

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 825**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/JP2010/072809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11078094**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10839324 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2518146**

54 Título: **Método para la detección y cuantificación de un gen endógeno del trigo**

30 Prioridad:

21.12.2009 JP 2009289137

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

14.11.2017

73 Titular/es:

**NISSHIN SEIFUN GROUP INC. (100.0%)
25, Kandanishiki-cho 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8441, JP**

72 Inventor/es:

**KITTA, KAZUMI;
FURUI, SATOSHI;
MANO, JUNICHI;
IMAI, SHINJIRO;
TANAKA, KEIKO;
MATSUOKA, YASUYUKI;
ARAMI, SHINICHIRO;
SATO, MEGUMI;
HARAGUCHI, HIROYUKI y
KURIMOTO, YOUICHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 641 825 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección y cuantificación de un gen endógeno del trigo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de detección y cuantificación de un gen endógeno del trigo (en lo sucesivo denominado “gen específico de la especie”) en una muestra de ensayo. En particular, la invención se refiere a un método para detectar y cuantificar un ADN endógeno del trigo (en lo sucesivo denominado “ADN específico de la especie”), que se utiliza para determinar la tasa de contaminación de trigo modificado genéticamente contenida en materiales alimenticios o alimentos procesados.

Antecedentes de la técnica

15 En Japón ya está aprobada la importación y la venta de 50 o más variedades de cultivos genéticamente modificados (en lo sucesivo denominado como “transgénico”), como el maíz, la soja y la patata que han pasado la evaluación de la seguridad. En relación con esto, los alimentos que contienen transgénicos deben ser etiquetados de acuerdo con las “Normas de etiquetado de los alimentos modificados genéticamente establecidas por el Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesca basadas en el artículo 7, párrafo 1 de la Norma de etiquetado de la calidad para los alimentos procesados y el artículo 7, párrafo 1 de la Norma de etiquetado de la calidad para alimentos frescos (Nota explicativa N.º 517 del Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesca, 31 de Marzo, el año 2000) y “la Aplicación de la Orden Ministerial que modifica parcialmente el Decreto Ministerial sobre el Reglamento de Aplicación de Ley de Higiene Alimentaria y Normas de Composición, etc. para la Leche y los Productos lácteos” (Nota explicativa N.º 79 del Departamento de Sanidad Alimentaria, Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar Social, 15 de marzo de 2001).

25 En otros países, sin embargo, los transgénicos pueden ser cultivados en algunos casos junto con los no transgénicos una vez que la evaluación de la seguridad de los mismos se ha completado, o puede producirse contaminación durante el proceso de distribución después de la cosecha. Por otra parte, muchos procesadores de alimentos y similares suelen contratar la fabricación de alimentos procesados a las empresas de fabricación, e incluso si estipulan la no utilización de transgénicos, si los transgénicos se utilizan en las plantas de las empresas de fabricación, pequeñas cantidades de dichos transgénicos pueden contaminar los alimentos procesados. En consecuencia, con el fin de cumplir con sus obligaciones de etiquetado, los procesadores de alimentos y similares deben evaluar y analizar los productos alimenticios procesados finales para confirmar que no están contaminados por transgénicos.

35 Los métodos conocidos de detección de transgénicos en muestras de ensayo de alimentos procesados, materias primas de los mismos, etc. incluyen un método de detección de un ADN recombinante mediante la reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo denominada “PCR”) y un método de detección de una proteína recombinante mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (en lo sucesivo denominado “ELISA”). En el caso de los alimentos procesados, muchas proteínas se desnaturalizan debido al calentamiento o presurización y no se puede, por lo tanto, detectar correctamente por ELISA en muchos casos. En consecuencia, con frecuencia se realiza la detección por PCR.

45 Los métodos conocidos para la evaluación y análisis de transgénicos incluyen el método descrito en el “JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods, segunda edición revisada” y en el método descrito en “Concerning Testing Methods for Foods Modified by Recombinant DNA Technology (parcialmente revisado) (Nota explicativa N.º 0618002 del Departamento de Sanidad Alimentaria, Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar Social, 18 de junio de 2003). Estos describen que en el ensayo y análisis de transgénicos, con el fin de confirmar si el ADN extraído de una muestra de ensayo puede ser amplificado por PCR, es necesario confirmar si se obtiene por PCR un producto de PCR que tiene una longitud esperada usando un par cebador que reconoce un ADN específico de la especie de cada producto agrícola. En la cuantificación de un transgénico contenido en una muestra de ensayo, la tasa de contaminación de un recombinante relativamente se determina basándose en la razón de abundancia entre un ADN recombinante y un ADN específico de la especie que está siempre presente en el cultivo.

55 Por ejemplo, en el caso del maíz, se han desarrollado los pares de cebadores que reconocen específicamente respectivamente las cinco líneas de variedades de transgénicos aprobados y también se ha desarrollado un par de cebadores que reconoce la región del gen SSIB como un ADN de maíz específico de la especie de maíz.

60 Debido a que este par de cebadores que reconoce el ADN específico de la especie proporciona un patrón para la cantidad de ADN específico de la especie en la detección y cuantificación del ADN, la región del ADN específico de la especie que va a amplificarse debería estar presente en una sola copia en el genoma. En “Concerning Testing Methods for Foods Modified by Recombinant DNA Technology (parcialmente revisado) (Nota explicativa N.º 1113001 del Departamento de Sanidad Alimentaria, Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar Social, 13 de noviembre de 2003), la PCR cuantitativa se realiza usando una sustancia patrón que es un producto de amplificación amplificado por un par de cebadores específico dirigidos a un ADN específico de la especie de maíz o de soja y un ADN

recombinante y ligado a un plásmido. La relación entre el número de copias del ADN recombinante y el número de copias del ADN específico de la especie puede determinarse con precisión mediante la realización de la PCR cuantitativa utilizando esta sustancia patrón y también mediante la realización de la PCR cuantitativa de una muestra de ensayo durante un tiempo predeterminado.

5 Cuando hay múltiples líneas de variedades de transgénicos, como en maíz, el uso de una sustancia patrón en la que un ADN específico de cualquier línea y un ADN específico de la especie están unidos a un único ADN circular permite provechosamente el uso de una sustancia patrón común para medir la tasa de contaminación de cualquier línea.

10 En general, es difícil obtener un gen específico de cualquier línea, pero una vez que se ha preparado un ADN replicable que lo contiene, también se puede obtener de forma estable un ADN específico de la línea mediante la replicación de este ADN.

15 [Bibliografía no de patente 3]
The JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods, Segunda edición revisada
[Bibliografía no de patente 4]
"Concerning Testing Methods for Foods Modified by Recombinant DNA Technology (Parcialmente revisado)"
20 (Nota explicativa N.º 0618002 del Departamento de Sanidad Alimentaria, Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar Social, 18 de junio de 2003)
[Bibliografía no de patente 5]
Kopell, E. et al.; Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 88, 164, publicado por Neukomm & Zimmermann (Berne)

25

Sumario de la invención

Problema técnico

30 Aunque los productos modificados genéticamente de trigo panificable todavía no han pasado una evaluación de la seguridad, se espera que tales productos aparezcan en el mercado en un futuro próximo. En consecuencia, existe una demanda para el desarrollo de un método para detectar y cuantificar un ADN específico de una especie de trigo y pares de cebadores de PCR para su uso en un método tal, en la preparación para la distribución de trigo transgénico.

35 El trigo existe en diversas formas de genes en comparación con otros cereales. Esto es debido a la presencia de genotipos de variedades de trigo hexaploide, tetraploide y diploide. El genotipo de trigo panificable común es hexaploide. Sus respectivos genes se parecen entre sí, pero tienen diferencias parciales debido a, por ejemplo, la translocación. Debido a estas razones, el trigo tiene variaciones en los genotipos en función de las variedades, no existiendo aún un gen de trigo específico de la especie que satisfaga los siguientes requisitos:

- 40
- A) ser omnipresentes en las variedades de trigo;
 - B) no variar en la abundancia (cantidad de detección) independientemente de las variedades de trigo;
 - C) no verse afectado en su detección por otros cereales y
 - 45 D) ser cuantitativamente amplificado por PCR.

El trigo tiene una alta homología con otros cereales como la cebada, el centeno y la avena en términos de la estructura del genoma y las secuencias de nucleótidos de los genes codificantes. Estos cereales tienen altas homologías con el trigo panificable y existen muchas posibilidades de que se produzca una detección falsa como trigo panificable. Por tanto, existe una demanda de un método que no experimente una reacción cruzada con otros cultivos con el fin de detectar específicamente solo un ADN específico de una especie de trigo panificable sin detectar erróneamente ADN derivados de otros cereales y cultivos.

50 Además, si una región de ADN específico de la especie que se amplifica por PCR está presente en múltiples copias, la cuantificación exacta de trigo en una muestra de ensayo es difícil. En consecuencia, con el fin de cuantificar con precisión la tasa de contaminación de trigo transgénico en una muestra de ensayo, es deseable que la región de ADN específico de la especie que se amplifica esté presente en el genoma en una tasa constante.

60 Por otra parte, en el caso de la determinación de la tasa de contaminación de un transgénico por PCR cuantitativa, para el trigo, también resulta de utilidad el uso de una sustancia patrón en la que una región que puede ser amplificada por un par cebador específico dirigido a un ADN del gen específico de la especie y un ADN recombinante está unido en un ADN circular.

65 En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un método adecuado para la detección y cuantificación de un ADN específico de la especie usando cebadores de PCR que especifican y amplifican una región parcial (genoma) del ADN de trigo que son ubicuos en las variedades de trigo, no variando en la abundancia

(cantidad de detección), y no reaccionando de forma cruzada con otras plantas.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una sustancia patrón en la que una región que puede ser
5
amplificada por un par de cebadores específicos están dirigidos a un ADN específico de una especie de trigo y un
ADN recombinante está unido en un ADN circular.

Solución al problema

10
Los presentes inventores han estudiado intensamente con el fin de resolver los problemas mencionados
anteriormente y, como resultado, han encontrado que una región parcial del gen de la proteína rica en prolina (PRP)
descrita en Raines CA, Lloyd JC, Chao SM, John UP, and Murphy GJ, A novel proline-rich protein from wheat, Plant
Mol. Biol., 1991, Apr. 16(4): 663-70 es ubicua en el ADN genómico de trigo independientemente de las variedades
de trigo. Además, los presentes inventores han encontrado que la región parcial del gen PRP puede ser amplificada
15 por PCR sin reactividad cruzada con otras plantas y se puede detectar específicamente o cuantificarse como una
secuencia de ADN específica de la especie de trigo y han completado la presente invención.

20
Es decir, la esencia de un primer aspecto de la presente invención es un método para detectar o cuantificar un ADN
específico de una especie de trigo en una muestra de ensayo por PCR, comprendiendo el método una etapa de
amplificación de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia parcial de una secuencia de nucleótidos
identificada como SEQ ID NO: 1, utilizando una molécula de ácido nucleico en la muestra de ensayo o una molécula
de ácido nucleico extraída de la muestra de ensayo como la plantilla y usando un par de cebadores capaces de
amplificar la secuencia parcial y una etapa de cuantificar la molécula de ácido nucleico amplificada.

25
En el primer aspecto de la presente invención, el par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en un par
de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos
identificada como SEQ ID NO: 4 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos
identificada como SEQ ID NO: 5 y un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que
comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4 y una molécula de ácido nucleico que
30 comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6.

Como se divulga en el presente documento, los cebadores del par de cebadores pueden ser moléculas de ácido
nucleico que tienen cada una longitud de 15 a 40 nucleótidos.

35
La esencia de un segundo aspecto de la presente invención es un kit para detectar o cuantificar una secuencia de
ADN específica de una especie de trigo en una muestra de ensayo por PCR, comprendiendo el kit el par de
cebadores anteriormente mencionado.

40
En la presente memoria se divulga un ADN replicable que comprende un ADN específico de la especie común tanto
al trigo modificado genéticamente como al trigo no modificado genéticamente y al menos un ADN específico del trigo
modificado genéticamente que incluye una secuencia específica de cualquier línea de trigo modificado
genéticamente. El ADN replicable se refiere a un ADN que tiene un origen de replicación específico de un
hospedador.

45
También se divulga en la presente memoria un ADN circular replicable que comprende un ADN que consiste en una
secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 80 % con la secuencia de nucleótidos identificada
como SEQ ID NO: 1. El ADN circular replicable puede contener además al menos un ADN que incluye una
secuencia específica de cualquier línea de trigo modificado genéticamente.

50
La esencia de un tercer aspecto de la presente invención es un ADN replicable que comprende una secuencia
parcial de una secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1, en el que la secuencia parcial consiste en
una región capaz de ser amplificada por PCR usando el par de cebadores anteriormente descrito, en el que el ADN
replicable comprende además al menos un ADN que consiste en una secuencia específica de cualquier línea de
trigo modificado genéticamente.

55
La esencia de un cuarto aspecto de la presente invención es un método para determinar una tasa de contaminación
de trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo, comprendiendo el método una primera etapa de
preparación de curvas de calibración para una región parcial de al menos una secuencia de ADN específica de la
especie de trigo y una región parcial de al menos una secuencia de ADN específica de cualquier línea de trigo
modificado genéticamente mediante la preparación de dos o más series de dilución de una solución que contiene el
60 ADN replicable de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención y someter cada serie de dilución a PCR
cuantitativa para la amplificación de las regiones parciales y una segunda etapa de determinar el número de
moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de la especie de trigo y el número de moléculas
de la región parcial de al menos una secuencia de ADN específica de cualquier línea de trigo modificado
genéticamente presente en una muestra de ensayo mediante la amplificación de las regiones parciales contenidos
65 en la muestra por PCR cuantitativa en las mismas condiciones que las de la primera etapa y utilizando las curvas de
calibración determinados en la primera etapa.

En el aspecto de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, el método puede comprender además una etapa de determinar una tasa de contaminación de trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo mediante el cálculo de una expresión, $100 \times A/B$, en la que A representa una relación que se obtiene dividiendo el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica del trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de la especie de trigo determinada en la segunda etapa y B representa una relación obtenida dividiendo el número de moléculas de una región parcial de una secuencia de ADN específicas de cualquier línea de trigo modificada genéticamente determinada por PCR cuantitativa usando una semilla patrón de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de la especie de trigo.

En el método de acuerdo con la cuarta realización de la presente invención, la secuencia de ADN específica de la especie de trigo se puede amplificar utilizando al menos un par de cebadores seleccionados de entre los pares de cebadores mencionados anteriormente.

El par de cebadores de PCR utilizado en el método de acuerdo con un aspecto de la presente invención detecta específicamente la especie de trigo y no reacciona de forma cruzada con los cultivos distintos del trigo, tales como arroz, cebada, centeno, avena, semilla de colza, maíz, mijo de cola de zorra, mijo común y alforfón. Por consiguiente, el método de acuerdo con un aspecto de la presente invención puede proporcionar información precisa de la presencia de trigo y la cantidad del mismo en una muestra de ensayo tal como un material alimenticio o un alimento procesado.

En un método de ensayo, si un par de cebadores de PCR reacciona de forma cruzada con un cultivo que no sea trigo, no solo puede obtenerse un resultado falso positivo en la detección de trigo, sino que además también puede ser difícil la cuantificación precisa de un ADN específico de una especie de trigo en una muestra de ensayo. Además, la región de un ADN específico de la especie que se amplifica en un método de detección debe ser ubicua entre variedades de trigo con una abundancia constante. Si las abundancias de la región de ADN específico de la especie entre las variedades de trigo no son las mismas, el ADN específico de una especie de trigo no se puede cuantificar con precisión. En consecuencia, en un método de este tipo y con un par de cebadores tales no se puede determinar con precisión la tasa de contaminación de trigo transgénico.

La presente invención proporciona un método para detectar específicamente o cuantificar un ADN específico de una especie de trigo en una muestra de ensayo tal como un material alimenticio o un alimento procesado sin reacción cruzada con otros cultivos y proporciona un par de cebadores de PCR utilizado en el método. El método de acuerdo con la presente invención detecta o cuantifica por PCR una región parcial que es específica para una secuencia de ADN específica de la especie de trigo, tiene una baja homología con cereales distintos del trigo y está presente en una sola copia en el genoma. Además, el uso de una sustancia patrón proporcionada por el método de acuerdo con la presente invención para la detección de trigo transgénico permite la determinación de las tasas de contaminación de las respectivas líneas de trigo transgénico en una muestra de ensayo por PCR cuantitativa con gran exactitud.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1]

La Figura 1 es una fotografía que muestra los resultados del Ejemplo 1 de la presente invención.

[Figura 2]

La Figura 2 es un gráfico que muestra las cantidades de detección de ADN específico de una especie de trigo de acuerdo con el Ejemplo 4 de la presente invención.

[Figura 3]

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de especificidad de acuerdo con el Ejemplo 5 de la presente invención.

[Figura 4]

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la investigación de los errores causados por la diferencia en el modelo de los aparatos de PCR cuantitativa de acuerdo con el Ejemplo 6 de la presente invención.

Descripción de la realización

A continuación se definen los términos utilizados en la memoria descriptiva y se describirá en detalle una realización de la presente invención.

En toda la memoria descriptiva, el término "trigo" significa trigo panificable a menos que se especifique lo contrario.

El método de acuerdo con la realización de la presente invención detecta una parte específica de una región del gen PRP en el genoma del trigo como secuencia de ADN específica de una especie de trigo.

Entre los genes Waxy (cerosos) descritos en Raines CA, Lloyd JC, Chao SM, John UP, and Murphy GJ, A novel proline-rich protein from wheat, Plant Mol. Biol., 16 Abr 1991 (4): 663-70, la región Wx012 descrita en la Publicación Internacional N.º WO2005/097989 no se puede detectar en el trigo duro. En consecuencia, se cree que la región

Wx012 está en el genoma del trigo D. En comparación con la cantidad de detección del gen Waxy y la cantidad de detección del gen PRP en cada variedad de trigo, la cantidad de la región Wx012 y la cantidad de la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 en el gen PRP son aproximadamente la misma, mientras que la relación entre la cantidad de la región Wx012 y la de la región del gen PRP distinta de la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 varía de 1:1 a 1:3 dependiendo de las variedades. Esto sugiere que el gen PRP no contiene una región PRP-3, sino que contiene una región similar a una región PRP-1. La cantidad de detección de la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 es aproximadamente la misma que la de Wx012, y la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 también se detecta en trigo duro. Esto sugiere que la región de gen se localiza en el genoma A o B del genoma de trigo. En el caso de la estimación de la tasa de contaminación de una variedad modificada genéticamente donde se modifica un gen de trigo, es necesario que el gen específico de la especie sea ubicuo entre las variedades de trigo en una abundancia constante. En la actualidad, además del trigo panificable, por ejemplo, en el mercado se comercializa el trigo duro y el trigo céreo. Por consiguiente, el gen específico de la especie a ser detectado es preferiblemente un gen comúnmente presente en estas variedades de trigo en una abundancia constante independientemente de las variedades. Es decir, ya que las variedades de trigo panificables comercializadas inevitablemente tienen genoma A o B, se prefiere como gen específico de la especie, un gen localizado en el genoma A o B.

Existen pseudogenes que son muy similares al gen PRP. Por consiguiente, secuencias parciales cortas seleccionadas al azar de longitud completa del gen PRP de un genoma de trigo en un alimento procesado pueden provocar la amplificación de regiones de varios genes distintos del gen PRP. Es decir, puede haber casos en los que las cantidades de ADN amplificado por unidad de trigo no son constantes en algunas variedades de trigo. Por consiguiente, los presentes inventores han estudiado exhaustivamente y, como resultado, han encontrado que la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 en la región del gen PRP no reacciona de forma cruzada con los pseudogenes. El método de acuerdo con la realización de la presente invención detecta y cuantifica un ADN específico de una especie de trigo mediante la amplificación de un ADN que contiene la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 por PCR.

La región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 tiene una longitud de aproximadamente 330 pb y es por tanto significativamente corta en comparación con el genoma de longitud completa. En consecuencia, es posible detectar y cuantificar la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 como un ADN específico de una especie de trigo, incluso si existe la posibilidad de que en la muestra los ADN estén fragmentados como en los alimentos procesados.

A lo largo de la memoria descriptiva, cualquier par de cebadores que pueda amplificar un ADN que contiene la región del gen identificada como SEQ ID NO: 1 se puede usar en la PCR. El par de cebadores se diseña basándose en la secuencia de nucleótidos de una región a amplificar de acuerdo con una regla básica en la preparación de la imprimación. En esta ocasión, cada cebador tiene preferiblemente un nivel de temperatura de fusión (T_m) similar y tiene una longitud de 15 a 40 pb, preferiblemente de 15 a 30 pb. Un par de cebadores de PCR con reacción cruzada con un cultivo que no sea de trigo puede dar resultados falsos positivos en la detección del trigo y también puede dificultar la cuantificación exacta de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo en una muestra de ensayo. Por otro lado, el par de cebadores de acuerdo con la realización no reacciona de forma cruzada con los cultivos distintos del trigo y se puede cuantificar con precisión un ADN específico de una especie de trigo.

Si la abundancia de una región de ADN específica de la especie a ser cuantificada varía dependiendo de las variedades de trigo, la tasa de contaminación de las variedades modificadas genéticamente no se puede cuantificar con precisión. Por otra parte, la región de ADN específica de la especie que va a amplificarse con el par de cebadores de acuerdo con la realización de la presente invención es ubicua entre las variedades de trigo con una abundancia constante.

El método de acuerdo con la realización de la presente invención proporciona una información precisa de la presencia de trigo y la cantidad del mismo en una muestra de ensayo tal como un material alimenticio o un alimento procesado. En consecuencia, se requiere el par de cebadores de PCR utilizado en el método de acuerdo con la realización para detectar específicamente el trigo y la dosis que no reacciona de forma cruzada con los cultivos distintos del trigo, tales como arroz, cebada, centeno, avena, semilla de colza, maíz, mijo de cola de zorra, mijo común y alforfón.

Como se divulga en la presente memoria, los ejemplos de un par de cebadores que se pueden utilizar sin reacción cruzada con cultivos distintos del trigo incluyen (i) un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3, (ii) un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3, (iii) un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5, (iv) un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5 y pares de cebadores que

comprenden cada uno secuencias de nucleótidos continuas de al menos el 80 % de las secuencias de nucleótidos que poseen las respectivas moléculas de ácido nucleico en los pares de cebadores (i) a (iv) descritos anteriormente. Estos pares de cebadores no reaccionan de forma cruzada con otros cultivos y pueden amplificar específicamente la región de ADN específica de una especie de trigo.

5 La muestra de ensayo utilizada en la realización de la presente invención es un material alimenticio o un alimento procesado que contiene trigo o tiene una posibilidad de contener trigo y ejemplos de los mismos incluyen ingredientes alimenticios tales como semillas crudas y semillas secas de trigo, harina de trigo y mezclas; materiales intermedios del procesamiento de los mismos y alimentos procesados como el pan y los fideos. Los materiales alimenticios y los alimentos procesados como muestras de ensayo no se limitan a los alimentos para personas y pueden ser alimentos o piensos, tales como alimentos para mascotas. Los cultivos distintos del trigo incluyen materiales alimenticios y todos los cultivos que se utilizan como materiales alimenticios y ejemplos de los mismos son cultivos tales como arroz, cebada, centeno, avena, semilla de colza, maíz, mijo de cola de zorra, mijo común y alforfón mencionados anteriormente.

15 La muestra de ensayo puede ser sometida directamente o después de la pulverización a la extracción de la molécula de ácido nucleico o puede ser sometida a la extracción de la molécula de ácido nucleico después de lavar, secar, y luego pulverizar. La molécula de ácido nucleico extraída de una muestra de ensayo y utilizada para el análisis es por lo general un ADN. El ADN puede extraerse por cualquier método conocido. En la actualidad, muchos kits de extracción de ADN están disponibles comercialmente y se pueden utilizar para la extracción del ADN. Por ejemplo, un ADN puede ser extraído de una muestra de ensayo usando un kit DNeasy Plant Maxi (fabricado por QIAGEN Inc.) de acuerdo con el método descrito en la Bibliografía no de patente 5. La concentración del ADN extraído se determina mediante, por ejemplo, medición de la absorbancia y se usa preferiblemente ADN diluido a una concentración apropiada para la PCR.

25 En el método de acuerdo con la realización de la presente invención, la PCR puede llevarse a cabo de acuerdo con un método habitual teniendo en cuenta los cebadores y las ADN polimerasas a utilizar. En este caso, se pueden preparar reactivos tales como una solución tampón de PCR, dNTP y $MgCl_2$ o se puede usar un kit comercializado. En la PCR, se puede utilizar uno o más de los pares de cebadores anteriormente mencionados. Las condiciones de la PCR pueden ser, por ejemplo, 40 ciclos de un ciclo de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 63 °C, y 30 segundos a 72 °C, seguido de 7 minutos a 72 °C para la reacción final, pero las condiciones pueden cambiar apropiadamente en consideración de la T_m de los cebadores utilizados, la longitud de la región a amplificar, la concentración del molde de ADN, etc.

35 La molécula de ácido nucleico amplificada (producto de PCR) se puede detectar utilizando cualquier método capaz de identificar un fragmento de ADN específico. La identificación se puede realizar mediante, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis capilar, hibridación, o un método inmunológico. En general, se identifica un producto de PCR basado en su patrón de electroforesis y puede ser detectado por electroforesis, por ejemplo, 0,8 % de gel de agarosa que contiene bromuro de etidio y la confirmación de la banda.

45 La realización de la presente invención incluye los pares de cebadores utilizados en el método de detección y cuantificación anteriormente descrito y un kit que contiene estos pares de cebadores. Los cebadores pueden ser producidos de acuerdo con un método habitual. El kit puede incluir los pares de cebadores y otros reactivos. El kit puede contener, por ejemplo, dNTP, $MgCl_2$, una polimerasa tal como la ADN polimerasa Taq, una solución tampón (tal como Tris-HCl), glicerol, DMSO, ADN de control positivo, ADN control negativo y agua destilada. Estos reactivos contenidos en el kit se pueden envasar individualmente o se pueden mezclar entre sí y luego envasarlos. La concentración de cada reactivo en el kit no está particularmente limitada dentro del intervalo que permite la PCR de acuerdo con la realización de la presente invención.

50 El kit también puede incluir condiciones de la PCR deseables y otra información.

En la presente memoria se divulga una sustancia patrón útil para la medición de la tasa de contaminación de trigo transgénico por PCR cuantitativa. Esta sustancia patrón es un ADN circular sencillo al cual está unido un ADN específico de una especie de trigo ubicuo tanto en trigo transgénico como no transgénico. La sustancia patrón puede contener además uno o más ADN específicos de trigo transgénico unidos al ADN circular.

55 En la sustancia patrón, el ADN específico de una especie de trigo en el ADN circular puede ser, por ejemplo, un ADN que incluye una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 80 % con la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1.

60 El ADN replicable usado como sustancia patrón puede ser cualquier ADN en el que se inserta el ADN específico de la especie de trigo o cualquier ADN en el que se insertan el ADN específico de una especie de trigo y un ADN específico de la línea de trigo transgénico. La sustancia patrón se puede producir usando, por ejemplo, un vector pBR (por ejemplo, pBR322 o pBR328), un vector pUC (por ejemplo, pUC19 o pUC18), un vector fago λ (por ejemplo, λ gt10 o λ gt11) o un vector comercializado de los mismos a los que no se ha aplicado ninguna modificación.

65

En algunos casos, la misma secuencia de ADN exógeno que la que se inserta en el trigo transgénico, se inserta en cultivos distintos al trigo para preparar cultivos transgénicos. Por lo tanto, si solo se detecta la secuencia de ADN exógeno, puede no estar claro si el ADN exógeno procede del trigo transgénico o de un cultivo transgénico diferente al trigo. Por consiguiente, en el caso de detectar trigo transgénico, se prefiere amplificar una región que comprende secuencias específicas de la especie presentes en dirección 5' y dirección 3' de la secuencia de ADN exógena, en comparación con la detección amplificando solamente la secuencia de ADN exógena insertada por modificación genética. En consecuencia, el cebador para la detección de una secuencia específica de la línea transgénica es preferiblemente un cebador que puede amplificar una región que comprende una secuencia de ADN exógena insertada en cada línea de trigo transgénico y las secuencias en dirección 5' y dirección 3' específicas de la especie de la misma. Tal cebador se prepara de acuerdo con el método descrito en la bibliografía no de patente 5, que describe el caso de la soja o un método basado en el mismo. La secuencia específica de cada línea de trigo transgénico a ser insertada en la sustancia patrón puede seleccionarse de secuencias de ADN que se pueden amplificar por un cebador de este tipo.

Después de la determinación del ADN específico de una especie de trigo y el ADN específico de un trigo transgénico a ser insertado en la sustancia patrón, la PCR se realiza usando un genoma de trigo normal y un genoma de trigo transgénico como moldes para clonar el fragmento de ADN específico de una especie de trigo y el fragmento de ADN específico de un trigo transgénico. Los fragmentos de ADN específico de la especie y de ADN específico de trigo transgénico clonados del ADN circular anteriormente mencionados se escinden con la misma enzima de restricción y los fragmentos de ADN específico de la especie y de ADN específico de trigo transgénico clonados se unen al sitio escindido del ADN circular. De este modo se produce una sustancia patrón. La enzima de restricción puede ser cualquiera conocida apropiadamente seleccionada, y, por ejemplo, se puede usar EcoRI, SpeI, EcoRV, SmaI, SacI, NotI, HindIII o XhoI.

Se preparan dos o más series de dilución de una solución que contiene la sustancia patrón resultante y cada una se somete a PCR cuantitativa para preparar curvas de calibración para las regiones parciales de la secuencia de ADN específica de una especie de trigo y la secuencia de ADN específica de ADN transgénico. La sustancia patrón también se puede utilizar como un control positivo para la secuencia de ADN específica de una especie de trigo y la secuencia de ADN específica de trigo transgénico en la PCR cualitativa.

La realización de la presente invención abarca un método para determinar la tasa de contaminación de trigo transgénico en una muestra de ensayo por PCR usando la sustancia patrón. El método incluye una primera etapa de determinación de curvas de calibración para secuencias específicas mediante el uso de la sustancia patrón y una segunda etapa de determinar el número de moléculas de una región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo y el número de moléculas de una región parcial de una secuencia de ADN específica de trigo transgénico presente en una muestra de ensayo mediante la amplificación de las regiones parciales de la secuencia de ADN específica de una especie de trigo y la secuencia de ADN específica de trigo transgénico contenidas en la muestra por PCR, en las mismas condiciones que las de la primera etapa durante un tiempo predeterminado, y el uso de las curvas de calibración preparadas en la primera etapa.

En la determinación de la tasa de contaminación de trigo transgénico en la muestra de ensayo, se calcula una relación de A, que se obtiene dividiendo el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de trigo transgénico contenida en la muestra de ensayo por el número de las moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo determinada en la segunda etapa. Por otra parte, se calcula una relación de B, que se obtiene dividiendo el número de moléculas de una región parcial de una secuencia de ADN específica de cada línea de trigo transgénico determinada por PCR cuantitativa usando una semilla patrón de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo. La tasa de contaminación del trigo modificado genéticamente en la muestra de ensayo se puede calcular por una expresión: $100 \times A/B$. La relación B se conoce como "relación de patrón interno" en la bibliografía no de patente 3 y es la relación entre un gen recombinante y un gen específico de la especie en un ADN extraído de la semilla de cada línea transgénica pura. La relación del patrón interno es constante en las semillas de cada línea recombinante.

Las etapas de PCR en el método de determinación de la tasa de contaminación de trigo transgénico de acuerdo con la realización de la presente invención pueden llevarse a cabo por separado o simultáneamente. Las etapas de la PCR se llevan a cabo preferiblemente en condiciones que permiten que se produzca la amplificación de una molécula de ácido nucleico a una velocidad aproximadamente la misma que la de la PCR para la preparación de la curva de calibración. Ejemplos de tales condiciones incluyen las mismas temperaturas y ciclos como en la PCR para la preparación de la curva de calibración. La tasa de contaminación de trigo transgénico puede calcularse a partir de los resultados obtenidos mediante la medición por separado de la cantidad de ADN específico de la especie y la cantidad del ADN recombinante. Como alternativa, la tasa de contaminación de trigo transgénico puede calcularse a partir de los resultados obtenidos mediante la amplificación simultánea del ADN específico de la especie y el ADN recombinante con un aparato de PCR en tiempo real de acuerdo con el método descrito en la bibliografía no de patente 3. En la realización de la presente invención, la expresión "ADN recombinante" se refiere a un ADN exógeno arbitrario introducido artificialmente en el trigo y se refiere a un ADN de, por ejemplo, una región que codifica un gen exógeno, una región no transcrita o no traducida, una región enlazadora o un sitio de vector.

Ejemplos

Las muestras, reactivos, aparatos y condiciones usados en los siguientes ejemplos son los siguientes.

5 (1) Muestras

Como trigo (*Triticum aestivum*), se utilizaron semillas secas de cuatro variedades nacionales de trigo (A a D) y 19 variedades extranjeras de trigo (E a W).

10 Como trigo duro (*Triticum durum*), se utilizaron semillas secas de una variedad.

Como maíz (*Zea mays*), se utilizaron semillas secas de una variedad de maíz dentado.

15 Como soja (*Glycine max*), se utilizaron semillas secas de una variedad progenie soja de una línea de soja Roundup Ready, que es una soja modificada genéticamente.

Como arroz (*Oryza sativa*), se utilizaron semillas secas de la línea Koshihikari (variedad Japónica).

20 Como cebada (*Hordeum vulgare*), se utilizaron semillas secas de cinco variedades convencionales.

Como avena (*Avena sativa*) se utilizaron semillas secas de una variedad comercializada.

Como centeno (*Secale cereale*), se utilizaron semillas secas de dos variedades comercializadas.

25 Como semilla de colza (*Brassica napus*), se utilizaron semillas secas de especies de canola.

Como mijo de cola de zorra (*Setaria italica* Beauvois), se utilizaron semillas secas de especies de mijo de cola de zorra glutinoso descascarillado.

30 Como mijo común (*Panicum miliaceum*), se utilizaron semillas secas de especies de mijo glutinoso descascarillado.

Como sorgo (*Sorghum subglabrescens*), se utilizaron semillas secas de un sorgo comercializado.

35 Como alforfón (*Fagopyrum esculentum*), se utilizaron semillas secas de una variedad convencional.

(2) Reactivos

La extracción de ADN de las muestras se realizó usando los siguientes reactivos:

40 Lauril sulfato de sodio (SDS) (producto químico de calidad especial) (Sigma Chemical Co.),
QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN GmbH) y
QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH).

La electroforesis del ADN se realizó usando los siguientes reactivos:

45 Ácido acético (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (producto químico de calidad especial) (Sigma Chemical Co.),
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (producto químico de calidad especial) (Sigma Chemical Co.),
50 Polvo de agarosa, LO3 "Takara" (Takara Shuzo Co., Ltd.),
Bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.),
Azul de bromofenol (Sigma Chemical Co.),
Xilenocianol (Sigma Chemical Co.),
Marcador de ADN "Escalera de 1 kb" (New England Biolabs Inc.) y
55 Marcador de ADN "Escalera de 100 pb" (New England Biolabs Inc.).

La PCR cualitativa se realizó usando los siguientes reactivos:

60 ADN polimerasa, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Inc.) y
× 10 tampón de PCR II (Applied Biosystems, Inc.).

La preparación y purificación de plásmidos se realizó utilizando los siguientes reactivos:

65 ADN polimerasa, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Inc.),
× 10 tampón de PCR II (Applied Biosystems, Inc.),
ADN polimerasa, KOD (Toyobo Co., Ltd.),
× 10 tampón de PCR II (Toyobo Co., Ltd.),

- TOPO TA Cloning Kit con células TOP10F' (Invitrogen Corp.),
 Extracto de levadura (Difco Laboratories Inc.),
 Peptona triptona (Difco Laboratories Inc.),
 NaCl (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),
 5 Polvo de agar (Takara Bio Inc.),
 D[-]-α-aminobencilpenicilina (Ampicilina) Sal de sodio (Sigma Chemical Co.),
 QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN GmbH),
 Etanol (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),
 2-Propanol (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),
 10 Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (producto químico de calidad especial) (Sigma Chemical Co.),
 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (producto químico de calidad especial) (Sigma Chemical Co.),
 Enzima de restricción, EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.),
 Enzima de restricción, SacI (New England Biolabs Inc.),
 Enzima de restricción, XbaI (New England Biolabs Inc.),
 15 Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Invitrogen Corp.),
 Fenol (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),
 Cloroformo (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y
 Alcohol isoamílico (producto químico de calidad especial) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).
- 20 La PCR cuantitativa se realizó utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc.).
- (3) Aparatos
- La extracción de ADN de las muestras se realizó usando un pulverizador, Multi Beads Shocker MB301 (Yasui Kikai
 25 Co., Ltd.).
- La electroforesis del ADN se realizó utilizando un aparato de electroforesis, Mupid 2 (Avance Co., Ltd.).
- La PCR cualitativa se realizó usando un ciclador térmico, PTC-200 (MJ Research Inc.).
- 30 La PCR cuantitativa se realizó utilizando un aparato de PCR cuantitativa, ABI PRISM 7700 Sequence Detector
 System (Applied Biosystems, Inc.).
- (4) Condiciones
- 35 La síntesis de los cebadores y las sondas se contrató a Operon Technologies Inc.
- La digestión con enzimas de restricción se realizó de acuerdo con el manual de cada enzima de restricción. Es decir,
 se mezcló una enzima de restricción, una solución de ADN, × 10 solución tampón unida a la enzima y agua destilada
 40 y se sometió a una reacción, en general, a 37 °C durante 2 horas.
- Los fragmentos de ADN tras la digestión con la enzima de restricción se separaron por electroforesis en gel de
 agarosa. La purificación a partir del gel se realizó usando un kit fabricado por QIAGEN GmbH. Es decir, un gel que
 45 contiene un ADN diana se fundió por calentamiento y el ADN se unió a una membrana de sílice. Posteriormente, la
 membrana de sílice se lavó con una solución que contiene etanol, seguido de elución con agua destilada.
- En la desfosforilación del plásmido digerido con la enzima de restricción, el plásmido digerido con la enzima de
 restricción se desaló y luego se mezcló con CIAP (fabricado por GIBCO Inc.) y un tampón exclusivo, seguido de
 50 reacción a 37 °C durante 30 minutos. Después de la reacción, la CIAP se inactivó mediante tratamiento con fenol y
 el plásmido desfosforilado se recogió por precipitación en etanol.
- La unión del ADN se realizó utilizando un kit de ligadura de ADN ver. 2 fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd. Así,
 una mezcla de reacción (soln I) del kit se añadió a una cantidad igual de una mezcla que contiene un ADN diana,
 seguido de reposo a 16 °C durante 30 minutos para la unión del ADN.
- 55 La transformación se realizó usando células competentes de *E. coli* DH5a fabricadas por Toyobo Co., Ltd. En hielo,
 se mezclaron de 10 a 50 µl de células competentes con el ADN y la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos.
 Después de choque térmico a 42 °C durante 50 segundos, la mezcla se colocó en hielo de nuevo durante 2 minutos
 y después se añadió a 450 µl de un medio SOC calentado a 37 °C, seguido de incubación a 37 °C durante 1 hora.
 60 Esta solución se aplicó a una placa con medio Circle Grow^{Amp⁺} en una cantidad de 100 µl/placa, seguido de cultivo a
 37 °C durante 16 horas.
- El cultivo para la purificación del plásmido se realizó usando un medio, Circle Grow. con resistencia a Amp como una
 65 presión de selección para la producción de plásmido mediante el uso de ampicilina a una concentración final de 100
 µg/ml. El cultivo se realizó con un agitador de tubos de ensayo a 37 °C durante 14 a 16 horas.

ES 2 641 825 T3

La PCR se realizó usando AmpliTaq Gold polimerasa fabricada por Applied Biosystems, Inc. a una composición de reacción mostrada en la Tabla 1 en las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 2.

[Tabla 1]

10 × Tampón	2,5
MgCl ₂ 25 mM	1,5
dNTP 2,5 mM	2,0
Par de cebador	2,5
5 μl/μl tag	0,25
H ₂ O MQ	15,75
ADN 50 ng/μl	0,5
Cantidad total	25,0

5

[Tabla 2]

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclo N.º
1	95	10 min	
2	95	30 seg	
3	60	30 seg	40
4	72	2 min	
5	72	7 min	
6	10	Continuación	

La clonación de TA se realizó usando un sistema de clonación TOPO TA fabricado por Invitrogen Corp. El método se realizó de acuerdo con el manual de la empresa.

10

La secuenciación del ADN se realizó utilizando CEQ 8000 fabricado por Beckman Coulter Inc. El método se realizó de acuerdo con el manual de la empresa. Como kit se utilizó la mezcla maestra de la empresa DTCS Quick Start.

15

La PCR en tiempo real se llevó a cabo por un método TaqMan. Como kit se utilizó TAKARA Premix Ex Taq (marca registrada) (Perfect Real Time) N.º de código RR039A. La PCR en tiempo real se realizó utilizando ADN genómicos como moldes sin diluir. Se preparó una mezcla maestra mezclando una premezcla, ROX, un cebador y una sonda como se muestra en la Tabla 3. Posteriormente, se mezclaron entre sí 16 μl/pocillo de la mezcla maestra y 4 μl/pocillo de un molde de ADN y se inició una reacción en las condiciones mostradas en la Tabla 4.

20

[Tabla 3]

	Concentración	
Premezcla	2 ×	10
ROX	50 ×	0,4
Sonda	10 μM	0,8
Par de cebador	5 μM de cada	0,8
H ₂ O		4,0
Cantidad total		16,0

[Tabla 4]

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo	Tiempo de rampa
1	50 °C	2 min	1	Auto
2	95 °C	10 min	1	Auto
3	95 °C	5 seg	40	Auto
	60 °C	30 seg		Auto
7	20 °C	1 min	1	Auto

Se diluyó el molde de ADN (plásmido pWIG04) como se muestra en la Tabla 5 con una solución de 5 ng/μl de ColE1.

25

[Tabla 5]

		Pocillo							
		2	3	4	5	6	7	8	
Concentración de la solución madre		10^7 copia/ μ l							
Concentración de la solución madre secundaria		10^5 copia/ μ l							
Volumen de la solución madre	μ l	4	20	20	20	20	20	20	
Volumen de la solución diluida	μ l	396	180	180	180	180	180	180	
Volumen de la solución madre	μ l	63,2	20	20	20	20	20	20	
Volumen de la solución diluida	μ l	136,8	180	180	180	180	180	180	
Concentración final copia/ μ l		$3,16 \times 10^4$	10^4	$3,16 \times 10^3$	10^3	$3,16 \times 10^2$	10^2	$3,16 \times 10^1$	

5 En el caso de la pulverización de una pequeña cantidad de semillas, se utilizó un Multi-beads shocker. En la pulverización, una semilla y un cono de metal se pusieron en un tubo de 2 ml y el tubo se cerró con una tapa, seguido de pulverización a 2000 rpm durante 10 segundos dos veces. Se extrajo el ADN directamente a partir del polvo de la semilla pulverizada.

10 El ADN genómico se preparó usando un QIAGEN Plant Mini Kit de acuerdo con el manual del kit. Específicamente, se añadieron 400 μ l de una solución AP1 y 4 μ l de ARNasa A a la semilla pulverizada, seguido de agitación. Posteriormente, la incubación a 65 °C durante 10 minutos se llevó a cabo con agitación dos o tres veces durante la incubación. Posteriormente, se añadió 130 μ l de AP2 a la misma, seguido de agitación. La mezcla se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Después de la centrifugación (15.000 rpm = 20.000 g, 5 min, temperatura ambiente), toda la cantidad del sobrenadante se aplicó a QIAshredder, seguido de centrifugación adicional (15.000 rpm, 2 min,

temperatura ambiente). Posteriormente, el sobrenadante obtenido directamente se transfirió a un recipiente separado por decantación, se añadieron 1,5 volúmenes (675 µl) de AP3/E al mismo y la mezcla se agitó. Se aplicó la mitad del volumen a una columna de centrifugación, y se realizó la centrifugación (10.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente). El flujo directo se descartó, y el residuo se aplicó al mismo tratamiento como antes. Posteriormente, la columna se colocó en otro tubo, se añadió 500 ml de AW a la misma y se realizó la centrifugación (10.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente). Después de repetir el tratamiento, el flujo directo se descartó y el residuo se sometió adicionalmente a centrifugación (15.000 rpm, 2 min, temperatura ambiente). La columna se colocó en otro tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 ml de AE a la misma. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se sometió a centrifugación (10.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente).

La cantidad de ADN se midió con un espectrofotómetro (GeneSpec). En la cuantificación, se utilizó una célula de 5 mm a una tasa de dilución de 1. Se utilizó la solución de eluato (AE) del kit como control.

Ejemplo de referencia 1: Construcción del plásmido patrón

El ADN genómico fue extraído de una semilla de la variedad nacional de trigo A y se realizó la PCR utilizando el ADN extraído como molde y usando los cebadores mostrados en la Tabla 6.

[Tabla 6]

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	Secuencia	Longitud de la cadena
2	PRP3F	5' - AAGCCACCGATGACTGA CAAT - 3'	21 pb
3	PRPds3R	5' - GGACAAAATGTGTCTTT CATGC - 3'	22 pb

El ADN amplificado resultante era TA clonado en un vector pCR4 TOPO usando un kit de clonación TOPO TA fabricado por Invitrogen Corp. Posteriormente, el plásmido resultante se digirió con la enzima de restricción EcoRI y un fragmento de 350 pb se purificó cortando la banda de un gel de electroforesis. El pWIG02, que se describe en la Publicación Internacional N.º WO2007/132760, se digirió con la enzima de restricción EcoRI y después se desfosforiló. El fragmento purificado se ligó al mismo para construir el plásmido patrón pWIG04. El fragmento insertado se confirmó mediante mapeo con enzimas de restricción del clon resultante y luego toda la secuencia se confirmó por secuenciación de ADN para que concordase con la secuencia diana.

Ejemplo 1: Búsqueda para la región de amplificación en el gen PRP

Se buscó en el gen PRP una región con cantidad de detección constante, independientemente de las variedades de trigo. El gen PRP del trigo tiene una homología con el gen PRP de la cebada. Una región que no cruza con la cebada es por lo tanto deseable como cebador. De acuerdo con ello, se buscó una región cebadora que no cruza con más de cinco variedades de cebada y se amplificó en tres variedades de trigo. La búsqueda se realizó utilizando un cebador directo PRP8F en combinación con un cebador inverso PRPds6R o PRPds7R mostrado en la Tabla 7. Como se muestra en la Fig. 1, los resultados muestran que en la combinación del cebador directo PRP8F y el cebador inverso PRPds6R, se amplifica un producto PCR a partir del trigo, pero un producto de PCR no se amplifica a partir de la cebada. Además, también se confirma que en la combinación del cebador directo PRP8F y el cebador inverso PRPds7R, un producto de PCR se amplifica a partir del trigo, pero no se amplifica a partir de cebada.

[Tabla 7]

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	Secuencia	Longitud de la cadena
4	PRP8F	5' - GCACCCATGATGAGTACTACT ATTCTGTA - 3'	29 pb
5	PRPds6R	5' - TGCAAACGAATAAAGCATGT G - 3'	22 pb
6	PRPds7R		22 pb

		5' - TGTGTCTTTTCATGCAAACGAA T - 3'	
--	--	---------------------------------------	--

Ejemplo 2: La búsqueda de la sonda

La investigación del ejemplo 1 reveló que la región amplificada por PRP8F y PRPds6R y la región amplificada por PRP8F y PRPds7R se prefieren como las regiones de amplificación por PCR de un gen específico de una especie. En consecuencia, se diseñó para estas regiones una sonda adecuada para los cebadores. La sonda fue diseñada utilizando el software de soporte de diseño de cebadores, Primer Express o Primer3 (El desarrollo de Primer3 y el sitio web Primer3 fue financiado por el Instituto Médico Howard Hughes y por los Institutos Nacionales de Salud, Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano en virtud de las subvenciones R01-HG00257 (a David C. Page) y P50-HG00098 (a Eric S. Lander): http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). La Tabla 8 muestra la secuencia de la sonda diseñada. Se sintetizó una sonda marcada con fluorescencia a partir de la secuencia de la sonda diseñada. En la sonda marcada con fluorescencia, el extremo 5' se modificó con FAM como el material fluorescente y el extremo 3' fue modificado con TAMRA como extinción.

[Tabla 8]

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	Secuencia	Longitud de la cadena
7	PRP - Taq 3	5' - GGTATATGTTTCATCTGTGC ACATGACTC - 3'	28 pb

Ejemplo 3: Establecimiento de las condiciones para la PCR en tiempo real

Se establecieron las condiciones para la PCR en tiempo real mediante un método TaqMan usando la sonda marcada con fluorescencia sintetizada en el Ejemplo 3 y usando el plásmido patrón pWIG04 como plásmido. Específicamente, las condiciones óptimas para la PCR en tiempo real se determinaron por el cambio de cada parámetro de la concentración de cebador, la concentración de la sonda, la temperatura de reacción de PCR y el tiempo. Las condiciones seleccionadas se muestran a continuación.

[Tabla 9]

	Concentración	
Premezcla	2 ×	10
ROX	50 ×	0,4
Sonda	10 μM	0,8
Par de cebador	5 μM de cada	0,8
H ₂ O		4,0
Cantidad total		16,0

[Tabla 10]

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo	Tiempo de rampa
1	50 °C	2 min	1	Auto
2	95 °C	10 min	1	Auto
3	95 °C	5 seg	40	Auto
	60 °C	30 seg		Auto
4	20 °C	1 min	1	Auto

Ejemplo 4: Confirmación de la universalidad de variedades de trigo

Después de la determinación de las condiciones óptimas para la PCR en tiempo real en el Ejemplo 3, las cantidades de detección de un ADN específico de una especie de trigo medidas por PCR en tiempo real por el método TaqMan se compararon para 23 variedades de trigo. Como los cebadores, se usaron PRP8F identificado como SEQ ID NO: 4 y PRPds6R identificado como SEQ ID NO: 6. Como la sonda, se usó PRP3-Taq identificada como SEQ ID NO: 7. Como se muestra en la Fig. 2, los resultados muestran que PRP se detecta en todas las 23 variedades de trigo y que PRP tiene una universalidad como específico de una especie de trigo.

Ejemplo 5: Validación de especificidad

Con el fin de confirmar que el método de acuerdo con la realización de la presente invención no se cruza con cultivos distintos del trigo, se realizó una prueba de especificidad. Los otros cultivos utilizados fueron cebada, avena, centeno, arroz, sorgo, colza, maíz, alforfón, mijo de cola de zorra, y mijo común. Los ADN se extrajeron de estos cultivos y la PCR en tiempo real se realizó utilizando los ADN extraídos como moldes en las condiciones óptimas determinadas en el Ejemplo 3. Como los cebadores, se usaron PRP8F identificado como SEQ ID NO: 4 y PRPds6R identificado como SEQ ID NO: 5. Como la sonda, se usó PRP-Taq3 identificada como SEQ ID NO: 7. Como se muestra en la Fig. 3, las tasas de detección no específicas de estos cultivos con respecto al valor detectado en el trigo eran 0,2 % o menos en todas las cinco variedades de cebada y 0,05 % o menos en otros cultivos. Por lo tanto, las tasas de detección no específica eran enormemente menores que el error estándar en la detección del trigo, lo que demuestra que estos cultivos distintos del trigo no afectan a la cuantificación del gen específico de la especie de trigo.

Ejemplo 6: Análisis de los errores entre los diferentes tipos de aparatos de PCR cuantitativa

En el mercado existen muchos tipos de aparatos de PCR cuantitativa y pueden diferir en el rendimiento. En consecuencia, se investigó usando el conjunto de cebadores y sonda de acuerdo con la realización de la presente invención independientemente de si los errores en el valor cuantitativo son debidos a la diferencia en el tipo de aparatos de PCR cuantitativa. Como aparatos de PCR cuantitativa, se usaron PRISM 7700 y el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 fabricados por Applied Biosystems, Inc. Como el reactivo de reacción de PCR, se usó TAKARA Premix Ex Taq (marca comercial registrada) (Perfect Real Time) N.º de código RR039A. Como conjunto de cebadores se usó PRP8F y PRPds6R y como sonda se utilizó PRP-Taq3. Como molde se usó el plásmido pWIG04 descrito en el Ejemplo de referencia 1. Se preparó una serie de diluciones del plásmido pWIG04 a fin de contener 10.000, 31.623, 10.000, 3.162, 1.000, 316, 100, o 32 copias por reacción. La reacción de PCR cuantitativa se realizó como en el Ejemplo 3. Como se muestra en la Fig. 4, los resultados muestran que ambos aparatos realizan la amplificación de una manera similar en el intervalo de dilución del molde de ADN. Por lo tanto, se confirmó que el conjunto de cebadores y la sonda de acuerdo con la realización de la presente invención no causan errores debido a la diferencia en el tipo de aparatos.

Descripción del Listado de secuencias

Las SEQ ID NOs: 1 a 17 descritas en la lista de secuencias de la memoria descriptiva son como sigue:

- SEQ ID NO: 1 es una secuencia de nucleótidos parcial de un gen PRP.
- SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos del cebador directo PRP3F.
- SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos del cebador inverso PRPds3R.
- SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos del cebador directo PRP8F.
- SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos del cebador inverso PRPds6R.
- SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos del cebador inverso PRPds7R.
- SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de una sonda.

A lo largo de la memoria descriptiva, cuando los nucleótidos se indican mediante símbolos, se utilizan símbolos de la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica o los símbolos comunes usados en la técnica. Los ejemplos de los símbolos se muestran a continuación.

a: adenina, t: timina, g: guanina, c: citosina.

Obsérvese que el número de GenBank de PRP es X52472; el número de GenBank de PRP-EST es CV772819; el número de GenBank de PRP de cebada es BE601897 y el número de GenBank del ADNc de PRP de cebada es CB881611.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NISSHIN SEIFUN GROUP INC.
- <120> Método para la detección y cuantificación de una secuencia de ADN endógena de trigo
- <130> N0419ABP0001JP
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 325

ES 2 641 825 T3

<212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*

<400> 1

5 aagccaccga tgactgacaa ttgatgtgat actcacatat gacagctgaa ggaggagatc 60
 gaccccgctcc ggagccacga tgtgctatct ctagaataag tggcatagta tccggtttagc 120
 gagatagtgga tgatgcatct ttttgtattc cttgtattcc accattcctt ttagtttctg 180
 ttgttccatg caccatgat gagtactact attctgtaat tatcatttgc gtgttggtat 240
 atgttcatct gtgcacatga ctcagttgtt ctttcgtgta gatacacatg cttttattcg 300
 tttgcacatgaa agacacattt tgtcc 325

<210> 2
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR PRP3F

15

<400> 2
 aagccaccga tgactgacaa t 21

<210> 3
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR PRPs3R

25

<400> 3
 ggacaaaatg tgtcttcat gc 22

30 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Cebador de PCR PRP8F

<400> 4
 gcacccatga tgagtactac tattctgta 29

40

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

45

<220>
 <223> PRPs6R

<400> 5
 50 tgcaaacgaa taaaagcatg tg 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

55

<220>
 <223> PPRPs7R

60 <400> 6
 tgtgtcttct atgcaaacga at 22

ES 2 641 825 T3

<210> 7
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial
5
<220>
<223> PRP-Taq3
10
<400> 7
ggtatatggt catctgtgca catgactc 28

REIVINDICACIONES

1. Un método de cuantificación de un ADN específico de una especie de trigo en una muestra de ensayo mediante reacción en cadena de la polimerasa, comprendiendo el método las etapas de:

5 amplificar una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia parcial de una secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1, utilizando como molde una molécula de ácido nucleico en la muestra de ensayo o una molécula de ácido nucleico extraída de la muestra de ensayo y usando un par de cebadores capaces de amplificar la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1 y
10 cuantificar la molécula de ácido nucleico amplificada que tiene la secuencia parcial de la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1, en donde el par de cebadores se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 15 (i) un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 5; y
20 (ii) un par de cebadores que consiste en una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 4 y una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 6.

2. Un kit para detectar o cuantificar una secuencia de ADN específica de una especie de trigo en una muestra de ensayo mediante reacción en cadena de la polimerasa, comprendiendo el kit el par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1.

25 3. Un ADN replicable que comprende una secuencia parcial de una secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1, en donde la secuencia parcial consiste en una región capaz de ser amplificada por reacción en cadena de la polimerasa usando el par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1 y en donde el ADN replicable comprende además al menos un ADN que consiste en una secuencia específica de una línea de trigo modificado genéticamente.

30 4. Un método de determinación de la tasa de contaminación de trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo, comprendiendo el método:

35 una primera etapa de preparar curvas de calibración para una región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo y una región parcial de una secuencia de ADN específica de al menos una línea de trigo modificado genéticamente mediante la preparación de dos o más series de dilución de una solución que comprende el ADN replicable de acuerdo con la reivindicación 3 y someter cada serie de dilución a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para amplificar las regiones parciales y
40 una segunda etapa de determinar el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo y el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de al menos una línea de trigo modificado genéticamente presente en una muestra de ensayo amplificando las regiones parciales contenidas en la muestra en las mismas condiciones que en la primera etapa y usando las curvas de calibración determinadas en la primera etapa.

45 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, comprendiendo el método además:

 una etapa de determinar la tasa de contaminación de trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo mediante el cálculo de una expresión, $100 \times A/B$, en la que

50 A representa una relación obtenida dividiendo el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de trigo modificado genéticamente por el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo determinada en la segunda etapa y
55 B representa una relación obtenida dividiendo el número de moléculas de una región parcial de una secuencia de ADN específica de cada línea de trigo modificado genéticamente, determinada por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa usando una semilla patrón de trigo modificado genéticamente, por el número de moléculas de la región parcial de una secuencia de ADN específica de una especie de trigo.

60 6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que la secuencia de ADN específica de una especie de trigo se amplifica usando al menos un par de cebadores seleccionado del par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1.

Fig. 1

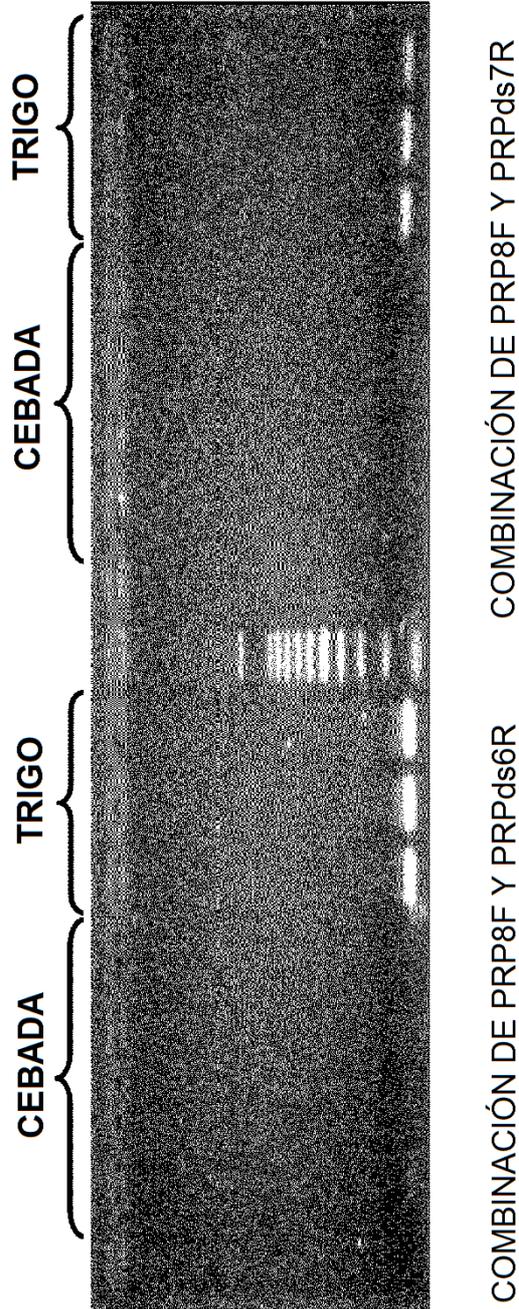


Fig. 2

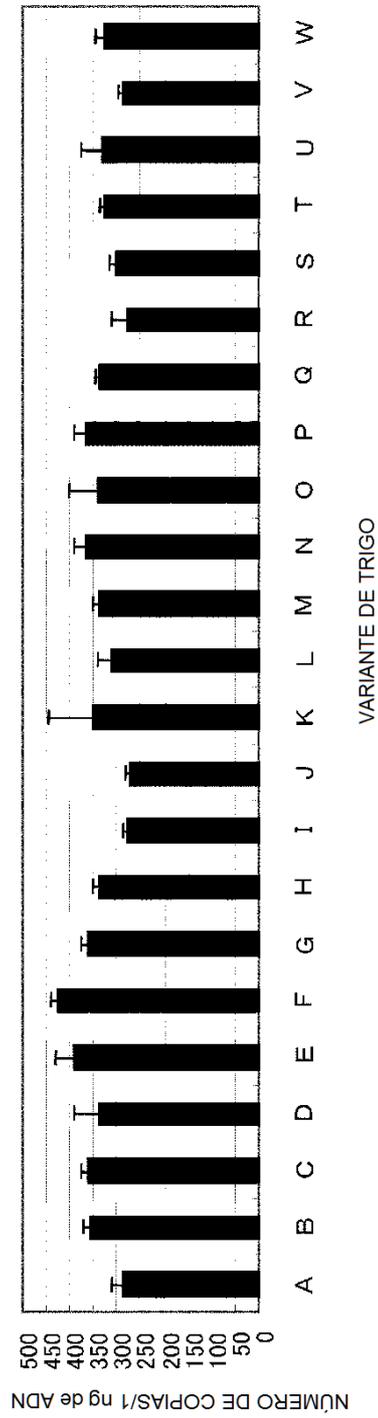


Fig. 3

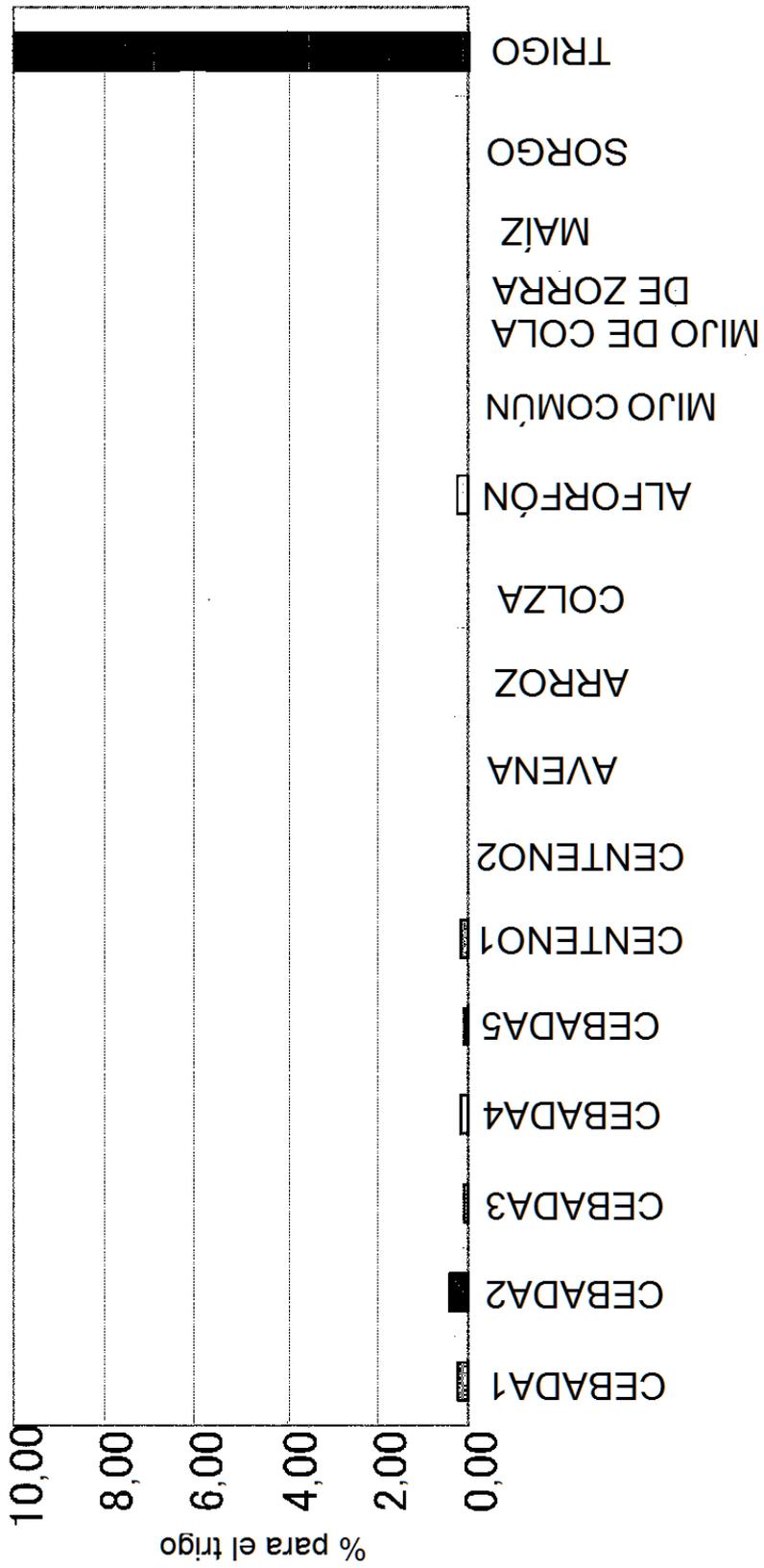


Fig. 4

