

## Aplicación de iTRAQ para la caracterización del perfil proteómico en la pulpa de la baya de uva de mesa (*Vitis vinifera* cv. Moscatel de hamburgo)

Martínez, M. J.<sup>a</sup>; Sellés, S.<sup>a</sup>; Vilella-Antón, M. T.<sup>a</sup>; Pedreño-García, M. A.<sup>b</sup>; Sánchez del Pino, M. M.<sup>c</sup>; Valero, L.<sup>c</sup>; Elliot, M.<sup>d</sup>; Ohlund, L.<sup>d</sup> and Bru, R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas. Dpto. Agroquímica y bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, E-03080, teléfono: 965903400, fax: 965903880, e-mail: roque.bru@ua.es; <sup>b</sup>Dpto. Fisiología vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, E-30100; <sup>c</sup>Unidad de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe, 46013, Valencia; <sup>d</sup>UVic- Genome BC Proteomics Centre, Victoria BC Canada V8Z7X8

### Introducción

La baya de vid presenta una curva de crecimiento doble sigmoidal, con un primer período de formación de las bayas que termina en el envero, punto donde comienza la segunda fase de maduración de los frutos (Coombe, 1976). Se ha analizado cualitativamente mediante proteómica la pulpa de la baya (Sarry et al, 2004), pero no se tienen datos acerca del perfil cuantitativo de proteínas. Por tanto, nuestro trabajo es pionero en la aplicación de la técnica de proteómica cuantitativa iTRAQ para caracterizar el perfil de proteínas de las bayas de uva a lo largo de su desarrollo. Se han realizado dos experimentos iTRAQ, uno con estadíos maduros y otro con estadíos verdes con un punto común de pre-envero. La técnica iTRAQ nos va a permitir identificar proteínas marcadoras asociadas a los estadíos de desarrollo.

### Material y métodos

- *Material vegetal*. Los estadíos de las bayas de uva (*Vitis vinifera* Moscatel de Hamburgo) seleccionados fueron: cuajado, 4 mm, 7 mm, 15 mm, envero 100%, 110 g/l, 140 g/l.
- *Preparación de los extractos proteicos*. Para la extracción de proteínas aplicamos una modificación del protocolo desarrollado por Hurkman et al. basado en el uso del fenol tris saturado (Hurkman y Tanaka, 1986).
- *iTRAQ*. A partir de las muestras analizadas se precipitaron 100 µg con acetona y se procesaron aplicando una modificación del protocolo comercial recomendado por

Applied Biosystems (ABI). Se realizó una cromatografía de intercambio catiónico off-line. Y se analizaron entre 18-20 fracciones mediante LC-MS/MS en QSTAR Pulsar I (ABI). Finalmente, los datos se procesaron mediante ProteinPilot realizando las búsquedas contra la base de datos NCBIInr.

### Resultados

En el experimento iTRAQ de estadíos verdes se han identificado 542 proteínas con una confianza mayor del 90 %, encontrando 234 proteínas con ratios de expresión mayores de 1,5 veces. Y para los estadíos maduros se han identificado 1121 proteínas con una confianza mayor del 95%, encontrando 420 proteínas con ratios de expresión mayores de 1,5 veces.

### Conclusiones

Los períodos a lo largo del desarrollo de los frutos en los que se encuentra mayores cambios de expresión son al comienzo de la fase de formación de las bayas y desde su entrada en el envero hasta el inicio de la maduración.

### Bibliografía

- Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant. Physiol.* 1986, 81, 802-806.
- Sarry, J. E., Sommerer, N., Sauvage, F. X., Bergoin, A., et al., Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* 2004, 4, 201-215.