

Brisia Villalón, Blanca E. García, Rosalía Reynoso y Carlos Regalado
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro,
C.U. Cerro de las Campanas, Querétaro, Qro. 76010. Fax: (4)2156867
e-mail: brivill@hotmail.com; carlosr@sunserver.uaq.mx

Palabras clave: anticuerpos policlonales, reacciones cruzadas, Western blot

Introducción. La peroxidasa es una hemoproteína que cataliza reacciones de óxido-reducción; está ampliamente distribuida en hongos, plantas y animales. Es muy usada en kits para análisis clínicos, y útil en la preparación de anticuerpos conjugados con enzimas. Por sus considerables aplicaciones es preciso encontrar fuentes alternativas y métodos que proporcionen un buen rendimiento, de manera rápida y eficaz. Se ha reportado que anticuerpos policlonales contra una peroxidasa presentan reacción cruzada con otras isoenzimas de la misma fuente (1). Se observó una alta ineficiencia en la purificación usando una lectina inmovilizada (concanavalina-A). Entonces, una alternativa de purificación sería mediante anticuerpos policlonales contra una peroxidasa ya existente, purificada y caracterizada. Los anticuerpos purificados, unidos a una resina activada, se utilizarían en una cromatografía de inmunoafinidad para éste propósito.

El objetivo del presente trabajo fue la producción de anticuerpos policlonales contra dos isoenzimas de peroxidasa de nabo y determinar la existencia de reacción cruzada con estas isoenzimas y con una peroxidasa de brócoli.

Metodología. Se purificaron dos isoenzimas de peroxidasa (P1 y P2) de nabo (2) y de brócoli (3). Cuatro dosis de 5-10 µg de cada una de las isoperoxidasas de nabo fueron inoculadas quincenalmente en conejos New Zealand (4). El suero obtenido se purificó por precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 33% de saturación (4). Se hizo una transferencia semiseca de 1 µg de las peroxidasa purificadas de nabo y de brócoli de un gel de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) a membrana PVDF. Se realizó un Western blot con diluciones apropiadas del anticuerpo producido. La detección de proteína se realizó mediante un kit de quimioluminiscencia.

Resultados y Discusión. Todas las muestras desarrollaron señal a una dilución de anticuerpos de 1:16000; mostrándose en común la banda que corresponde al peso molecular (PM) de las peroxidasa contra las que se desarrolló el anticuerpo: 39 kDa para P1 y 36 kDa para P2. Para la peroxidasa de brócoli (PB) se observó una débil señal a un valor similar de PM, pero la señal más intensa se observó a un PM de 49 kDa. Después de SDS-PAGE no desnaturante, un zimograma mostró que solamente ésta banda tenía actividad apreciable de peroxidasa. Por lo tanto, la banda con menor intensidad para PB podría tratarse de alguna proteína contaminante ó con menor homología.

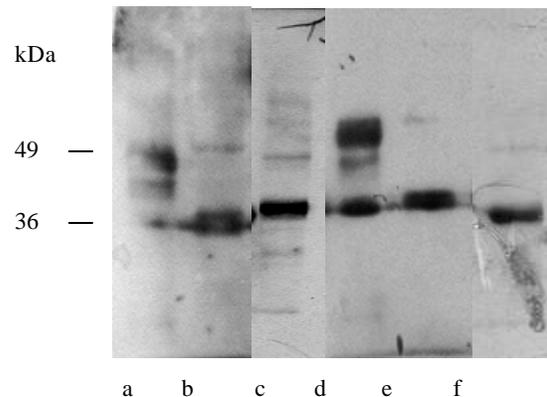


Fig 1. Western blot. a y d: peroxidasa de brócoli. b y f: isoperoxidasa de nabo P2. c y e: isoperoxidasa de nabo P1. a y c: reacción cruzada con anticuerpos para P2. d y f: reacción cruzada con anticuerpos para P1. b: reacción directa con anticuerpo para P2. e: reacción directa con anticuerpo para P1

Conclusiones. Las isoperoxidasas, P1, P2 y PB, comparten determinantes antigénicos estructuralmente relacionados, debido a que la respuesta a la reacción cruzada con los dos anticuerpos se presentó para las tres. Por lo que la posterior construcción de una columna de inmunoafinidad utilizando los anticuerpos producidos, es factible. La relación de mg de proteína obtenida por precipitación del suero por µg de proteína inyectada fue de 6.9 para P1 y 12.5 para P2, indicando un buen rendimiento en la producción de anticuerpos.

Agradecimientos. Trabajo financiado por CONACYT Ref. 31696-B.

Bibliografía.

- Lang, S., Hilgenfeldt, U y Mäder, M. (1990). Purification and immunological characterization of peroxidase-isoenzymes from *Nicotia tabacum*. *L. J. Plant Physiol.* **136**:494-498.
- Duarte-Vázquez, M, García-Almendárez, B, Regalado, C, Whitaker, J. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L.var. esculenta D.C.) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* **48**:1574-1579.
- García Padilla, S. (2000). Purificación de peroxidasa de brócoli (*Brassica olearacea* var. maratón) y estudios de termoestabilidad. Tesis de Licenciatura. UAQ.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, Seidmen, J.G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1995). Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York. Cap 11:26-27 .