



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DE AMARANTO (*Amaranthus
hypochondriacus*) BAJO ESTRÉS POR SEQUÍA**

Tesis que presenta

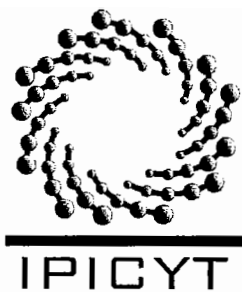
José Ángel Huerta Ocampo

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

**Directora de la Tesis
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

San Luis Potosí, SLP, Julio de 2008.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Análisis proteómico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés por sequía” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Ángel Huerta Ocampo** y aprobada el 01 de Julio de 2008 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Carlos Barajas López
Presidente

Dr. Antonio De León Rodríguez
Secretario

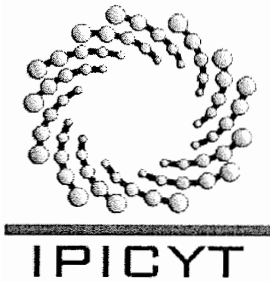
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Vocal



Créditos institucionales

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (204127) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 048 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2008, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Carlos Barajas López	Presidente	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Secretario	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Ángel Huerta Ocampo

sobre la Tesis intitulada:

*Análisis Proteómico de Amarantho (*Amaranthus hypochondriacus*) Bajo Estrés por Sequía*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de julio de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

A mi madre y hermano

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Al Dr. Antonio De León Rodríguez

A mis sinodales

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández de la Facultad de Medicina de la UNAM por su colaboración en el análisis de espectrometría de masas.

A la Dra. Alicia Chagolla de la Unidad de Proteómica del CINVESTAV Unidad Irapuato por las facilidades otorgadas para la digestión de proteínas.

A los compañeros del Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica

A los compañeros de la mesa 6 de “La cabaña de Don Raúl”

A los amigos (IPICYT, Foreign Power, Base Lab, Los Bultos)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (204127)

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

ÍNDICE GENERAL

	Pag
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El amaranto	1
1.2 Sequía	2
1.3 Identificación de mecanismos de respuesta a sequía	2
II. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos particulares	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1 Cultivo de plantas de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>) y tratamiento para generar estrés por sequía.....	6
3.2 Extracción de proteínas de amaranto.....	7
3.3 Rehidratación y Cuantificación de proteínas.....	9
3.4 Electroforesis en doble dimensión (2-DE).....	11
3.4.1 Primera dimensión: Separación de proteínas por punto isoelectrónico o Isoelectroenfoco.....	11
3.4.2 Segunda dimensión: separación de proteínas por peso molecular en SDS-PAGE.....	13
3.5 Tinción.....	13
3.5.1 Tinción con azul brillante de Coomassie.....	13
3.5.2 Tinción con Sypro® Ruby.....	14
3.6 Adquisición y análisis de imágenes.....	14
3.7 Análisis estadístico.....	15

3.8 Espectrometría de masas.....	15
3.8.1 Digestión en gel.....	15
3.8.2 Extracción y purificación de péptidos.....	16
3.8.3 Espectrometría de masas	17
3.9 Análisis bioinformático.....	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1 Respuesta de las plantas de amaranto al estrés por sequía.....	18
4.2 Métodos de extracción de proteínas de amaranto para electroforesis bidimensional.....	21
4.3 Análisis proteómico de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>) bajo estrés por sequía.....	24
4.3.1 Análisis proteómico de raíz de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>) bajo estrés por sequía.....	24
4.3.1.1 Identificación de proteínas de raíz de amaranto en respuesta a sequía.....	25
4.3.1.2 Proteínas de raíz de amaranto sobreexpresadas en respuesta a sequía.....	27
4.3.1.3 Proteínas de raíz de amaranto reprimidas en respuesta a sequía.....	32
4.3.2 Análisis proteómico de hoja de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>) bajo estrés por sequía.....	34
4.3.2.1 Identificación de proteínas de hoja de amaranto mediante espectrometría de masas.....	35
4.3.2.2 Proteínas de hoja de amaranto sobreexpresadas en respuesta a sequía.....	37
4.3.2.3 Proteínas de hoja de amaranto reprimidas en respuesta a sequía.....	40
V. CONCLUSIONES.....	44
VI. REFERENCIAS.....	45
APÉNDICE.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para la determinación de proteínas totales mediante el método de Bradford.....	10
Tabla 2. Programación del isoelectroenfoque en el equipo Ettan IPGphor II...	12
Tabla 3. Extracción de proteínas de amaranto utilizando diferentes métodos.....	22
Tabla 4. Proteínas de raíz de amaranto identificadas en respuesta a sequía mediante espectrometría de masas	28
Tabla 5. Identificación de proteínas de hoja de amaranto en respuesta a sequía mediante espectrometría de masas	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de cultivo en invernadero de plantas de amaranto.....	6
Figura 2. Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	11
Figura 3. Fotografías que muestran la apariencia de las plantas de amaranto control y sometidas a sequía al día 29 en invernadero.....	18
Figura 4. Recuperación de plantas de amaranto al ser rehidratadas tras someterse a estrés por sequía.....	19
Figura 5. Determinación del Contenido Relativo de Agua en hojas de amaranto.....	20
Figura 6. Patrones bidimensionales en geles 2-DE de proteínas de raíz de amaranto utilizando diferentes métodos de extracción.....	23
Figura 7. Gel 2-DE de proteínas de raíz de amaranto.....	25
Figura 8. Cambios en la concentración de proteínas de raíz de amaranto tras ser sometidas a sequía.....	26
Figura 9. Histogramas que muestran las diferencias en la cantidad de las proteínas de raíz de amaranto en las manchas seleccionadas para análisis mediante espectrometría de masas.....	27
Figura 10. Gel 2-DE de proteínas de hoja de amaranto.....	36
Figura 11. Histogramas que muestran las diferencias en la cantidad de las proteínas de hoja de amaranto analizadas mediante espectrometría de masas.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DTT	Ditiotreitol
(p/v)	Relación peso/volumen
SDS	Dodecil sulfato de sodio
(v/v)	Relación volumen/volumen
Tris	Hidroximetil-aminometano
PM	Peso molecular
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina
2-DE	Electroforesis en doble dimensión
PSA	Persulfato de amonio
c.b.p.	Cuanto baste para
TCA	Ácido tricloroacético
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
2-ME	2-Mercaptoetanol
G	Gramos
<i>g</i>	Gravedad
BSA	Albúmina sérica bovina
IPG	Gradiente inmovilizado de pH
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
D.O.	Densidad óptica
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

RESUMEN

La sequía es uno de los principales factores que limitan la productividad agrícola mundial, las pérdidas originadas por sequía en cultivos de importancia económica son superiores a las provocadas por cualquier otro factor biótico o abiótico. La exposición de las plantas a ambientes con limitación de agua desencadena cambios fisiológicos regidos por la expresión de diferentes grupos de genes y proteínas cuya actividad ayuda a las plantas a tolerar condiciones ambientales adversas. Es necesario identificar los genes y proteínas que controlan la respuesta al estrés en cultivos de importancia económica para facilitar su mejoramiento biotecnológico a fin de obtener cultivos tolerantes y mejores rendimientos de las cosechas. El amaranto es un cultivo con gran potencial pues además de ser rico en proteínas y compuestos nutraceuticos, puede crecer en condiciones de poca agua y altas temperaturas, lo que lo convierte en un buen modelo para estudiar la tolerancia a sequía y estrés salino. El empleo de las herramientas moleculares ha contribuido al entendimiento de la percepción y transducción de señales en respuesta al estrés. El estudio de los mecanismos de respuesta al estrés en plantas mediante el enfoque proteómico es una herramienta más de la biología molecular que puede contribuir a identificar genes y rutas metabólicas que son cruciales para la tolerancia y la respuesta al estrés. En este trabajo se evaluó mediante electroforesis bidimensional (2-DE) los patrones de proteínas en hoja y raíz de plantas de amaranto sometidas a sequía. El análisis cuantitativo de los geles 2-DE permitió detectar incrementos y disminuciones en la concentración de proteínas tras el tratamiento aplicado, cuarenta y dos de estas proteínas se analizaron mediante espectrometría de masas. Lo cual mostró que las proteínas sobre-expresadas están relacionadas con la señalización en respuesta al estrés, eliminación de especies reactivas de oxígeno, síntesis de osmolitos, mantenimiento del correcto plegamiento y degradación de proteínas. Mientras que las proteínas que disminuyeron su concentración están relacionadas con daño al aparato fotosintético, disminución de la síntesis de lignina y disminución de la actividad de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico.

ABSTRACT

Drought is one of the most important factors limiting the agricultural yield worldwide, losses by drought on important crops are higher than those occurred by any other biotic or abiotic stressing factor. Plant exposition to water limited environments leads physiological changes governed by the expression of different kinds of proteins and genes whose activity helps plants to tolerate adverse environmental conditions. It is necessary to identify the proteins controlling stress response on economical importance crops to facilitate its biotechnological improvement to obtain higher yields and better tolerant crops. Amaranth is a rediscovered crop with high potential, produces seeds with high content of proteins and is rich in nutraceutical compounds. It can grow at high temperatures with little quantity of water and is a good model for drought and salt stress studies. The usage of molecular tools has contributed to understand the perception and signal transduction in stress response. Proteomic analysis is a molecular biology tool that offers a new approach to discovering genes and molecular pathways related to stress responsiveness and tolerance. In this work, differential protein response in amaranth roots and leaves under severe drought stress was evaluated by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis (2-DE). Quantitative analysis of the 2-DE gels spots made possible the identification of up and down-regulated proteins in response to severe drought. Forty two protein spots were analyzed by mass spectrometry. Identification of drought responsive proteins shows that up-regulated proteins are related with signaling, elimination of reactive oxygen species, osmolites synthesis and protein folding and degradation. Diminished responsive proteins to severe drought stress were related to photosynthetic damage, decrease in lignin synthesis and decrease in glucolysis and citric acid cycle activity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El amaranto

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un pseudocereal de origen americano que fue cultivado por las antiguas civilizaciones Mesoamericanas. Formaba parte importante en la dieta básica de los aztecas junto con el maíz y el frijol, y se cree que tras la conquista española el cultivo del amaranto fue prohibido debido a que además de alimento se utilizaba en cultos religiosos; lo anterior originó que pasara a ser un cultivo subutilizado, pero en 1979 la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos y la FAO propusieron que debido a su alta calidad nutricional el amaranto podría ser un grano con gran potencial para ser explotado comercialmente (National Academy of Science, 1984).

Las semillas de amaranto poseen alto contenido de proteína (13-17%) y su composición de aminoácidos es cercana al balance óptimo requerido en la dieta humana (Barba de la Rosa *et al.*, 1992). Además, la semilla de amaranto es rica en compuestos nutraceuticos (Silva Sánchez *et al.*, 2008) y sus hojas poseen alto contenido de minerales como el calcio, hierro, magnesio y fósforo; además de vitaminas A y C (Barba de la Rosa *et al.* 2006).

El amaranto es una planta con metabolismo del tipo C4 y es una de las pocas dicotiledóneas cuyo primer producto de la fotosíntesis contiene cuatro carbonos. Lo que origina un incremento en la eficiencia del uso del CO₂ bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad, esto lo convierte en una planta bastante adaptable por lo que se considera un cultivo alternativo capaz de crecer en lugares en donde cereales y otros cultivos de importancia económica no pueden hacerlo (Paredes López *et al.*, 1991). Es un cultivo muy resistente ya que tolera suelos arenosos y con alto contenido de sales, es capaz de crecer en condiciones de poca agua y altas temperaturas, lo que lo convierte en un buen modelo para estudiar la tolerancia a sequía y estrés salino.

1.2 Sequía

La escasez de alimentos es uno de los problemas serios con los que ha de enfrentarse la humanidad en este siglo. Los cereales como el arroz, trigo y maíz proveen la mitad de las calorías consumidas por la población mundial. Se estima que para satisfacer la creciente demanda de alimentos debido al rápido crecimiento de la población mundial, la producción de granos deberá incrementarse en un 50% hacia el año 2025 (Khush, 2001).

Gran parte de las tierras cultivadas se encuentran en condiciones no óptimas para el crecimiento de los cultivos convencionales. Cerca del 70% del potencial productivo se pierde debido a condiciones desfavorables como la sequía y diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

La sequía es uno de los principales factores que limitan la productividad agrícola mundial (Boyer, 1982). Las pérdidas originadas por sequía en cultivos de importancia económica probablemente sean superiores a las provocadas por cualquier factor biótico o abiótico.

1.3 Identificación de mecanismos de respuesta a sequía

Es necesario identificar los genes y proteínas que controlan la respuesta de las plantas a la sequía, con el fin de facilitar el mejoramiento biotecnológico de plantas (Salekdeh y Komatsu 2007) y obtener cultivos tolerantes, dando como resultado mejores rendimientos de las cosechas.

Por tal razón, es importante el estudio de los mecanismos de respuesta al estrés por sequía en cultivos de importancia económica (como el arroz, maíz, trigo, etc.) y cultivos con gran potencial como el amaranto, que además de ser un alimento con alto valor nutricional es capaz de manera natural de crecer en ambientes con poco agua, lo que lo convierte en un buen modelo de estudio.

La exposición de las plantas a ambientes con limitación de agua desencadena cambios fisiológicos como son: la modificación de la turgencia, cambios en la fluidez y composición de las membranas, reducción de la actividad fotosintética, acumulación de osmoprotectores, cambios en el metabolismo del carbono, entre otros (Chávez *et al.*, 2004).

El entendimiento de los mecanismos moleculares y fisiológicos básicos de la percepción del estrés, la transducción de señales y los mecanismos de tolerancia en plantas es actualmente uno de los retos de la biología (Valliyodan *et al.*, 2006).

El empleo de las herramientas de la genética ha contribuido al entendimiento de la percepción y transducción de señales en respuesta al estrés. Esto ha permitido identificar un importante número de genes inducidos por estrés así como varios factores transcripcionales que regulan los sistemas de respuesta en plantas inducidos por el estrés por sequía (Valliyodan *et al.*, 2006).

El análisis de la expresión de RNA mensajero por varios métodos (SAGE, Microarreglos, Hibridación sustractiva) se ha empleado para analizar la respuesta al estrés en plantas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que no existe una correlación directa entre la cantidad de RNA mensajero y la cantidad de proteína sintetizada, ya que el RNA mensajero está sujeto a varios mecanismos de control transcripcional (Splicing alternativo, poliadenilación, edición) y las proteínas sintetizadas a partir de estos mensajeros pueden experimentar diversas modificaciones post-traduccionales como: fosforilaciones, glicosilaciones, cortes proteolíticos (Graves *et al.*, 2002); mismos que definirán el papel que juegue la proteína en la célula bajo una condición o estrés determinado.

El estudio de los mecanismos de respuesta al estrés en plantas mediante el enfoque proteómico es una herramienta más de la biología molecular que puede

contribuir a identificar genes y rutas metabólicas que son cruciales para la tolerancia y la respuesta al estrés (Salekdeh y Komatsu 2007).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar mediante un enfoque proteómico la respuesta de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) al estrés por sequía.

2.2 Objetivos particulares

Obtener extractos de proteínas de hoja y raíz de *Amaranthus hypochondriacus*. Que sean compatibles con la separación mediante electroforesis en doble dimensión (2-DE).

Analizar la respuesta de la raíz de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) a estrés por sequía mediante electroforesis en doble dimensión (2-DE) e identificar proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas.

Analizar la respuesta a estrés por sequía en hoja de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), mediante electroforesis en doble dimensión (2-DE) e identificar proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de plantas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y tratamiento para generar estrés por sequía

Se germinaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* variedad Nutrisol en una mezcla de sustrato comercial (Sunshine Premix 3, Sun Gro Horticulture Inc. Bellevue, Washington. USA). Una vez germinadas, las plántulas fueron trasplantadas el día 11 a bolsas de plástico de 15 x 25 cm que contenían el mismo sustrato en donde se germinaron y fueron cultivadas 22 días más en invernadero, se determinó el contenido de agua del suelo (Hydrosense, Campbell Scientific, INC.) y este se mantuvo entre un 30-35%.

A partir de un lote de 60 plantas se formaron 3 grupos de 20 plantas. Para provocar el estrés por sequía se dejó de suministrar agua a dos de los tres grupos a partir del día 22 en invernadero (Figura 1). Al llegar al día 29 un grupo de plantas sometidas a sequía se rehidrató.

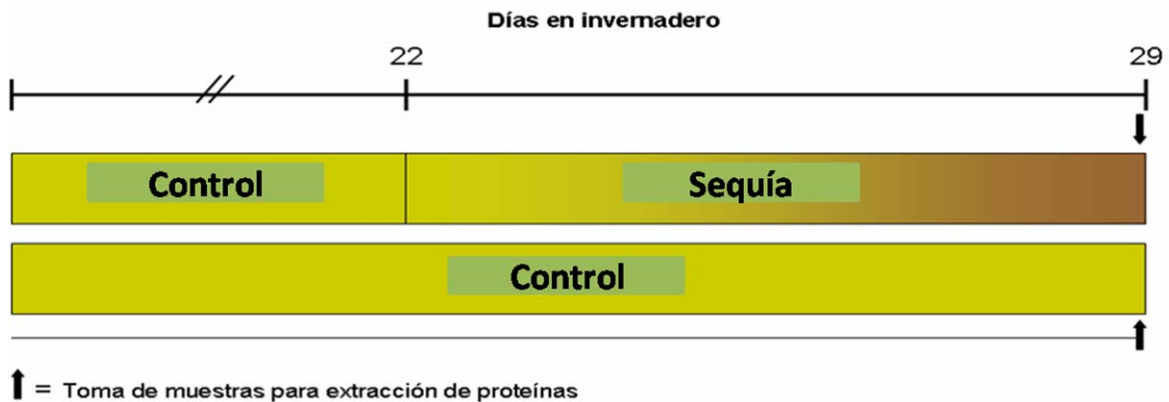


Figura 1. Esquema de cultivo en invernadero de plantas de amaranto.

Se determinó el contenido relativo de agua (CRA) en hojas de los diferentes grupos de plantas de acuerdo con el método reportado por Barrs y Weatherly

(Barrs y Weatherly, 1962). Para lo cual se determinaron los pesos: fresco (PF), turgente (PT) y seco (PS) en hojas de 4 plantas de cada grupo seleccionadas al azar y finalmente se calculó el contenido relativo de agua (CRA) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{[(\text{PF}-\text{PS})/(\text{PT}-\text{PS})] \times 100}{}$$

Se recolectaron muestras de hoja y raíz, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

3.2 Extracción de proteínas de amaranto

En el caso de las hojas de amaranto, la extracción de proteínas totales se realizó por triplicado, mediante el método de extracción reportado por Saravanan y Rose (2004) basado en precipitación con ácido tricloroacético y acetona (TCA-A), con algunas modificaciones. Las hojas se molieron en nitrógeno líquido con la ayuda de un molino para granos y se suspendieron en 3 volúmenes de acetona fría con 10% de TCA, 1% de PVPP y 2% de 2-Mercaptoetanol.

La mezcla se homogenizó durante 15 minutos en hielo con la ayuda de un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor), una vez homogenizada se centrifugó a 2000g durante 2 minutos a 4°C (Super T21, Sorvall); el sobrenadante se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C . Se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C para obtener la pastilla de proteínas que se lavó varias veces en acetona fría, se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacenó a -80°C .

En el caso de las raíces se probaron 4 diferentes métodos a fin de encontrar aquel que combinara la mejor relación entre rendimiento de proteínas y ausencia de contaminantes que interfirieran con el isoelectroenfoco y la resolución de la electroforesis bidimensional.

En todos los casos las raíces se molieron en nitrógeno líquido con la ayuda de un molino para granos hasta obtener un polvo fino a partir del cual se realizó la extracción de proteínas.

Extracción de proteínas de raíz de amaranto por el método TCA-C

Se mezclaron 5 gramos de raíz de amaranto molida con 15 mL de acetona fría con 10% de TCA y 0.07% de β -mercaptoetanol. La mezcla se homogenizó durante 15 minutos en hielo con la ayuda de un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor) una vez homogenizada se centrifugó a 2000 g durante 2 minutos a 4°C (Super T21, Sorvall); el sobrenadante se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C para obtener una pastilla de proteínas que se lavó 3 veces en acetona fría, se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacenó a -80°C.

Extracción de proteínas de raíz de amaranto por el método TCA-A

Se mezclaron 5 gramos de raíz de amaranto molida con 15 mL de acetona fría con 10% de TCA, 1% de PVPP y 2% de β -mercaptoetanol. La mezcla se homogenizó durante 15 minutos en hielo con la ayuda de un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor), una vez homogenizada se centrifugó a 2000 g durante 2 minutos a 4°C (Super T21, Sorvall); el sobrenadante se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C para obtener una pastilla de proteínas que se lavó 1 vez con metanol y tres veces mas en acetona fría, se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacenó a -80°C.

Extracción de proteínas de raíz de amaranto por el método TCA-B

Se mezclaron 5 gramos de raíz con 15 mL de solución de extracción (tris 40 mM, 1% polivinilpolipirrolidona (PVPP), EDTA 10 mM, PMSF 1 mM) La mezcla se

homogenizó durante 15 minutos en hielo con la ayuda de un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor) y una vez homogenizada se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C (Super T21, Sorvall); el sobrenadante se mezcló con 3 volúmenes de acetona fría con 10% de TCA y 2% de β -mercaptoetanol y se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. Se centrifugó, lavó y secó de la misma manera que en el método TCA-A, y se almacenó a -80°C.

Extracción de proteínas de raíz de amaranto por el método de extracción-liofilización

Se mezclaron 5 gramos de raíz con 15 mL de solución de extracción (tris 40 mM, 1% polivinilpolipirrolidona (PVPP), EDTA 10 mM, PMSF 1 mM) La mezcla se homogenizó durante 15 minutos en hielo con la ayuda de un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor) y una vez homogenizada se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C (Super T21, Sorvall); se obtuvo el sobrenadante y se liofilizó (Freezone 6[®], LABCONCO).

3.3 Rehidratación y Cuantificación de proteínas

Las pastillas de proteínas de hoja y raíz se re-suspendieron en solución de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%) con 0.5% de IPG buffer (Amersham) rango de pH 4-7 y 0.56% de DTT.

La concentración de proteínas totales solubles se determinó mediante el método de Bradford utilizando el kit comercial Protein Assay (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) y BSA como estándar.

Se preparó una solución stock de BSA (Sigma Aldrich) con una concentración de 100 mg/mL. Esta se diluyó en solución de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 4%, Azul de bromofenol 0.02%, 0.56% de DTT y 0.5% de IPG buffer) a una concentración de 2 mg/mL a partir de esta solución se prepararon diluciones

con las que se realizó una curva de calibración por duplicado como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Preparación de la curva de calibración para la determinación de proteínas totales mediante el método de Bradford.

Estándar	Concentración de proteínas		Solución de rehidratación + DTT e
	totales mg/mL	BSA 2 mg/mL (μ L)	IPG buffer (μ L)
1	0.0	0	100
2	0.2	10	90
3	0.4	20	80
4	0.6	30	70
5	0.8	40	60
6	1.0	50	50
7	1.2	60	40
8	1.4	70	30

La determinación de proteínas totales de estándares de la curva de calibración (Figura 3) y de las muestras problema se realizó de la siguiente manera: se preparó el reactivo de trabajo, diluyendo 1:5 el reactivo de Bradford en agua Milli-Q.

Se agregaron 20 μ L de cada estándar o muestra a 1 mL de reactivo de trabajo, se mezcló y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz y se determinó la absorbancia a 595 nm dentro de los siguientes 30 minutos.

Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford

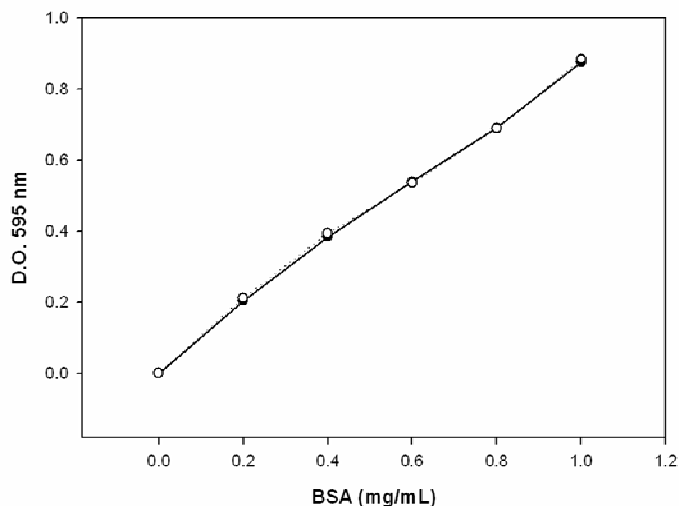


Figura 2. Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford. La ecuación de la recta fue: $Y=0.855X+0.022$, $r^2=0.997$.

3.4 Electroforesis en doble dimensión (2-DE)

3.4.1 Primera dimensión: Separación de proteínas por punto isoelectrico o Isoelectroenfoque

Para el isoelectroenfoque se utilizaron tiras de gradiente inmovilizado de pH de 13 cm de largo (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) con diferentes rangos de pH (3-10, 4-7). Estas tiras se rehidrataron durante 16 horas a temperatura ambiente con 250 μ L de solución de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%, Azul de bromofenol 0.02%, DTT 0.56%, IPG buffer 0.5%) en una charola de rehidratación (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) de la siguiente manera:

Se depositaron 250 μ L de solución de rehidratación con una cantidad determinada de proteínas en la charola de rehidratación, por separado se retiró la cubierta protectora de la tira de gel con IPG (gradiente inmovilizado de pH) y se

colocó la tira en la bandeja de rehidratación de tal manera que el gel de la tira estuviese en contacto con la solución de rehidratación evitando la formación de burbujas. Para evitar la evaporación de la solución de rehidratación se cubrió la tira con 3 mL de aceite mineral (GE Healthcare, Upssala, Suecia). La rehidratación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 16 horas.

Transcurrida la rehidratación las tiras se colocaron sobre los carriles de la charola para isoelectroenfoque del equipo Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences) con el gel de la tira orientado hacia arriba y la marca + impresa en la tira orientada hacia el ánodo. Cada carril se cubrió con 9 mL de aceite mineral (Plus One, Amersham Biosciences) se colocaron esponjas de papel hidratadas con 125 µL de agua desionizada a cada extremo de la tira y se colocaron los electrodos de manera que hicieran contacto con las esponjas y la plataforma del equipo.

El isoelectroenfoque se llevó a cabo a 20°C y las condiciones de corrimiento fueron programadas en la modalidad Volt-Hora como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Programación del isoelectroenfoque en el equipo Ettan IPGphor II.

Paso	Modo de voltaje	Voltaje máximo (V)	Voltz-hora (kVh)
1	Gradiente	150	0.15
2	Gradiente	500	0.01
3	Gradiente	4000	5.6
4	Constante	8000	15.2

Una vez que transcurrió el isoelectroenfoque se eliminó el exceso de aceite mineral de las tiras de IPG y se prosiguió con la segunda dimensión o bien las tiras de IPG se almacenaron a -20°C para continuar después con la separación por peso molecular.

3.4.2 Segunda dimensión: separación de proteínas por peso molecular en SDS-PAGE

Después de la separación por punto isoeléctrico, las tiras de IPG se sumergieron en solución Buffer de Equilibrio con SDS (Tris 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002%) con DTT al 1% durante 15 minutos en agitación constante para posteriormente sumergirse durante 15 minutos más en la misma solución Buffer de Equilibrio pero ahora con 2.5% de iodoacetamida en lugar de DTT. Las tiras se lavaron con buffer de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) y se transfirieron a un gel vertical para SDS-PAGE al 13% (con una relación acrilamida:bis-acrilamida de 29:1) y se fijaron con solución de sellado (ver solución O, apéndice).

Una vez gelificada la solución de sellado, se llenó la cámara de electroforesis (Hoeffer™ SE600 Ruby™, Amersham Biosciences) con buffer de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) y se agregaron 2 µL de marcadores de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen) en el carril lateral.

La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA por gel durante 2 horas seguida de 30 mA por gel hasta que el frente de corrimiento alcanzara el final del gel y se saliera.

3.5 Tinción

3.5.1 Tinción con azul brillante de Coomassie

Los geles se sumergieron durante 30 minutos bajo agitación suave en solución de fijado (metanol 50%, ácido acético 10%), una vez retirada la solución de fijado se sumergieron durante toda la noche bajo agitación en solución de azul

brillante de Coomassie R-250 al 0.025% (ver apéndice) y se destiñeron mediante varios lavados con solución de desteñido (metanol 50%, ácido acético 10%) hasta observar los geles libres de tinción de fondo (fondo transparente), se lavaron varias veces con agua Milli-Q hasta que los geles eliminaran el metanol de la solución de desteñido y recuperaran su tamaño normal.

3.5.2 Tinción con Sypro® Ruby

Los geles se sumergieron durante 1 hora en solución de fijado para 2-DE (Ver apéndice) bajo agitación suave, después se lavaron 3 veces con agua Milli-Q durante 10 minutos bajo agitación. Una vez lavados, se sumergieron en Sypro® Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes™) y se agitaron durante toda la noche protegidos de la luz.

Una vez teñidos los geles, se transfirieron a un contenedor con solución de lavado (metanol 10%, ácido acético 7%) y se agitaron durante 30 minutos para después someterlos a tres lavados de 5 minutos con agua Milli-Q.

3.6 Adquisición y análisis de imágenes

Los geles se escanearon en el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Kodak) y se analizaron con el programa PDQuest™ 2-D Analysis Software v7.2.0 (Biorad). Al menos tres geles por condición (Riego normal y sequía) se analizaron para raíz y hoja de amaranto.

Se realizó la detección de manchas, se obtuvieron los porcentajes del volumen representado por cada mancha en los geles bidimensionales y se determinó el peso molecular aparente con base en la posición de las manchas respecto a los marcadores de peso molecular utilizados, se determinó el punto isoeléctrico de cada una de ellas con base en la migración de las manchas de proteínas en las tiras de gradiente de pH inmovilizado (pH 4-7 lineal).

3.7 Análisis estadístico

Se evaluó mediante electroforesis bidimensional la respuesta de proteínas en hoja y raíz de plantas de amaranto sometidas a riego normal y sequía. El análisis cuantitativo de los geles 2-DE se realizó por triplicado con la ayuda del programa PDQuest™ 2-D Analysis Software v7.2.0 (Biorad), y permitió detectar incrementos o disminuciones en la concentración de proteínas tras el tratamiento aplicado.

Para conocer si las diferencias cuantitativas observadas como cambio en la intensidad de las manchas en los geles de hoja y raíz sometidos a sequía, en comparación con las plantas sometidas a riego normal eran significativas, se realizó un análisis de varianza de una vía (One Way ANOVA) con un límite de confianza del 95% utilizando el programa Statgraphics Plus v 5.0 (el efecto del tratamiento fue significativo cuando $p < 0.05$).

3.8 Espectrometría de masas

Se seleccionaron 20 manchas de raíz y 21 manchas de hoja que mostraron diferencias cuantitativas, además de una mancha que solo apareció en las hojas sometidas a sequía.

Las manchas seleccionadas se cortaron de los geles con puntas para micropipeta estériles y se almacenaron a -20°C para su posterior digestión en gel con tripsina, extracción y purificación de péptidos y análisis mediante espectrometría de masas.

3.8.1 Digestión en gel

Las manchas de proteínas en gel se cortaron en pedacitos de aproximadamente 1 mm con la ayuda de un bisturí, se lavaron dos veces en 50 μL

de agua Milli-Q y dos veces más en 50 μ L de acetonitrilo al 50%. (10 minutos por cada lavado). Una vez lavados se retiró todo el líquido y se lavaron los pedazos de gel en 50 μ L de acetonitrilo al 100% en agitación constante durante 10 minutos. Se retiró el acetonitrilo y se agregaron 25 μ L de NH_4HCO_3 100 mM a los 5 minutos se agregaron 25 μ L de acetonitrilo al 100% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en agitación y se retiró todo el líquido posible.

Para reducir y alquilar las proteínas, se rehidrataron los pedazos de gel en 50 μ L de DTT 10 mM se incubaron a 56°C por 45 minutos en agitación, se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente, se removió el líquido y se agregaron 50 μ L de Iodoacetamida (10 mg/mL) y se incubó 30 minutos en la oscuridad.

Se removió la solución y se lavaron los pedazos de gel con 100 μ L de NH_4HCO_3 100 mM/acetonitrilo al 100% en partes iguales y se incubaron 15 minutos. Se lavó una vez más con acetonitrilo al 100% durante 15 minutos y se retiró todo el líquido posible.

Para la digestión con tripsina se rehidrataron los pedazos de gel perfectamente secos con 15 μ L de solución de digestión (ver apéndice) y se incubaron en hielo durante 45 minutos, se retiró el líquido remanente y se reemplazó con 20 μ L de NH_4HCO_3 50 mM y se incubó toda la noche a 37°C.

3.8.2 Extracción y purificación de péptidos

Se colocó el sobrenadante de la digestión con tripsina en tubos de 0.6mL previamente enjuagados con ácido trifluoroacético (TFA) al 1% o ácido fórmico al 5%. Se agregaron 25 μ L de agua al tubo de la digestión y se agitó durante 10 minutos, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más agregando una solución de acetonitrilo al 50%/ácido fórmico al 5% y se colectaron todos los sobrenadantes. Los sobrenadantes se concentraron hasta un

volumen de 10–15 μL y se agregó ácido fórmico al 50% hasta obtener una concentración final del 5%.

3.8.3 Espectrometría de masas

Los péptidos se separaron mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Presión UPLC (Nano-Aquity, Waters), se sometieron a ionización en electrospray y se analizaron en un espectrómetro de masas (3200 QTRAP, Applied Biosystems) para obtener los tamaños de los péptidos.

3.9 Análisis bioinformático

Los datos obtenidos de la espectrometría de masas se utilizaron para descubrir la identidad de las proteínas con la ayuda del servidor MASCOT v2.2 (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com/>).

La búsqueda se realizó contra la base de datos no redundante del NCBI, utilizando los datos de los péptidos analizados. La búsqueda se realizó ingresando las masas monoisotópicas de los péptidos utilizando los siguientes parámetros: Protein Mass: Unrestricted; Peptide Mass Tolerance: ± 1.2 Da; Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da; Max Missed Cleavages: 1.

Se utilizó como categoría taxonómica el subreino *viridiplantae*; las búsquedas tomaban en cuenta las posibles modificaciones siguientes: carboxiamidometilación de las cisteínas y oxidación de las metioninas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Respuesta de las plantas de amaranto al estrés por sequía

Al llegar al día 29 el contenido de agua del suelo de los 2 grupos sometidos a sequía fue del 3% y las plantas mostraban pérdida de la turgencia y enrollamiento de las hojas (Figura 3).



Figura 3. Fotografías que muestran la apariencia de plantas de amaranto control (izquierda) y sometidas a sequía (derecha) al día 29 en invernadero.

Un grupo de plantas sometidas a sequía se rehidrató y se observó que al transcurrir dos y media horas, las hojas se desenrollaban y las plantas recuperaban la turgencia, mientras que a las cinco horas las plantas se observaban recuperadas por completo (Figura 4).

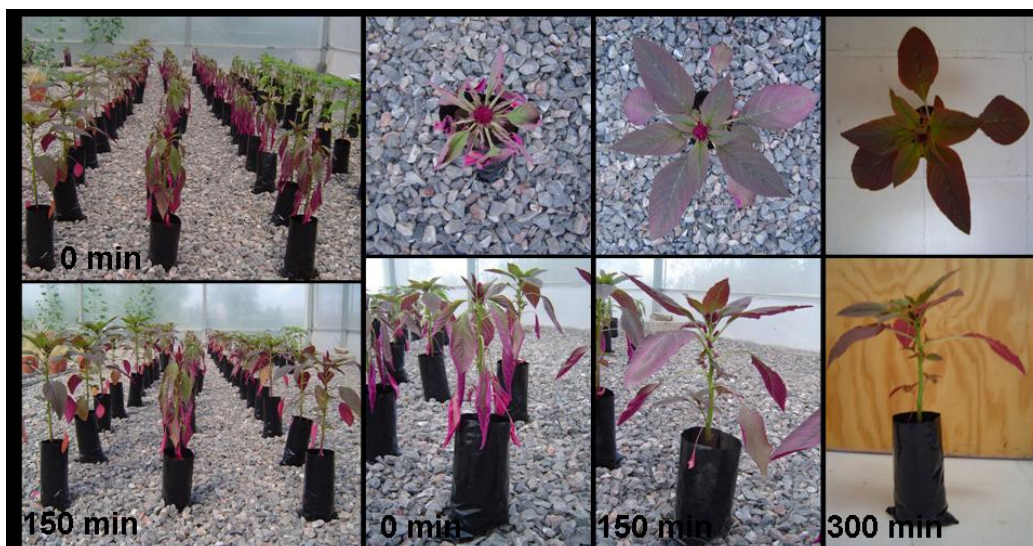


Figura 4. Recuperación de plantas de amaranto al ser rehidratadas tras someterse a estrés por sequía.

Se considera que las plantas tolerantes a sequía son aquellas capaces de mantener constante el contenido de agua de sus tejidos o de sobrevivir a la reducción drástica de este en condiciones adversas o bien son capaces de recuperarse completamente de los efectos de la sequía al ser rehidratadas (Cabuslay *et al.*, 1999).

El contenido relativo de agua (CRA) ha sido considerado como un indicador de la tolerancia a la desecación en cultivos como la soya y el trigo (Villalobos *et al.*, 1990). Se estima que el CRA es un determinante principal de la actividad metabólica y de la sobrevivencia foliar y se considera este parámetro como una perspectiva más confiable que las mediciones termodinámicas p.ej. potencial hídrico, para analizar las respuestas fisiológicas a la desecación (Villalobos *et al.*, 1990).

En este trabajo se observó que las plantas de amaranto sometidas a sequía progresiva se mantenían turgentes aún con niveles de contenido de agua del suelo del 5-7%. En el último día del tratamiento el contenido de agua del suelo de

las plantas sometidas a sequía fue del 3% y las plantas mostraban pérdida de la turgencia y enrollamiento de las hojas. Un grupo de plantas sometidas a sequía se rehidrató y se observó que al transcurrir dos y media horas, las hojas se desenrollaban y las plantas recuperaban la turgencia, mientras que a las cinco horas las plantas se observaban recuperadas por completo.

Al determinar el CRA en hojas de amaranto (Figura 5); se observó que las plantas sometidas a sequía presentaron un CRA de 45.39 (± 7.12), esto es indicativo de que el grado de estrés al que se sometieron fue severo. Mientras que las plantas control presentaron un CRA de 95.14% (± 0.43) indicativo de su buen estado de hidratación. En el caso de las plantas rehidratadas tras someterse a sequía, su CRA se incrementó a niveles del 90.20% (± 2.0) adquiriendo una apariencia indistinguible de las plantas control.

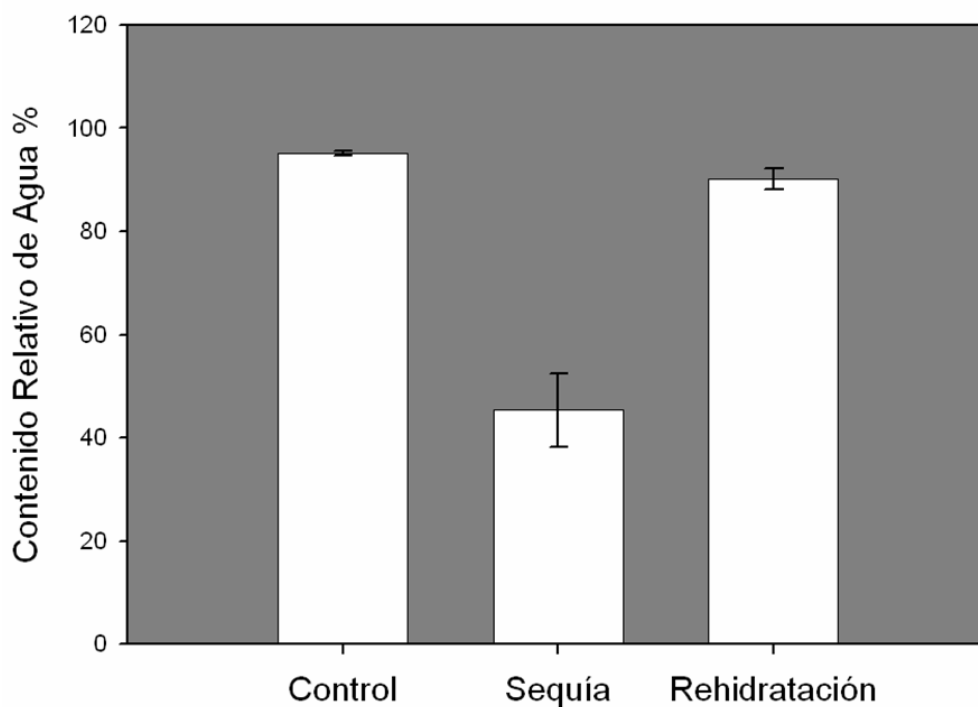


Figura 5. Determinación del Contenido Relativo de Agua en hojas de amaranto. (n=4)

Al comparar la respuesta en cultivos de frijol susceptibles y tolerantes a déficit de agua, Montalvo-Hernández *et al.*, (2008) observaron que al someter ambas variedades a sequía severa (CRA menor del 50%), la variedad susceptible alcanzaba su punto de marchitez permanente ya que al ser rehidratadas estas plantas no eran capaces de recuperarse, mientras que la variedad tolerante si lo hizo. Esta característica observada en este trabajo en las plantas de amaranto es importante ya que es distintiva de plantas tolerantes a sequía.

4.2 Métodos de extracción de proteínas de amaranto para electroforesis bidimensional

La extracción de proteínas es quizá el proceso más importante cuando se pretende hacer un análisis proteómico basado en geles bidimensionales (Görg *et al.*, 2004). Existen diferentes protocolos para extracción de proteínas de plantas reportados en la literatura, todos con ventajas y desventajas, sin embargo, la mejor elección para realizar un análisis proteómico basado en geles 2-DE de plantas que no han sido analizadas mediante este enfoque es desarrollar un método específico y optimizarlo en lugar de utilizar un protocolo optimizado para otro tipo de planta con diferentes concentraciones de compuestos que puedan interferir en la extracción de proteínas y en la resolución de los patrones bidimensionales obtenidos (Gómez Vidal *et al.*, 2008).

En el caso del amaranto se sabe que esta planta contiene altos niveles de compuestos que pueden interferir con la extracción de proteínas y resolución de la 2-DE. Sus hojas contienen altos niveles de colorantes (Gins *et al.*, 1998), sales de oxalato de calcio, fenoles y polifenoles (Siener *et al.*, 2006). En el caso de las raíces de amaranto estas también contienen pigmentos que deben eliminarse.

En cuanto a la extracción de proteínas de hoja de amaranto se obtuvo un rendimiento de 0.76 mg/gramo de tejido fresco (Tabla 3). Se utilizó este método ya que en el laboratorio ya se habían probado algunos métodos y este resultó ser el

mejor en cuanto a rendimiento de proteínas y calidad de los geles bidimensionales (Briones Cerecero *et al.*, 2008).

Tabla 3. Extracción de proteínas de amaranto utilizando diferentes métodos.

Tejido	Rendimiento (mg de proteína/g tejido fresco)			
	Método TCA -C	Método TCA-A	Método TCA-B	Método Extracción-Liofilización
Hoja	Nd	0.76	Nd	Nd
Raíz	0.14	0.08	1.6	2.73

Los valores corresponden al promedio obtenido al realizar tres determinaciones. Nd= No determinado.

En lo que respecta a la extracción de proteínas de raíz de amaranto (Tabla 3), se obtuvo el mayor rendimiento con el método de extracción-liofilización, sin embargo la calidad de la muestra no fue aceptable para la electroforesis bidimensional, debido a que al liofilizar la muestra se concentran los contaminantes y se incrementa la concentración de sales en la muestra, lo que interfiere con la resolución del isoelectroenfoco de tal manera que al realizar la segunda dimensión aparecen barridos horizontales y verticales; además no se realizó correctamente la separación por punto isoelectrico a lo largo de las tiras de IPG (Figura 6a). Por lo que no se recomienda utilizar este método si se pretende utilizar las proteínas extraídas para realizar geles 2-DE.

En el caso de los métodos TCA-C y TCA-A, siendo este último una modificación del método TCA-C, los rendimientos obtenidos fueron bastante modestos, sin embargo la calidad de la muestra permitió obtener geles bidimensionales de calidad aceptable, detectándose 279 y 258 manchas respectivamente, se observan mínimos barridos verticales y horizontales (Figuras 5b y 5c). Se puede observar que los patrones de proteínas obtenidos con los diferentes métodos son bastante similares, observándose algunas proteínas que se extraen diferencialmente dependiendo del método utilizado.

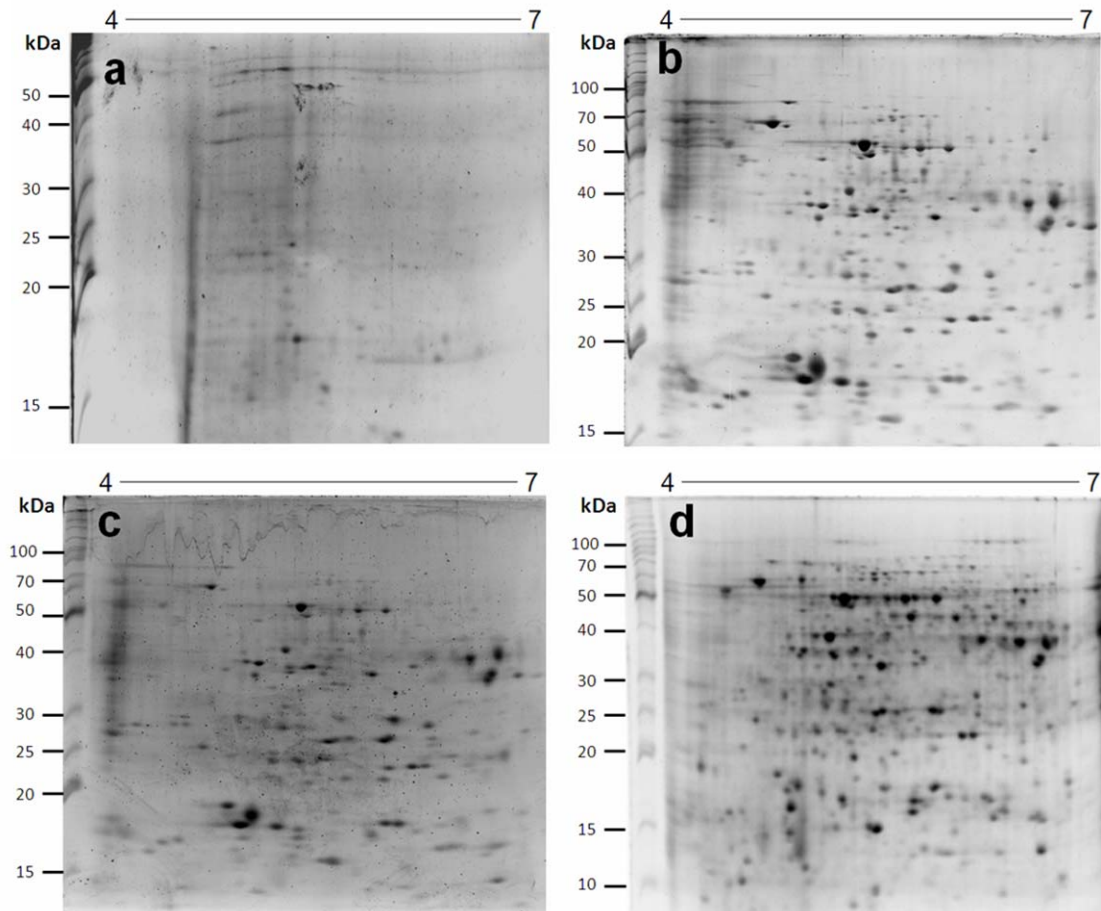


Figura 6. Patrones bidimensionales de geles 2-DE de proteínas de raíz de amaranto utilizando diferentes métodos de extracción. a) Método Extracción-Liofilización; b) Método TCA-C; c) Método TCA-A y d) Método TCA-B.

Los bajos rendimientos obtenidos en raíz de amaranto con estos dos métodos contrastan con lo reportado por Saravanan y Rose (2004), quienes reportan rendimientos superiores utilizando estos métodos en raíz de tomate. Estas diferencias probablemente se deban a que comparada con la raíz de tomate, la raíz de amaranto es una estructura más recalcitrante al contener mayor cantidad de pigmentos y otros contaminantes, además de ser más fibrosa y por tanto fue menor la cantidad de proteínas extraídas utilizando estos dos métodos basados en extracción directa con TCA y acetona.

En lo que respecta al método TCA-B, el rendimiento obtenido fue menor comparado con el método de Precipitación-Liofilización y superior a los obtenidos mediante precipitación directa con TCA y acetona (métodos TCA-C y TCA-A), pero a diferencia del método de Precipitación-Liofilización, que acarrea muchos contaminantes, con el método TCA-B fue posible obtener geles 2-DE como el que se muestra en la Figura 5d, para este gel se detectaron 392 manchas; utilizando una menor cantidad de material biológico, lo que representa una clara ventaja cuando el material biológico es una limitante, además se puede observar que con este método se logran extraer proteínas que no se extraen con los métodos basados en la extracción directa con TCA y acetona.

4.3 Análisis proteómico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés por sequía

Se evaluó mediante electroforesis bidimensional la respuesta de proteínas en hoja y raíz de plantas de amaranto sometidas a sequía progresiva durante 7 días. El análisis cuantitativo de los geles 2-DE se realizó por triplicado con la ayuda del programa PDQuest™ 2-D Analysis Software v7.2.0 (Biorad), y permitió detectar incrementos o disminuciones en la concentración de proteínas tras el tratamiento aplicado, la identificación de las proteínas se realizó mediante espectrometría de masas.

4.3.1 Análisis proteómico de raíz de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés por sequía

Los efectos del tratamiento de sequía sobre los patrones de proteínas en raíces de amaranto se analizaron mediante 2-DE. El análisis por triplicado de los geles para las condiciones de sequía y riego normal mostró alrededor de 400 manchas de proteína reproduciblemente detectadas en todos los geles (Figura 7).

20 manchas de cuyo cambio en concentración fue significativo se seleccionaron para su análisis mediante espectrometría de masas (Figura 7). La Figura 8 muestra el cambio en la intensidad de las manchas seleccionadas entre la condición control y sequía. La Figura 9 muestra el cambio en la concentración de las manchas seleccionadas.

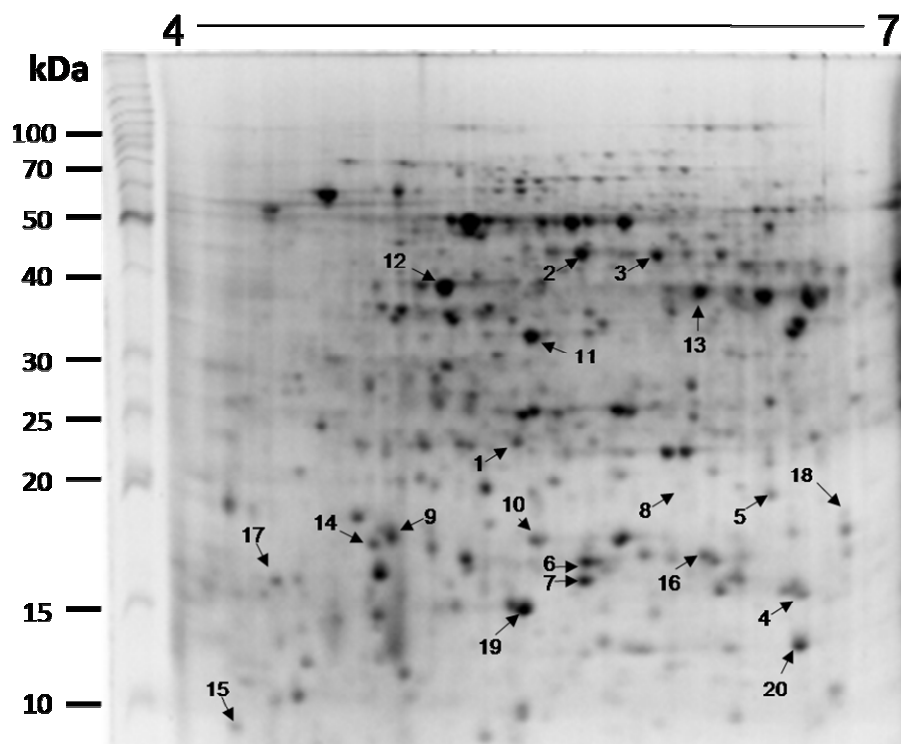


Figura 7. Gel 2-DE de proteínas de raíz de amaranto. Las flechas indican las 20 manchas diferenciales analizadas mediante espectrometría de masas.

4.3.1.1 Identificación de proteínas de raíz de amaranto en respuesta a sequía

De las 20 manchas de proteínas diferencialmente expresadas en respuesta a sequía y analizadas por espectrometría de masas (Tabla 4), en cinco de los casos (manchas 9,14,15,17 y 18) no fue posible la identificación, esto debido a que no se obtuvo un buen match al realizar la búsqueda de los péptidos contra la base de datos no redundante del NCBI.

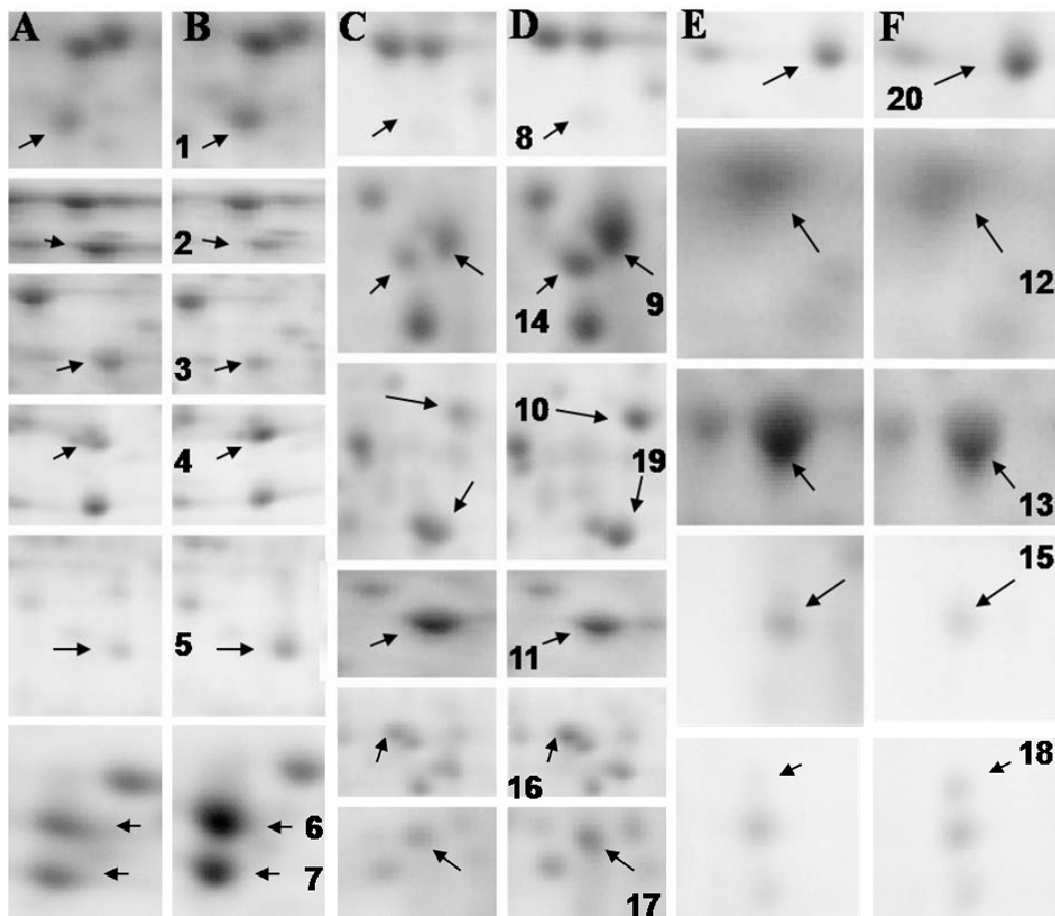


Figura 8. Cambios en la concentración de proteínas de raíz de amaranto tras ser sometidas a sequía. (A, C y E) raíces control. (B, D y F) raíces sometidas al tratamiento de sequía.

Entre las 15 manchas de proteína que se logró identificar, 10 fueron manchas que se sobre expresaron y entre estas se encontraron: 5 proteínas pequeñas de choque térmico (*Small Heat Shock Proteins "sHSPs"*), Dos diferentes proteínas de unión a RNA ricas en glicina (*putative glycine-rich RNA binding proteins*), una superóxido dismutasa (SOD Cu-Zn), la nucleósido difosfato cinasa 1 (*NDPK 1*) y el precursor de una chaperonina de 21 kilodaltones (*CPN 21*).

Las 5 manchas de proteínas disminuidas en respuesta a sequía correspondieron a: Dos diferentes S-adenosil metionina sintetisas, isoflavona reductasa, adenosina cinasa y la ácido caféico 3-O metiltransferasa (*COMT*).

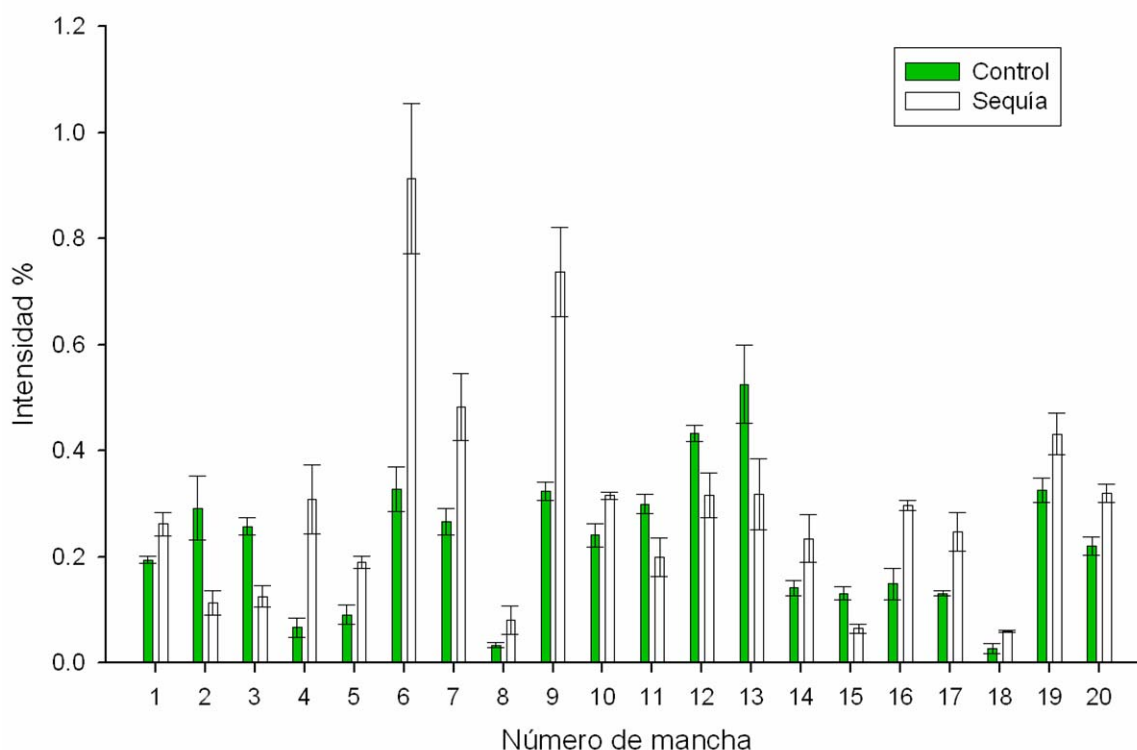


Figura 9. Histogramas que muestran las diferencias en la cantidad de las proteínas de raíz de amaranto en las manchas seleccionadas para análisis mediante espectrometría de masas.

4.3.1.2 Proteínas de raíz de amaranto sobre expresadas en respuesta a sequía.

Proteínas pequeñas de choque térmico (Manchas 6, 7, 8 10 y 16)

El estrés abiótico origina disfunción de las proteínas celulares, de ahí que sea importante para las células mantener sus proteínas en su conformación funcional y prevenir su agregación bajo condiciones de estrés. Las proteínas de choque térmico son componentes clave que contribuyen a mantener la homeostasis celular. Estas proteínas son responsables del plegamiento correcto, ensamblaje, translocación y degradación de otras proteínas; también participan en la estabilización de las membranas y el re-plegamiento de proteínas bajo condiciones de estrés (Wang *et al.*, 2004).

Tabla 4. Proteínas de raíz de amaranto identificadas en respuesta a sequía mediante espectrometría de masas.

No. ^a	Factor de inducción ^b	Score [‡]	Proteína identificada	No. de acceso ^c	Masa (kDa) / pI Exp ^d	Masa (kDa) / pI Teórico ^e	Fuente
1 ↑	1.35*	109	Precursor de Chaperonina 21	gi 7331143	22.6 / 5.43	26.5 / 6.85	<i>Lycopersicon esculentum</i>
2 ↓	0.39*	401	S-adenosilmetionina sintetasa 2	gi 127046	43.4 / 5.66	43.2 / 5.57	<i>Dianthus caryophyllus</i>
3 ↓	0.49*	506	S-adenosilmetionina sintetasa	gi 71000465	43.1 / 5.97	42.9 / 5.60	<i>Beta vulgaris</i>
4 ↑	4.68*	45	Proteína de unión a RNA rica en glicina 1. Putativa	gi 6911142	15.4 / 6.54	14.1 / 8.71	<i>Catharanthus roseus</i>
5 ↑	2.10*	52	Proteína de unión a RNA rica en glicina 2. Putativa	gi 6911146	18.8 / 6.33	16.2 / 7.82	<i>Catharanthus roseus</i>
6 ↑	2.79*	122	Proteína citosólica de choque térmico clase 1.	gi 37704425	16.8 / 5.65	15.3 / 5.82	<i>Nicotiana tabacum</i>
7 ↑	1.81*	93	Proteína de choque térmico de clase I 17.5 kDa.	gi 38639431	16.2 / 5.64	17.5/5.31	<i>Carica papaya</i>
8 ↑	2.40*	95	Proteína se choque térmico de bajo peso molecular.	gi 159138945	19.6 / 6.04	18.3 / 6.34	<i>Gossypium hirsutum</i>
9 ↑	2.28*	---	No identificada	---	17.7 / 4.90	---	---
10 ↑	1.31*	138	Proteína pequeña de choque térmico	gi 16930753	17.5 / 5.47	17.9 / 5.82	<i>Retama raetam</i>
11 ↓	0.66*	48	Isoflavona reductasa putativa	gi 18410820	32.5 / 5.46	33.7 / 5.66	<i>Arabidopsis thaliana</i>
12 ↓	0.73*	92	Adenosina cinasa 1	gi 15232763	38.5 / 5.11	37.8/ 5.29	<i>Arabidopsis thaliana</i>
13 ↓	0.60*	119	Ácido caféico 3-O- metiltransferasa	gi 3176967	36.8 / 6.14	38.6 / 5.70	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
14 ↑	1.66*	---	No identificada	---	17.4 / 4.84	---	---
15 ↓	0.49*	---	No identificada	---	10.3 / 4.32	---	---
16 ↑	2.00*	50	Proteína de choque térmico de 17.6 kDa clase I (HSP17.6A-CI)	gi 15218934	16.8 / 6.11	17.7 / 6.85	<i>Arabidopsis thaliana</i>
17 ↑	1.89*	---	No identificada	---	15.9 / 4.44	---	---
18 ↑	2.25*	---	No identificada	---	17.3 / 6.73	---	---
19 ↑	1.33*	56	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	gi 3334334	15.6 / 5.41	15.2 / 5.46	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
20 ↑	1.45*	153	Nucleósido difosfato cinasa 1	gi 400404	12.6 / 6.55	16.3 / 6.42	<i>Spinacia oleracea</i>

a = Los números corresponden a los del gel 2-D de la figura 7. ↑= proteínas que incrementan su concentración y ↓= proteínas que disminuyen su concentración tras el tratamiento de sequía. **b**= Es la media del porcentaje de volumen de una mancha en la condición de sequía / la media del porcentaje del volumen de una mancha en la condición normal. * = El efecto del tratamiento es significativo, $P < 0.05$ NI= No identificada. **c**= Número de acceso a la base de datos del NCBI. **d**= Corresponden al peso molecular y punto isoeléctrico aparentes de las manchas en los geles 2-D analizados. **e**= Corresponden al peso molecular y punto isoeléctrico teórico de las mismas proteínas en otros organismos. **‡**= Valores de score para las proteínas identificadas en Mascot. Un valor debajo de 44 indica que la identificación es solo tentativa ($p < 0.05$).

Las sHSPs son proteínas de bajo peso molecular (12-40 kDa) y comparten un dominio C-terminal altamente conservado denominado *alpha-cristallin domain* (Van Montfort *et al.*, 2001), por sí solas no son capaces de re-plegar proteínas no nativas, mas sin embargo, tienen la capacidad unirse a ellas y estabilizarlas, evitando su agregación y facilitando así que sean re-plegadas por chaperonas dependientes de ATP (Wang *et al.*, 2004). Se sabe estas proteínas, se expresan en plantas no sólo en respuesta a estrés por alta temperatura, sino también en respuesta a otro tipo de factores como sequía, estrés salino y osmótico, frío y estrés oxidativo.

Al estudiar la respuesta de las plantas al estrés por sequía empleando un enfoque proteómico varios autores (Vincent *et al.*, 2007; Hajheidari *et al.*, 2005, Yoshimura *et al.*, 2008) han reportado la sobreexpresión de este tipo de proteínas, solo en un caso (Gazanchian *et al.*, 2007) se ha reportado además de su sobreexpresión, la aparición de una proteína pequeña de choque térmico tras someter a la planta a sequía. En el caso de las raíces de amaranto sometidas a sequía se encontró que 5 de las manchas sobre expresadas identificadas corresponden a sHSPs. En conjunto estos resultados sugieren que la sobreexpresión de estas proteínas pudiera utilizarse como estrategia en programas de mejoramiento de la tolerancia a estrés abiótico en plantas.

Precursor de chaperonina 21 (mancha 1)

La chaperonina 21 actúa como una co-chaperonina estabilizando y protegiendo proteínas fundamentales para el correcto funcionamiento del cloroplasto en situaciones de estrés. En plantas se requiere la acción concertada de dos proteínas CPN 60 (groEL) y CPN 21 (groES) para conseguir el plegamiento correcto de proteínas del cloroplasto como la RUBISCO (Wang *et al.*, 2004).

Boscariol Camargo *et al.* (2007) reportaron la sobre expresión de la chaperonina 21 en raíces de lima Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck) sometidas a

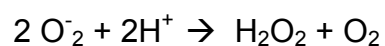
sequía, Jorge *et al.*, (2006) reportaron la inducción de la expresión de la *CPN 21* en respuesta a estrés por sequía en hojas de encino. Esta proteína es un homólogo funcional de la chaperonina 10 (*CPN 10*) y consiste de 2 dominios tipo chaperonina (*CPN like*) fusionados en tándem (Hirohashi *et al.*, 1999), En *Arabidopsis thaliana*, se ha detectado la expresión de *CPN 21* en hojas, raíces y tallos, mientras que la expresión de *CPN 10* solo se ha detectado en hojas y tallos. Esto sugiere que esta chaperonina esta involucrada en la regulación de la actividad de las subunidades de la chaperonina 60 en raíces (Boscariol Camargo *et al.* 2007).

Proteínas putativas de unión a RNA ricas en glicina (manchas 4 y 5)

Las proteínas de unión a RNA ricas en glicina (*Glycine-rich RNA-binding proteins*) juegan un papel importante en la regulación post-transcripcional de la expresión genética, incluyendo el procesamiento del RNA. Se sabe que este tipo de proteínas son inducidas en respuesta a diversos estímulos, por ejemplo altas concentraciones de cloruro de sodio y ácido abscisico incrementando sus niveles de expresión de 4 a 7 veces respectivamente (Aneeta *et al.*, 2002). Otros autores han encontrado que este tipo de proteínas contribuyen a incrementar la tolerancia al congelamiento (Kim *et al.*, 2005) y pueden llevar a cabo funciones de chaperona durante la adaptación al estrés por frío (Kim y Kang, 2006).

Superoxido dismutasa (Cu-Zn SOD) (mancha 19)

Las superóxido dismutasas (EC 1.15.1.1) son un grupo de metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno que es una molécula menos tóxica (Alsher *et al.*, 2002). La reacción catalizada es la siguiente:



Estas enzimas alteran su actividad bajo diferentes condiciones ambientales (Bowler *et al.*, 1992), se clasifican de acuerdo a los cofactores metálicos con los que se unen dando lugar a tres clases de enzimas; FeSOD, MnSOD y Cu-ZnSOD. Los cloroplastos generalmente contienen Cu-ZnSOD y en algunos casos contienen FeSOD (Van Camp *et al.*, 1994). Las MnSOD se encuentran en mitocondrias y peroxisomas y las Cu-ZnSOD se localizan en el cloroplasto, el citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Qureshi *et al.*, 2007).

En este trabajo se encontró un incremento en la concentración de SOD en respuesta a sequía en raíces de amaranto, esto concuerda con lo reportado para caña de azúcar (Hajheidari *et al.*, 2005), Arroz (Salekdeh *et al.*, 2002; Ali y Komatsu, 2006) y *Elymus elongatum* (Gazanchian *et al.*, 2007). Este tipo de proteínas se han empleado como candidatos para mejorar de la tolerancia a sequía de los cultivos a través de ingeniería genética (McKersie *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006).

Nucleósido difosfato cinasa 1 (mancha 20)

Las nucleósido difosfato cinasas (EC 2.7.4.6) son enzimas que transfieren grupos fosfato de los nucleósidos trifosfatados (NTPs) a nucleósidos difosfatados (NDPs) por esta razón se les cataloga como proteínas de *housekeeping* ya que utilizan principalmente el ATP, para mantener los niveles CTP, UTP y GTP de la célula (Escobar Galvis *et al.*, 2001).

Su expresión se incrementa en respuesta a sequía y estrés salino. (Salekdeh y Komatsu 2007). Esta clase de enzimas juegan un papel importante en la respuesta a hormonas, estrés por calor, estrés por sequía, participan en la señalización mediada por peróxido de hidrógeno de las MAPK, señalización en respuesta a la luz UV-B, crecimiento y desarrollo (Escobar-Galvis *et al.*, 2001). Se cree que su papel en la regulación de estas funciones posiblemente se debe a su actividad de fosfotransferasa.

Moon *et al.*, (2003) mostraron que la actividad de una NDPK de *Arabidopsis thaliana* (AtNDPK2) está asociada con la señalización de peróxido de hidrógeno mediada por MAPK en plantas y encontraron que al sobre expresar esta proteína en *Arabidopsis thaliana* disminuye la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), incrementando la tolerancia de esta planta a múltiples tipos de estrés abiótico.

4.3.1.3 Proteínas de raíz de amaranto reprimidas en respuesta a sequía.

S-adenosilmetionina sintetasas (manchas 2 y 3)

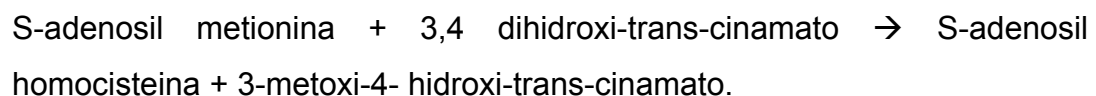
Las S-adenosilmetionina sintetasas (SAMs EC 2.5.1.6) catalizan la siguiente reacción:



La S-adenosil metionina producida en esta reacción es un donador de grupos metilo que participa en reacciones de transmetilación esenciales para la síntesis de lípidos, ácido nucleicos y proteínas. También participa en la biosíntesis de fenilpropanoides, etileno, poliaminas, nicotinamida y monolignoles (Yang y Hoffman 1984).

(COMT), (mancha 13)

La ácido caféico 3-O metiltransferasa (COMT, EC 2.1.1.68) es una enzima que participa en la síntesis de fenilpropanoides relacionados con la síntesis de lignina catalizando la siguiente reacción de metilación:



Isoflavona reductasa putativa (mancha 11)

La biosíntesis de lignanos e isoflavonoides involucra la participación de reductasas dependientes de NADPH, isoflavona reductasa (IFR), pinoresinol-lacriresinol-reductasa (PLR) y fenil-cumaran-bencil-eceter reductasa (PCBER); que en conjunto son conocidas como “reductasas parecidas a IFR” (IFR-like) (Shoji *et al.*, 2002). Los isoflavonoides juegan un papel importante en la defensa de las plantas, las isoflavona reductasas (EC 1.3.1.-) reconocen específicamente isoflavonoides y cataliza su reducción en presencia de NADPH.

Adenosina cinasa (mancha 12)

La adenosina cinasa (ADK, EC 2.7.1.20) cataliza la formación de AMP a partir ATP y adenosina.

La reacción es la siguiente:



Esta es la principal ruta para la reutilización de la adenosina en las plantas (Moffatt *et al.*, 2000). En hojas de espinaca los niveles de transcritos y proteína de la ADK se incrementan en respuesta a estrés salino (Weretilnyk *et al.*, 2001). Su disminución en raíces bajo sequía probablemente este relacionada con la disminución en la reutilización de adenosina para la síntesis de SAM.

Incrementos en la abundancia o actividad de la SAMS se han asociado con el incremento en la lignificación y la síntesis de glicin-betaina bajo condiciones de estrés salino (Sánchez-Aguayo *et al.*, 2004). Empleando un enfoque proteómico, Parker *et al.* (2006) encontraron la represión de dos diferentes SAMS en hoja de arroz sometidas a estrés salino. Yang *et al.* (2006), han encontrado su incremento en respuesta a estrés por frío.

En lo que respecta a estrés por sequía, utilizando un enfoque proteómico, Vincent *et al.* (2005) encontraron que en hojas de maíz en crecimiento dos isoformas de COMT se acumulaban a medida que se alejaban del punto de inserción de la hoja, mientras que en plantas sometidas a déficit de agua (sequía), observaron una menor cantidad de estas proteínas en todas las secciones de las hojas y que además esta cantidad era menor a medida que se alejaban del punto de inserción.

Además de la disminución en la concentración de las dos COMT identificadas, estos autores observaron el mismo comportamiento en diferentes proteínas relacionadas con la síntesis de fenilpropanoides y lignina, entre ellas tres isoformas de la SAMS y una proteína tipo isoflavona reductasa, el ensayo de actividad de la COMT y la cuantificación de los derivados de la tioacidolisis de la lignina comprobaron que la disminución de estas proteínas estaba relacionada con la disminución en el crecimiento debida a la sequía.

En las plantas de amaranto sometidas a sequía se observó que el tamaño de las raíces y de la planta en general fue afectado por el estrés severo. La disminución de la concentración de algunas de las proteínas identificadas en este trabajo (dos diferentes SAMS, COMT, Isoflavona reductasa y ADK) nos sugiere que en respuesta al estrés severo se detiene el crecimiento de las raíces y se afecta la producción de lignina.

4.3.2 Análisis proteómico de hoja de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés por sequía

Los efectos del tratamiento de sequía sobre los patrones de proteínas en las hojas de amaranto se analizaron mediante 2-DE. El análisis por triplicado de los geles para las condiciones control y sequía mostró alrededor de 315 manchas de proteína reproduciblemente detectadas en todos los geles. 20 manchas de hoja cuyo cambio en concentración fue significativo, 1 mancha que solo apareció en

sequía y 1 mancha que fue la mas abundante en el gel y que presumiblemente se trata de la proteína ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa / oxigenasa (RUBISCO), se analizaron mediante espectrometría de masas (Figura 10).

La Figura 11 muestra el cambio en la concentración de las manchas seleccionadas.

4.3.2.1 Identificación de proteínas de hoja de amaranto mediante espectrometría de masas.

De las 22 manchas de proteínas analizadas por espectrometría de masas (Tabla 5), en cinco de los casos (manchas 5, 8, 9,17 y 22) no fue posible la identificación debido a que no se obtuvo un buen match al realizar la búsqueda de los péptidos contra la base de datos no redundante del NCBI.

Entre las 17 manchas de proteína que se logró identificar; 6 fueron manchas que se sobre expresaron y entre estas se encontraron: Dos manchas identificadas como la subunidad beta de la chaperonina de 60 kDa (CPN 60 beta), la subunidad alfa de la chaperonina de 60 kDa (CPN 60 alfa), S-adenosil metionina sintetasa (SAMS), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP 70) y una enzima conjugadora de ubiquitina (*ubiquitin-conjugating enzyme family protein-like protein*).

Las 10 manchas de proteínas disminuidas en respuesta a sequía, tres manchas correspondieron a la subunidad grande de la RUBISCO, dos a la subunidad de 23 kDa del OEC (*oxigen evolving complex*), subunidad 2 del complejo hierro-azufre del citocromo B6-F, una proteína hipotética que tendría actividad de nucleósido difosfato cinasa, fructosa bifosfato aldolasa citoplásmica, ascorbato peroxidasa citosólica y un precursor de malato deshidrogenasa mitocondrial.

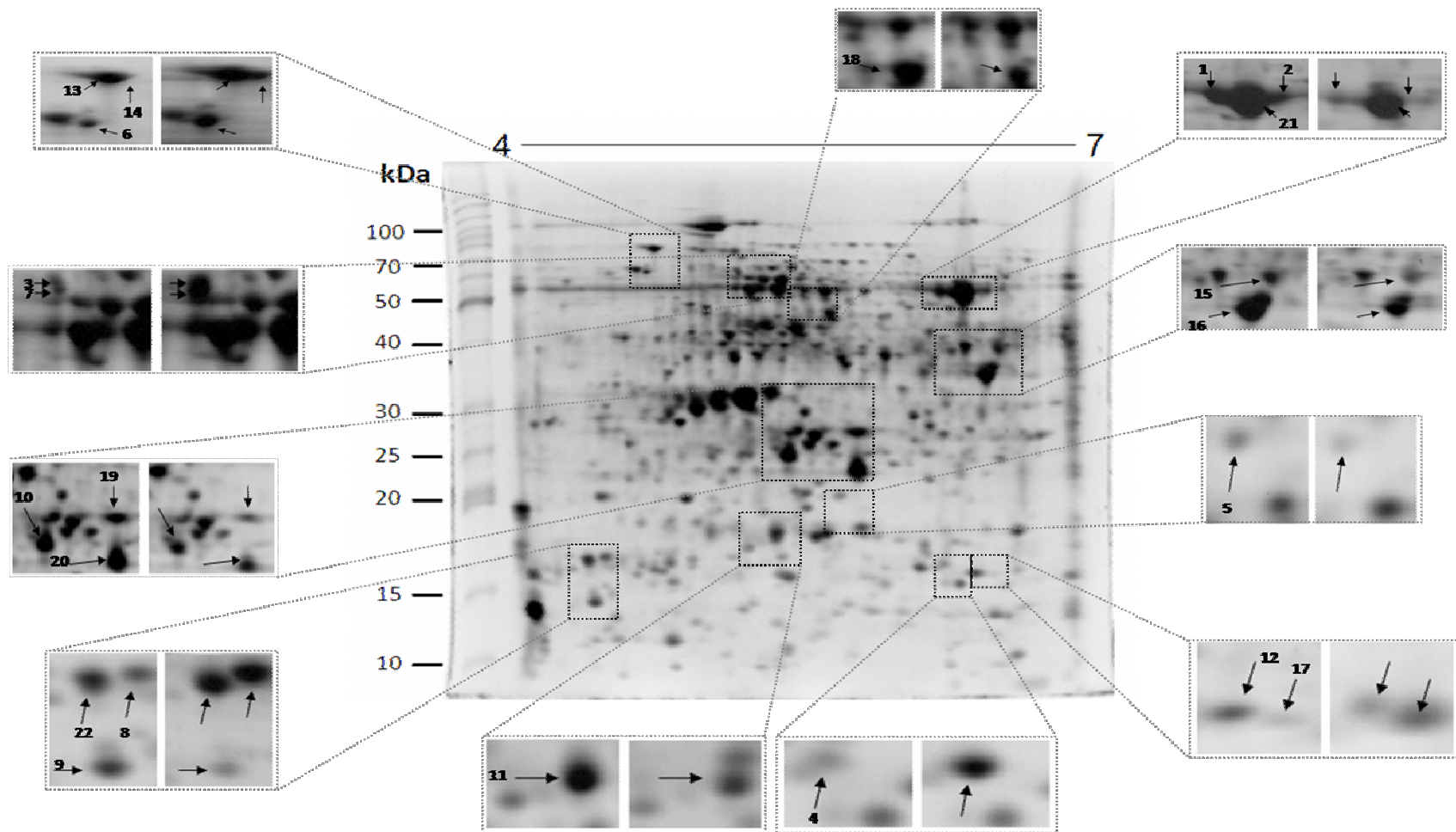


Figura 10. Gel 2-DE de proteínas de hoja de amaranto. Los recuadros muestran cambios en la concentración de proteínas de hoja de amaranto tras ser sometidas a sequía. En el lado izquierdo de cada recuadro se muestra la condición control y el número de las manchas analizadas, mientras que en el lado derecho se muestran los gels de hojas de plantas sometidas a sequía.

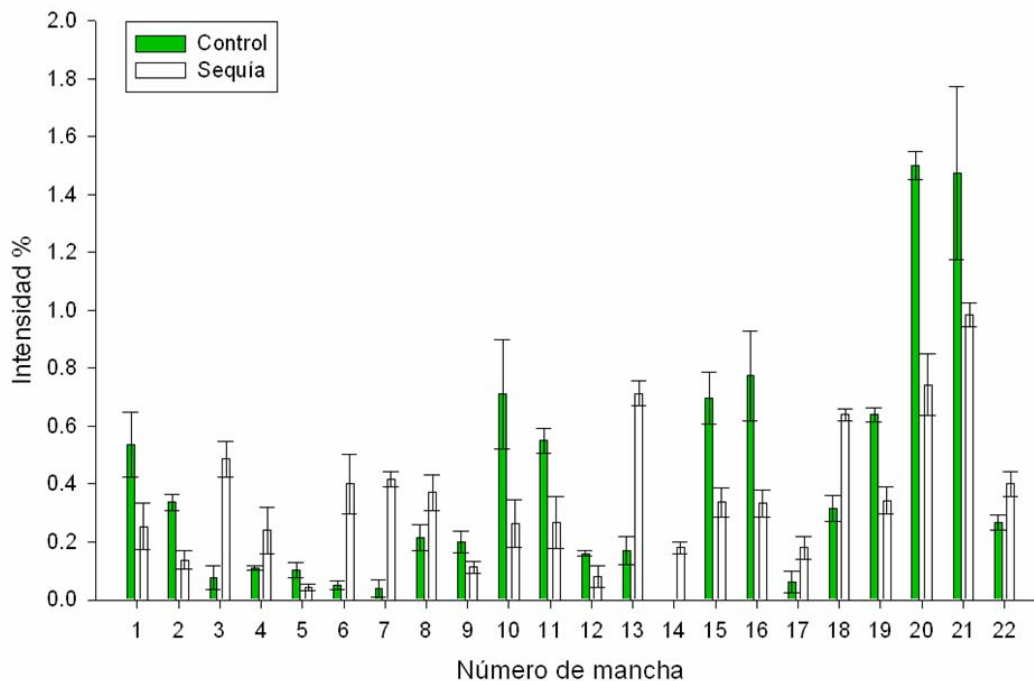


Figura 11. Histogramas que muestran las diferencias en la cantidad de las proteínas de hoja de amaranto analizadas mediante espectrometría de masas.

La mancha que solo apareció tras la sequía (mancha 14) se identificó como: una proteína hipotética con posible actividad de proteína de choque térmico de 70 kDa.

4.3.2.2 Proteínas de hoja de amaranto sobre expresadas en respuesta a sequía.

Subunidad alfa y beta de la chaperonina de 60 kDa (manchas 3,6 y 7)

Las chaperoninas de los cloroplastos contienen dos tipos de subunidades (CPN alfa y CPN beta) las cuales son idénticas en solo aprox. 50% de sus aminoácidos, su caracterización funcional es limitada, pero se sabe que son importantes en el ensamblaje de de proteínas como la Rubisco (Boston et al., 1996).

S-adenosilmetionina sintetasa (SAMS) (mancha 18)

La S-adenosilmetionina sintetasa (SAMS, EC 2.5.1.6) cataliza la formación a partir de L-metionina y ATP de la S-adenosil metionina, que es un donador de grupos metilo que participa en numerosas reacciones de transmetilación (Yang y Hoffman, 1984). El incremento en la actividad o abundancia de la SAMS está asociado con el incremento de la lignificación y la síntesis del glicin-betaina durante estrés salino (Sánchez Aguayo *et al.*, 2004).

Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP 70) (manchas 13 y 14)

Las HSP 70 previenen la agregación y asisten en el re-plegamiento de proteínas no nativas bajo condiciones normales y estrés; facilitan la degradación proteolítica de proteínas inestables marcándolas para que se dirijan hacia los lisosomas o proteasomas. Algunas de estas proteínas se expresan constitutivamente, mientras que otras se expresan solo bajo condiciones de estrés (Hartl, 1996).

Enzima conjugadora de ubiquitina (mancha 4)

La enzima conjugadora de ubiquitina, E2 o Enzima acarreadora de ubiquitina (EC 6.3.2.19) realiza el segundo paso en las reacciones de ubiquitinación que marcan proteínas para ser degradadas vía proteasoma.

El mecanismo general es el siguiente: Una enzima E1 activa una molécula de ubiquitina uniéndola a una cisteína de su sitio activo, esta ubiquitina activada se transfiere a una cisteína en la E2, una vez conjugada con la ubiquitina activada la E2 se une a una ubiquitina ligasa (E3) estas proteínas transfieren la ubiquitina de E2 a al grupo amino de una lisina en la proteína blanco (Nandi *et al.*, 2006).

Tabla 5. Identificación de proteínas de hoja de amaranto en respuesta a sequía mediante espectrometría de masas.

Mancha no. ^a	Factor de inducción ^b	Score [‡]	Proteína identificada	No. de acceso ^c	Masa (kDa) / pI Exp ^d	Masa (kDa) / pI Teórico ^e	Fuente
1 ↓		339	Subunidad grande de RUBISCO [¶]	gij1346961	52 / 6.27	52.6 / 6.14	<i>Amaranthus tricolor</i>
2 ↓	0.47*	277	Subunidad grande de RUBISCO [¶]	gij1346961	52 / 6.52	52.6 / 6.14	<i>Amaranthus tricolor</i>
3 ↑	0.41*	54	Subunidad beta de la chaperonina 60 (CPN 60-Beta)	gij1762130	62 / 5.20	63.3 / 5.72	<i>Solanum tuberosum</i>
4 ↑	6.35*	74	Enzima conjugadora de ubiquitina (ubiquitin-conjugating enzyme family protein-like protein)	gij76160962	16.3 / 6.28	16.5 / 6.20	<i>Solanum tuberosum</i>
5 ↓	2.18*	---	No identificada	---	19.9 / 5.75	---	---
6 ↑	0.42*	174	Subunidad alfa de la chaperonina 60 (CPN-60 alfa)	gij1710807	62 / 4.73	61.9 / 5.15	<i>Pisum sativum</i>
7 ↑	8.00*	53	Subunidad beta de la chaperonina 60 (CPN 60-Beta)	gij1762130	60 / 5.20	63 / 5.72	<i>Solanum tuberosum</i>
8 ↑	10.42*	---	No identificada	---	---	---	---
9 ↓	1.73*	---	No identificada	---	---	---	---
10 ↓	0.57*	130	Subunidad de 23 kDa del OEC	gij148535011	24.4 / 5.47	21.5 / 5.94	<i>Salicornia veneta</i>
11 ↓	0.37*	145	Subunidad 2 del complejo Hierro-Azufre del citocromo B6-F	gij146454654	18 / 5.40	16.6 / 6.04	<i>Sonneratia alba</i>
12 ↓	0.48*	223	Proteína hipotética OsJ_018983: (nucleósido difosfato cinasa)	gij125595441	15.8 / 6.45	21.5 / 8.38	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>
13 ↑	0.50*	335	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	gij1143427	75 / 4.76	75.4 / 5.15	<i>Cucumis sativus</i>
14	4.20*	58	Proteína hipotética (proteína de choque térmico 70 kDa)	gij147805297	75 / 4.83	69.1 / 5.11	<i>Vitis vinifera</i>
15 ↓	* solo en sequía	107	Fructosa bifosfato aldolasa citoplásmica	gij113624	38.7 / 6.58	38.5 / 5.96	<i>Spinacia oleracea</i>
16 ↓	0.48*	260	Precursor de Malato deshidrogenasa mitocondrial.	gij126896	34.6 / 6.51	36.2 / 8.88	<i>Citrullus lanatus</i>
17 ↑	0.43*	---	No identificada	---	15.6 / 6.52	---	---
18 ↑	3.00*	391	S-adenosil metionina sintetasa	gij48928010	46 / 5.69	43.2 / 5.52	<i>Solanum brevidens</i>
19 ↓	2.02*	223	Ascorbato peroxidasa	gij559005	27 / 5.83	27.4 / 5.43	<i>Nicotiana tabacum</i>
20 ↓	0.54*	155	Subunidad de 23 kDa del OEC	gij148535011	23 / 5.83	21.5 / 5.94	<i>Salicornia veneta</i>
21 ↓	0.50*	351	Subunidad grande de RUBISCO [¶]	gij7240502	52 / 6.38	51.7 / 6.12	<i>Achlys triphylla</i>
22 ↑	0.67	---	No identificada	---	16.6 / 4.43	---	---
	1.50*	---	No identificada	---	---	---	---

a = Los números corresponden a los del gel 2-D de la figura 10. **↑**= proteínas que incrementan su concentración y **↓**= proteínas que disminuyen su concentración tras el tratamiento de sequía. **b**= Es la media del porcentaje de volumen de una mancha en la condición de sequía / la media del porcentaje del volumen de una mancha en la condición normal. *****= El efecto del tratamiento es significativo, $P < 0.05$. **NI**= No identificada. **c**= Número de acceso a la base de datos del NCBI. **d**= Corresponden al peso molecular y punto isoelectrico aparentes de las manchas en los geles 2-D analizados. **e**= Corresponden al peso molecular y punto isoelectrico teórico de las mismas proteínas en otros organismos. **‡**= Valores de score para las proteínas identificadas en Mascot. Un valor debajo de 44 indica que la identificación es solo tentativa ($p < 0.05$). **¶**= Ribulosa-1,5- bifosfato carboxilasa oxigenasa.

4.3.2.3 Proteínas de hoja de amaranto reprimidas en respuesta a sequía.

Subunidad grande de la RUBISCO (manchas 1,2 y 21)

La enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, E.C. 4.1.1.39) juega un papel central en la fotosíntesis en plantas ya que realiza en la fijación de CO₂, además de su actividad de carboxilasa, actúa como una oxigenasa en una reacción que implica la competencia entre el O₂ y el CO₂ por reaccionar con la ribulosa-1,5-bifosfato (Ogren y Bowes, 1971), así mientras la fotosíntesis comienza por la actividad de carboxilasa de la Rubisco, su actividad de oxigenasa cataliza la primera reacción de la fotorespiración. El balance entre estas reacciones está determinado por las propiedades de la Rubisco y la cantidad de oxígeno y dióxido de carbono. La cantidad de Rubisco en hojas es controlada por su tasa de síntesis y degradación. Incluso bajo condiciones de estrés por sequía en etapas tempranas, esta proteína se mantiene relativamente estable en forma de holoenzima y tiene una vida media de varios días (Webber et al., 1994). Sin embargo, bajo condiciones de sequía se ha detectado un rápido decremento de transcritos de la subunidad pequeña de la rubisco en tomate (Bartholomew *et al.*, 1991), arábido (*Arabidopsis*) (Williams *et al.*, 1994) y arroz (Vu *et al.*, 1999), lo que indica un decremento en su síntesis. Cohen et al., (2006) reportaron que bajo condiciones de estrés oxidativo existe una disminución en la síntesis de la subunidad grande de la rubisco sin que se afecten los niveles de RNA mensajero.

Subunidad de 23 kDa del OEC (Oxygen Evolving Complex) (manchas 10 y 20)

El OEC es un complejo enzimático también conocido como *water-splitting complex*, está formado por 3 subunidades (33, 23 y 16 kDa) y realiza la fotooxidación del agua durante las reacciones luminosas de la fotosíntesis liberando oxígeno. Se ha demostrado que el déficit de agua (sequía) daña este complejo. (Skotnica et al., 2000).

Subunidad 2 del complejo Hierro-Azufre del citocromo b₆/f (mancha 11)

La plastoquinona-plastocianina oxidoreductasa (EC 1.10.99.1) forma parte del complejo citocromo b₆/f presente en cianobacterias y cloroplastos, cataliza la oxidación del plastoquinol y el citocromo f. Este complejo está compuesto por el citocromo b₆, el citocromo f y las subunidades Rieske o proteínas hierro-azufre (Madueño *et al.*, 1992).

Bajo condiciones favorables los electrones que fluyen a través de la cadena transportadora de electrones se consumen en el ciclo de Calvin, minimizando el flujo de electrones al O₂. Bajo condiciones en las que el ciclo de Calvin se inhibe (sequía o bajas concentraciones de CO₂), el transporte de electrones es reprimido para minimizar el flujo de electrones al O₂. El punto más probable de regulación es el complejo citocromob₆/f (Golding y Johnson 2003).

Nucleósido difosfato cinasa hipotética (mancha 12)

Las nucleósido difosfato cinasas (NDPKs, EC 2.7.4.6) son enzimas que transfieren grupos fosfato de los nucleósidos trifosfatados (NTPs) a nucleósidos difosfatados (NDPs), por lo que se les ha catalogado como proteínas de *housekeeping* ya que utilizan principalmente el ATP para mantener los niveles de CTP, UTP y GTP de la célula. Se cree tienen actividad de fosfotransferasa (Escobar Galvis *et al.*, 2001).

Fructosa bifosfato aldolasa citoplásmica, (mancha 15)

La fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (EC 4.1.2.13) es una enzima importante para la glucólisis que mediante una reacción reversible, rompe la fructosa-1,6-bifosfato en dos moléculas de tres carbonos: Dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato.

Precursor de malato deshidrogenasa mitocondrial (mancha 16)

La malato deshidrogenasa es una enzima (EC 1.1.1.37) del ciclo del ácido cítrico que cataliza la conversión reversible de malato a oxalacetato en presencia de NAD⁺.



La disminución en la concentración de su precursor quizá este relacionada con mantener altos los niveles de malato, que se sabe es un osmolito que se acumula en respuesta a diferentes tipos de estrés.

Ascorbato peroxidasa citosólica (cAPX) (mancha 19)

Las ascorbato peroxidases (EC 1.11.1.11) son enzimas que utilizan ácido ascórbico como donador de hidrógeno para degradar el peróxido de hidrógeno. La reacción es la siguiente:



Empleando el enfoque proteómico se han encontrado incrementos en la concentración de APX y otras peroxidases bajo diferentes condiciones estresantes como: ozono (Agrawal *et al.*, 2002), sequía (Hajheidari *et al.*, 2005) y estrés salino (Yan *et al.*, 2005). Sin embargo, la ascorbato peroxidasa es altamente sensible a la inactivación por ROS y con frecuencia es insuficiente para proteger el aparato fotosintético de la fotoinhibición durante el estrés severo (Shikanai *et al.*, 1998).

Se ha observado que la disminución de la concentración y actividad de la APX es un requisito para la inducción de la senescencia (Hossain *et al.*, 2006). En hojas de amaranto sometidas a estrés severo (CRA<50%) en este trabajo, la concentración de APX se encuentra disminuida y si bien las hojas muestran

enrollamiento y pérdida de la turgencia aún son capaces de recuperarse tras la rehidratación (figura 2).

CONCLUSIONES

Los métodos TCA-A y TCA-B probados para la extracción de proteínas amaranto, muestran rendimientos aceptables y permiten obtener geles bidimensionales de buena calidad para el análisis de proteínas de hoja y raíz de amaranto respectivamente.

La identificación de las proteínas sobre-expresadas y disminuidas muestra que en las hojas amaranto sometido a estrés severo existe daño y disminución de la actividad del aparato fotosintético y en respuesta se sintetizan proteínas involucradas en mantener la estabilidad del aparato fotosintético y el correcto plegamiento de las proteínas, la degradación de proteínas desnaturalizadas y la síntesis de osmolitos.

En el caso de las raíces se observa el incremento de proteínas que se han relacionado con la señalización en respuesta a sequía, la síntesis de proteínas involucradas en mantener el correcto plegamiento de otras proteínas y proteínas encargadas de proteger a las células de las especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, la disminución de proteínas relacionadas con las reacciones de transmetilación y la síntesis de lignina indican que la detención del crecimiento y la disminución en la lignificación son respuestas adaptativas al estrés severo en raíces.

Las plantas sometidas a estrés severo por sequía (CRA < 50%) presentan pérdida de la turgencia y enrollamiento de las hojas, también se detecta una disminución en la cantidad de ascorbato peroxidasa, que se ha relacionado con la inducción de senescencia. La recuperación de las plantas de amaranto tras su rehidratación nos indica que la tolerancia a sequía en amaranto está relacionada con su rápida recuperación, rasgo que es característico de plantas tolerantes a sequía.

REFERENCIAS

- Agrawal G.K., Rakwal R., Yonekura M., Kubo A., Saji H. 2002. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*. 2, 947-959.
- Ali G. M. and Komatsu S. 2006. Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. *Journal of Proteome Research*. 5, 396-403.
- Alsher R.G., Erturk N., Heath L. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1331-1341.
- Aneeta,, Sanan Mishra N., Tuteja N., Kumar Sopory S. 2002. Salinity- and ABA-induced up-regulation and light-mediated modulation of mRNA encoding glycine-rich RNA-binding protein from *Sorghum bicolor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 296, 1063-1068.
- Barba de la Rosa A.P., Gueguen J., Paredes López O. Viriben G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40, 931-936.
- Barba de la Rosa A.P., Silva Sánchez C, González De Mejía E. *Characterization of bioactive peptides in Amaranthus hypochondriacus seed storage proteins*. From: *Hispanic Foods: Chemistry and Flavor*; Tunick, M.H.; Gonzalez de Mejia, E, Editors; ACS Symposium Series 946, Chapter 9; American Chemical Society: Washington, DC; pp 103-116, 2006.
- Barrs H.D., Weatherley P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity techniques for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biology Science* 15, 413-428.
- Bartholomew D. M., Bartley G. E., Scolink P.A. 1991. Abscicic-acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiology*. 96, 291-296.
- Boscariol Camargo R. L., Berger I. J., Souza A. A., M. do Amaral A. Carlos E. F., Freitas Astúa J., Takita M. A., Targon M. L., Medina C. L., Reis M. S., Machado M.A. 2007. In silico analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) under water stress. *Genetics and Molecular Biology*. 3, 906-916.
- Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*. 32, 191-222.
- Bowler C., Montagu M. V., Inze D. 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43, 83-116.

Boyer J.S. 1982. Plant Productivity and Environment. *Science* 1982. 218, 443-448.

Briones Cerecero E.P., Huerta Ocampo J.A., De León Rodríguez A., Terrones M., Barba de la Rosa A.P. 2008. Protein extraction from amaranth, agave, and nopal plants for two-dimensional electrophoresis analysis. *Plant Biotechnology Journal*. (Submitted).

Cabuslay G., Ito O., Alejar A. 1999. Genotypic differences in physiological responses to water deficit in rice. In: O'Toole J., Ito O., Hardy B., eds. *Genetic improvement of rice for water-limited environments*. Los Baños: International Rice Research Institute. 99–116.

Chávez M.M., Oliveira, M.M. 2004. Mechanisms underlying resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55, 2365-2384.

Cohen I., Sapir Y., Shapira M. 2006. A Conserved Mechanism Controls Translation of Rubisco Large Subunit in Different Photosynthetic Organisms. *Plant Physiology*, 141, 1089–1097.

Escobar Galvis M. L., Marttila S., Håkansson G., Forsberg J., Knorpp C. 2001., Heat Stress Response in Pea Involves Interaction of Mitochondrial Nucleoside Diphosphate Kinase with a Novel 86-Kilodalton Protein. *Plant Physiology*. 126, 69–77.

Gazanchian A., Hajheidari M., Sima N.K., Salekdeh G.H. 2007. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*. 58, 291-300.

Gins M.S., Konokov P.F., Gins V.K., Lysenko G.G., Desalen T.L., Bravova G.B. 1998. Physicochemical properties and biological activity of amaranthine in *Amaranthus caudatus* L. plants. *Applied Biochemistry Microbiology*. 34, 409-413.

Golding A. J., and Johnson G.N. (2003) Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta*. 218: 107–114.

Gómez Vidal S., Tena M., López Llorca LV., Salinas J. 2008. Protein extraction from *Phoenix dactylifera* L. leaves, a recalcitrant material, for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 29, 448-456.

Görg A., Weiss W., Dunn, M.J. 2004 Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4, 3665-3685.

Graves P. R., Haystead T. A. J. 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66, 39-63.

Hajheidari M., Abdollahian Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S., Salekdeh G.H. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*. 5, 950–960.

Hartl F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 13, 571-579.

Hirohashi T., Nishio K., Nakai M.1999. cDNA sequence and overexpression of chloroplast chaperonin 21 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1429(2):512-515.

Hossain Z., Mandal A.K., Kumar Datta S., Krishna Biswas A. 2006. Decline in ascorbate peroxidase activity - A prerequisite factor for tepal senescence in *gladiolus*. *Journal of Plant Physiology*. 163, 186-194.

Jorge R.M., Navarro C., Lenz S., Ariza S., Jorin J. 2006 Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress, *Proteomics*. 6, 207–214.

Khush G.S. 2001. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 60, 15-26.

Kim Y.O., Kang H. 2006. The role of a zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein during the cold adaptation process in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 47, 793-798.

Kim Y.O., Kim J.S., Kang H. 2005. Cold-inducible zinc finger containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 43, 890-900.

Madueño F., Napier J.A., Cejudo F.J., Gray J.C.1992. Import and processing of the precursor of the Rieske FeS protein of tobacco chloroplasts. *Plant Molecular Biology*. 20, 289-299.

McKersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O. 1996. Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant Physiology*. 111, 1177–1181.

Moffatt B.A., Wang L., Allen M.S., Stevens Y.Y., Qin W., Snider J., von Schwanberg K. (2000) Adenosine kinase of *Arabidopsis*: kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology*. 124, 1775–1785.

Montalvo Hernández L., Piedra Ibarra E., Gómez Silva L., Lira Carmona R., Acosta Gallegos J. A., Vázquez Medrano J., Xoconostle Cázares B., Ruíz Medrano R. 2008. Differential accumulation of mRNAs in drought-tolerant and susceptible common bean cultivars in response to water deficit. *New Phytologist*. 177, 102–113.

Moon H., Lee B., Choi G., Shin D., Prasad D.T., Lee O., Kwak S.S., Kim D.H., Nam J., Bahk J., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J., Lim C.O., Yun D.J. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 358-363.

Nandi D., Tahiliani P., Kumar A. and Chandu D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*. 31, 137–155.

National Academy of Sciences. 1984. Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. National Academy Press, Washington D.C.

Ogren W.L., and Bowes G. (1971) Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration. *Nature New Biology* 230:159–160.

Paredes López O., Barba de la Rosa, A. P., Hernández López D., Carabez, A. Características Alimentarias y Aprovechamiento Agroindustrial. *Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*. Washington D.C. 1991 pp 1-20.

Parker R., Flowers T.J., Moore A.L., Harpham N.V. 2006. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*. 57, 1109-1118.

Qureshi MI, Qadir S, Zolla L. 2007. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology*. 164, 1239-1260.

Salekdeh G. H., Komatsu S. 2007. Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics* 7, 2976-2996.

Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., Bennett J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*. 2, 1131-1145.

Sánchez Aguayo I., Rodríguez Galán J.M., García R., Torreblanca J., Pardo J.M. 2004. Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta*. 220, 278-285.

Saravanan R.S. Rose J.K. 2004. A critical evaluation of simple extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4, 2522-2532.

Shikanai T., Takeda T., Yamauchi H., Sano S., Tomizawa K.I., Yokota A., Shigeoka S. 1998. Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Letters*. 428, 47-51.

Shoji T., Winz R., Iwase T., Nakajima K., Yamada Y., Hashimoto T. 2002. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. *Plant Molecular Biology*. 50, 427-440.

Siener R., Hönow R., Seidler A., Voss S., Hesse A. 2006. Oxalate contents of species of the *Polygonaceae*, *Amarantaceae* and *Chenopodiaceae* families. *Food Chemistry*. 98, 220-224.

Silva Sánchez C., de la Rosa A.P., León Galván M.F., de Lumen B.O., De León Rodríguez A., de Mejía E.G. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 1233-1240.

Skotnica J., Matousková M., Naus J., Lazár D., Dvůrák L. 2000. Thermoluminescence and fluorescence study of changes in Photosystem II photochemistry in desiccating barley leaves. *Photosynthesis Research*. 65, 29-40.

Tang L., Kwon S.Y., Kim S.H., Kim J.S., Choi J.S., Cho K.Y., Sung C.K., Kwak S.S., Lee H.S. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports*. 25, 1380-1386.

Valliyodan B., Nguyen H.T. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 9, 189-195.

Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D. Superoxide dismutases. In: Foyer CH, Mullineaux PM, editors. Causes of photo-oxidative stress in plants and amelioration of defense systems. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. p. 317-341.

Van Montfort R.L., Basha E., Friedrich K.L., Slingsby C., Vierling E. 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Structural Biology*. 8, 1025-1030.

Villalobos E., Umaña C H., Sterling F. 1990. Determinación del contenido relativo de agua en progenies de palma aceitera (*Elaeis guineensis*), durante la época seca en Quepos, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 14, 73-78.

Vincent D., Ergül A., Bohlman M.C., Tattersall E.A., Tillett R.L, Wheatley M.D., Woolsey R., Quilici D.R., Joets J., Schlauch K., Schooley D.A., Cushman J.C., Cramer G.R. 2007. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany*. 58, 1873-1892.

- Vincent D., Lapierre D., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. 2005. Water Deficits Affect Caffeate O-Methyltransferase, Lignification, and Related Enzymes in Maize Leaves. A Proteomic Investigation. *Plant Physiology*. 137, 949-960.
- Vu J.C.V., Gesch R.W., Allen L.H., Boote K.J., Bowes G. 1999. CO₂ enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. *Journal of Plant Physiology*. 155, 139-142.
- Wang F.Z., Wang Q.B., Kwon S.Y., Kwak S.S., Su W.A. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*. 162, 465-472.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS in Plant Science*. 9, 244-252.
- Webber A.N., Nie G.Y., Long S.P. 1994. Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research* 39: 413–425.
- Weretilnyk E.A., Alexander K.J., Drebenstedt M., Snider J.D., Summers P.S., Moffatt B.A. 2001. Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiology*. 125, 856-865.
- Williams J., Bulman M.P., Neil S.J. 1994. Wilt-induced ABA biosynthesis, gene-expression and down-regulation of *rbcS* messenger-RNA levels in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 91, 177-182.
- Yan S., Tang Z., Su W., Sun W. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*. 5, 235-244.
- Yang P. F., Li X.J., Liang Y., Jing Y.X., Shen S.H., Kuang T. Y. (2006) Proteomic Analysis of the Response of Liangyoupeijiu (Super High-Yield Hybrid Rice) Seedlings to Cold Stress. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48, 945–951.
- Yang S.F., Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Reviews in Plant Physiology*. 35, 155–189.
- Yoshimura K., Masuda A., Kuwano M., Yokota A., Akashi K. 2008. Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C (3) xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiology*. 49, 226-241.

APÉNDICE

A. Solución de rehidratación sin IPG buffer*

(Urea 8M, CHAPS 2%, Azul de bromofenol 0.02%)

Componente	Concentración final	Cantidad
Urea	8M	12 g
CHAPS	2% (p/v)	0.5 g
Azul de bromofenol al 1%	0.002% (v/v)	50 μ L
Agua Milli-Q		c.b.p. 25 mL

† Esta solución puede almacenarse en alícuotas a -20°C hasta su uso. Antes de usar añadir 0.56% (p/v) de DTT y 0.5% (v/v) de IPG buffer. Es posible utilizar otros detergentes (Tritón X-100, NP-40, otros) en lugar de CHAPS.

B. Azul de bromofenol al 1%

Componente	Concentración final	Cantidad
Azul de bromofenol	1% (p/v)	100 mg
Tris-base	50 mM	60 mg
Agua Milli-Q		c.b.p. 10 mL

C. Buffer de equilibrio con SDS*

(Tris 50mM pH 8.8, Urea 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002%)

Componente	Concentración final	Cantidad
Tris 1.5 M pH 8.8	50 mM	10 mL
Urea	6M	72.07 g
Glicerol	30% (v/v)	60 mL
SDS	2% (p/v)	4.0 g
Azul de bromofenol al 1%	0.002% (p/v)	400 μ L
Agua Milli-Q		c.b.p. 200 mL

* Esta solución debe almacenarse a -20°C hasta su uso. Antes de usar añadir 1% (p/v) de DTT o 2.5% (p/v) de Iodacetamida por cada mililitro de solución de equilibrio según sea el caso.

D. Tris 1.5M pH 8.8

Componente	Concentración final	Cantidad
Tris-base (PM 121.1)	1.5M	181.65 g
Agua Milli-Q		750 mL
HCl (PM 36.46)		Ajustar a pH 8.8
Agua Milli-Q		c.b.p. 1 L

E. Tris 0.5M pH 6.8

Componente	Concentración final	Cantidad
Tris-base (PM 121.1)	0.5M	60.55 g
Agua Milli-Q		750 mL
HCl (PM 36.46)		Ajustar a pH 6.8
Agua Milli-Q		c.b.p. 1 L

F. Solución de Acrilamida al 30% (29:1)*

Acrilamida	145 g
N,N'-bis-metilen-acrilamida	5 g
Agua Milli-Q	c.b.p. 500 mL

Filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad.

- **Precaución:** la acrilamida es un potente neurotóxico, evite inhalarla y el contacto directo con piel y mucosas. Manéjela siempre con guantes.

G. SDS al 10%

Componente	Concentración final	Cantidad
SDS	10% (p/v)	5g
Agua Milli-Q		c.b.p. 50 mL

H. Persulfato de amonio al 10%

Componente	Concentración final	Cantidad
Persulfato de amonio	10% (p/v)	0.1g
Agua Milli-Q	c.b.p.	1.0 mL

I. Buffer de electroforesis

(Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%)

Componente	Concentración final	Cantidad
Tris -base (PM 121.1)	25 mM	30.275 g
Glicina (PM 75.07)	192 mM	144.134 g
SDS (PM 288.38)	0.1% (p/v)	10 g
Agua Milli-Q		c.b.p. 10 L

J. Gel de poli-acrilamida desnaturante al 13% (separador) para 2-DE de tiras de IPG de 13cm

Componente	Cantidad
Solución de acrilamida al 30% (29:1)	14.15 mL
Agua Milli-Q	10.098 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	8.25 mL
SDS al 10%	330 µL
PSA al 10%	165 µL
TEMED	16.5 µL

K. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% (concentrador) para 2-DE de tiras de IPG de 13 cm

Componente	Cantidad
Solución de acrilamida al 30% (29:1)	0.792 mL
Agua Milli-Q	3.618 mL
Tris 0.5 M pH 6.8	1.5 mL
SDS al 10%	60 µL
PSA al 10%	30 µL
TEMED	3 µL

L. Solución fijado y desteñido para tinción con Azul de Coomassie

Componente	Concentración final	Cantidad
Metanol	50% (v/v)	500 mL
Ácido acético	10% (v/v)	100 mL
Agua Milli-Q		c.b.p. 1L

M. Solución de lavado para tinción con Sypro® Ruby

Componente	Concentración final	Cantidad
Metanol	10% (v/v)	100 mL
Ácido acético	7% (v/v)	70 mL
Agua Milli-Q		c.b.p. 1L

N. Solución para precipitación de proteínas

Componente	Concentración final	Cantidad
TCA	10% (p/v)	1 mL
PVPP	1% (p/v)	0.1 g
2-ME	2% (v/v)	200 µL
Acetona		c.b.p. 10 mL

Ñ. Solución de Azul de Coomassie R-250 al 0.025%

Componente	Concentración final	Cantidad
Azul de Coomassie R-250	0.025% (p/v)	250 mg
Metanol	40% (v/v)	400 mL
Ácido acético	10% (v/v)	100 mL
Agua Milli-Q		c.b.p. 1L

Disolver el colorante en metanol, agregar el ácido acético y el agua, filtrar y proteger de la luz.

O. Solución de sellado

Componente	Concentración final	Cantidad
Buffer de electroforesis (apéndice I)	(Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%)	100mL
Agarosa	0.5% (p/v)	0.5 g
Azul de bromofenol al 1%	0.002% (p/v)	200 µL

P. Solución de fijado para tinción con Sypro® Ruby

Componente	Concentración final	Cantidad
Metanol	40% (v/v)	40 mL
TCA	10% (v/v)	10 mL
Agua Milli-Q		c.b.p. 100 mL

Q. Solución de digestión con tripsina

Componente	Cantidad
Tripsina (0.1 µg/µL)	5µL
Bicarbonato de amonio NH ₄ HCO ₃ 50 mM	45µL

Bicarbonato de amonio 100 mM

Componente	Concentración final	Cantidad
Bicarbonato de amonio NH ₄ HCO ₃	100 mM	79 mg
Agua Milli-Q		c.b.p. 10 mL

Stock DTT 1M

Componente	Concentración final	Cantidad
DTT	1M	15.43 mg
Agua Milli-Q		c.b.p. 100µL

Iodoacetamida 55 mM

Componente	Concentración final	Cantidad
Iodoacetamida	55 mM	10 mg
Agua Milli-Q		c.b.p. 1 mL

TFA 10%

Componente	Concentración final	Cantidad
Ácido trifluoroacético 99.5%	10% (v/v)	1 mL
Agua Milli-Q		c.b.p. 10 mL