

Estudio comparativo de técnicas electroforéticas no desnaturalizantes para el análisis de complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*

Marzoa J., Sanchez.S, Abel A., Criado M.T., Ferreirós C.

Dep. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. USC

Introducción

Blue Native (BNE; Schägger 1991), Clear Native (CNE; Schägger 1994) y High Resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE; Wittig 2007) son técnicas analíticas no desnaturalizantes que permiten la separación de complejos proteicos en función de su tamaño sin alterar su estructura nativa, ya que utilizan detergentes suaves en la solubilización de los mismos. En la BNE se incluye el colorante aniónico Coomassie Blue G-250 tanto en la muestra como en el tampón de cátodo para conferir a los complejos la carga necesaria para su migración y evitar la formación de agregados. En la CNE no se emplea este colorante por lo que solo tendrán movilidad electroforética los complejos con carga negativa a pH neutro. En la hrCNE se utiliza una mezcla de detergentes neutros y aniónicos en el tampón de cátodo para provocar la formación de micelas que confieren a los complejos una carga negativa. Tras la separación nativa, una segunda dimensión en SDS-PAGE, permite la identificación e las subunidades que forman los distintos complejos. En este trabajo se compara el poder de resolución de cada una de las técnicas de separación y análisis de los complejos proteicos de membrana de *Neisseria meningitidis*.

Material y métodos

Para el análisis de los complejos se utilizaron vesículas de membrana externa (OMVs) de la cepa H44/76. Los complejos fueron extraídos de las OMVs utilizando ac. amino hexanóico. Posteriormente, la muestra se solubilizó con el detergente no iónico dodecyl- β -D-maltosido, eliminando el material no solubilizado mediante ultracentrifugación. El tratamiento de la muestra varió según el tipo de electroforesis. En la BNE, muestra y tampón de cátodo contienen Coomassie, al 0.5% y 0.002% respectivamente. En la CNE, ni la muestra ni el tampón de cátodo llevan colorante. En la hrCNE el

tratamiento de la muestra es igual que en la CNE, pero el tampón de cátodo contiene Dodecyl- β -D-maltosido 0.02% y Deoxicolato sódico 0.05%.

Resultados

Las principales diferencias encontradas entre los perfiles de las primeras dimensiones (fig. 1,A) se encuentran en los complejos comprendidos entre 130 y 230 KDa, correspondientes a complejos de porinas. BNE y hrCN ofrecen una buena resolución de los mismos, aunque se observan ciertas diferencias en sus pesos moleculares. En CNE no aparecen estos complejos sino uno de 350 KDa con muy baja definición, debido a la ausencia de un agente que confiera la carga negativa, necesaria para la migración hacia el ánodo. Las 2D en SDS-PAGE obtenidas a partir de las 1D nativas con BNE y hrCNE (fig.1, B y C) evidencian una mayor capacidad resolutive de la técnica hrCNE, ya que se consigue un muy buen enfoque de cada de las subunidades de los complejos proteicos, facilitando así su asignación a un determinado complejo.

Conclusión

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que hrCNE es la mejor técnica para la separación de complejos proteicos de membrana en su conformación nativa debido a su excelente enfoque y reproductibilidad.

Referencias

- Schägger H, Cramer W A, von Jagow G 1994. *Analytical Biochemistry* 217, 220-230.
- Schägger H, von Jagow G. 1991. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231
- Wittig I., Karas M, and Schägger H 2007. *Molecular & Cellular Proteomics*; 6 :1215-25.