectó radiactividad en la región de gel por encima de la banda de la proteína de la toxina central Cry1Fa. Se detectó algo de reactividad en la región de gel por debajo de la banda de la proteína de la toxina central Cry1Fa (por ejemplo, fragmentos más pequeños que los de la proteína de la toxina central Cry1Fa). Estos contaminantes radiactivos probablemente representen la degradación de productos de la proteína de la toxina central Cry1Fa.

La proteína de la toxina central Cry1Fa (no-radiactiva, yodada) marcada fluorescentemente preparada de esta manera se utilizó en bioensayos de dieta de insectos para demostrar que no se había afectado la toxicidad del insecto, y en los estudios de unión se empleó una proteína de la toxina central Cry1Fa (fluorescentemente marcado) radio-yodada con preparaciones de BBMV para demostrar que las actividades de unión del receptor no se habían afectado.

Ejemplo 4

Bioensayos de dieta de insectos

Se ensayaron individualmente las proteínas de la toxina central Cry1Fa truncada con tripsina, bien marcada con fluoresceína-5-maleimida yodada no-radiactiva, o sin marcar, para su actividad insecticida en un bioensayo de alimentación de gran carga contra la larva de *Spodoptera frugiperda* (cogollero del maíz; de sus siglas en inglés FAW). Las larvas eclosionaron de los huevos de una colonia mantenida en un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA).

Los bioensayos se llevaron a cabo en cubetas de plástico con 128 pocillos específicamente diseñados para bioensayos de insectos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 0,5 mL de una dieta Lepidóptera Multi-especies (Southland Products, Lake Village, AR). Se repartió mediante pipeteo una alícuota de 40 μL de la proteína de la toxina central Cry1Fa purificada, diluida a varias concentraciones en 10 mM CAPS, pH 10,5, o 40 μL de una disolución control, sobre la superficie de la dieta de cada pocillo (26,7 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Se ensayaron dieciséis pocillos por muestra. El control negativo era una disolución tampón blanco que no contenía proteína. Los controles positivos incluían preparaciones de longitud completa de la toxina Cry1Fa. Las cubetas tratadas se mantuvieron en una campana de gases hasta que el líquido de la dieta de la superficie se hubo evaporado o fue absorbido en la dieta. Se calcularon las concentraciones de las toxinas Proteína Cry1Fas de la dieta como la cantidad (ng) de proteína de la toxina Cry1Fa por centímetro cuadrado del área superficial en el pocillo (1,5 cm^2).

Unas pocas horas después de la eclosión, se tomaron las larvas individualmente con una brocha de pelo de camello humedecida y se depositaron en la dieta tratada, una larva por pocillo. Los pocillos infestados se sellaron después con láminas adhesivas de plástico transparente que están ventiladas para permitir el intercambio gaseoso (C-D International, Pitman, NJ). Las cubetas de bioensayo se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28°C, aproximadamente 40% de Humedad Relativa, 16:8 (Luz:Oscuridad)) durante 5 días, transcurridos los cuales se registraron el número total de insectos expuestos a cada muestra proteica, el número de insectos muertos, y el peso de los insectos supervivientes. Se calcularon el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de inhibición de crecimiento para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento (GI) se midió como sigue:

$$\text{GI} = [1 - (\text{TWIT}/\text{TNIT})/(\text{TWIBC}/\text{TNIBC})]$$

donde TWIT es el Peso Total de Insectos en Tratamiento,

TNIT es el Número Total de Insectos en el Tratamiento

TWIBC es el Peso Total de Insectos en el Chequeo de Antecedentes (Tampón control), y

TNIBC es el Número Total de Insectos en al Chequeo de Antecedentes (Tampón control).

Se determinó que la GI_{50} era la concentración de la proteína de la toxina central Cry1Fa en la dieta a la cual el valor GI era del 50%; por ejemplo, el crecimiento de los insectos en la dieta que contenía Cry1Fa fue sólo de la mitad del de los insectos sin proteína Cry1Fa en la dieta, como se calculó anteriormente. La LC_{50} (la Concentración Letal para el 50%; calculada como la concentración de la proteína de la toxina Cry1Fa en la dieta a la cual el 50% de los insectos del ensayo estaban muertos) no se determinó, ya que se observó una mortalidad muy pequeña durante los 5 días del periodo experimental. Se hizo el análisis estadístico (ANOVA de una dirección) empleando un programa informático JMP (SAS, Cary, NC).

Las proteínas de la toxina central Cry1Fa marcada y no marcada eran aproximadamente igual de activas en la inhibición del crecimiento de la larva *S. frugiperda*, causando el cincuenta por ciento de la inhibición del crecimiento a concentraciones entre 33 ng/cm² y 100 ng/cm² (Figura 1). Este resultado muestra que el marcado de la proteína de la toxina central Cry1Fa truncada con tripsina con fluoresceína-5-maleimida yodada no da como resultado pérdida de la actividad insecticida.

Ejemplo 5

Preparación de las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV)

Preparación de las BBMV solubilizadas: Las larvas del último estadio de *S. frugiperda* y *Ostrinia nubilalis* (piral del maíz) se mantuvieron sin comida durante la noche y después se diseccionaron tras enfriarse en hielo durante 15 minutos. Se retiró el tejido del intestino medio de la cavidad corporal, dejando detrás el intestino posterior unido al integumento. El intestino medio se colocó en 9 volúmenes de un tampón de homogeneización enfriado con hielo (base Tris 17 mM, pH 7,5, manitol 300 mM, y EGTA (ácido etilenglicol tetraacético) 5 mM, enriquecido con un Cóctel Inhibidor de Proteasa (Sigma-Aldrich P-2714) diluido como recomienda el proveedor. La concentración final de los componentes del cóctel era (en μ M) AEBSF (500), EDTA (250), Bestatina (32), E-64 (0,35), Leupeptina (0,25), y Aprotinina (0,075). El tejido se homogeneizó con 15 pequeños toques de un homogeneizador de tejidos de vidrio. Las BBMV se prepararon mediante el método de precipitación con $MgCl_2$ de Wolfersberg (1993). Brevemente, se mezcló un volumen equivalente de una disolución de $MgCl_2$ 24 mM con el homogeneizado de intestino medio, se agitó durante 5 minutos y se dejó reposar sobre hielo durante 20 minutos. La disolución se centrifugó a 25000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se guardó el sobrenadante y el sedimento se suspendió en 0,5X volúmenes del tampón de homogeneización y se centrifugó de nuevo. Se combinaron los dos sobrenadantes, y se centrifugó a 27000 x g durante 30 minutos a 4°C para formar la fracción de BBMV. El sedimento se suspendió en Tampón de Almacenamiento de BBMV (HEPES 10 mM pH 7,4 ácido 2-[(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etanosulfónico], KCl 130 mM, 10% de glicerol) a una concentración de aproximadamente 3 mg/mL de proteína. La concentración de proteína se determinó empleando el método de Bradford con BSA como el patrón (Bradford, 1976). El ensayo de leucina-p-nitroanilida para la determinación de aminopeptidasa N, se realizó antes de congelar las muestras empleando un kit de ensayo Sigma-Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad específica de esta enzima marcadora en la fracción de BBMV normalmente aumentó 7 veces en comparación con la que se encontró en la fracción homogeneizada de intestino medio. Las preparaciones de BBMV se repartieron en muestras de 250 μ L, se ultracongelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 6

Ensayos de unión de la proteína de la toxina central Cry1Fa yodada a BBMV

Unión de la proteína de la toxina central Cry1Fa-¹²⁵ a BBMV: Para determinar la cantidad óptima de proteína de BBMV que se tiene que usar en los ensayos de unión competitiva, se generó una curva de saturación. La proteína de la toxina central Cry1Fa radiomarcada con I¹²⁵ (0,5 nM) se incubó durante 1 hora a 28°C con proteínas de BBMV de *O. nubilalis* (ECB) en concentraciones que oscilaban de 0 a 500 μ g/mL en tampón de unión (NaHPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de BSA, pH 7,4). El volumen total era de 0,5 mL. La proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵ unida se separó del material no unido tomando muestras por triplicado de 150 μ L de la mezcla de reacción y centrifugando las muestras a 14000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró con cuidado, y el sedimento se lavó tres veces con tampón de unión enfriado en hielo. El fondo del tubo centrífugo que contenía el sedimento se recortó y se colocó en un tubo de cultivo de vidrio 13 x 75 mm. Se hizo el recuento de cada muestra durante 10 minutos en un contador gamma. Se registró el valor de cuentas por minuto (CPM) menos el fondo (reacciones sin proteína añadida) frente a la concentración proteica de BBMV. Se determinó que el intervalo óptimo de proteína de BBMV para emplear en cada reacción de unión era de 100 μ g/mL a 150 μ g/mL.

Cinética de unión: Para determinar la cinética de unión, se generó una curva de saturación. Brevemente, se incubaron 150 μ g/mL de proteínas de BBMV de ECB durante 1 hora a 28°C con concentraciones crecientes (intervalo de 0,5 nM a 20 nM) de la proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵. Se determinó la unión total tomando muestras por triplicado de 150 μ L de cada concentración, seguido de centrifugación y el recuento como se describió anteriormente. Se promediaron los valores por triplicado. La unión no-específica se determinó de la misma manera,

con la adición de 1.000 nM de proteína de toxina central Cry1Fa no-radiactiva (el competidor). Esta concentración era al menos 50 veces mayor que la concentración más alta de la proteína de la toxina central Cry1Fa radiomarcada usada; por tanto, se esperaba la unión a todos los sitios de los receptores disponibles, mientras se desplaza la proteína de la toxina central Cry1Fa radiomarcada. Se calculó la unión específica como la diferencia en el CPM (menos el fondo) entre la unión total y la unión no-específica. Se determinó (Figura 2) que la proteína de toxina central Cry1Fa-I¹²⁵ se une específicamente a las proteínas de BBMV de ECB de una manera saturable, con una K_d de 11 nM y una B_{max} de 37 fmoles/mg de proteínas de BBMV de ECB. El nivel de unión no-específica era casi del 70% de la unión total; sin embargo el nivel de unión específica era claramente saturado, mostrando que la interacción era una respuesta de unión mediada por receptor.

Ejemplo 7

Ensayos de unión competitiva con BBMV

Se empleó un ensayo de receptor de tipo inmovilización y arrastre (aquí en lo sucesivo ensayo *pull-down*) para determinar el grado de competición entre la proteína de la toxina central Cry1Fa radiomarcada y otras proteínas de toxinas Cry (no marcadas) por unirse a los sitios del receptor. En este ensayo el tamaño molecular relativo del ligando unido con receptor se caracterizó por separación mediante SDS-PAGE, y la cantidad de ligando radiomarcado unido al receptor de BBMV se midió mediante detección de la radiactividad en el gel por visualización con fósforo. Se realizaron ensayos de unión de competición homólogos y heterólogos empleando 100 µg/mL ó 150 mg/mL de proteína de BBMV (de varias fuentes de insectos) y 0,5 nM ó 2,5 nM de la proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵. El ligando competitivo (por ejemplo, 1000 nM de la proteína de la toxina Cry1Fa no-marcada) se añadió a la mezcla de reacción en el mismo momento que el ligando radioactivo para garantizar verdaderas interacciones de unión competitiva.

Se llevaron a cabo incubaciones durante 1 hora a 28°C, y la proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵ unida a su receptor o receptores de BBMV se separó de la proteína sin unir mediante centrifugación de la mezcla de reacción como se describió anteriormente. El sedimento se lavó tres veces con tampón de unión enfriado con hielo, después se solubilizó añadiendo 25 µL de 2X de tampón Laemmli con 5% de β-mercaptoetanol y mezclando la muestra rápidamente durante 10 minutos a 95°C. La muestra se centrifugó y se cargaron muestras por duplicado en gel de poliacrilamida Tris glicina de 4% a 20% y se separó por SDS-PAGE. La cantidad de la proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵ unida al receptor se midió por visualización con fósforo del gel y densitometría de las bandas correspondientes a la radiactividad de la proteína de la toxina central Cry1Fa radiactiva después de 3 días de exposición de la placa.

En una reacción control, 0,5 nM de proteína de toxina central Cry1Fa-I¹²⁵ se incubó con proteínas de BBMV de *S. frugiperda* (FAW) durante 1 hora, y la cantidad de proteína Cry1Fa-I¹²⁵ que se unió a las BBMV se midió por SDS-PAGE y visualización con fósforo como anteriormente. Un experimento simultáneo, en el que se añadió 1000 nM de la proteína de la toxina central Cry1Fa sin marcar, demostró que esta adición que excedía 2000 veces la concentración de una proteína de la toxina central Cry1Fa sin marcar, eliminaba completamente la unión de la proteína Cry1Fa radiomarcada. Estos resultados demostraron que este ensayo mide eficazmente la capacidad de una proteína de la toxina Cry1Fa para desplazar la unión de la proteína de la toxina central Cry1Fa a sus receptor o receptores en BBMV de FAW. De una manera similar, se determinó que 1000 nM de la proteína de la toxina central Cry1Ab eliminaba completamente la unión de la proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵ a las proteínas de BBMV de FAW. Este resultado es coherente junto con otras informaciones que indican que la toxina Cry1Ab proteica y la proteína de la toxina Cry1Fa comparten similares sitios de unión al receptor (Banks *et al.*, 2001; Hernández y Ferre, 2005).

Además, se encontró que no existía competición para la unión a receptores de BBMV de FAW entre 1000 nM de la proteína de la toxina central Cry1Ca y 0,5 nM de la proteína de la toxina central Cry1Fa-I¹²⁵, indicando que la proteína Cry1Ca se une a un receptor diferente del receptor o receptores de Cry1Fa. Este resultado es coherente con otros estudios realizados con BBMV de *Diatraea saccharalis* (piral de la caña de azúcar), en los que se ha encontrado que un exceso de proteína Cry1Fa no desplazó a la proteína Cry1Ca biotinilada de su receptor o receptores.

Ejemplo 8

Unión de la toxina central Cry1Fa a BBMV preparados a partir de insectos FAW resistentes a la toxina Cry1Fa

Se realizaron ensayos de unión competitiva de tipo *pull-down* empleando BBMV preparadas a partir de larvas de insectos que son resistentes a la intoxicación por ingestión de toxina Cry1Fa. Larvas de *S. frugiperda* resistentes a Cry1Fa (rFAW) eclosionaron de huevos recogidos de una colonia propia (Dow AgroSciences LLC, Indianápolis, IN). Las larvas rFAW son más de 30 veces resistentes a la toxicidad de la toxina Cry1Fa. Se prepararon BBMV a partir de larvas rFAW de la misma manera que a partir de sus homólogos sensibles a Cry1Fa.

Como se ha indicado anteriormente, hubo unión de I¹²⁵-Cry1Fa a BBMV de larvas FAW de tipo salvaje (es decir, sensibles a Cry1Fa), y la unión se pudo desplazar mediante la adición de 2000 veces de la proteína Cry1Fa no marcada. Por el contrario, no hubo unión de ninguna proteína de toxina central I¹²⁵-Cry1Fa a las BBMV preparadas

a partir de larvas rFAW y empleadas en ensayos de unión *pull-down* a 100 µg/mL con I^{125} -Cry1Fa 2,5 nM. Estos resultados indican que la resistencia a la toxina Cry1Fa en rFAW puede ser debida a la incapacidad del receptor o receptores de Cry1Fa en las BBMV para unirse a la proteína de la toxina central Cry1Fa. Alternativamente, la resistencia puede ser resultado de la ausencia de receptores en los insectos. En cualquier caso, parece que el mecanismo de resistencia a la toxina Cry1Fa en estas larvas rFAW se basa en el receptor.

Ejemplo 9

Unión de la toxina central Cry1Fa a BBMV preparadas a partir de insectos ECB resistentes a la toxina Cry1Fa

Se realizaron ensayos de unión competitiva de tipo *pull-down* empleando BBMV preparadas a partir de larvas de insectos que eran resistentes a la intoxicación por ingestión de toxina Cry1Fa. Las larvas de *O. nubilalis* resistentes a Cry1Fa (rECB) eclosionaron de huevos recogidos de una colonia propia (Dow AgroSciences LLC, Indianápolis, IN). Las larvas rECB son más de 30 veces resistentes a la toxicidad de la toxina Cry1Fa. Se prepararon BBMV a partir de larvas rECB de la misma manera que a partir de sus homólogos Cry1Fa sensibles.

Se realizaron experimentos *pull-down* empleando 100 µg/mL de BBMV preparadas a partir de larvas ECB de tipo salvaje (por ejemplo, sensibles a Cry1Fa) y larvas resistentes a Cry1Fa (rECB), y empleando 2,5 nM de la proteína de la toxina central I^{125} -Cry1Fa. La proteína radioyodada se unió a las BBMV de las larvas ECB, pero en un grado menor que el que se vio para la unión a BBMV de las larvas FAW. La proteína Cry1Fa no-marcada (competidora) compitió por la unión de I^{125} -Cry1Fa a las BBMV de ECB pero la competición fue menor que la que se midió en los experimentos de competición empleando BBMV de FAW.

Se detectaron algunas uniones de I^{125} -Cry1Fa a las BBMV de rECB, y el grado de unión fue menor que el que se midió empleando BBMV de ECB. La proteína Cry1Fa no-marcada (competidora) no compitió completamente con la proteína de toxina central I^{125} -Cry1Fa por unirse a las BBMV de rECB. Estos datos avalan los estudios previos de unión de Cry1Fa hechos mediante Resonancia Plasmónica de Superficie empleando BBMV de ECB y rECB. Esos estudios mostraron que la proteína de la toxina Cry1Fa no-yodada pudo unirse a fracciones de BBMV preparadas a partir de larvas bien de ECB o bien de rECB, pero la disociación de la toxina de las BBMV de ECB fue más lenta que su disociación de las BBMV de rECB. La unión de la proteína de la toxina central I^{125} -Cry1Fa detectada en los ensayos de tipo *pull-down* que se describen en la presente memoria no es lo suficientemente cuantitativa para medir la afinidad de unión, pero indica que la proteína de la toxina Cry1Fa se une a las BBMV de rECB en un grado significativo. Por tanto, la resistencia de la toxina Cry1Fa en rECB puede deberse a la menor eficacia en la unión de la proteína de la toxina central Cry1Fa al receptor o receptores en las BBMV de rECB, en comparación con la unión a receptores de las larvas susceptibles. Esto podría manifestarse como una menor eficacia para la formación del poro en la membrana, ya que el tiempo que la toxina permanece en el receptor es más corto que en insectos susceptibles.

La Tabla 1 resume los resultados de la unión relativa a partir de ensayos que emplean una proteína de la toxina central Cry1Fa radio-yodada con preparaciones de BBMV a partir de varias fuentes de insectos. Los porcentajes indican las cantidades relativas de radioactividad unidas a las BBMV, con, y sin, el ligando competidor no radiactivo. El 100% de los valores no representan números iguales; la unión de la proteína Cry1Fa total a las BBMV de ECB es menor que a las BBMV de FAW.

Tabla 1				
	Cantidades Relativas de proteína Cry1Fa radio-yodada unida			
Competidor no marcado* →	Ninguno	Cry1Fa	Cry1Ab	Cry1Ca
BBMV de FAW	100%	0%	-4%	50%
BBMV de rFAW	10%	NA**	No realizado	No realizado
BBMV de ECB	100%	31%	No realizado	No realizado
BBMV de rECB	64%	51%	No realizado	No realizado

*se añadió 1000 nM de las proteínas de toxinas centrales Cry competidoras no-radiactivas cuando era apropiado

**N/A = No Aplicable, ya que se unió una cantidad muy pequeña de la proteína de toxina central I^{125} -Cry1Fa

Esta invención demuestra que, sorprendentemente, la proteína de la toxina central Cry1Fa se puede radio-marcarse, empleando fluoresceína-5-maleimida marcada con I^{125} para alquilar restos de cisteína, mientras se mantiene la actividad insecticida y la capacidad de unión al receptor. La forma truncada con tripsina de la toxina central Cry1Fa contiene sólo un único resto de cisteína (que corresponde al C205 dentro del Dominio I de Cry1Fa), el cual debe comprender el sitio del radiomarcado. Esta región forma parte de la estructura del poro de la proteína y no se considera que esté implicada en la unión al receptor. Un experto en la técnica del campo de la bioquímica y la

estructura de las proteínas observará que moléculas similares a fluoresceína-5-maleimida, que contienen un anillo de fenol unido a una función maleimida, se podrían yodar mediante química de cloramina y se podrían emplear para yodar restos de cisteína específicos en proteínas, tales como Cry1Fa. En particular, análogos más pequeños que fluoresceína-5-maleimida pueden ser más accesibles al interior de la toxina central Cry1Fa y, por lo tanto, puede dar como resultado una mayor radiactividad específica de la proteína marcada.

La proteína Cry1Fa alquilada con cisteína que se produce aquí es un insecticida activo contra la larva de FAW. La proteína Cry1Fa sin marcar y la proteína Cry1Ab sin marcar, pero no la proteína Cry1Ca sin marcar, pueden desplazar la unión de la proteína Cry1Fa radiomarcada de BBMV de FAW. Los datos de los bioensayos demuestran que Cry1Ca es activa tanto contra larvas FAW como rFAW, mientras que Cry1Ab es menos activa contra larvas rFAW. Por tanto, las actividades biológicas de las proteínas Cry1Fa, Cry1Ab, y Cry1Ca contra larvas FAW y RFAW se detallan y se predicen convenientemente mediante los resultados de los ensayos de unión a BBMV. Es, por lo tanto, un aspecto de esta invención que se puedan predecir combinaciones de proteínas Cry útiles en las estrategias del Manejo de Insectos empleando ensayos de unión competitiva que utilizan la proteína Cry1Fa radiomarcada por medio de los métodos de esta invención.

Referencias

Ausubel *et al.*, eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York).

Ballester, V., Granero, F., de Maagd, R.A., Bosch, D., Mensua, J.L., y Ferre, J. (1999) Role of *Bacillus thuringiensis* Toxin Domains in Toxicity and Receptor Binding in the Diamondback Moth. *App. Environ. Microbiol.* 65:1900-1903.

Banks, D. J., Jurat-Fuentes, J. L., Dean, D. H., y Adang, M. J. (2001) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa delta-endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:909-918.

Bernardi, R., Tedeschi, G., Ronchi, S., y Palmieri, S. (1996) Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: pyralidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26:883-889.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Bravo, A., Gill, S. S., y Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cry toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49:423-435.

Christeller, J. T., Laing, W.A., Marwick, N. P., y Burgess, E. P. J. (1992) Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22:735-746.

de Maagd, R. A., Bakker, P. L., Masson, L., Adang, M. J., Sangadala, S., Stiekema, W., y Bosch, D. (1999) Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Molec. Microbiol.* 31:463-471.

de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., y Schnepf, H. E (2003) Structure, diversity, and evolution of proteins toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37:409-433.

de Maagd, R. A., Kwa, M. S., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlark, J. M., Stiekema, W. J., y Bosch, D. (1996) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1A(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol* 62:1537-1543.

Gatehouse, L. N., Shannon, A. L., Burgess, E. P., y Christeller, J. T. (1997) Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27:929-944.

Gómez, I., Arenas, I. Benítez, I., Miranda-Ríos, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J. C., Bravo, A., y Soberón, M. (2006) Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 281:34032-34039.

Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A., y Soberón, M. (2003) Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. *Biochem.* 2:10482-10489.

Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernández, L. E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M., y Bravo, A. (2007) Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28:169-173.

- Griffitts, J. S. y Aroian, R. V. (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* 27:614-624.
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao, J. Z., Shelton, A. M., Gould, F., y Tabashnik, B. E. (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invert. Pathol.* 95:192-197.
- 5 Hernández, C. S. y Ferre, J. (2005) Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, y Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, y *Spodoptera exigua*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5627-5629.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Bakker, P. L., y de Maagd, R. A. (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem. J.* 384:507-513.
- 10 Huang, K-X., Badger, M., Haney, K., Evans, S. L. (2007) Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Prot. Express. Purific.* 53:325-330.
- Lee, M. K., You, T. H., Gould, F. L., y Dean, D. H. (1999) Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4513-4520.
- 15 Luo, K., Banks, D., y Adang, M. J. (1999) Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:457-464.
- Palmer, M., Buchkremer, M., Valeva, A., y Bhakdi, S. (1997) Cysteine-specific radioiodination of proteins with fluorescein maleimide. *Anal. Biochem.* 253:175-179.
- 20 Pigott, C. R. Y Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 71:255-281.
- Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A. C., Real, M. D., y Bravo, A. (2004) Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochem. Biophys. Acta* 1660:99-105.
- 25 Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.).
- Squires, C. H., Retallack, D. M., Chew, L. C., Ramseier, T. M., Schneider, J. C., Talbot, H. W. (2004) Heterologous protein production in *P. fluorescens*. *Bioprocess Intern.* 2:54-59.
- 30 Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D., y Van Mellaert, H. (1990a) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D., y Van Mellaert, H. (1990b) Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247:72-74.
- 35 Wolfersberger, M. G. (1993) Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Arch. Insect Biochem. Physiol* 24:139-147.

Lista de secuencias

- <110> Dow AgroSciences LLC
- 40 <120> Cry1Fa radiomarcada biológicamente activa y métodos de ensayo de unión al receptor
- <130> DAS.163PCT
- <150> US 61/423,844
- 45 <151> 2010-12-16
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 3447
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de codificación optimizada de planta sintética que codifica proteína Cry quimérica

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3444)

<400> 1

10

atg gaa aat aat att caa aat caa tgc gta cct tac aat tgt tta aat	48
Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn	
1 5 10 15	
aat cct gaa gta gaa ata ctg aac gaa gaa cgc agc acc ggc cgc ctg	96
Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu	
20 25 30	
ccg ctg gac atc agc ctg agc ctt aca cgt ttc ctt ttg agt gaa ttt	144
Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe	
35 40 45	
gtt cca ggt gtg gga gtt gcg ttt gga tta ttt gat tta ata tgg ggt	192
Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly	
50 55 60	
ttt ata act cct tct gat tgg agc tta ttt ctt tta cag att gaa caa	240
Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln	
65 70 75 80	
ttg att gag caa aga ata gaa aca ttg gaa agg aac cgg gca att act	288
Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr	
85 90 95	
aca tta cga ggg tta gca gat agc tat gaa att tat att gaa gca cta	336
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu	
100 105 110	
aga gag tgg gaa gca aat cct aat aat gca caa tta agg gaa gat gtg	384
Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val	
115 120 125	

ES 2 620 479 T3

cgt att cga ttt gct aat aca gac gac gct tta ata aca gca ata aat Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn 130 135 140	432
aat ttt aca ctt aca agt ttt gaa atc cct ctt tta tcg gtc tat gtt Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val 145 150 155 160	480
caa gcg gcg aat tta cat tta tca cta tta aga gac gca gta tcg ttt Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe 165 170 175	528
ggg cag ggt tgg gga ctg gat ata gct act gtt aat aat cat tat aat Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn 180 185 190	576
aga tta ata aat ctt att cat aga tat acg aaa cat tgt ttg gac aca Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr 195 200 205	624
tac aat caa gga tta gaa aac tta aga ggt act aat act cga caa tgg Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp 210 215 220	672
gca aga ttc aat cag ttt agg aga gat tta aca ctt act gta tta gat Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp 225 230 235 240	720
atc gtt gct ctt ttt ccg aac tac gat gtt aga aca tat cca att caa Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln 245 250 255	768
acg tca tcc caa tta aca agg gaa att tat aca agt tca gta att gag Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu 260 265 270	816
gat tct cca gtt tct gct aat ata cct aat ggt ttt aat agg gcg gaa Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu 275 280 285	864
ttt gga gtt aga ccg ccc cat ctt atg gac ttt atg aat tct ttg ttt Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe 290 295 300	912
gta act gca gag act gtt aga agt caa act gtg tgg gga gga cac tta Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu 305 310 315 320	960
gtt agt tca cga aat acg gct ggt aac cgt ata aat ttc cct agt tac Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr 325 330 335	1008
ggg gtc ttc aat cct ggt ggc gcc att tgg att gca gat gag gat cca Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro 340 345 350	1056
cgt cct ttt tat cgg aca tta tca gat cct gtt ttt gtc cga gga gga Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly 355 360 365	1104
ttt ggg aat cct cat tat gta ctg ggg ctt agg gga gta gca ttt caa Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln 370 375 380	1152

ES 2 620 479 T3

caa act ggt acg aac cac acc cga aca ttt aga aat agt ggg acc ata Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile 385 390 395 400	1200
gat tct cta gat gaa atc cca cct cag gat aat agt ggg gca cct tgg Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp 405 410 415	1248
aat gat tat agt cat gta tta aat cat gtt aca ttt gta cga tgg cca Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro 420 425 430	1296
ggg gag att tca gga agt gat tca tgg aga gct cca atg ttt tct tgg Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp 435 440 445	1344
acg cac cgt agt gca acc cct aca aat aca att gat ccg gag agg att Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile 450 455 460	1392
act caa ata cca ttg gta aaa gca cat aca ctt cag tca ggt act act Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr 465 470 475 480	1440
gtt gta aga ggg ccc ggg ttt acg gga gga gat att ctt cga cga aca Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr 485 490 495	1488
agt gga gga cca ttt gct tat act att gtt aat ata aat ggg caa tta Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu 500 505 510	1536
ccc caa agg tat cgt gca aga ata cgc tat gcc tct act aca aat cta Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu 515 520 525	1584
aga att tac gta acg gtt gca ggt gaa cgg att ttt gct ggt caa ttt Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe 530 535 540	1632
aac aaa aca atg gat acc ggt gac cca tta aca ttc caa tct ttt agt Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser 545 550 555 560	1680
tac gca act att aat aca gct ttt aca ttc cca atg agc cag agt agt Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser 565 570 575	1728
ttc aca gta ggt gct gat act ttt agt tca ggg aat gaa gtt tat ata Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile 580 585 590	1776
gac aga ttt gaa ttg att cca gtt act gca aca ttg gaa gca gaa tct Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser 595 600 605	1824
gat tta gaa aga gca caa aag gcg gtg aat gcg ctg ttt act tct agc Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser 610 615 620	1872
aac caa ata ggg cta aaa aca gat gtg acg gat tat cat atc gat cga Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg	1920

ES 2 620 479 T3

625	630	635	640	
gta tcc aat tta gtt gag tgt tta tct gat gaa ttt tgt ctg gat gaa Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu 645 650 655				1968
aaa aaa gaa ttg tcc gag aaa gtc aaa cat gcg aag cga ctt agt gat Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp 660 665 670				2016
gag cgg aat tta ctt caa gat cca aac ttt aga ggg atc aat aga caa Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln 675 680 685				2064
cta gac cgt ggc tgg aga gga agt acg gat att acc atc caa gga ggc Leu Asp Arg Gly Trp Arg Glu Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly 690 695 700				2112
gat gac gta ttc aaa gag aat tac gtt acg cta ttg ggt acc ttt gat Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp 705 710 715 720				2160
gag tgc tat cca acg tat tta tat caa aaa ata gat gag tcg aaa tta Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu 725 730 735				2208
aaa gcc tat acc cgt tac caa tta aga ggg tat atc gaa gat agt caa Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln 740 745 750				2256
gac tta gaa atc tat tta att cgc tac aat gcc aaa cac gaa aca gta Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val 755 760 765				2304
aat gtg cca ggt acg ggt tcc tta tgg ccg ctt tca gcc cca agt cca Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro 770 775 780				2352
atc gga aaa tgt gcc cat cat tcc cat cat ttc tcc ttg gac att gat Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp 785 790 795 800				2400
gtt gga tgt aca gac tta aat gag gac tta ggt gta tgg gtg ata ttc Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe 805 810 815				2448
aag att aag acg caa gat ggc cat gca aga cta gga aat cta gaa ttt Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe 820 825 830				2496
ctc gaa gag aaa cca tta gta gga gaa gca cta gct cgt gtg aaa aga Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg 835 840 845				2544
gcg gag aaa aaa tgg aga gac aaa cgt gaa aaa ttg gaa tgg gaa aca Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr 850 855 860				2592
aat att gtt tat aaa gag gca aaa gaa tct gta gat gct tta ttt gta Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val 865 870 875 880				2640
aac tct caa tat gat aga tta caa gcg gat acc aac atc gcg atg att				2688

ES 2 620 479 T3

Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile	
885 890 895	
cat gcg gca gat aaa cgc gtt cat agc att cga gaa gct tat ctg cct	2736
His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro	
900 905 910	
gag ctg tct gtg att ccg ggt gtc aat gcg gct att ttt gaa gaa tta	2784
Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu	
915 920 925	
gaa ggg cgt att ttc act gca ttc tcc cta tat gat gcg aga aat gtc	2832
Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val	
930 935 940	
att aaa aat ggt gat ttt aat aat ggc tta tcc tgc tgg aac gtg aaa	2880
Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys	
945 950 955 960	
ggg cat gta gat gta gaa gaa caa aac aac cac cgt tgc gtc ctt gtt	2928
Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val	
965 970 975	
gtt ccg gaa tgg gaa gca gaa gtg tca caa gaa gtt cgt gtc tgt ccg	2976
Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro	
980 985 990	
ggt cgt ggc tat atc ctt cgt gtc aca gcg tac aag gag gga tat gga	3024
Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly	
995 1000 1005	
gaa ggt tgc gta acc att cat gag atc gag aac aat aca gac gaa	3069
Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	
1010 1015 1020	
ctg aag ttt agc aac tgt gta gaa gag gaa gta tat cca aac aac	3114
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn	
1025 1030 1035	
acg gta acg tgt aat gat tat act gcg act caa gaa gaa tat gag	3159
Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	
1040 1045 1050	
ggt acg tac act tct cgt aat cga gga tat gac gga gcc tat gaa	3204
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu	
1055 1060 1065	
agc aat tct tct gta cca gct gat tat gca tca gcc tat gaa gaa	3249
Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	
1070 1075 1080	
aaa gca tat aca gat gga cga aga gac aat cct tgt gaa tct aac	3294
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn	
1085 1090 1095	
aga gga tat ggg gat tac aca cca cta cca gct ggc tat gtg aca	3339
Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr	
1100 1105 1110	
aaa gaa tta gag tac ttc cca gaa acc gat aag gta tgg att gag	3384
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu	
1115 1120 1125	
atc gga gaa acg gaa gga aca ttc atc gtg gac agc gtg gaa tta	3429
Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu	
1130 1135 1140	
ctt ctt atg gag gaa taa	3447
Leu Leu Met Glu Glu	
1145	

5 <210> 2
 <211> 1148
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 2

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175

ES 2 620 479 T3

Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
 180 185 190

Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
 195 200 205

Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
 210 215 220

Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
 225 230 235 240

Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
 245 250 255

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
 260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
 275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
 290 295 300

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
 305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
 325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
 340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
 355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
 370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
 405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
 420 425 430

ES 2 620 479 T3

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
 435 440 445
 Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
 450 455 460
 Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
 465 470 475 480
 Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
 485 490 495
 Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
 500 505 510
 Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
 515 520 525
 Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
 530 535 540
 Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
 545 550 555 560
 Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
 565 570 575
 Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
 580 585 590
 Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser
 595 600 605
 Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser
 610 615 620
 Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
 625 630 635 640
 Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
 645 650 655
 Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
 660 665 670
 Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
 675 680 685

ES 2 620 479 T3

Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
 690 695 700
 Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
 705 710 715 720
 Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 725 730 735
 Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 740 745 750
 Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 755 760 765
 Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
 770 775 780
 Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 785 790 795 800
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 805 810 815
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 820 825 830
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 835 840 845
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 850 855 860
 Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 865 870 875 880
 Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 885 890 895
 His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 900 905 910
 Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 915 920 925
 Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val

ES 2 620 479 T3

930	935	940
Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys 945 950 955 960		
Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val 965 970 975		
Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro 980 985 990		
Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly 995 1000 1005		
Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu 1010 1015 1020		
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn 1025 1030 1035		
Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu 1040 1045 1050		
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu 1055 1060 1065		
Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu 1070 1075 1080		
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn 1085 1090 1095		
Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr 1100 1105 1110		
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu 1115 1120 1125		
Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu 1130 1135 1140		
Leu Leu Met Glu Glu 1145		

REIVINDICACIONES

1. Una proteína seleccionada del grupo que consiste en holotoxina Cry1Fa y toxina central Cry1Fa en donde dicha proteína está marcada con un isótopo radiactivo de yodo y en donde dicha proteína marcada retiene la capacidad de unirse selectivamente a receptores de las vesículas de membrana del borde en cepillo preparadas a partir de intestinos medios de *Spodoptera exigua* y *Spodoptera frugiperda*, en donde la Cry1Fa se radiomarca tomando como diana un resto de Cys C205 localizado en el dominio I de la toxina central Cry1Fa.
2. La proteína de la reivindicación 1 que es holotoxina Cry1Fa.
3. Una toxina central Cry1Fa en donde dicha proteína está marcada con un isótopo radiactivo de yodo y en donde dicha proteína marcada retiene la capacidad para unirse selectivamente a receptores en las vesículas de membrana del borde en cepillo preparadas a partir de intestinos medios de *Spodoptera exigua* y *Spodoptera frugiperda*.
4. Un método de ensayo de unión de tipo-saturación para determinar la actividad de unión de la toxina central Cry1Fa a receptores en el intestino medio de una especie de insecto dada que comprende:
 - a) preparar una suspensión que contiene una concentración conocida de vesículas de membrana del borde en cepillo, aislada a partir de intestinos medios de la especie de insecto;
 - b) añadir, en recipientes separados, cantidades ascendentes de la Cry1Fa marcada de la reivindicación 3 a una cantidad fija de la suspensión de vesículas de membrana en borde en cepillo bajo condiciones tiempo y tampón que permiten a Cry1Fa marcada unirse a los receptores de las vesículas de membrana del borde en cepillo;
 - c) separar la Cry1Fa marcada no unida de la Cry1Fa marcada unida a los receptores de las vesículas de membrana del borde en cepillo; y
 - d) contabilizar cualquier señal radiactiva emitida a partir de la Cry1Fa marcada unida a las vesículas de membrana del borde en cepillo.
5. Un método de ensayo de unión competitiva para determinar reactividad cruzada que comprende:
 - a) preparar una suspensión que contiene vesículas de membrana del borde en cepillo aisladas a partir de intestinos medios de una especie de insecto;
 - b) mezclar la Cry1Fa marcada de la reivindicación 3 con un exceso de una proteína no marcada diferente y la suspensión de vesículas de membrana del borde en cepillo bajo condiciones de tiempo y tampón que permiten a la Cry1Fa marcada y a la proteína no marcada unirse a los receptores de las vesículas de membrana del borde en cepillo;
 - c) aislar las vesículas de membrana del borde en cepillo unidas de la mezcla de Cry1Fa marcada no unida y proteína sin marcar no unida; y
 - d) comparar la radiactividad emitida des de la fracción de vesículas de membrana del borde en cepillo unida con la radiactividad emitida desde la fracción de la mezcla no unida.
6. El método de la reivindicación 5 en donde la proteína sin marcar es una proteína Cry.

Figura 1

Bioensayo de Cry1Fa truncada con tripsina y Cry1Fa truncada con tripsina y marcada con fluoresceína-5-maleimida contra larvas de *S. frugiperda*

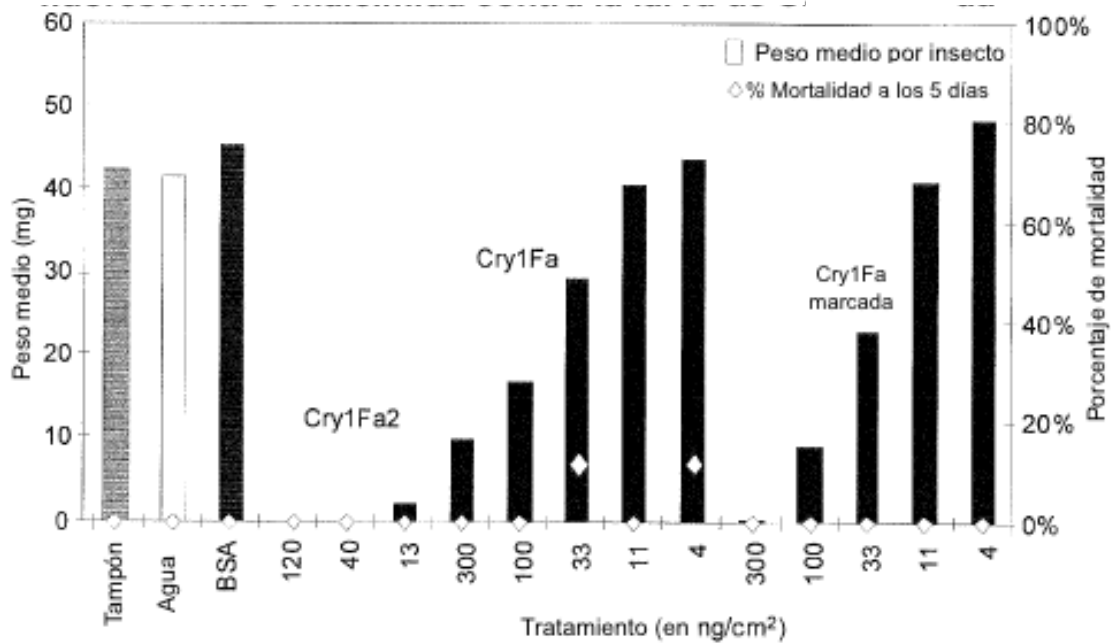


Figura 2

