

INFORME FINAL SDS-PAGE

PROFUNDIZACIÓN BIOLOGÍA MOLECULAR

Carlos Pedraza & María A. Sierra.

METODOLOGÍA

- Las muestras utilizadas fueron previamente mezcladas con Sample Buffer 2x y Azul de Bromofenol proporción 1:1. Estas se calentaron en baño maria a 80°C durante 3 minutos.
- En la cámara de electroforesis vertical se pusieron dos geles, se agregó el Buffer de corrida (Glicina+SDS) y se depositaron las muestras con volúmenes de 5uL de marcador HMW (Farmacia) y 10uL para cada muestra de extracto proteico de *E.coli*.
- En el primer gel se agregaron muestras diferentes de fracciones periplásmicas con pET 21d no recombinante y recombinantes para: CueO 1,4; CueOdD2; CueOΔD2.
- En el segundo gel se pusieron muestras de proteínas de fracciones periplásmicas y de sobrenadante a diferentes tiempos de expresión del clon CueOdD2 con 0.4mM IPTG a 0h, 1h, 3h, 6h y 24h.
- Los geles fueron a corridos a 100V y 20mA durante 2 horas.

- Una vez finalizada la corrida, se colorearon los geles con una solución de 0,25% Azul de Coomassie, 10% ácido acético y 50% metanol durante una hora y luego una decoloración con 7% ácido acético y 5% metanol overnight.
- Se realizó la observación de los geles bajo UV y se fotografiaron para ser analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1. Se muestran los geles revelados bajo UV.

Al observar la migración del marcador en ambos geles, se pudieron identificar las cinco bandas correspondientes a los pesos: 669, 440, 232, 140, 67 kDa. Sin embargo se apreció una mayor migración y menor intensidad de las bandas en el gel A.

En los carriles 2 y 5 no se encontraron bandas correspondientes a periplasma de *E.coli* ni de los plásmidos con los diferentes clones de CueO.

En el carril 3, se observaron tres bandas de aproximadamente 440, 232 y 140kDa, pero no se evidencia

presencia de CueO 1,4 que correspondería a un peso de 55kDa. En el carril 4, se observaron dos bandas de 600 y 140kDa, y no se observó presencia de CueOdD2 que correspondería a 35kDa.

Realizando una búsqueda de las proteínas correspondientes a estos pesos moleculares en las bases de datos EcoProDB, UniProtKB y EchoBASE, se encontró que el peso máximo es ≈ 150 kDa para proteínas presentes en *E.coli*. Por tanto la banda de 140kDa se podría atribuir a las proteínas PutA, RpoB, FtsK ó HerpA.

Sin embargo, se evidenciaron bandas de mayor peso en el gel, y ya que no se encontraron proteínas de un peso molecular mayor a 150kDa en las bases de datos y el frente de migración no alcanzó la totalidad del gel, sería indicio de un problema en la corrida con el tiempo de migración o el voltaje.

Por ende, no se podría hacer una comparación del peso molecular entre el marcador y las muestras del gel A.

En el gel B, se utilizó el mismo marcador y tampoco serviría de referencia para los pesos de las muestras. Sin embargo sí podemos observar algunas proteínas que se expresan a diferentes tiempos en *E.coli* en el periplasma y sobrenadante.

Los carriles 2 - 5 corresponden a extractos de *E.coli* con el clon CueOdD2 de fracciones periplásmicas y los carriles 6 – 10 de sobrenadante.

Para las fracciones periplásmicas se evidenció cómo las proteínas desde el tiempo 0h (Carril 2) hasta el tiempo 24h (Carril 5) fueron cambiando en su presencia e intensidad. Sin embargo en el carril 3 y 5 no hubo presencia de proteínas. Siendo un resultado poco concordante con lo esperado pues a medida que el tiempo transcurre, la cantidad de proteína presente en el periplasma debería cambiar progresivamente como se evidencia en la segunda banda del carril 4 (Fig.1, gel B, recuadro blanco) que no se encontraba en el carril 2, y no desaparecer de forma abrupta. Esto pudo haber sido resultado de la ausencia de muestra en el carril, si al momento de agregarla al pozo esta se salió.

En las muestras de fracciones de sobrenadante correspondientes a los carriles 7 y 9 no se observó resultado alguno. En el carril 6, se logra visualizar una banda de poca intensidad (Flecha amarilla) y esta va aumentando progresivamente en los carriles 8 y 10. De igual manera, se observa presencia de otras proteínas que cambian de intensidad a través del tiempo (Flechas verde y morada).

Cabe resaltar, que la mayor intensidad de las bandas se presentó en el carril 10 (24h); esto es lo esperado ya que este tiempo sería el resultado de la acumulación de proteínas expulsadas al medio por la célula.

Comparando la cantidad de proteínas que se observó en el periplasma y el sobrenadante, la presencia y cantidad de proteínas en el periplasma disminuyó a través del tiempo mientras que en el sobrenadante la fue aumentando progresivamente.

La explicación a esto podría ser que las proteínas observadas se producen dentro de la célula, y son expulsadas de la misma y por tanto encontradas en el sobrenadante (Koster *et al*, 2000). Además, si estas proteínas tienen actividad catalítica se esperaría que los picos de actividad varíen en el tiempo debido a su función y el sustrato que utilizan .

Dado que la actividad enzimática depende del medio en que estas se encuentren, los resultados esperados

concuerdan con lo observado siendo diferentes entre las fracciones y además de dentro de los tiempos de las mismas (Thanassi *et al*, 2000).

Finalmente, no se pudo determinar la presencia de ninguna de las variantes de CueO en *E.coli* al no tener ningún punto de referencia de peso molecular para menos de 55kDa.

Bibliografía

1. Koster M, Bitter W, y Tommassen J (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiology*
2. Thanassi DG, y Hultgren SJ (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 12:420-430.
3. Flores *et al* (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO.

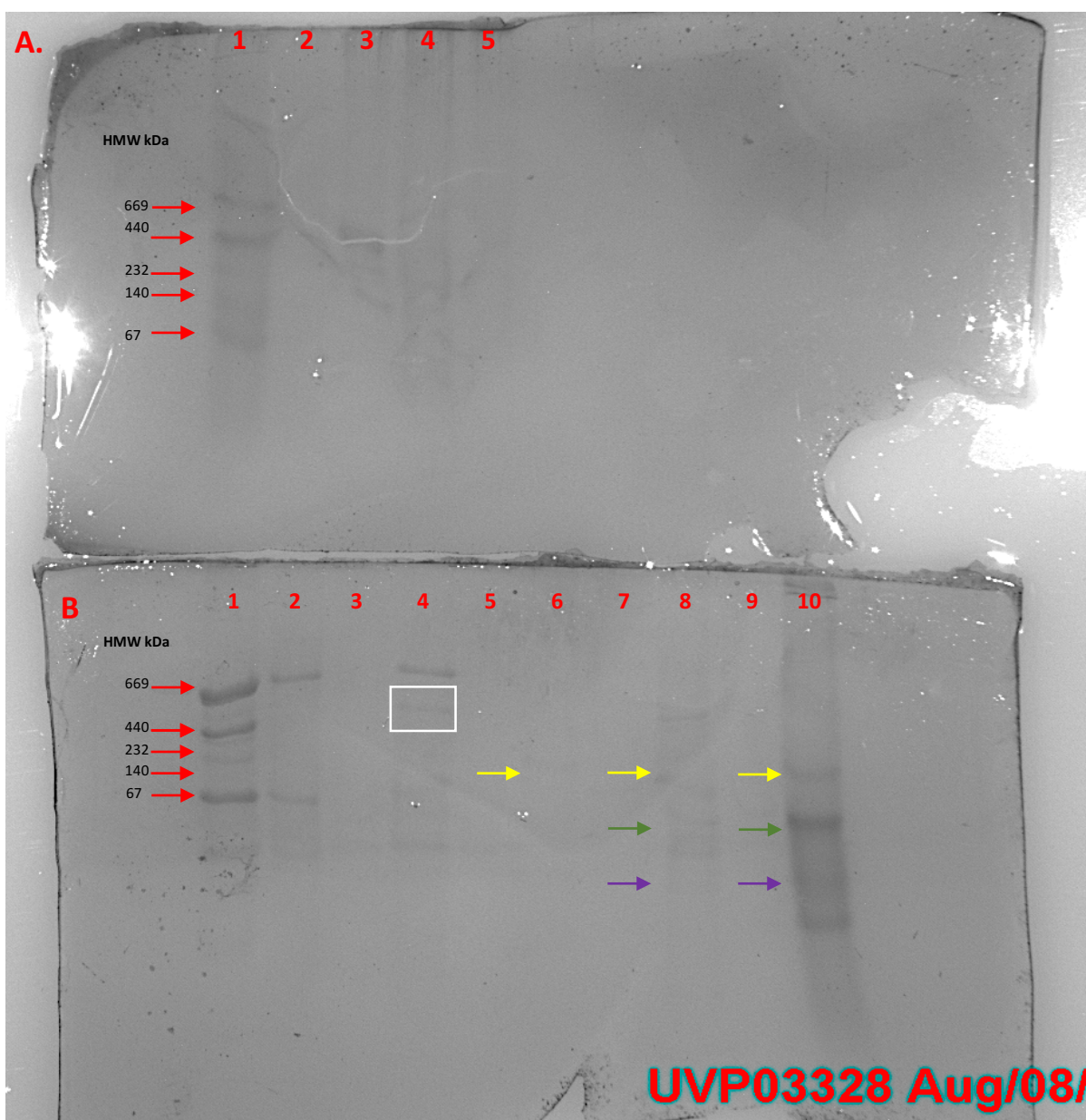


Fig. 1. Geles SDS-PAGE 9% ⇔ 0,8mm

A) Extractos de fracciones periplásmicas de *E.coli* , los carriles corresponden a:

- | | |
|----------------|------------|
| 1- Marcador HW | 4- CueOdD2 |
| 2- PET 21d NR | 5- CueOΔ |
| 3- CueO 1,4 | |

B) Extractos de *E.coli* con el clon CueOdD2 de fracciones periplásmicas (FP) y de sobrenadante (FS):

- | | |
|----------------|------------|
| 1- Marcador HW | 6- 0h SP |
| 2- 0h FP | 7- 1h SP |
| 3- 1h FP | 8- 3h SP |
| 4- 3h FP | 9- 6h SP |
| 5- 24h FP | 10- 24h SP |

Nota: Flechas de colores amarillo, verde y morado, indican el cambio de intensidad de algunas proteínas de FS.