



## Estandarización de la extracción y análisis de proteínas de frutos de zarzamora (*Rubus sp.*) por electroforesis bidimensional

Alonso-Ojeda B.C.\*, Valdés-Rodríguez S. E.° y Chávez-Bárceñas A.T.\*, \*UMSNH Fac. de Agrobiología "Presidente Juárez", Paseo Gral. Lázaro Cárdenas y Berlín S/N, Col. Viveros, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán. °Cinvestav-Irapuato Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato León, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, atchavez@umich.mx

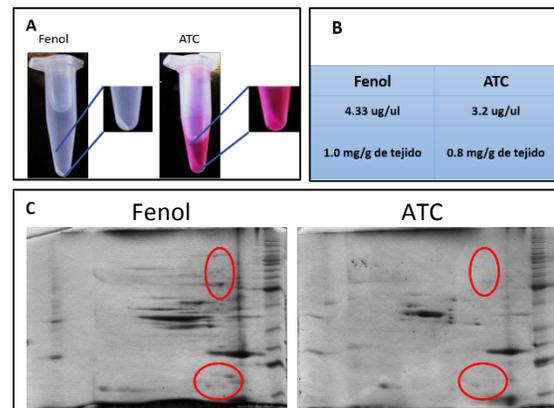
*Palabras clave: Proteínas, Isoelectroenfoque, Zarzamora.*

**Introducción.** La Proteómica es una herramienta que permite analizar e identificar proteínas que participan directamente en una condición celular precisa (1). La electroforesis bidimensional (2D) es una de las técnicas más utilizadas para estudios de proteómica, sin embargo para lograr obtener perfiles electroforéticos de calidad es necesario establecer las condiciones de extracción y análisis de las proteínas en geles 2D para cada especie y cada órgano de la planta. En nuestro trabajo de investigación se pretende analizar el proteoma de frutos de zarzamora (*Rubus sp.*) durante el proceso de maduración. Por lo cual, nuestro primer objetivo es estandarizar la metodología para la extracción de proteínas del fruto de zarzamora y su análisis por electroforesis 2D, las condiciones de electroforesis bidimensional para analizar el proteoma de frutos de zarzamora con maduración contrastante.

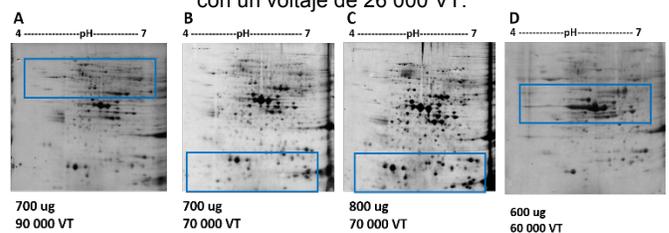
**Metodología.** Se evaluó la eficiencia de dos protocolos de extracción de proteínas totales) a partir de frutos de zarzamora 'Tupy'. Para lo cual 1 g de tejido se molió con nitrógeno líquido y se resuspendió con amortiguador de extracción, agregando solución saturada de fenol: Tris, pH 8.8 para el primer protocolo y ácido tricloroacético (ATC) en el segundo protocolo (2). Se cuantificó la proteína total por el método de Bradford (3). Para la electroforesis bidimensional (4) se utilizaron 100 ug de proteína total para geles de isoelectroenfoque de 7 cm y ensayos variados de 600 ug a 800 ug para geles de 18 cm, ambos con gradiente de pH inmovilizado de 4-7 (Bio-Rad). El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en el equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), utilizando un voltaje total de 26 000 VT para geles de 7 cm y de 60 000 VT a los 90 000 VT para geles de 18 cm. Las tiras fueron equilibradas con una solución de equilibrio con urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador Tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 30 %, DTT 1 % y Iodoacetamida 2.5 %. En la segunda dimensión se utilizaron las condiciones descritas por Laemmli (5). Los geles se tiñeron con Coomassie R350. Para la obtener las imágenes, los geles se escanearon en un densitómetro Amersham Biosciences. Para seleccionar las condiciones de la electroforesis bidimensional se tomó en cuenta, el enfoque de las manchas y la cantidad de manchas visualizadas en los geles.

**Resultados.** Se seleccionó el protocolo de extracción de proteínas con Fenol: Tris pH 8.8 ya que se obtuvo una mayor concentración de proteínas y mayor número de

manchas peptídicas en los geles bidimensionales (Fig. 1). Para la estandarización en geles de 18 cm se observó un mejor enfoque y mejor resolución en la separación de proteínas con 700 ug y un voltaje total de 70 000. Fig. 2.



**Fig. 1.** Comparación de protocolos de extracción de proteínas con Fenol y ATC. Precipitación de proteínas totales (A), Concentración de proteínas totales (B) y geles 2DE (C) de ambos protocolos. Los geles fueron cargados con 100 ug de proteína y se sometieron a una corrida con un voltaje de 26 000 VT.



**Fig. 2.** Patrón de separación de manchas proteicas bajo distintas condiciones de IEF. Las condiciones electroforéticas se describen debajo de cada gel 2DE.

**Conclusiones.** Se logró estandarizar las condiciones para la extracción y análisis de proteínas de frutos de zarzamora por electroforesis bidimensional

**Agradecimiento.** El trabajo fue desarrollado con apoyo del proyectos CIC-UMSNH No.15.11-2014.

**Bibliografía.** Hay un error en la numeración

1. Görg, A., W. Weiss, M. J. Dunn. (2004). *Proteomics*; 4: 3665-3688
2. Isaacson T., Damasceno MB C., Saravanan S R., He Y., Catalá C., Saladié M., Rose KC J. (2006) *Nat. Protocols* Vol.1 (2): 769-774.
3. Bradford M. M. (1976). *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
4. O'Farrell P. (1975) *The Journal of Biol. Chem.* Vol. 250 (10):400-4021.
5. Laemmli U.K. (1970) *Nature* 227:680-685