

UnB

Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Pós Graduação em Biologia Molecular

Expressão do antígeno antitumorgênico NY-ESO-1 em plantas

Thaina de Almeida Lima

Orientador: Dr. Elíbio Rech

Outubro de 2013

Thaina de Almeida Lima

Expressão do antígeno antitumorgênico NY-ESO-1 em plantas

Tese de Doutorado apresentada à
banca examinadora do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular
do Departamento de Biologia Celular da
Universidade de Brasília como requisito
parcial para a obtenção do título de
Doutor em Biologia Molecular

Orientador: Dr. Elíbio Rech

Brasília, Outubro de 2013

Comissão Examinadora

Dr. Elibio Rech

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Orientador e Presidente da Banca Examinadora)

Dra. Ana Cláudia Guerra Araújo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro Titular Externo)

Dra. Cintia Marques Coelho

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro Titular Externo)

Dra. Eliane Ferreira Noronha

Universidade de Brasília
(Membro Titular Interno)

Dra. Simoni Campos Dias

Universidade Católica de Brasília
(Membro Titular Externo)

Dr. André Melro Murad

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro Suplente Externo)

*“[I do not] carry such information in my mind since it is readily available in books.
...The value of a college education is not the learning of many facts
but the training of the mind to think.”*

Albert Einstein

Para minha avó, Lourdes,
por ter sido a primeira a despertar em mim a
característica mais importante de um cientista:
a curiosidade.

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada, tantas que é difícil lembrar de cada uma, e todos merecem minha gratidão.

Agradeço primeiramente a todos da minha família, pelo apoio, carinho, incentivo e sobretudo pela compreensão nos constantes momentos de ausência ao longo do doutorado.

Ao André, por todo o amor, companheirismo e ensinamentos preciosos não só ao longo do doutorado, mas também da vida. Amo você.

A todos os amigos que tanto me apoiaram e me encorajaram. Um agradecimento especial aos incríveis Diego, Marcela, Takamatsu, Jana e minhas *primas-divas* Bárbara e Leticya por permanecerem ao meu lado nos momentos mais difíceis, oferecendo apoio, incentivo e carinho constantes. A vida não teria a mesma graça sem vocês.

Agradeço a companhia, amizade, carinho e suporte de todos os colegas dos laboratórios de Biologia Sintética, Transferência de Genes, Microscopia Eletrônica e Espectrometria de Massas.

Ao meu orientador, Elíbio, pela acolhida em seu laboratório. Aos pesquisadores Ana Cláudia Guerra Araújo, Carlos Bloch, Cristiano Lacorte, Francisco Aragão, Giovanni Vianna, Gustavo Souza, Luciano Paulino, Marly Coelho, Maura Prates e Stephan Nielen pelos ensinamentos e auxílio na execução de experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, por me ajudarem a ampliar os meus horizontes. Meu sinceros agradecimentos também para a Ana, secretária do Programa, sempre muito prestativa.

Aos técnicos Ana Cristina, Elsa, Jorge e Rosana pela ajuda e apoio. Ao Luís, pelas transformações de soja. E ao Pedro, por cuidar das plantas sempre com tanto carinho!

Aos estagiários que estiveram em algum momento sob minha supervisão. Obrigada por todo o auxílio!

Aos funcionários do CENARGEN, pela cordialidade e solicitude.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas sugestões tão valiosas.

E por fim (mas não menos importante), à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo

O câncer é classificado como uma doença crônica degenerativa, com evolução prolongada e progressiva se não sofrer interferência em alguma de suas fases, e configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A relação entre câncer e o sistema imune começou a ser explorada no começo do século XX na Alemanha, quando foi sugerido que os carcinomas poderiam ser suprimidos pelo sistema imune. Antígenos do tipo câncer/testis (ACTs) são uma classe única de antígenos que ocorrem naturalmente em alguns tecidos imunoprivilegiados e em células carcinogênicas; dentre eles, pode-se destacar NY-ESO-1, um ACT associado a diversos tipos de malignidades que é capaz de desencadear resposta imune tanto celular quanto humoral, o que o tornou um dos candidatos mais promissores ao desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas. A produção de NY-ESO-1, em sua forma integral e em grandes quantidades, é imprescindível para a aquisição de maiores informações acerca de seu modo de ação e subsequente exploração de seu potencial, e o desenvolvimento de sistemas de produção heteróloga estáveis e seguros são fundamentais. Este trabalho propôs a utilização de tabaco e soja como biofábricas para o acúmulo deste importante antígeno em sua forma integral e completamente livre de fusões e tags de purificação, a fim de oferecer uma alternativa estável, segura para uso em humanos e de custo mais baixo. Dentre os sistemas utilizados, apenas a expressão em sementes de soja apresentou expressão e acúmulo da proteína-alvo, chegando a um nível de expressão médio de 0,079% de NY-ESO-1, tornando este trabalho pioneiro não apenas por ser o primeiro a utilizar plantas como sistema de expressão, mas também por evitar a expressão associada a proteínas de fusão e tags de purificação, comumente utilizadas como estratégia para a expressão deste importante antígeno.

Palavras-chave: NY-ESO-1, antígeno cancer/testis, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, expressão heteróloga.

Abstract

Cancer is classified as a chronic degenerative disease with prolonged and progressive evolution if not interfered in any of its phases; it is characterized as a large public health problem both in developed and in non-developed countries. The relationship between cancer and the immune system began to be explored in the early 20th century in Germany when it was suggested that carcinomas could be suppressed by the immune system. Antigens cancer / testis (ACTs) are a unique class of naturally occurring antigens in some immune-privileged tissues and cancer cells. Among them, we can highlight NY-ESO-1, an ACT associated with various types of malignancies which is capable to trigger both cellular and humoral immune response, becoming one of the most promising candidates for the development of immunotherapeutic strategies. The large scale production of NY-ESO-1 in its native form is essential to acquire more information about its mode of action and subsequent exploitation of its full potential, and the development of stable and secure heterologous production systems are fundamental. This work proposes the use of tobacco and soybean seeds as bio-factories for the accumulation of this important antigen in its integral form, completely free of protein fusion and purification tags, aiming to offer an alternative treatment that is stable, low cost and safe for humans. Among the systems elected only soybean seeds presented expression and accumulation of the target protein, reaching an average expression level of 0.079 %, which can be considered promising as the heterologous expression of NY-ESO-1 is in most cases dependent on fusion proteins and purification tags, and usually presents low success in eukaryotic systems.

Keywords: NY-ESO-1, cancer/testis antigen, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, heterologous expression.

Sumário

FOLHA DE ROSTO	II
BANCA EXAMINADORA	III
EPÍGRAFE	IV
DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
1.1. CÂNCER E O SISTEMA IMUNE	1
1.1.1. IMUNOTERAPIA DO CÂNCER	2
1.1.2. NY-ESO-1 E OS ANTÍGENOS CÂNCER/TESTIS (ACTs)	3
1.1.3. FÁRMACOS PRODUZIDOS EM PLANTAS E SUA REGULAMENTAÇÃO	9
1.2. VANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	11
1.2.1. ESPÉCIES DE PLANTAS UTILIZADAS	13
1.3. TIPOS DE TRANSFORMAÇÃO	16
5.1. CONSTRUÇÃO DE VETORES PLASMIDIAIS DE EXPRESSÃO	20
5.1.1. VETOR PARA EXPRESSÃO EM <i>G. MAX</i> E <i>NICOTIANA</i> SPP.	20
5.2. EXPRESSÃO TRANSIENTE EM FOLHAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	22
5.2.1. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>A. TUMEFASCIENS</i>	22
5.2.2. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA E AGROINFILTRAÇÃO	22
5.2.3. COLETA DO MATERIAL AGROINFILTRADO	23

5.2.4. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE GFP	23
5.3. EXPRESSÃO ESTÁVEL EM PLANTAS DE <i>N. TABACUM</i>	23
5.3.1. CO-CULTIVO	23
5.3.2. INDUÇÃO DE CALOS	24
5.3.3. REGENERAÇÃO DE BROTO	24
5.3.4. ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO	24
5.3.5. ACLIMATAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO	25
5.3.6. PCR DAS PLANTAS DE FUMO TRANSFORMADAS	25
5.4. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE SOJA	25
5.4.1. BOMBARDEAMENTO DOS EXPLANTES DE SOJA	25
5.4.2. PCR DAS SEMENTES R ₁ BCONGICTAG	27
5.5. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE NY-ESO-1 POR WESTERN BLOT	27
5.6. ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	28
5.6.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL TOTAL	28
5.6.2. PREPARO DE AMOSTRAS PARA AQUISIÇÃO EM NANOUPLC-MS ^E .	29
5.6.3. AQUISIÇÃO POR NANOLC-MS ^E	30
5.6.4. PROCESSAMENTO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	32
6.1 EXPRESSÃO ESTÁVEL DE NY-ESO-1 EM <i>N. TABACUM</i>	34
6.1.1 PCR DAS PLANTAS DE FUMO ESTAVELMENTE TRANSFORMADAS	34
6.1.2 WESTERN BLOT DAS FOLHAS DE FUMO DE PLANTAS ESTAVELMENTE TRANSFORMADAS	34
6.1.3 ANÁLISE DE PROGÊNIE DE PLANTAS DE FUMO DE ESTAVELMENTE TRANSFORMADAS VIA WESTERN BLOT	35
6.2 EXPRESSÃO TRANSIENTE DE NY-ESO-1 EM <i>N. BENTHAMIANA</i>	36
6.2.1 WESTERN BLOT DAS FOLHAS DE TABACO AGROINFILTRADAS	36
6.2.2 ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	37
6.3 EXPRESSÃO DE NY-ESO-1 EM SOJA	37
6.3.1 PCR DAS PLANTAS DE SOJA TRANSFORMADAS	37
6.3.2 TRIAGEM DAS SEMENTES BCONGICTAG-1B R1 VIA WESTERN BLOT	38
6.3.3 PCR DAS SEMENTES R1 BCONGICTAG	39
6.3.4 ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	40
<u>TABELAS SUPLEMENTARES</u>	65

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática de NY-ESO-1.....	8
Figura 2: Representação esquemática do cassete de expressão utilizado para transformação estável de soja.	20
Figura 3: Representação esquemática vetor pCambia contendo o fragmento CTAG-1B.....	21
Figura 4: PCR representativo para identificação de plantas de fumo estavelmente transformadas.....	34
Figura 5: Western blot de sementes de fumo mostrando ligação inespecífica do anticorpo.....	36
Figura 6: Western blot representativo de folhas de <i>N. benthamiana</i>	37
Figura 7: PCR representativo para identificação de plantas de soja estavelmente transformadas.....	38
Figura 8: Western blot de sementes de soja R ₁ contendo NY-ESO-1 mostrando baixa concentração de proteína recombinante.....	39
Figura 9: PCR representativo para identificação sementes de soja R1 portadoras do gene CTAG-1B.	39
Figura 10: Espectro MS ^E da dupla carga do fragmento de NY-ESO-1 [M + H] ⁺ = 1349.73 e seu respectivo espectro processado pelo <i>software</i> PGLS. Observa-se, ainda, os 8 peptídeos identificados.	43
Figura 11: Cobertura das proteínas identificadas.....	43
Figura 12: Erro das massas dos peptídeos identificados em partes por milhão.	44
Figura 13: Concentração de NY-ESO-1 nas sementes analisadas com relação ao conteúdo total de PTS para as Linhagens 5 e 37.....	45
Figura 14: Proteínas identificadas para cada semente analisada da Linhagem 5..	46
Figura 15: Proteínas identificadas para cada semente analisada da Linhagem 37.. ..	46
Figura 17: Sequência de NY-ESO-1..	51
Figura 18: Espectro MS ^E da dupla carga do fragmento de NY-ESO-1 [M + 2H] ²⁺ = 858.00 e seu respectivo espectro processado pelo <i>software</i> PGLS (Murad et al., 2011).	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sementes de soja analisadas para a presença do gene CTAG-1B por PCR, para as diferentes linhagens.	40
Tabela Suplementar 1 - Identificação e comparação dos níveis de expressão de proteínas das Linhagens 5 e 37.....	66
Tabela Suplementar 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na Linhagem 5.....	86
Tabela Suplementar 3 - Proteínas identificadas exclusivamente na Linhagem 37.....	90
Tabela Suplementar 4 - Prováveis funções das proteínas identificadas como putativas na Tabela Suplementar 1.....	96
Tabela Suplementar 5 - Prováveis funções das proteínas identificadas como putativas para a Linhagem 5 na Tabela Suplementar 2.	101
Tabela Suplementar 6 - Prováveis funções das proteínas identificadas como putativas para a Linhagem 37 na Tabela Suplementar 3.	104
Tabela Suplementar 7 – Proteínas identificadas em sementes não transformadas de soja (cultivar BR16) – controle negativo.....	109

Introdução

1.1. Câncer e o sistema imune

O câncer é classificado como uma doença crônica degenerativa, com evolução prolongada e progressiva se não sofrer interferência em alguma de suas fases. Trata-se de um processo comum a um grupo heterogêneo de doenças que diferem em etiologia, frequência e manifestações clínicas (Vainio & Wilbourn, 1993; World Health Organization, 2008). Pode ser considerado uma doença genética, independentemente de ocorrer de forma esporádica ou hereditária, sendo a desregulação do ciclo celular uma das mais frequentes alterações durante o desenvolvimento do tumor, ocorrendo a proliferação anormal e descontrolada das células em um tecido ou órgão (World Health Organization, 2008; DeVita Jr, Vincent T., Theodore S. Lawrence, 2011).

As neoplasias configuram-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. As estatísticas mundiais, segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2008), mostraram a ocorrência de 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões).

Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (World Health Organization, 2008; INCA, 2011).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, as estimativas para o ano de 2012 no Brasil, válidas também para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer. A distribuição dos casos novos de câncer segundo

localização primária mostra-se heterogênea entre estados e capitais do país, o que fica em evidência ao observar-se a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2011).

A relação entre câncer e o sistema imune começou a ser investigada no começo do século XX na Alemanha, quando foi sugerido que os carcinomas poderiam ser suprimidos pelo sistema imune (Ehrlich, 1909). William B. Coley é geralmente reconhecido como o “pai da imunoterapia do câncer” por demonstrar que o sistema imune poderia ser empregado no tratamento da doença. Em seus estudos, foi observado os tumores de alguns pacientes regrediam espontaneamente após a injeção de bactérias inertes dentro destes (Hoption Cann et al., 2003).

Em 1957, Burnet propôs a hipótese da imunovigilância, referindo-se ao fenômeno da resistência imunológica ao desenvolvimento de câncer no hospedeiro: a resposta imune contra tumores é iniciada na fase inicial do desenvolvimento do tumor, antes que o câncer se torne clinicamente relevante.

O sistema imune pode ser ativado num estágio primário da progressão tumoral pela expressão de antígenos tumorais ou outros “sinais daníficos” liberados pelas células tumorosas. A ativação imune pode ainda ser suprimida pelas citocinas imunossupressoras oriundas das células carcinogênicas. O balanço entre o desenvolvimento do tumor e o sistema imunológico determina se o câncer se torna clinicamente relevante (Hu et al., 2010).

1.1.1. Imunoterapia do câncer

A imunoterapia do câncer é baseada no mecanismo de imunovigilância, e emprega o sistema imune dos pacientes no combate à doença. Geralmente sua pesquisa, na área de oncologia, é focada em estratégias que aperfeiçoem a resposta

imune tumor-associada aumentando os componentes que induzem uma resposta imune efetiva ou inibindo componentes que suprimem a resposta imune (Hu et al., 2010). A técnica pode ser classificada em duas macro categorias (Schuster et al., 2006): imunoterapia passiva, baseada na administração de moléculas efectoras ou células que existam no hospedeiro, tais como anticorpos monoclonais específicos para antígenos do tumor (Anderson et al., 1997; Goldenberg et al., 1999; Hombach et al., 2001; Mackensen et al., 2006; Herr et al., 2009), ou células-T efectoras isoladas de pacientes com câncer (Mackensen et al., 2006; Herr et al., 2009); imunoterapia ativa: consiste em vacinas contra câncer e citocinas (Schuster et al., 2006).

1.1.2. NY-ESO-1 e os antígenos câncer/testis (ACTs)

O processo de desenvolvimento de células germinativas e o desenvolvimento de tumores compartilham semelhanças importantes. A mais de 100 anos atrás, as semelhanças entre trofoblastos e células tumorigênicas levaram John Beard a propôr a “teoria trofoblástica do câncer”, que previa o câncer como resultado de células germinativas que não conseguiam migrar com sucesso até as gônadas (Gurchot, 1975). Surgiram, então, evidências da possível associação entre o desenvolvimento de células germinativas e o câncer, como a frequente produção da gonatrofina coriônica e outros hormônios trofoblásticos por diversos tipos de tumores (Acevedo et al., 1995). Atualmente, esses hormônios são utilizados como indicadores de prognóstico de uma gama de tumores epiteliais (Louhimo et al., 2004; Simpson et al., 2005; Whitehurst, 2013).

A descoberta de um grupo de proteínas que aparentam estar presentes apenas em células germinativas, trofoblásticas e carcinogênicas – os antígenos cancer/testis (ACT) – constituiu um grande passo na investigação da relação entre a gametogênese e o câncer (Scanlan et al., 2004), levando à teoria de que a expressão aberrante de genes de linhagem germinativa refletiria na ativação do programa gametogênico; este programa estaria silenciado nas células somáticas, e sua aquisição seria uma das

forças motrizes da tumorigênese (Old, 2001; Whitehurst, 2013). Estes antígenos apresentam grande potencial tanto como biomarcadores quanto como alvos de estratégias para imunoterapia (Scanlan et al., 2002; Suri et al., 2012).

Mais de 40 famílias de ACTs já foram identificadas. O primeiro ACT, denominado MAGE-A1 (*Melanoma Antigen A1*), foi identificado a partir de células T citotóxicas tumor-específicas autólogas em um paciente de melanoma no começo dos anos 90 (Boon, 1991). Logo em seguida, outros membros das famílias ACT, BAGE e GAGE1 (*B Melanoma Antigen* e *G Melanoma Antigen 1*, respectivamente), foram descobertos (Boël et al., 1995; Van den Eynde et al., 1995). Posteriormente, foi desenvolvida uma nova abordagem denominada SEREX (do inglês *serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries with autologous serum*), que consistia em isolar antígenos de tumores a partir do soro de pacientes com câncer, o que possibilitou a identificação de várias classes de ACTs (Hu et al., 2010).

Análises da expressão de RNA mensageiro (RNAm) demonstraram que os genes MAGE-A1, BAGE e GAGE1 possuíam transcritos em testículos, mas não em nenhum outro tecido ou célula somática, incluindo melanócitos. De modo contrastante, RNAm desses genes foi encontrado não apenas em células de melanoma, mas também numa série de outros tipos de câncer, indicando que a expressão desses antígenos era compartilhada por múltiplos tipos de tumores e não por células de linhagens específicas. Esse padrão de expressão gênica, em conjunção com a falta de antígenos de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility System*, MHC) em células germinativas dos testículos, implica que os produtos proteicos dessas famílias de genes são antígenos tumor-específicos do ponto de vista imunoterapêutico (Boon et al., 1997; Caballero & Chen, 2009).

NY-ESO-1 (*New York oesophageal squamous cell carcinoma 1*) é um ACT que foi identificado há mais de uma década a partir de uma amostra proveniente de um

paciente com câncer de esôfago do estado americano de Nova Iorque; o gene se encontra no cromossomo X, juntamente à maioria dos genes codificadores de ACTs (Chen et al., 1997; Caballero & Chen, 2009), na porção telomérica do braço longo do cromossomo X, na posição 28. O gene codifica uma proteína citosólica fortemente hidrofóbica com 180 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 18 kDa (Chen et al., 1997). Seu produto só pode ser detectado em algumas células cancerígenas e em tecidos imunologicamente privilegiados tais como testículos e placenta. A função da NY-ESO-1 nas células permanece desconhecida (Satie et al., 2002; Caballero & Chen, 2009).

Uma das características dos genes codificadores de ACTs que se encontram no cromossomo X é o fato de possuírem múltiplas cópias, resultantes de duplicação gênica recente. Essas repetições são frequentemente palindrômicas e, somando todos os ACTs, estima-se que esses genes compreendam cerca de 10% do total de sequências de DNA do cromossomo X (Ross et al., 2005).

A ativação e expressão de transcritos de RNAm em vários cânceres humanos de modo linhagem-independente é um dos critérios de definição de um ACT. Além disso, algumas características da expressão, pertinentes para a consideração de alguns ACTs como alvo de imunoterapia, foram observados: (a) diferentes tipos de câncer são significativamente diferentes quanto à expressão dos RNAm de ACTs; (b) para um determinado tipo de câncer, tumores de grau histológico e estágio clínico tardio geralmente manifestam maior expressão de ACTs; (c) ACTs tendem a ser coordenadamente expressos, ou seja, um tumor positivo para a expressão de ACTs frequentemente apresenta expressão de mais de um tipo de antígeno (Caballero & Chen, 2009).

A expressão de RNAm para NY-ESO-1 foi observada em 52% de melanomas (Goydos et al., 2001), 35% em câncer de bexiga (Sharma et al., 2003), 27,8% em

meningiomas (Baia et al., 2013), 27% dos carcinomas pulmonares de grandes células (Gure et al., 2005), 10% dos casos de câncer de cólon e reto (Li et al., 2005), e em nenhum caso de câncer renal ou linfoma testados (Chen et al., 1997). É notado ainda altos níveis de expressão proteica em sarcoma sinovial, com presença do antígeno em 80% dos casos analisados, contrastando com malignidades como o carcinoma hepatocelular, que apresenta expressão em apenas 15,6% dos casos (Jungbluth et al., 2001; Xia et al., 2013).

Para cada determinado tipo de câncer, a alta frequência de expressão do ACT é constantemente correlacionada com um pior prognóstico. Constatou-se que tumores com maior graduação histopatológica e tumores metastásicos comumente apresentam mais ACTs que aqueles primários. Kurashige e colaboradores (2001) detectaram a expressão de NY-ESO-1 em 40% de tumores grau 3, 23% em tumores de grau 2 e ausente em tumor de grau 1 (para maiores informações acerca da classificação histopatológica de tumores, consultar União Nacional Contra o Câncer, 2006), embora mais recentemente tenha sido observada expressão do antígeno em 3,4% dos pacientes com câncer gástrico analisados por Fujiwara e colaboradores (2013). Padrão semelhante pode ser observado para outros ACTs, como MAGE-A1 (Brasseur et al., 1995).

Outra característica de expressão observada em múltiplos tumores é a tendência dos ACTs a serem coordenadamente expressos; numa análise de 9 ACTs em câncer pulmonar, Gure e colaboradores (2005) observaram que a expressão de um ACT por um tumor aumenta a probabilidade de que também ocorra a expressão de um segundo ACT. Por outro lado, também pode-se observar uma série de tumores que não apresentou expressão de nenhum dos ACTs testados.

Pelo menos três parâmetros comuns à expressão proteica de ACTs foram observados nos testículos: (a) expressão predominante na espermatogônia,

predominantemente como proteína nuclear; (b) expressão em espermatoócitos primários e/ou secundários, também nucleares; (c) expressão restrita aos espermatozoides maduros, predominantemente como proteína citoplasmática. NY-ESO-1 pertence ao primeiro grupo, com forte expressão na espermatogônia (Caballero & Chen, 2009).

O fato de NY-ESO-1 ser um dos ACTs mais imunogênicos já descobertos, combinado a sua ampla distribuição em diversos tipos de câncer, faz com que se torne uma molécula atrativa para ser usada em vacinas contra malignidades (Nicholaou et al., 2006). Sua principal característica é a capacidade de desencadear respostas mediadas por células-T e anticorpos, espontaneamente, numa grande proporção de pacientes com câncer (Lee et al., 1999; Odunsi et al., 2003; Rodolfo et al., 2003). Estudos mostram que cerca de 40% dos pacientes portadores de tumores com expressão de NY-ESO-1 desenvolveram anticorpos contra a proteína sem nenhum tipo de imunização (Stockert et al., 1998). Células-T restritas ao MHC de classes I e II estão presentes em pacientes com tumores positivos para NY-ESO-1 (Valmori et al., 2000; Zeng et al., 2002), e o envolvimento de células-T CD4+ NY-ESO-1-específicas em paciente com anticorpos contra a proteína foi descrito (Wang et al., 1998). Embora sua expressão ocorra em níveis mais altos que os demais ACTs, a resposta imune espontânea ao NY-ESO-1 não está relacionada com este fato (Gnjatic et al., 2006), e investigações adicionais acerca dos mecanismos que tornam sua imunogenicidade superior podem prover informações importantes acerca dos antígenos de câncer e sistema imune.

Estatísticas apresentadas em 2006 (Gnjatic et al., 2006; Nicholaou et al., 2006) já apontavam o uso de NY-ESO-1 em mais de 30 testes clínicos em todo o mundo, e esse número aumentou consideravelmente desde então. Muitas abordagens vêm sendo utilizadas visando o aumento da imunogenicidade dessa proteína. O primeiro teste clínico com NY-ESO-1 utilizava peptídeos que desencadeavam respostas

restritas ao complexo HLA-A2 (um grupo de receptores celulares de leucócitos) do MHC (Chen et al., 2004; Jäger et al., 2006). Esses peptídeos estimularam respostas primárias NY-ESO-1-específicas, mediadas por células-T citotóxicas. Em outro teste clínico utilizando peptídeos HLA-DP4-restritos, derivados a partir de NY-ESO-1, apenas uma pequena parcela de pacientes desenvolveu resposta imunológica (Khong & Restifo, 2002). Esses resultados indicam que a imunogenicidade da proteína depende fortemente de sua habilidade de estimular a resposta das células-T citotóxicas. Testes envolvendo a transfecção de NY-ESO-1 completa via poxvírus em células dendríticas também foram realizados, resultando na detecção de anticorpos e respostas mediadas por células-T em pacientes de câncer portadores de diferentes tipos de tumores (Jäger et al., 2006).

Muita atenção tem sido dada às abordagens envolvendo a NY-ESO-1 em sua forma completa, pois não há restrição do MHC para os pacientes que a utilizam (Hu et al., 2010). A proteína completa apresenta epitopos para células-T restritos, tanto ao MHC de classe I quanto ao MHC de classe II, e ainda é capaz de estimular respostas mediadas por células-T citotóxicas e células-T CD4+ (Figura 1). A presença de células-T CD4+ pode auxiliar a produção de anticorpos e gerar respostas envolvendo memória imunológica a longo prazo, bem como células-T efectoras de alta qualidade (Kaech and Ahmed, 2003).

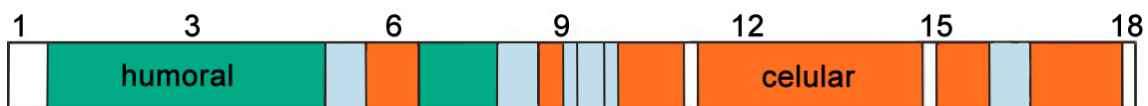


Figura 1: Representação esquemática de NY-ESO-1. A área verde é rica em epitopos reconhecidos por anticorpos, enquanto as áreas alaranjadas são ricas epitopos reconhecidos por células-T CD4 de classe HLA II. Regiões azuis representam epitopos de classe HLA I reconhecidos por células-T CD8.

Nesse contexto, é grande a necessidade de desenvolvimento de tecnologias visando o aumento da exploração dos antígenos antitumorais como ferramentas na

terapia do câncer. Estratégias de produção, purificação e isolamento de NY-ESO-1 em sua forma íntegra e funcional são de grande importância para o avanço dos testes clínicos. O desenvolvimento de um sistema de produção heteróloga estável pode viabilizar a produção do antígeno em larga escala a custos mais baixos.

1.1.3. Fármacos produzidos em plantas e sua regulamentação

O primeiro produto farmacêutico derivado de plantas aprovado para o uso humano foi o Elelyso™ (taliglucerase alfa), uma glucocerebrosidase recombinante produzida em células de cenoura (Shaaltiel et al., 2007; Fox, 2012; Osborne, 2013). Desde 2012 este fármaco vem sendo empregado na terapia de reposição enzimática de uma rara disordem de armazenamento lisossomal, a Doença de Gaucher tipo I. Embora já houvesse comercialização de medicamento de mesma função (Cerezyme®, produzido em células ovarianas de hamster chinês e comercializado pela Genzyme Corporation), a droga produzida em plantas representa um grande avanço para os portadores da doença, custando 25% menos que seu concorrente (Osborne, 2013); Cerezyme® é o fármaco de origem proteica que gera maior custo de importação para o Brasil, chegando ao valor médio de R\$180 milhões/ ano (Madeira et al., 2011), o que evidencia a necessidade de desenvolvimento de sistemas de produção de biofármacos de baixo custo. O Elelyso™ foi regulamentado não somente pelo FDA (*US Food and Drug Administration*), mas também pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Rondon & Martins, 2013).

Em 2006, um anticorpo recombinante que se liga a antígenos de superfície do vírus da hepatite B foi aprovado em Cuba pelo Centro para o Controle Estatal de Medicamentos, Equipamentos e Dispositivos Médicos (CECMED), e embora não seja utilizado diretamente para fins terapêuticos (e sim para a realização de cromatografias de afinidade), sua regulamentação foi tão rigorosa quanto a de um componente farmacêutico ativo (Twyman et al., 2012).

Dentre as 37 novas drogas de origem biológica aprovadas em 2012 pelo FDA (*US Food and Drug Administration*), 11 são destinadas ao tratamento do câncer; o tempo de aprovação médio para todas elas foi de 14,5 meses, enquanto o tempo médio de desenvolvimento clínico chegou a 6,8 anos mais 8 anos de desenvolvimento geral (Osborne, 2013).

Atualmente, três novos produtos biológicos produzidos em sistemas vegetais estão sendo desenvolvidas para uso em humanos: vacina para o vírus da gripe, medicamento para o combate à cárie (ambos com produção em tabaco) e interferon alpha, para o tratamento de hepatite tipo C (produzido em lentilha d'água) (Broz et al., 2013).

No Brasil, a regulamentação de drogas de origem biológica é regimentada pelas Resolução RDC Nº-55 (Brasil, 2011). A maior parte dos medicamentos biológicos comercializados no país são oriundos de importação, e em 2010 alguns produtores de vacinas iniciaram a transferência de tecnologia para a produção de produtos como eritropoietina e interferon gama em solo nacional (Castanheira et al., 2011).

Uma nova parceria do Governo Federal com diversas empresas do setor privado prevê o incentivo à produção de biofármacos no país, ampliando o número de medicamentos de origem biológica de para 25 produtos. Entre eles, moléculas ativas no tratamento de câncer de mama, leucemia, artrite reumatoide, diabetes, oftalmológicos, além de um cicatrizante, um hormônio de crescimento e uma vacina alergênica, gerando uma economia estimada em R\$250 milhões por ano. Entre os sistemas de expressão a serem utilizados, se encontram o tabaco e as células de cenoura, com produção anunciada para a partir de 2016, numa colaboração entre a israelense Protalix, o norte-americano Centro Fraunhofer para Biotecnologia Molecular, a iBio Inc. e a Fundação Oswaldo Cruz (Rondon & Martins, 2013).

1.2. Vantagens da utilização de plantas para a produção de proteínas recombinantes

A produção de proteínas recombinantes em sistema vegetal tem se mostrado atraente por diversos aspectos relacionados tanto a benefícios econômicos quanto a benefícios qualitativos. As biofábricas vegetais (em inglês *molecular farming*) são sistemas destinados à produção recombinante de enzimas para uso industrial, proteínas farmacêuticas e metabólitos secundários em plantas. Seus maiores benefícios são o potencial para a larga escala e o baixo custo de produção. O custo da produção agrícola corresponde apenas a uma fração do que custam sistemas de produção baseados em culturas de células de mamíferos, leveduras ou bactérias (Ma et al., 2003; Fischer et al., 2004). Outras vantagens do sistema de biofábricas vegetais incluem modificações pós-traducionais eucarióticas, baixo risco de contaminação com patógenos humanos e animais, excelente escalonamento e alto rendimento protéico (Lau & Sun, 2009).

A primeira proteína recombinante de interesse farmacêutico a ser produzida em planta transgênica, foi o hormônio do crescimento humano em tabaco, em 1986 (Barta et al.). Diversas proteínas como anticorpos, fatores sangüíneos, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, enzimas e vacinas produzidas em plantas já foram obtidas, o que demonstra a viabilidade desse sistema de expressão e a capacidade de produzir moléculas heterólogas corretamente montadas (Twyman et al., 2005).

Atualmente, existem dois grandes grupos de produtos em desenvolvimento: anticorpos e subunidades de vacinas derivados de plantas. Anticorpos são alvos populares por dominarem as linhas de produção farmacêuticas, e em 2009 já representavam mais de 30% dos fármacos em desenvolvimento (Sheridan, 2010). Essa classe de macromoléculas tende a possuir um mecanismo de ação estequiométrico, tornando necessário o uso de altas doses. Atualmente, apenas plantas possuem o escalonamento necessário para cumprir essa demanda (Ma et al.,

2005a; Ma et al., 2005b; Twyman et al., 2012; Xu et al., 2012), e o desenvolvimento de vacinas produzidas em plantas para imunização de humanos tem sido endossada pelo grande número de estudos demonstrando a eficácia de vacinas derivadas de plantas para a prevenção de doenças em outros animais, culminando com a aprovação da vacina contra a doença de Newcastle, uma importante patologia aviária (Rybicki, 2010).

A rápida produção atingida pelas plantas é útil não somente para a produção de medicamentos personalizados, mas também para a produção escalonada em resposta às ameaças pandêmicas, tornando possível a produção de vacinas contra doenças virais como a gripe em apenas um mês através da utilização de plataformas baseadas em *Agrobacterium tumefaciens*, vírus fitopagênicos ou mesmo híbridos combinando as funcionalidades de ambos (Rybicki, 2010; Twyman et al., 2012).

As sementes surgiram, então, como um dos órgãos ideais para a expressão de proteínas recombinantes em plantas (Stöger et al., 2002; Ma et al., 2003). Sementes são órgãos naturalmente destinados à síntese e estocagem de proteína, com altas concentrações dessas macromoléculas, baixa atividade proteolítica e baixo teor de umidade (Müntz et al., 1998). No contexto da biofábrica, esses fatores podem ser traduzidos em ganho de rendimento, conveniência de estocagem e de transporte. Já foi demonstrado que é possível não somente acumular anticorpos, vacinas de antígenos e outras proteínas recombinantes em altos níveis de concentração, mas também conservar sua funcionalidade e estabilidade por anos, mesmo com as sementes mantidas em temperatura ambiente (Stöger et al., 2000; Schünmann et al., 2002; Nochi et al., 2007). Sementes são bem adequadas ao consumo direto, permitindo administração oral direta de vacinas de antígenos ou proteínas farmacêuticas para imunização, imunoterapia e tratamento de doenças diversas (Daniell et al., 2001; Lamphear, 2002; Takagi et al., 2005; Kermode, 2012). Como seu conteúdo é relativamente homogêneo, apresentando concentrações protéicas

similares entre as unidades de dispersão, o material compreende uma excelente matéria-prima para processamento e purificação, o que é favorecido pela existência de sistemas bem estabelecidos de cultivo, colheita, estocagem, distribuição e processamento das sementes (Lau & Sun, 2009).

Um dos principais determinantes da viabilidade comercial de uma molécula produzida em plantas é o alcance de adequadas taxas de produção, o que depende da espécie da planta, da construção do cassete de expressão e do tipo de transformação aplicado (Twyman et al., 2003).

1.2.1. Espécies de plantas utilizadas

O fumo (*Nicotiana tabacum*) tem uma longa história como sistema bem-sucedido de expressão de moléculas recombinantes, e, por esse motivo, sempre foi um forte candidato quando o objetivo é produção comercial (Twyman et al., 2003; Fischer et al., 2004; Menassa et al., 2012). Esse fato se deve à tecnologia bem estabelecida de transferência e expressão de genes, alta produção de biomassa, potencial de aumento da massa devido à produção de sementes férteis e disponibilidade de infra-estrutura de processamento em larga escala (Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003; Menassa et al., 2012).

Algumas desvantagens estão relacionadas com a alta concentração de alcalóides; no entanto há cultivares com baixa produção desses metabólitos que apresentam potencial para a produção de proteínas de interesse farmacêutico (Twyman et al., 2003). Outra desvantagem é a instabilidade do produto recombinante produzido em folhas, que apresenta um ambiente celular com alta concentração de água. Isso significa que o tecido deve ser congelado ou liofilizado para o transporte (Ma et al., 2003; Twyman et al., 2003; Fischer et al., 2004). Em contraste, a expressão de proteínas recombinantes em sementes como a soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mayz*), permite o armazenamento a longo prazo,

pois apresentam o ambiente bioquímico apropriado para o acúmulo estável de proteínas (Ma et al., 2003; Kermode, 2012). Tem sido demonstrado que anticorpos produzidos em sementes permanecem estáveis por pelo menos três anos à temperatura ambiente sem perda de atividade detectável (Stöger et al., 2000)

Diferentes tipos de culturas têm sido investigados para a produção de proteínas em sementes, como cereais (arroz, trigo e milho) e legumes (ervilha e soja) (Hood et al., 2002; Stöger et al., 2002; Ma et al., 2003). Sementes de arroz (*Oryza sativa*) já foram demonstradas como o melhor sistema de expressão para um anticorpo de cadeia única quando comparados com fumo, trigo (*Triticum aestivum*) e ervilha (*Pisum sativum*), apresentando as maiores concentrações do recombinante por unidade de biomassa, embora o fumo tenha apresentado a maior produção final devido ao acúmulo superior de biomassa por hectare (Stöger et al., 2002).

O milho é atualmente a principal cultura utilizada para a produção comercial de proteínas recombinantes (Ma et al., 2003). Diversas proteínas comercialmente importantes, como β -glucuronidase, avidina, lacase, tripsina e peroxidase de manganês estão sendo produzidas por meio desse sistema (Kusnadi et al., 1998; Hood et al., 1999; Hood et al., 2002; Clough et al., 2006). A produção de anticorpos como a imunoglobulina A, e de vacinas como aquela contra *Escherichia coli* enterotoxigênica, também tem sido bem sucedidas em milho (Hood et al., 2002; Streatfield, 2006). A semente de soja é particularmente rica em proteínas, contendo de 35 a 40% do total de sua massa em proteínas, dos quais 70% são conglicininas e β -conglicininas (Krishnan, 2001), enquanto o milho apresenta de 8 a 10% de sua massa em proteínas e a folha de fumo, de 1 a 2% (Moravec et al., 2007). Apesar disso e do domínio das técnicas de transformação de soja, demonstrado pela produção de diversas linhagens transgênicas resistentes a herbicidas e pragas, essa cultura quase não tem sido explorada para a produção de biofármacos. No entanto, em três trabalhos distintos a semente de soja foi utilizada como um eficiente sistema de

expressão para a produção destas moléculas. No primeiro, o fator de crescimento do fibroblasto (bFGF), acumulou em 2,3% do total de proteína da semente, utilizando-se o promotor e o peptídeo-sinal da glicinina (Ding et al., 2006). No segundo, a semente de soja foi utilizada para a produção da toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica (LTB), acumulando em 2,4% do total de proteínas da semente (Moravec et al., 2007). Para isso, também foi utilizado o promotor da glicinina, com o peptídeo sinal da quitinase e a seqüência de retenção no retículo endoplasmático C-terminal, KDEL. Mais recentemente, Cunha e colaboradores (2011) obtiveram um acúmulo de 2,9% de hormônio do crescimento humano (HGH) utilizando o promotor e o peptídeo-sinal da β -conglucina. Outros trabalhos também demonstram a viabilidade da soja para a produção de proteínas recombinantes, como o anticorpo monoclonal contra a herpes genital (Zeitlin et al., 1998) e a fitase de *Aspergillus* (Denbow et al., 1998).

A planta de soja apresenta diversas vantagens para a produção de moléculas de interesse farmacêutico quando comparada a outras culturas, como a de milho. Primeiramente, ela é uma planta autógama, e a freqüência de polinização cruzada não ultrapassa 1%, uma vez que o seu grão de pólen alcança a distância de apenas 6,5 metros (Abud et al., 2003; Abud et al., 2007). Isso implica no baixo risco de contaminação de culturas não-transgênicas por pólen oriundo de culturas transgênicas. O milho, por sua vez, é uma planta alógama e, como sua polinização é feita pelo vento, o pólen atinge distâncias superiores a 500 metros (Iowa State University, 1993). Outra vantagem da soja é a sua capacidade de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, como as dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, por meio de seu sistema radicular (Castro et al., 1993). Essa característica diminui os custos da cultura da soja, uma vez que quase não há necessidade de utilização de fertilizantes nitrogenados. Além disso, por ser extremamente sensível ao fotoperíodo, o número de ramos, folhas e, conseqüentemente, o número de vagens podem ser

bastante aumentados em casa de vegetação sob condições de fotoperíodo prolongado (Kantolic & Slafer, 2007).

1.3. Tipos de transformação

A maioria dos biofármacos recombinantes derivados de plantas foram produzidos por transformação nuclear e regeneração das linhagens transgênicas (Fischer et al., 2004). A transformação nuclear acarreta na integração do gene heterólogo no genoma da planta e na transmissão do mesmo para a progênie, o que caracteriza uma expressão estável (Sharma et al., 2005; Lacorte, 2006). Esse tipo de expressão também pode ser alcançado por meio da transformação de cloroplastos, que apresenta algumas vantagens quando comparada à transformação nuclear, e tem demonstrado marcantes níveis de expressão em trabalhos recentes (Staub et al., 2000; Fernández-San Millán et al., 2003; Tregoning et al., 2003; Molina et al., 2004).

Os principais métodos utilizados para a transformação estável de plantas são a transformação mediada por *Agrobacterium*, a qual utiliza o mecanismo natural de transferência de genes para plantas de *Agrobacterium tumefaciens*, e o bombardeamento de partículas, no qual microprojéteis cobertos de DNA são acelerados sobre o tecido vegetal (Brasileiro & Carneiro, 1998; Rech et al., 2008).

Para a realização deste trabalho foram aplicadas tanto a técnica de biobalística para a transformação estável de soja, como a transformação transiente de folhas de *N. benthamiana* e transformação estável de plantas de *N. tabacum* mediadas por *A. tumefaciens*.

Justificativas

Os índices crescentes de casos de câncer exigem que medidas urgentes sejam tomadas para a prevenção, o diagnóstico precoce e o tratamento desta doença. Os antígenos antitumorais representam uma ferramenta adicional no combate à doença, uma vez que os vários tipos de tratamentos existentes são muitas vezes danosos à saúde dos pacientes, debilitando-os e levando a um agravamento do quadro clínico geral.

NY-ESO-1 apresenta a vantagem de ser expressa naturalmente pelo paciente com câncer, o que diminui a chance de rejeição e efeitos colaterais. No entanto, a demanda mundial por terapias imunogênicas exigem o desenvolvimento de estratégias de expressão que reduzam custos de produção e mantenham as atividades biológicas das proteínas recombinantes intactas — um cenário em que plantas funcionam com o biofábricas de proteínas recombinantes se encaixam de maneira promissora.

A proteína em questão tem se mostrado efetiva como iniciadora de resposta imune. Para que sua utilização se torne viável, abordagens que levem à estabilidade estrutural somado a bons níveis de expressão podem ser viabilizadas, através do endereçamento subcelular das proteínas recombinantes para corpos-protéicos de sementes transgênicas de soja [*Glycine max* L.(Merril)], para folhas de tabaco (*Nicotiana benthamiana* Domin) infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* ou estavelmente transformadas (*Nicotiana tabacum* L.) por co-cultura.

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é obter um sistema de produção heteróloga da proteína recombinante NY-ESO-1 expressada em linhagens de soja transgênica e folhas de tabaco.

Objetivos Específicos

1. Clonar os fragmentos do gene codante da NY-ESO-1 em vetores de expressão utilizados para a transformação de soja e tabaco;
2. Obter e caracterizar geneticamente as linhagens transgênicas;
3. Caracterizar bioquimicamente os níveis de acúmulo, avaliar a eficiência de compartimentalização subcelular (apenas em sementes) e a correta expressão do antígeno em sementes de soja, folhas e sementes de tabaco transgênicos.

Metodologia

5.1. Construção de vetores plasmidiais de expressão

5.1.1. Vetor para expressão em *G. max* e *Nicotiana spp.*

O fragmento de 540 pb referente à região codificante de NY-ESO-1 (gene CTAG) foi sintetizado e clonado em vetor pBSK com múltiplos sítios de clonagem pela empresa Epoch Biolabs (Sugar Land, USA), de onde foi digerido e subsequentemente clonado nos sítios *Hind* III e *Eco* RI do vetor p β CongI. Este segundo vetor é resultado da clonagem do promotor da subunidade α da β -Conglicinina de soja seguido do peptídeo sinal completo da subunidade α da β -Conglicinina de soja e do terminador 35S de CaMV. O vetor resultante contendo 4666 pares de base, *in frame*, foi denominado p β CongICTAG-1B (Figura 2). O antibiótico utilizado para a seleção dos transformantes foi a ampicilina (*Amp*).

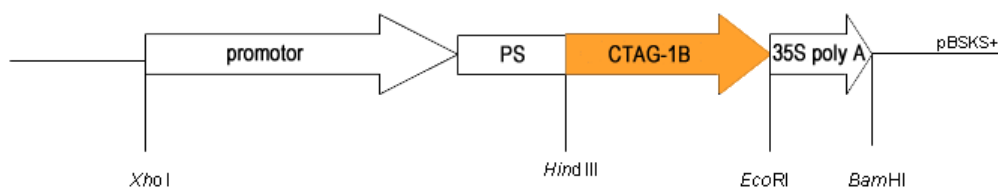


Figura 2: Representação esquemática do cassete de expressão utilizado para transformação estável de soja. Foram utilizados promotor e peptídeo sinal (PS) da subunidade α da β -Conglicinina de soja e do terminador 35S de CaMV.

Para a construção do vetor utilizado em plantas do gênero *Nicotiana*, foram adotados os mesmos procedimentos anteriores, tendo como alteração a clonagem do fragmento de interesse nos sítios *SAL* I e *SST* I do vetor pCambia 2300™, gerando o vetor *in frame* pCambiaCTAG-1B (Figura 3). O antibiótico utilizado para a seleção dos transformantes foi a Canamicina (*Kan*).

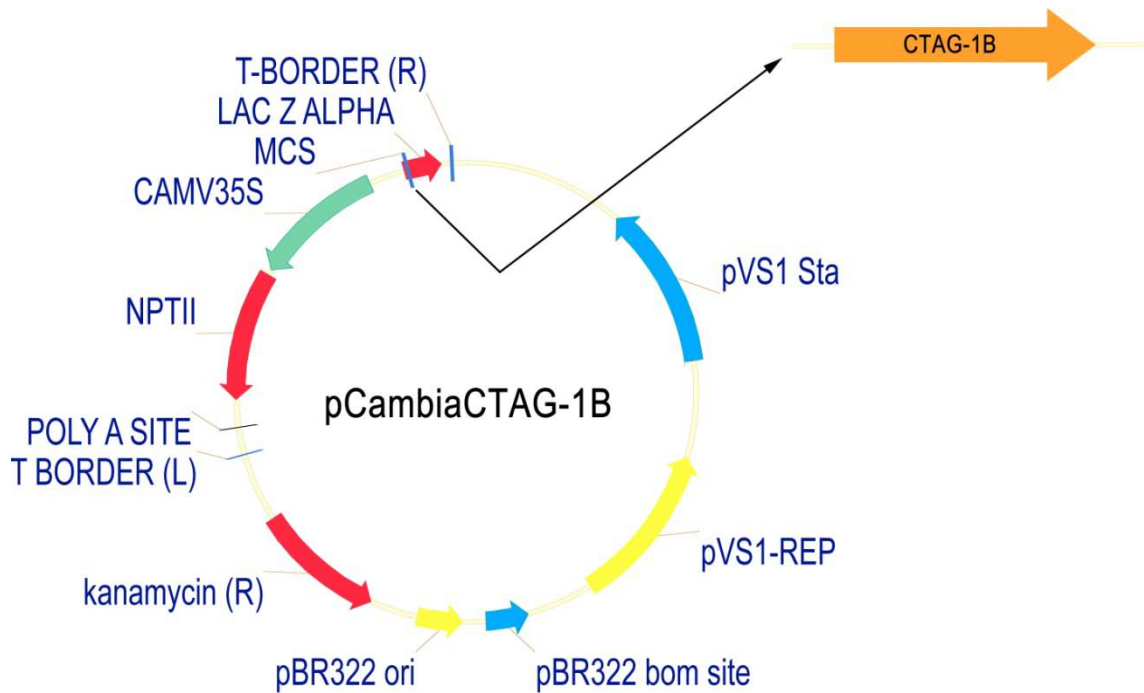


Figura 3: Representação esquemática vetor pCambia contendo o fragmento CTAG-1B.

Foram feitas 3 construções adicionais com endereçadores subcelulares, com o intuito de averiguar em qual(is) região(ões) subcelular(es) se daria maior expressão: a primeira delas contendo o peptídeo sinal da cadeia leve Kappa do anticorpo de camundongo CEA66-E3, que atua como endereçador para o retículo endoplasmático, e um tag c-Myc (N-EQKLISEEDL-C, 1202 Da) seguido de um sinal de retenção no retículo endoplasmático, KDEL; a segunda contém apenas o peptídeo sinal da cadeia leve Kappa; o terceiro apresenta peptídeo sinal para cloroplasto (Chlo).

Os vetores resultantes, pCambiaCTAG, pCambiaKappa-CTAG-KDEL, pCambia-Kappa-CTAG e pCambiaCTAG-Chlo foram então utilizados para agroinfiltração. Para controle positivo foi utilizado o vetor pCambia-sGFP, resultante da clonagem de um cassete de expressão de sGFP (Chiu et al., 1996) (promotor 35S CaMV – sequência codificante para sGFP – tNOS) no vetor pCambiaTM2300. Foram construídos ainda vetores virais baseados no vetor viral PVX (Lacorte, 2006), de forma a obter maiores níveis de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*. Para

isso, os vetores pCambiaCTAG, pCambiaCTAG-KDEL e pCambiaCTAG-Chlo foram digeridos com *Nco*I e *Sac*I, e os fragmentos resultantes (CTAG; Kappa-CTAG; Kappa-CTAG-KDEL; Kappa-CTAG-Chlo) foram clonados no vetor pDONCTAG-1B digerido com *Nco*I e *Sac*I. Os três vetores resultantes foram então recombinados com o vetor PVX-GW [vetor PVX com sistema de recombinação Gateway™ (Lacorte, 2006)], para obtenção dos vetores finais PVX-CTAG, PVXCTAG-KDEL e PVXCTAG-Chlo.

5.2. Expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*

5.2.1. Transformação de células de *A. tumefaciens*

Colônias de *A. tumefaciens*, linhagem LBA4404 (Invitrogen), foram transformadas por meio de eletroporação com os plasmídeos pCambiaCTAG, pCambiaCTAG-KDEL, pCambia-Kappa-CTAG, pCambia-CTAG-Chlo, PVX-CTAG, PVXCTAG-KDEL e PVXCTAG-Chlo conforme o Manual de Transformação Genética de Plantas (Brasileiro & Carneiro, 1998). A linhagem de *A. tumefaciens* PMP90 foi transformada com o vetor pCambiaSGFP nas mesmas condições. As colônias transformadas foram então cultivadas em 3 mL de meio LB por 24 horas a 28° C antes de serem utilizadas para a agroinfiltração.

5.2.2. Preparação da suspensão bacteriana e agroinfiltração

As culturas bacterianas obtidas conforme o item anterior foram centrifugadas por 1 minuto a 3000xg para a separação das células do meio de cultura. Os precipitados resultantes foram então resuspendidos em meio de infiltração [10 mM de MgSO₄; 10 mM de ácido morpholineethanesulfônico (MES), pH 5.6 e acetoseringona 150 µM]. As suspensões finais foram ajustadas para a OD₆₀₀ 0,6. Plantas de *N. benthamiana* com 4 semanas de idade (estágio de 4 folhas) foram utilizadas. As folhas foram infiltradas pelo lado abaxial com as suspensões bacterianas. Utilizou-se de 2 a 6

plantas para cada construção. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por 3 dias até a análise de expressão.

5.2.3. Coleta do material agroinfiltrado

Três dias após a agroinfiltração, foram coletados discos foliares de aproximadamente 10 mm de diâmetro das plantas infiltradas com as construções pCambiaSGFP (controle positivo), pCambiaCTAG, pCambiaKappa-CTAG-KDEL, pCambia-Kappa-CTAG-1B e pCambiaCTAG-Chlo.

5.2.4. Detecção da expressão de GFP

A fim de confirmar a eficácia do experimento, as amostras infiltradas com o vetor pCambiaSGFP foram levadas para análise da expressão de GFP no microscópio de fluorescência. A fluorescência de GFP foi detectada por meio da excitação com luz azul, com comprimento de onda de 488 nm, e emissão através de um filtro de barreira de 505-530 nm.

5.3. Expressão estável em plantas de *N. tabacum*

5.3.1. Co-cultivo

Colônias de *A. tumefaciens* contendo a construção pCambiaCTAG-1B estocadas em glicerol foram previamente cultivadas por 48 a 72 horas em estufa a 28°C, em meio LB sólido com os antibióticos adequados. A seguir, colônias isoladas foram cultivadas a 28°C sob agitação a 150 rpm por 36 horas (até obter OD₆₀₀ entre 0,5 e 1,0), em 10mL de meio LB líquido com antibióticos de seleção. A cultura foi então distribuída em diversos tubos de 1,5 mL, sendo centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet (células bacterianas) ressuspendido em 10 mL de NaCl 0,85%. A suspensão bacteriana foi mantida à temperatura ambiente até o momento do co-cultivo. Plântulas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* que apresentavam em média 7 cm de comprimento foram utilizadas como material para

excisão dos explantes (pequenos fragmentos foliares quadrados com cerca de 0,5 mm lado, livres de nervuras e bordos foliares). Os fragmentos foliares foram mantidos em meio MS líquido até o momento do co-cultivo. A seguir, os explantes foram transferidos para uma placa de Petri com 10 mL da suspensão bacteriana, sendo o co-cultivo incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Explantes também foram incubados em placa com solução de NaCl (sem células bacterianas), sendo estes utilizados como controle negativo. Logo após, os explantes foram transferidos para placas com meio MS sólido para co-cultivo no escuro por aproximadamente 60 horas, a $23\pm 1^\circ\text{C}$; sendo então imersos por 15 minutos em água destilada estéril contendo $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de higromicina para lavagem e inibição da agrobactéria.

5.3.2. Indução de calos

Após a lavagem, os fragmentos foliares de *N. tabacum* foram secos em folhas de papel filtro estéreis e transferidos para meio de indução de calos: meio Murashige & Skoog (meio MS, Murashige & Skoog, 1962) contendo $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de higromicina, $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de canamicina e $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP), incubados em câmara de crescimento a 28°C com fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de $50\text{ }\mu\text{mols m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A cada 15 dias os explantes eram transferidos para novo meio de cultivo, a fim de conservar a ação dos antibióticos e do fitorregulador.

5.3.3. Regeneração de brotos

Após o aparecimento dos primeiros calos (30 a 45 dias), estes foram excisados e transferidos para meio de regeneração de brotos composto por meio MS contendo $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de higromicina, $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de canamicina e $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP.

5.3.4. Alongamento e enraizamento

Os brotos regenerados foram excisados e transferidos para meio de alongamento e enraizamento, apenas na presença do antibiótico de seleção ($30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de canamicina), havendo diminuição na concentração de BAP ($0,2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Para a

extração de DNA, utilizou-se material foliar obtido de plântulas bem desenvolvidas e resistentes ao antibiótico de seleção.

5.3.5. Aclimação em casa de vegetação

Após o desenvolvimento *in vitro* das plântulas resistentes, estas foram transferidas para aclimação em casa de vegetação, sob condições controladas de cultivo.

5.3.6. PCR das plantas de fumo transformadas

Para a análise de PCR das plantas transformadas, o DNA foi isolado a partir discos de folhas conforme Edwards e colaboradores (1991). Cada reação de PCR foi feita em alíquotas de 25µl contendo 2 mM de MgCl₂, 160 µM de cada dNTP, 200 nM de cada primer, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 20 ng de DNA genômico. Como controle negativo foi utilizado o DNA de uma planta não-transformada, e como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pβCongICTAG. Os primers CTAG*forward* (5'AAGCACTGCGTGATCCACAT3') e CTAG*reverse* (5'GGCTGAATGGATGCTGCAGA3') foram utilizados para amplificar a seqüência de 540 pb referente à região codificante de NY-ESO-1. O PCR foi realizado em termociclador Bio-Rad sob as seguintes condições: 2 minutos a 94° C para desnaturação, 34 ciclos de 94° C por 30 segundos, 55° C por 1 minuto para anelamento dos primers e 68° C por 30 segundos para amplificação do fragmento, e um ciclo final de 10 min a 68° C. As reações foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e visualizadas sob luz UV.

5.4. Transformação de plantas de soja

5.4.1. Bombardeamento dos explantes de soja

Foram realizados quinze experimentos, em cada um deles, aproximadamente, 144 sementes da cultivar brasileira de soja BR-16 foram desinfetadas conforme o

protocolo descrito por Rech e colaboradores (2008). Os eixos embrionários foram isolados das sementes e o meristema apical exposto por meio da remoção das folhas primárias. Os eixos foram então posicionados em placas de cultura de cinco centímetros de diâmetro contendo doze mililitros de meio de bombardeamento com as regiões apicais direcionadas para cima. O bombardeamento foi realizado com o vetor p β CongICTAG-1B, juntamente com o vetor pAC 321TM (proporção 1:1), que contém o gene *ahas*, conforme descrito por Aragão e colaboradores (Aragão et al., 1996). Imediatamente após o bombardeamento, o multibrotamento dos explantes foi induzido pela completa imersão em meio de indução (meio MS suplementado com 22,2 μ M de BAP, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,7) em placas de 10 cm de diâmetro, nas quais foram incubados no escuro por 16 horas à 28° C. Depois, os mesmos foram transferidos para frascos (*baby food jars*) contendo 20 mL de meio de seleção (meio MS, 3% de sacarose, 500 nM de *Imazapyr*, 0,7% de ágar pH 5,7) e cultivados sob as mesmas condições descritas no item 5.3.2. Os explantes que atingiram um alongamento de 4-5 cm após um período aproximado de 3 semanas foram transferidos individualmente para copos plásticos contendo uma mistura de solo e vermiculita (1:1) fertilizada. Os copos foram cobertos com saco plástico, selados com uma liga de borracha e mantidos em casa de vegetação. As ligas de borracha foram retiradas após uma semana, e os sacos plásticos após duas semanas. Neste estágio, o DNA genômico das plantas foi extraído de amostras de tecido foliar e submetido à análise de PCR para a verificação da presença do transgene (de acordo com o item 5.3.6). As plantas identificadas como portadoras do transgene foram transferidas para vasos contendo 5 dm³ de solo para o desenvolvimento de sementes após atingirem aproximadamente 10 cm de altura.

5.4.2. PCR das sementes R₁ βCongICTAG

Para a análise de PCR das sementes obtidas, foram utilizados pequenos fragmentos de semente para a extração de DNA, utilizando-se os mesmos métodos e condições descritos anteriormente no item 5.3.6.

5.5. Detecção da expressão de NY-ESO-1 por Western Blot

Os diversos materiais vegetais analisados foram coletados e liofilizados (exceto sementes); as amostras tiveram suas proteínas extraídas em 1 mL de Tris-HCl 8,0 pH 50 mM, acrescido de EDTA 2 mM, coquetel de inibidores de protease 0,01% para célula vegetal (SIGMA) e Tween 0,5% para cada 0,5 grama de tecido foliar. As amostras foram mantidas em repouso por no mínimo 4 horas a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos (10°C, 10000xg) e o sobrenadante foi delipidado com 1 volume de hexano. A fase aquosa foi coletada e seu conteúdo proteico foi estimado utilizando-se quantificação de proteínas em comprimento de onda A280 via NanoDrop (Thermo, USA) e armazenada a -20°C. Quantidades conhecidas de proteína, incluindo controle negativo (fumo não transformado), foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% de acordo com Laemmli (1970). Como controle positivo, foram usados 600 nanogramas de NY-ESO-1 recombinante produzida em *E. coli*. Foram utilizados, ainda, 5 µL de marcador de massa molecular aparente (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad). A corrida eletroforética foi realizada a 80V e 15 mA por placa.

Após a conclusão da eletroforese, os géis obtidos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond™ ECL™) em transferidor semi-seco Bio-Rad de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução de leite 5% em tampão tris-salino (TBS) pH 7.0 e posteriormente incubadas com a mesma solução adicionada de

Tween 0,1% e α -NY-ESO-1 mAb E978 (1:6000) produzido em camundongo. Após 2 horas de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em solução de leite 5% em tampão TBS e Tween 0,1% e incubadas por 2 horas em anticorpo secundário produzido em cabra (conjugado com fosfatase alcalina, 1:5000 v/v), diluído na mesma solução utilizada para o anticorpo primário. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes e reveladas com NBT/BCIP (Invitrogen) ou substrato fotoluminescente CSPD (Applied Biosystems), de acordo com as instruções dos fabricantes.

Anticorpo e proteína recombinante (controle positivo) foram gentilmente cedidos pelo *Ludwig Institute for Cancer Research*.

5.6. Análise de espectrometria de massas

5.6.1. Extração de proteína solúvel total

Sementes de soja e fumo foram triturados até a formação de um pó fino com o auxílio de pistilo e mortar; foram pesados aproximadamente 100 mg de cada amostra, sendo estas transferidas para microtubos com 2 mL de capacidade aos quais foram adicionados posteriormente 500 μ L de 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSF e 0,1% v/v SDS. As amostras foram homogeneizadas por agitação em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 10.000xg e os sobrenadantes recolhidos e transferidos para novos microtubos. O conteúdo proteico das amostras foi estimado utilizando-se quantificação de proteínas em comprimento de onda A280 via NanoDrop (Thermo, USA). Volumes de amostra correspondendo a 100 μ g de proteína solúvel total (PST) foram precipitados usando acetona gelada (1:4 v/v). As amostras foram homogeneizadas vigorosamente, mantidas a -20°C por 15 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 10000xg. Os sobrenadantes foram então descartados e os precipitados cuidadosamente dissolvidos em 50 μ L de

bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50mM. A concentração final da solução correspondia a $2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de PST.

Para a análise de sementes de soja, foram utilizadas 18 sementes recombinantes (9 sementes da Linhagem 5 e 9 sementes da Linhagem 3, ambas R_1) oriundas das análises de PCR e selecionadas aleatoriamente e 3 sementes não transformadas (BR16) como controle negativo); cada unidade de dispersão foi analisada individualmente. Para sementes de fumo estavelmente transformado, utilizou-se amostragem do tipo *pool* para as 3 linhagens selecionadas, uma vez que a análise individual é inviável devido ao tamanho reduzido das sementes.

5.6.2. Preparo de amostras para aquisição em nanoUPLC-MS^E.

Foram adicionados 10 μL de bicarbonato de amônio 50 mM para cada alíquota de 50 μL das amostras em concentração $2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e, em seguida, foram adicionados 25 μL de *RapiGEST*[™] (0.2 % v/v). Os microtubos foram homogeneizados com auxílio de vortex e incubados em banho seco a 80°C por 15 minutos. Após uma centrifugação rápida (“*short spin*”) para recolher o líquido evaporado, foram adicionados 2,5 μL de DTT 100 mM a cada microtubo, sendo estes novamente homogeneizados em vortex e incubados a 60°C por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram mais uma vez centrifugadas rapidamente, recebendo dessa vez 2,5 μL de iodoacetamida 300 mM, homogeneizadas e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foram adicionados 10 μL de tripsina (previamente preparada pela adição de 400 μL de bicarbonato de amônio 50 mM para cada vial contendo 20 μg tripsina Promega, resultando numa concentração final $0,05\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), rapidamente homogeneizados em vortex e incubados em banho seco a 37°C *overnight* para digestão proteolítica das amostras. A fim de precipitar o surfactante, foram adicionados 10 μL de ácido trifluoroacético (TFA) 5%, seguindo homogeneização, incubação por 90 minutos a 37°C em banho seco e centrifugação a 10000 xg a 6°C por 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram recolhidos, congelados, liofilizados e posteriormente

ressuspendidos com 190 μ L de 200mM formato de amônio e transferidos para *vials* Waters Total Recovery (Waters, USA), onde foram acrescentados 10 μ L de Fosforilase B (Waters Massprep PHOSB standard - 1mL de acetonitrila 3% e ácido fórmico 0,1%),. A concentração de proteína final foi de 250 ng· μ L⁻¹ para um volume final de 200 μ L, enquanto a concentração de PHOSB correspondia a 50 fmol· μ L⁻¹.

5.6.3. Aquisição por nanoLC-MS^E

A separação dos peptídeos trípticos do PTS por cromatografia líquida em nanoescala foi realizada através de sistema nanoACQUITY™ (Waters Corp., USA) com tecnologia de diluição 2D. A primeira dimensão (1D) foi realizada em coluna *XBridge™* 300mm x 50mm *nanoEase™* contendo resina C18 BEH130 de partícula 5 μ m. A segunda dimensão (2D) foi realizada em pré-coluna *Symmetry C18* de partícula 5 μ m, 5mm x 300 μ m e coluna analítica de fase reversa *HSST3 C18* de partícula 1.8 μ m, 75 μ m x 150mm (Waters, USA). Na primeira dimensão, a fase móvel A correspondeu a formato de amônio 20mM, e a fase móvel B à acetonitrila; na segunda dimensão, a fase móvel A correspondeu a ácido fórmico 0,1% em água e a fase B à ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. Duas corridas foram realizadas: a primeira correspondeu a uma simulação 1D de 70 minutos para checar a digestão e quantificar a amostra; a segunda equivaleu a uma corrida 2D completa, utilizando 5 frações e 5 horas para ser completada. Para a primeira corrida, 2 μ L das amostras foram inicialmente transferidas para a coluna 1D em 0,5 minuto numa taxa de fluxo de 2 μ L·min⁻¹ e 0,1% de B. os peptídeos foram eluídos da 1D a 2 μ L·min⁻¹ e 65% da fase móvel B por 4 minutos e diluídos para a pré-coluna na 2D usando uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% com taxa de fluxo 20 μ L·min⁻¹ por 20,5 minutos. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-40% na fase B por 54 minutos com uma taxa de fluxo de 500 nL·min⁻¹ seguido de lavagem com 85% da fase móvel B. A coluna foi então reequilibrada às condições iniciais por 10 minutos. Durante esse processo, a temperatura da coluna foi mantida a 35°C. O íon de referência (lock mass) peptídeo

glu-fibrino humano (GFP) foi entregue a partir do sistema fluídico do SynaptG2 usando uma taxa de fluxo constante de $500 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ a uma concentração de 320 fmol de GFP para o vaporizador de referência da fonte do *NanoLockSpray* do espectrômetro de massas.

Após a aquisição, as amostras foram quantificadas usando o método de identificação descrito abaixo e a segunda corrida utilizando 5 frações foi realizada ajustando-se a injeção do volume para uma concentração final de 500ng. As amostras foram inicialmente transferidas para a coluna 1D em 0,5 minuto a $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e 0,1% de B. os peptídeos para a primeira fração foram eluídos da 1D a $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e 10,8% da fase móvel B por 2 minutos e diluída para a pré-coluna da 2D usando uma solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico com uma taxa de fluxo de $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ por 8,5 minutos. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-35% de fase móvel B por 37 minutos com uma taxa de fluxo $500 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ seguida por uma lavagem com 85% da fase móvel B por 5 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. os peptídeos para a segunda, terceira, quarta e quinta frações foram eluídos utilizando-se 14, 16.7, 20.4 e 50% de fase móvel B, respectivamente. As condições para diluição, taxa de fluxo e análise 2D foram as mesmas utilizadas para a primeira fração. A entrega do íon de referência em todas as frações foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas *Synapt*[®] *G2 HDMS*[™] (Waters, GBR) com geometria quadropolo híbrida/ mobilidade iônica/ aceleração ortogonal por tempo de voo (oa-TOF). Para todas as mensurações, o espectrômetro de massas foi operado em modo resolução com alcance típico de pelo menos 20000 FWHM (“metade do máximo da largura do total”, do inglês *full-width half-maximum*). Todas as análises foram realizadas usando o modo íon-positivo do nanoelectrospray (*nanoESI+*) o analisador de tempo de voo do espectrômetro de massas foi externamente calibrado com íons GFP b+ e y+ com m/z 50 a 2000 com

dados de pós-aquisição dos íons de referência corrigidos usando o íon precursor dupla-carga da GFP $[M+2H]^{2+} = 785.8426$. O vaporizador de referência foi ajustado para uma frequência de 30 segundos. Os dados de massa exata por tempo de retenção (Exact Mass Retention Time) do nanoLC-MS^E (Geromanos et al., 2009) foram coletados em modos alternados de aquisição de baixa e alta energia. O tempo de aquisição do espectro contínuo, em cada modo, foi de 1,5 segundos com um atraso de 0,1 segundo por *interscan*. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 3 eV; no modo de alta energia, a energia de colisão foi rampeada de 27 a 50 eV a cada intervalo de 1,5 segundos do espectro.

A radiofrequência aplicada ao analisador de massas do quadrupolo foi ajustada de tal maneira que os íons com m/z entre 200 e 2000 fossem eficientemente transmitidos, garantindo assim que quaisquer íons com m/z menores que 200 que fossem observados no LC-MS tivessem surgido apenas a partir de dissociações geradas na célula de colisão *TRAP T-wave* do equipamento (para maiores informações e referências, consultar Giles et al., 2010). A mobilidade iônica foi conduzida sob controle de gás manual com taxa de fluxo do gás da armadilha de íons a $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de fluxo do gás da fonte de ionização $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de fluxo do gás de resfriamento $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de fluxo da célula de hélio $170 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de fluxo do gás do sistema de mobilidade iônica $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.6.4. Processamento de dados e identificação de proteína

Os dados de espectrometria de massa obtidos por LC-MS^E foram processados e comparados a um banco de dados com auxílio do software *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.5.2 (Waters, GBR). As identificações das proteínas foram obtidas com um algoritmo de “*ion accounting*” incorporado ao programa e comparado às sequências de soja com padrões de digestão *Mass PREP* (MPDS) *UniProtKB/Swiss-Prot* apenas ao banco de dados (Phosphorylase - P00489 - PHS2_RABIT, *Bovine Hemoglobin* - P02070 - HBB_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1_YEAST, BSA - P02769 -

ALBU_BOVIN) e CTAG-1B (UniProtKB/Swiss-Prot – P78358 – Cancer_testis_1). Identificação e pacote de dados quantitativos foram gerados com o uso de algoritmos dedicados e alinhados contra uma base de dados espécie-específica.

A detecção de íons, agrupamento e normalização paramétrica de escala log foram realizados em PLGS com uma licença *Expression^E*. As medidas das intensidades são tipicamente ajustadas nesses componentes removendo os isótopos e reduzindo os estados de carga dos espectros que se replicam pelo experimento ao analisar os clusters de EMRT. Carboamidometilação da cisteína foi especificada como uma modificação fixa, enquanto acetilação do N-terminal, deaminação do N-terminal e da glutamina, e oxidação da metionina foram incluídas como modificações variáveis. Os componentes são agrupados com uma precisão de 10 ppm e tolerância de 0,25 minuto contra as massas dos peptídeos teóricos gerados pelo banco de dados com no mínimo 1 peptídeo. O alinhamento dos peptídeos precursores obtidos pelos dados de baixa e alta energia de colisão possui uma precisão de aproximadamente 0,05 min. Um erro de clivagem da tripsina é permitido. As tolerâncias entre os fragmentos e os precursores são determinadas automaticamente.

O critério de identificação de proteínas no banco segue a identificação de no mínimo um fragmento de íon por peptídeo, três fragmentos de íons por proteína, ao mínimo um peptídeo por proteína e a identificação permitida somente dentre 4% dos falsos positivos encontrados em uma réplica experimental. Usando um filtro de identificação por réplicas, falsos positivos são minimizados uma vez que ruído possui natureza caótica e não tende a se replicar entre injeções. Para a quantificação e identificação das proteínas, as intensidades das massas medidas são normalizadas para a intensidade das massas identificadas dos peptídeos do padrão interno.

Resultados

6.1 Expressão estável de NY-ESO-1 em *N. tabacum*

6.1.1 PCR das plantas de fumo estavelmente transformadas

A presença do transgene CTAG-1B nas plantas de fumo regeneradas após a co-cultura com *A. tumefaciens* contendo o vetor pCambiaCTAG-1B foi detectada por PCR utilizando-se os primers CTAG*reverse* e CTAG*forward*. Do total de plantas analisadas, onze apresentaram o transgene (amostras 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15 e 20), das quais três foram selecionadas (11, 15 e 20), sendo cada uma delas um evento de transformação independente (linhagens transgênicas).

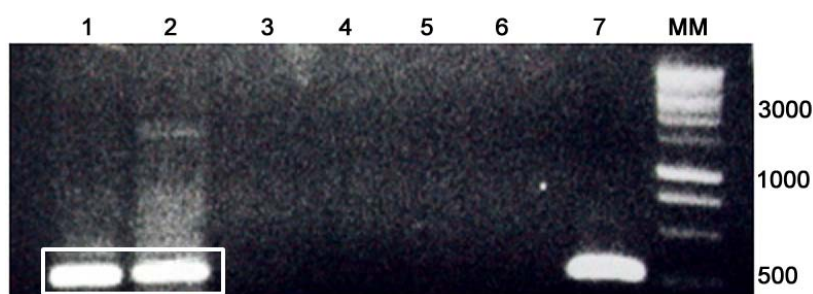


Figura 4: PCR representativo para identificação de plantas de fumo estavelmente transformadas. Os números 1 e 2 correspondem a amostras portadoras do gene CTAG-1B (540 pb); 3 corresponde a amostra negativa (não incorporou o transgene); 6 – controle negativo; 6 – branco; 7 – controle positivo pCambiaCTAG; MM – marcador de massa molecular aparente *1Kb Plus Ladder* (Promega, USA) . À direita, o número correspondente em pares de bases (pb) das bandas do marcador de massa molecular. As bandas correspondentes ao transgene (540 pb) se encontram destacadas.

6.1.2 Western blot das folhas de fumo de plantas estavelmente transformadas

Embora o transgene tenha sido identificado nos experimentos de PCR, não foi possível detectar a proteína alvo através da análise de Western Blot (dados não mostrados). Como a construção plasmidial utilizada não continha endereçador

subcelular (pCambiaCTAG), preferiu-se aguardar o período de frutificação das plantas, a fim de analisar também as suas sementes.

6.1.3 Análise de progênie de plantas de fumo de estavelmente transformadas via Western Blot

As 3 linhagens obtidas nos eventos de transformação estável que alcançaram sucesso reprodutivo tiveram suas sementes analisadas apenas por Western Blot, uma vez que seu tamanho reduzido impedia a análise individual por PCR. Um *pool* de sementes (0,05 grama, o que corresponde a cerca de 580 sementes) de cada linhagem foi tomado, macerado e submetido à extração protéica de acordo com o item 5.5. Embora fosse possível a visualização de bandas em todas as amostras, os controles negativos (sementes de plantas não transformadas e sementes positivas para hormônio do crescimento humano, por não possuir similaridade alguma com NY-ESO-1) também gerou banda nítida e de forte sinal inespecífico com massa aparente de um trímero, que podia ser igualmente visualizada no controle positivo (Figura 5), levando a crer que a espécie utilizada como biofábrica apresenta reatividade ao anticorpo α -NY-ESO-1, mesmo este sendo monoclonal. Não se sabe, no entanto, a natureza da molécula que gerou ligações inespecíficas.

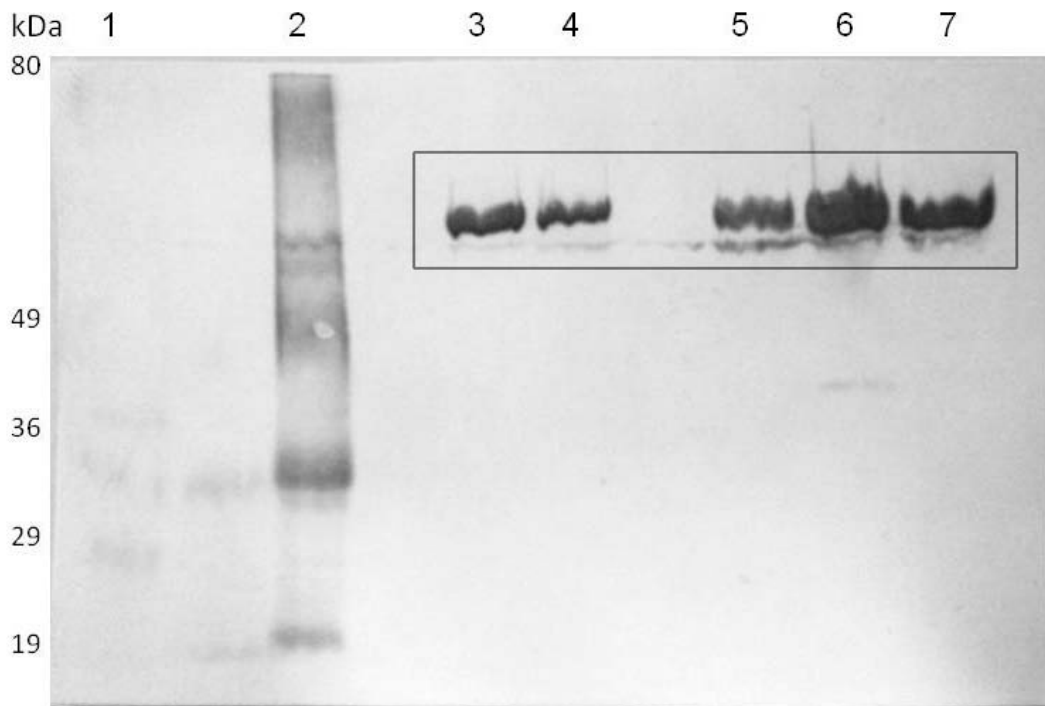


Figura 5: Western blot de sementes de fumo mostrando ligação inespecífica do anticorpo. 1 – marcador de massa molecular (Pre-Stained SDS Standards, Bio-Rad); 2 - NY-ESO-1 600 ng (controle positivo); 3 – sementes não transformadas (controle negativo 1), 30 µg proteína total solúvel (TSP); 4 – sementes transgênicas, HGH, 30 µg TSP; 5 – sementes transgênicas para NY-ESO-1, linhagem 11, 30 µg TSP; 6 – sementes transgênicas para NY-ESO-1, linhagem 15, 30 µg TSP; 7 – sementes transgênicas para NY-ESO-1, linhagem 20, 30 µg TSP.). As bandas inespecíficas se encontram destacadas e correspondem à massa aparente de aproximadamente 60 kDa.

6.2 Expressão transiente de NY-ESO-1 em *N. benthamiana*

6.2.1 Western Blot das folhas de tabaco agroinfiltradas

As construções com diferentes tipos de endereçadores subcelulares, tanto com vetor pCambia quanto com vetor viral (PVX), apresentaram banda inespecífica de fraca intensidade com cerca de 60 kDa (Figura 6) indicando que, até o presente momento, o método de agroinfiltração não é eficaz para a produção de NY-ESO-1 recombinante. Foram realizados 5 experimentos para cada construção.

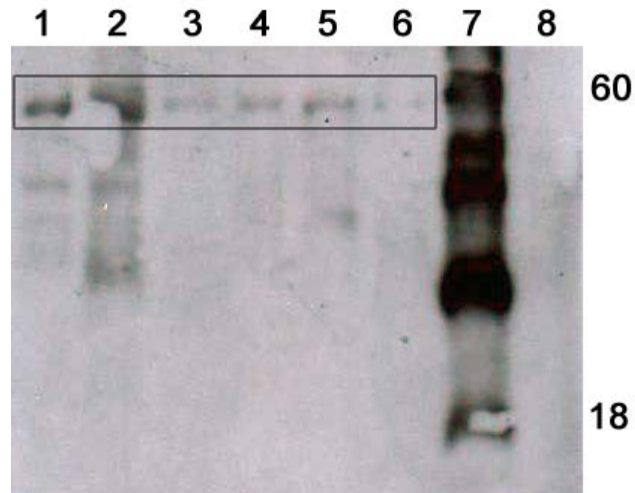


Figura 6: Western blot representativo de folhas de *N. benthamiana*. 1 e 2: proteínas do apoplasto de folhas infiltradas com pCambia-CTAG-1B; 3: proteínas do apoplasto de folhas não infiltradas (controle negativo); 4 e 5: proteínas de folhas infiltradas com pCambia-CTAG-1B; 6: proteínas de folhas não infiltradas (controle negativo); 7: NY-ESO-1 recombinante (controle positivo); 8: marcador de massa molecular aparente (Pre-Stained SDS Standards, Bio-Rad). As bandas inespecíficas se encontram destacadas e correspondem à massa aparente de aproximadamente 60 kDa.

6.2.2 Análise de espectrometria de massas

A fim de averiguar se a expressão transiente de NY-ESO-1 em folhas de tabaco agroinfiltradas ocorria em níveis baixos o suficiente para que a mesma não fosse imunodetectável, o material obtido foi também analisado por espectrometria de massa. Nesse experimento confirmou-se, porém, que a proteína não estava presente nos extratos protéicos (dados não mostrados).

6.3 Expressão de NY-ESO-1 em soja

6.3.1 PCR das plantas de soja transformadas

Após 5 experimentos de bombardeamento de embriões de soja (com 144 embriões/experimento, totalizando 800 embriões), 8 plantas regeneradas foram confirmadas por PCR como sendo transgênicas para o gene CTAG (amostras 2, 3, 5,

8, 9, 17, 37 e 38), mas apenas 5 chegaram à fase reprodutiva (3, 5, 8, 9 e 37); cada uma delas corresponde a um evento de transformação independente (linhagem transgênica). Estas plantas compuseram a geração parental, nomeada R₀.

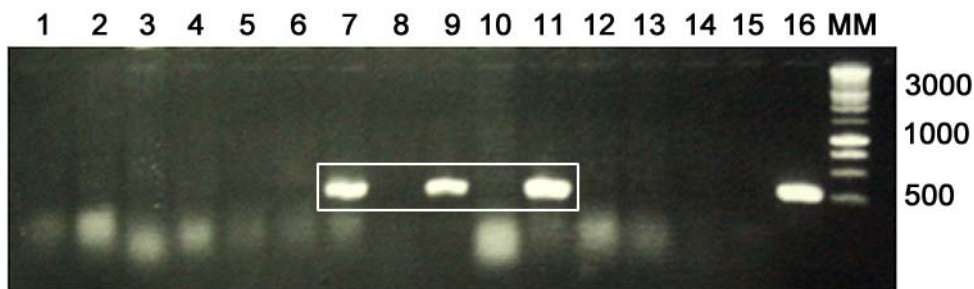


Figura 7: PCR representativo para identificação de plantas de soja estavelmente transformadas. Neste experimento, apenas as amostras 7, 9 e 11 apresentaram integração do transgene. 14 – controle negativo; 15 – branco; 16 – controle positivo (pβCongICTAG); MM – marcador de massa molecular aparente *1Kb Plus Ladder* (Promega, USA). À direita, o número correspondente em pares de bases (pb) das bandas do marcador molecular. As bandas correspondentes ao transgene (540 pb) se encontram destacadas.

6.3.2 Triagem das sementes βCongICTAG-1B R1 via Western Blot

O Western Blot das sementes R₁ confirmou a expressão e acúmulo de proteína heteróloga, embora sua concentração fosse baixa (Figura 8). A massa molecular aparente da proteína se encontrava um pouco abaixo da esperada, o que pode ser atribuído às condições da corrida eletroforética, uma vez que a presença da proteína foi detectada também por espectrometria de massa, onde foi confirmado que sua massa molecular se encontrava correta. Dentre as amostras analisadas, as linhagens 5 e 37 apresentaram sinal mais intenso para a proteína em estudo, sendo assim escolhidas para as análises de espectrometria de massas.

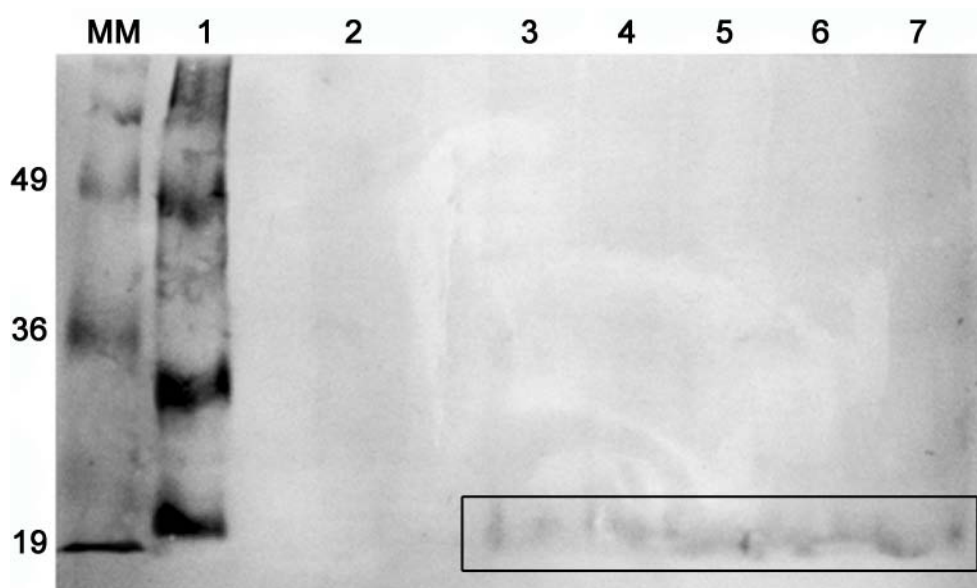


Figura 8: Western blot de sementes de soja R₁ contendo NY-ESO-1 mostrando baixa concentração de proteína recombinante. MM: marcador de massa molecular (Pre-Stained SDS Standards, Bio-Rad); 1: NY-ESO-1 recombinante, 600 nanogramas; 2: controle negativo (sementes de soja não transformadas); 3: Linhagem 2; 4: Linhagem 3; 5: Linhagem 5; 6: Linhagem 8; 7: Linhagem 37. As bandas correspondentes à proteína de interesse (18 kDa) se encontram destacadas.

6.3.3 PCR das sementes R1 βCongICTAG

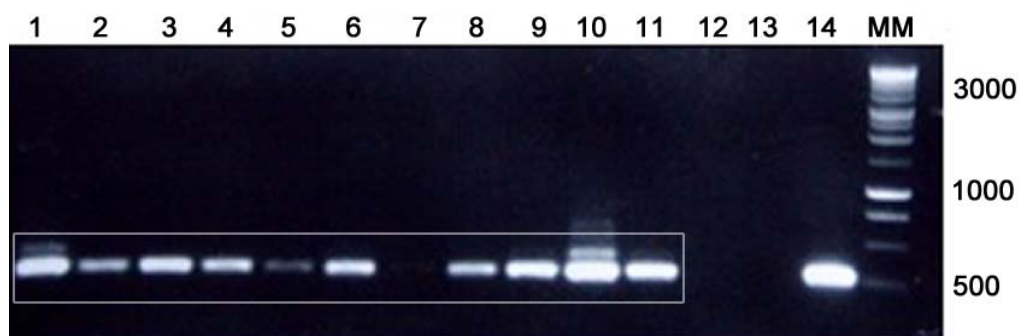


Figura 9: PCR representativo para identificação sementes de soja R1 portadoras do gene CTAG-1B. Neste experimento, as sementes correspondentes às amostras de número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 11 receberam o transgene da planta-mãe. 12 – controle negativo; 13 – branco; 14 – controle positivo (pβCongICTAG); MM – marcador de massa molecular aparente. À direita, o número correspondente em pares de bases (pb) das bandas do marcador molecular. As bandas correspondentes ao transgene (540 pb) se encontram destacadas.

Sementes das 5 plantas transgênicas geradas que atingiram fase reprodutiva foram selecionadas para análise da presença do transgene CTAG-1B por PCR (Figura 9), e apenas as Linhagens 5 e 37 apresentaram sementes portadoras do transgene na triagem inicial, sendo então selecionadas para dar continuidade às análises. Foram analisadas 310 sementes das linhagens selecionadas (Tabela 1). As sementes analisadas correspondem à geração R₁.

Tabela 1– Sementes de soja analisadas para a presença do gene CTAG-1B por PCR, para as diferentes linhagens. Sementes PCR (+): número de sementes que continham o gene de interesse; sementes PCR (-): número de sementes que não continham o gene de interesse.

	Linhagem 2	Linhagem 3	Linhagem 5	Linhagem 8	Linhagem 37
Sementes PCR (+)	0	0	71	0	59
Sementes PCR (-)	29	29	47	29	46
Total	29	29	118	29	105

6.3.4 Análise de espectrometria de massas

Os dados obtidos pela análise das linhagens 5 e 37 demonstraram que os níveis de expressão de NY-ESO-1 variaram entre 0,030 e 0,192% da PTS de acordo com a semente analisada (Figura 13). Embora todas as sementes perfiladas tenham apresentado o transgene na detecção por PCR, 3 das 9 (1:3) amostras analisadas para a linhagem 37 não apresentaram a proteína, indicando que suas cópias do transgene não eram funcionais.

Levando em consideração a média da concentração proteica das sementes, a linhagem 5 mostrou-se com maior expressão de NY-ESO-1, apresentando um Log(e)Ratio de 0,7 com relação à linhagem 37. O valor de Log(e)Ratio corresponde ao logaritmo neperiano da razão (Ratio) dos valores normalizados da quantidade em femtomol calculado, e corresponde ao *fold*ing (“vezes” ou “repetições”) da proteína; quanto maior o *fold*ing, maior é sua expressão quando comparada à de outra amostra.

Nesse contexto, cada $\text{Log}(e) = 1$ corresponde a 1 “*fold*”, o que equivale a 100% de expressão.

OK	Accession	Entry	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Precursor RMS Mass Error (ppm)	Products	Digest Peptides	Modified Peptides	Products RMS Mass Error (ppm)	Pr
+	Q9WE10_SOYBN	Q9WE10	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN PM30 PE 2 SV 1	15088	9.4	7823.7	5	19	32.1	1.4	56	5	0	9.9493	
+	C6TDF5_SOYBN	C6TDF5	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	41854	7.0	7297.5	23	30	56.4	2.8	140	21	2	8.2537	
+	C6T9Z5_SOYBN	C6T9Z5	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	42796	6.3	7214.1	25	30	68.6	2.2	148	24	5	8.3183	
+	C1G1B_HUMAN	P78358	Cancer testis antigen 1	17981	9.5	6316.8	8	11	68.9	3.6	60	7	1	8.0729	
+	A7LCD5_SOYBN	A7LCD5	Lipoxygenase OS Glycine max GN LO19 PE 2 SV 1	96294	6.6	6015.3	23	72	19.5	7.3	130	18	1	6.7697	
+	C6T8B3_SOYBN	C6T8B3	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	12337	5.4	5985.4	2	12	22.3	0.4	28	2	0	6.7807	
+	C6T588_SOYBN	C6T588	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	16750	4.5	5452.9	9	10	77.2	2.7	61	8	1	9.3404	
+	Q49440_SOYBN	Q49440	Lipoxygenase OS Glycine max GN v10c PE 2 SV 1	96240	6.3	5108.2	26	75	27.4	7.2	147	22	5	7.9505	
+	C6T0L2_SOYBN	C6T0L2	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	11134	6.4	5090.3	4	10	44.6	11.0	37	4	0	6.7092	
+	QLE01_SOYBN	P29530	P24 oleosin isoform A OS Glycine max PE 2 SV 2	23487	9.1	4916.2	7	33	40.7	3.7	47	7	2	6.8394	
+	Q9LLC6_SOYBN	Q9LLC6	Seed maturation protein PM34 OS Glycine max GN PM34 PE 2 SV 1	31746	6.7	4574.4	12	26	36.2	4.2	62	10	1	7.2497	
+	Q2I0H_SOYBN	Q2I0H	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase OS Glycine max GN GAPC1 PE 2 SV 1	36741	6.8	4549.2	19	28	61.5	2.2	97	19	4	7.5839	
+	B2YDQ7_SOYBN	B2YDQ7	Gly m Bd 28k allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	41306	5.0	4535.1	17	28	47.5	2.9	96	15	0	7.5647	
+	C6K8D1_SOYBN	C6K8D1	Seed botinylated protein 68 kDa isoform OS Glycine max PE 2 SV 1	67906	6.1	3754.8	39	70	56.6	3.2	208	32	5	6.6828	

OK	Precursor MH+ (Da)	z	Peak mW	Peptide MH+ (Da)	MH+ Error (Da)	MH+ Error (ppm)	Score	Start	End	Sequence	Originating Spectrum	Modifications	Retention Time (min)	Query Tool
+	1715.0094	2.01	1715.0096	1715.0103	-0.0006	-0.3684	8.40	108	124	(R)SLAQDAPFLPVPVGLLK(E)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005			32.59 PLGS Databank Search
+	1349.7392	2.00	1349.7397	1349.7423	-0.0027	-1.9617	8.34	125	134	(K)EFTVSGNLTIR(L)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005			29.13 PLGS Databank Search
+	1871.1104	2.60	1871.1112	1871.1113	-0.0001	-0.0262	7.91	107	124	(R)EFLAQDAPFLPVPVGLLK(E)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005			29.33 PLGS Databank Search
+	2839.4395	3.08	2839.4398	2839.4158	0.0232	7.1067	7.00	82	106	(R)CFEELLEFLFLAPFATPEELAR(D)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005			32.70 PLGS Databank Search
+	3005.3132	4.30	3005.3123	3005.3215	-0.0094	-3.1231	6.95	7	43	(R)CTGSGTGDADPGGCGIPDPGDMAGPGRAGATGCR(D)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005	Carbamidomethyl C (23), Carbamidomethyl C (24)		22.00 PLGS Databank Search
+	2278.0369	3.00	2278.0366	2278.0312	0.0054	2.3733	6.70	53	77	(R)ASPGGGGAPRPGGGAASGLGCCR(C)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_001			9.61 PLGS Databank Search
+	782.4222	1.00	782.4227	782.4268	-0.0041	-5.2530	5.68	137	143	(R)LTAAER(Q)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005	Amidation C-TERM (7)		26.25 PLGS Databank Search
+	1129.7311	2.00	1129.7316	1129.7343	-0.0027	-2.3964	0.00	114	124	(R)FPLPVPVGLLK(E)	20130610_Thaina_CTAG-R1-5-106_R1_SF_SF_005			29.33 PLGS Databank Search

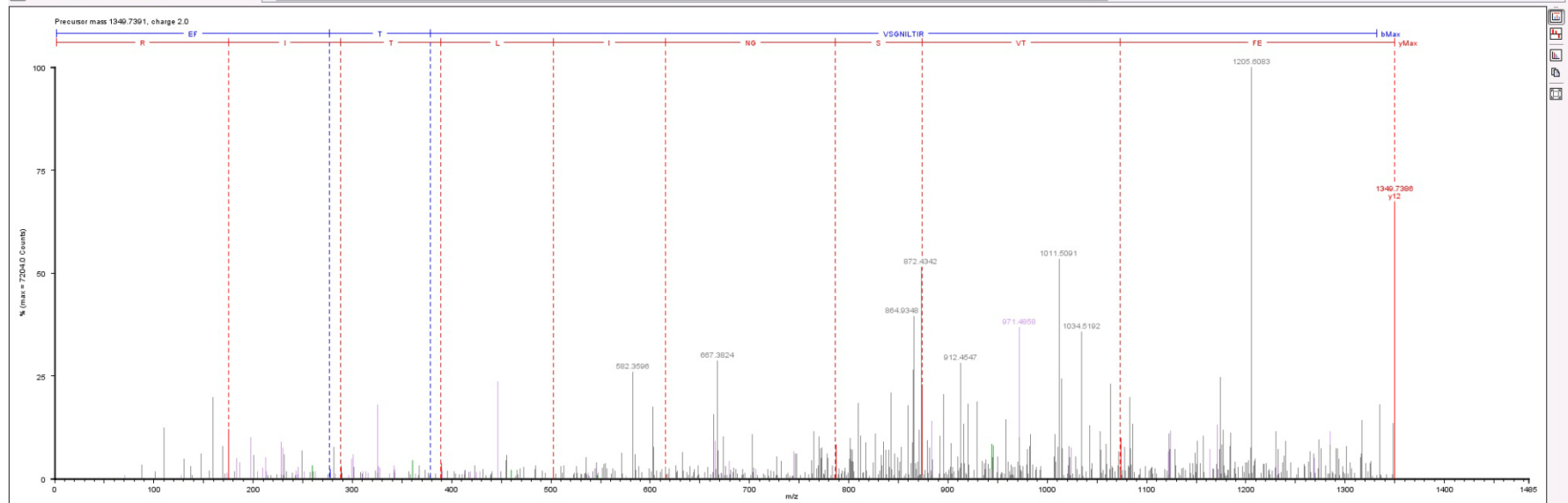


Figura 10 - Espectro MS^E da dupla carga do fragmento de NY-ESO-1 [M + H]⁺ = 1349.73 e seu respectivo espectro processado pelo *software* PGLS. Observa-se, ainda, os 8 peptídeos identificados.

Durante o processo de aquisição dos espectros, foram identificados até 8 fragmentos trípticos de NY-ESO-1 numa mesma replicata (Figura 10), o que corresponde a uma cobertura de 68,9% da sequência da proteína; a digestão teórica prevê 11 peptídeos gerados. Foram realizadas análises estatísticas a fim de verificar a consistência dos dados adquiridos pelo espectrômetro de massas, revelando que 77% das proteínas identificadas apresentaram cobertura de peptídeos superior a 20% (Figura 11), e 91% dos peptídeos identificados apresentaram erro igual ou inferior a 5 ppm (Figura 12).

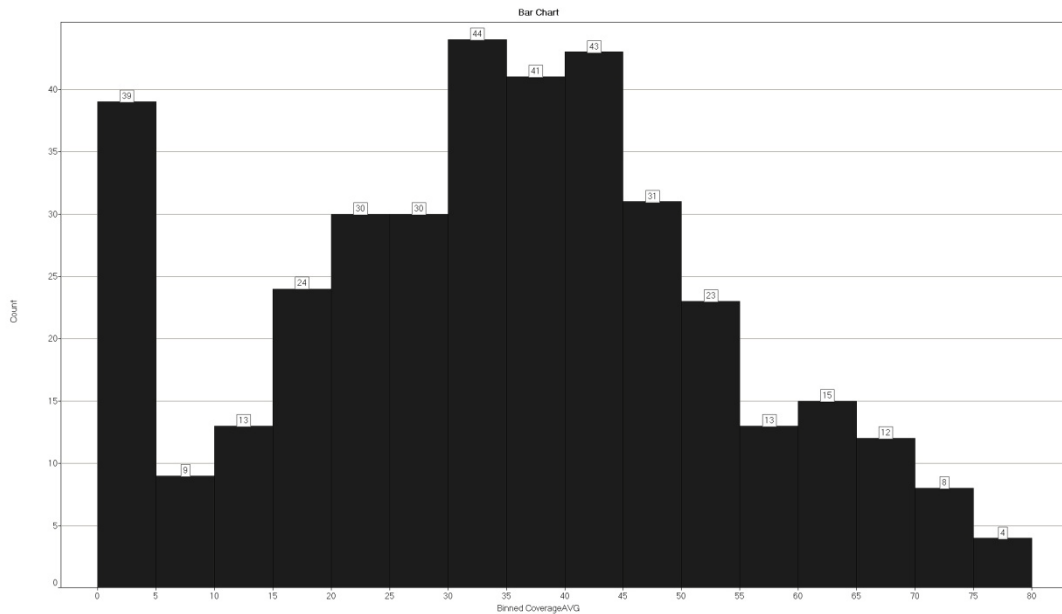


Figura 11: Cobertura das proteínas identificadas. Eixo Y: número de proteínas (*count*); eixo X: intervalos de percentagem de peptídeos cobertos (*binned coverage AVG*).

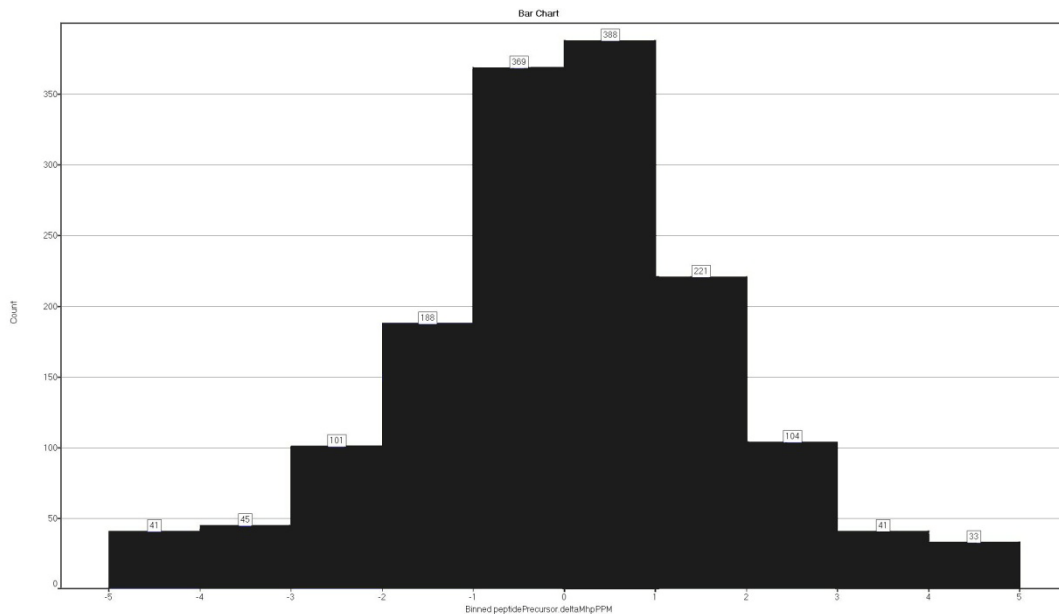


Figura 12: Erro das massas dos peptídeos identificados em partes por milhão. Eixo Y: número de proteínas (*count*); eixo X: intervalos de desvios de massa em ppm (*binned peptide precursor delta MhpPPM*).

É importante ressaltar que, caso seja desconsiderada a diluição que as sementes com cópias não-funcionais acrescenta à análise, a linhagem 37 apresenta as maiores porcentagens de proteína recombinante com relação à PTS (Figura 13).

Além de NY-ESO-1, foram identificadas 297 proteínas nas amostras analisadas (Tabela Suplementar 1), dentre elas proteínas de reserva, de defesa e relacionadas a processos celulares. Além das proteínas consensuais observadas nas duas linhagens, foram observadas 104 proteínas identificadas exclusivamente Linhagem 5 (Tabela Suplementar 2) e 135 na Linhagem 37 (Tabela Suplementar 3). Nas Figura 14 e Figura 15, observa-se o número de proteínas identificadas em cada amostra, bem como sua concentração em fentomol no momento da detecção na coluna do UPLC para as Linhagens 5 e 37, respectivamente. As identificações das proteínas putativas se encontram nas Tabelas Suplementares 4,5 e 6.

As tabelas de identificação de proteínas das sementes não transformadas, utilizadas para controle do experimento, encontram-se na Tabela Suplementar 7.

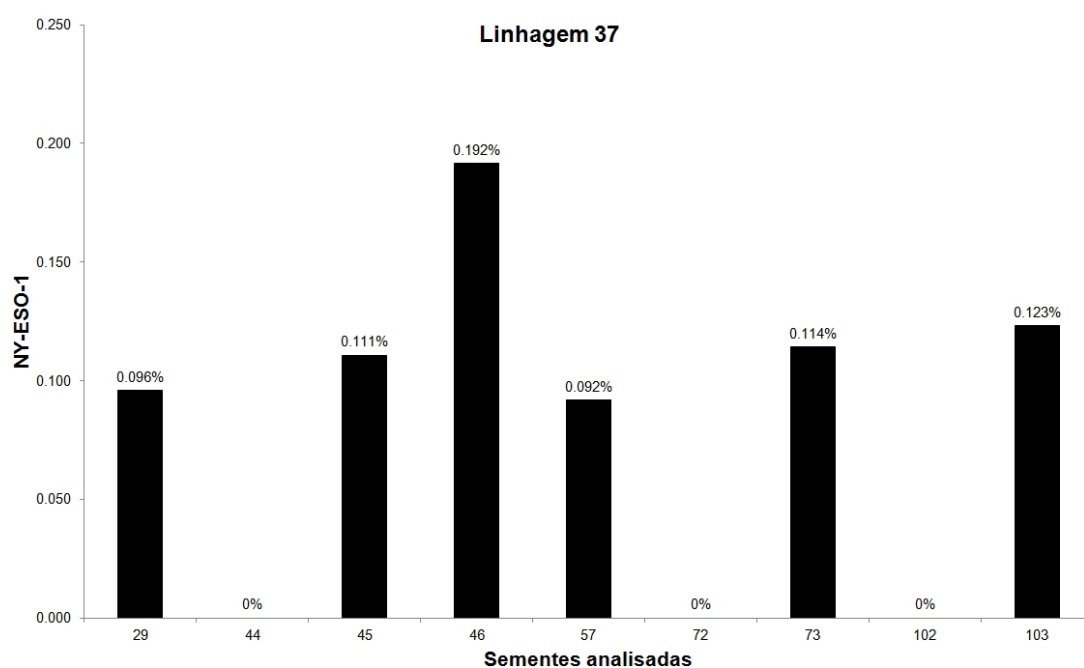
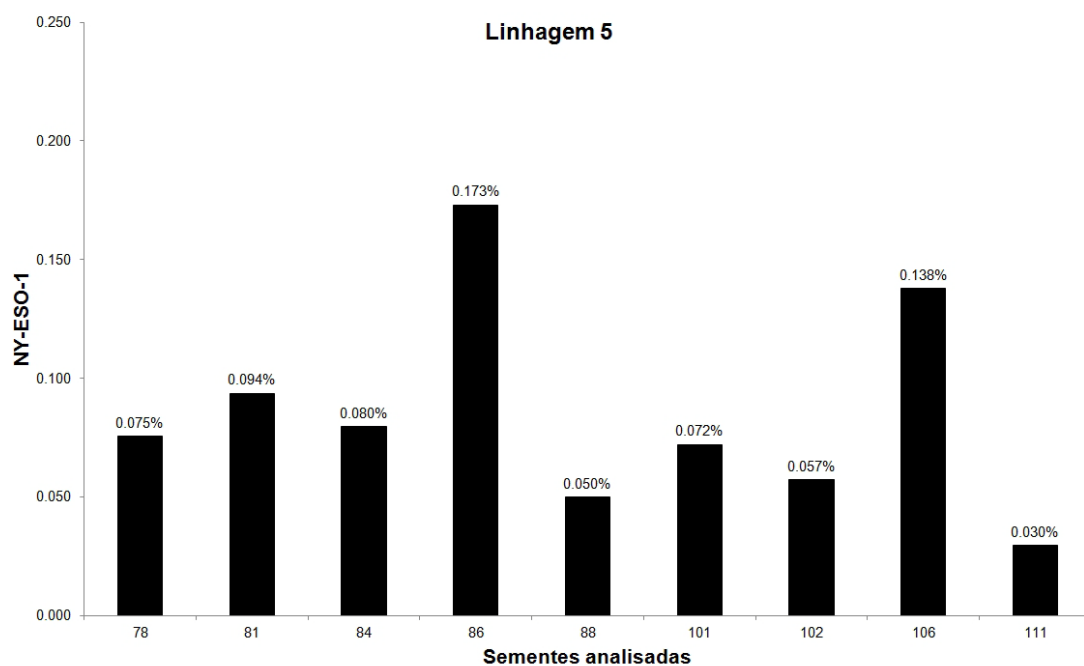
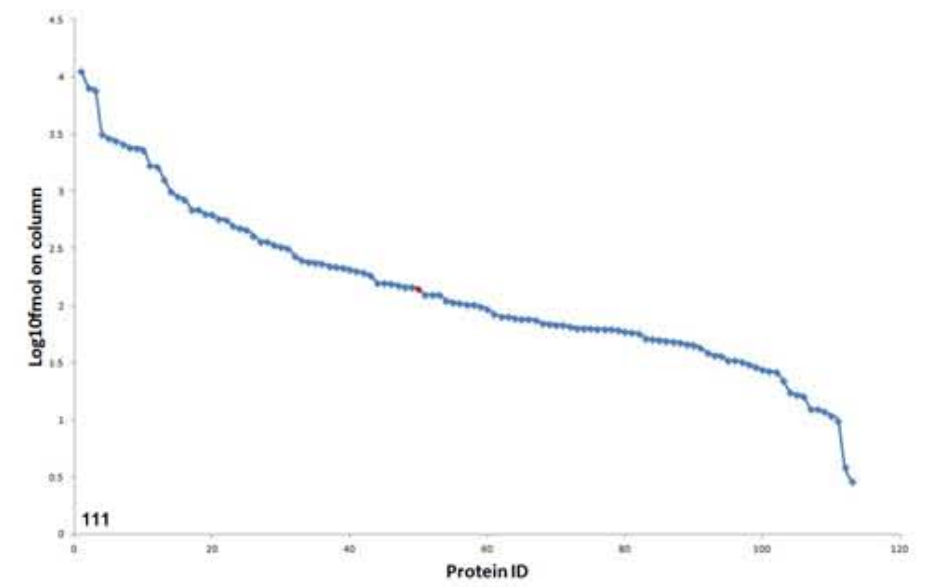
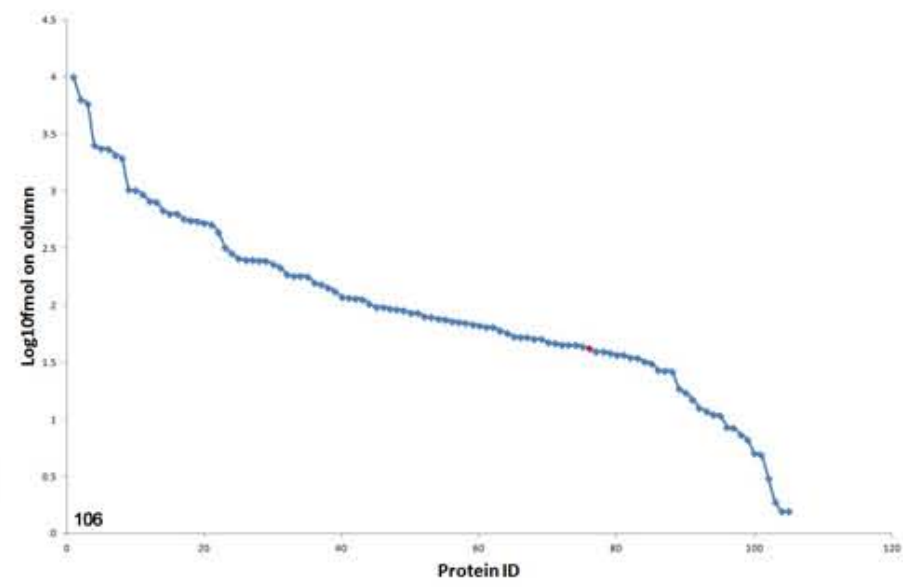
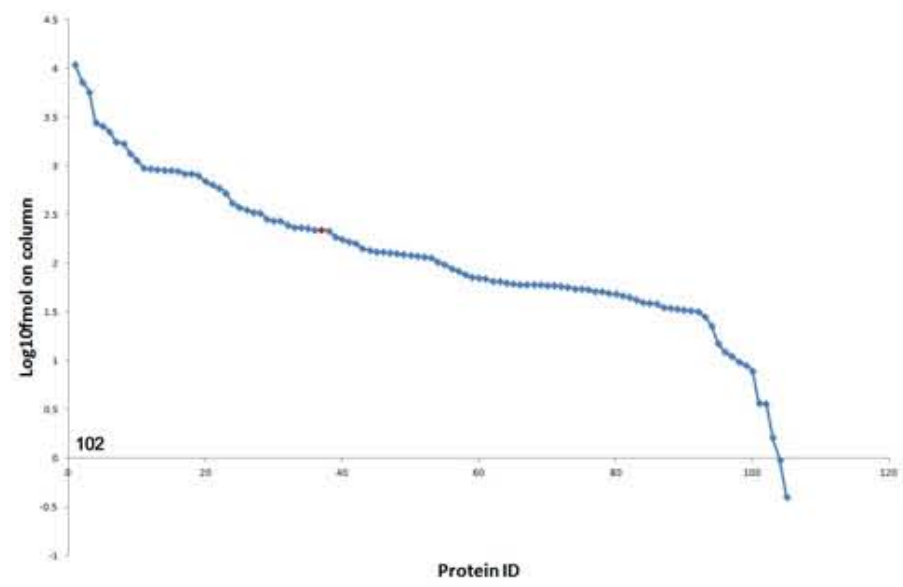
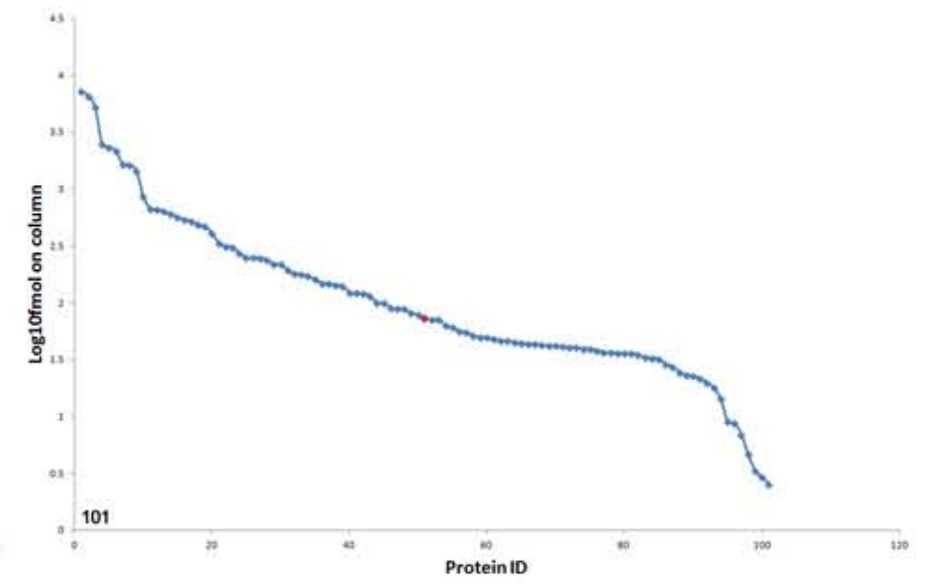
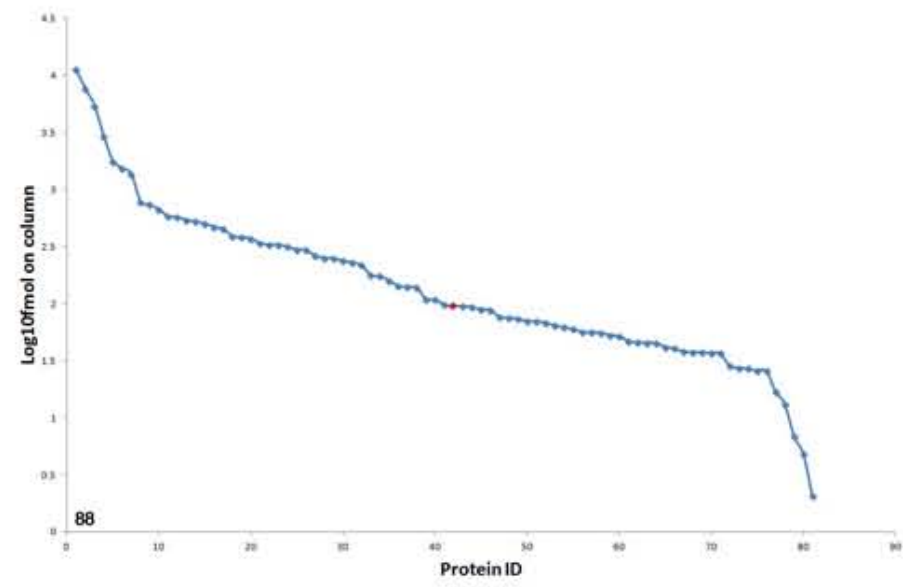
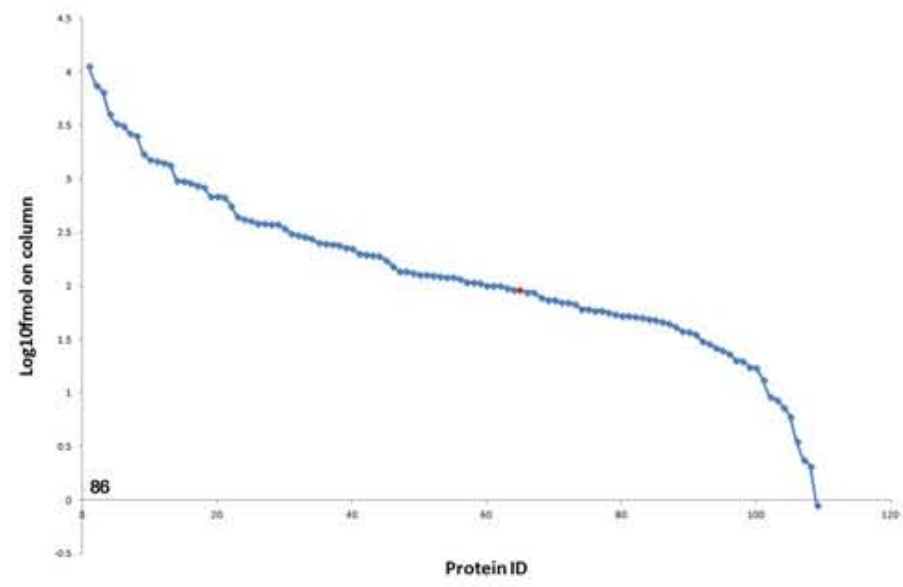
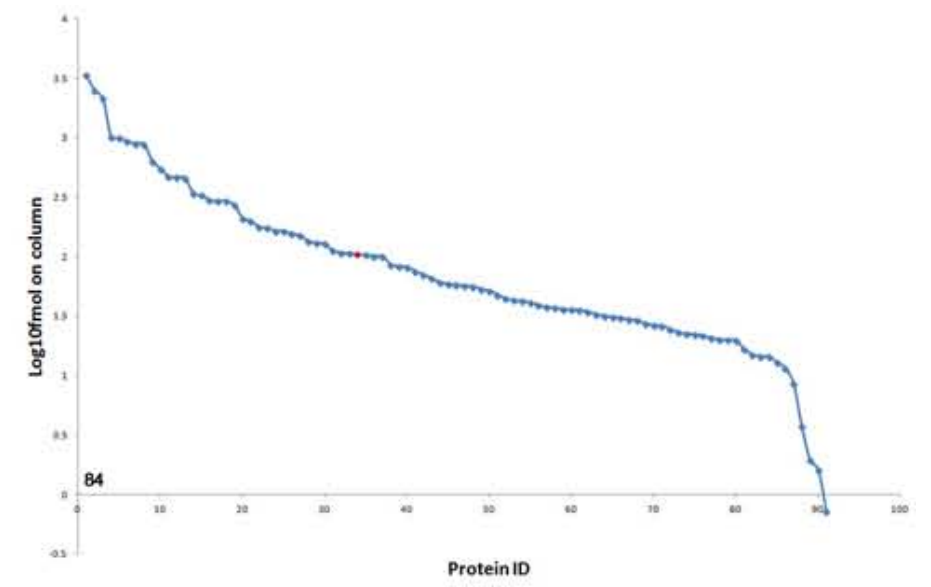
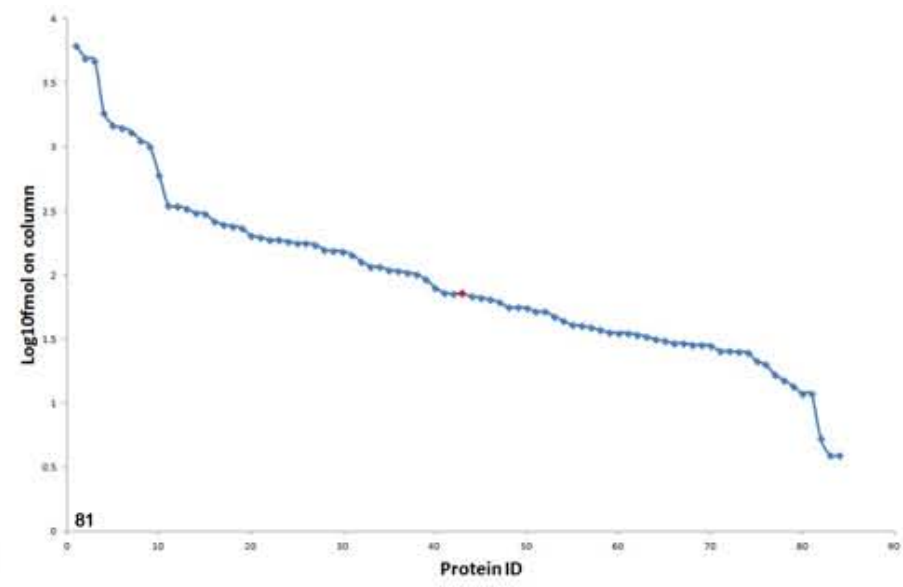
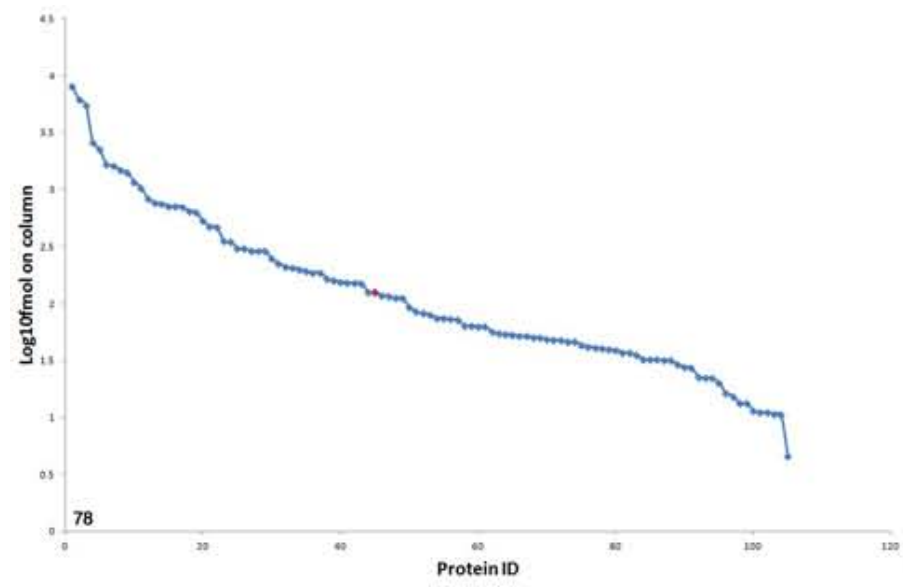
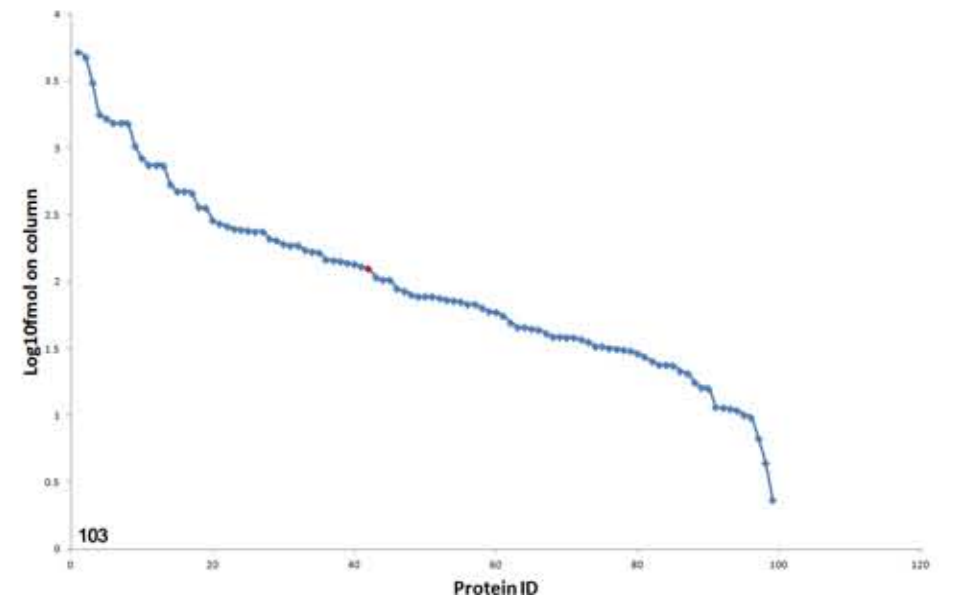
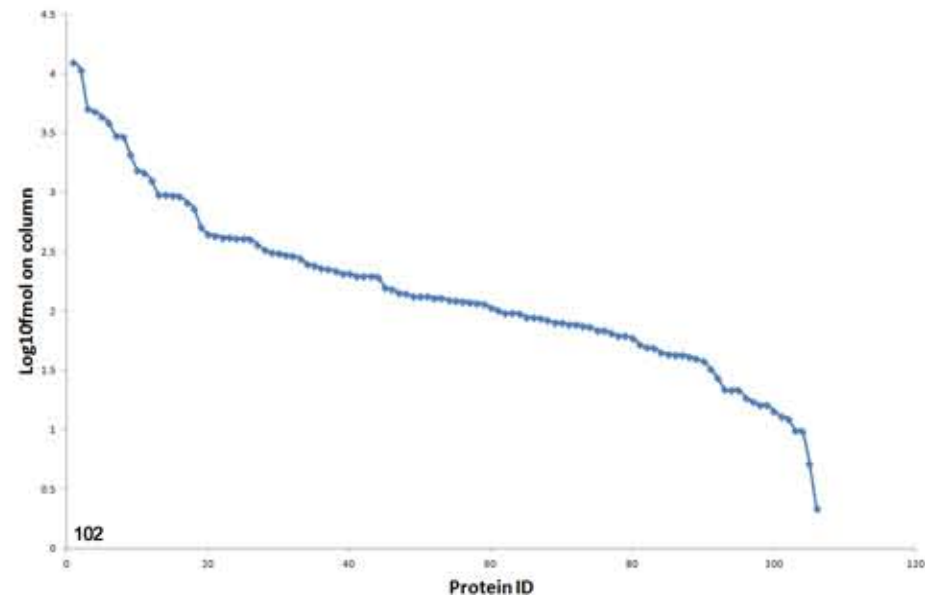
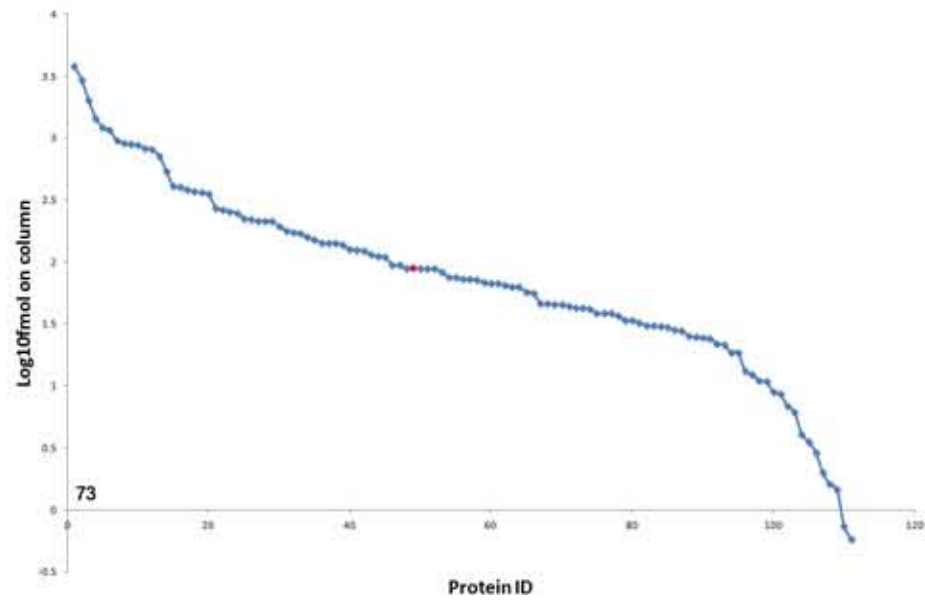
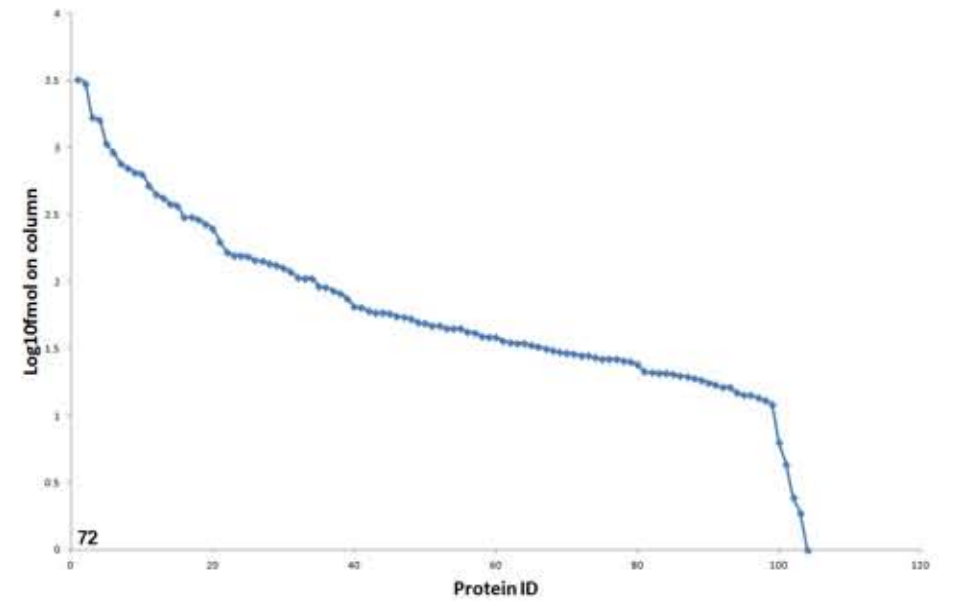
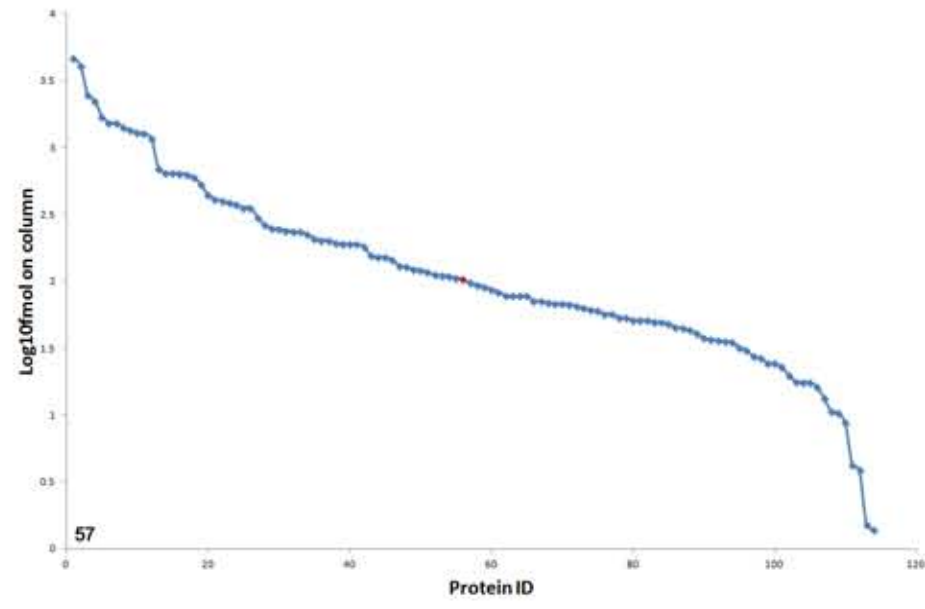
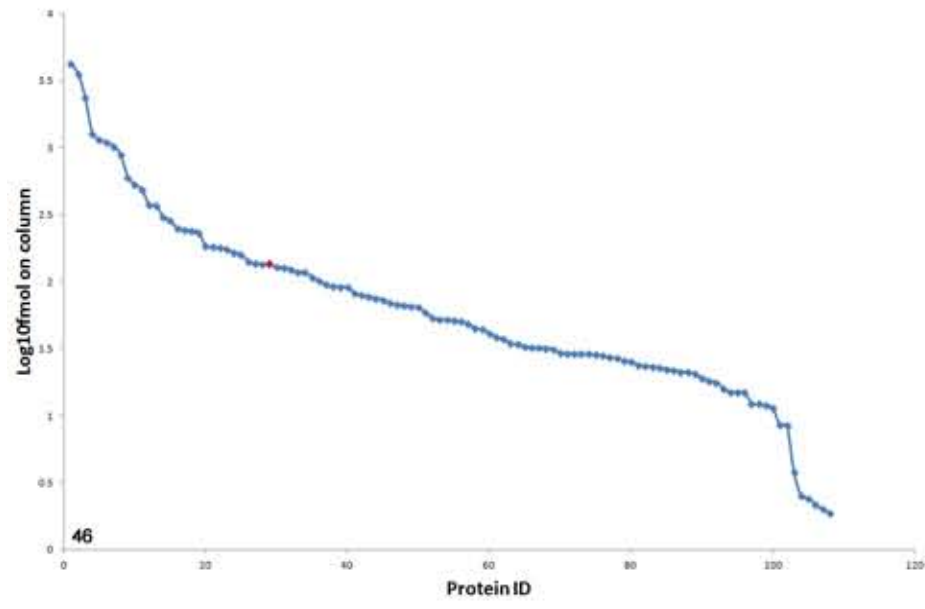
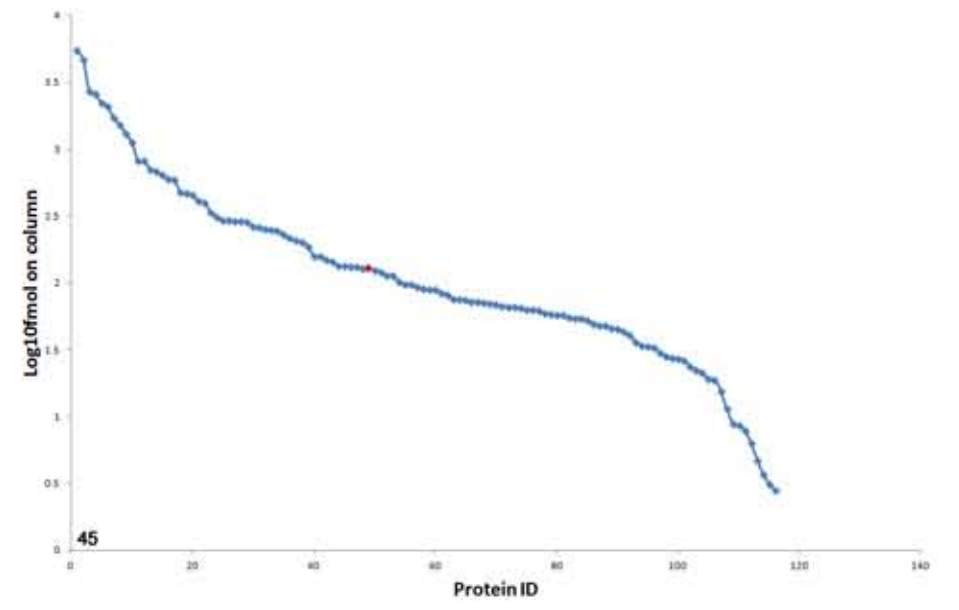
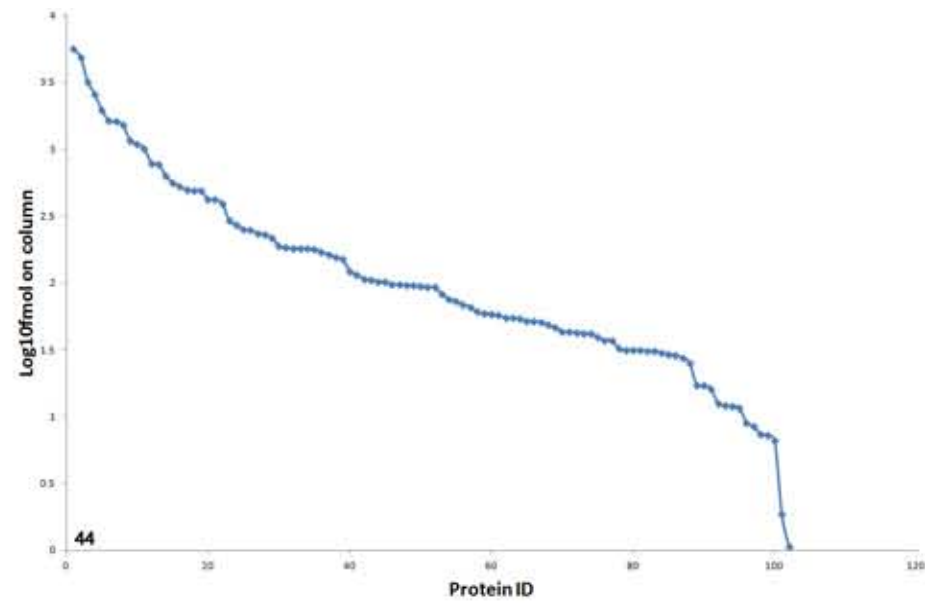
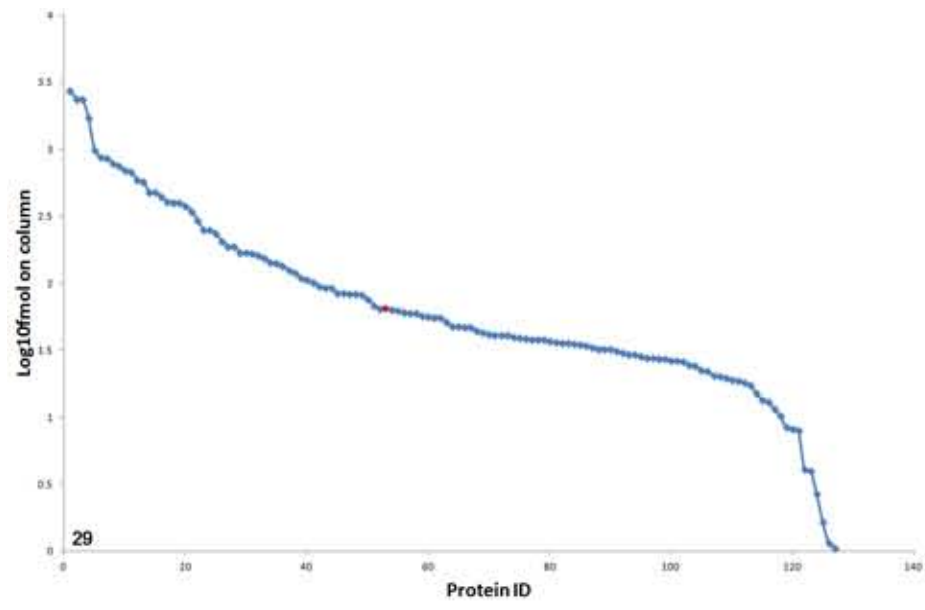


Figura 13: Concentração de NY-ESO-1 nas sementes analisadas com relação ao conteúdo total de PTS para as Linhagens 5 e 37.

Figura 14: Proteínas identificadas para cada semente analisada da Linhagem 5. No eixo Y, o logaritmo natural de suas respectivas concentrações (em fentomoles) durante o momento da retenção na coluna cromatográfica (*Log10fmol on column*). Os quadrados azuis representam proteínas constitutivas, enquanto os quadrados vermelhos representam a proteína de interesse, NY-ESO-1. Os números no canto inferior esquerdo do eixo X correspondem à identificação da amostra analisada.

Figura 15: Proteínas identificadas para cada semente analisada da Linhagem 37. No eixo Y, o logaritmo natural de suas respectivas concentrações (em fentomoles) durante o momento da retenção na coluna cromatográfica (*Log10fmol on column*). Os quadrados azuis representam proteínas constitutivas, enquanto os quadrados vermelhos representam a proteína de interesse, NY-ESO-1. Os números no canto inferior esquerdo do eixo X correspondem à identificação da amostra analisada.





Discussão

A procura por sistemas de expressão de proteínas com alta eficiência e custos reduzidos tem voltado a atenção de cientistas e indústrias para o uso de plantas como uma opção viável. A utilização de plantas como biofábricas vem sendo ilustrada por diversos produtos recombinantes já em fase de testes clínicos (Gleba et al., 2005). Existem diversas vantagens oferecidas pelas plantas para a produção de proteínas recombinantes como o potencial para alta capacidade de produção a um custo reduzido e a ausência de patógenos capazes de infectar o homem ou animais e que poderiam contaminar o produto final.

NY-ESO-1 é um ACT altamente imunogênico que vem sendo utilizado pela *Cancer Vaccine Collaborative Initiative* (em português, Iniciativa Colaborativa de Vacina para o Câncer) para programas de testes clínicos que comparam a eficiência da resposta imune gerada por peptídeos, proteína integral, vetores virais e bacterianos e vetores de DNA no câncer. Tanto a formulação da vacina como a caracterização imunológica detalhada deste antígeno requerem quantidades consideráveis da proteína purificada. Os esforços para a produção desta proteína em sistemas de expressão eucarióticos nas duas últimas décadas não obtiveram sucesso, e o material isolado a partir dos corpos de inclusão obtidos como misturas protéicas complexas limitou seu uso terapêutico em larga escala (Piatesi et al., 2006)

Levando em consideração as vantagens e desvantagens da produção de proteínas recombinantes em folhas e em sementes, foi proposta neste trabalho a utilização de ambos os sistemas para a produção de NY-ESO-1. Como em folhas o direcionamento da proteína pode ser crucial para a estabilidade e consequente acúmulo da mesma, foram elaboradas três estratégias: direcionamento para o retículo endoplasmático, por ser um ambiente rico em chaperonas, porém pobre em proteases (Bruyns et al., 1996; Fischer et al., 2004); para o apoplasto, do qual a purificação é bastante simples, caso bons níveis de acúmulo sejam alcançados (Sexton et al.,

2006); e para o cloroplasto, para verificar o comportamento e os níveis de expressão de NY-ESO-1 nesta organela, uma vez que plantas transplastômicas tendem a apresentar altos níveis de expressão e algumas vantagens no processamento das proteínas recombinantes (Day & Goldschmidt-Clermont, 2011; Maliga, 2012). Já que o objetivo era a comparação de diferentes construções, foi escolhido o sistema de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* por agroinfiltração. Para transformação estável de *N. tabacum* foi utilizada uma construção sem peptídeo sinal, a fim de avaliar o comportamento da proteína.

Embora não fosse possível detectar a proteína recombinante nas folhas, experimentos de western blot mostraram forte sinal nos extratos protéicos obtidos a partir das sementes produzidas pelas plantas estavelmente transformadas; as bandas obtidas, no entanto, apresentavam massa molecular aparente muito superior àquela de NY-ESO-1 (cerca de 60 kDa) e correspondiam à ligação inespecífica do anticorpo, uma vez que sementes de plantas não transformadas e até mesmo sementes transformadas com outros genes apresentavam os mesmos resultados.

A expressão transiente de NY-ESO-1 em folhas de *N. benthamiana* teve como objetivos principais a comparação entre diferentes tipos de endereçamento subcelular, a fim de detectar o local de maior acúmulo da proteína, e a obtenção de material para o desenvolvimento de testes de procedimentos de purificação. As construções utilizando tanto o vetor pCambia quanto o vetor PVX, assim como aquelas de sementes de *N. tabacum*, apresentaram banda visível com massa molecular aparente bem mais elevada que o esperado, diferentemente da proteína gerada em sementes de soja, que apresentou massa aparente esperada (18 kDa). As análises de espectrometria de massa, porém, não permitiram a identificação de NY-ESO-1 nas amostras de tabaco, confirmando a inespecificidade detectada nos experimentos de western blot.

Para a expressão em sementes de soja, foi utilizado o gene CTAG-1B fusionado ao peptídeo-sinal da β -conglícinina α' , sob o controle transcricional do

promotor semente-específico da β -conglucina, com o objetivo de acumular NY-ESO-1 nos corpos protéicos da semente. A proteína de interesse foi identificada tanto por western blot quanto por espectrometria de massas nas amostras analisadas, com níveis de acúmulo que oscilaram entre 0,03% e 0,192% da PST, dependendo da semente. Durante o processo de identificação de NY-ESO-1 por espectrometria de massas, foi possível reconhecer até 8 peptídeos tripticos (Figura 10), o que corresponde a uma cobertura de 68,9% da sequência da proteína. A digestão teórica da mesma prevê 11 fragmentos peptídicos gerados pela tripsina. Não foram reveladas modificações pós-traducionais relevantes que pudessem interferir na função da proteína.

Murad e colaboradores (2011) apresentaram em seu estudo uma metodologia para a análise proteômica de misturas complexas, onde o modelo utilizado corresponde a sementes de soja expressando NY-ESO-1 de uma das linhagens geradas e descritas no presente trabalho. A sequência de aminoácidos de NY-ESO-1 e seus peptídeos detectados podem ser observados na Figura 16, enquanto a Figura 17 mostra o espectro MS^E da dupla carga do fragmento de NY-ESO-1 ($[M + 2H]^+ = 857.87$) e seu respectivo espectro processado pelo programa PGLS. Cinco peptídeos de NY-ESO-1 foram detectados nesse estudo com alta especificidade e seletividade sem apresentar traços de modificações pós-traducionais. O nível de expressão detectado foi de 0,1%.

MQAEGRGTGG	STGDADGPGG	PGIPDGPGGM	AGGPGEAGAT	GGRGPRGAGA
ARASGPGGGA	PRGPHGGAAS	GLNGCCRCGA	RGPEsrLLEF	YLAMPFATPM
EAEIARRSLA	QDAPPLPVPG	VLLKEFTVSG	NILTIRLTAA	DHRQLQLSIS
SCLQLSLLM	WITQCFLPVF	LAQPPSGQRR		

Figura 16: Sequência de NY-ESO-1. As áreas coloridas correspondem aos 6 peptídeos detectados (Murad et al., 2011).

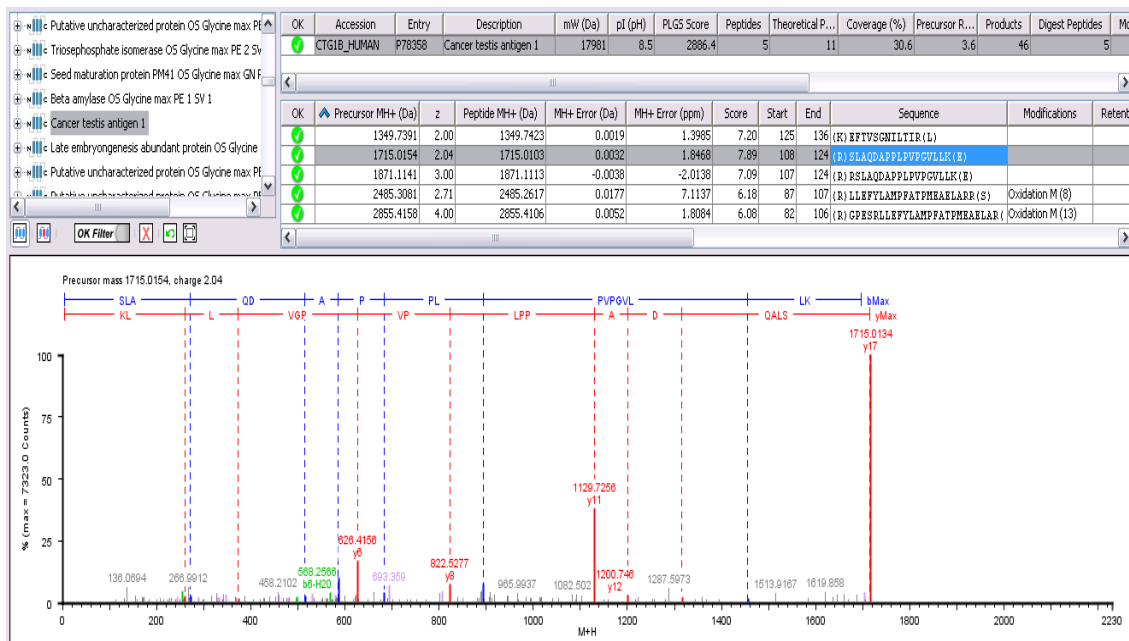


Figura 17: Espectro MS^E da dupla carga do fragmento de NY-ESO-1 [M + 2H]⁺2 = 858.00 e seu respectivo espectro processado pelo *software* PGLS (Murad et al., 2011).

As análises apresentadas no trabalho anterior utilizaram uma configuração antiga do espectrômetro de massas, com separação cromatográfica em apenas uma dimensão. A separação cromatográfica bidimensional permite maior acurácia na quantificação das proteínas identificadas, tornando os dados ainda mais robustos.

A Linhagem 37, genitora das sementes com maiores níveis de expressão, apresentou 3 (dentre 9) sementes que, apesar de conterem o gene CTAG-1B, não acusaram qualquer expressão de NY-ESO-1 nas análises de espectrometria de massas. Tal fato pode ser resultante do padrão de integração do transgene e/ou a possibilidade de as plantas transgênicas serem quimeras, situação que pode ser detectada principalmente quando se utilizam métodos diretos de transformação, implicando em análises de segregação complexas.

O sistema de expressão heteróloga de NY-ESO-1 mais bem estabelecido utiliza *E. coli* como biofábrica, com o auxílio de cauda de histidina (*His6-tag*) para a recuperação do antígeno (Murphy et al., 2005; Schnurr et al., 2005; Gnjatic et al.,

2006); nesse sistema, é necessária a realização de remoção de toxinas bacterianas para que a proteína possa então ser utilizada em testes clínicos. Batt e colaboradores (2011) afirmam ter obtido um rendimento de 3.4 gramas de NY-ESO-1 recombinante a partir do crescimento de 20 litros de *E. coli* C41DE3 em fermentador, utilizando o promotor T-7. A literatura reporta, ainda, a produção de NY-ESO-1 recombinante em levedura. Este sistema apresentou algumas dificuldades, como a presença de cluster de cisteína (CCRC) na posição 75-78, que pode causar problemas de dobramento ou mesmo de toxicidade para as células de *Saccharomyces cerevisiae*, o que costuma resultar em baixa expressão; porém, ao se realizar uma mutação na sequência da proteína, os índices de expressão foram aumentados em cerca de cem vezes (Piatesi et al., 2006).

Embora a utilização de fragmentos de NY-ESO-1 também seja possível, o reconhecimento e posterior resposta imunológica são dependentes da presença de HLA-A2, o que não é uma característica comum a todos os pacientes (Gnjatic et al., 2006). Dessa forma, a expressão da proteína integral é altamente desejável.

Além da identificação de NY-ESO-1, os dados de NanoUPLC-HDMS^E gerados pelo processamento no software PLGS mostram a listagem de proteínas identificadas, e as diferenças de expressão entre as duas linhagens analisadas (Tabela Suplementar 1), bem como as proteínas exclusivas de cada linhagem (Tabelas Suplementares 2 e 3). A literatura reporta que modificações genéticas são capazes de modificar o perfil proteômico das sementes de soja (Foyer & Noctor, 2005; Kim et al., 2006; Sussulini et al., 2007; Brandão et al., 2010; Mataveli et al., 2010). Embora existam divergências na identificação de algumas proteínas com importante função, essas pequenas variações não implicam em mal funcionamento celular ou qualquer tipo de anomalia, e podem estar relacionadas à presença de diferentes isoformas oriundas da variabilidade genética que ocorre naturalmente na espécie, indicando que a expressão de NY-ESO-1 não traz danos à planta hospedeira.

Conclusões

O uso de plantas como biofábricas apresenta diversas vantagens em relação a sistemas convencionais de produção de proteínas recombinantes; o custo reduzido e a capacidade de aumento da produção são alguns destes fatores que fazem este sistema particularmente atrativo. No entanto, algumas limitações ainda precisam ser contornadas para que este sistema venha a ser viabilizado para a produção de qualquer proteína.

Este trabalho mostra que a expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* e a expressão estável em *N. tabacum* não resultaram no acúmulo do antígeno; ambas as espécies possuem uma molécula desconhecida que apresenta ligação inespecífica ao anticorpo monoclonal, diminuindo a viabilidade do sistema. A produção do antígeno NY-ESO-1 na sua forma íntegra e livre de *tags* de purificação em sementes de soja se mostrou possível e atingiu nível de acúmulo médio de 0,079% para a Linhagem 5 e 0,070% para a Linhagem 37, o que representa um passo de extrema importância para a obtenção de um sistema de produção heterólogo estável e de baixo custo para a proteína em questão. Para que a viabilidade da produção de NY-ESO-1 seja confirmada, serão necessários ensaios de função *in vitro* utilizando a proteína recombinante, que deverão ser realizados por laboratório parceiro do Ludwig Institute for Cancer Research. O desenvolvimento de uma estratégia de purificação também será de grande importância para essa confirmação. Quando da obtenção da linhagem homozigota, será possível a produção de sementes expressando NY-ESO-1 em quantidades suficientes para suprir a demanda para realização de testes clínicos. É importante ressaltar que este antígeno é de difícil purificação, e não há relatos de procedimentos para isolá-lo completamente sem o auxílio de caudas de poli-histidina, o que torna a NY-ESO-1 proveniente deste estudo pioneira dentre as NY-ESO-1 recombinantes.

Referências Bibliográficas

- Abud S, de Souza PIM, Vianna GR, Leonardecz E, Moreira CT, Faleiro FG, Júnior JN, Monteiro PMFO, Rech EL, Aragão FJL** (2007) Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil. *Genetics and molecular research: GMR* **6**: 445–52
- Abud S, Souza PIM, Moreira CT, Andrade SRM, Ulbrich A V, Vianna GR, Rech EL, Aragão FJL** (2003) Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**: 1229–1235
- Acevedo HF, Tong JY, Hartsock RJ** (1995) Human chorionic gonadotropin-beta subunit gene expression in cultured human fetal and cancer cells of different types and origins. *Cancer* **76**: 1467–1475
- Anderson PM, Leonard AS, Ochoa AC, Loeffler C** (1997) Liposome Immunoadjuvants Containing IL-2.
- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL** (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* **93-93**: 142–150
- Baia GS, Caballero OL, Ho JSY, Zhao Q, Cohen T, Binder ZA, Salmasi V, Gallia GL, Quinones-Hinojosa A, Olivi A, et al** (2013) NY-ESO-1 expression in meningioma suggests a rationale for new immunotherapeutic approaches. *Cancer Immunology Research*. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0029
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM** (1986) The expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* **6**: 347–357
- Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P** (1995) BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* **2**: 167–75
- Boon ME** (1991) Can we do without mass cervical screening? *Cytopathology*. official journal of the British Society for Clinical Cytology **2**: 57–60
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B** (1997) Tumor antigens recognized by T cells. *Immunology Today* **18**: 267–268
- Brandão AR, Barbosa HS, Arruda MAZ** (2010) Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of proteomics* **73**: 1433–40
- Brasil** (2011) Resolução - RDC No - 49, de setembro de 2011. 690
- Brasileiro ACM, Carneiro VT de C, eds** (1998) Manual de Transformação Genética de Plantas. 309

- Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethé B, Carrel S, Arienti F, Suter L, Vanwijck R, Bourlond A, Humblet Y** (1995) Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **63**: 375–80
- Broz A, Huang N, Unruh G** (2013) Plant-Based Protein Biomanufacturing. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **33**: 32–33
- Bruyns AM, De Jaeger G, De Neve M, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A** (1996) Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS letters* **386**: 5–10
- Burnet M** (1957) Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British medical journal* **1**: 779–86
- Caballero OL, Chen Y-T** (2009) Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer science* **100**: 2014–21
- Castanheira LG, Barbano DBA, Rech N** (2011) Current development in regulation of similar biotherapeutic products in Brazil. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* **39**: 308–11
- Castro OM de, Prado H do, Severo ACR, Cardoso EJBN** (1993) Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Scientia Agricola* **50**: 212–219
- Chen Q, Jackson H, Parente P, Luke T, Rizkalla M, Tai TY, Zhu H-C, Mifsud NA, Dimopoulos N, Masterman K-A, et al** (2004) Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9363–8
- Chen Y-T, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ** (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1914–8
- Clough RC, Pappu K, Thompson K, Beifuss K, Lane J, Delaney DE, Harkey R, Drees C, Howard JA, Hood EE** (2006) Manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is enzymatically active and accumulates to high levels in transgenic maize seed. *Plant biotechnology journal* **4**: 53–62
- Cunha NB, Murad AM, Cipriano TM, Araújo ACG, Aragão FJL, Leite A, Vianna GR, McPhee TR, Souza GHMF, Waters MJ, et al** (2011) Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic research* **20**: 811–26
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K** (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* **6**: 219–226
- Day A, Goldschmidt-Clermont M** (2011) The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant biotechnology journal* **9**: 540–53

- Denbow DM, Grabau EA, Lacy GH, Kornegay ET, Russell DR, Umbeck PF** (1998) Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poultry science* **77**: 878–81
- DeVita Jr, Vincent T., Theodore S. Lawrence and SAR, ed** (2011) *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 2800
- Ding S-H, Huang L-Y, Wang Y-D, Sun H-C, Xiang Z-H** (2006) High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnology letters* **28**: 869–75
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**: 1349–1349
- Ehrlich P** (1909) On the present state of chemotherapy. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **42**: 17–47
- Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T** (1995) A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *The Journal of experimental medicine* **182**: 689–98
- Fernández-San Millán A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H** (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant biotechnology journal* **1**: 71–9
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM** (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology* **7**: 152–8
- Fox JL** (2012) First plant-made biologic approved. *Nature Biotechnology* **30**: 472–472
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant cell* **17**: 1866–75
- Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Takahashi T, Fujita J, Hirao T, Shibata K, Makari Y, Iijima S, et al** (2013) NY-ESO-1 antibody as a novel tumour marker of gastric cancer. *British journal of cancer* **108**: 1119–25
- Geromanos SJ, Vissers JPC, Silva JC, Dorschel CA, Li G-Z, Gorenstein M V, Bateman RH, Langridge JI** (2009) The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **9**: 1683–95
- Giles K, Wildgoose JL, Langridge DJ, Campuzano I** (2010) A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide. *International Journal of Mass Spectrometry* **298**: 10–16
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S** (2005) Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **23**: 2042–8

- Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Chen Y-T, Old LJ** (2006) NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Advances in cancer research* **95**: 1–30
- Goldenberg DM, Griffiths GL, Hansen HJ** (1999) Detection and therapy of lesions with biotin/avidin-metal chelating protein conjugates.
- Goydos JS, Patel M, Shih W** (2001) NY-ESO-1 and CTP11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *The Journal of surgical research* **98**: 76–80
- Gurchot C** (1975) The Trophoblast Theory of Cancer (John Beard, 1857–1924) Revisited. *Oncology* **31**: 310–333
- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, Ritter G, Simpson AJG, Chen Y-T, Old LJ, et al** (2005) Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 8055–62
- Herr JC, Mandal A, Frierson Jr. HF** (2009) Diagnostic Markers for Cancer.
- Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, Seliger B, Abken H** (2001) Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **167**: 6123–31
- Hood EE, Kusnadi A, Nikolov Z, Howard JA** (1999) Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. *Advances in experimental medicine and biology* **464**: 127–47
- Hood EE, Woodard SL, Horn ME** (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants - myths and realities. *Current opinion in biotechnology* **13**: 630–5
- Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C** (2003) Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate medical journal* **79**: 672–80
- Hu Y, Cheng SC-S, Chan K-T, Ke Y, Xue B, Sin FW-Y, Zeng C, Xie Y** (2010) Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **392**: 329–34
- INCA** (2011) Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. 118
- Iowa State University** (1993) The National Corn Handbook. <http://corn.agronomy.wisc.edu/Management/NCH.aspx>
- Jäger E, Karbach J, Gnjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, Ayyoub M, Ritter E, Ritter G, Jäger D, et al** (2006) Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses

in cancer patients. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**: 14453–8

Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old LJ (2001) Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7. International journal of cancer Journal international du cancer **94**: 252–6

Kaech SM, Ahmed R (2003) Immunology. CD8 T cells remember with a little help. Science (New York, NY) **300**: 263–5

Kantolic AG, Slafer GA (2007) Development and seed number in indeterminate soybean as affected by timing and duration of exposure to long photoperiods after flowering. Annals of botany **99**: 925–33

Kermode A (2012) Seed Expression Systems for Molecular Farming. In A Wang, S Ma, eds, Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects SE - 5. Springer Netherlands, pp 89–123

Khong HT, Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. Nature immunology **3**: 999–1005

Kim YH, Choi SJ, Lee HA, Moon TW (2006) Quantitation of CP4 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase in Soybean by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. Journal of Microbiology and Biotechnology v. 16(1) p:

Krishnan HB (2001) Biochemistry and Molecular Biology of Soybean Seed Storage Proteins. Journal of New Seeds **2**: 1–25

Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T, et al (2001) NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. Cancer research **61**: 4671–4

Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nikolov ZL (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. Biotechnology progress **14**: 149–55

Lacorte C (2006) Improving and assessing viral vectors for recombinant protein production in plants. s.n.], [S.I.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680–5

Lamphear B (2002) Delivery of subunit vaccines in maize seed. Journal of Controlled Release **85**: 169–180

Lau OS, Sun SSM (2009) Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. Biotechnology advances **27**: 1015–22

Lee L, Wang RF, Wang X, Mixon A, Johnson BE, Rosenberg SA, Schrupp DS (1999) NY-ESO-1 may be a potential target for lung cancer immunotherapy. The cancer journal from Scientific American **5**: 20–5

- Li M, Yuan Y-H, Han Y, Liu Y-X, Yan L, Wang Y, Gu J** (2005) Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 1809–14
- Louhimo J, Alfthan H, Stenman U-H, Haglund C** (2004) Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer. *Oncology* **66**: 126–31
- Lowe AJ, Bardliving CL, Huang C-J, Teixeira LM, Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Old LJ, Batt CA** (2011) Expression and purification of cGMP grade NY-ESO-1 for clinical trials. *Biotechnology progress* **27**: 435–41
- Ma JK-C, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, et al** (2005a) Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO reports* **6**: 593–9
- Ma JK-C, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman RM** (2005b) Plant-derived pharmaceuticals - the road forward. *Trends in plant science* **10**: 580–5
- Ma JK-C, Drake PMW, Christou P** (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews Genetics* **4**: 794–805
- Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R** (2006) Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology. official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**: 5060–9
- Madeira L, Borschiver S, Pereira Jr N** (2011) Identificação de Biofármacos para Produção no Brasil. 3ra. Conferencia Iberoamericana de Ingeniería e Innovación Tecnológica. Décima Conferencia Iberoamericana en Sistemas, Cibernética e Informática. IIS Copyright Manage, Winter Garden - Florida/ USA, pp 321–326
- Maliga P** (2012) Plastid Transformation in Flowering Plants. *In* R Bock, V Knoop, eds, *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria SE* - 17. Springer Netherlands, pp 393–414
- Mataveli LRV, Pohl P, Mounicou S, Arruda MAZ, Szpunar J** (2010) A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Metallomics* **2**: 800
- Menassa R, Ahmad A, Joensuu J** (2012) Transient Expression Using Agroinfiltration and Its Applications in Molecular Farming. *In* A Wang, S Ma, eds, *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects SE* - 9. Springer Netherlands, pp 183–198
- Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J** (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* **2**: 141–53

- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T** (2007) Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* **25**: 1647–57
- Müntz K, Christov V, Saalbach G, Saalbach I, Waddell D, Pickardt T, Schieder O, Wüstenhagen T** (1998) Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Die Nahrung* **42**: 125–7
- Murad AM, Souza GHMF, Garcia JS, Rech EL** (2011) Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). *Journal of separation science* **34**: 2618–30
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497
- Murphy R, Green S, Ritter G, Cohen L, Ryan D, Woods W, Rubira M, Cebon J, Davis ID, Sjolander A, et al** (2005) Recombinant NY-ESO-1 cancer antigen: production and purification under cGMP conditions. *Preparative biochemistry & biotechnology* **35**: 119–34
- Nicholaou T, Ebert L, Davis ID, Robson N, Klein O, Maraskovsky E, Chen W, Cebon J** (2006) Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1. *Immunology and cell biology* **84**: 303–17
- Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, et al** (2007) Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 10986–91
- Odunsi K, Jungbluth AA, Stockert E, Qian F, Gnjatic S, Tammela J, Intengan M, Beck A, Keitz B, Santiago D, et al** (2003) NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer research* **63**: 6076–83
- Old LJ** (2001) Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer immunity* **1**: 1
- Osborne R** (2013) Fresh from the biotech pipeline--2012. *Nature biotechnology* **31**: 100–3
- Piatesi A, Howland SW, Rakestraw JA, Renner C, Robson N, Cebon J, Maraskovsky E, Ritter G, Old L, Wittrup KD** (2006) Directed evolution for improved secretion of cancer-testis antigen NY-ESO-1 from yeast. *Protein expression and purification* **48**: 232–42
- Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL** (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature protocols* **3**: 410–8
- Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, Chen Y-T, Collini P, Ranzani T, Lombardo C, Dalerba P, Rivoltini L, Arienti F, et al** (2003) Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer research* **63**: 6948–55

- Rondon R, Martins D** (2013) Portal da Saúde. Brasil amplia produção de medicamentos biológicos, <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/11454/162/brasil-amplia-producao-de-medicamentos-biologicos.html>
- Ross MT, Grafham D V, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, et al** (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**: 325–37
- Rybicki EP** (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant biotechnology journal* **8**: 620–37
- Satie A-P, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Henno S, Olivo L, Jacobsen GK, Rioux-Leclercq N, Jégou B, Samson M** (2002) The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **82**: 775–80
- Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen Y-T** (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunological reviews* **188**: 22–32
- Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ** (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer immunity* **4**: 1
- Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis ID, et al** (2005) Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* **105**: 2465–72
- Schünmann PHD, Coia G, Waterhouse PM** (2002) Biopharming the SimpliRED™ HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Molecular Breeding* **9**: 113–121
- Schuster M, Nechansky A, Kircheis R** (2006) Cancer immunotherapy. *Biotechnology journal* **1**: 138–47
- Sexton A, Drake PM, Mahmood N, Harman SJ, Shattock RJ, Ma JK-C** (2006) Transgenic plant production of Cyanovirin-N, an HIV microbicide. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**: 356–8
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, et al** (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant biotechnology journal* **5**: 579–90
- Sharma KK, Bhatnagar-Mathur P, Thorpe TA** (2005) Genetic transformation technology: Status and problems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **41**: 102–112
- Sharma P, Gnjjatic S, Jungbluth AA, Williamson B, Herr H, Stockert E, Dalbagni G, Donat SM, Reuter VE, Santiago D, et al** (2003) Frequency of NY-ESO-1 and

LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer immunity* **3**: 19

Sheridan C (2010) Fresh from the biologic pipeline-2009. *Nature biotechnology* **28**: 307–10

Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews Cancer* **5**: 615–25

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, et al (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature biotechnology* **18**: 333–8

Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ (1998) A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* **187**: 1349–54

Stöger E, Sack M, Perrin Y, Vaquero C, Torres E, Twyman RM, Christou P, Fischer R (2002) Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding* **9**: 149–158

Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, et al (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant molecular biology* **42**: 583–90

Streatfield SJ (2006) Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods (San Diego, Calif)* **38**: 150–7

Suri A, Saini S, Sinha A, Agarwal S, Verma A, Parashar D, Singh S, Gupta N, Jagadish N (2012) Cancer testis antigens: A new paradigm for cancer therapy. *Oncoimmunology* **1**: 1194–1196

Sussulini A, Souza GHMF, Eberlin MN, Arruda MAZ (2007) Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **22**: 1501

Takagi H, Saito S, Yang L, Nagasaka S, Nishizawa N, Takaiwa F (2005) Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant biotechnology journal* **3**: 521–33

Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, et al (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic acids research* **31**: 1174–9

Twyman R, Schillberg S, Fischer R (2012) The Production of Vaccines and Therapeutic Antibodies in Plants. *In* A Wang, S Ma, eds, *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects* SE - 7. Springer Netherlands, pp 145–159

Twyman RM, Schillberg S, Fischer R (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert opinion on emerging drugs* **10**: 185–218

- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R** (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**: 570–578
- União Nacional Contra o Câncer** (2006) TNM: classificação de tumores malignos, 6^a ed. 254
- Vainio H, Wilbourn J** (1993) Cancer Etiology: Agents Causally Associated with Human Cancer. *Pharmacology & Toxicology* **72**: 4–11
- Valmori D, Dutoit V, Liénard D, Rimoldi D, Pittet MJ, Champagne P, Ellefsen K, Sahin U, Speiser D, Lejeune F, et al** (2000) Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer research* **60**: 4499–506
- Wang RF, Johnston SL, Zeng G, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Rosenberg SA** (1998) A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **161**: 3598–606
- Whitehurst AW** (2013) Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140326
- World Health Organization** (2008) *World Cancer Report 2008*. 512
- Xia Q-Y, Liu S, Li F-Q, Huang W-B, Shi L-N, Zhou X-J** (2013) Sperm protein 17, MAGE-C1 and NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma: expression frequency and their correlation with clinical parameters. *Int J Clin Exp Pathol* **6**: 1610–1616
- Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ** (2012) Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology advances* **30**: 1171–84
- Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Cone RA, Whaley KJ** (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature biotechnology* **16**: 1361–4
- Zeng G, Li Y, El-Gamil M, Sidney J, Sette A, Wang R, Rosenberg SA, Robbins PF** (2002) Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T Cells by a Single Peptide with Dual MHC Class I and Class II Specificities: A New Strategy for Vaccine Design. *Cancer Research* **62**: 3630–3635

Tabelas Suplementares

Tabela Suplementar 1 - Identificação e comparação dos níveis de expressão de proteínas das Linhagens 5 e 37, seus respectivos números de acesso (Accession) e o quociente dos critérios preenchidos e estabelecidos no processo de indentificação da proteína (Score). Células realçadas em verde correspondem às proteínas identificadas em maior quantidade (upregulation) na Linhagem 5; células realçadas em vermelho correspondem às proteínas identificadas em maior quantidade na Linhagem 37 (downregulation em relação à Linhagem 5). Células realçadas em cinza e sem realce correspondem à proteínas estatisticamente isentas de diferenças no perfil de expressão. A identificação de NY-ESO-1 pode ser vista realçada em laranja. Ratio: razão dos valores normalizados da concecntração em fentomol calculado; Log(e)Ratio: logaritmo natural de Ratio; Log(e)Var: logaritmo natural da variância; P: Teste de Student.

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6TG05_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	579.44	9.30	2.23	1.27	1
Q9SBA9_SOYBN	Bowman Birk proteinase inhibitor Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	4011.44	7.17	1.97	0.14	1
Q9S9D0_SOYBN	Glycinin G4 subunit OS Glycine max PE 3 SV 1	37863.71	3.39	1.22	0.04	1
C6SX26_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	1918.42	3.13	1.14	0.14	1
C6T689_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	375.17	3.10	1.13	0.92	1
C7EA92_SOYBN	Mutant glycinin subunit A1aB1b OS Glycine max GN Gy1 PE 2 SV 1	56647.54	2.80	1.03	0.03	1
C6TCX5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	970.8	2.61	0.96	0.22	1
P34_SOYBN	P34 probable thiol protease OS Glycine max PE 1 SV 1	915.69	2.48	0.91	0.13	1
C6SX02_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	755.99	2.44	0.89	0.63	1
Q6V7V6_SOYBN	34 kDa maturing seed vacuolar thiol protease Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	986.81	2.25	0.81	0.1	1
GLYG1_SOYBN	Glycinin G1 OS Glycine max GN GY1 PE 1 SV 2	52999.64	2.20	0.79	0.03	1
GLYG2_SOYBN	Glycinin G2 OS Glycine max GN Gy2 PE 1 SV 2	40191.25	2.08	0.73	0.02	1

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
Q549Z4_SOYBN	Proglycinin A2B1 OS Glycine max PE 2 SV 1	40191.25	2.01	0.7	0.01	1
C6T1A6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	507.84	1.95	0.67	0.38	1
GLYG3_SOYBN	Glycinin G3 OS Glycine max GN GY3 PE 3 SV 1	11350.62	1.95	0.67	0.03	1
IBBC2_SOYBN	Bowman Birk type proteinase inhibitor C II OS Glycine max PE 1 SV 2	1918.42	1.95	0.67	0.05	1
C6THP4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	105.78	1.93	0.66	0.09	1
Q7XAW0_SOYBN	Lea protein OS Glycine max GN ZLDE 2 PE 2 SV 1	6385.77	1.93	0.66	0.07	1
Q39858_SOYBN	Soybean glycinin A3 B4 subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	36647.68	1.88	0.63	0.06	1
C6SVF6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	689.23	1.88	0.63	0.32	1
OLEO2_SOYBN	P24 oleosin isoform B OS Glycine max PE 2 SV 1	858.97	1.84	0.61	0.07	1
Q8W171_SOYBN	Cyclophilin OS Glycine max GN Cyp PE 2 SV 1	523.32	1.77	0.57	0.31	1
P93708_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN Gly A3B4 PE 2 SV 1	45456.45	1.75	0.56	0.04	1
Q852U4_SOYBN	Glycinin A1bB2 784 OS Glycine max PE 2 SV 1	11968.05	1.72	0.54	0.04	1
O22120_SOYBN	Alpha subunit of beta conglycinin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 2	129087	1.68	0.52	0.01	1
Q70EL7_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 3 SV 1	5616.7	1.68	0.52	0.07	1
Q84UB3_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit Fragment OS Glycine max GN GM7S PE 2 SV 1	44904.15	1.65	0.5	0.02	1
Q7GC77_SOYBN	Glycinin A3B4 subunit OS Glycine max PE 1 SV 1	45432.64	1.65	0.5	0.02	1

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
Q7M211_GLYSO	Glycinin A3B4 Plasmid pSPGD41 Fragment OS Glycine soja PE 3 SV 1	41620.24	1.65	0.5	0.03	1
Q948X9_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	29575.5	1.63	0.49	0.01	1
Q9FZP9_SOYBN	Alpha subunit of beta conglycinin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	47684.54	1.58	0.46	0.01	1
Q9SB11_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN A5A4B3 PE 2 SV 1	43317.56	1.58	0.46	0.01	1
Q8LJR2_SOYBN	Alcohol dehydrogenase 1 Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	438.73	1.58	0.46	0.05	1
O64458_SOYBN	Gly m Bd 30K allergen OS Glycine max GN P34 PE 2 SV 1	1271.06	1.51	0.41	0.1	1
Q541U1_SOYBN	Seed maturation protein LEA 4 OS Glycine max PE 4 SV 1	444.3	1.51	0.41	0.19	1
Q53WV6_SOYBN	Napin type 2S albumin 3 OS Glycine max PE 2 SV 1	8971.68	1.49	0.4	0.04	1
C6TA60_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	66.95	1.48	0.39	0.09	1
C3VHQ8_SOYBN	Oleosin OS Glycine max PE 2 SV 1	532.21	1.45	0.37	0.09	1
Q7M210_GLYSO	Glycinin A3B4 Plasmid pSPGL1 Fragment OS Glycine soja PE 3 SV 1	43196.42	1.43	0.36	0.03	1
Q70EM0_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 3 SV 1	29375.24	1.40	0.34	0.04	1
P93707_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN Gly A3B4 PE 2 SV 1	36641.57	1.40	0.34	0.02	1
C6T9C2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	534.93	1.40	0.34	0.06	1
C6SYA7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	11819.91	1.39	0.33	0.06	1
AMYB_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN BMY1 PE 1	1280.04	1.38	0.32	0.15	1

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
	SV 3					
2SS_SOYBN	2S albumin OS Glycine max PE 1 SV 2	8971.68	1.38	0.32	0.04	1
KTI2_SOYBN	Kunitz type trypsin inhibitor KTI2 OS Glycine max GN KTI2 PE 2 SV 1	7331.86	1.38	0.32	0.05	1
SBP_SOYBN	Sucrose binding protein OS Glycine max GN SBP PE 1 SV 1	12184.68	1.35	0.3	0.02	1
C6TB67_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	663.04	1.34	0.29	0.08	1
KTI1_SOYBN	Kunitz type trypsin inhibitor KTI1 OS Glycine max GN KTI1 PE 2 SV 1	31428.11	1.31	0.27	0.02	1
C6TB98_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	391.87	1.30	0.26	0.17	1
Q5K3R0_SOYBN	Putative dehydrin Fragment OS Glycine max GN lea10 PE 4 SV 1	1134.38	1.30	0.26	0.09	1
Q9ATY1_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max PE 4 SV 1	29453.45	1.30	0.26	0.02	1
C6T7Y4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2246.66	1.30	0.26	0.08	1
C6SWW4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	31428.11	1.30	0.26	0.02	1
Q39853_SOYBN	Soybean beta conglycinin alpha subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	97834.71	1.28	0.25	0.02	1
GLYG5_SOYBN	Glycinin OS Glycine max PE 1 SV 1	16667.18	1.28	0.25	0.04	1
Q39871_SOYBN	Late embryogenesis abundant protein OS Glycine max GN MP2 PE 2 SV 1	3553.29	1.27	0.24	0.04	1
Q9SWB2_SOYBN	Seed maturation protein PM41 OS Glycine max GN PM41 PE 4 SV 1	394.82	1.26	0.23	0.08	1
Q01527_SOYBN	Maturation protein OS Glycine max GN gGmpm9 PE 2 SV 1	2124.77	1.25	0.22	0.08	1

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
OLEO1_SOYBN	P24 oleosin isoform A OS Glycine max PE 2 SV 2	923.01	1.25	0.22	0.08	1
Q6LBP7_SOYBN	Glycinin B 1b subunit 15 AA Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	74298.4	1.25	0.22	0.09	1
ITRA_SOYBN	Trypsin inhibitor A OS Glycine max GN KTI3 PE 1 SV 2	29819.82	1.23	0.21	0.02	1
Q84V19_SOYBN	Sucrose binding protein 2 OS Glycine max GN SBP2 PE 2 SV 1	1898.8	1.22	0.2	0.04	1
C6TBB3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	6319.69	1.22	0.2	0.08	1
C6SYU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	548.54	1.20	0.18	0.13	1
7SBG2_SOYBN	Basic 7S globulin 2 OS Glycine max PE 1 SV 1	5120.55	1.19	0.17	0.03	1
C6T0L2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	9636.13	1.17	0.16	0.07	1
LOX3_SOYBN	Seed lipoxygenase 3 OS Glycine max GN LOX1 3 PE 1 SV 1	16725.48	1.16	0.15	0.03	1
C6TCF1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1107.94	1.16	0.15	0.07	1
Q9SEL0_SOYBN	Seed maturation protein PM24 OS Glycine max GN PM24 PE 2 SV 1	6240.3	1.15	0.14	0.03	1
Q50JD8_SOYBN	Beta conglycinin beta subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	76853.69	1.15	0.14	0.03	1
C6K8D1_SOYBN	Seed biotinylated protein 68 kDa isoform OS Glycine max PE 2 SV 1	3074.32	1.14	0.13	0.03	1
C6TMG1_SOYBN	Fructose biphosphate aldolase OS Glycine max PE 2 SV 1	538.16	1.12	0.11	0.05	1
B3TDK6_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	18229.56	1.06	0.06	0.02	1
C6TKW9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	785.7	1.06	0.06	0.04	1

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
Q9XET0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN PM30 PE 2 SV 1	5429.36	1.06	0.06	0.04	1
C6T535_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	431.27	5.05	1.62	0.29	0.99
C6TFP6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	351.29	2.01	0.7	0.26	0.99
C6SYJ3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	414.75	1.23	0.21	0.15	0.99
Q9S7N8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN PM21 PE 4 SV 1	959.37	1.19	0.17	0.14	0.99
Q9XER5_SOYBN	Seed maturation protein PM22 OS Glycine max GN PM22 PE 2 SV 1	3160.78	1.11	0.1	0.08	0.99
Q38IW8_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	530.1	1.08	0.08	0.05	0.99
Q9XES8_SOYBN	Seed maturation protein PM28 OS Glycine max GN PM28 PE 4 SV 1	1460.79	1.08	0.08	0.06	0.99
IBBD2_SOYBN	Bowman Birk type proteinase inhibitor D II OS Glycine max PE 1 SV 2	1568.77	1.06	0.06	0.06	0.99
Q9SEK9_SOYBN	Seed maturation protein PM25 OS Glycine max GN PM25 PE 2 SV 1	17598.49	1.04	0.04	0.04	0.99
Q9LLQ6_SOYBN	Seed maturation protein PM34 OS Glycine max GN PM34 PE 2 SV 1	3806.2	1.04	0.04	0.04	0.99
Q9SEK8_SOYBN	Seed maturation protein PM26 OS Glycine max GN PM26 PE 2 SV 1	12432.1	1.03	0.03	0.03	0.99
C6SWW0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	443.3	3.22	1.17	0.96	0.98
C6TLJ8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	662.95	1.63	0.49	0.4	0.98
PM1_SOYBN	18 kDa seed maturation protein OS Glycine max GN GMPM1 PE 2 SV 1	444.3	1.39	0.33	0.29	0.98

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
Q9AVK8_SOYBN	Allergen Gly m Bd 28K Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	4824.57	1.16	0.15	0.15	0.98
C6TK22_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	4.96	2.01	0.7	0.72	0.96
Q9FEZ8_SOYBN	Stress induced protein SAM22 like Fragment OS Glycine max GN dd4 62 PE 2 SV 1	7534.69	1.12	0.11	0.12	0.95
A1KR24_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN LEA 2 D11 PE 3 SV 1	697.28	1.08	0.08	0.09	0.95
PHSB_PHAVU	Phaseolin beta type OS Phaseolus vulgaris PE 1 SV 2	60	1.62	0.48	0.64	0.93
C6TL94_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	312.84	1.20	0.18	0.23	0.93
Q9XES9_SOYBN	Seed maturation protein OS Glycine max GN PM29 PE 2 SV 1	721	1.84	0.61	0.84	0.92
C6TMB5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	494.48	1.17	0.16	0.22	0.92
B1Q2X4_SOYBN	Protein disulfide isomerase OS Glycine max GN PDIL 1 PE 3 SV 1	662.21	1.03	0.03	0.04	0.92
CTG1B_HUMAN	Cancer testis antigen 1	3359.6	1.07	0.07	0.09	0.91
C6T8D8_SOYBN	Fructose biphosphate aldolase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	195.92	1.06	0.06	0.09	0.9
C6TBV7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	281.92	1.25	0.22	0.31	0.89
C6TGM9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	352.47	1.36	0.31	0.54	0.88
C6TDL5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	580.92	1.40	0.34	0.5	0.87
C6SYT3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	942.68	1.31	0.27	0.51	0.86

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
B2YDR0_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	5367.33	1.04	0.04	0.06	0.85
Q5K3Q9_SOYBN	Putative dehydrin Fragment OS Glycine max GN lea8 PE 4 SV 1	17967.64	1.20	0.18	0.25	0.84
HPSE_SOYBN	Hydrophobic seed protein OS Glycine max PE 1 SV 1	882.92	1.04	0.04	0.09	0.83
C6TL08_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5.62	1.26	0.23	0.57	0.82
C6TMC0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	388.23	1.23	0.21	0.44	0.82
C6T7B5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	506.62	1.17	0.16	0.34	0.82
C6T4L8_SOYBN	Fructose bisphosphate aldolase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	129.87	1.07	0.07	0.14	0.79
C6T819_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	505.99	1.02	0.02	0.17	0.79
Q6RUF6_SOYBN	Fructose bisphosphate aldolase OS Glycine max GN FBA PE 2 SV 1	147.31	1.08	0.08	0.18	0.78
Q42795_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max PE 1 SV 1	2572.42	1.02	0.02	0.05	0.78
C6T1Q7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1158.5	1.39	0.33	0.9	0.75
C6TJM1_SOYBN	Fructose bisphosphate aldolase OS Glycine max PE 2 SV 1	286.03	1.04	0.04	0.11	0.74
NDK1_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase 1 OS Glycine max PE 2 SV 1	743.93	1.08	0.08	0.25	0.72
Q8GV25_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	502.89	1.05	0.05	0.15	0.72
C6T5M6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1844.15	1.05	0.05	0.21	0.7

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6TNA8_SOYBN	Malate dehydrogenase OS Glycine max PE 2 SV 1	457.42	1.03	0.03	0.13	0.7
C6T6U3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	125.88	1.21	0.19	0.74	0.67
O82478_SOYBN	Alcohol dehydrogenase Adh 1 Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	1746.09	1.01	0.01	0.08	0.67
C6TB80_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	905.48	1.08	0.08	0.47	0.66
C6TKH0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	4866.68	1.01	0.01	0.03	0.66
Q39873_SOYBN	Lea protein OS Glycine max PE 2 SV 1	479.71	1.01	0.01	0.05	0.65
Q9ZNZ4_SOYBN	Napin type 2S albumin 1 OS Glycine max PE 2 SV 1	1158.5	1.15	0.14	1.01	0.64
Q6DNI3_SOYBN	Elongation factor 1A SMV resistance related protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	523.62	1.05	0.05	0.33	0.63
Q4U3W3_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max PE 3 SV 1	1058.32	1.02	0.02	0.1	0.63
Q7M1Q4_SOYBN	Protein disulfide isomerase Fragments OS Glycine max PE 1 SV 1	1442.55	1.05	0.05	0.25	0.62
B2YDQ6_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	4922.66	1.01	0.01	0.03	0.62
C6T1K9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	154.13	1.11	0.1	0.9	0.61
C6T0Q0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	940.38	1.11	0.1	0.86	0.6
Q8LJU1_SOYBN	PR10 like protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1221.99	1.02	0.02	0.18	0.6
Q9ZTG0_SOYBN	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1 Fragment OS Glycine max GN GAPDH1 PE 4 SV 1	255.62	1.25	0.22	1.06	0.59

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6TJT5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	53.86	1.11	0.1	0.7	0.59
C6TET4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	494.23	1.03	0.03	0.3	0.59
C6T9J2_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	279.47	1.08	0.08	0.81	0.58
Q9SDZ0_SOYBN	Isoflavone reductase homolog 2 OS Glycine max GN IFR2 PE 2 SV 1	391.87	1.02	0.02	0.17	0.57
Q9XET1_SOYBN	Seed maturation protein PM31 OS Glycine max GN PM31 PE 2 SV 1	7178.38	1.00	0	0.04	0.57
O81278_SOYBN	Nodule enhanced malate dehydrogenase OS Glycine max GN Mdh PE 3 SV 1	38.06	1.00	0	0.86	0.57
B3TDK9_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	644.09	1.02	0.02	0.2	0.56
C0J370_SOYBN	Ribulose biphosphate carboxylase large chain Fragment OS Glycine max GN rbcL PE 3 SV 1	1217.38	1.00	0	0.1	0.53
C6T9Z5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5337.18	1.00	0	0.03	0.53
C6T034_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	331.67	1.04	0.04	0.49	0.51
Q43446_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN vlxB PE 1 SV 1	1141.54	1.00	0	0.1	0.51
ACT3_SOYBN	Actin 3 OS Glycine max GN SAC3 PE 3 SV 2	21.48	0.99	-0.01	0.19	0.5
C6SVR5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	426.37	1.00	0	0.13	0.49
C6TMV9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	310.81	1.00	0	0.17	0.48
Q6RIB7_SOYBN	Enolase OS Glycine max PE 2 SV 1	519.16	1.00	0	0.1	0.47
C6SZN6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	562.14	0.97	-0.03	0.96	0.47

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6T9F8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	54.63	0.92	-0.08	0.54	0.43
C6TNF0_SOYBN	Ferritin OS Glycine max PE 2 SV 1	479.97	0.85	-0.16	1.18	0.43
Q41244_SOYBN	Lipoxygenase Fragment OS Glycine max GN loxA PE 2 SV 1	2074.23	1.00	0	0.05	0.42
C6THE1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	482.81	0.90	-0.11	1.41	0.42
C6SYE7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	408.33	1.07	0.07	1.12	0.41
O65016_SOYBN	Actin 4 OS Glycine max GN SAc4 PE 3 SV 1	591.32	0.98	-0.02	0.11	0.41
C6T8X3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	494.47	0.87	-0.14	0.76	0.4
Q39803_SOYBN	BiP isoform C Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	223.25	0.95	-0.05	0.25	0.39
C6TE78_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	153.3	0.89	-0.12	0.66	0.39
ACT1_SOYBN	Actin 1 OS Glycine max GN SAC1 PE 3 SV 2	2171.62	0.98	-0.02	0.09	0.38
Q96445_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy118 PE 3 SV 1	691.65	0.96	-0.04	0.16	0.38
Q9ZT38_SOYBN	Alcohol dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN Adh 2 PE 3 SV 1	2006.53	0.99	-0.01	0.05	0.37
C6SXX2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1293.55	0.91	-0.09	0.4	0.37
C6SYC6_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	734.95	0.92	-0.08	0.38	0.36
C6TJ25_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	432.71	0.85	-0.16	0.63	0.36
Q39875_SOYBN	Soybean lipoxygenase 1 Fragment OS Glycine max PE 3 SV 1	13068.26	0.98	-0.02	0.09	0.33

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6TGD9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	145.88	0.84	-0.17	0.56	0.32
C6SVS4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	16.25	0.76	-0.28	1.02	0.31
O81279_SOYBN	Malate dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN Mdh 2 PE 3 SV 1	270.14	0.89	-0.12	0.38	0.29
FRI4_SOYBN	Ferritin 4 chloroplastic OS Glycine max PE 2 SV 2	479.97	0.70	-0.35	1.17	0.29
C6TD56_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	4055.03	0.96	-0.04	0.11	0.28
C6TJ78_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1751.55	0.95	-0.05	0.17	0.28
Q96448_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy109 PE 3 SV 1	651.44	0.94	-0.06	0.2	0.25
Q71EW8_SOYBN	Methionine synthase OS Glycine max PE 2 SV 1	291.98	0.93	-0.07	0.15	0.25
C6TIM2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	1656.73	0.97	-0.03	0.07	0.22
C6TD82_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1803.41	0.97	-0.03	0.06	0.21
Q42780_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN lox7 PE 2 SV 1	993.41	0.95	-0.05	0.08	0.16
C6T4J1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	867.54	0.67	-0.4	0.72	0.16
Q6GW08_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	914.89	0.94	-0.06	0.09	0.14
C6T5N1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1039.75	0.90	-0.11	0.21	0.14
Q96441_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy58 PE 3 SV 1	1045.48	0.89	-0.12	0.15	0.12

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6T588_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2236.15	0.97	-0.03	0.05	0.11
Q9ARI1_SOYBN	Lipoxygenase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	4.25	0.57	-0.57	0.95	0.11
Q96447_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy115 PE 3 SV 1	2065.56	0.91	-0.09	0.1	0.1
C6TMS5_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	2606.89	0.70	-0.36	0.59	0.1
O23959_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN GmPM13 PE 2 SV 1	1319.48	0.95	-0.05	0.07	0.09
C6SWV3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	351.41	0.92	-0.08	0.11	0.09
C6T7U2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	307.44	0.90	-0.1	0.17	0.09
O65363_SOYBN	Malate dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN Mdh 1 PE 2 SV 1	1083.53	0.83	-0.19	0.26	0.09
C6TLF0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	639.89	0.75	-0.29	0.46	0.09
Q43453_SOYBN	G max mRNA from stress induced gene H4 OS Glycine max PE 2 SV 1	682.67	0.71	-0.34	0.52	0.09
C6T2N6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	558.58	0.65	-0.43	0.79	0.09
Q96439_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy70 PE 3 SV 1	1157.29	0.87	-0.14	0.23	0.08
Q96443_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy120 PE 3 SV 1	1090.35	0.90	-0.11	0.13	0.07
A0A762_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN Gm crt 1 PE 2 SV 1	457.71	0.87	-0.14	0.18	0.07
C6TJF6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	217.53	0.69	-0.37	0.41	0.07

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6SX83_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	982.09	0.61	-0.49	0.64	0.07
Q96444_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy119 PE 3 SV 1	1935.73	0.92	-0.08	0.11	0.06
C6T6J1_SOYBN	Triosephosphate isomerase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	1777.55	0.85	-0.16	0.17	0.06
C6T7I4_SOYBN	Malate dehydrogenase OS Glycine max PE 2 SV 1	325.31	0.84	-0.18	0.2	0.05
C6T8W9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5609.59	0.95	-0.05	0.06	0.04
P93165_SOYBN	Em protein OS Glycine max PE 4 SV 1	3280.75	0.89	-0.12	0.13	0.04
C6T920_SOYBN	Phosphoglycerate kinase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	304.4	0.86	-0.15	0.15	0.04
C6TGX6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	803.16	0.82	-0.2	0.19	0.03
C6SW63_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	832.66	0.57	-0.57	0.67	0.03
Q39876_SOYBN	Maturation associated protein OS Glycine max GN MAT9 PE 2 SV 1	23294.17	0.95	-0.05	0.04	0.02
Q6RIB6_SOYBN	Malate dehydrogenase OS Glycine max PE 2 SV 1	608.1	0.87	-0.14	0.1	0.02
Q6I8E6_SOYBN	Pseudo atpA Fragment OS Glycine max PE 3 SV 1	255.22	0.43	-0.84	0.81	0.02
7SB1_SOYBN	Basic 7S globulin OS Glycine max GN BG PE 1 SV 2	7784.24	0.97	-0.03	0.02	0.01
C6T7M2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	449.85	0.92	-0.08	0.08	0.01
SBP65_SOYBN	Seed biotin containing protein SBP65 OS Glycine max GN SBP65 PE 1 SV 1	4066.48	0.90	-0.11	0.07	0.01
C6TK76_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine	1026.99	0.80	-0.22	0.21	0.01

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
	max PE 2 SV 1					
C6T0Y5_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	453.73	0.68	-0.38	0.3	0.01
Q8LJS3_SOYBN	Lea protein Fragment OS Glycine max GN PM2 PE 4 SV 1	439.56	0.68	-0.39	0.29	0.01
Q8GV24_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	857.39	0.45	-0.8	0.67	0.01
HSP14_SOYBN	17.5 kDa class I heat shock protein OS Glycine max GN HSP17.5 E PE 3 SV 1	2263.47	0.41	-0.9	0.54	0.01
O22121_SOYBN	Beta subunit of beta conglycinin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 2	73717.36	0.98	-0.02	0.01	0
B3TDK5_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	15448.99	0.95	-0.05	0.02	0
C6TDF5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5305.33	0.93	-0.07	0.03	0
B3TDK8_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	1028.48	0.93	-0.07	0.04	0
Q39801_SOYBN	51 kDa seed maturation protein OS Glycine max PE 2 SV 1	576.24	0.93	-0.07	0.03	0
C6TB70_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2139.19	0.92	-0.08	0.05	0
LEC_SOYBN	Lectin OS Glycine max GN LE1 PE 1 SV 1	5278.62	0.92	-0.08	0.03	0
C6EVF9_SOYBN	Elongation factor 1 alpha OS Glycine max GN EF 1A PE 2 SV 1	2856.94	0.91	-0.09	0.04	0
C6TN36_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	4151.35	0.90	-0.1	0.04	0
C6TKJ5_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	630.26	0.90	-0.11	0.09	0
Q45UE7_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max PE 2 SV 1	3340.55	0.90	-0.11	0.06	0

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
C6TCK9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	4323.74	0.90	-0.11	0.07	0
C6T072_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1107.89	0.88	-0.13	0.05	0
C6T8Q2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2206.8	0.87	-0.14	0.06	0
Q9SPB8_SOYBN	Malate dehydrogenase OS Glycine max GN Mdh1 PE 3 SV 1	1688.22	0.87	-0.14	0.09	0
C6SZ11_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	574.61	0.87	-0.14	0.07	0
C6T9L1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	64867.72	0.86	-0.15	0.03	0
Q70EL9_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 3 SV 1	6371.37	0.86	-0.15	0.07	0
EF1A_SOYBN	Elongation factor 1 alpha OS Glycine max GN TEFS1 PE 3 SV 2	3017.91	0.86	-0.15	0.06	0
Q42447_SOYBN	Maturation protein OS Glycine max GN MAT1 PE 2 SV 1	1326.29	0.86	-0.15	0.07	0
B2YDQ7_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	6463.6	0.86	-0.15	0.05	0
C6T4A1_SOYBN	Glutathione peroxidase OS Glycine max PE 2 SV 1	949.52	0.85	-0.16	0.14	0
Q588Z4_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyTkm2 PE 2 SV 1	3292.85	0.85	-0.16	0.04	0
UBIQ_SOYBN	Ubiquitin OS Glycine max GN SUBI 1 PE 3 SV 1	1037.65	0.84	-0.17	0.09	0
O04299_SOYBN	Elongation factor 1 alpha Fragment OS Glycine max GN TefS1 PE 4 SV 1	2153.66	0.84	-0.17	0.06	0
A7LCD6_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN LOX10 PE 2 SV 1	853.18	0.84	-0.17	0.06	0

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
Q2I0H4_SOYBN	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase OS Glycine max GN GAPC1 PE 2 SV 1	5750.83	0.84	-0.18	0.04	0
A7LCD5_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN LOX9 PE 2 SV 1	1560.4	0.84	-0.18	0.04	0
C7F8N8_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max PE 3 SV 1	2024.33	0.83	-0.19	0.08	0
C6SVM2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	6715.28	0.82	-0.2	0.1	0
Q588Z5_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyKza PE 2 SV 1	4073.41	0.82	-0.2	0.12	0
Q43440_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN vlxC PE 2 SV 1	1603.72	0.81	-0.21	0.04	0
Q39805_SOYBN	Dehydrin like protein OS Glycine max PE 2 SV 1	38268.01	0.80	-0.22	0.02	0
Q96442_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy57 PE 3 SV 1	2518.11	0.79	-0.23	0.06	0
Q70EL8_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 4 SV 1	15921.89	0.79	-0.23	0.04	0
Q96440_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy69 PE 3 SV 1	839.89	0.79	-0.24	0.13	0
C6T0B5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1522.29	0.78	-0.25	0.07	0
GLCAP_SOYBN	Beta conglycinin alpha chain OS Glycine max GN CG 1 PE 2 SV 1	21089.13	0.78	-0.25	0.03	0
C6SWE0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1195.27	0.76	-0.27	0.06	0
LOXX_SOYBN	Seed lipoxygenase OS Glycine max GN LOX1 4 PE 1 SV 1	2004.36	0.76	-0.27	0.05	0
B3VE15_SOYBN	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	323.32	0.76	-0.28	0.19	0
Q39874_SOYBN	Lipoxygenase Fragment OS Glycine max PE 2	5429.44	0.75	-0.29	0.06	0

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
	SV 1					
B3TDK4_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	23559.76	0.75	-0.29	0.02	0
Q588Z6_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyTkm1 PE 2 SV 1	2582.36	0.74	-0.3	0.08	0
Q39830_SOYBN	BiP isoform A OS Glycine max PE 2 SV 1	780.01	0.73	-0.32	0.13	0
C6SZX7_SOYBN	Glutathione peroxidase OS Glycine max PE 2 SV 1	960.06	0.72	-0.33	0.1	0
C6THM8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	177.11	0.72	-0.33	0.26	0
LOX2_SOYBN	Seed lipoxygenase 2 OS Glycine max GN LOX1 2 PE 2 SV 1	14259.97	0.71	-0.34	0.02	0
O22639_SOYBN	Endoplasmic reticulum HSC70 cognate binding protein OS Glycine max GN BIP PE 2 SV 1	375.62	0.70	-0.36	0.06	0
HSP70_SOYBN	Heat shock 70 kDa protein OS Glycine max GN HSP70 PE 3 SV 1	423.16	0.69	-0.37	0.06	0
O49222_SOYBN	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN GAPDH PE 2 SV 1	3048.32	0.68	-0.38	0.07	0
Q9FEZ7_SOYBN	Ribosomal protein L2 OS Glycine max GN rpL2 PE 2 SV 1	391.76	0.67	-0.4	0.29	0
Q587K1_SOYBN	BiP OS Glycine max GN Gm bip PE 2 SV 1	798.44	0.67	-0.4	0.12	0
Q43438_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 2 SV 1	1236.86	0.65	-0.43	0.06	0
O23957_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN GmPM12 PE 2 SV 1	6272.79	0.64	-0.44	0.07	0
Q588Z3_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyDam PE 2 SV 1	3340.55	0.63	-0.46	0.04	0

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
Q9SP11_SOYBN	Sucrose binding protein homolog S 64 OS Glycine max GN SBP PE 2 SV 1	1506.56	0.61	-0.49	0.12	0
C6SZK3_SOYBN	Glutathione peroxidase OS Glycine max PE 2 SV 1	1267.34	0.61	-0.49	0.18	0
C6T5U3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1533.22	0.61	-0.5	0.46	0
HSP12_SOYBN	Class I heat shock protein Fragment OS Glycine max GN HSP6834 A PE 3 SV 1	1651.08	0.59	-0.52	0.23	0
Q9ATB8_SOYBN	BiP isoform D Fragment OS Glycine max GN BiPD PE 3 SV 1	326.32	0.56	-0.58	0.18	0
C6TFW4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1903.63	0.54	-0.62	0.15	0
C6TI64_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	414.47	0.52	-0.65	0.52	0
C6TGZ9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2184.03	0.51	-0.68	0.21	0
C6T7Y1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1815.87	0.50	-0.69	0.07	0
Q39804_SOYBN	BiP isoform B OS Glycine max PE 2 SV 1	849.16	0.50	-0.69	0.17	0
Q7XAC5_SOYBN	Embryo specific urease OS Glycine max PE 2 SV 1	1261.56	0.49	-0.71	0.11	0
ATPAM_SOYBN	ATP synthase subunit alpha mitochondrial OS Glycine max GN ATPA PE 3 SV 1	2723.74	0.48	-0.73	0.25	0
ITRB_SOYBN	Trypsin inhibitor B OS Glycine max PE 1 SV 1	33020.89	0.47	-0.75	0.03	0
B2YDQ8_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	8406.16	0.43	-0.85	0.11	0
C6T9U5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	967.83	0.42	-0.86	0.31	0
C6T1V2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	3373.43	0.34	-1.09	0.07	0

Accession	Description	Score	Ratio	Log(e)Ratio	Log(e)Var	P
HSP13_SOYBN	17.5 kDa class I heat shock protein OS Glycine max GN HSP17.5 M PE 3 SV 1	1820.93	0.33	-1.11	0.5	0
C6SXG1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1786.46	0.30	-1.22	0.26	0
Q949H4_SOYBN	Leaf ubiquitous urease OS Glycine max GN ure PE 2 SV 1	112.45	0.25	-1.37	0.24	0
HSP16_SOYBN	18.5 kDa class I heat shock protein OS Glycine max GN HSP18.5 C PE 3 SV 1	1271.54	0.24	-1.44	0.61	0
C6T9Z3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	251.41	0.23	-1.49	0.79	0
C6SXP1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	599.07	0.22	-1.53	0.78	0
C6T8E9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	20.11	0.11	-2.19	1.42	0
C6TJH3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	154.31	0.11	-2.2	1.12	0
PHS2_RABIT	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE MUSCLE FORM EC	2994.07				

Tabela Suplementar 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na Linhagem 5, seus respectivos números de acesso (Accession) e o quociente dos critérios preenchidos e estabelecidos no processo de identificação da proteína (Score).

Accession	Description	Score
Q4LER5_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	155987.09
Q3V5S6_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	129473.7
Q7M1N5_SOYBN	Glycinin A1aB1b Fragments OS Glycine max PE 4 SV 1	120268.1
C7EA91_SOYBN	Mutant glycinin subunit A1aB1b OS Glycine max GN Gy1 PE 3 SV 1	70865.19
Q0MUU5_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	30575.59
Q39816_SOYBN	7S storage protein alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	27755.49
LOX1_SOYBN	Seed lipoxygenase 1 OS Glycine max GN LOX1 1 PE 1 SV 2	16657.43
Q852U5_SOYBN	Glycinin A1bB2 445 OS Glycine max PE 2 SV 1	14132.67
Q07CZ3_SOYBN	Glyceraldehyde 3 dehydrogenase C subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	2616.17
Q9M5V9_SOYBN	Disease resistance like protein Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	1362.05
C6TAC6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1303.02
C6T0A0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	1032.72
Q1XI23_SOYBN	Truncated beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max GN CG 2 PE 4 SV 1	1032.43
C6TEF4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1006.03
C6SZL0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	987.77
Q9XIT8_SOYBN	GmMYB7 Fragment OS Glycine max GN GmMYB7 PE 4 SV 1	974.69
O81976_SOYBN	14 3 3 Protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	969.25
C6TES2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	870.12
C6T4R9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	838.95
C6TBN4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	804.35
C6TFE3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	792.99
C6SZR6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	785.3
Q53B72_SOYBN	Putative chalcone isomerase 4 OS Glycine max PE 2 SV 1	773.3
C6T4S8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	763.56
C6TL91_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	761.8

Accession	Description	Score
O73564_SBMV	Putative uncharacterized protein OS Southern bean mosaic virus PE 4 SV 1	756.22
C6TIJ3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	748.14
Q9ZTY1_SOYBN	35 kDa seed maturation protein OS Glycine max GN pGmPM18 PE 2 SV 1	742.46
C6TI57_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	729.3
Q83472_SBMV	P96 protein OS Southern bean mosaic virus PE 4 SV 1	719.99
C6T428_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	710.07
C6TEI1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	700.49
HSP11_SOYBN	17.3 kDa class I heat shock protein OS Glycine max GN HSP17.3 B PE 3 SV 1	694.03
C6SXF1_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	691.29
C6TMW5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	661.89
C6TCR6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	650.24
C6T9G9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	631.89
C6T0G0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	624.76
C6TB86_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	623.95
C6T0L9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	622.73
C6SYV7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	622.2
C6TD88_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	621.26
C6SXW6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	601.18
C6TKD6_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	600.5
C6SY31_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	599.95
C6T0K1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	596.63
C6T3C2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	587.65
C6TIK2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	587.5
C6SXU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	582.64
C6T5D6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	582.25
LEA14_SOYBN	Desiccation protectant protein Lea14 homolog OS Glycine max PE 2 SV 1	577.85
C6T9Y2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	567.22

Accession	Description	Score
Q9FQF0_SOYBN	Glutathione S transferase GST 8 OS Glycine max PE 2 SV 1	559.37
C6TIS7_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	555.44
Q9SWB3_SOYBN	Seed maturation protein PM39 Fragment OS Glycine max GN PM39 PE 2 SV 1	548.93
B9P4N2_SOYBN	SGR OS Glycine max PE 2 SV 1	548.33
C6T6P4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	544.8
C6T080_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	544.24
Q8W0V9_SOYBN	24 kDa protein SC24 OS Glycine max PE 2 SV 1	536.01
C6SX11_SOYBN	Non specific lipid transfer protein OS Glycine max PE 2 SV 1	534.33
C6TFG8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	533.3
C6SWA3_SOYBN	Acyl carrier protein OS Glycine max PE 2 SV 1	529.41
C6SV69_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	527.51
SUSY_SOYBN	Sucrose synthase OS Glycine max GN SS PE 1 SV 2	524.34
C6SXU3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	521.74
C6TC84_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	520.6
C6T0U7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	516.94
C6TGE7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	508.43
C6TK59_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	505.65
C6TEB7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	504.34
C6T239_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	503.38
C6TM75_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	499.72
FRI3_SOYBN	Ferritin 3 chloroplastic OS Glycine max PE 2 SV 1	493.84
C6T8Z4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	488.97
C6T752_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	471.35
Q50JD9_SOYBN	Sucrose synthase Fragment OS Glycine max GN GmSS PE 2 SV 1	469.31
C6TIU4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	469.19
C6SV84_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	467.2
Q39861_SOYBN	GTP binding protein OS Glycine max PE 2 SV 1	466.41

Accession	Description	Score
C6TNT2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	465.16
C6T3P9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	462.7
C6T8F0_SOYBN	Glutamine synthetase OS Glycine max PE 2 SV 1	451.58
C6T225_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	450.78
C6TEC1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	449.54
C6SWN9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	439.75
C6T4H7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	437.09
Q6WNU4_SOYBN	Subtilisin like protease OS Glycine max GN SUB1 PE 4 SV 1	436.06
C6SWT4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	432.73
C6TJ14_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	418.04
C6TI29_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	415.1
PPAF_SOYBN	Purple acid phosphatase OS Glycine max GN PAP PE 1 SV 2	400.04
C6T5K2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	397.36
C6TBY9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	366.27
C6T5P6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	348.06
C6TM43_SOYBN	Ferritin OS Glycine max PE 2 SV 1	337.02
C6TNU2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	292.62
C6TN38_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	247.62
B2ZGR8_SOYBN	NAC domain protein Fragment OS Glycine max GN NAC28 PE 2 SV 1	233.94
A9YT06_SOYBN	Ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase large subunit Fragment OS Glycine max GN rbcL PE 3	174.86
C6T429_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	154.77
B6EBD5_SOYBN	SGT1 2 OS Glycine max PE 2 SV 1	80.57
Q96446_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy117 PE 3 SV 1	44.2
C0JJI3_SOYBN	Retrotransposon protein OS Glycine max PE 4 SV 1	8.54
A5YJV9_SOYBN	NFR5a OS Glycine max GN NFR5a PE 4 SV 1	8.54

Tabela Suplementar 3 - Proteínas identificadas exclusivamente na Linhagem 37, seus respectivos números de acesso (*Accession*) e o quociente dos critérios preenchidos e estabelecidos no processo de indentificação da proteína (*Score*).

Accession	Description	Score
Q43452_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN Gy4 PE 3 SV 1	38776.45
C6T488_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	36595.15
Q948Y0_SOYBN	Beta conglycinin alpha prime subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	26441.94
C6SVX0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2431.6
O65364_SOYBN	Malate dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN Mdh 1 PE 2 SV 1	2153.37
C6TBZ3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	1264.53
C6THG3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1244.33
C6TL84_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1216.21
Q9S7H2_SOYBN	Ubiquitin OS Glycine max GN SUBI 2 PE 4 SV 1	1199.51
C6SYV5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	1084.66
C6SYT7_SOYBN	Glutathione peroxidase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	1041.83
B3TDK7_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	1038.7
C6T699_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1008.85
C6TFY7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	1004.39
C6T1H9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	989.63
B5LSX5_SOYBN	Microsomal omega 3 fatty acid desaturase OS Glycine max GN FAD3 PE 2 SV 1	933.41
RBL_SOYBN	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS Glycine max GN rbcL PE 1 SV 3	892.91
C6TFH8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	850.56
C6TFC7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	795.52
C6T3D0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	767.97
C6F121_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	767.19
C6T4Q6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	761.55
C6K8D0_SOYBN	Trypsin inhibitor 26 kDa isoform OS Glycine max PE 2 SV 1	742.38
C6T2L4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	741.24
C6T4K6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	732.58

Accession	Description	Score
C6T0B7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	728.6
C6SZI1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	728.11
A4ULK1_SOYBN	Microsomal omega 3 fatty acid desaturase C Fragment OS Glycine max GN FAD3C PE 2 SV 1	704.24
C6T8C0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	703.33
DUT_BRAJA	Deoxyuridine 5 triphosphate nucleotidohydrolase OS Bradyrhizobium japonicum GN dut PE 3 SV 2	699.55
C6TEU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	699.19
C6T2U1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	696.5
C6TMG8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	684.59
C6SZN7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	683.79
VPG_BWYVG	Putative genome linked protein precursor OS Beet western yellows virus isolate GB1 GN ORF4 PE 3 SV	680.17
TCTP_SOYBN	Translationally controlled tumor protein homolog OS Glycine max GN TCTP PE 2 SV 1	679.19
C6TI71_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	676.48
C6TE09_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	669.06
C6TFF3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	645.1
C6T416_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	639.52
C6TFI0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	638.73
B4XH29_SOYBN	Plant nuclear matrix 1 Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	638.04
Q9SWA8_SOYBN	Glycine rich RNA binding protein OS Glycine max GN GRP PE 2 SV 1	637.3
C6TAX7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	624.27
C6TJD6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	624.24
Q9ZPJ2_SOYBN	ADP ribosylation factor Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	623.31
C6SVG1_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	620.64
C6T938_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	614.84
C6TFW0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	614.68
A7LHG1_SOYBN	WRKY15 Fragment OS Glycine max GN WRKY15 PE 2 SV 1	604.71
C6TEV0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	601.01
C6T6C0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	597.78

Accession	Description	Score
C6TK98_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	595.34
C6SVX3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	595.03
C6T1C0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	592.29
C6TIU2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	589.98
C6T729_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	588.83
C6SX96_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	587.85
C6TG11_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	580.87
C6T3C7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	575.09
C6SWV4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	573.75
C6THU7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	571.13
C6T5K7_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	567.45
B0LUS5_SOYBN	Transcription factor OS Glycine max GN WRKY11 PE 2 SV 1	561.37
C6SXM9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	550.53
C6THD9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	535.32
C6TIB6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	534.95
C6TNH2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	534.26
C6SVC4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	531
C6FF81_SOYBN	Receptor like serine threonine kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	528.84
C6T085_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	527.11
C6SZF9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	520.46
C6TM48_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	518.86
C6TM01_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	514.49
C6T9R0_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	511.6
C6T377_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	510.38
Q49N13_SOYBN	Putative receptor like protein kinase 3 OS Glycine max PE 2 SV 1	509.34
C6ZJY6_SOYBN	Serine hydroxymethyltransferase OS Glycine max PE 2 SV 1	508.61
C6TBU8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	507.9

Accession	Description	Score
Q9FQE4_SOYBN	Glutathione S transferase GST 14 Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	506.29
C6TB24_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	505.54
C6SZA4_SOYBN	Histone H3 OS Glycine max PE 2 SV 1	503.19
C6ZRN2_SOYBN	Leucine rich repeat family protein protein kinase family protein OS Glycine max PE 2 SV 1	499.7
C6TD94_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	499.2
C6TJC8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	497.08
C6TM06_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	496.14
C6SXA1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	493.56
Q96438_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy86 PE 3 SV 1	488.61
C6TKX2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	487.74
HSP15_SOYBN	17.6 kDa class I heat shock protein OS Glycine max GN HSP17.6 L PE 3 SV 1	481.81
C6TED6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	481.52
C6TMA8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	473.52
C6TED3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	469.81
C6THM7_SOYBN	Serine hydroxymethyltransferase OS Glycine max PE 2 SV 1	469.43
C6T9B7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	466.25
C6ZRU2_SOYBN	Protein kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	464.16
C6TNX6_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	462.61
Q84L90_SOYBN	Putative receptor like protein kinase RPLK3 Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	460.4
C6SVE0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	457.72
C6SVR8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	447.85
C6TH15_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	446.51
C6SZC8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	444.3
C6THV5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	439.38
C6TCS3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	432.07
C6THP5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	430.7
C6T5U0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	429.92

Accession	Description	Score
C6SVE3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	429.79
C6T0F5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	426.05
C6TKA5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	425.28
C6THC5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	423.79
Q39802_SOYBN	Cytokinin induced message OS Glycine max GN cim1 PE 2 SV 1	423.49
C6TEI0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	411.62
C6TMN0_SOYBN	ATP dependent Clp protease proteolytic subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	408.52
C6TJP9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	404.51
C6SWI1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	396.09
C6TN22_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	383.57
C6T049_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	370.11
C6SY42_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	368.54
C6TC35_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	360.09
C6SY66_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	329.67
C6ZJY7_SOYBN	Serine hydroxymethyltransferase OS Glycine max PE 2 SV 1	327.18
C6T5T0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	307.63
C6T8X0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	305.84
Q2XQG7_SOYBN	Pathogenesis related protein PR 10 Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	280.04
C6T2W1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	137.51
B6EBD4_SOYBN	SGT1 1 OS Glycine max PE 2 SV 1	125.88
C6T813_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	117.25
C6THM9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	96.29
C6THR5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	83.1
C6TNJ7_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	75.64
C6T3A2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	75.33
Q41214_SOYBN	Urease Fragment OS Glycine max GN Eu4 PE 2 SV 1	61.81
C6TDF9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	31.65

Accession	Description	Score
Q49N12_SOYBN	Putative receptor like protein kinase 2 OS Glycine max PE 2 SV 1	2.06
C6T020_SOYBN	Glutathione peroxidase OS Glycine max PE 2 SV 1	0

Tabela Suplementar 4 - Prováveis funções das proteínas identificadas como putativas na Tabela Suplementar 1.

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6T535_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SWW0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SX02_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Oxidorrredutase de pontes dissulfeto
C6TFP6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Quinase
C6SVF6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Oxidorrredutase de pontes dissulfeto
C6TLJ8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SYJ3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de defesa
C6TBB3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T0L2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Pequena proteína hidrofílica de semente
C6TIM2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína ligadora de zinco/oxidorrredutase
C6SW63_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína ribossômica
C6SX26_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	Inibidor de peptidase serínica
C6T4J1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	Proteína envolvida no dobramento protéico
C6TG05_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de zinco
C6T689_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TCX5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Peptidase
C6T1A6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6THP4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida na resposta ao estresse oxidativo
C6TA60_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de zinco/oxidorrredutase
C6TDL5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T9C2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T1Q7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Inibidor de alpha-amilase
C6SYA7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TGM9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidorrredutase

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
N		
C6TB67_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Inibidor de endopeptidase
C6SYT3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TB98_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T7Y4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de reserva
C6SWW4_SOYB		
N	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Inibidor de endopeptidase
C6TL08_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína integral de membrana
C6TBV7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6TMC0_SOYB		
N	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6T6U3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SYU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de peptídeos
C6TL94_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Metilnotetrahidrofolato desidrogenase (NADP+)
C6T7B5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6TMB5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TCF1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T1K9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Fator de alongação da tradução
C6TJT5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Isomerase/oxidoredutase de pontes dissulfeto
C6T0Q0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TB80_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Endopeptidase serínica
C6SYE7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta a estímulos bióticos
C6TKW9_SOYB		
N	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T5M6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6T034_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Fator de alongação da tradução
C6TET4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T819_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de íons metálicos/fosfatase

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
		ácida
C6TKH0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6T9Z5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6SVR5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TMV9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Metilnotetrahidrofolato desidrogenase (NADP+)
C6SZN6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta ao estresse
C6TD82_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase/proteína ligadora de zinco
C6T588_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta a estímulos bióticos
C6TD56_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6T8W9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6TJ78_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ATP
C6TDF5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
		Proteína ligadora de fosfolipídeos cálcio-dependente
C6T7M2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Peroxirredoxina
C6TB70_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Isomerase/oxidoredutase de pontes dissulfeto
C6T9F8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	
C6SWV3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SXX2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Ubiquitina
C6TN36_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6T7U2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Nucleotidiltransferase
C6T5N1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6THE1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TCK9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6TE78_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Domínio de repetição tetratricopeptídeo (TPR)
C6T072_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6T8Q2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ATP

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6T8X3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Helicase/hidrolase
C6SZ11_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T9L1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de reserva
C6TJ25_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Helicase/hidrolase
C6TGD9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6SVM2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta ao estresse hídrico
C6TGX6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Fosfotransferase
C6TK76_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ATP
C6T0B5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de GTP/GTPase
C6SWE0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6TLF0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Fator de alongação da tradução
C6THM8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6TJF6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de fosfolípidos cálcio-dependente
C6T2N6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6SX83_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T5U3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6TFW4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta a estímulos bióticos
C6TI64_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TGZ9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ATP
C6T7Y1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ATP
C6T9U5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T1V2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6SXG1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6TJI8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T9Z3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Acetil glicosamino transferase
C6SXP1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Fator de alongação da tradução
C6T8E9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína da família da actina
C6TJH3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Fator de alongação da tradução
Q9XET0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN PM30 PE 2 SV 1	Proteína de maturação de semente
Q9S7N8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN PM21 PE 4 SV 1	Proteína de maturação de semente
O23959_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN GmPM13 PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio (Ca +2) "EF hand"
A0A762_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN Gm crt 1 PE 2 SV 1	Calreticulina-1
C6T9J2_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Nucleotidiltransferase
C6SVS4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Transferase
C6TMS5_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T0Y5_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase/proteína ligadora de zinco

Tabela Suplementar 5 - Prováveis funções das proteínas identificadas como putativas para a Linhagem 5 na Tabela Suplementar 2.

Acesso	Descrição	Processo biológico ou função
C6SY31_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6SYV7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SZR6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína ligadora de zinco
C6T0A0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína envolvida na replicação do DNA
C6T0K1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T3C2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T5D6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína envolvida na fosforilação oxidativa
C6TB86_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TD88_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TEI1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína envolvida na fotossíntese
C6TIK2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TIJ3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	Proteína relacionada à patogênese
C6SV69_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6SV84_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida no processo de oxirredução
C6SWN9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6SWT4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SXU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína inibidora de protease
C6SXU3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SXW6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Ureído glicolato hidrolase
C6SZL0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T080_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T0G0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação a sequência de DNA específica
C6T0L9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T0U7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T239_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida

Acesso	Descrição	Processo biológico ou função
C6T3P9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
PPAF_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação a sequência de DNA específica
C6T429_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Peptidil-prolil isomerase
C6T4H7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T4R9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T4S8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T5K2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T5P6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T752_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T8Z4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Transferase
C6T9G9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T9Y2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TAC6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TBY9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TC84_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Serina/treonina fosfatase
C6TCR6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Glicosil hidrolase
C6TEB7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação a sequência de DNA específica
C6TEC1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Epsina
C6TEF4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação a sequência de DNA específica
C6TES2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Peroxi-redoxina-like
C6TFE3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TFG8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TGE7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TI29_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína integral de membrana
C6TI57_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação ao DNA

Acesso	Descrição	Processo biológico ou função
C6TJ14_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Citocinina desidrogenase
C6TK59_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TL91_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TM75_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Hidrolase
C6TMW5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cobre
C6TN38_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida na elongação da tradução
C6TNT2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida na elongação da tradução
C6TNU2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida na elongação da tradução
C6SXF1_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Fosfatase
C6T225_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína transportadora (Rab)
C6T6P4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TBN4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TIS7_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação ao DNA/cromatina
C6TIU4_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TKD6_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida

Tabela Suplementar 6 - Prováveis funções das proteínas identificadas como putativas para a Linhagem 37 na Tabela Suplementar 3.

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6T3D0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TFF3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TEU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TMG8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T6C0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TFW0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6THD9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Subunidade de proteína carreadora de carboxil-biotina
C6TMA8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SZN7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína carreadora de elétrons
C6TBZ3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Tiol oxidase
C6TE09_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína envolvida no dobramento protéico
C6SZC8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de resposta ao estresse
C6TFH8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SYV5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SVE3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína ribossômica
C6T1H9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SXM9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína transportadora de prótons (ATPase)
C6T1C0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TFY7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	Proteína envolvida no dobramento protéico

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6F121_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	Oxidorrredutase
C6TM48_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6TJC8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Transferase envolvida na síntese de celulose
C6TIB6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T699_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TED6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de ligação a tRNA
C6T8X0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T3A2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína relacionada à patogênese
C6TIU2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Endopeptidase aspártica
C6TFI0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6THG3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T416_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TJP9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Repetição WD40
C6TH15_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína reguladora do sistema de transferência de fosfato
C6TAX7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína relacionada ao estresse hídrico
C6T729_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Domínio Sec14p-like
C6SXA1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Domínio p23-like
C6T049_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida no metabolismo de lipídeos
C6TM06_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T2W1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Chaperona
C6T488_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína inibidora de peptidase
C6TJD6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Transferase

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6TB24_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6SY42_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida na elongação da tradução
C6THU7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6TBU8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de membrana
C6TDF9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	ABHidrolase
C6T8C0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Cisteína peptidase
C6T085_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Peptidase
C6THR5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de membrana do peroxissomo
C6TG11_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6THM9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6SVE0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida na tradução
C6TI71_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta à dessecação
C6TM01_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase
C6T813_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TCS3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína com atividade frutose-bifosfato aldolase
C6SVX0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6T0F5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína bola-like
C6TEI0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ácidos nucléicos
C6THC5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TL84_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoredutase

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6T938_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína reguladora da transcrição
C6T4Q6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6TN22_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Citocromo-c oxidase
C6SWV4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína integral de membrana
C6T3C7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína carreadora de elétrons/oxidoreductase de pontes dissulfeto
C6THV5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TC35_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ácidos nucleicos
C6T9B7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de íons metálicos
C6T2U1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SZF9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TFC7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TK98_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Oxidoreductase
C6TKA5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SVX3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de resposta ao estresse
C6T4K6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Citocromo-c oxidase (mitocondrial)
C6SX96_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6T5U0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6THP5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SVR8_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T2L4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6TKX2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6TED3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida

Acesso	Descrição	Provável processo biológico ou função
C6TEV0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ferro
C6SZI1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína LSM (manutenção da estrutura do RNA)
C6T0B7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína do complexo de clivagem de glicina
C6SWI1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína heat shock
C6SVC4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	O-metiltransferase
C6TNH2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de cálcio
C6T5T0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6T377_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Serina/treonina fosfatase
C6TD94_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Transferase intramolecular
C6T5K7_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ribossômica
C6TNJ7_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína ligadora de ácidos nucleicos
C6TNX6_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína de função desconhecida
C6SVG1_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Co-fator de transcrição da RNA polimerase II
C6T9R0_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Quinase serina/treonina
C6SY66_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	Proteína envolvida no transporte protéico
Q49N13_SOYBN	Putative receptor like protein kinase 3 OS Glycine max PE 2 SV 1	Quinase serina/treonina
Q49N12_SOYBN	Putative receptor like protein kinase 2 OS Glycine max PE 2 SV 1	Quinase serina/treonina
Q84L90_SOYBN	Putative receptor like protein kinase RPLK3 Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	Quinase

Tabela Suplementar 7 – Proteínas identificadas em sementes não transformadas de soja (cultivar BR16) – controle negativo – e seus respectivos números de acesso (Accession) e o quociente dos critérios preenchidos e estabelecidos no processo de indentificação da proteína (Score).

Accession	Description	Score
C6T9L1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	61835.887
GLYG1_SOYBN	Glycinin G1 OS Glycine max GN GY1 PE 1 SV 2	73159.25
Q9S9D0_SOYBN	Glycinin G4 subunit OS Glycine max PE 3 SV 1	32877.5
Q4LER6_SOYBN	Beta conglycinin alpha prime subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	81583.47
GLCB_SOYBN	Beta conglycinin beta chain OS Glycine max GN CG 4 PE 1 SV 1	60488.17
GLCA_SOYBN	Beta conglycinin alpha chain OS Glycine max PE 2 SV 2	117191.37
Q4LER5_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	101746.414
SBP_SOYBN	Sucrose binding protein OS Glycine max GN SBP PE 1 SV 1	30166.205
LEC_SOYBN	Lectin OS Glycine max GN LE1 PE 1 SV 1	15049.71
Q70EM0_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 3 SV 1	27188.822
GLYG2_SOYBN	Glycinin G2 OS Glycine max GN Gy2 PE 1 SV 2	43148.69
Q9ATY1_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max PE 4 SV 1	33204.543
Q39805_SOYBN	Dehydrin like protein OS Glycine max PE 2 SV 1	36719.043
7SB1_SOYBN	Basic 7S globulin OS Glycine max GN BG PE 1 SV 2	17609.98

IBBC2_SOYBN	Bowman Birk type proteinase inhibitor C II OS Glycine max PE 1 SV 2	15275.472
Q549Z4_SOYBN	Proglycinin A2B1 OS Glycine max PE 2 SV 1	47534.906
P93707_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN Gly A3B4 PE 2 SV 1	53254.375
C6TKH0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	21752.877
2SS_SOYBN	2S albumin OS Glycine max PE 1 SV 2	17870.51
PHS2_RABIT	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE MUSCLE FORM EC	11117.536
O22121_SOYBN	Beta subunit of beta conglycinin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 2	71885.51
OLEO1_SOYBN	P24 oleosin isoform A OS Glycine max PE 2 SV 2	17248.264
Q9XET1_SOYBN	Seed maturation protein PM31 OS Glycine max GN PM31 PE 2 SV 1	20339.475
O64458_SOYBN	Gly m Bd 30K allergen OS Glycine max GN P34 PE 2 SV 1	15085.75
Q9SEK9_SOYBN	Seed maturation protein PM25 OS Glycine max GN PM25 PE 2 SV 1	33808.33
Q39870_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN lox2 PE 2 SV 1	15887.289
Q39853_SOYBN	Soybean beta conglycinin alpha subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	53253.03
B3TDK6_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	13055.989
GLCAP_SOYBN	Beta conglycinin alpha chain OS Glycine max GN CG 1 PE 2 SV 1	51623.05
ITRA_SOYBN	Trypsin inhibitor A OS Glycine max GN KTI3 PE 1 SV 2	31733.28

KTI1_SOYBN	Kunitz type trypsin inhibitor KTI1 OS Glycine max GN KTI1 PE 2 SV 1	26888.88
Q7GC77_SOYBN	Glycinin A3B4 subunit OS Glycine max PE 1 SV 1	57683.184
IBBD2_SOYBN	Bowman Birk type proteinase inhibitor D II OS Glycine max PE 1 SV 2	5102.2847
7SBG2_SOYBN	Basic 7S globulin 2 OS Glycine max PE 1 SV 1	9070.589
Q50JD8_SOYBN	Beta conglycinin beta subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	59318.676
Q39858_SOYBN	Soybean glycinin A3 B4 subunit Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	26800.39
C6SVM2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	13294.724
Q39871_SOYBN	Late embryogenesis abundant protein OS Glycine max GN MP2 PE 2 SV 1	7235.989
C3VHQ8_SOYBN	Oleosin OS Glycine max PE 2 SV 1	13146.05
OLEO2_SOYBN	P24 oleosin isoform B OS Glycine max PE 2 SV 1	11428.446
C6T588_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	19210.164
C6T8W9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	6202.7437
C6T0B5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2894.6562
Q9SB12_SOYBN	Glycinin OS Glycine max PE 3 SV 1	26660.055
Q9SEL0_SOYBN	Seed maturation protein PM24 OS Glycine max GN PM24 PE 2 SV 1	13095.113
Q84V19_SOYBN	Sucrose binding protein 2 OS Glycine max GN SBP2 PE 2 SV 1	12946.077

C6K8D1_SOYBN	Seed biotinylated protein 68 kDa isoform OS Glycine max PE 2 SV 1	4373.526
B3TDK4_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	14950.3955
Q43452_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN Gy4 PE 3 SV 1	33182.56
C6SWW4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	26497.498
Q9XET0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN PM30 PE 2 SV 1	9300.778
Q9S7H2_SOYBN	Ubiquitin OS Glycine max GN SUBI 2 PE 4 SV 1	13820.8
Q2I0H4_SOYBN	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase OS Glycine max GN GAPC1 PE 2 SV 1	8051.307
C6EVF9_SOYBN	Elongation factor 1 alpha OS Glycine max GN EF 1A PE 2 SV 1	4707.3135
C6T9Z5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	9234.599
KTI2_SOYBN	Kunitz type trypsin inhibitor KTI2 OS Glycine max GN KTI2 PE 2 SV 1	3557.5085
Q7XAC5_SOYBN	Embryo specific urease OS Glycine max PE 2 SV 1	1091.2356
Q8GV25_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	3534.3147
B2YDQ6_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	6386.0376
C6T9C2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	852.6173
Q42447_SOYBN	Maturation protein OS Glycine max GN MAT1 PE 2 SV 1	5782.6304
O23957_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN GmPM12 PE 2 SV 1	14317.746

A1KR24_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN LEA 2 D11 PE 3 SV 1	3414.7156
Q93VL9_SOYBN	Beta conglycinin beta subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	67684.38
LOX3_SOYBN	Seed lipoxygenase 3 OS Glycine max GN LOX1 3 PE 1 SV 1	9506.548
C6TCF1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1635.839
AMYB_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN BMY1 PE 1 SV 3	3036.839
C6T0L2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	8748.807
C6T7M2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2799.9102
C6TBB3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	14133.954
Q9SEK8_SOYBN	Seed maturation protein PM26 OS Glycine max GN PM26 PE 2 SV 1	20198.174
Q9SWB2_SOYBN	Seed maturation protein PM41 OS Glycine max GN PM41 PE 4 SV 1	7562.4336
LOX1_SOYBN	Seed lipoxygenase 1 OS Glycine max GN LOX1 1 PE 1 SV 2	19224.88
O23959_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max GN GmPM13 PE 2 SV 1	3464.6238
C6T1Q7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	571.6007
B1Q2X4_SOYBN	Protein disulfide isomerase OS Glycine max GN PDIL 1 PE 3 SV 1	2350.0051
Q9S7Z9_SOYBN	Hydrophobic seed protein OS Glycine max GN HPS PE 4 SV 1	13724.53
Q6RIB7_SOYBN	Enolase OS Glycine max PE 2 SV 1	3011.928

C6SZ18_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	2167.823
C6SYU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1129.2495
C6SVR5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	3352.7117
C6T1V2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2369.106
C6TB70_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2606.4138
C6SZ13_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2223.286
B2YDR0_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	7124.432
Q9XES8_SOYBN	Seed maturation protein PM28 OS Glycine max GN PM28 PE 4 SV 1	5880.5684
C6TMG1_SOYBN	Fructose bisphosphate aldolase OS Glycine max PE 2 SV 1	1206.5055
Q42795_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max PE 1 SV 1	2963.3552
Q9LLQ6_SOYBN	Seed maturation protein PM34 OS Glycine max GN PM34 PE 2 SV 1	5597.1587
Q852U4_SOYBN	Glycinin A1bB2 784 OS Glycine max PE 2 SV 1	9847.139
Q39801_SOYBN	51 kDa seed maturation protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2799.0564
C6SWV3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1076.3029
C6SXU0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	819.7554
C6SZ11_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2339.0803

C6T699_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2279.9353
C6TKW9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1826.4847
Q8LJR2_SOYBN	Alcohol dehydrogenase 1 Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	1423.5684
C7EA91_SOYBN	Mutant glycinin subunit A1aB1b OS Glycine max GN Gy1 PE 3 SV 1	54231.402
O22639_SOYBN	Endoplasmic reticulum HSC70 cognate binding protein OS Glycine max GN BIP PE 2 SV 1	660.2098
C6T072_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2005.5414
C6TDF5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	9861.715
C7EA92_SOYBN	Mutant glycinin subunit A1aB1b OS Glycine max GN Gy1 PE 2 SV 1	53598.11
C6TB67_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1055.949
Q71EW8_SOYBN	Methionine synthase OS Glycine max PE 2 SV 1	475.15787
Q9ZT38_SOYBN	Alcohol dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN Adh 2 PE 3 SV 1	1727.5941
C6SZK3_SOYBN	Glutathione peroxidase OS Glycine max PE 2 SV 1	1065.458
Q3HM29_SOYBN	Hydrophobic seed protein Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	12104.027
HSP70_SOYBN	Heat shock 70 kDa protein OS Glycine max GN HSP70 PE 3 SV 1	1063.3087
Q38IW8_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	1344.8411
Q948Y0_SOYBN	Beta conglycinin alpha prime subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	68985.695

Q9SPJ6_SOYBN	Maturation protein pPM32 OS Glycine max GN PM32 PE 2 SV 1	1665.0293
C6TA60_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	843.1351
B6EBD6_SOYBN	Heat shock protein 90 2 OS Glycine max PE 2 SV 1	404.14096
C6TB80_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1118.9237
C6SW66_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	655.6688
O81279_SOYBN	Malate dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN Mdh 2 PE 3 SV 1	1200.5133
Q6I8E6_SOYBN	Pseudo atpA Fragment OS Glycine max PE 3 SV 1	436.17905
Q3V5S6_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	113736.34
C6T920_SOYBN	Phosphoglycerate kinase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	950.75793
O82478_SOYBN	Alcohol dehydrogenase Adh 1 Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	1044.5076
Q7M1N5_SOYBN	Glycinin A1aB1b Fragments OS Glycine max PE 4 SV 1	30251.69
C6T7Y1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	743.5504
Q96440_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max GN Soy69 PE 3 SV 1	822.5314
B6EBD7_SOYBN	Heat shock protein 90 1 OS Glycine max PE 2 SV 1	403.78287
C6SWE0_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1455.1606
Q9SP11_SOYBN	Sucrose binding protein homolog S 64 OS Glycine max GN SBP PE 2 SV 1	9170.763

Q07CZ3_SOYBN	Glyceraldehyde 3 dehydrogenase C subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	6780.631
C6TD82_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1252.8473
C6TN36_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5490.1484
GLYG3_SOYBN	Glycinin G3 OS Glycine max GN GY3 PE 3 SV 1	10235.066
C6TD56_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5355.602
Q94LX2_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 4 SV 1	95877.62
O22120_SOYBN	Alpha subunit of beta conglycinin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 2	81614.086
Q0MUU5_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	74319.48
Q7XXT2_SOYBN	Prepro beta conglycinin alpha prime subunit OS Glycine max PE 1 SV 1	74382.305
Q9FZP9_SOYBN	Alpha subunit of beta conglycinin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	73294.695
Q84UB3_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit Fragment OS Glycine max GN GM7S PE 2 SV 1	61664.64
C0KG62_SOYBN	Mutant glycinin A3B4 OS Glycine max PE 2 SV 1	47409.22
P93708_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN Gly A3B4 PE 2 SV 1	48482.457
Q7M210_GLYSO	Glycinin A3B4 Plasmid pSPGL1 Fragment OS Glycine soja PE 3 SV 1	34459.22
Q7M211_GLYSO	Glycinin A3B4 Plasmid pSPGD41 Fragment OS Glycine soja PE 3 SV 1	33807.07
GLYG4_SOYBN	Glycinin G4 OS Glycine max GN GY4 PE 1 SV 1	38236.984

Q948X9_SOYBN	Beta conglycinin alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	42616.87
Q39816_SOYBN	7S storage protein alpha subunit OS Glycine max PE 2 SV 1	38036.965
Q9SB11_SOYBN	Glycinin OS Glycine max GN A5A4B3 PE 2 SV 1	33376.832
C6T488_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	33715.81
Q39898_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max GN Ti a PE 2 SV 1	30969.166
Q94IA1_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max GN Tie PE 4 SV 1	30260.74
Q70EL8_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 4 SV 1	26450.19
Q39876_SOYBN	Maturation associated protein OS Glycine max GN MAT9 PE 2 SV 1	26468.58
GLYG5_SOYBN	Glycinin OS Glycine max PE 1 SV 1	24080.46
Q76B18_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max GN Tic PE 4 SV 1	23410.588
C6T7B0_SOYBN	Putative uncharacterized protein Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	17310.586
Q9LD16_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor 3 OS Glycine max PE 4 SV 1	19621.58
Q5K3Q9_SOYBN	Putative dehydrin Fragment OS Glycine max GN lea8 PE 4 SV 1	19580.225
Q39899_SOYBN	Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max GN Ti b PE 2 SV 1	17904.01
ITRB_SOYBN	Trypsin inhibitor B OS Glycine max PE 1 SV 1	17904.01
B3TDK5_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	13065.267

Q53WV6_SOYBN	Napin type 2S albumin 3 OS Glycine max PE 2 SV 1	16279.633
LOX2_SOYBN	Seed lipoxygenase 2 OS Glycine max GN LOX1 2 PE 2 SV 1	12384.863
C6SYA7_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	13708.72
C6SX26_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 3 SV 1	14279.644
HPSE_SOYBN	Hydrophobic seed protein OS Glycine max PE 1 SV 1	9672.514
P34_SOYBN	P34 probable thiol protease OS Glycine max PE 1 SV 1	10839.653
Q6V7V6_SOYBN	34 kDa maturing seed vacuolar thiol protease Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	10516.632
P93165_SOYBN	Em protein OS Glycine max PE 4 SV 1	12188.017
Q9ATY0_SOYBN	Truncated Kunitz trypsin inhibitor OS Glycine max PE 4 SV 1	8901.763
Q852U5_SOYBN	Glycinin A1bB2 445 OS Glycine max PE 2 SV 1	9789.7
Q39875_SOYBN	Soybean lipoxygenase 1 Fragment OS Glycine max PE 3 SV 1	5703.5215
Q9AVK8_SOYBN	Allergen Gly m Bd 28K Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	7654.1777
Q39874_SOYBN	Lipoxygenase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	5733.008
B2YDQ8_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	6204.5215
B2YDQ7_SOYBN	Gly m Bd 28K allergen Fragment OS Glycine max PE 4 SV 1	5960.59
Q43709_SOYBN	Bowman Birk proteinase iso inhibitor D II OS Glycine max GN GB D II PE 3 SV 1	4790.417

Q5K3R0_SOYBN	Putative dehydrin Fragment OS Glycine max GN lea10 PE 4 SV 1	4577.385
C6TCK9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	4844.537
C6TFW4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	8335.095
C6T7Y4_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5157.817
Q8LJU1_SOYBN	PR10 like protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5465.482
C6T1G1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	5465.482
SAM22_SOYBN	Stress induced protein SAM22 OS Glycine max PE 1 SV 1	5465.482
C6TAX1_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	4393.807
SBP65_SOYBN	Seed biotin containing protein SBP65 OS Glycine max GN SBP65 PE 1 SV 1	4158.4243
Q588Z3_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyDam PE 2 SV 1	3386.0781
EF1A_SOYBN	Elongation factor 1 alpha OS Glycine max GN TEFS1 PE 3 SV 2	6774.689
Q9FEZ8_SOYBN	Stress induced protein SAM22 like Fragment OS Glycine max GN dd4 62 PE 2 SV 1	5176.228
PM36_SOYBN	Seed maturation protein PM36 OS Glycine max GN PM36 PE 2 SV 1	2995.7097
Q45UE7_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max PE 2 SV 1	2980.0283
Q588Z5_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyKza PE 2 SV 1	3205.0166
Q588Z4_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyTkm2 PE 2 SV 1	3327.2205

Q588Z6_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max GN Gm BamyTkm1 PE 2 SV 1	3036.839
Q43453_SOYBN	G max mRNA from stress induced gene H4 OS Glycine max PE 2 SV 1	3637.96
Q4U3W3_SOYBN	Beta amylase OS Glycine max PE 3 SV 1	2403.3884
C6T080_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	3003.059
C6T5M5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	3003.059
C6SXX2_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	3003.059
UBIQ_SOYBN	Ubiquitin OS Glycine max GN SUBI 1 PE 3 SV 1	3003.059
C6T4R9_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	3003.059
O81975_SOYBN	Polyubiquitin Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	3003.059
C6TGK5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 4 SV 1	3003.059
Q8GV24_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	2549.465
NDK1_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase 1 OS Glycine max PE 2 SV 1	2549.465
Q7XAW0_SOYBN	Lea protein OS Glycine max GN ZLDE 2 PE 2 SV 1	3083.3054
Q70EL7_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 3 SV 1	3957.4521
Q70EL9_SOYBN	Dehydrin OS Glycine max GN lea D 11 PE 3 SV 1	3064.7024
O04299_SOYBN	Elongation factor 1 alpha Fragment OS Glycine max GN TefS1 PE 4 SV 1	3645.3855

C6T049_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	2111.8342
Q43440_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN vlxC PE 2 SV 1	2017.4977
O49222_SOYBN	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase Fragment OS Glycine max GN GAPDH PE 2 SV 1	2567.1125
Q39873_SOYBN	Lea protein OS Glycine max PE 2 SV 1	1793.1864
Q9SPB8_SOYBN	Malate dehydrogenase OS Glycine max GN Mdh1 PE 3 SV 1	1240.712
C6SYC6_SOYBN	Nucleoside diphosphate kinase OS Glycine max PE 2 SV 1	1331.376
C6SZX7_SOYBN	Glutathione peroxidase OS Glycine max PE 2 SV 1	967.41156
Q42780_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN lox7 PE 2 SV 1	1224.9177
B3TDK8_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	1219.7036
B3TDK7_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	1219.7036
Q43438_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 2 SV 1	1219.7036
Q43446_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN vlxB PE 1 SV 1	1219.7036
LOX4_SOYBN	Lipoxygenase 4 OS Glycine max GN LOX1 5 PE 1 SV 1	1219.7036
LOXX_SOYBN	Seed lipoxygenase OS Glycine max GN LOX1 4 PE 1 SV 1	1094.3153
Q6GW08_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	1297.8257
C6T7I4_SOYBN	Malate dehydrogenase OS Glycine max PE 2 SV 1	911.9927

Q41244_SOYBN	Lipoxygenase Fragment OS Glycine max GN loxA PE 2 SV 1	954.05475
Q587K1_SOYBN	BiP OS Glycine max GN Gm bip PE 2 SV 1	642.22174
Q39804_SOYBN	BiP isoform B OS Glycine max PE 2 SV 1	642.22174
Q9ATB8_SOYBN	BiP isoform D Fragment OS Glycine max GN BiPD PE 3 SV 1	642.22174
Q39830_SOYBN	BiP isoform A OS Glycine max PE 2 SV 1	572.775
B3TDK9_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max PE 3 SV 1	786.2331
C6T6J1_SOYBN	Triosephosphate isomerase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	930.1411
C6TKJ5_SOYBN	Triosephosphate isomerase OS Glycine max PE 2 SV 1	1184.8795
Q9ZNZ4_SOYBN	Napin type 2S albumin 1 OS Glycine max PE 2 SV 1	631.8608
A7LCD5_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN LOX9 PE 2 SV 1	915.791
C6TJM1_SOYBN	Fructose bisphosphate aldolase OS Glycine max PE 2 SV 1	290.93054
Q9ZTY1_SOYBN	35 kDa seed maturation protein OS Glycine max GN pGmPM18 PE 2 SV 1	805.0115
Q9ARI1_SOYBN	Lipoxygenase Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	283.4324
Q39803_SOYBN	BiP isoform C Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	244.88939
A7LCD6_SOYBN	Lipoxygenase OS Glycine max GN LOX10 PE 2 SV 1	232.30185
Q2XQG7_SOYBN	Pathogenesis related protein PR 10 Fragment OS Glycine max PE 2 SV 1	1817.0454

Q8W171_SOYBN	Cyclophilin OS Glycine max GN Cyp PE 2 SV 1	908.8907
C6TAA6_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	778.4336
C6TK76_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	626.1266
ACT1_SOYBN	Actin 1 OS Glycine max GN SAC1 PE 3 SV 2	626.1266
C7F8N8_SOYBN	Actin Fragment OS Glycine max PE 3 SV 1	618.06635
C6T1R3_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	507.4242
C6TFN5_SOYBN	Putative uncharacterized protein OS Glycine max PE 2 SV 1	466.08005
ATPAM_SOYBN	ATP synthase subunit alpha mitochondrial OS Glycine max GN ATPA PE 3 SV 1	414.81128