

nas con Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1 v/v/v) [3]. La cantidad de proteínas recuperadas es baja.

3) Rotura con TRI Reagent (Sigma). La eficiencia de rotura es buena, sin embargo, la cantidad de proteínas recuperadas tras seguir el protocolo es baja.

Para aumentar la resolución y el enfoque de las proteínas en 2-DE se están ensayando, en los extractos totales potencialmente más idóneos para nuestro estudio, el detergente ASB-14, el DeStreak y el método de cargado de las tiras de IPG mediante "cup loading".

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SAF2008-00733 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

Métodos de enriquecimiento de glicoproteínas bacterianas para su posterior análisis y caracterización mediante espectrometría de masas

Lidia Gómez-Gascón, Alfonso Olaya, Manuel J. Rodríguez-Ortega

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba

Resumen

Una de las formas más comunes de modificaciones postraduccionales de proteínas es la glicosilación. Se estima que más del 50% de las proteínas conocidas, así como el 80% de las proteínas de membrana, están glicosiladas. En contra de lo que se creía, se ha demostrado que los procariotas también poseen glicoproteínas. Las glicoproteínas bacterianas parecen estar asociadas a la superficie del microorganismo. Este hecho sugiere por tanto que están implicadas en la interacción de la bacteria con el hospedador y por tanto puede existir una relación directa con la capacidad patógena del microorganismo. El objeto de este estudio consiste en desarrollar una metodología,

Referencias

- [1] Raj K. Upreti Manoj K., y V. Shankar. Bacterial glycoproteins: Functions, biosíntesis and applications. *Proteomics* 2003; 3: 363-379.
- [2] Balanova L., Hernychova L., Bilkova Z. Bioanalytical tools for the discovery of eukaryotic glycoproteins applied to the análisis of bacterial glycoproteins. *Expert Rev. Proteomics* 2009; 6(1), 75-85.
- [3] Antonioli P, Bachi A, Fasoli E., Righetti P. Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map análisis. *Journal of Chromatography A*, 1216 2009; 3606-3612.
- [4] Choe W. y Middelberg A. Selective Precipitation of DNA by Spermine during the Chemical Extraction of Insoluble Cytoplasmic Protein. *Biotechnol. Prog.* 2001; 17: 1107-1113.
- [5] Encheva V., Gharbia S., Wait R., Begum S. y Shah H. Comparison of extraction procedures for proteome analysis of *Streptococcus pneumoniae* and a basic reference map. *Proteomics* 2006; 6: 3306-3317.

mediante diversas cromatografías de afinidad, para el enriquecimiento y purificación de glicoproteínas de bacterias del género *Streptococcus*.

En contra de lo que estaba establecido hasta hace unos años, recientemente se ha demostrado que los procariotas producen glicoproteínas [1]. Estas parecen estar asociadas a la superficie del microorganismo, lo que sugiere que están implicadas en la interacción con el hospedador y por tanto, con la capacidad patógena del microorganismo. Hay dos tipos de glicosilación en procariotas: N-glicosilación, en la cual los glicanos están unidos a un residuo de asparagina, y O-glicosilación, en la cual está unido a un residuo de serina, treonina o tirosina [1,2].

Para el enriquecimiento de glicoproteínas, los métodos que hemos utilizado se basan en cromatografías de afinidad usando lectinas, así como la química de la hidrazida y del ácido aminofenilborónico [1,3].

Las lectinas son proteínas que se unen específicamente a motivos oligosacáridicos, reconociendo cada una a un subgrupo de especies de glicanos. Para asegurar el reconocimiento del mayor número de glicoproteínas, se está poniendo a punto una batería de lectinas: *Canavalia ensiformis lectin* (ConA), que reconoce principalmente residuos de α -manosa, y α -glucosa; *Ulex europaeus lectin* (UEA-1) reconoce residuos de α -L-fucosa; *Triticum vulgare lectin* (WGA) reconoce grupos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico; *Arachis hypogaea lectin* (AH) reconoce β -gal(1 \rightarrow 3) galNAc; y *Bandeiraea simplicifolia lectin* (BC-1) reconoce α -galactosa y α -galNAc.

Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon con gelatina al 3%, se hibridaron con cada una de las cinco lectinas, se incubaron con estreptavidina-HRP y se revelaron mediante quimioluminiscencia. [1,2,4]. Resultados preliminares han indicado hasta ahora que tanto la ConA como la AH son las lectinas que reconocen un mayor número de glicoproteínas ya que revelan un mayor número de bandas a partir de extractos totales (Figura 1).

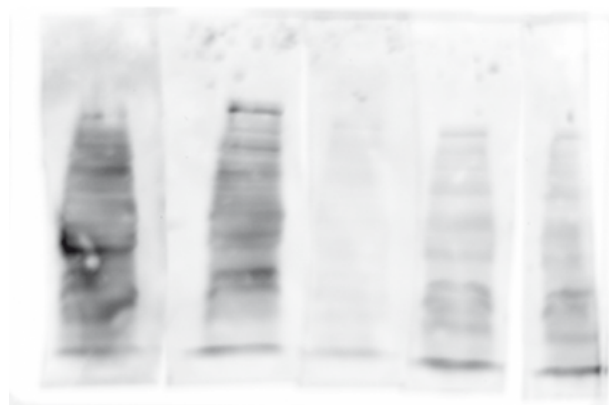


Figura 1. Blotting con lectinas de extractos totales de *Streptococcus pneumoniae*. Calles de izquierda a derecha: ConA, A.H., WGA, UEA-I, BC-I.

El segundo método de enriquecimiento está basado en la química de la hidrazida [6], mediante la cual dicho grupo funcional reacciona con los grupos cis-diol de los residuos de azúcares, previamente oxidados a aldehídos, para formar un enlace hidra-

zona. Para ello se está poniendo a punto una cromatografía con una resina de hidrazida (Bio-Rad). En primer lugar las muestras se oxidan con peryodato sódico, y después la muestra se hace pasar por la resina para permitir la formación de los enlaces hidrazona. El resto de proteínas no glicosiladas se eliminan mediante lavados. Posteriormente las glicoproteínas se digieren con tripsina y se recogen mediante lavados los péptidos generados, que corresponden a las proteínas glicosiladas, quedando los glicopéptidos unidos a la resina. Los N-glicopéptidos pueden recuperarse de la resina digiriendo con la glicosilasa PNGasa F, ya que esta enzima corta el sitio de unión del glicano a la asparagina. Para liberar los O-glicopéptidos se realiza β -eliminación, con dimetilamina al 26%, que convierte las serinas y treoninas glicosiladas en alanina y ácido 2-aminobutírico respectivamente [1-2-3,6]. Tras hacer pasar la tripsina por la resina para digerir las proteínas retenidas y analizar los péptidos mediante nano-LC/MS/MS, se identificaron muchas proteínas citoplasmáticas, en principio no esperadas.

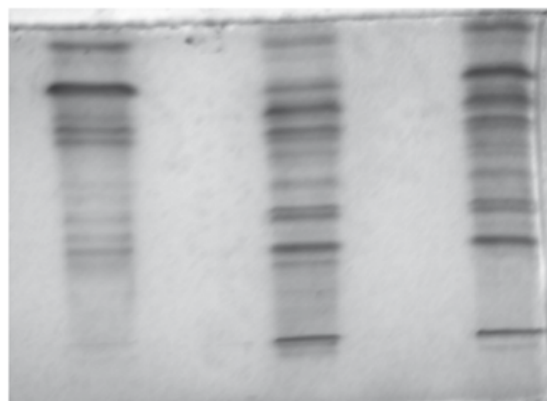


Figura 2. Gel teñido con Coomassie de proteínas obtenidas tras purificar con ácido aminofenilborónico extractos totales de *Streptococcus pneumoniae*. Calles de izquierda a derecha: eluido, flowthrough, extracto total.

El tercer método consistió en la cromatografía de afinidad usando la química del ácido aminofenilborónico, que forma enlaces covalentes con los grupos cis-diol de residuos de glucosa, manosa y galactosa en condiciones de alcalinidad, dando lugar a diésteres, siendo estos enlaces reversibles en condiciones ácidas. Se usó como tampón de unión a la resina taurina 50 mM /NaOH, pH 8.7 + 20 mM $MgCl_2$ y de elución igual al anterior pero con 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 [1, 2, 5]. El eluido se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (Figura 2), y las bandas se analizaron por MALDI-TOF MS, identificándose únicamente proteínas citoplasmáticas. Además, el eluido se digirió

en solución con tripsina y se analizó mediante ESI-MS/MS, dando también como resultado principalmente proteínas citoplasmáticas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SAF2008-00733 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

Referencia

- [1] Balonova L., et al. Bioanalytical tools for the discovery of eukaryotic glycoproteins applied to the analysis of bacterial glycoproteins. *Expert Rev. Proteomics* 2009; 6 (1): 75-85.
- [2] Capote F.P. y Sanchez J.C.. Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Wiley InterScience* 2009 ; DOI 10.1002/mas.20187.
- [3] Greis K. et al. Selective Detection and Site-Analysis of O-GlcNAc-Modified Glycopeptides by B-Elimination and Tandem Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 1996; 234: 38-49.
- [4] Kaji H., et al. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nature Biotechnology* 2003; v.21, n.6.
- [5] Mozano A., et al. Boronic acid-lectin affinity chromatography.1.Simultaneous glycoprotein binding with selective or combined elution. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 2097-2102.
- [6] Zhang H., et al. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 2003; v. 21, n. 6.

Análisis de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* en leche por ionización mediante desorción por láser asistida por matriz, acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF)

Isabel Sospedra, Carla Soler, Jose Miguel Soriano, Jordi Mañes

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universitat de València

Resumen

Las bacterias del género *Staphylococcus* son microorganismos de amplia distribución, causantes de numerosas intoxicaciones alimentarias debido, en gran medida, a su capacidad de producir enterotoxinas. La enterotoxina del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria. En el presente trabajo se desarrolla una técnica de análisis de muestras de leche por MALDI-TOF para la detección de la enterotoxina A estafilocócica. Este método presenta como ventajas sobre las técnicas actualmente utilizadas su gran especificidad y elevada rapidez. Los resultados obtenidos mostraron la efectividad de la extracción

utilizada demostrando la utilidad del método de análisis utilizado.

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena, de amplia distribución en la naturaleza, asociada a infecciones generalizadas y brotes alimentarios [1]. Algunas especies de estafilococos son productoras de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular (M_r 22-31.000) conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Estas enterotoxinas son causa de intoxicaciones alimentarias por la ingesta de productos contaminados, principalmente de origen cárnico y lácteo [2-3] destacándose la enterotoxina A [4], que es la que con mayor frecuencia se asocia a brotes de intoxicación alimentaria y que es extremadamente potente.