

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 026074-6 A2

(22) Data de Depósito: 09/10/2013  
(43) Data da Publicação: 04/11/2014  
(RPI 2287)



(51) Int.Cl.:  
C07K 16/40  
G01N 33/573  
C12N 5/16

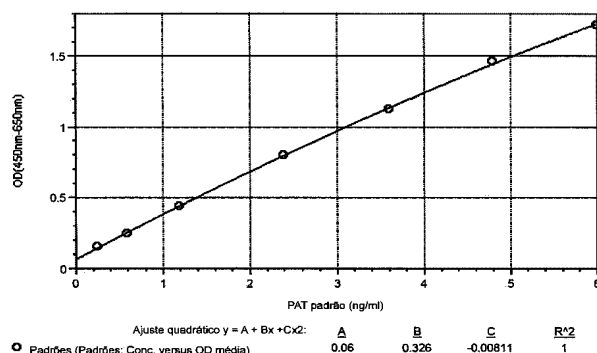
(54) Título: ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS DE DETECÇÃO PARA ENZIMAS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FOSFINOTRICIN-N-ACETIL TRANSFERASE

(30) Prioridade Unionista: 10/10/2012 US 61/711,950

(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC

(72) Inventor(es): ERIC H. MA, GUOMIN SHAN

(57) Resumo: ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS DE DETECÇÃO PARA ENZIMAS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FOSFINOTRICIN-N-ACETIL TRANSFERASE A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais e métodos úteis para determinar e quantificar a presença de uma enzima fosfinotricin-N-acetil transferase. Os anticorpos e os métodos reivindicados são particularmente úteis para identificar e quantificar a presença de fosfinotricin-N-acetil transferase expressa em plantas transgênicas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS DE DETECÇÃO PARA ENZIMAS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FOSFINOTRICIN-N-ACETIL TRANSFERASE".

5 REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO

O presente pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de patente U.S. nº de série 61/711.950, depositado em 10 de outubro de 2012, cuja citação é aqui incorporada em sua totalidade a título de referência.

10 CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se ao campo da imunologia para ensaios ELISA (ensaios imunossorventes ligados por enzimas) destinados a detectar as enzimas expressas por determinados eventos de plantas transgênicas que conferem resistência a glufosinato, L-fosfinotricina, herbicidas.

15 ANTECEDENTES

Os genes que codificam a fosfinotricin-N-acetil transferase (PAT), EC 2.3.1.183, são usados rotineiramente como marcadores selecionáveis em eventos transgênicos nas plantas e foram isolados originalmente do actinomicete aeróbico comum do solo, *Streptomyces viridochromogenes*. A enzima PAT catalisa a acetilação de fosfinotricina, desintoxicando a mesma em um composto inativo, o que resulta na acumulação de amônia e morte das células (Murakami T., Anzai H., Imai S., Satoh A., Nagaoka K., Thompson C. J. (1986). *Mol Gen Genet* 205:42 50; Twell D., Klein T. M., Fromm M. E., McCormick S. (1989). *Plant Physiol* 91:1270 1274). As células de plantas transformadas que expressam PAT podem, portanto, ser selecionadas ao usar glufosinato.

As companhias que desenvolvem e comercializam traços de DNA recombinante para produtos de semente de plantio formulam, implementam e se atêm a planos de controle estrito de produtos. Essas plantas de controle requerem o uso de métodos de detecção de proteína quantitativos e qualitativos validados para vários componentes do traço recombinante

para acompanhar as atividades de introgressão de traço e produção de sementes, assim como o monitoramento da colheita de grãos. Esses métodos de detecção devem ser fáceis e robustos o bastante para serem usados sob condições de GLP e que não de GLP. Além disso, os métodos devem ser convenientes aos usuários o bastante para serem empregados facilmente por fazendeiros no campo, negociantes de grãos no silo, e em funcionários da aduana nas fronteiras. Portanto, métodos de detecção de proteína robustos de alta qualidade e convenientes aos usuários e kits comerciais são úteis e necessários.

10. Embora os ensaios ELISA sejam bem conhecidos no estado da técnica, o desenvolvimento de métodos de ELISA robustos de alta qualidade validados que podem ser reproduzivelmente capazes de detectar um produto transgênico particular em uma disposição de tecido de planta em ajustes tanto de laboratório quanto de campo não é trivial nem rotineiro. Ainda mais
15. desafiante é encontrar pares de anticorpos que sejam particularmente adequados para o desenvolvimento de uma tira de fluxo lateral e/ou ELISA para detectar um evento transgênico de PAT funcional.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

- A presente invenção apresenta um painel de anticorpos monoclonais (mAbs), 155AD4, 155E2.1.114, 155Q3, 155Q12, e 155Q19.1 e as linhagens de células de hibridomas que produzem esses mAbs. Esses mAbs são surpreendentemente bem adequados para a detecção de eventos transgênico que expressam a proteína PAT em uma variedade de plantas e tecidos de plantas. A invenção também apresenta imunoensaios
20. quantitativos e qualitativos que usam as imunoglobulinas da invenção e incluem em geral um método para identificar a presença de uma enzima PAT, o qual compreende a) a imobilização de um primeiro mAb reivindicado sobre uma superfície de ensaio e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; b) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com
25. um líquido suspeito de conter a PAT por um período de tempo suficiente para permitir a ligação e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; c) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um segundo
- 30.

anticorpo reivindicado diferente conjugado a um grupo relator por um período de tempo suficiente para permitir a ligação do dito segundo anticorpo monoclonal conjugado e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; e d) a detecção da presença ou ausência do dito grupo relator. A

5 invenção também inclui de modo geral um método para a determinação quantitativa de uma enzima PAT, o qual compreende a) a imobilização de um anticorpo policlonal específico de PAT em uma superfície de ensaio; b) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um líquido suspeito de conter a PAT por um período de tempo suficiente para permitir a ligação e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; c) a colocação

10 da dita superfície de ensaio em contato com um segundo anticorpo reivindicado diferente conjugado a um grupo relator por um período de tempo suficiente para permitir a ligação do dito segundo anticorpo monoclonal conjugado e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; e d) a

15 quantificação da presença do dito grupo relator por meio da interpolação da comparação a uma curva de calibração. A invenção também inclui métodos de uso dos mAbs para o isolamento ou a detecção de PAT, os quais compreendem: a) a imobilização do dito anticorpo sobre uma superfície; b) a colocação do dito anticorpo imobilizado com uma mistura que contém a

20 PAT; c) a separação do dito anticorpo imobilizado ligado à PAT da dita mistura; e d) a recuperação da PAT ao remover a PAT ligada a anticorpo do dito anticorpo imobilizado.

#### BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

A FIG. 1 é uma análise de curva padrão de ELISA. A proteína

25 PAT recombinante purificada foi diluída até 7 concentrações que variam de 0,25 a 6,0 ng/ml. As concentrações foram traçadas ao usar leituras da densidade ótica a 450 nm depois de ter subtraído um OD de fundo a 650 nm.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção engloba os anticorpos que ligam especificamente PAT e os hibridomas que produzem os mAbs. A tabela a seguir

30 lista as designações das linhagens de células de hibridoma reivindicadas e suas datas de depósito correspondentes.

Designação de Hibridoma/mAb	Designação de Depósito na ATCC	Data de Depósito na ATCC
155AD4	PTA-13188	12 de setembro de 2012
155E2.1.114	PTA-13189	12 de setembro de 2012
155Q3	PTA-13187	12 de setembro de 2012
155Q12	PTA-13190	12 de setembro de 2012
155Q19.1	PTA-13186	12 de setembro de 2012

As linhagens de células de hibridoma foram depositadas e ficarão disponíveis ao público sem limitação, mas sujeitas aos direitos de patentes, junto à American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110. As linhagens de células reivindicadas foram depositadas em nome da Dow AgroSciences LLC em 12 de setembro de 2012. Esses depósitos foram feitos e serão mantidos de acordo com, e sob os termos, do Tratado de Budapeste no que diz respeito aos depósitos de linhagens de células para as finalidades de procedimentos de patente. Esses depósitos serão mantidos sem limitação no depositário da ATCC, que é um depositário público, por um período de 30 anos, ou cinco anos após a solicitação mais recente, ou para o período de validade da patente, qualquer que seja mais longo, e serão substituídos se ficarem inviáveis durante esse período.

A invenção inclui métodos de uso dos mAbs para o isolamento ou a detecção de PAT, os quais compreendem a imobilização do dito anticorpo sobre uma superfície, a colocação do dito anticorpo imobilizado em contato com uma mistura que contém PAT, a separação do dito anticorpo imobilizado ligado a PAT da dita mistura, e a recuperação de PAT ao removendo a PAT ligada a anticorpo do dito anticorpo imobilizado.

A invenção também inclui um método de uso dos anticorpos reivindicados para a identificação da presença de PAT em uma amostra biológica, o qual compreende a imobilização do dito anticorpo sobre uma superfície de ensaio, a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um líquido suspeito de conter a PAT e a lavagem da dita superfície de ensaio com uma solução apropriada, a colocação da dita superfície de ensaio em

contato com um anticorpo anti-PAT etiquetado com um grupo relatador e a lavagem da dita superfície de ensaio com uma solução apropriada e a detecção da presença do dito grupo relatador.

5 A invenção também inclui um método analítico para a determinação quantitativa da enzima PAT expressa em plantas transgênicas, especialmente em pé de milho, soja e algodão. A proteína PAT é extraída das amostras de uma planta com uma solução salina tamponada com fosfato. O extrato é centrifugado e o sobrenadante aquoso é coletado e diluído. Uma alíquota da amostra diluída é incubada com o anticorpo monoclonal anti-PAT  
10 conjugado com enzima da invenção reivindicada nas cavidades de uma placa revestida com anticorpo anti-PAT policlonal ou monoclonal em um formato de ELISA de sanduíche. Ambos os anticorpos no par do sanduíche capturam a proteína PAT na amostra. No final do período de incubação, os reagentes não ligados são removidos da placa por meio de lavagem com PBST.  
15 A presença de PAT é detectada ao incubar o conjugado da enzima com um substrato de enzima, gerando um produto colorido. Uma vez que a PAT esteja ligada no sanduíche de anticorpo, o nível de desenvolvimento da cor é proporcional à concentração de PAT na amostra (isto é, concentrações mais baixas de proteína resultam em um desenvolvimento menor da cor). A absorvância a 450 nm menos a absorvância a um comprimento de onda de referência (tal como 650 nm) é medida ao usar um leitor de placa. Uma curva de calibração é estimada a partir de sete concentrações padrão ao usar uma equação de regressão quadrática. Esse ensaio ELISA de PAT é específico e sensível o bastante para a quantificação de PAT em extratos de amostras de tecidos de plantas. Além disso, os anticorpos da invenção podem ser  
20 usados para confirmar a presença de PAT ao usar um procedimento de transferência Western padrão.  
25

A preparação dos anticorpos versus as proteínas de interesse é bem conhecida no estado da técnica. Vide Galfre and Milstein, *Methods in*  
30 *Enzymology*, Vol. 73, Academic Press, New York (1981); James W. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, Orlando, Florida (1986); *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, et al.

ed., Wiley Interscience, New York, (1987).

Para preparar os anticorpos reativos com uma proteína de interesse, a proteína deve ser em primeiro lugar enriquecida ou purificada. Preparados antigênicos relativamente brutos da proteína podem ser usados para finalidades de imunização. No entanto, uma proteína altamente purificada é requerida para determinar com exatidão se os hibridomas estão produzindo os anticorpos monoclonais procurados ou para o ensaio dos títulos do anticorpo do soro imunológico.

Uma vez que a enzima PAT tenha sido purificada, os anticorpos específicos para a PAT podem ser obtidos pelos métodos convencionais que são bem conhecidos no estado da técnica. As injeções repetidas em um hospedeiro animal selecionado por um período de semanas ou meses irão acarretar uma resposta imunológica e resultar em títulos significativos do soro anti-PAT. Os hospedeiros preferidos são espécies de mamíferos e as espécies mais altamente preferidas são de coelhos, cabras, carneiros e camundongos. O sangue extraído de tais animais imunizados pode ser processado por métodos estabelecidos para obter o antissoro (anticorpos policlonais) reativo com PAT. O antissoro pode então ser purificado por afinidade mediante a adsorção para PAT de acordo com as técnicas conhecidas no estado da técnica. O antissoro purificado por afinidade pode ainda ser purificado ao isolar a fração de imunoglobulina dentro do antissoro ao usar procedimentos conhecidos no estado da técnica. O material resultante será uma população heterogênea de imunoglobulinas reativas com PAT.

Os mAbs anti-PAT são preparados de imediato ao usar PAT purificada. Os métodos para a produção de mAbs têm sido praticados há várias décadas e são bem conhecidos dos elementos versados na técnica. As injeções intraperitoneais ou subcutâneas repetidas de PAT em um adjuvante irão acarretar uma resposta imunológica na maior parte dos animais, especialmente os camundongos. Os B-linfócitos hiperimunizados são removidos do animal e fundidos com uma linhagem de células parceira de fusão apropriada que pode ser cultivada indefinidamente. Numerosas linhagens de células de mamíferos são parceiros de fusão apropriados para a produção de hibri-

domas. Muitas de tais linhagens são comercialmente disponíveis junto à ATCC e a fornecedores comerciais.

Uma vez fundidos, os hibridomas resultantes são cultivados em um meio de crescimento seletivo por uma a duas semanas. Dois sistemas  
5 de seleção bem conhecidos são disponíveis para a eliminação de células de mieloma não fundidas ou fusões entre células de mieloma da cultura de mielomas misturados. A escolha do sistema de seleção depende da cepa do camundongo imunizada e do parceiro da fusão de mieloma usado. O sistema de seleção AAT, descrito por Taggart e Samloff, Science 219, 1228  
10 (1982), pode ser usado; no entanto, o sistema de seleção HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina), descrito por Littlefield, Science 145, 709 (1964), é o preferido por causa de sua compatibilidade com as células de camundongo e os parceiros de fusão mencionados acima.

O meio de crescimento usado é então selecionado para a secre-  
15 ção imuno específica de mAb. Os procedimentos de ensaios imunossorventes ligados por enzima são mais bem adequados para esta finalidade; no entanto, os ensaios radioimunológicos adaptados para a seleção em grande volume também são aceitáveis. Múltiplas seleções destinadas a restringir consecutivamente abaixo o número considerável de culturas irrelevantes ou  
20 menos desejadas devem ser executadas para isolar a porcentagem pequena dos mAbs da presente invenção. As culturas que secretam mAbs reativos com PAT podem ser isotipificadas ao usar ensaios comercialmente disponíveis.

As culturas de Hibridomas que secretam os mAbs anti-PAT pro-  
25 curados podem ser subclonadas várias vezes para estabelecer a monoclonalidade e a estabilidade. Os métodos bem conhecidos a subclonagem de culturas de células eucariotas não aderentes incluem as técnicas de limitação da diluição, agarose mole e de classificação de células ativadas por fluorescência. Depois de cada subclonagem, as culturas resultantes devem en-  
30 saiadas novamente quanto à secreção de anticorpo e isotipificadas para assegurar que uma linhagem de células de hibridoma de secreção de anticorpo estável seja estabelecida.



Os anticorpos anti-PAR reivindicados podem ser imobilizados em uma superfície de modo que uma parte do sítio de ligação de anticorpo permaneça exposto e com capacidade de ligar PAT. Uma ampla variedade de esquemas para a imobilização de anticorpos foi desenvolvida nas poucas  
5 décadas passadas. A imobilização pode ser realizada ao acoplar de maneira covalente o anticorpo diretamente à superfície desejada ou ao ligar o anticorpo à superfície.

O acoplamento de CNBr e de carbodiimida de anticorpos a grânulos à base de polissacarídeos tais como SEPHAROSE® (Pharmacia, Piscataway, NJ) é ilustrativo dos esquemas de acoplamento direto que são  
10 consistentes com a invenção. Os acoplamentos diretos de modo geral não orientam os anticorpos de nenhuma forma particular; no entanto, alguns tipos de acoplamentos diretos podem orientar de maneira reproduzível o anticorpo na substância de imobilização.

Os esquemas de acoplamento preferidos orientam o anticorpo de maneira tal que as suas regiões de ligação de antígeno permanecem expostas. Tal esquema utiliza o carboidrato natural encontrado nas cadeias pesadas do anticorpo. Ao oxidar em primeiro lugar as porções carboidrato nos aldeídos correspondentes e ao reagir então o aldeído com um grupo  
15 amino primário na superfície, é possível ligar o anticorpo em uma orientação vantajosa.

Muitos tipos de ligações são possíveis e incluem pequenos ligantes orgânicos, que ligam covalentemente o anticorpo à substância de imobilização. Tais braços espaçadores são aceitáveis e de preferência não  
25 devem interagir com as proteínas uma vez que a ligação tenha sido formada.

A discussão acima não se presta de nenhuma maneira a limitar o âmbito da invenção. Numerosos outros esquemas bem conhecidos para a ligação de anticorpos a substâncias de imobilização são consistentes com a invenção.

É bem conhecido que os anticorpos etiquetados com um grupo relator podem ser usados para identificar a presença de antígenos em  
30 uma variedade de ambientes. Os anticorpos etiquetados com radioisótopos

têm sido usados há décadas em ensaios radioimunológicos para identificar, com grande precisão e sensibilidade, a presença de antígenos em uma variedade de fluidos biológicos. Mais recentemente, os anticorpos etiquetados com enzimas têm sido usados como um substituto para os anticorpos radioetiquetados no ensaio ELISA popular.

Os anticorpos da presente invenção podem ser ligados a uma superfície de ensaio da substância de imobilização, tal como uma cavidade ou uma partícula de poliestireno, e ser usados nos imunoenaios para determinar se a PAT está presente em uma amostra de teste. Nesta modalidade da invenção, uma amostra é colocada em contato com a superfície de imunoafinidade e e colocada para incubar. Após uma etapa de lavagem, toda PAT que estiver ligada à superfície de imunoafinidade é detectada ao colocar a superfície em contato com um outro anticorpo da invenção etiquetado com um grupo relator.

O uso de tiras de fluxo laterais ou tiras imunocromatográficas com os anticorpos de ensaio e os métodos reivindicados é consistente com a invenção. Os ensaios de fluxo lateral são bem conhecidos no estado da técnica. Vide, por exemplo, a Patente U.S. 6.485.982. Nesse modo, os testes de fluxo lateral podem ser usados para a detecção qualitativa ou semiquantitativa de PAT sozinha ou simultaneamente com outros analitos. Os testes de fluxo lateral são os mais simples de usar de todos os formatos de teste aqui descritos e são particularmente úteis nos ajustes de campo em que o material da planta é extraído rapidamente para uma solução e testado em uma tira de fluxo lateral. Desse modo, só é necessário colocar a tira de fluxo lateral em uma amostra líquida ou aplicar a amostra líquida à tira de fluxo lateral e ler os resultados depois de um tempo predeterminado. Todos os testes de fluxo lateral devem incorporar uma linha de controle de processo ou então uma linha de controle de amostra que é usada para validar o resultado do teste. O aparecimento de duas linhas, portanto, indica um resultado positivo, ao passo que um teste negativo válido produz somente a linha de controle. Se apenas a linha do teste aparecer, ou se nenhuma linha aparecer, ele não é válido.

Uma tira de teste de fluxo lateral típica consiste em quatro componentes principais: uma almofada de amostra sobre a qual a amostra de teste é aplicada, uma almofada de conjugado que contém anticorpos da presente invenção conjugados a partículas coloridas (tipicamente partículas de  
5 ouro coloidal, ou microesferas de látex); uma membrana de reação, tal como uma membrana hidrofóbica de nitrocelulose ou acetato de celulose sobre a qual um anticorpo diferente da invenção é imobilizado em uma linha através da membrana como uma zona de captura ou linha de teste; um anticorpo secundário específico de espécie para capturar o conjugado de Pat Ab-ouro  
10 não ligado para formar a linha de controle; e um reservatório de resíduos destinado a extrair a amostra através da membrana de reação pela ação capilar.

Os componentes da tira de fluxo lateral são normalmente fixados a um material de suporte inerte e podem ser apresentados em um formato  
15 simples de bastão imerso ou dentro de uma embalagem de plástico com uma porta de amostra e uma janela de reação que mostra as zonas de captura e controle. Em um outro modo da modalidade de ensaio, uma amostra de teste suspeita de conter a PAT é secada em uma superfície, formando uma amostra de teste imobilizada. Um anticorpo etiquetado da invenção é  
20 então colocado em contato com a amostra de teste imobilizada e colocado para incubar. Se a amostra contiver a PAT, o anticorpo etiquetado irá se ligar à PAT imobilizada. Esse método também pode ser levado a efeito ao usar um anticorpo não etiquetado da invenção seguido por um anticorpo secundário etiquetado que se liga a um anticorpo da invenção que já se ligou à  
25 PAT. Após a lavagem, a amostra de teste imobilizada é medida para detectar a presença de quaisquer grupos relatadores.

Os grupos relatadores são tipicamente enzimas, tais como a fosfatase alcalina, a peroxidase de rábano silvestre ou a beta-D-galactosidase. Os substratos apropriados produzem uma mudança de cor  
30 quando reagidos com a enzima. Ao fazer isso, as medições da intensidade da cor podem ser quantificadas ao usar um espectrofotômetro. Se o grupo relator for um radioisótopo, um instrumento de detecção de raios gama

ou beta pode ser usado para quantificar o grupo relatador. A intensidade do grupo relatador é diretamente correlacionada com a quantidade de PAT na amostra de teste.

- Os exemplos a seguir irão ajudar a descrever como a invenção é praticada e irão ilustrar as características dos anticorpos e dos ensaios anti-PAT reivindicados.

#### EXEMPLO 1

##### Geração de Anticorpo Monoclonal

- Camundongos foram imunizados com proteína PAT recombinante purificado, e técnicas de fusão mediadas por PEG padrão foram usadas na preparação de um painel de hibridomas que expressam anticorpos anti-PAT monoclonais. Amostras do meio de cultura de tecidos usadas foram removidas assepticamente de cada cavidade contendo uma cultura de hibridoma e ensaiadas quanto à reatividade de PAT ao usar o seguinte método de análise ELISA de captura de anticorpo. As cavidades do microtítulo foram revestidas com uma solução de 1-10 µg/ml da proteína PAT recombinante purificada. As cavidades foram lavadas e as amostras de meios de tecidos usados foram colocadas nas cavidades e colocadas para incubar. As cavidades foram lavadas e um anticorpo anticumundongo etiquetado com peroxidase de rábano silvestre foi adicionado e colocado para incubar. As placas foram lavadas, o substrato foi adicionado para desenvolver uma reação colorida, e as placas foram lidas quanto à densidade ótica (OD). As cavidades com leituras de OD elevada foram mapeadas de volta a cavidade de cultura que contém os hibridomas. As culturas positivas de anticorpo de PAT foram selecionadas continuamente quanto à produção de anticorpo para assegurar a estabilidade do crescimento e a produção de anticorpo à medida que as culturas foram expandidas. Várias rodadas de limitação da clonagem de diluição foram pré-formadas para estabelecer uma monoclonalidade verdadeira para cada cultura. Outros ensaios de clones positivos de anticorpo foram realizados para determinar a adequabilidade de cada anticorpo para o uso nos métodos de detecção quantitativa presentemente reivindicados para o uso de campo com material de planta.

## EXEMPLO 2

### Desenvolvimento do Ensaio de Imunotransferência

As condições de transferência Western foram avaliadas e estabelecidas para ao usar anticorpos de PAT monoclonais ou policlonais para a detecção da proteína PAT a partir de amostras de tecido da cultura transgênica. O ensaio final usou SDS-PAGE para separar as amostras e sondou as mesmas com anticorpos de PAT monoclonais ou policlonais depois da transferência a uma membrana.

As amostras de tecido de folha de soja transgênica que expressam PAT foram extraídas primeiramente em um tampão PBST ou então diretamente em tampão Laemmli. Em seguida, as amostras tratadas a quente foram sujeitadas a SDS-PAGE. Depois que as proteínas foram transferidas a uma membrana de PVDF ou de nitrocelulose, a membrana foi bloqueada em um tampão de bloqueio e então incubada com anticorpos de PAT monoclonais ou policlonais à temperatura ambiente por cerca de 1 hora. Depois de uma etapa de lavagem, a membrana foi incubada com um anticorpo secundário específico de espécie conjugado com HRP (peroxidase de rábano silvestre) (por exemplo, para o anticorpo de PAT monoclonal, o anticorpo secundário era anticorpo IgG antiamundongo de cabra). Após a incubação, os anticorpos não ligados foram removidos por lavagem e os anticorpos ligados foram incubados com um substrato quimioluminescente. Os sinais quimioluminescentes foram capturados pela exposição a uma película a vários intervalos de tempo para obter as faixas resultantes. Os anticorpos tanto monoclonais quanto policlonais puderam detectar a proteína PAT das amostras de tecido da cultura transgênica.

## EXEMPLO 3

### Formato e desenvolvimento do Ensaio ELISA

As condições do ensaio foram avaliadas para determinar o par de anticorpos ideal, a concentração de revestimento de anticorpo, os constituintes do tampão de revestimento e de bloqueio, o formato de revestimento e o pH, e a relação de conjugação e a concentração de anticorpo de HRP. O formato final do ensaio usou um formato de sanduíche sequencial ou simul-

tâneo que constitui um anticorpo de revestimento policlonal e um conjugado de anticorpo de HRP monoclonal.

Nesse sistema, o anticorpo policlonal de PAT purificado do lote D2976 de antissoro foi diluído no tampão de revestimento e adicionado a uma placa de microtitulação. Após a incubação, as cavidades foram bloqueadas com tampão de bloqueio e lavadas. As amostras de proteína PAT recombinante purificada foram adicionadas às cavidades de reação revestidas e incubadas com o anticorpo monoclonal conjugado com HRP 155Q12 por cerca de 1 hora. Depois de uma etapa de lavagem, um substrato colorimétrico foi adicionado às cavidades de reação. Na presença da proteína PAT, os anticorpos monoclonais específicos de PAT foram ligados nas cavidades de reação a HRP conjugada reagiu com a HRP e gerou subsequentemente uma mudança da cor nas cavidades. Após a incubação com o substrato por um tempo apropriado, as reações foram interrompidas ao adicionar uma solução de paralisação. As densidades óticas do desenvolvimento da cor foram lidas em um leitor de placa de 96 cavidades a um comprimento de onda específico do substrato (isto é, 450 nm) após a subtração da leitura a um comprimento de onda de referência (isto é, 650 nm). Os dados resultantes foram traçados e uma curva de calibração padrão foi calculada tal como mostrado na FIG. 1.

#### EXEMPLO 4

##### Características do Ensaio ELISA

###### A) Desempenho da curva de calibração padrão:

O formato do ensaio foi aplicado para a análise quantitativa das proteínas PAT extraídas de materiais de plantas. A faixa da curva de calibração padrão foi estabelecida com sete concentrações que variam de 0,25 a 6,0 ng/ml e a faixa e a variação de OD correspondentes foram avaliadas. A partir de cinco testes realizados por vários analistas em dias diferentes, os resultados mostraram que a absorbância da curva padrão total variou de 0,113 a 1,773. A precisão dos testes interplacas e interanalistas resultou em um coeficiente porcentual de variação (CV%) que varia de 8,0% a 12,6% (Tabela 1a). Ao usar a curva de calibração estabelecida para o retrocálculo,

as concentrações-padrão preditas mostraram uma predicação exata com % de erro médio que varia de 0,4% a 3,5% e que a variação (CV%) era menor do que 5% de cinco testes independentes (Tabela 1b).

Tabela 1a

5 Desempenho da curva de calibração de PAT – faixa e precisão de OD

Amostra	Concentração	Conc. predita média	% de erro médio	CV%	(n=)
Padrão 01	6,00	5,98	0,4	0,5	5
Padrão 02	4,80	4,85	1,1	1,2	5
Padrão 03	3,60	3,55	1,4	0,7	5
Padrão 04	2,40	2,41	1,2	1,5	5
Padrão 05	1,20	1,21	1,4	2,1	5

Tabela 1b

Desempenho da curva de calibração de PAT – faixa e precisão de OD

Padrão	Conc. (ng/ml)	Teste #1	Teste #2	Teste #3	Teste #4	Teste #5	OD média	Desvio padrão	CV%	OD Min	OD Max	(n=)
01	6,00	1,669	1,680	1,428	1,715	1,773	1,653	0,132	8,0	1,428	1,773	5
02	4,80	1,418	1,388	1,191	1,459	1,483	1,388	0,116	8,4	1,191	1,483	5
003	3,60	1,106	1,072	0,858	1,118	1,153	1,061	0,117	11,1	0,858	1,153	5
04	2,40	0,811	0,748	0,598	0,793	0,84	0,758	0,095	12,6	0,598	0,840	5
05	1,20	0,452	0,43	0,332	0,439	0,444	0,419	0,050	11,8	0,332	0,452	5
06	0,60	0,265	0,244	0,195	0,247	0,249	0,240	0,026	11,0	0,195	0,265	5
07	0,25	0,149	0,137	0,113	0,148	0,137	0,137	0,014	10,6	0,113	0,149	5



## B) Exatidão do ensaio:

O ensaio foi avaliado quanto à exatidão ao fortificar os tecidos de cultura de controle negativos com uma quantidade conhecida de proteína padrão de referência e ao medir a recuperação. Com base em dois testes independentes, as amostras de folhas de milho e de soja eram reforçadas com níveis de 0,25 ng/ml (nível de LOD), 0,60 ng/mL (nível de LOQ), níveis médio (2,40 ng/ml) e superior (6,00 ng/ml) da faixa quantitativa. As recuperações em média dentro da faixa quantitativa (0,60 – 6,00 ng/ml) eram de 88,5% e 117% para as folhas de milho e de soja, respectivamente, (Tabela 2), que caíram dentro da indústria praticaram amplamente a faixa de 70 - 120% aceitável para a avaliação da exatidão do ensaio. A variação de dois testes resultou em uma CV% de 18,3% e 2,5% para o milho e a soja, respectivamente. Diferente da soja, a folha de milho ficou fora da faixa de 70 - 120% ao nível de LOD, mas a quantificação exata não era aplicável neste nível.

Tabela 2

Avaliação da exatidão para a quantificação da proteína PAT de milho e soja

Tecido	Nível reforçado (ng/ml)	Recuperação média (%)	Desvio padrão	CV%	N
Folha de milho	6,00	76,0	3,1	4,1	2
	2,40	82,6	7,8	9,4	2
	0,60 (LOQ)	106,8	17,5	16,4	2
	0,25 (LOD)	169,8	42,3	24,9	2
	0,60-6,00	88,5	16,2	18,3	6
Folha de soja	6,00	120,3	1,8	1,5	2
	2,40	116,0	5,8	5,0	2
	0,60 (LOQ)	114,8	5,4	4,7	2
	0,25 (LOD)	119,3	0,2	0,2	2
	0,60-6,00	117,0	2,9	2,5	6

C) Quantificação da proteína PAT transgênica da amostra de tecido da cultura:

O ensaio foi aplicado às amostras de tecido da cultura para medir a expressão da proteína PAT. Tal como mostrado na Tabela 3, uma amostra de folha de soja de controle negativo e três amostras de folha de soja transgênica de PAT foram analisadas em diluições múltiplas pelo ensaio ELISA. As linearidades e a precisão foram avaliadas ao calculando a CV% do resultado ajustado através de diluições múltiplas e através de amostras replicadas, respectivamente. Ambas as CV% eram menores do que 5%, indicando boa linearidade e precisão do ensaio.

Tabela 3

Quantificação de proteína PAT de amostras de folha de soja pela análise ELISA

Amostra	OD média	Resultado médio (ng/ml)	CV%	Diluição	Resultado ajustado (ng/ml)	Média (ng/ml)	CV%
Tampão modelo	0,058	N.D.	N.A.	1	N.D.	N.A.	N.A.
Soja Neg (1:1)	0,073	N.D.	N.A.	1	N.D.	N.D.	N.A.
Soja Neg (1:2)	0,073	N.D.	N.A.	2	N.D.		
Soja #1 (1:100)	0,593	2,36	1,6	100	235,86	232,02	2,3
Soja #1 (1:50)	1,103	4,56	1,0	50	228,19		
Soja #2 (1:100)	0,602	2,40	1,1	100	239,69	234,07	3,4
Soja #2 (1:50)	1,105	4,57	1,2	50	228,45		
Soja #3 (1:100)	0,597	2,38	1,5	100	237,72	235,06	1,6
Soja #3 (1:50)	1,123	4,65	1,3	50	232,40		
					Média total	233,72	
					Desvio padrão	1,55	
					CV%	0,7	
					n=	3	

O resultado ajustado e o resultado médio são de determinações

replicadas multiplicadas pelo fator de diluição; N.D., não detectável se a OD média for menor do que a OD do nível de LOD na curva de calibração; N.A., não aplicável.

#### EXEMPLO 5

##### 5 Protocolo de Análise ELISA Quantitativa de PAT

##### Equipamento e materiais

Balança, analítica, Modelo AE50, Mettler Instrument Corporation, Hightstown, NJ 08520.

10 Centrífuga, com capacidade para placas de 96 cavidades, Modelo GR422, número de catálogo 11176916, Jouan, Inc., Winchester, VA 22602.

Centrífuga, com capacidade para tubos Eppendorf de 2 ml, Eppendorf-5417C, Brinkmann Instruments. Inc., Westbury, NY 11590.

15 Freezer, capaz de manter  $-20^{\circ}\text{C}$ , Modelo 75F, U Line Corporation, Milwaukee, WI 53223.

Freezer, capaz de manter  $-80^{\circ}\text{C}$ , Modelo ULT2586, número de catálogo 13 989 233, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA 15205.

Incubadora, Precision, Economy, número de catálogo 51221087, Jouan, Inc.

20 Pilão, porcelana, Coors 60316, número de catálogo 12 961A, Fisher Scientific.

Almofariz, porcelana, Coors 60317, número de catálogo 12 961 5A, Fisher Scientific.

Pipeta, vários tamanhos, Rainin, Woburn, MA 01888.

25 Pipeta, 8 ou 12 canais, Rainin, Woburn, MA 01888.

Auxiliar de pipeta, portátil, número de catálogo 13 681 19, Fisher Scientific.

30 Leitor de placas, leitor de microplacas MAXIINE<sup>®</sup> Vmax com software SOFTMAX PRO<sup>®</sup>, capacidade de leitura de 450 and 650 nm, número de catálogo 0200 2018, Molecular Devices, Sunnyvale, CA 94089

Refrigerador, capaz de manter  $4^{\circ}\text{C}$ , número de catálogo 13 991 86, Fisher Scientific.

Agitador/Triturador, Modelo Geno/Grinder, número de catálogo 2000 115, Certiprep, Metuchen, New Jersey 08840.

Placa de agitação, Modelo 220T, número de catálogo 14 493 220T, Fisher Scientific.

5 Vórtice, Modelo Genie 2, número de catálogo 12 812, Fisher Scientific.

Lavadora, microplaca de 96 cavidades, Modelo Elx 405, Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, VT 05404.

10 Sistema de purificação de água, Modelo Milli Q UV Plus, Millipore Corporation, Milford, MA 01757.

Bacia, Reagente, não estéril, número de catálogo 13 681 100, Fisher Scientific.

Grânulos, 1/8" aço ao cromo, número de catálogo 039347, Small Parts Inc., Miami Lakes, FL 33014 0650.

15 Pipeta, 10 ml sorológica descartável, número de catálogo 13 678 11E, Fisher Scientific.

Ponta de pipeta, vários tamanhos, Fisher Scientific.

Placa, 96 cavidades, polipropileno de cavidade profunda para ligação para a diluição de amostras, Fisher Scientific.

20 Vedante de placa, 96 cavidades, número de catálogo 07 200 375, Fisher Scientific.

Tubos, aglomerado de polipropileno de 1,2 ml, 96 tubos por prateleira, número de catálogo 7200320, Fisher Scientific.

25 Tubo, microcentrífuga Eppendorf de polipropileno cônica de 2,0 ml, número de catálogo 02 681 344, Fisher Scientific.

Tampa, para tubo cônico de 2,0 ml, número de catálogo 02 681 361, Fisher Scientific.

Tubo, centrífuga de polipropileno de 5 ml com tampa, número de catálogo 14 959 11A, Fisher Scientific.

30 Tubo, centrífuga de polipropileno de 15 ml com tampa, número de catálogo 05 538 59A, Fisher Scientific.

Tubo, centrífuga de polipropileno de 50 ml com tampa, número

de catálogo 05 526B, Fisher Scientific.

Disco de peso, pequeno, número de catálogo 02 204A, Fisher Scientific.

#### Reagentes e padrões

- 5 Placa de microtitulação de 96 cavidades revestida com anticorpo de PAT, solução de conjugado de anticorpo de PAT, solução de substrato colorimétrico, solução de paralisação.

PBST, pH 7,4, pacotes para produzir 1 litro, número de catálogo P 3563, Sigma. Armazenar a 2-8°C.

- 10 Polivinil pirrolidona (PVP), peso molecular 40.000, número de catálogo PVP 40, Sigma.

Proteína-padrão microbiana PAT.

Tampão de lavagem: PBS, pH 7,4, com 0,05% de Tween 20 (PBST)

- 15 Tampão de ensaio: Solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4, com 0,05% de Tween 20 mais 1% de PVP (peso/volume) (PBST/PVP):

#### Procedimento do ensaio

- 20 Equilibrar os reagentes de ELISA de PAT a 20 - 25°C mediante a sua remoção do refrigerador pelo menos 30 minutos antes de executar o ensaio.

Preparar a solução de partida de trabalho de PAT, 100 ng/ml.

O padrão de PAT inicial pode ser um pó liofilizado ou alíquotas de soluções de partida líquidas. Por exemplo, uma solução de partida é uma solução a 0,3 mg/ml.

- 25 Turbilhonar a solução de partida e adicionar então um mínimo de 10 µl da solução de partida de PAT a 0,3 mg/ml em 990 µl de PBST/PVP e misturar bem para obter a solução de partida a 3.000 ng/ml. Similarmente, adicionar 40 µl da solução de partida da solução de partida a 1.000 ng/ml em 1.160 µl de PBST/PVP e misturar bem para obter a solução de partida a 100 ng/ml. Manter as mesmas geladas e usar as mesmas dentro de 2 horas.
- 30 Descartar se qualquer contaminação visível for observada.

Preparar as soluções da curva de calibração de PAT de acordo

com a Tabela 4.

Tabela 4

Conc. da solução. de partida	Alíquota da solução de partida	Volume de tampão inicial	Volume final da solução	Conc. Padrão final	Volume res- tante após a alíquota
(ng/ml)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	(ng/ml)	( $\mu$ l)
100	105	1.645	1.750	6,00	550
6.00	1.200	300	1.500	4,80	600
4.80	900	300	1.200	3,60	500
3.60	700	350	1.050	2,40	600
2.40	450	450	900	1,20	500
1.20	400	400	800	0,60	550
0.60	250	350	600	0,25	600
0	0	500	500	0	500

Preparação das amostras

- 5                   A) As amostras do tecido da cultura são armazenadas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem liofilizadas. Após a liofilização, as amostras são trituradas e em seguida armazenadas em um freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem pesadas para a análise.

- 10                   B) De modo geral, pesam-se porções de 15 mg das amostras de tecido preparadas e distribuem-se as mesmas em tubos de polipropileno de 2 ml. Adicionam-se dois ou três grânulos de metal a cada tubo e 1,5 ml de tampão de ensaio de PBST/PVP. Um reagente modelo e um controle devem ser carregados através do método com cada jogo de amostras. O reagente modelo contém 1,5 ml de tampão de ensaio de PBST/PVP.

- 15                   C) Tampam-se todos os tubos. Extraem-se as amostras ao usar o agitador/triturador Geno/Grinder automático a um ajuste do seletor de 500 e no interruptor de alavanca ao ajuste do 1X (cerca de 1.500 cursos por minuto) por 3 minutos como um ciclo.

- 20                   D) Centrifugam-se as amostras a 3.000 rpm (ou mais) por 5 minutos ou até separar (nenhuma partícula visível no sobrenadante). O sobrenadante pode ser transferido a um tubo separado ou submetido a diluições adicionais no tampão de ensaio para a análise tal como descrito nas seguintes etapas. Mantém-se o extrato gelado e ensaia-se o mesmo e dentro de 4 horas.

Realiza-se cada teste em uma placa de microtitulação individual. A média de análises duplicadas de uma amostra ou de um padrão constitui um único resultado. Uma curva de calibração e o controle apropriado devem ser incluídos em cada placa.

- 5                    Transferem-se as soluções de calibração padrão de ELISA a uma placa de diluição de 96 cavidades que não de ligação e registra-se a localização na folha de molde de ensaio de 96 cavidades.

- 10                  Preparam-se diluições da amostra tal como necessário e transferem-se as amostras diluídas à placa de diluição de 96 cavidades que não de ligação que contém as soluções de calibração padrão e registra-se a localização na folha de molde de ensaio de 96 cavidades.

Aplicam-se cerca de 6 ml do conjugado de anticorpo de PAT por placa em uma bacia de reagente.

- 15                  Pipetam-se 50 µl do conjugado de anticorpo de PAT da bacia de reagente em cada cavidade da placa de microtitulação de 96 cavidades revestida com anticorpo. Descarta-se qualquer solução de conjugado de anticorpo de PAT não utilizada.

- 20                  Adicionam-se 100 µl das soluções-padrão de ELISA e as amostras diluídas da placa de diluição de 96 cavidades que não de ligação à placa de microtitulação de 96 cavidades revestida com anticorpo, mantendo a mesma orientação que o molde de ensaio de 96 cavidades. Trocam-se as pontas de pipeta por pontas com cada amostra.

- 25                  Cobre-se a placa com um vedante de placa adesivo. Gira-se suavemente a placa de ELISA em cima da bancada ou em um agitador de placa por cerca de dez segundos para misturar os padrões de referência e as amostras diluídas com o conjugado de anticorpo de PAT.

Agita-se a placa de microtitulação à temperatura ambiente (20 - 30°C) por cerca de 60 minutos em um agitador de placa.

- 30                  Lava-se a placa cinco vezes com 350 µl/cavidade de PBST ao usar uma arruela de placa automática. Seca-se o excesso de líquido em uma toalha de papel.

Aplicam-se cerca de 12 ml do reagente de cor (solução de subs-

trato) por placa em uma bacia de reagente.

- Pipetam-se 100 µl do reagente de cor da bacia de reagente em cada cavidade da placa de microtitulação de 96 cavidades revestida com anticorpo. Cobre-se a placa e misturar suavemente. Descarta-se qualquer  
5 solução não utilizada do reagente de cor.

Agita-se a placa de microtitulação à temperatura ambiente (20 - 30°C) por cerca de 30 minutos em um agitador de placa.

Aplicam-se cerca de 12 ml por placa da solução de paralisação em uma bacia de reagente.

- 10 Adicionam-se 100 µl da solução de paralisação a cada cavidade para paralisar a reação. Mistura-se a placa suavemente. A adição da solução de paralisação deve ser completada sem interrupção. Protege-se a placa de microtitulação da luz solar; caso contrário, a intensidade da cor é influenciada.

- 15 Lê-se a absorbância a 450 nm menos 650 nm ao usar um leitor de placa de microtitulação de 96 cavidades. Todas as leituras devem ser completadas dentro de 30 minutos da adição da solução de paralisação.

#### Análise de Dados e Cálculos; Curva de Calibração

- 20 As concentrações conhecidas das soluções de calibração padrão e sua absorbância subsequente (densidade ótica) devem ser usadas para a regressão da curva de calibração. Um modelo de regressão quadrática foi usado no software SOFTMAX PRO® para desenvolver a curva de regressão e os cálculos subsequentes.

- 25 A equação acomoda a melhor parábola à curva-padrão com base na equação:  $y = A + Bx + Cx^2$

onde: y = valor de absorbância médio (OD) e x = concentração padrão de referência

#### Cálculo de PAT em amostras desconhecidas

- 30 O software SOFTMAX PRO® ou Excel da Microsoft pode ser usado para calcular a concentração de PAT em cada amostra. Os valores de absorbância de cada cavidade foram usados para interpolar concentrações da regressão da curva de calibração (vide a equação abaixo) e o resultado



médio da amostra, o desvio-padrão e a porcentagem do coeficiente de variação foram calculados então a partir dos resultados de cavidades replicadas.

$$\text{Concentração interpolada (ng/ml)} = \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4C * (A - OD)}}{2C}$$

5 A concentração final de PAT de cada amostra foi calculada como ng/mg com base no peso da amostra, no volume do tampão de ensaio usado para a extração e no fator de diluição aplicado.

$$\text{Concentração de PAT (ng/mg)} = \frac{\text{Conc. Interp. (ng/ml)} \times \text{Vol. De Extr. (ml)}}{\text{Peso da amostra (mg)} \times \text{Diluição}}$$

#### 10 Crítérios para a aceitação de uma batelada analítica

Cada corrida deve ser compatível com os critérios aceitos no procedimento para ser válida tal como listado abaixo. Se os dados não forem compatíveis com esses critérios de desempenho, O analista deve avaliar os resultados; determinar a fonte potencial da variação, e repetir a análise caso  
15 necessário.

Tabela 5

Tampão de ensaio modelo (0 ng/ml padrão)	Absorbância (450 nm - 650 nm) < 0,120
6 ng/ml padrão	Absorbância (450 nm - 650 nm) ≥ 1.000
Curva de calibração	$r^2$ (Correlação de determinação) ≥ 0,990
Todo padrão de referência positivo, OD	CV (OD) de triplicatas ≤ 15%
Amostras desconhecidas ou QC, solução	CV (OD) de replicados ≤ 20%*

Embora a presente invenção tenha sido descrita em relação ao relatório descritivo e aos exemplos, a presente invenção também pode ser  
20 modificada dentro do caráter e do âmbito desta apresentação. Além disso, este pedido de patente presta-se a cobrir tais desvios da presente apresentação tal como dentro da prática no estado da técnica conhecida ou habitual à qual pertence a presente invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal que se liga especificamente a uma enzima fosfinotricina-N-acetil transferase (PAT) selecionada do grupo de anticorpos monoclonais que consistem em 155AD4, 155E2.1.114, 155Q3,  
5 155Q12 e 155Q19.1.

2. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, o qual é produzido pelo hibridoma que tem uma designação de 155AD4.

3. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, o qual é produzido pelo hibridoma que tem uma designação de 155E2.1.114.

10 4. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, o qual é produzido pelo hibridoma que tem uma designação de 155Q3.

5. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação, o qual é 1 produzido pelo hibridoma que tem uma designação de 155Q12.

15 6. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, o qual é produzido pelo hibridoma que tem uma designação de 155Q19.1.

7. Linhagem de células de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal como definido na reivindicação 1, que foi depositada junto à American Type Culture Collection (ATCC) sob os números de acessão selecionados do grupo que consiste em PTA 13186, PTA 13187, PTA 13188,  
20 PTA 13189 e PTA 13190.

8. Hibridoma, de acordo com a reivindicação 7, o qual foi depositado sob o número de acessão PTA 13186 junto à ATCC.

9. Hibridoma, de acordo com a reivindicação 7, o qual foi depositado sob o número de ascensão PTA 13187 junto à ATCC.

25 10. Hibridoma, de acordo com a reivindicação 7, o qual foi depositado sob o número de acessão ATCC 13188 junto à ATCC.

11. Hibridoma, de acordo com a reivindicação 7, o qual foi depositado sob o número de acessão PTA 13189 junto à ATCC.

30 12. Hibridoma, de acordo com a reivindicação 7, o qual foi depositado sob o número de acessão PTA 13190 junto à ATCC.

13. Método para a identificação da presença da enzima PAT, o qual compreende:

a) a imobilização de um primeiro mAb como definido na reivindicação 1, sobre uma superfície de ensaio e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio;

5 b) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um líquido suspeito de conter a PAT por um período de tempo suficiente para permitir a ligação e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio;

c) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um segundo anticorpo diferente como definido na reivindicação 1, conjugado a um grupo relator por um período de tempo suficiente para permitir a ligação do dito segundo anticorpo monoclonal conjugado e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; e

d) a detecção da presença ou ausência do dito grupo relator.

14. Método para a determinação quantitativa da enzima PAT, o qual compreende:

15 a) a imobilização de um anticorpo policlonal específico de PAT em uma superfície de ensaio;

b) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um líquido suspeito de conter a PAT por um período de tempo suficiente para permitir a ligação e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio;

20 c) a colocação da dita superfície de ensaio em contato com um segundo anticorpo diferente como definido na reivindicação 1, conjugado a um grupo relator por um período de tempo suficiente para permitir a ligação do dito segundo anticorpo monoclonal conjugado e em seguida a lavagem da dita superfície de ensaio; e

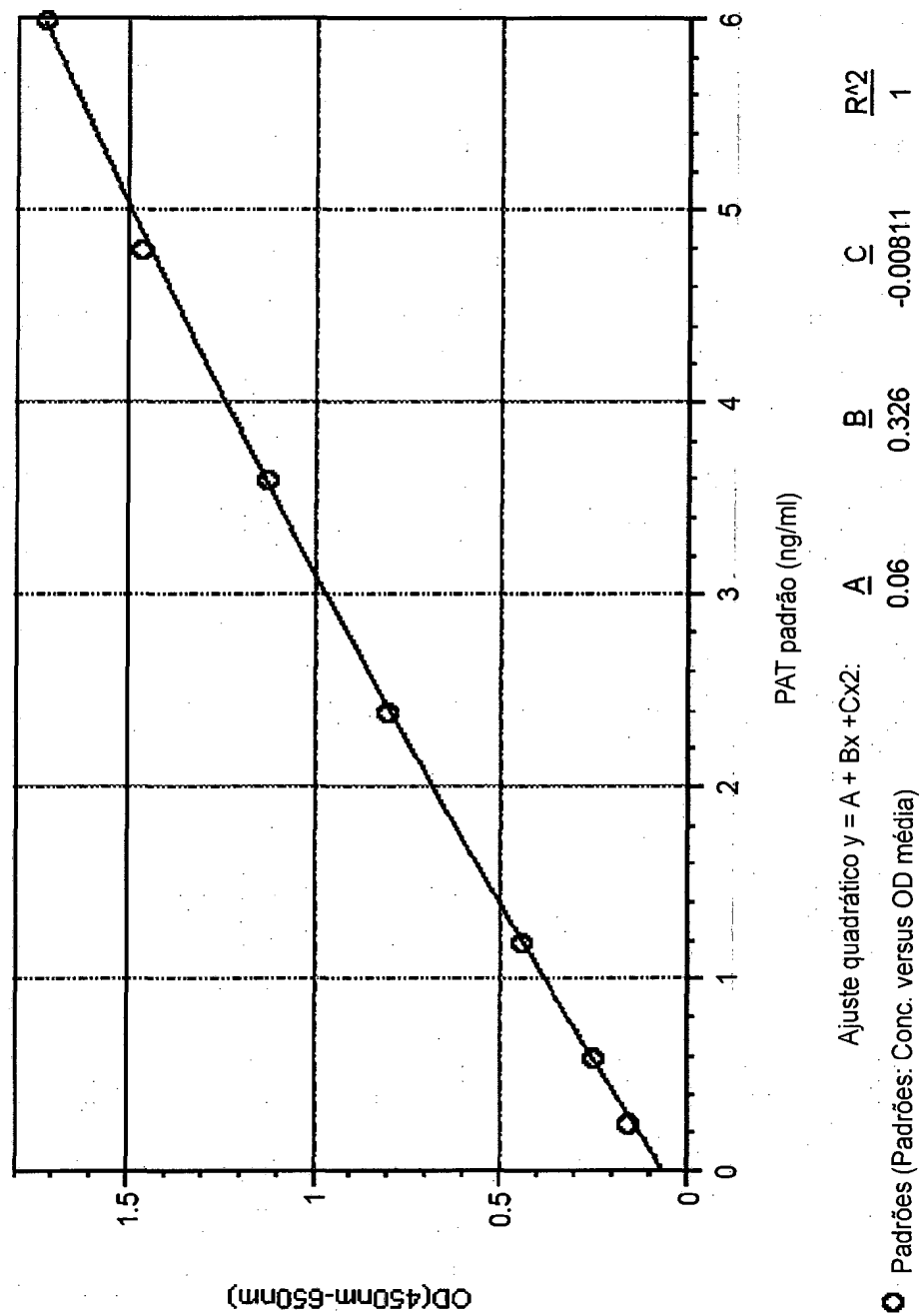
25 d) a quantificação da presença do dito grupo relator por meio da interpolação de uma curva de calibração.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo monoclonal conjugado é selecionado do grupo que consiste em 155Q12 e em 155Q19.1.

30 16. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo monoclonal conjugado é 155Q12.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo monoclonal conjugado é 155Q19.1.

FIG. 1



**RESUMO**

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS DE DETECÇÃO PARA ENZIMAS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FOSFINOTRICIN-N-ACETIL TRANSFERASE".**

- 5           A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais e métodos úteis para determinar e quantificar a presença de uma enzima fosfinotricin-N-acetil transferase. Os anticorpos e os métodos reivindicados são particularmente úteis para identificar e quantificar a presença de fosfinotricin-N-acetil transferase expressa em plantas transgênicas.