

de otras especies de decápodos comerciales próximas filogenéticamente. Estas proteínas sarcoplásmicas se separaron por electroforesis bidimensional, y se seleccionó un spot presente en los geles de todas las especies estudiadas, identificado como Arginina Kinasa. Este spot fue recortado de cada gel y digerido in situ con tripsina, (Jensen *et al.*, 1999), y una fracción de los péptidos resultantes de la digestión de cada spot fue analizada mediante espectrometría de masas con fuente de ionización tipo MALDI y analizador de tiempo de vuelo, para obtener su huella peptídica e identificar la presencia de péptidos específicos de *P. muelleri*. Una vez que estos péptidos fueron identificados, se analizó otra fracción mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas trampa iónica e ionización por electrospray (HPLC-ESI-IT MS) o mediante nanospray (nESI-IT MS) (Piñeiro *et al.*, 2001). Se obtuvieron así los espectros de fragmentación de los péptidos diferenciadores, que debido a la ausencia de información de *P. muelleri* en las bases de datos, fueron analizados mediante secuenciación *de novo* con interpretación manual, obteniéndose así su secuencia aminoacídica.

Resultados y conclusiones

Aunque se observó poca variabilidad entre las especies estudiadas, se detectaron y caracterizaron 3 péptidos presentes únicamente en *P. muelleri*. En la Figura 1 se presenta el espectro de fragmentación de

uno de ellos, de 1130.6 Da. Se concluye que estos péptidos pueden utilizarse como marcadores para identificar esta especie.

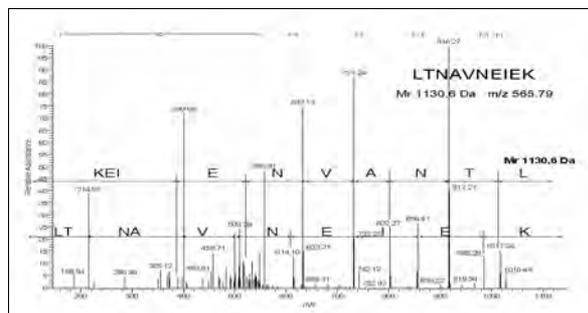


Fig. 1. Espectro MS/MS de un péptido específico de *P. muelleri*.

Bibliografía

- Secretaría General de Pesca Marítima. Resolución de 18 de enero de 2005, por la que se establece el listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España. *BOE*, 11 de marzo de 2005, 8711.
- Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A., Mann, M., en: Link, A. J. (Ed.). Humana Press, Totowa 1999, pp. 513-530.
- Piñeiro, C., Vázquez, J., Marina, A. I., Barros-Velázquez, J. et al. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1545-1552.

Proteómica de familias multigénicas de especies poco representadas en bases de datos: polifenol oxidasas de níspero (*Eriobotrya japonica*)

Sellés-Marchart S¹, Luque P², Casado-Vela J³, Martínez-Esteso MJ¹, Bru-Martínez R¹.

¹Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Campus de San Vicente del Raspeig. Apdo.99. E-03080 Alicante (Spain). Teléfono: +34 965903400, Fax: 965903880 e-mail:Roque.Bru@ua.es. ²Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis Avda. Américo Vespucio 49.41092 -Sevilla. Spain. ³Unidad de tecnología de proteínas. Centro Nacional de investigaciones oncológicas (CNIO). Madrid.

Introducción

El análisis de proteínas de especies poco representadas en bases de datos y la presencia de fami-

lias multigénicas en eucariotas dificultan e incluso previenen la identificación del origen génico de la proteína, el cual proporciona una información valiosa para comprender el proceso biológico en

el que participa. Nosotros hemos desarrollado una estrategia para solucionar este problema con la familia multigenica de polifenol oxidasa (PPO) en el fruto de níspero que combina fuentes proteómicas y bioinformáticas, las cuales nos permiten obtener información del origen génico de la PPO.

Material y métodos

Las fracciones de PPO- soluble, particulada y latente pura- del fruto de níspero se prepararon de acuerdo a (Sellés *et al.*, 2006). La extracción de proteínas se realiza en varios pasos usando TCA/DXC y fenol/acetato amónico/metanol. Las bandas de interés son digeridas con tripsina usando el equipo de digestión ProGest. Los péptidos extraídos se analizan por LC-MS/MS usando el sistema de Agilent 1100 series nano-HPLC en línea con un espectrómetro de trampa de iones XCT plus y una fuente nano-ESI. La separación de los péptidos se realiza en una columna de fase reversa Zorbax 300SB-C18. Los espectros de MS se adquieren en modo standard (26000 m/z por s), y MS/MS en modo ultrascan (8100 m/z por s). Para poder identificar las proteínas de nuestro interés se utiliza el programa informático Spectrum Mill Proteomics Workbench. Cada uno de los espectros se busca en NCBIInr en modo identidad utilizando la herramienta de búsqueda MS/MS y considerando un buen espectro el que presenta un score >13 y SPI >70%. A continuación los espectros restantes con score medio no interpretados por MS/MS, se someten a secuenciación de novo usando la herramienta del Spectrum Mill que usa

el algoritmo de la secuenciación de novo de Sherenga (Dancik y col., 1999). A las secuencias se les realiza un BlastP buscando frente a NCBIInr.

Resultados

La combinación de western-blot y la LC-MS/MS ha demostrado la presencia de dos parálogos de PPO cuyos productos proteicos están en el fruto de níspero en el estadio de recolección, uno homólogo a PPO 2 de *Malus domestica* (Acc. 14194273) y otro homólogo a PPO de *Prunus armeniaca* (Acc. 3282505). Además, se ha obtenido otro parálogo de PPO, homólogo a PPO de *Pyrus Pyrifolia* (Acc. 15487290), cuyo polipéptido no se encuentra en frutos en el momento de la recolección.

Conclusiones

El uso de secuencias de péptidos, deducidas de la interpretación por secuenciación de novo de los espectros de MS/MS para interrogar las bases de datos, permite la identificación de proteínas basadas en homología, incrementando notablemente la cobertura de secuencias.

Bibliografía

- Sellés, S., Casado-Vela, J., Bru, R. *Archiv. Biochem. Biophys.* 2006, 446, 175-185.
- Dancik, V., Clauser, K. R., Addona, T. A., Vath, J. E. et al. *J. Comp. Biol.* 1999, 6, 327-342.