

Desarrollo y optimización del proceso de extracción de proteínas y electroforesis bidimensional en fruta de hueso

Esther Giraldo Ramos¹, Amelia Díaz Méndez¹, Alfredo García Sánchez²

¹ Departamento de Vegetales II. Instituto Tecnológico Agroalimentario (INTAEX) ² Centro de Investigación “Finca La Orden-Valdesequera”

La fruta de hueso es muy inestable y se deteriora muy rápido a temperatura ambiente. El almacenamiento a bajas temperaturas para prolongar su vida puede afectar negativamente a la calidad de la fruta, debido al desarrollo de desordenes fisiológicos, conocidos como daños por frío (DF) [1]. La incidencia de estos daños es mayor en unas variedades que en otras [2], por lo tanto su severidad parece tener un componente genético [3]. Conocer los procesos moleculares puede permitir diseñar procedimientos para inducir resistencia o disminuir la sensibilidad al DF. El estudio de la proteómica comparativa es cada vez más atractivo en la biología de plantas dada las amplias bases de datos de secuencia genómicas y EST que proporcionan grandes oportunidades para identificar proteínas. La electroforesis bidimensional (2D) constituye actualmente el método más eficiente para la separación de proteínas ya que permite separar cientos, incluso miles de proteínas en un solo experimento. En este trabajo se presenta la optimización de la extracción y separación de proteínas mediante geles bidimensionales a partir del problemático tejido de la fruta. Las proteínas fueron extraídas de la pulpa del melocotón y la nectarina mediante un método ya descrito [4] con ligeras modificaciones. Partimos de 5 gramos de polvo de pulpa de melocotón o nectarina, pulverizados en mortero con nitrógeno líquido, resuspendidos en 10 ml de tampón de extracción (100 mM TRIS pH 8.8, 5 mM EDTA, 20 mM DTT, 2 mM PMSF y 30% de sacarosa), más fenol saturado en TRIS (pH 8.8) en proporción 1:1 (v/v), mezclamos vigorosamente y se dejó reposar las muestras durante 10 minutos a 4°C antes de centrifugar (10.000g; 15 minutos; 4°C), se recuperó la fase fenólica se añadió 1:5 (v/v) volúmenes de Acetato Amónico 100 mM en metanol y se dejó a -20°C toda la noche. También se probó en este paso el empleo de ácido tricloroacético (ATC) en lugar de Acetato Amónico, sin embargo los resultados fueron decepcionantes. Tras la precipitación, las muestras fueron centrifugadas (10.000g; 15

minutos; 4°C), y el precipitado lavado 2 veces con acetona fría, y se dejó secar al aire para eliminar los restos de acetona. Finalmente el precipitado de proteínas se resuspendió en tampón de rehidratación (7 M Urea, 2 M thiurea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte, 40 mM DTT). Debido a la baja calidad de los geles, causados por la presencia de sales y contaminantes no proteínicos, se decidió el empleo del PlusOne 2-D Clean-Up kit. El precipitado limpio fue disuelto en tampón (7M Urea, 4% (p/v) CHAPS, 1% (v/v) tampón de inmovilización gradiente de pH 3-11 (GE Healthcare), 0,037 DTT y 0,002% (p/v) azul de bromofenol, conteniendo una tableta de Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche) por cada 10 ml de tampón). La concentración de proteínas extraídas fue determinado utilizando el PlusOne Quant Kit (GE Healthcare). En el Isoelectroenfoco, se utilizaron 150 mg de proteínas/ geles teñidos con plata y 300 mg/ geles teñidos con azul de Coomassie para la rehidratación pasiva de tiras de isoelectroenfoco (IEF) de 13 cm con pH 3-11 “no lineal” (al menos 12 horas). Tras la rehidratación se procedió al IEF a 100, 200, 500 y 1000 V durante 1 hora cada uno, un paso de gradiente hasta 8000 V durante 2:30 horas y 8000 V durante 1 hora en un Ettan IPGphor Manifold (GE Healthcare) a 20°C y con una corriente máxima de 50 uA/gel. A continuación las tiras fueron incubadas 30 minutos en Tampón de equilibrado (0,075 M Tris, 6 M urea, 29.3% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS y 0,002% (p/v) azul de bromofenol), los primeros 15 minutos con 0,065 M DTT y la segunda incubación con iodoacetamida (0,135 M). La electroforesis SDS PAGE se realizó en geles (20x20 cm) de poliacrilamida 12,5% (p/v) utilizando tampones [5] a 2-4 W por gel y 15°C durante toda la noche. Los geles fueron teñidos mediante las tinciones de plata, (silver-stain GE Healthcare) y azul Coomassie (GE Healthcare). Los geles obtenidos fueron escaneados y calibrados con el software labscan 6 (GH Healthcare) (Figuras 1 y 2). La mayoría de los protocolos de extracción incluyen un paso de

precipitación con ATC para incrementar la concentración de proteínas y ayudar a la eliminación de contaminantes [6], sin embargo en ciertas ocasiones, como es nuestro caso, provoca una co-extracción de contaminantes, este es el principal problema de los tejidos de fruta carnoso, que presentan un alto nivel tanto de polisacáridos de pared celular como de pectinas [7]. Una alternativa ya descrita [8] y adoptada por nuestro grupo en el protocolo de extracción fue solubilizar las proteínas con fenol y precipitar con acetato amónico. En este caso se consiguió una alta calidad y cantidad de extracción de proteínas libres de contaminantes. Ya que el fenol ofrece una mayor estabilidad proteica al minimizar la proteólisis durante la extracción [9]. Por otro lado el melocotón y la nectarina presentaron un comportamiento similar en la extracción de proteínas. La electroforesis 2D es actualmente el método de elección para los estudios de comparación de perfiles proteicos, ya que se trata de una técnica muy resolutive empleada frecuentemente en los análisis proteómicos, que permite la generación de datos fácilmente evaluables, así como su comparación cuantitativa [10].

Bibliografía

[1] Lill RE, O'Donoghue EM y King GA. Postharvest physiology of peach and nectarines. Horticultural Reviews 1989;11:413-452.
 [2] Lurie S y Crisosto CH. Chilling injury in

peach and nectarine. Postharvest Biol. Technol. 2005;37:195-208.

[3] Ogundiwin EA, Peace CP y Gradziel TM. Molecular genetic dissection of chilling injury in peach fruit. Acta Horticulturae 2007;738:633-638.
 [4] Renaut J, Lutts S, Hoffmann L, et al. Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. Plant Biol. 2004;6:81-90.
 [5] Laemmli UK. Cleavage Of Structural Proteins During Assembly Of Head Of Bacteriophage-T4. Nature 1970;227:680.
 [6] Santoni V, Bellini C y Caboche M. Use Of 2-Dimensional Protein-Pattern Analysis For The Characterization Of Arabidopsis-Thaliana Mutants. Planta 1994;192:557-566. [7] Saravanan RS y Rose JKC. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. Proteomics 2004;4:2522-2532.
 [8] Hurkman WJ y Tanaka CK. Solubilization Of Plant Membrane-Proteins For Analysis By Two-Dimensional Gel-Electrophoresis. Plant Physiol. 1986;81:802-806.
 [9] Schuster AM y Davies E. Ribonucleic-Acid And Protein-Metabolism In Pea Epicotyls .1. The Aging Process. Plant Physiol. 1983;73:809-816.
 [10] Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics 2002;2:3-10.

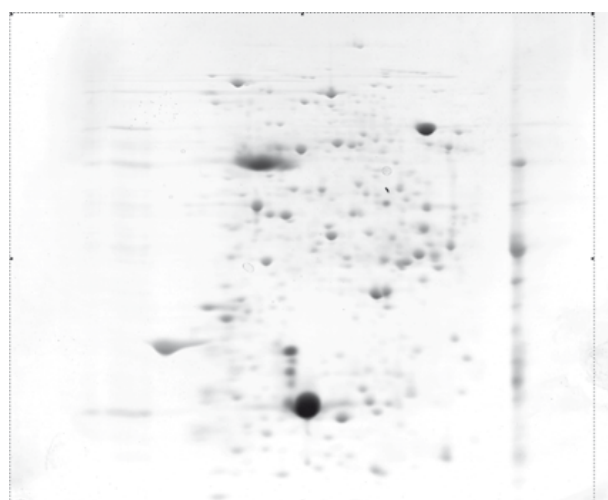


Figura 1. Gel teñido con Coomassie

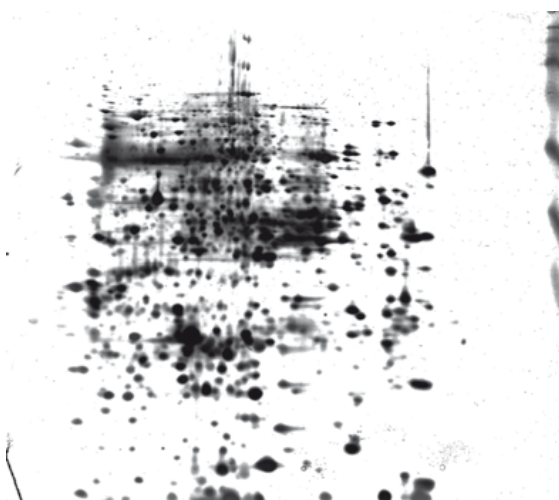


Figura 2. Gel teñido con Plata