



11661

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

ACCIÓN ANTI-*Escherichia coli* DE FRACCIONES  
PROTÉICAS AISLADAS Y PURIFICADAS  
DE LA RAÍZ DE *Mirabilis jalapa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

P R E S E N T A :

CYNTHIA ORDAZ PICHARDO

DIRECTORA: DRA. GRACIELA MEZA RUIZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
FES-Cuautitlán  
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "ACCION ANTI-Escherichia coli DE FRACCIONES PROTEICAS AISLADAS Y PURIFICADAS DE LA RAIZ DE Mirabilis jalapa".

que presenta el (la) alumno (a) CYNTHIA ORDAZ PICHARDO

con número de cuenta 8904220-5 y número de expediente 100981001

para obtener el grado de MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

CUAUTITLÁN IZCALLI a 18 de SEPTIEMBRE del 2009

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente M.C. NIDIA ARAGON SALGADO

Vocal DRA. GRACIELA MEZA RUIZ

Secretario M.C. GUILLERMO AVILA ACEVEDO

Primer Suplente DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO

Segundo Suplente DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

*Nidia Aragón Salgado*

*Graciela Meza Ruiz*

*Guillermo Avila Acevedo*

*Enrique Angeles Anguiano*

*Susana E. Mendoza Elvira*

Este trabajo se realizó gracias al apoyo del Programa de Becas de Posgrado de Excelencia del CONACYT, durante el periodo de septiembre de 1997 a julio de 1999 (No. de registro 121790).

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por permitirme existir  
Y guiar mis pasos a cada momento  
Y lo más importante  
Porque nunca me has dejado sola  
¡Gracias por estar siempre conmigo!

A mis PAPAS, Vicky y Luis, por ser las personas  
Más maravillosas del mundo,  
Por comprenderme, apoyarme y darme  
Su cariño, ah! y por concederme la libertad de ser

A mis HERMANOS, Yeshica y Luis,  
Porque a pesar de ser más pequeños  
Me han enseñado a comprender  
Lo importante que es la vida  
¡Mi! Gracias por su gran paciencia!

LOS AMO MUCHÍSIMO

Tampoco se hubiera podido realizar este trabajo sin la valiosa ayuda de:

*Dra. Susana E. Mendoza*, quien generosamente prestó las instalaciones del laboratorio de Virología de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán, para la purificación de la proteína así como la compra y uso de algunos reactivos en este proceso.

*Dra. Mireya de la Garza*, por el uso de las instalaciones del laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular en el CINVESTAV, para el corrimiento de PAGE-SDS y determinación del PI de las proteínas.

*Dr. Alejandro Zentella*, por facilitar la infraestructura necesaria para la extracción de RNA bacteriano, permitir realizar las pruebas de actividad enzimática y la evaluación antimicrobiana en el laboratorio 204 del Departamento de Biología Celular y Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

*Dr. David Romero e I.B.B. Oscar Rodríguez*, por permitir el uso del laboratorio de Genética Molecular en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, para la realización de PAGE-SDS y electroelución de las proteínas, durante el periodo del paro estudiantil.

También agradezco infinitamente a quienes me compartieron sus conocimientos y me ayudaron a comprender, desentrañar y superar las pequeñas dificultades de mi trabajo (¡mis técnicas maravilla!).

Al P. de M. en C. Oscar Torres de la FES Cuautitlán, quien me apoyó en el montaje de las técnicas de purificación de proteínas por columnas de intercambio iónico, así como en la preparación de geles de poliacrilamida.

Al M. en C. Delfino Godínez del CINVESTAV, por su apoyo académico y su desinterés al ayudarme en la realización de algunos experimentos.

A la Bióloga Magda Reyes del CINVESTAV, por su auxilio y paciencia al enseñarme a utilizar los equipos de isoelectroenfoque.

Al Biólogo José Luis Ventura del Instituto de Fisiología Celular, por haberme enseñado los detalles y trucos para el manejo de RNA y sobre todo por dedicarme su tiempo.

A la Bióloga Edith López del Herbario IZTA, por haberme ayudado a determinar taxonómicamente a la maravilla.

Al Biólogo Jorge Ramírez, por haberme apoyado en el diseño de imágenes, gráficos, la presentación y el escrito de este trabajo.

Quienes no me podían fallar:

A Hugo, porque siempre me motivaste  
Y apoyaste a seguir en este camino de la ciencia  
Y aunque ya no estás conmigo  
Nuestro sueño se hizo realidad

A Jorge y Adrian, por ser mis más fieles  
Y mejores amigos del mundo,  
¡Los quiero mucho!

Al Dr. Andrés Romero, porque  
Más que ser mi profesor  
Has demostrado ser un gran amigo  
¡Gracias por tus porras, consejos y apoyo!

A Oscar, por tu compañía, optimismo,  
Disposición y sobre todo por los buenos  
Momentos que compartimos,  
¡Gracias, mi angelito de la guarda!

A Joaquín, mi gran amigocho de la Maestría,  
Que junto con Hesper, Adán y Marco  
Durante estos dos años, compartimos momentos difíciles,  
Pero también muchos muy alegres.

A Gus, porque aunque apareciste  
En la última parte de esta etapa de mi vida  
Me has demostrado tu cariño, en todo momento,  
¡Muchísimas gracias, Te quiero mucho!

Y a todas aquellas personas, que de alguna manera ayudaron a que  
mi sueño se hiciera realidad y que no es, sino por falta de espacio, que no  
las he podido mencionar, siempre las llevaré en mi mente.



## CONTENIDO

|  | Pags. |
|--|-------|
| ABREVIATURAS   | ii    |
| RESUMEN  | v     |
| 1.0 INTRODUCCIÓN   | 1     |
| 2.0 ANTECEDENTES   | 2     |
| 2.1 Ribonucleasas  | 2     |
| 2.2 Proteínas de Inhibición Ribosomal (RIP)                    | 4     |
| 2.3 <i>Mirabilis jalapa</i>                                    | 6     |
| 2.4 Análisis fitoquímico, actividad antimicrobiana y toxicidad | 8     |
| 2.5 Como fuente de RIP   | 9     |
| 3.0 OBJETIVOS  | 13    |
| 4.0 MATERIALES Y MÉTODOS                                       | 14    |
| 5.0 RESULTADOS   | 27    |
| 6.0 DISCUSIÓN  | 60    |
| 7.0 CONCLUSIONES   | 65    |
| 8.0 BIBLIOGRAFÍA   | 67    |
| APÉNDICE   | 74    |

## ABREVIATURAS

|                  |  |
|------------------|--|
| ATCC             | American Type Culture Collection                 |
| cm               | Centímetros                                      |
| CM-celulosa      | Carboximetil celulosa                            |
| CMH              | Caldo Mueller-Hinton                             |
| <30              | Corie de membrana de menos de 30<br>kilodaltones |
| DEAE-celulosa    | Diethylaminoetil celulosa                        |
| DL <sub>50</sub> | Dosis letal media                                |
| Dil              | Dilución   |
| Ext.             | Extracto   |
| F                | Fracción   |
| h                | Hora   |
| Kd               | Kilodalton                                       |
| Kb               | Kilobase   |
| L                | Litro  |
| lb               | Libra  |
| LIA              | Agar hierro lisina                               |
| $\lambda$        | Longitud de onda                                 |
| M                | Molar  |

|       |   |
|-------|---|
| MAP   | Proteína inactivadora de ribosoma aislada de <i>M. jalapa</i> |
| MCF.7 | Línea celular de cáncer de mama                               |
| MES   | Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico                          |
| mg    | Miligramos  |
| MIC   | Concentración mínima inhibitoria                              |
| MIO   | Omitina, indol, motilidad                                     |
| ml    | mililitros  |
| mm    | Milímetros  |
| mM    | Milimolar   |
| MOPS  | Ácido 2-(N-morfolino)-propanosulfónico                        |
| µg    | Microgramos   |
| µl    | Microlitros   |
| mos   | Microorganismos   |
| MPM   | Marcador de peso molecular                                    |
| ng    | Nanogramos  |
| nm    | Nanómetros  |
| Pa    | Pastilla  |
| PAGE  | Electroforesis en gel de poliacrilamida                       |
| pH    | Potencial de hidrógeno  |
| PI    | Punto isoeléctrico  |
| PM    | Peso Molecular  |

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| r.p.m.           | Revoluciones por minuto             |
| RIP              | Proteína inactivadora de ribosoma   |
| RNA              | Ácido ribonucleico                  |
| RNA <sub>r</sub> | Ácido ribonucleico ribosomal        |
| RNA <sub>t</sub> | Ácido ribonucleico de transferencia |
| Sn               | Sobrenadante                        |
| S                | Unidades Svedberg                   |
| SDS              | Dodecil sulfato de sodio            |
| SIM              | Motilidad, indol, ácido sulfhídrico |
| SSF              | Solución salina fisiológica         |
| Tris-HCl         | Trisma / Acido clorhídrico          |
| TSI              | Tripie azúcar hierro                |
| UFC              | Unidades Formadoras de Colonias     |
| V                | Volts                               |
| W                | Watts                               |

## RESUMEN

Los vegetales producen una amplia variedad de compuestos antimicrobianos, como las fitoalexinas. La producción de éstas depende de la activación transcripcional de una serie de genes codificadores de enzimas de la ruta para su biosíntesis. En las últimas décadas, se ha dilucidado el papel de algunas proteínas vegetales en el control de los microorganismos, en especial, las quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y más recientemente las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP).

En este trabajo, se aisló RIP de tubérculos de *Mirabilis jalapa*, para establecer una técnica específica de extracción, pues hasta el momento no se ha encontrado información concreta de alguna metodología en la cual se obtengan cantidades significativas de la proteína. La RIP se identificó y se caracterizó a través de pruebas específicas, además se evaluó la posible actividad antimicrobiana de este tipo de proteínas (extracto, fracciones combinadas y fracción <30) y su efecto a diferentes concentraciones en *Escherichia coli*.

Para su purificación se emplearon tres diferentes metodologías: columnas de intercambio iónico (DEAE-celulosa, CM-celulosa y Azul-sepharosa), membranas que permiten separar fracciones prerónicas de diferentes PM y electroelución, monitoreando con PAGE-SDS y cuantificando por el método de Bradford. Para caracterizar la RIP se realizó el ensayo de actividad de N-glicosidasa (con ribosomas de *E. coli*) y se empleó la técnica de isoelectroenfoque y para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó el método espectrofotométrico y el conteo de UFC en placa.

Los resultados muestran que los métodos para la purificación de RIP, con los cuales se obtiene un mayor rendimiento fueron: las membranas de corte de menos de 30 Kd combinado con la electroelución y el monitoreo con PAGE-SDS. En las pruebas anti-ribosómicas, tanto el extracto como las fracciones combinadas degradaron el RNA total y parece ser que la fracción <30 sólo degrada parcialmente la subunidad 16S. Al realizar el isoelectroenfoque a ésta última fracción, se presentaron dos proteínas del mismo PM pero con diferentes puntos isoeléctricos 9.4 y 9.8. Finalmente en los ensayos microbiológicos no se detectó actividad antimicrobiana en *E. coli* al utilizar tanto el extracto crudo como algunas de las fracciones combinadas y en el caso de la fracción <30 sólo se presentó una actividad bacteriostática.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años, en la terapéutica se han usado antibióticos obtenidos por fermentación de gran variedad de microorganismos. Sin embargo, los organismos patógenos han desarrollado resistencias muy importantes. Al tratar de mejorar estas acciones (resistencias) se han desarrollado antibióticos sintéticos o semisintéticos, los cuales son, en algunos casos, sumamente tóxicos o tienen efectos secundarios. Una fuente alternativa de sustancias antimicrobianas son algunas plantas que tradicionalmente se han usado en la herbolaria. En muchos casos, dichos productos los sintetizan las plantas en respuesta a la invasión por un gran número de microorganismos, lo cual implica una amplia diversidad de mecanismos. Algunos de ellos son metabolitos secundarios (fitoalexinas, terpenos, etc.), o algunos son macromoléculas que actúan como barrera a la penetración del patógeno (lignina, callosa, extensina, etc.) y en otros casos se trata de enzimas con actividad hidrolítica como la quitinasa, o la 1,3- $\beta$ -glucanasa, por mencionar algunos (1).

Recientemente se han descrito proteínas que actúan en la función ribosomal, las cuales tienen actividad biocida y tal vez estén implicadas en los mecanismos de resistencia natural. Estas proteínas han sido aisladas de diferentes vegetales y de distintas partes de los mismos, como semillas,

hojas y raíces (2). La primera RIP que se investigó con estas características fue la ricina, que es una proteína purificada de semillas de *Ricinus communis* (2, 3); esta sustancia es tóxica tanto para células como a organismos multicelulares. Su acción se ha relacionado con la inhibición de la síntesis de proteínas y su probable mecanismo es la inactivación de los ribosomas, por lo cual se ha denominado a todas estas toxinas proteicas como proteínas inactivadoras de ribosomas o RIP (*ribosome inactivating proteins*).

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES DE LAS RIBONUCLEASAS

Las ribonucleasas son nucleasas, enzimas que hidrolizan los enlaces internucleotídicos – fosfodiéster – del RNA, que catalizan la hidrólisis de ciertos enlaces intranucleotídicos del RNA, la más conocida es la ribonucleasa bovina (PM 13.7 Kd). De manera específica, rompen el enlace P-O en el sitio más alejado del fósforo, el cual está unido a un carbono 3' de un anillo de ribosa que lleva consigo una pirimidina (citocina o uracilo). Los puntos de división se muestran en la Figura 1 (4).



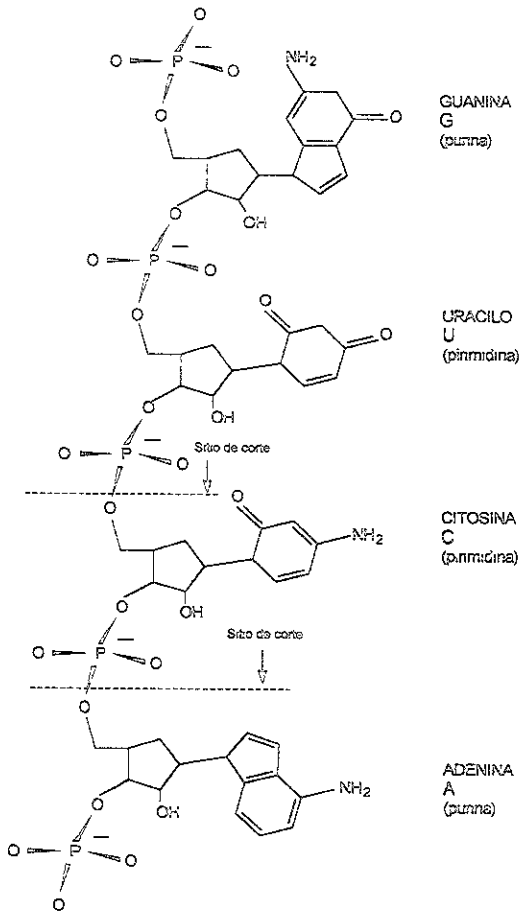


FIGURA 1.- SITIO DE CORTE DE UNA RIBONUCLEASA

Existe otro grupo de moléculas de ácido ribonucleico

con actividad catalítica llamadas enzimas RNA (RNAasas) o mejor conocidas como ribozimas (es decir, que el RNA puede romperse por sí mismo) (5).

Como se puede apreciar, tanto las ribonucleasas como las ribozimas actúan de manera parecida a las RIP, la diferencia principal reside en el origen vegetal de éstas últimas.

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS RIP

Las RIP han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo al número de polipéptidos que la conforman. Así se tienen las formadas por una cadena, también conocidas como tipo I, entre las que se encuentran la briodina, aislada de semillas de *Bryonia dioica* y la tricosantina, aislada de raíces de *Trichosanthes kirilowii* (3, 6).

Las del tipo II, están compuestas de dos cadenas polipeptídicas diferentes (A o B), unidas por un enlace disulfuro, a las cuales pertenece la ricina antes mencionada y la viscumina aislada de hojas de *Viscus albus*. La cadena A es homóloga a las RIP de tipo I y es responsable de la toxicidad de la molécula. La cadena B es una lectina la cual permite la unión de la toxina a la superficie celular, facilitando su entrada a la célula. Las RIP de tipo I no son tan tóxicas porque no ingresan fácilmente a las células, ya que no poseen la cadena B que les permita unirse a la superficie celular (3, 6).

Las de tipo IV (no hay un III en la nomenclatura) están compuestas de dos dímeros unidos por enlaces no covalentes y cada dímero comprende dos cadenas de polipéptidos unidos por enlaces disulfuro (3,



### 2.3 CARACTERÍSTICAS DE *Mirabilis jalapa* L.

*Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) conocida en México con el nombre popular de maravilla, se distribuye ampliamente en el territorio nacional, en todas las zonas climáticas, excepto en la zona norte del país. Comúnmente se asocia a terrenos de cultivo, huertos familiares, jardines públicos, baldíos, ruderales en bosque tropical perennifolio, tropical subcaducifolio, mesófilo de montaña, de pino-encino y matorral xerófilo (Figura 3), por lo que es considerada una "mala hierba", causando importantes pérdidas económicas a la agricultura y jardinería (8).



FIGURA 3.- LOCALIZACIÓN DE *M. jalapa*

*M. jalapa* es una planta herbácea de 60 a 150 cm de altura, pubescente o glabra; raíces en forma de tubérculos gruesos y carnosos; tallos muy ramificados con nudos marcados, hojas ovado-lanceoladas de

4 a 13 cm de largo por 1 a 8.5 cm de ancho, algo lustrosas cuando están jóvenes, frecuentemente ciliadas, a veces pubescentes; pedúnculos casi siempre de 1 a 2 mm de largo, que sostiene a numerosas flores aglomeradas en cimas en los extremos de las ramas frecuentemente rodeadas de hojas reducidas; vistosas tubulares de color blanco, rojo, púrpura, amarillo o rosa, con fruto pequeño y seco (9).

En nuestro país, *M. jalapa* se usa además como planta de ornato, y también está reportado que algunas personas consumen la raíz por su alto contenido de carbohidratos. Además de ser comestible, en la medicina tradicional se emplea la raíz macerada en alcohol y se preparan cataplasmas para tratar las contusiones; hervida para el tratamiento de tumores de estómago y también como purgante o anticonceptivo; lo que comprueba su importancia como fuente de compuestos de uso terapéutico (Tabla 1)(10).

CUADRO 1.- USOS DE *M. jalapa* EN LA MEDICINA TRADICIONAL

| Usos                                 | Parte empleada | Preparación                             |
|--------------------------------------|----------------|---|
| Comestible                           | Tubérculo      | Cruda en ensalada                       |
| Hinchazón por inyección mal aplicada | Tubérculo      | Aplicada con sal                        |
| Tumores de estómago                  | Tubérculo      | Hervida                                 |
| Reumas                               | Ramas          | Maceradas en alcohol                    |
| Granos, golpes y dermatitis          | Hojas          | Maceradas en alcohol o hervidas en agua |
| Ataques epilépticos                  | Flores y hojas | Infusión                                |
| Lavados vaginales                    | Toda           | Hervida                                 |

## 2.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

De las ramas se han aislado los siguientes compuestos: triterpenos, ácidos oleanólicos y ursólicos, los esteroides brasicasterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol y el flavonoide quercetina. En las hojas, los compuestos más abundantes son los esteroides campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol. Por lo que respecta a las flores se encuentran los alcaloides del indol, betanina e isobetanina y el alcaloide de isoquinolina tiramina. Se han encontrado los compuestos heterocíclicos nitrogenados no alcaloides indicaxantina, miranxantina I-IV y vulgaraxantina I en pétalos; en las semillas el ácido 8-hidroxi-octadeca-cis-11-14-dienoico y en raíz la betaína del ácido nicotínico, llamado trigonelina (11).

## 2.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se han evaluado los extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos de las flores, hojas, tallos y semillas de *M. jalapa* en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, sin que se observara actividad, pero nunca se ha determinado si las distintas fracciones derivadas de estos extractos poseen actividad antimicrobiana ni tampoco si presentan actividad de tipo endonucleasa (RIP) (11, 12).

## 2.6 TOXICIDAD

Se determinó la DL<sub>50</sub> de los extractos etanólico-acuosos de las partes aéreas de la planta en ratones, resultando de 1g/kg por vía intraperitoneal (9, 11).

## 2.7 LAS RIP Y *Mirabilis jalapa* COMO FUENTE DE PROTEÍNA INACTIVADORA DE RIBOSOMAS

En *Mirabilis jalapa*, se ha descrito actividad de RIP, así como en otras plantas: *Dianthus caryophyllus*, *Saponaria officinalis*, *Momordica charantia*, *Trichosanthes kirilowii*, *Physalacca americana*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, a las cuales se les ha determinado algunas características fisicoquímicas (Tabla 2) (3).

TABLA 2.- CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y ANÁLISIS DE ALGUNAS RIP DE TIPO I

| RIP           | Peso molecular (Kd) | Contenido de azúcar (%) | Coefficiente de extinción a 280 nm (M) |
|---------------|---------------------|-------------------------|--|
| Dianitina 30  | 29.5 <sup>a</sup>   | 1.56                    | -                                      |
| RIP de maíz   | 25.0 <sup>A</sup>   | 0                       | 26500                                  |
| MÁP           | 27.833 <sup>a</sup> | 0                       | 24000                                  |
| Momordina     | 29.092 <sup>a</sup> | 1.74                    | -                                      |
| PAP           | 29.0 <sup>A</sup>   | 0                       | 24000                                  |
| Saporina S6   | 29.5 <sup>A</sup>   | 0                       | 24800                                  |
| Tricosanitina | 24-29.0             | 0                       | -                                      |

<sup>a</sup> Determinado por secuencia de aminoácidos

<sup>A</sup> Determinado por PAGE-SDS

En 1990 y 1991, Lee-Huang y cols. en la Universidad de Nueva York demuestran que las RIP aisladas de hojas de *Dianthus caryophyllus* (DAP 30 y 32), la gelonina de semillas de *Gelonium multiflorum* y la proteína inactivadora de ribosomas aislada de semillas y frutos de *Momordica charantia* (MAP 30) tienen acción inhibitoria en la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en células T CD4+ infectadas en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (SIDA) cultivadas *in vitro* (13, 14).

En 1993, Zhao-Chun y cols. y Lodge y cols. demostraron la presencia de una RIP en hojas de *Phytolacca americana* y encontraron que podía inhibir la transmisión mecánica (por abrasión) de virus fitopatógenos como el del mosaico del tabaco y el del pepino (15, 16) (Tabla 3).

TABLA 3.- RIP CON PROPIEDADES ANTIVIRALES

| RIP                 | VIRUS | HOSPEDERO           |
|---------------------|-------|---------------------|
| VIRUS DE PLANTAS    |       |                     |
| Dianthina 30 y 32   | TMV   | Nicotiana glutinosa |
| Momordica i         | TMV   | Nicotiana glutinosa |
| Ricina D            | TMV   | Nicotiana glutinosa |
| Saporina S6 y S9    | TMV   | Nicotiana glutinosa |
| VIRUS DE ANIMALES   |       |                     |
| Dianthina 32        | HSV   | Células Hep         |
| Momordica charantia | HSV   | Células hep         |
| Tricosantina        | HIV   | Células CD4+        |

Fuente: *Physiol Mol Plant Pathol* 42, 1993.

*Proc Natl Acad Sci* 90, 1993



Habuka y cols. (1989-1992) reportaron por primera vez, la síntesis química del gen que codifica para una proteína de inhibición ribosomal aislada de raíz de *M. jalapa* (MAP) de la cual se dedujo su estructura primaria y por tanto su masa molecular (27.833 Kd), por lo que se infirió que se trataba de una RIP de tipo I (17, 18, 19). En un principio su objetivo fue sintetizar en forma abundante y de manera controlada esta proteína en un sistema heterólogo como es el de *Escherichia coli* y construir químicamente una inmunotoxina dirigida en contra de células cancerosas (20, 21). Después de varios intentos, sólo lograron obtener una escasa expresión, por lo cual tuvieron que cambiar de estrategia y decidieron rediseñar totalmente el gen para adecuarlo al uso de codones del sistema heterólogo. Esta estrategia no resultó del todo satisfactoria por la toxicidad de la proteína contra los propios ribosomas de *E. coli* (22, 23). Es necesario hacer notar, que estos investigadores enfocaron sus estudios a la actividad antiviral de esta RIP, pero nunca estudiaron con detalle su acción con microorganismos completos. Sin embargo, en 1991, Kusamba y cols. fueron los primeros que trabajaron con los extractos acuosos y alcohólicos de semillas de *M. Jalapa*, realizando pruebas de actividad antimicrobiana en distintas cepas bacterianas, encontrando resultados controvertidos, p. ej.: mientras que *E. coli* es sensible al extracto alcohólico, *Vibrio cholerae* no lo es (12). Posteriormente en 1992, Cammue y cols. realizaron este mismo tipo

de estudios con péptidos aislados de semillas de *M. jalapa*, y sus resultados demostraron que se necesitan >500  $\mu\text{g}$  para inhibir a *E. coli* (1).

Como *M. jalapa* es un recurso biológico ampliamente disponible en nuestro país y como quizá pudiera dársele un uso de importancia económica se decidió retomar los estudios de su actividad antimicrobiana, trabajando primero sobre la optimización de una técnica confiable de extracción específica (24, 25), en la cual se obtengan cantidades significativas de diversas fracciones y probar su actividad antimicrobiana, usando como modelo una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología comprendió cuatro fases (Diagrama 1):

I.- La colecta del tubérculo de *M. jalapa*.

II.- La obtención de los extractos acuosos y posterior purificación de las fracciones protéicas, usando de forma secuencial las columnas de intercambio iónico o membranas de diferentes cortes de PM, identificando su naturaleza protéica por medio de geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

III.- Los bioensayos.

IV.- Pruebas específicas para determinar la actividad glicosídica y/o posterior caracterización, identificando la fracción o fracciones por su punto isoeléctrico.

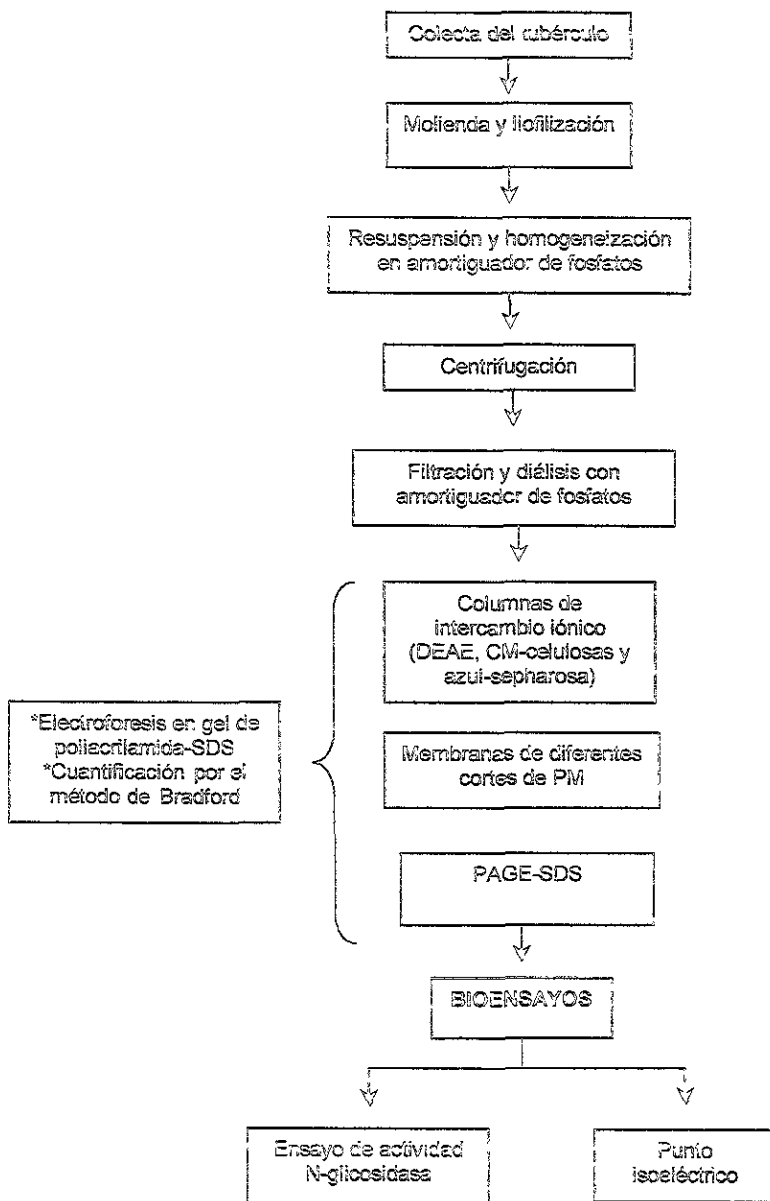


DIAGRAMA 1.- METODOLOGÍA GENERAL

#### 4.1 COLECTA DEL TUBÉRCULO

Se colectaron los tubérculos de arbustos de *M. jalapa*, en tres diferentes áreas: Zonas aledañas en el Estado de México (Incluyendo Cuautitlán Izcalli y Los Reyes Iztaacala, Tlalnepanlta), viveros delegacionales en el D.F. y en los mercados de Sonora y Jamaica y se obtuvieron ejemplares completos que presentaron flor, fruto y hojas libres de plaga, para su clasificación taxonómica.

Una vez transportados al laboratorio, los tubérculos se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de suelo, raíces primarias y corteza; posteriormente se partieron en pequeños trozos y se maceraron en un homogeneizador de cuchillas (Marca Waring, Mod. 22300) hasta obtener una pasta con la menor cantidad de agua posible, para liofilizarlos en condiciones controladas en un equipo Labconco, Mod. KX27205A (-34°C/ 8 h, -25°C/8 h, -15°C/6 h, -5°C/6 h, 0°C/20.4 h). Se determinó el peso seco de la muestra.

#### 4.1.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS.

**Extractos acuosos.**- Se tomaron 2.5 g de tubérculo liofilizado y se resuspendieron en 25 ml de amortiguador de fosfatos 2 mM pH 7.5. La pasta formada se homogeneizó toda la noche a 4°C, posteriormente fue filtrada a través de gasa y se centrifugó a 5000 r.p.m. por 1 h a 4°C (Marca

Sorvan, Mod. 4225A). El sobrenadante se filtró por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y dializó contra el amortiguador de fosfatos 2 mM, pH 7.5 por 18 h a 4°C (22, 25).

#### 4.11.1 Procedimiento por columnas de intercambio iónico.

La muestra dializada se colocó en una columna de DEAE-celulosa (Sigma, D3764) equilibrada con el amortiguador de diálisis. El extracto no ligado se colectó y dializó contra un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.0 por 18 h a 4°C. Después se pasó a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y la muestra se puso en una columna de CM-celulosa (Sigma, C4146) preequilibrada con el amortiguador de fosfatos. El extracto se eluyó con un gradiente lineal de 0-0.5 M de NaCl en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 6.0 a un flujo de 60 ml/h. A todas las fracciones se les determinó su contenido protéico y en las que se encontró proteína, se dializaron contra un amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y se cargaron a una columna de Azul-sepharosa (Sigma, R8752) equilibrada con el amortiguador de diálisis, para obtener las diversas fracciones purificadas; se corrió un gradiente lineal de 0-0.2 M de NaCl en el amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 a un flujo de 30 ml/h (22, 24, 25). El seguimiento de las proteínas fue por PAGE-SDS de acuerdo al procedimiento de Laemmli, en un equipo MiniProtean II, Bio-rad, usando un gel separador al 12 % y un gel concentrador al 5 % (26). La tinción fue con azul de Coomassie y nitrato de plata (27, 28, 29). La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (30),

obtenidas las muestras, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso en las pruebas biológicas (Diagrama 2).

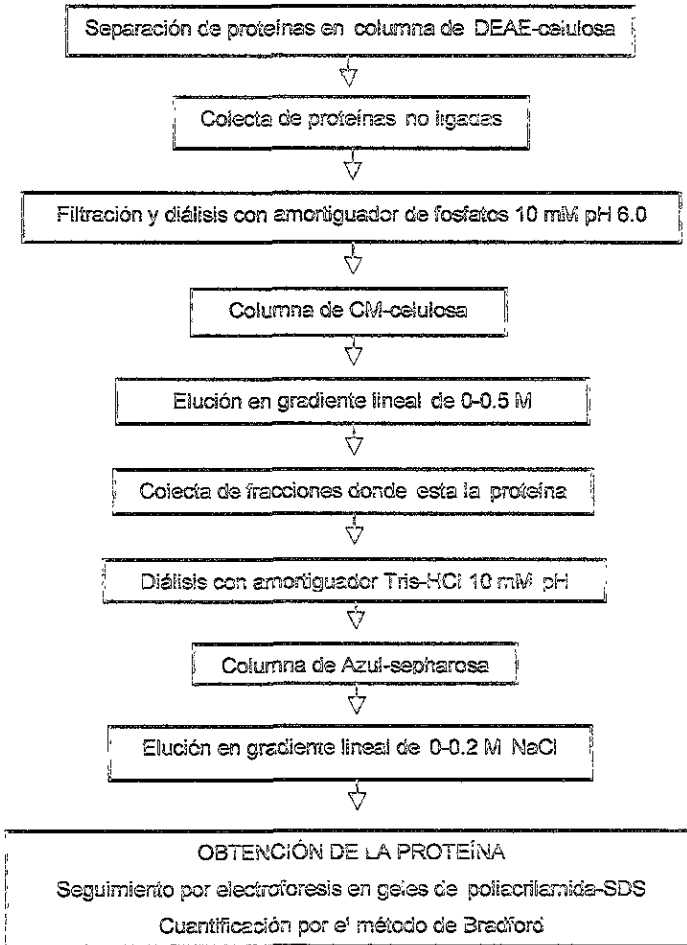


DIAGRAMA 2.- PURIFICACIÓN DE FRACCIONES PROTÉICAS A TRAVÉS DE COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

4.11.2 Procedimiento usando membranas que separan por grupo de proteínas con diferente PM.

Diez litros de sobrenadante filtrado en la membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  del extracto acuoso, se pasaron por un equipo Minitan Filter Plates, Millipore con membranas de diferentes cortes de PM Minitan-S Filter Sheets, Millipore en intervalos de: >100 Kd, entre 100 y 30 Kd y < 30 Kd a 4°C. Cada uno de los cortes se fueron monitoreando en geles de PAGE-SDS al 12 % y cuando fue necesario, se pasaron por una columna de Azul-sepharosa (Diagrama 3) (31).

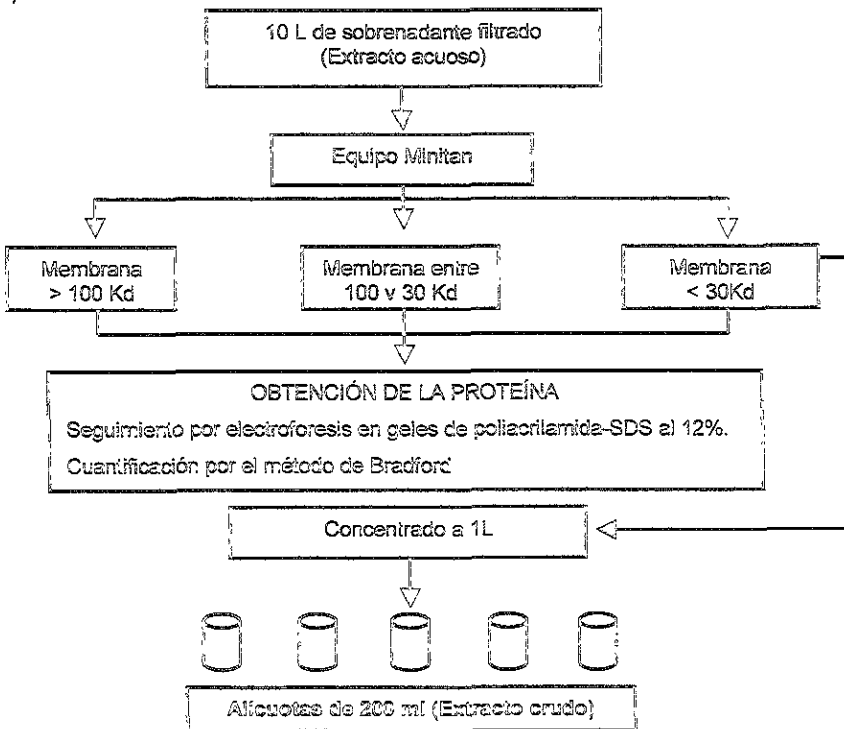


DIAGRAMA 3.- PURIFICACIÓN DE FRACCIONES PROTÉICAS A TRAVÉS DE MEMBRANAS DE DIFERENTES CORTES DE PM.



#### 4.11.3 Procedimiento de electroelución de geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS).

Se obtuvieron los extractos crudos que se concentraron a un volumen de 1 L y se separó en alícuotas de 200 ml, congelándose a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se corrieron geles de PAGE-SDS al 15 % que fueron teñidos con azul de Coomassie y se sometieron a un proceso de electroelución en un equipo MiniProtean II, Electroductor, Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 125 V cte./4 h y se volvió a monitorear en geles de poliacrilamida (Diagrama 4) (32).

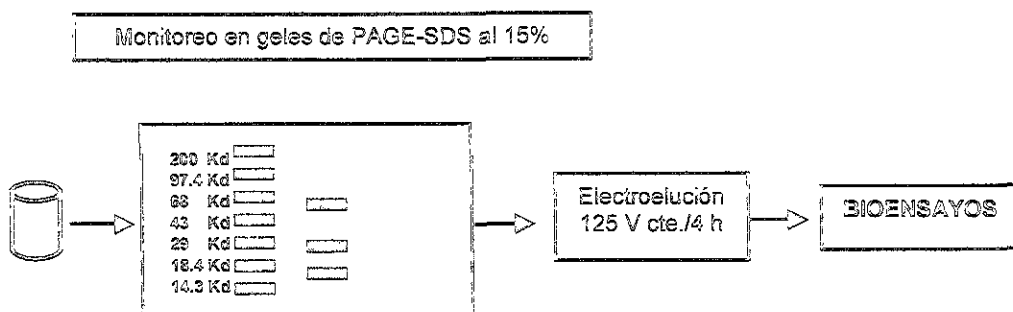


DIAGRAMA 4.- PURIFICACIÓN DE FRACCIONES PROTÉICAS A TRAVÉS DE PAGE-SDS

### 4.III PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

#### 4.III.1 Material Biológico

Se trabajó con *Escherichia coli* ATCC 25922. La cepa se mantuvo en agar Mueller-Hinton para realizar las pruebas bioquímicas pertinentes con el fin de corroborar el género y especie.

| Prueba Bioquímica | <i>Escherichia coli</i> |
|-------------------|-------------------------|
| Mantol            | +                       |
| Lactosa           | +                       |
| Sacarosa          | +                       |
| Rojo de Metilo    | +                       |
| Voges-Proskauer   | -                       |
| SIM               | -, +, +                 |
| MIO               | +                       |
| TST               | Ac/Ac                   |
| LIA               | +                       |
| Gram              | -                       |
| Características   | Cocobacilos solos       |

#### 4.III.2 Estandarización de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

A partir de un cultivo en placa (18 h) de la cepa, se tomó un inóculo y se pasó a un tubo de ensaye que contenía solución salina fisiológica (SSF), posteriormente el tubo fue ajustado a una absorbencia de 1.00 a 595 nm efectuando diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  con SSF, luego se sembraron por triplicado en cajas de Petri con agar Mueller-Hinton, incubándolos

(tanto las cajas como los tubos) por 24 h a 37°C; pasado el tiempo se realizó el conteo de bacterias (Método del Conteo en Superficie) y tomando en cuenta el factor de dilución utilizado, se obtuvieron los datos para saber cual era la dilución apropiada para obtener 10<sup>4</sup> UFC/ml, que se utilizaron durante los bioensayos para probar la actividad antimicrobiana de las proteínas (33).

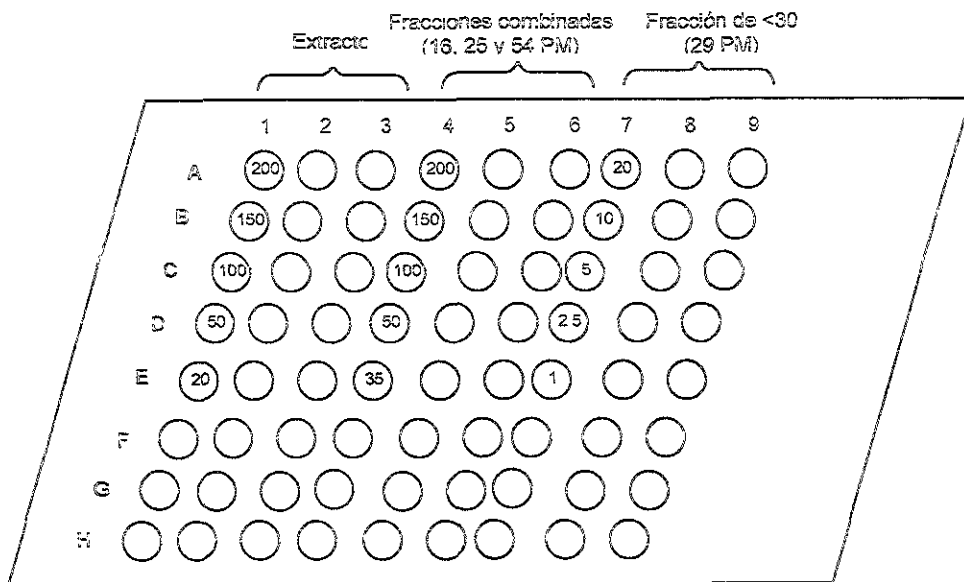
#### 4.III.3 Bioensayos turbidimétricos y en placa.

A todos los pozos de la microplaca de cultivo, se les agregó Caldo Mueller-Hinton (CMH) en la misma proporción (50 µl), a los pozos 1, 2 y 3 de la fila A, se les agregó 200 µl del extracto; al 4, 5 y 6, 200 µl de las fracciones combinadas (16, 25 y 54 PM) y a los pozos 7, 8 y 9, 20 µl de la fracción <30 (29 PM). A los pozos 1, 2 y 3 de la fila B, se les agregó 150 µl del extracto; al 4, 5 y 6, 150 µl de las fracciones combinadas y a los pozos 7, 8 y 9, 10 µl de la fracción <30. A los pozos 1, 2 y 3 de la fila C, se les agregó 100 µl del extracto; al 4, 5 y 6, 100 µl de las fracciones combinadas y a los pozos 7, 8 y 9, 5 µl de la fracción <30. A los pozos 1, 2 y 3 de la fila D, se les agregó 50 µl del extracto; al 4, 5 y 6, 50 µl de las fracciones combinadas y a los pozos 7, 8 y 9, 2.5 µl de la fracción <30. A los pozos 1, 2 y 3 de la fila E, se les agregó 20 µl del extracto; al 4, 5 y 6, 35 µl de las fracciones combinadas y a los pozos 7, 8 y 9, 1 µl de la fracción <30 [Ver Diagrama 5]. Todos los pozos de la fila F, se consideraron como blancos, a los cuales se les agregó 150 µl del amortiguador correspondiente. Los pozos de la fila G fueron considerados

como controles positivos, pues solo se les agregó 50  $\mu$ l de la bacteria. Los pozos de la fila H se consideraron como controles negativos pues se les agregó 5  $\mu$ l de cloranfenicol como antibiótico de referencia. Posteriormente las placas se incubaron a 37°C por 24 h con agitación y se tomaron alícuotas de cada dilución y de los controles al tiempo cero y a las 24 h para determinar las UFC/ml por el método de conteo en superficie y por el método microespectrofotométrico (Spectronic 20 GENESYS, Mod. ME23515) se realizaron las lecturas a 595 nm.

Para determinar la actividad antimicrobiana se observaron los pozos en donde no hubo crecimiento y en las cajas en donde no se encontraron UFC (1, 33, 34). Además se monitoreó el comportamiento del enfrentamiento del extracto, fracciones combinadas y la fracción <30 con el microorganismo del tiempo 0 hasta la novena hora y posteriormente a las 24 h, también por el método espectrofotométrico.

Nota: Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.



50 µl CMH a todos los pozos

50 µl Bacteria a todos los pozos excepto a la fila F

Diferentes concentraciones de extracto, fracciones combinadas y fracción <30

Bianco 50 µl CMH + 150 µl de amortiguador

Control + 50 µl CMH + 50 µl de amortiguador + 50 µl de bacteria

Control - 50 µl CMH + 50 µl de amortiguador + 50 µl de bacteria + 5 µl cloranfenicol

Monitoreo de  $t_0$ ,  $t_0$  y  $t_{24}$

Incubar a 37 °C / 24 h

Tomar alícuotas de cada dilución y de los controles a  $t_0$  y  $t_{24}$  para determinar las UFC/ml

Lecturas de las muestras por el método microespectrofotométrico a 595 nm.

DIAGRAMA 5.-BIOENSAYOS TURBIDIMÉTRICOS Y EN PLACA SOBRE *E. coli*

## 4.IV. PRUEBAS CONFIRMATIVAS

### 4.IV.1 Determinación de la actividad anti-ribosómica.

Para comprobar la eficacia de la extracción del RNA total, se obtuvo RNA de células de cáncer de mama MCF.7 - donadas por el Dr. Zenella del Instituto de Fisiología Celular, UNAM - y de *Escherichia coli* ATCC 25922, por el método de Chomczynski (35, 36, 37). Una vez cuantificado (3 µg), se enfrentó al extracto, fracciones combinadas y fracción <30 en una concentración de 5 ng de la RIP en presencia y ausencia de anilina (dicho compuesto se adhiere al residuo de adenina, permitiendo hacer evidente la separación del nucleótido del azúcar y el fosfato), de acuerdo al protocolo de Girbes modificado (comunicación personal). Para identificar las subunidades 23S, 16S y 5S del RNA ribosomal de *E. coli* se utilizó un equipo de Hoefer No. SE250, en donde se corrieron géles de agarosa al 2 % en un amortiguador MOPS 1x a 50V/5h/4°C, teñidos con bromuro de etidio, los cuales se observaron en un transiluminador Slimline UV TR281900 y fotografiaron con una cámara Polaroid CP8560 y película ISO 3000/36° B/N, Polapan 667, además se corrieron en los mismos geles marcadores de RNA conocidos (Diagrama 6) (38, 39, 40, 41).

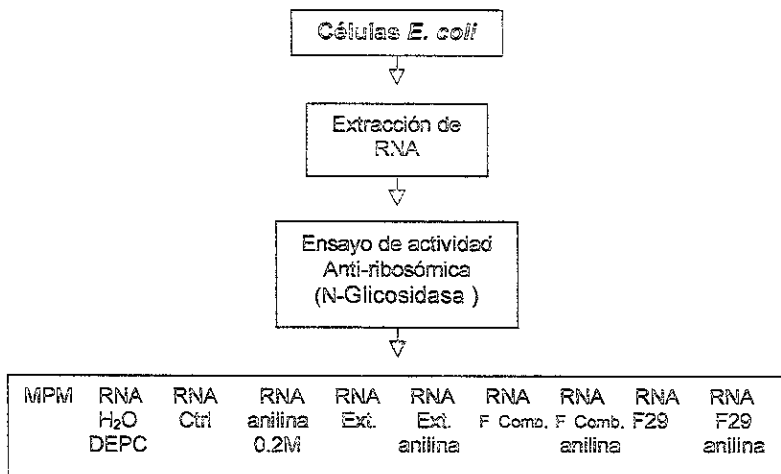


DIAGRAMA 6.- ENSAYO DE ACTIVIDAD N-GLICOSIDASA

#### 4.IV.2 Determinación del punto isoelectrico.

De la muestra obtenida en el proceso de electroelución, se tomó una alícuota para determinar el punto isoelectrico del o los péptidos aislados pasándose por un Sistema Rotofor de Purificación Bio-Rad No. 170-2986, donde la membrana del ánodo fue equilibrada con NaOH 0.1 M y la membrana del cátodo con MES 0.25 M y los rotolitos a 80% de  $\epsilon$ -amino-n-ácido caprónico y 20% de Trisma base, para formar un gradiente de pH de 9.5 a 11 (42, 43).

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 COLECTA DEL TUBÉRCULO

Las colectas se realizaron de agosto a octubre de 1998. Las muestras del material biológico se obtuvieron en las zonas de Los Reyes Iztacala y Cuautitlán Izcalli, mercados y viveros. Solo en la primera zona se controló la hora de muestreo, el tamaño de los arbustos y el color de la flor. Estos datos se presentan en la Tabla 4. En el caso de los mercados, los comerciantes proporcionaron información acerca de otros usos adicionales dados a la raíz de maravilla, que no se encontraban reportados en la bibliografía como el "alivio de dolores del corazón" y artritis, entre otros.

| LUGAR                       | HORA DE LA COLECTA            | TAMAÑO DEL ARBUSTO | COLOR DE LA FLOR                   |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| COLECTAS EN AREAS NATURALES | De las 11:00 AM a las 4:00 PM | De 1 a 2 m.        | Morada                             |
| VIVEROS                     | Sin información               | De 0.3 a 1 m.      | Amarilla<br>Blanca                 |
| MERCADO                     | Por la noche                  | Variable           | Amarilla<br>(en algunas ocasiones) |

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LA COLECTA DEL TUBÉRCULO DE *M. jalapa*



## 5.II PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTÉICAS POR COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Las muestras se pesaron y liofilizaron, posteriormente se guardó el 25% de cada una y se les realizó una primera extracción para determinar si la proteína de nuestro interés está presente en los tubérculos de las distintas zonas de colecta. Al no detectar diferencias, todas las muestras fueron mezcladas y a partir de esta mezcla se comenzó a purificar la proteína con posible actividad ribosomal (MAP) y/o los péptidos cercanos a 29 Kd. Cabe mencionar que desde el momento de obtener los tubérculos hasta que se liofilizaron, hubo una pérdida del 45.02% (entre corteza y agua principalmente).

Se obtuvieron 4000 g de liofilizado (mezcla), el cual se refrigeró a 4°C y se fueron tomando muestras de 2.5 g/25 ml para realizar las extracciones. Cuando la técnica se estandarizó, se determinó que tanto para el sobrenadante como para la pastilla siempre se presentaron 8 bandas protéicas en el monitoreo con PAGE-SDS, por lo que se decidió continuar solo con el sobrenadante. La concentración protéica de éste fue de 197.03µg/ml y el peso de las proteínas obtenidas se muestra en la Tabla 6; el gel correspondiente se muestra en la Figura 4. En la Tabla 5 se indican las concentraciones protéicas de las diferentes fracciones obtenidas en las distintas columnas.

| FRACCIÓN                                      | CONCENTRACIÓN<br>( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) |
|---|--|
| Extracto crudo                                | 197.03   |
| Efluente de DEAE                              | 130.09   |
| Dializado de DEAE                             | 73.96  |
| Efluente de CIM                               | 56.87  |
| (Proteína sin interés)                        |  |
| Gradiente de NaCl-CIM<br>3, 11, 13, 17, 24 35 | 0, 22.71, 61.40, 19.22, 0.04, 0                |
| Conc. I, II, III                              | 8.06, 85.46, 0                                 |
| Gradiente de NaCl- AS II                      | 10.31  |

TABLA 5. CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE CADA UNA DE LAS FASES DE EXTRACCIÓN  
(COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO)

La columna de DEAE-celulosa fue cargada con el dializado del sobrenadante (equilibrado a las condiciones referidas en los materiales y métodos) y a las fracciones obtenidas se les realizó una electroforesis (Figuras 5 y 6) para corroborar si el péptido de 29 Kd permanecía en dichas fracciones (ver Tabla 6). En los geles se observa que en la fracción 1 y 7 a 11, por mencionar algunas, siempre presentaron una banda protéica intensa en la parte inferior. En el caso de la tabla, donde se muestran datos más específicos, se observa que el número de bandas varía de 6 hasta 14, que algunas proteínas incluso son de mayor peso molecular que las observadas en la pastilla o en el sobrenadante y que en todas las fracciones si se mantuvo constante la banda inferior (30.32-25.70 Kd), que por su PM suponemos se trata de la MAP.

TABLA 6. OBTENCIÓN DE PESO MOLECULAR\* DE BANDAS PROTÉICAS DE LA PASTILLA Y EL SOBRENADANTE DEL EXTRACTO, ASÍ COMO DE ALGUNAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA COLUMNA DEAE-CELULOSA POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (EXPRESADA EN KD)

| Extracto |              | DEAE-celulosa |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------|--------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Pastilla | Sobrenadante | F1            | F2     | F3     | F4     | F5     | F6     | F7     | F8     | F9     | F10    | F11    |
|          |              | 184.05        | 187.61 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        | 170.80 | 170.80 | 177.22 | 180.64 | 180.64 |
|          |              |               | 160.85 | 157.80 | 157.80 | 157.80 | 157.80 |        |        | 167.35 | 167.35 | 167.35 |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        |        | 164.19 | 164.19 | 164.19 |
|          |              |               | 154.76 |        |        |        | 154.76 |        |        |        |        |        |
|          |              | 121.82        |        | 121.82 |        |        |        |        | 149.21 |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        | 152.11 |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        | 146.38 |        |        |        |
|          |              |               | 135.26 | 135.26 | 135.26 |        |        |        |        | 140.90 |        |        |
| 128.62   | 128.62       |               |        |        | 132.69 |        |        | 132.69 |        | 133.05 |        |        |
|          |              | 127.69        | 127.69 | 127.69 |        |        |        | 130.54 |        | 130.54 | 130.54 |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        |        |        | 125.64 | 125.64 |
| 113.04   | 113.04       |               |        |        |        | 122.86 |        | 128.24 | 123.27 | 123.27 |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        | 113.76 |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        |        | 112.02 |        |        |
|          |              |               | 105.33 | 105.33 |        |        |        | 109.90 |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        | 101.62 |        |        |        |
|          |              | 97.53         |        |        |        |        |        | 97.90  |        | 97.90  | 99.89  | 99.89  |
|          |              |               |        |        | 83.60  |        |        |        |        |        |        |        |
|          |              |               | 63.85  | 63.85  |        |        |        |        |        | 77.90  |        |        |
|          |              | 61.65         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        | 59.67  |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        | 59.15  | 59.15  |        | 59.61  | 59.61  | 59.61  | 59.61  |
|          |              |               |        |        | 52.67  |        |        |        |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        | 50.69  |        |        |        |        |        |        |
| 47.01    | 47.01        | 47.85         |        |        |        |        |        | 49.73  | 49.23  | 49.23  | 49.23  | 49.23  |
|          |              |               | 46.03  | 46.03  | 46.03  |        |        |        | 48.51  |        |        |        |
| 44.65    | 44.65        |               |        |        |        |        | 45.16  | 45.16  |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        | 43.90  |        |        |        |
|          |              |               | 41.81  | 41.81  |        |        |        |        |        | 42.25  | 43.07  |        |
|          |              |               |        |        |        |        |        |        |        | 37.68  |        |        |
| 38.32    | 38.32        | 29.57         |        |        |        |        |        |        |        | 36.26  |        |        |
|          |              |               | 27.91  | 27.91  |        |        |        |        |        |        |        |        |
|          |              |               |        |        | 27.38  | 27.38  | 27.38  |        | 26.70  | 26.70  | 25.70  | 26.70  |
| 24.03    | 24.03        |               |        |        |        |        |        |        |        |        |        | 24.74  |
| 21.12    | 21.12        |               |        |        |        |        |        |        |        | 22.92  |        | 22.92  |
| 0.10     | 0.10         |               |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 8 bandas | 8            | 7             | 10     | 9      | 6      | 9      | 9      | 10     | 12     | 14     | 11     | 11     |

F = Fracción \* Se calculó como se indica en el apéndice



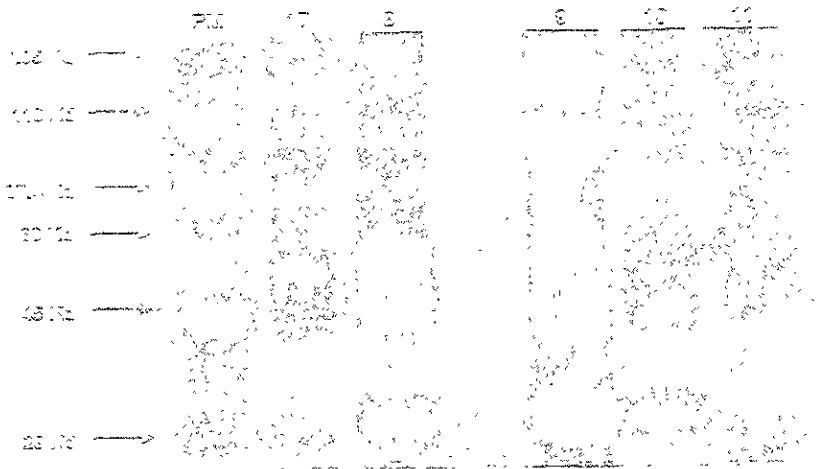


FIGURA 6.- GEL DE PAGE-SDS DE DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS EN EL EFLUENTE DE DEAE-CELULOSA

\* NO. DE FRACCIÓN

El efluente obtenido, se dializó a características de la columna de CM-celulosa y se cargó a dicha columna. Para corroborar si había pérdida de la proteína de interés, se colectaron algunas fracciones y se les hizo corrimiento electroforético (Figura 7), los datos se muestran en la Tabla 7. Solo en la fracción 4 se detectan bandas protéicas entre 24-29 Kd; en las demás aun cuando se detectan bandas protéicas de rangos de PM muy cercanos, no son tan significativas, pues por la técnica de nitrato de plata solo se detectan proteínas en cantidades de ng.

TABLA 7. OBTENCIÓN DE PESO MOLECULAR\* DE BANDAS PROTÉICAS DE ALGUNAS  
 FRACCIONES OBTENIDAS EN LA COLUMNA CM-CELULOSA POR ELECTROFORESIS EN GELES  
 DE POLIACRILAMIDA-SDS (EXPRESADA EN Kd)

| CM-celulosa |        |        |        |        |        |        |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| F 1         | F2     | F3     | F4     | F5     | F6     | F7     |
|             |        | 160.65 |        |        |        |        |
|             |        |        |        |        |        |        |
|             |        |        |        |        |        |        |
| 121.95      | 121.95 | 127.67 | 127.67 | 124.68 | 124.68 | 121.95 |
|             |        | 116.45 |        |        |        |        |
| 111.24      | 111.24 |        | 111.24 | 111.24 | 111.24 | 111.24 |
|             |        | 96.92  |        |        |        | 96.92  |
|             |        |        | 92.55  |        |        | 92.55  |
|             |        |        | 88.40  |        |        |        |
|             |        |        |        |        |        |        |
|             |        |        | 64.88  |        |        |        |
|             |        | 61.21  |        |        |        |        |
| 55.83       | 55.83  |        |        | 55.83  | 55.83  |        |
| 53.32       | 53.32  |        |        |        |        |        |
|             |        | 48.63  | 48.63  |        |        |        |
|             |        |        | 44.37  |        |        |        |
|             |        |        |        | 40.47  | 40.47  |        |
|             |        |        | 38.65  |        |        | 38.65  |
|             |        | 32.16  |        |        |        |        |
| 30.71       | 30.71  |        | 29.34  |        |        | 29.34  |
|             |        |        | 24.41  |        |        |        |
|             |        | 23.31  |        |        |        |        |
|             |        |        | 22.26  |        |        |        |
| 5 bandas    | 5      | 8      | 11     | 4      | 4      | 6      |

\* Se calculó como se indica en el apéndice

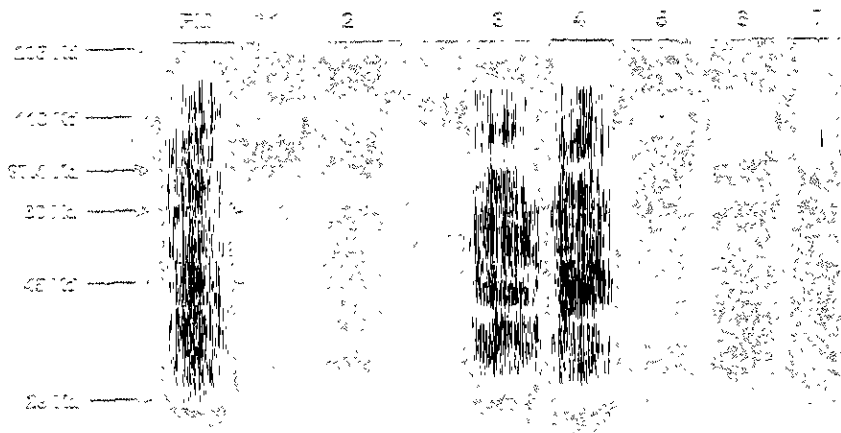


FIGURA 7.-GEL DE PAGE-SDS DE ALGUNAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL EFLUENTE DE CM-CELULOSA

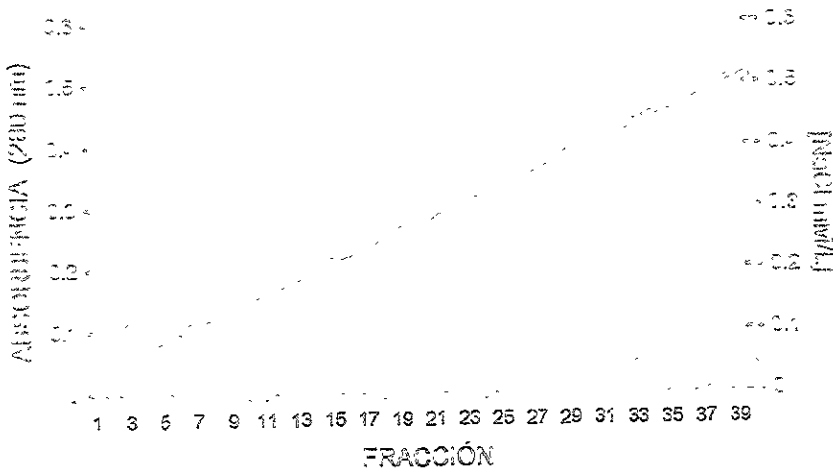
\* NO. DE FRACCIÓN

A diferencia de las fracciones obtenidas en DEAE-celulosa, el número de bandas proteicas disminuyó hasta 4 o 5 en algunos casos. Es importante mencionar que en este paso, el péptido debería de quedarse retenido en la columna, lo cual fue cierto, ya que en la mayoría de las fracciones no aparecen bandas de PM menores a 30 a excepción de las fracciones correspondientes a los números 4 y 7. Al cuantificar la proteína de este efluente se obtuvieron 56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (cantidad de proteína perdida que no interesa).

Al correr el gradiente de NaCl, se obtuvieron 40 fracciones como se puede observar en la Gráfica 7, de las cuales la 3, 11, 13, 17, 24 y 38, resultaron interesantes. A cada una se le cuantificó la cantidad de

proteína (0, 22.71, 61.40, 19.22, 0.04 y 0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) y se realizó un corrimiento electroforético, el cual se muestra en la Figura 8.

Los datos se presentan en la Tabla 8 y podemos ver que en todas las fracciones se presentan proteínas de PM muy cercano a la de nuestro interés (PM 29, 28, 26, 25, 24) excepto en la 3 y 35 donde no hubo proteínas o las pocas que se presentaron fueron de PM mayores a 50 Kd. Por lo anterior, se juntaron las fracciones y solo se mantuvieron 3 (denominadas fracción I, II y III) a las cuales se les determinó la concentración de proteínas obteniéndose los siguientes resultados: 8.06, 85.46 y 0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, por ello se decidió a trabajar solo con la fracción II.



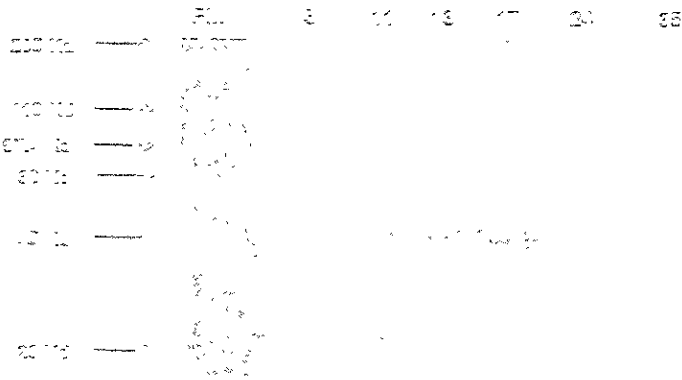
GRÁFICA 1.- GRADIANTE LINEAL DE 0-0.5 M DE NaCl EN COLUMNA DE CM-CELULOSA



**TABLA 8. OBTENCIÓN DE PESO MOLECULAR\* DE BANDAS PROTÉICAS DEL GRADIENTE LINEAL DE 0-0.5 M NaCl EN COLUMNA DE CM-CELULOSA POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (EXPRESADA EN Kd)**

| Gradiente lineal de 0-0.5 M NaCl en columna de CM-celulosa |        |        |        |        |        |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| F3   | F11    | F13    | F17    | F24    | F35    |
|  |        |        |        |        | 131.04 |
|  | 124.47 | 124.47 | 124.47 | 124.47 | 124.47 |
|  | 115.24 | 115.24 | 115.24 | 112.31 | 112.31 |
|  |        |        |        |        |        |
|  | 70.76  | 70.76  | 67.21  | 63.85  | 70.76  |
|  | 57362  | 57362  |        |        | 60.65  |
|  | 5200   | 5200   | 53.35  | 5200   |        |
|  |        |        | 49.39  |        | 49.39  |
|  | 29.56  |        | 28.08  |        |        |
|  | 26.67  | 26.67  | 25.34  | 26.67  |        |
|  | 24.07  |        |        | 24.07  |        |
|  | 21.17  | 21.17  |        |        |        |
|  | 19.10  |        | 18.62  | 19.60  |        |
| 0 bandas   | 10     | 7      | 8      | 7      | 6      |

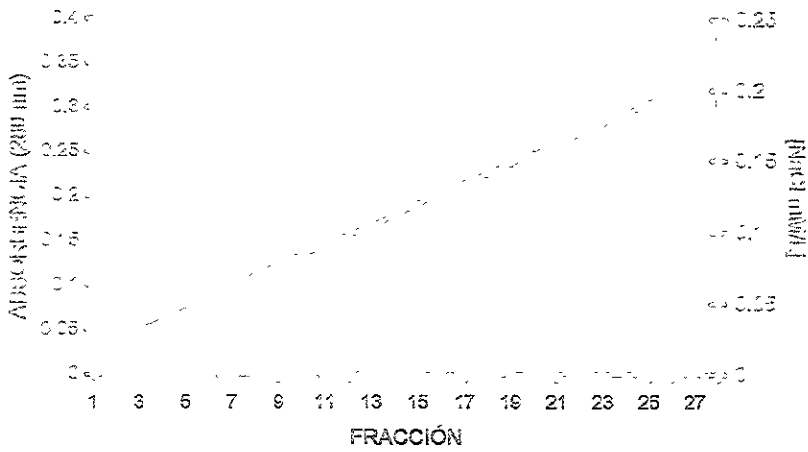
F = Fracción \* Se calculó como se indica en el apéndice.



**FIGURA 8.- GEL DE PAGE-SDS DEL GRADIENTE LINEAL DE 0-0.5 M NaCl EN COLUMNA DE CM-CELULOSA**

\* No. DE FRACCIÓN

La fracción II fue dializada contra un amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y depositada poco a poco a la columna de Azul-sepharosa. Una vez lavada la columna y al correr el gradiente de NaCl, se obtuvieron 28 fracciones como se puede observar en la Gráfica 2. Al realizar el análisis electroforético como se muestra en la Tabla 9, observamos que a parte de disminuir el número de bandas, la proteína se encuentra entre las fracciones 9 a 16 (ver Figura 9).



GRÁFICA 2.- GRADIENTE LINEAL DE 0-0.2 M DE NaCl EN COLUMNA DE AZUL-SEPHAROSA



Por lo cual se decidió concentrarlas y obtener un nuevo gel, además de determinarle la cantidad de proteína (10.31  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pero como solo hay 350  $\mu\text{l}$ , finalmente se tienen 3.6  $\mu\text{g}$ ). Los datos se presentan en la Tabla 10, donde nuevamente aparecen bandas proteicas de alto PM (129.55 y 116.36 Kd), otras de PM intermedio y las más bajas que pesan entre 19.80 y 30.42 Kd.

TABLA 10. OBTENCIÓN DE PESO MOLECULAR DE BANDAS PROTÉICAS DE LAS FRACCIONES REUNIDAS EN EL GRADIENTE DE 0-0.5 M NaCl EN COLUMNA DE CM-CELULOSA POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (EXPRESADA EN Kd)

| Concentración de las fracciones 9 a 17 |
|--|
| 129.55                                 |
| 116.36                                 |
| 64.47                                  |
| 49.60                                  |
| 30.42 - 19.80                          |

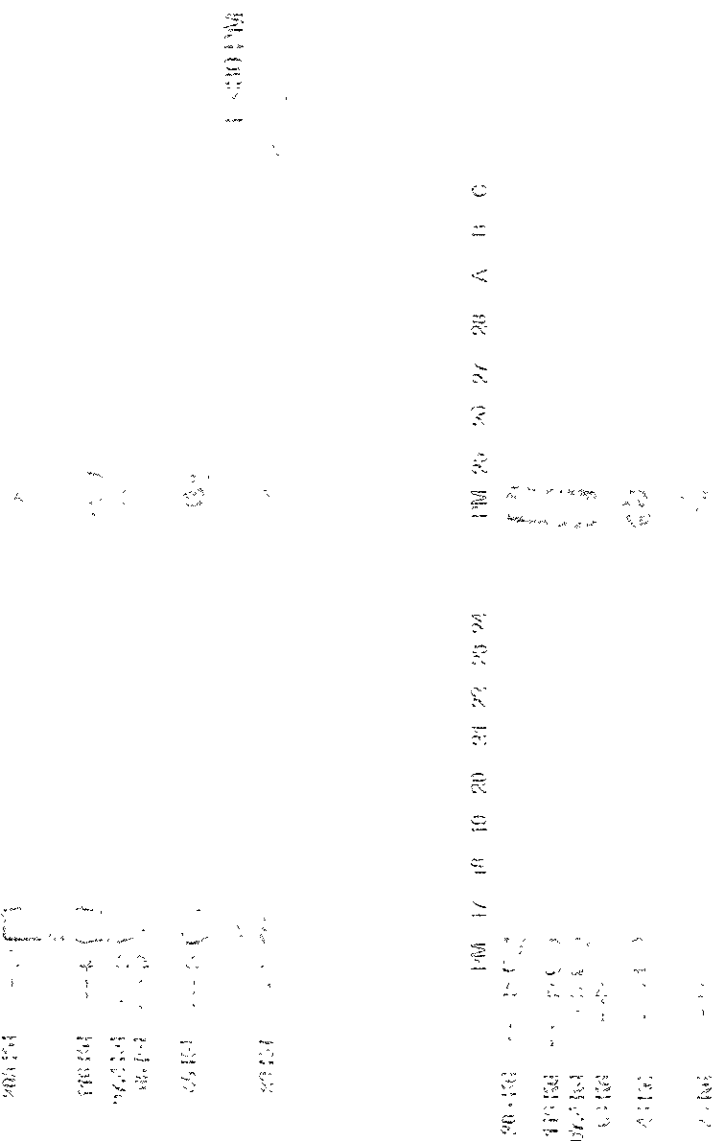


FIGURA 9.- GELES DE PAGE-SDS DEL GRADIENTE LINEAL DE 0.0.2 M NaCl EN COLUMNA DE AZUL-SEPHAROSA

\* NO. DE FRACCIÓN  
A, B Y C = LAVADOS DE LA COLUMNA

Como por el método de columnas de intercambio iónico se obtuvo poca cantidad de proteína, se realizó el método de membranas que permite separar fracciones de diferentes PM, en donde se utilizaron 1000 g de liofilizado por 10000 ml de amortiguador de fosfatos 2 mM, pH 7.5. La concentración protéica obtenida en los diferentes cortes de membrana se muestran en la Tabla 11 y el número de bandas obtenidas en cada corte se presentan en la Tabla 12 y en la Figura 10.

| Membranas de diferentes cortes de PM                 | Concentración (µg/ml) |
|--|-----------------------|
| Extracto acuoso<br>(filtrado en membrana de 0.22 µm) | 392.83                |
| Más de 100 Kd  | 99.61                 |
| Entre 100 y 30 Kd                                    | 66.66                 |
| Menos de 30 Kd                                       | 150                   |

TABLA 11. CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE CADA UNO DE LOS CORTES PASADOS POR DIFERENTES MEMBRANAS QUE SEPARAN DE ACUERDO A DISTINTOS PESOS MOLECULARES

Se puede observar que, en el corte de más de 100 Kd, se encontraron 20 proteínas con PM de 22 a 124 Kd; en el corte entre 100 y 30 Kd, solo se encontraron 6 proteínas y en el caso del corte de menos de 30 Kd, se encontraron 3 proteínas con PM de 54.33, 25.49 y 22.99 Kd, por lo que esta última muestra se concentró a un litro y se le denominó extracto crudo.

TABLA 12. OBTENCIÓN DE PESO MOLECULAR DE BANDAS PROTÉICAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS DE LAS MEMBRANAS DE DIFERENTES CORTES DE PM (EXPRESADA EN KD)

| Más de 100 | Entre 100 y 30 | Menos de 30 |
|------------|----------------|-------------|
| 124.05     |                |             |
| 115.79     |                |             |
| 111.39     |                |             |
|            |                |             |
| 94.21      | 97.49          |             |
| 87.96      |                |             |
|            | 84.99          |             |
| 84.19      |                |             |
| 82.11      |                |             |
| 80.70      |                |             |
| 76.64      | 76.64          |             |
| 72.79      |                |             |
| 69.13      |                |             |
| 60.24      | 60.24          |             |
| 57.22      |                |             |
| 54.33      | 54.33          | 54.33       |
| 50.72      |                |             |
|            |                |             |
| 44.20      |                |             |
|            |                |             |
| 28.75      |                |             |
| 27.31      |                |             |
| 25.49      |                | 25.49       |
|            | 23.80          |             |
| 22.99      |                | 22.99       |



FIGURA 10.-GEL DE PAGE-SDS AL 15% DE MUESTRAS OBTENIDAS DE LAS FRACCIONES DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES.



FIGURA 11.-GEL DE PAGE-SDS AL 15% DEL EXTRACTO, FRACCIONES COMBINADAS Y FRACCIÓN DE <30.



Posteriormente, se corrieron geles de PAGE-SDS al 15 %, en donde se encontraron tres bandas bien diferenciadas - 54, 25 y 16 Kd - (Figura 11), por lo que se piensa, que la membrana de corte de menos de 30 Kd no es tan selectiva o estaba dañada. A continuación se corrieron 20 geles preparativos cargados con muestras de 250  $\mu$ l y una vez identificada la proteína de <30 Kd, se sacó de la malla de poliacrilamida por el método de electroelución (Figura 12). Al cuantificar la proteína de los 20 geles, se obtuvieron 1220.22  $\mu$ g. Esta se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y se dividió en tres alícuotas con 20  $\mu$ l cada una y se guardaron a -20°C.

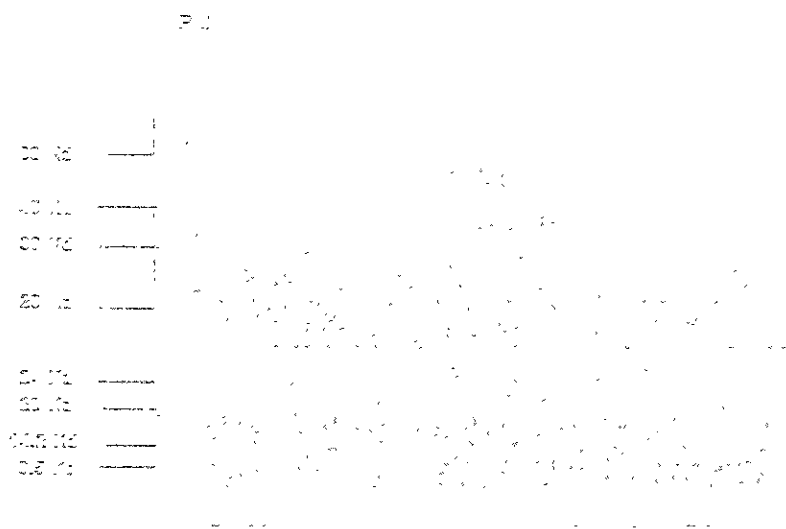


FIGURA 12.- GEL DE PAGE-SDS AL 15% DE LAS MUESTRAS DEL CORTE DE MEMBRANA DE PM: <30

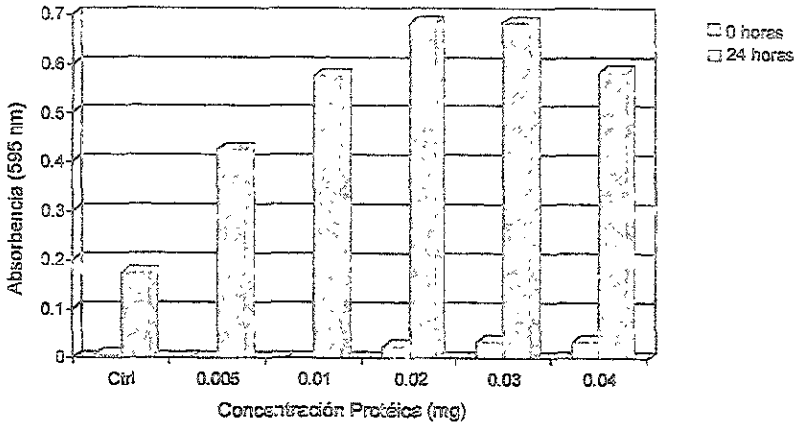
Del extracto de tubérculo, se obtuvieron ocho bandas protéicas; al pasarlo por columnas de intercambio iónico (DEAE-celulosa, CM-celulosa y Azul-sepharosa) se llegó a la purificación de una proteína de menos de 30 Kd en poca cantidad. Por el método de membranas que permiten separar fracciones de distintos PM, se obtuvieron tres fracciones: Mayores de 100, entre 100 y 30 y menores de 30, en mayor cantidad. Ésta última, se electroeluyó, quedando; Fracciones combinadas (16, 25 y 54 PM) y una fracción menor a 30 (29 PM).

### 5.III BIOENSAYOS

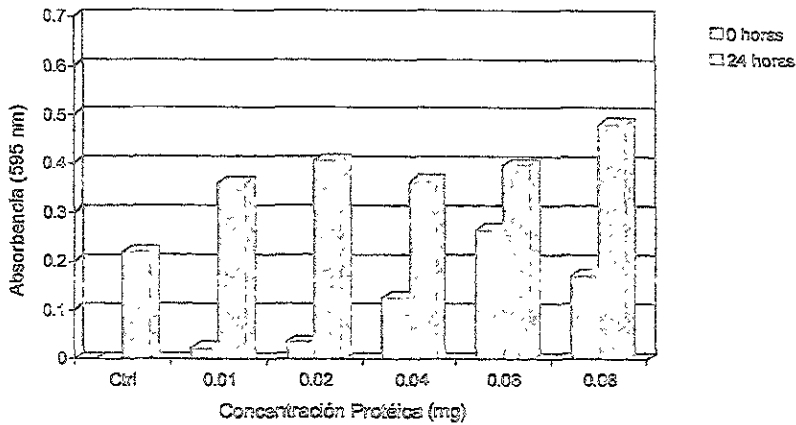
Las UFC de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 se estandarizaron de la siguiente manera:

| Microorganismo          | Inóculo inicial<br>Absorbencia a 530 nm | Unidades Formadoras<br>de Colonias / ml |
|-------------------------|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> | 0.950                                   | $2.61 \times 10^9$                      |

Una vez obtenidas  $10^4$  UFC/ml se realizaron los ensayos turbidimétricos. En la Gráfica 3, se muestra la absorbencia obtenida del enfrentamiento de *E. coli* con diferentes concentraciones del extracto a tiempo 0 y a las 24 h de incubación. Como se puede ver en las concentraciones de 0.02 y 0.03 mg, los microorganismos no son inhibidos por el extracto, al contrario se estimula hasta 3 veces más su crecimiento respecto al control.

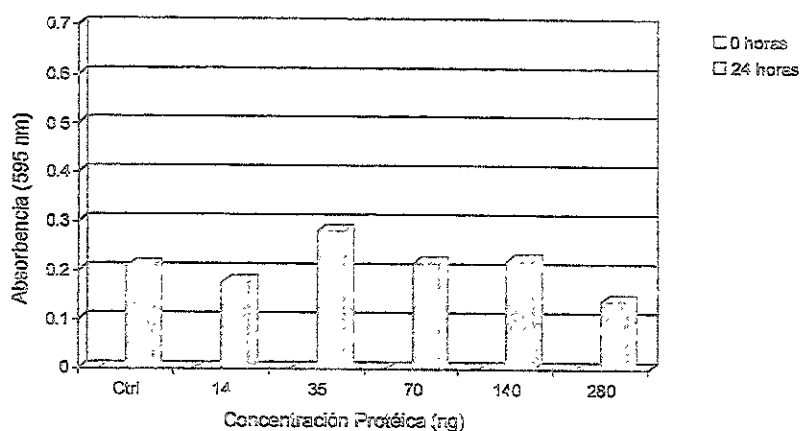


GRÁFICA 3.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO.



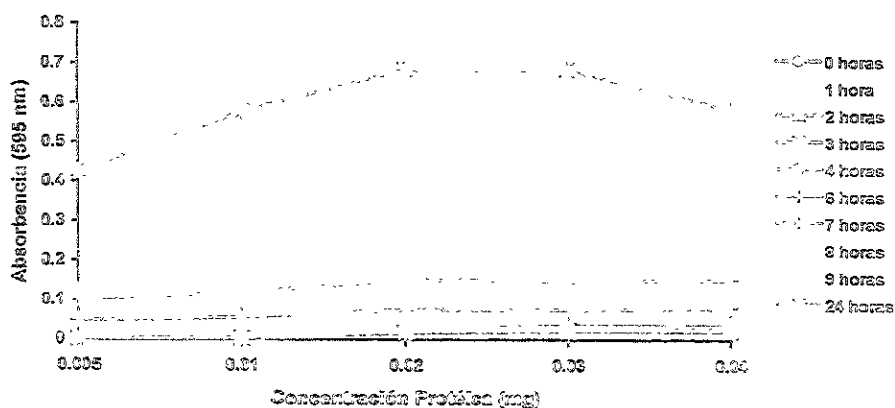
GRÁFICA 4.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES COMBINADAS (1:3, 2:4 Y 5:4 PM)

Cuando se emplearon las fracciones combinadas, no se observó un incremento marcado del crecimiento bacteriano, como cuando se utilizó el extracto crudo, así a las concentraciones 0.01, 0.02 y 0.04 mg, la absorbencia disminuyó en 0.25 unidades (Gráfica 4). Al emplear la fracción de <30 a la concentración de 14 ng e incluso 280 ng (100 000 veces menor que en los otros casos) se observa un decremento de hasta 0.5 unidades de absorbencia en comparación a las obtenidas al utilizar las diferentes concentraciones del extracto y 0.25 unidades en el caso de las fracciones combinadas (Gráfica 5).

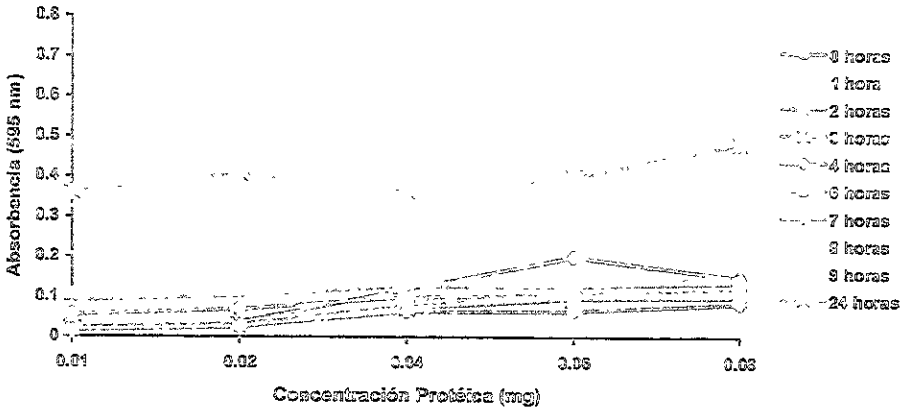


GRÁFICA 5.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN <30 (29 PM)

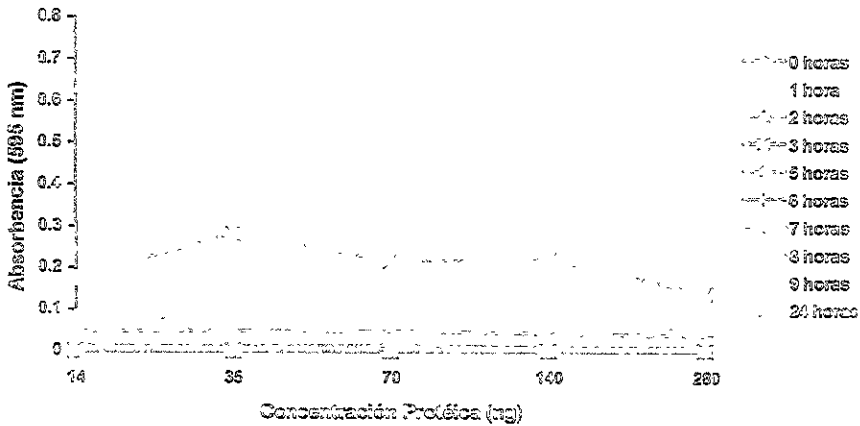
Por otro lado, tomando en cuenta que este tipo de organismos se reproducen rápidamente, al observar la evolución temporal de estas acciones, monitoreando a intervalos cortos (h), se comprobó que a todas las concentraciones del extracto, durante las primeras 9 h presenta efecto bacteriostático evidente, ya que las unidades de absorbencia no se incrementan sino hasta las 24 h (Gráfica 6). En el caso de las fracciones combinadas, se presenta semejante comportamiento (ver Gráfica 7). Y en el caso de la fracción <30 a todas las concentraciones, el efecto bacteriostático es marcado, ya que no es sino hasta la séptima hora en la que las unidades de absorbencia comienzan a aparecer y hasta las 24 h el máximo valor de absorbencia que se detecta es de 0.2 unidades, cuando en los otros casos el valor más alto fue de 0.65 unidades (Gráfica 8).



GRÁFICA 6.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO CRUDO EN DIFERENTES TIEMPOS

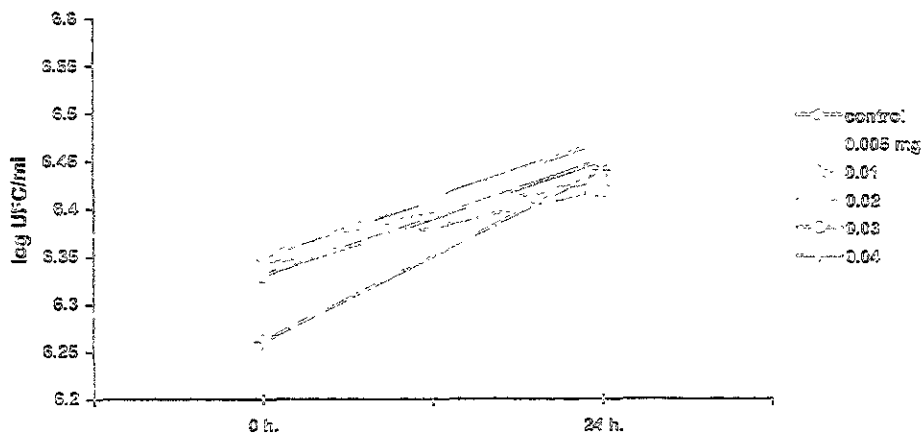


GRÁFICA 7.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES COMBINADAS EN DIFERENTES TIEMPOS

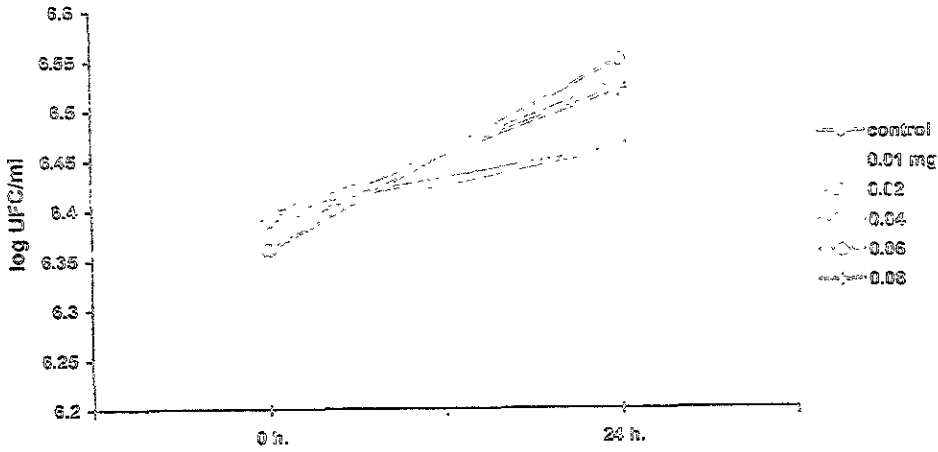


GRÁFICA 8.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN <30 EN DIFERENTES TIEMPOS

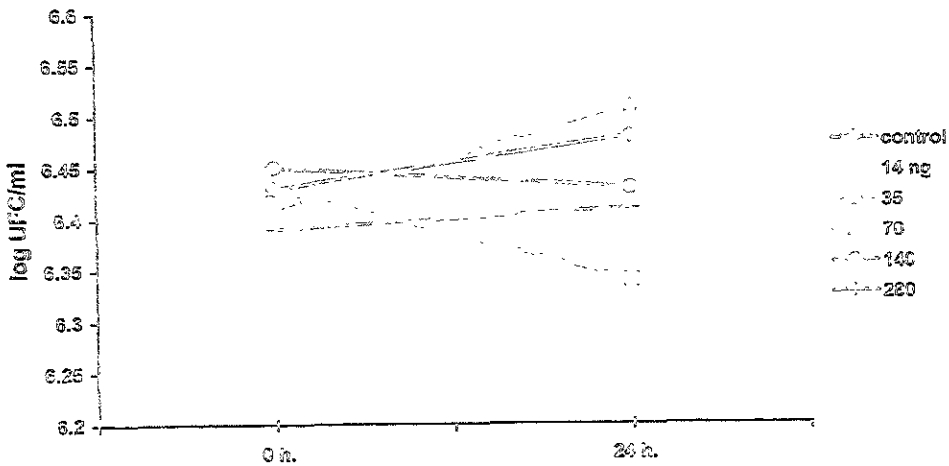
Al analizar el gráfico en donde se muestra el logaritmo de las UFC/ml con respecto a las mismas 24 h, en el extracto y las fracciones combinadas se nota nuevamente un crecimiento, lo que demuestra que se favorece el crecimiento del microorganismo (Gráficas 9 y 10). En el caso de la fracción <30, a las concentraciones de 70, 140 y 280 ng, se confirma el efecto bacteriostático, pues aún a las 24 h de incubación las UFC son menos con respecto al control (Gráfica 11). Cabe mencionar que fenotípicamente, estas colonias, en particular cambiaron de color a las 24 h, pero una vez resembradas (48 h) expresan su color original.



GRÁFICA 9.- UFC/ML A LOS 30 MINUTOS Y 24 HORAS DE HABER SIDO ENFRENTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO CRUDO



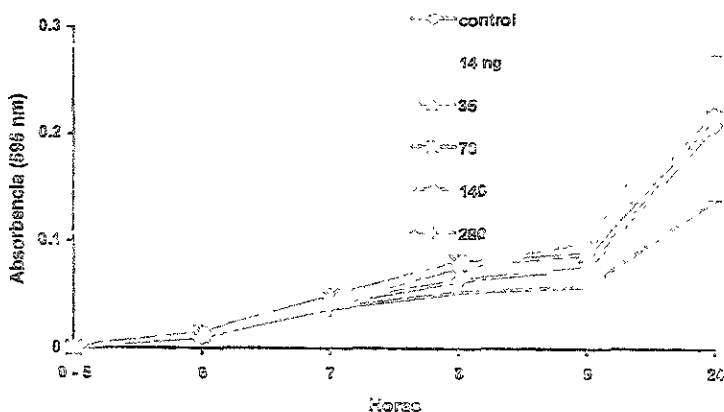
GRÁFICA 10.-UFC/ML A LOS 30 MINUTOS Y 24 HORAS DE HABER SIDO ENFRENTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS FRACCIONES COMBINADAS



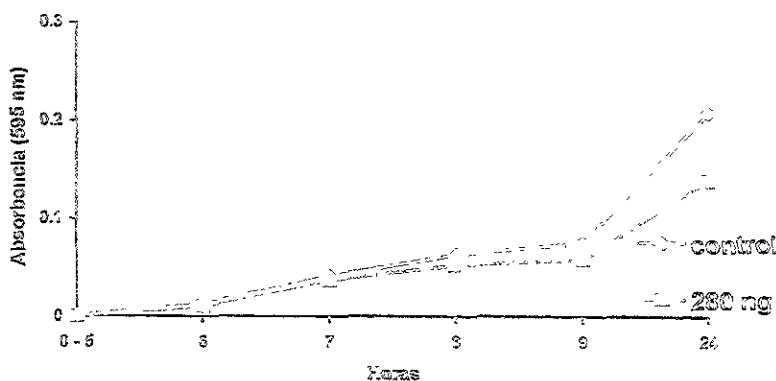
GRÁFICA 11.-UFC/ML A LOS 30 MINUTOS Y 24 HORAS DE HABER SIDO ENFRENTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN <math><30</math>



Para estar seguros de este efecto, nuevamente se graficó el comportamiento de *E. coli* a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de la fracción <30 (Gráfica 12), aquí se observó que solo a la concentración de 280 ng hay un efecto bacteriostático, pues desde el inicio hasta las 24 h, las unidades de absorbancia siempre estuvieron por debajo de las detectadas en el control (Gráfica 13).



GRÁFICA 12.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN DE <30 A DIFERENTES TIEMPOS



GRÁFICA 13.- ENFRENTAMIENTO DE *E. coli* A UNA CONCENTRACIÓN DE 280 ng DE LA FRACCIÓN DE <30 A DIFERENTES TIEMPOS

Para tratar de comprobar si esta acción se debía a un efecto en la síntesis de proteínas, indirectamente actuando sobre los diferentes ribosomas bacterianos, se enfrentaron las distintas fracciones incubándolas con RNA total aislado de *E. coli*, analizados en geles de agarosa.

#### 5.IV PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTI-RIBOSÓMICA

En la determinación de la actividad glicosídica, se extrajeron cantidades considerables de RNA tanto de las células MCF.7 como de *E. coli*. Para asegurar su grado de pureza, se cuantificó espectrofotométricamente a 260 y 280 nm (ver Tabla 13), se corrieron geles el mismo día de la extracción (Figura 13) y para prevenir que este se degradara se separó en alícuotas que fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , que posteriormente se enfrentarían a las diferentes fracciones protéicas.

|                    | $\lambda$ 260 | $\lambda$ 280 | Resultado<br>$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
|--------------------|---------------|---------------|--|
| RNA MCF.7          | 2.42          | 1.63          | 24.2                                   |
| RNA <i>E. coli</i> | 0.42          | 0.27          | 4.2                                    |

TABLA 13.- CUANTIFICACIÓN DE RNA EUKARIOTE Y PROCARIOTE

En el carril 2 del gel, se pueden observar claramente las subunidades 28S (5300 pb) y 18S (2000 pb) de células eucarióticas que se utilizaron como control y en el carril 3, las subunidades 23S (2904 pb) y 16S (1542 pb) de células de *E.coli*.

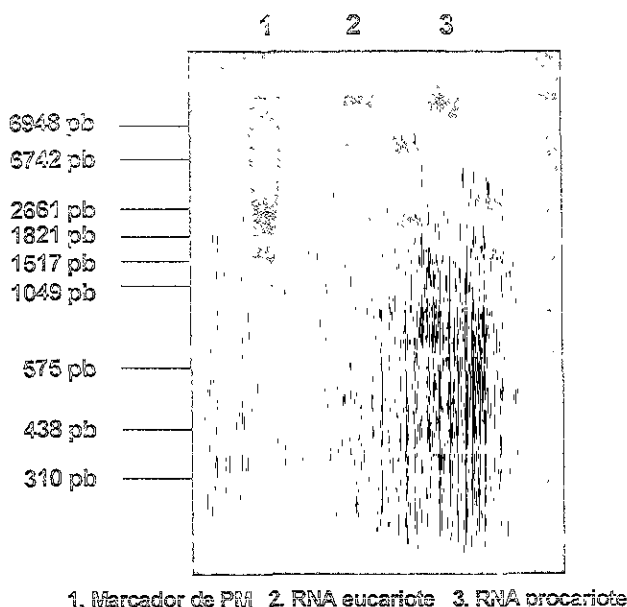


FIGURA 13 - GEL DE AGAROSA AL 2% DONDE SE MUESTRA LA EXTRACCIÓN DE RNAf DE CÉLULAS MCF.7 Y *E. coli*

Se volvieron a tomar muestras al azar del extracto, de las fracciones combinadas y la fracción <30, a las cuales se les hicieron pruebas de esterilidad y cuantificó la concentración proteica por métodos macro y micrométricos de Bradford (30), obteniendo los siguientes resultados:

|                       | $\lambda$ 595 | Resultado<br>ng/ $\mu$ l |
|-----------------------|---------------|--------------------------|
| Extracto              | 0.12          | 226                      |
| Fracciones combinadas | 0.24          | 415.5                    |
| Fracción <30          | 0.04          | 13.9                     |

Para encontrar la cantidad óptima de anilina, una vez cuantificado tanto el RNA como las proteínas, se efectuó una curva de concentraciones de anilina, encontrando que donde se observan mejor las subunidades correspondía a concentración 0.2 M (carril 3), por lo cual se utilizó ésta en los experimentos posteriores (Figura 14).

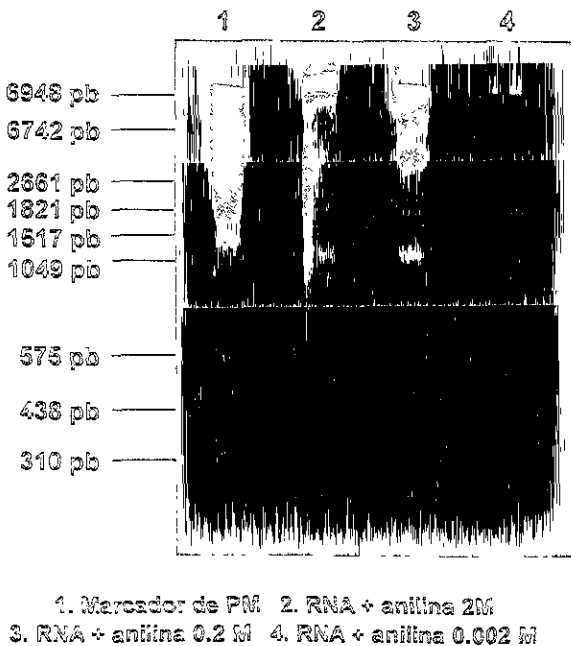


FIGURA 14. GEL DE AGAROSA AL 2% DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANILINA EN CÉLULAS MCF.7

Hasta este punto, se trabajaron células eucariotes y procariotes; según los resultados, se observa que el RNA de células eucariotes es más fácil de

manejar, se obtiene en grandes cantidades y es de mejor calidad. Sin embargo, como las fracciones protéicas solo se probaron en *E. coli*, los resultados están enfocados principalmente al RNA de éste microorganismo.

En la Figura 15 se puede observar que en el carril 2, el RNA disuelto en agua DEPC, mostró las subunidades ribosomales 23S, 16S y 5S, además de una gran cantidad de RNAi en la parte inferior, por lo cual se limpió con acetato de sodio 4 M. En el carril 3 se muestra el RNAr tratado en el ensayo de actividad de N-Glicosidasa, sin contener fracciones protéicas, por lo que se considero como control. Como se puede ver en el carril 4, las subunidades 23S y 16S están ligeramente más abajo que las bandas del control, debido a la presencia de la anilina (en ambos carriles, el RNAi se encuentra en menor cantidad). En los carriles 5, 6, 7 y 8, el extracto y las fracciones combinadas degradan totalmente el RNA (RNAr y RNAi). Por último, en el carril 9 y 10, se nota la subunidad 23S casi intacta, la 16S se observa difusa y cerca de la subunidad 5S y del RNAi, una pequeña mancha, como consecuencia de la ruptura entre las bases del RNAr.

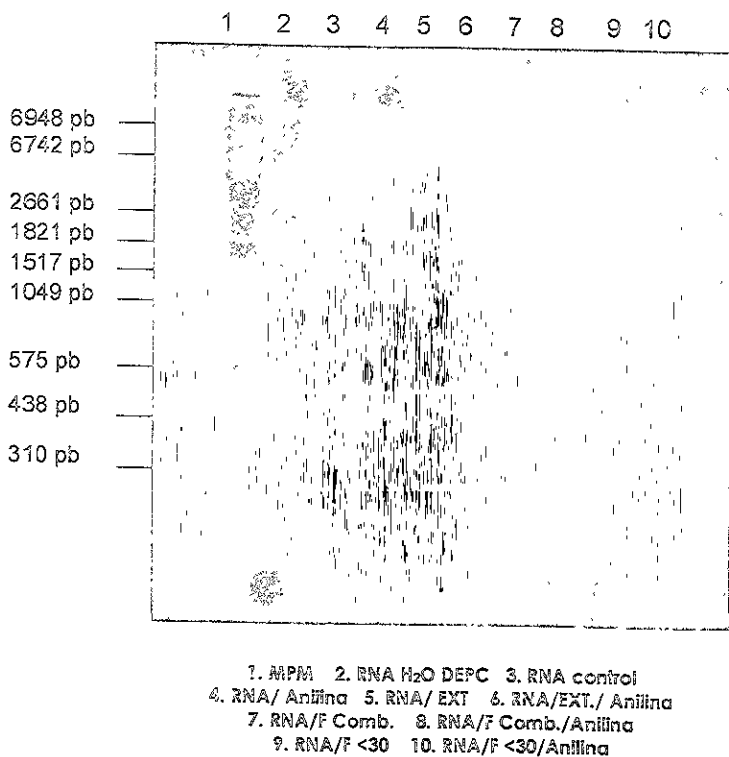


FIGURA 15.- GEL DE AGAROSA AL 2% DE LA ACTIVIDAD ANTI-RIBOSÓMICA EN *E. coli*

CONCENTRACIÓN PROTÉICA DEL EXTRACTO = 4.5 µg  
 CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE LAS FRACCIONES COMBINADAS = 12.4 µg  
 CONCENTRACIÓN PROTÉICA DE LA FRACCIÓN <30 = 0.069 µg  
 CONCENTRACIÓN DE RNA = 12.6 µg

Por lo anterior, se decidió efectuar otra prueba solo a la fracción <30, la cual consistió en determinar su punto isoeléctrico.

## 5.V PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO

De la muestra obtenida en el proceso de electroelución, se tomó una alícuota para determinar el punto isoeléctrico del o los péptidos aislados. El gradiente de pH formado fue el siguiente:

| TUBO | pH    | TUBO | pH     |
|------|-------|------|--------|
| 1    | 4.13  | 11   | 8.24   |
| 2    | 5.24  | 12   | 9.67   |
| 3    | 7.08  | 13   | 9.05   |
| 4    | 8.09  | 14   | 9.83** |
| 5    | 8.43  | 15   | 9.95   |
| 6    | 8.81  | 16   | 10.14  |
| 7    | 8.31  | 17   | 10.09  |
| 8    | 9.01  | 18   | 10.63  |
| 9    | 8.49  | 19   | 11.10  |
| 10   | 9.42* | 20   | 12.35  |

Una vez precipitados los tubos con isopropanol (24 h/-70°C) los tubos 10 y 14 mostraron una pequeña pastilla. Al ser analizados en PAGE-SDS al 15% (teñidos con plata), se observaron dos proteínas de PM 29 y PI 9.4 y 9.8 (Figura 16).

## 6.0 DISCUSIÓN

En el presente estudio, a diferencia de Cammue y cols. (1) y Kusamba y cols. (12) que solo han trabajado con las partes aéreas de la planta, se utilizaron tubérculos de *M. jalapa* colectados bajo distintas condiciones ambientales (lugar, hora, etc.). Estas condiciones no afectaron la composición protéica de los tubérculos, pues como se observa en la Figura 4 las bandas protéicas se presentaron de forma constante.

En la purificación protéica, a través de los métodos de columnas de intercambio iónico, membranas de diferentes cortes y los geles de SDS-PAGE con electroelución, se plantearon ventajas y desventajas en los tres métodos. En el primer caso, las desventajas son: manipulación excesiva de las muestras, (lo que podría afectar la actividad enzimática), tiempos largos de preparación de reactivos y materiales, costos elevados y el rendimiento bajo, pues las columnas sólo soportan volúmenes de hasta un litro, la mayor ventaja es que la proteína de bajo PM (29, posible RIP) se obtiene aparentemente con un buen grado de pureza. Respecto al método de membranas de diferentes cortes, se pueden emplear volúmenes mayores a un litro, no hay necesidad de preparar muchos reactivos, los costos se reducen si se cuenta con el equipo completo, el rendimiento es mucho mayor y la muestra no es manipulada excesivamente, lo que redundaría en que se puede mantener la actividad



enzimática. Las desventajas serían que las membranas de los diferentes cortes no son muy específicas y en caso de que las membranas estuviesen dañadas, podría permitir el paso de otros péptidos no deseados. Con los geles, una de las ventajas es la rapidez con la cual se purifica la proteína (24 h), siempre y cuando se tenga establecida una metodología estándar de purificación; el inconveniente más significativo es que se requieren varios geles, con lo cual se incrementan los costos de la técnica.

Como es evidente, por el método de columnas de intercambio iónico, las muestras son sometidas a diversos procesos. Fong y cols. (24) mencionan que las concentraciones salinas utilizadas, los cambios de pH y otros factores muchas veces son los que hacen que disminuya o se pierda la actividad enzimática, a pesar de ello, Barbieri y cols. (25) lo reportan como el mejor método para purificar cualquier tipo de RIP junto con el método de columnas Mono-FPLC. En este trabajo se propusieron dos nuevas alternativas de purificación, como es la utilización de membranas de diferentes cortes de PM y la electroelución de PAGE-SDS, éstos métodos destacan debido: al incremento considerable de la cantidad de proteína purificada y la reducción del tiempo empleado, evitando así que se afecte su actividad. Resulta interesante que los métodos mencionados no han sido reportados por ningún autor en el manejo de las RIP.

En lo que respecta a la evaluación de la actividad antimicrobiana de las distintas fracciones proteicas se observó, de manera general, que el

extracto estimula el crecimiento y la combinación de las fracciones también lo hace pero en menor proporción, lo que permite pensar que en las fracciones combinadas ya no están presentes aquellos factores estimulantes del crecimiento.

Para la fracción <30, dadas sus características de mayor pureza, se utilizaron dosis menores que las reportadas por Lodge y cols. -0.1 a 10 ng- (16), Zhao-Chun y cols. -de 1 a 100 µg- (15), (estos investigadores evaluaron en virus) y Cammue y cols. (1) (en bacterias, hongos y células nerviosas). Este último reporta que la MIC para *E. coli* es >500 µg empleando péptidos de bajo PM aislados de semillas de *M. Jalapa*. En este trabajo, cuando se evaluó la fracción <30, se observó que a la concentración de 280 ng se detecta actividad bacteriostática durante las primeras 9 h y conforme transcurre el tiempo por lo menos hasta las 24 h, las unidades de absorbencia y las unidades formadoras de colonias se mantienen por debajo de las detectadas para el control (Gráfica 11 y 13), es interesante destacar que si bien los autores expresan el carácter bactericida de las RIP, aquí el manejo de los resultados evidencian actividad bacteriostática. Este comportamiento podría explicarse por la fisiología de la célula, pues en un principio la entrada de uno o ambos péptidos podría verse obstaculizada y además podría existir una competencia entre ellos debido a tener características similares (como se explicará más adelante). Por otro lado, conforme se va saturando, en este caso los sitios específicos en donde

corra la enzima glicosídica, (residuo de adenina<sub>2660</sub> en la subunidad 23S y adenina<sub>1014</sub> en la subunidad 16S) se va perdiendo actividad. Para corroborar si esta acción bacteriostática se debía o no a la presencia de una enzima con actividad anti-ribosómica en la fracción <30, se enfrentó dicha fracción al RNA total de *E. coli*, cabe mencionar que en otros trabajos solo se han empleado el lisado de reticulocitos de conejo (por su riqueza en ribosomas) y aquí se está empleando el RNA intacto de *E. coli*, por lo que se considera una nueva metodología.

Al enfrentar el RNA de *E. coli* tanto al extracto crudo como a las fracciones combinadas se observó una degradación del RNA, pues no se visualizaron bandas correspondientes al RNAr ni tampoco el RNAt, esto podría atribuirse a la presencia de otras proteínas con actividad enzimática. En el caso de las fracciones combinadas (16, 25 y 54 PM), quizá alguna tenga actividad de RNAasa, pues aunque no se han reportado aisladas de *M. jalapa*, en el caso de *Mormodica charantia* (donde hay RIP tipo I), Ide y cols. (44) han encontrado una de PM muy cercano a los 25 Kd -21.25 Kd-. Por otro lado, al enfrentarlo a la fracción <30, apareció una pequeña mancha cerca de la subunidad 5S; como consecuencia de la ruptura del residuo de adenina<sub>1014</sub> de la subunidad 16S; si esta acción tiene que ver o no con el efecto bacteriostático presentado en las pruebas antimicrobianas, podría explicarse por la presencia de dos proteasas diferentes, identificadas por isoelectroenfoque, que pudieran tener efectos

contrarios; o bien, que en los ribosomas de *E. coli*, exista una ribozima que se expresa en presencia de proteínas de PM similar. Estas posibilidades tendrían que explorarse en estudios posteriores.

Una de las pruebas de mayor importancia para que se obtengan resultados confiables es la del punto isoeléctrico. Con esta prueba se detectaron dos proteínas de PM 29 y PI 9.4 y 9.8, ésta última parece ser la MAP reportada por Habuka y cols. (17). Asimismo, Vivanco y cols. (45), reportan este mismo hecho en la caracterización de RIP de *Mirabilis expansa*, donde se identificaron dos proteínas de raíz con un PM muy semejante 27 y 27.5 Kd.

## 7.0 CONCLUSIONES

- Se purificaron y caracterizaron 2 proteínas de la raíz de *Mirabilis jalapa*.
- Para el aislamiento y purificación, la combinación de los métodos de membranas que separan fracciones protéicas de diferentes PM y los geles de PAGE-SDS, permiten obtener un mayor rendimiento, en menor tiempo y con costos reducidos.
- Se logró aislar y purificar una fracción de menos de 30 Kd.
- No se detectó actividad antimicrobiana sobre *E. coli* al utilizar diferentes concentraciones del extracto crudo ni tampoco al utilizar fracciones combinadas.
- La fracción <30, a una concentración de 280 ng produce un efecto bacteriostático en *E. coli*.

- El extracto y las fracciones combinadas degradaron el RNA total de *E. coli*, quizá por la presencia de alguna RNAasa.
- La fracción <30 sólo presenta actividad glicosídica parcial sobre la subunidad 16S de RNAr de *E. coli* debido a la presencia de otra proteína con características similares.
- Mediante la técnica de isoelectroenfoque se determinó que se trataba de dos especies moleculares con PM de 29, pero con PI de 9.4 y 9.8.
- La proteína de PM 29 y PI 9.8 corresponde a la MAP.

### 3.0 BIBLIOGRAFIA

1. Cammue Bruno P.A., De Bolle Miguel F.C., Terras Franky, R. G., Proosi Paul, Van Damme Jo, Rees Sarah B., Vanderleyden Jozef and Broekaert Willem F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 267 (4) : 2228-2233.
2. Harley S. and Beevers H. (1982). Ricin inhibition of *in vitro* protein synthesis by plant ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 5935-5938.
3. Barbieri Luigi, Battelli Maria and Stirpe Fiorenzo. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Chimica et Biophysica Acta*, 1154 : 237-282.
4. Dickerson R. and Geis T. (1989). The structure and action of protein S. Harper & Row, Publishers. pp: 79-81.
5. Lehninger A., Nelson D. and Cox M. (1993). Principles of Biochemistry. Worth Publishers. 2<sup>nd</sup>. Ed.
6. Girbes T., Ferreras M., Iglesias R., Cifores L., De Torre C., Carbajales M.L., Jiménez P., De Benito F. M. and Muñoz R. (1996). Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cellular and Molecular Biology*. 42 (4): 461-471.

7. Stitpe F., Bailey S., Miller S. P. and Bodley J. W. (1988). Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acid Research* Vol. 16 (4): 1349-1357.
8. Martínez Maximino (1987) *Las plantas medicinales de México*. INAH: *Plantea* p.p: 126-127.
9. Lozoya X. y Lozoya M. (1982) *Flora Medicinal de México*. 1ª Parte. *Plantas Indígenas*. IMSS. México p.p.: 218.
10. Lozoya X. y Zolla C. (1984) *Medicina tradicional en México*. *Bol. Of. Sanit. Panamer.* Año 63 96(4): 360-364.
11. Argueta A., Cano L y Rodarte M. (1994) *Atlas De Las Plantas De La Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista Tomo II p.p.: 968-969.
12. Kusamba C., Byamana K. and Mbuyi W. (1991) Antibacterial activity of *Mirabilis jalapa* seed powder. *Journal of Ethnopharmacology* (35): 197-199.
13. Lee-Huang S., Kung H., Huang P. L., Li B., Huang P., Huang H. and Chen H. (1991) A new class of anti-HIV agents: GAP31, DAPs30 and 32. *FEBS LETT.* Vol. 291 (1): 139-144.
14. Lee-Huang S., Huang P., Nara P. L., Chen H., Kung H., Huang P., Huang H. and Huang P. L. (1990). MAP 30: A new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *FEBS LETT.* Vol. 272 (1,2) : 12-18.



15. Zhao-Chun C., Anroniw J.F. and White R. (1993). A possible mechanism for the antiviral activity of pokeweed antiviral protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 249-258.
16. Lodge J., Kaniewski W. and Tumer N. (1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90 : 7089-7093.
17. Habuka N., Murakami Y., Noma M., Kudo T. and Horikoshi K. (1989). Amino acid sequence of *Mirabilis* antiviral protein, total synthesis of its gene and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264 (12): 6629-6634.
18. Kataoka J., Miyano M., Habuka N., Masuta C. and Koizumi A. (1993). A genomic gene for MAP, a ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa*, contains an intron. *Nucleic Acids Research* Vol. 21. (4): 1035.
19. Miyano M., Appelt K., Arifa M., Habuka N., Kataoka J., Ago H., Tsuge H., Noma M., Ashford V. and Xuong N. (1992). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Mirabilis* antiviral protein. *J. Mol. Biol.* 226: 281-283.
20. Kataoka J., Habuka N., Miyano M., Masuta C. and Koizumi A. (1992). Adenine depuration and inactivation of plant ribosomes by an antiviral protein of *Mirabilis jalapa* (MAP). *Plant. Mol. Biol.* 20: 1111-1119.
21. Kataoka J., Habuka N., Furuno M., Masashi M., Takanami Y. and Koizumi A. (1991). DNA sequence of *Mirabilis* antiviral protein (MAP), a ribosome-

- inactivating protein with an antiviral property, from *Mirabilis jalapa* L. and its expression in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 266 (13): 8426-8430.
22. Habuka N., Akiyama K., Tsuge H., Miyano M., Matsumoto T. and Noma M. (1990). Expression and secretion of *Mirabilis* antiviral protein in *Escherichia coli* and its inhibition of *in vitro* eukaryotic and prokaryotic protein synthesis. The Journal of Biological Chemistry Vol. 265. (19): 10988-10992.
23. Habuka N., Miyano M., Kataoka J., Tsuge H. and Noma M. (1992). Specificities of RNA N-Glycosidase activity of *Mirabilis* antiviral protein variants. The Journal of Biological Chemistry Vol. 267. (11): 7758-7760.
24. Fong W., Poon Y., Wong T. M., Mock J. W. Y., Ng T. B., Wong R. N. S., Yao Q. Z. and Yeung H. W. (1996). A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins  $\alpha$  and  $\beta$  - Momorcharins from *Momordica charantia* seeds, N-terminal sequence comparison and establishment of their N-Glycosidase activity. ELSEVIER. Life Sciences, Vol. 59. (11): 901-909.
25. Barbieri L., Stoppa C. and Bolognesi A. (1987). Large scale chromatographic purification of ribosome-inactivating proteins. Journal of Chromatography, 408: 235-243.
26. Laemmli U.K. (1970) Techniques of polyacrilamide gel electrophoresis Nature 227 : 680-685.

27. Zinker Samuel (1984) Método de tinción de proteínas con azul de Coomassie, después de electroforesis en geles de poliacrilamida. BEB (84) Vol. III No. 2: 23
28. Wray W., Boulikas T., Wray V. P. and Hancock R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118: 197-203.
29. De Moreno M., Smith J. and Smith R. (1985). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: Increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain Procedure. *Anal. Biochem.* 151: 466-470.
30. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
31. Millipore Corp. (1990). Installation and Operation instructions of Minitan Filter Plates and Minitan-S Filter Sheets. pp: 17.
32. Wessel D. and Flügge U. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
33. Davis B.D., Dulbecco R., et al. (1996) Tratado de Microbiología 4ª Edición Editorial Masson p.p: 193-219.
34. Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (1998) Brock Biología de los Microorganismos. 8ª Edición Editorial Prentice Hall p.p: 149-177 y 397.

35. Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
36. Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* Vol. 15 No. 3: 532-536.
37. Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition* Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.
38. Sallustio S. and Stanley P. (1990). Isolation of chinese hamster ovary ribosomal mutants differentially resistant to ricin, abrin and modeccin. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 265, No. 1: 582-588.
39. Hartley M., Legname G., Osborn R., Chen Z. and Lord M. (1991). Single-chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *FEBS letters* Vol. 290 No.12. p.p.: 65-68.
40. May M., Hartley M., Roberts L., Krieg P., Osborn R. and Lord M. (1989). Ribosome inactivation by ricin A chain: A sensitive method to assess the activity of wild-type and mutant polypeptides. *EMBO J.* 8: 301-308.
41. Turner N., Hwang D. and Bonness M. (1997) C-terminal deletion mutant of Pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 3866-3871.

42. O'Farrell Patrick H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 250. No. 10: 4007-4021.
43. Gasking D.K. (1997) Purification of *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -toxin: Comparison of three isoelectric focusing methods. Protein Expression and Purification 9: 76-82.
44. Ide H., Kimura M., Arai M and Funatsu G. (1991). The complete aminoacid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter gourd. FEBS Lett Jun 24; 284(2): 161-164.
45. Vivanco J., Savary B. and Flores H. (1999). Characterization of two novel type 1 ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. Plant. Physiol. 119: 1447-1456.

# APÉNDICE

COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

MÉTODO DE BRADFORD

ELECTROFORESIS

BIOENSAYOS

ACTIVIDAD ANT-RIBOSÓMICA

ISOELECTROENFOQUE

## COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### ◦ Amortiguador de fosfatos (Fosfatos 0.1 M)

Se preparan las siguientes soluciones:

- **Solución A** ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M): Disolver 27.6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y aforar a un litro.
- **Solución B** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M): Disolver 53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y aforar a un litro.

Para obtener soluciones a diferente pH se toman las siguientes alícuotas:

| Sol. A (ml) | Sol. B (ml) | Agua destilada (ml) | pH  |
|-------------|-------------|---------------------|-----|
| 438.5       | 61.5        | 500                 | 6   |
| 195         | 305         | 500                 | 7   |
| 140         | 360         | 500                 | 7.2 |
| 80          | 420         | 500                 | 7.5 |

#### ◦ PBS 2 mM pH 7.5 (Para columna DEAE-celulosa)

| Sol. A | Sol. B |
|--------|--------|
| 8 ml   | 42 ml  |

#### ◦ PBS 10 mM pH 6.0 (Para columna CM-celulosa)

| Sol. A  | Sol. B | H <sub>2</sub> O destilada |
|---------|--------|----------------------------|
| 43.85ml | 6.15ml | 50 ml                      |

◦ Tris-HCl 10 mM pH 8.0 (Para columna Azul-sepharosa)

Disolver 1.211 g de trisma en 500 ml de agua destilada, ajustar a pH 8.0 con HCl 1N, aforar a un litro con agua destilada.

◦ Solución salina fisiológica (S.S.F.) al 0.85%

Pesar 0.85 g de NaCl y aforar a 100 ml con agua destilada.

◦ Preparación del gradiente de NaCl para la columna de CM-Celulosa  
10mM pH 6.0

En el primer vaso comunicante colocar 100 ml PBS 10 mM pH 6.0

En el segundo vaso comunicante 100 ml con NaCl 0.5 M disuelto en el mismo PBS 10 mM pH 6.0.

◦ Preparación del gradiente de NaCl para la columna de Azul-Sepharosa  
10 mM pH 8.0

En el primer vaso comunicante colocar 100 ml Tris-HCl 10 mM pH8.0

En el segundo vaso comunicante 100 ml con NaCl 0.2 M disuelto en el mismo Tris-HCl 10 mM pH 8.0



## CUANTIFICACIÓN RÁPIDA Y SENSIBLE DE PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASSIE G<sub>250</sub>

### REACTIVOS:

#### SOLUCIÓN DE AZUL DE COOMASSIE (PARA CUANTIFICAR PROTEÍNAS)

Disolver 100 mg de Azul de Coomassie en 50 ml de etanol al 95%, posteriormente agregar 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% y aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Almacenar a 4°C por una semana para madurar; Para su uso, primero filtrar y después utilizar; se almacena nuevamente a 4°C.

### Método Estándar o Macrométrico

1. Pipetear en un tubo de ensayo 0.1 ml de la solución que contenga entre 10-100 µg de proteína
2. Agregar 5 ml del Reactivo de Azul de Coomassie y mezclar con vortex.
3. Medir la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos y antes de 1 h.

NOTA: El blanco deberá contener 0.1 ml del amortiguador adecuado y 5ml del azul de Coomassie.

## Método Micrométrico

1. Pipetear en un tubo de ensayo 0.1 ml de la solución de proteína conteniendo 1-10  $\mu\text{g}$ .
2. Agregar 1 ml de reactivo de Coomassie, mezclar y medir la absorbencia a 595 nm en cubeta de cuarzo de 1 ml.

### CURVA PATRÓN:

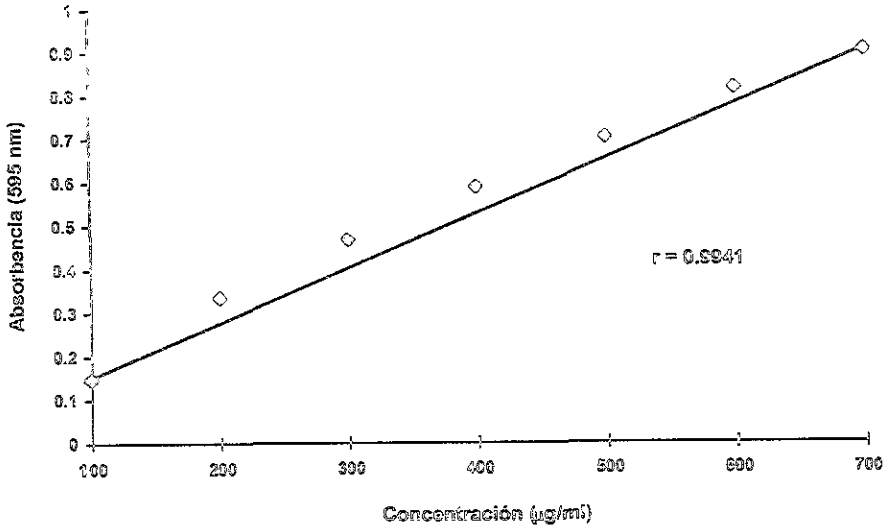
1. Pesar exactamente 10 mg de albúmina sérica bovina y añorar con S.S.F. a 10 ml. Esta solución contiene 1 mg/ml. Preparar diluciones de dicha solución como sigue y tomar solo 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución y agregar 5 ml de solución de Bradford. Leer absorbencia a 595 nm :

#### A) MACRO

| Tubo | Sol. 1 mg/ml | S.S.F. | Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Absorbencia 595 nm |
|------|--------------|--------|------------------------------------|--------------------|
| 1    | 0.1          | 0.9    | 100                                | 0.148              |
| 2    | 0.2          | 0.8    | 200                                | 0.336              |
| 3    | 0.3          | 0.7    | 300                                | 0.469              |
| 4    | 0.4          | 0.6    | 400                                | 0.590              |
| 5    | 0.5          | 0.5    | 500                                | 0.704              |
| 6    | 0.6          | 0.4    | 600                                | 0.817              |
| 7    | 0.7          | 0.3    | 700                                | 0.904              |
| 8    | 0.8          | 0.2    | 800                                | ND                 |
| 9    | 0.9          | 0.1    | 900                                | ND                 |
| 10   | 1.0          | 0      | 1000                               | ND                 |

ND = No determinado

### Curva Patrón de Proteína



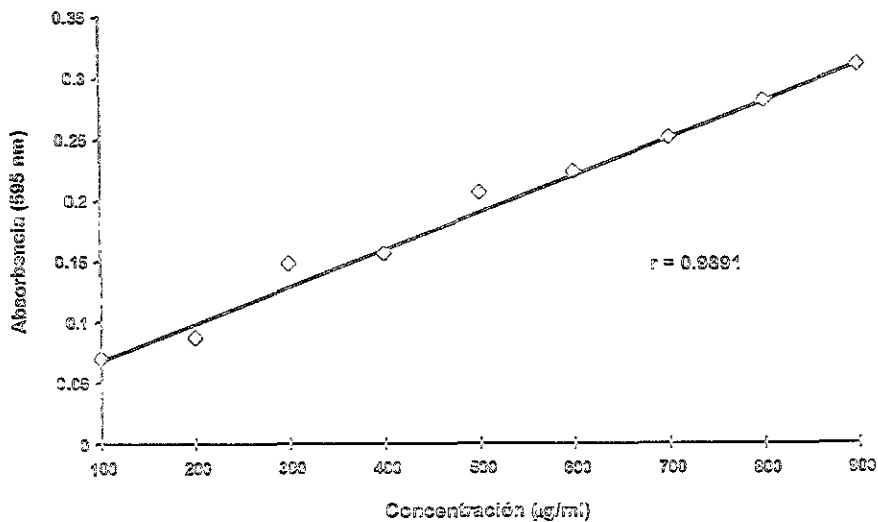
#### B) MICRO

1. De la solución que contiene 1 mg/ml tomar 1 ml y aforar a 10 ml con S.S.F. y con esta dilución preparar la siguiente serie. Tomar 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución y agregar 1 ml de solución de Bradford. Leer absorbencia a 595 nm:

| Tubo | Sol. 1 mg/ml | S.S.F. | Concentración (µg/ml) | Absorbencia 595 nm |
|------|--------------|--------|-----------------------|--------------------|
| 1    | 0.1          | 0.9    | 10                    | 0.070              |
| 2    | 0.2          | 0.8    | 20                    | 0.087              |
| 3    | 0.3          | 0.7    | 30                    | 0.148              |
| 4    | 0.4          | 0.6    | 40                    | 0.156              |
| 5    | 0.5          | 0.5    | 50                    | 0.206              |
| 6    | 0.6          | 0.4    | 60                    | 0.223              |
| 7    | 0.7          | 0.3    | 70                    | 0.251              |
| 8    | 0.8          | 0.2    | 80                    | 0.281              |
| 9    | 0.9          | 0.1    | 90                    | 0.310              |
| 10   | 1.0          | 0      | 100                   | ND                 |

ND = No determinado

Curva Patrón de Proteína



## SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

### ❖ Tris- HCl 1.5 M pH 8.8

Trisma base 18.15 g

Agua destilada 80 ml

Ajustar al pH 8.8 con HCl 1 N, aforar a 100 ml con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C.

### ❖ Tris- HCl 0.5 M pH 6.8

Trisma base 6 g

Agua destilada 60 ml

Ajustar al pH 6.8 con HCl 1 N, aforar a 100 ml con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C.

### ❖ Stock de SDS al 10 %

Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada y almacenar a 4°C.

### ❖ Acrilamida-bis-acrilamida

Acrilamida 29.2 g

Bis-Acrilamida 0.8 g

Agua destilada 100 ml

Filtrar y almacenar a 4°C.

### ❖ Persulfato de amonio al 10%

Se prepara el día que se va a utilizar, disolviendo 100 mg en un mililitro de agua desionizada.

## TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se ponen 20  $\mu$ l de solución digestora + 20  $\mu$ l de la solución problema.

Calentar a 95 °C por 1 minuto.

Nota: El mismo tratamiento se le da al marcador de PM.

### ❖ Solución digestora

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Agua destilada            | 4 ml   |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8     | 1 ml   |
| Glicerol                  | 0.8 ml   |
| SDS 10 %                  | 1.6 ml   |
| 2-b-mercaptoetanol        | 0.4 ml   |
| Azul de bromofenol 0,05 % | 0.2 ml   |
|                           | <hr/>  |
|                           | 8 ml $\longrightarrow$ Guardar a $-70^{\circ}\text{C}$ . |

### ❖ Amortiguador de corrida 5 X, pH 8.3

|             |      |
|-------------|------|
| Trisma base | 15 g |
| Glicina     | 72 g |
| SDS         | 5 g  |

Aforar a un litro con agua destilada y guardar a 4°C y a 37°C antes de su uso, sin que haya precipitación.

Diluir a 1 X de la siguiente manera:

60 ml de Stock 5 X en 240 ml de agua destilada

120 " " 480 ml "

180 " " 720 ml "

❖ GEL SEPARADOR Tris-HCl 0.375 M pH 8.8

|                           | 12%         | 15%         |
|---------------------------|-------------|-------------|
| Agua destilada            | 3.35 ml     | 2.5 ml      |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8     | 2.5 ml      | 2.5 ml      |
| SDS 10 %                  | 100 $\mu$ l | 100 $\mu$ l |
| Aciamida-bis-aciamida     | 4.2 ml      | 5 ml        |
| Persulfato de amonio 10 % | 50 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l  |
| TEMED                     | 20 $\mu$ l  | 20 $\mu$ l  |

Se agregan 3.7 ml para cada gel y luego una solución de isopropanol para emparejar los geles; se deja de 10 a 15 minutos hasta que gelifique. Posteriormente se retira el alcohol y se lava cuidadosamente la superficie del gel con agua destilada, luego se prepara el gel concentrador de la siguiente manera:

❖ GEL CONCENTRADOR Tris-HCl 0.125 M pH 6.8

|                           | 5 %         |
|---------------------------|-------------|
| Agua destilada            | 5.68 ml     |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8     | 2.5 ml      |
| SDS 10 %                  | 100 $\mu$ l |
| Aciamida-bis-aciamida     | 1.67 ml     |
| Persulfato de amonio 10 % | 50 $\mu$ l  |
| TEMED                     | 10 $\mu$ l  |

Se llenan los vidrios y se coloca el peine hasta que gelifique. Inmediatamente se pasan los vidrios a la caja de corriente y se llena con amortiguador de corrida 1X (sin provocar burbujas). Posteriormente se quitan los peines y se cargan las muestras una vez digeridas. Finalmente se tapa la caja con los electrodos correspondientes (rojo-rojo y negro-negro) y se aplica el siguiente voltaje: 150 V ctes./ 2 h.



## TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

### Solución Stock del colorante

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Azul de Coomassie | 2 g    |
| Agua desionizada  | 200 ml |

1. Colorante de trabajo para tinción de proteínas. Coomassie al 0.125 % en metanol:ácido acético:agua

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Sol. Stock            | 62.5 ml |
| Metanol absoluto      | 250 ml  |
| Acido acético glacial | 50 ml   |
| Agua desionizada      | 137 ml  |

Se filtra en papel Whatman No. 1 y se almacena en frasco color ámbar a temperatura ambiente. Una vez preparada esta solución se deposita una pequeña cantidad en un recipiente de vidrio hasta que cubra el gel y se mantiene en constante agitación por 30 minutos.

2. Solución desteñidora I

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Metanol               | 250 ml |
| Acido acético glacial | 50 ml  |
| Agua desionizada      | 200 ml |

Se deshecha la solución de trabajo y en el mismo recipiente de vidrio se agrega esta solución nuevamente hasta cubrir el gel, nuevamente se mantiene en agitación y se cambia cada 20 minutos dependiendo de la intensidad de color de la solución, por 1 hora.

### 3. Solución desteñidora II

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Metanol               | 25 ml  |
| Acido acético glacial | 35 ml  |
| Agua desionizada      | 440 ml |

Tirar la solución desteñidora I y agregar la solución II, cambiarla cada 20 minutos hasta la aparición de las bandas proteicas.

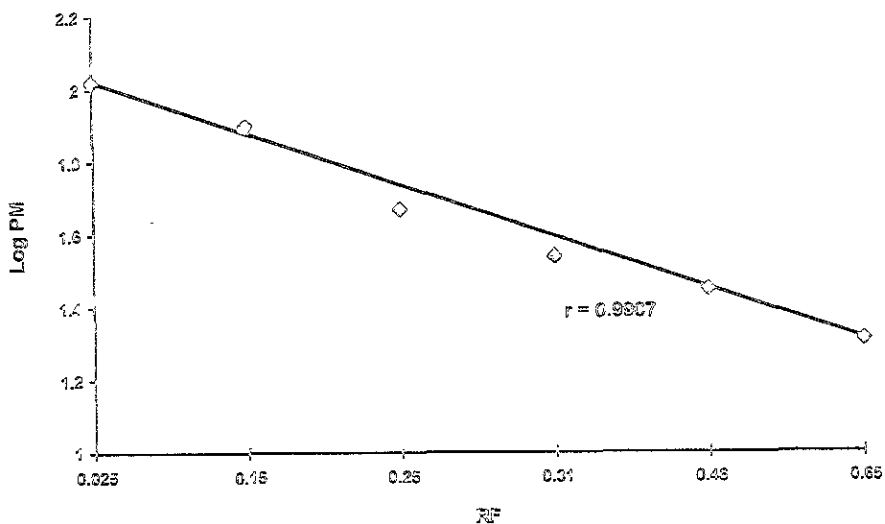
Una vez identificadas las proteínas, se pasa el gel a agua destilada, para posteriormente secarlo o almacenarlo a 4°C.

### Marcador de PM (Estándar preteñido para PAGE-SDS, Bio-rad)

| Proteína                      | PM (Kd) |
|-------------------------------|---------|
| Fosforilasa B                 | 106     |
| Albumina sérica bovina        | 81      |
| Ovoalbumina                   | 47.5    |
| Anhidrasa carbónica           | 35.3    |
| Inhibidor de tripsina de soya | 28.2    |
| Lisozima                      | 20.8    |

| PM   | Log PM | RF    | Distancia<br>(cm) |
|------|--------|-------|-------------------|
| 106  | 2.02   | 0.025 | 0.15              |
| 81   | 1.90   | 0.15  | 0.9               |
| 47.5 | 1.67   | 0.25  | 1.5               |
| 35.3 | 1.54   | 0.31  | 1.9               |
| 28.2 | 1.45   | 0.46  | 2.8               |
| 20.8 | 1.31   | 0.65  | 3.9               |

Curva Patrón de PM



## TINCIÓN CON PLATA

1. Fijar el gel en metanol:ácido acético:agua (250:50:200 ml), toda la noche.
2. Lavar 15 minutos con agua destilada 500 ml aproximadamente, 3 veces.
3. Preparar la mezcla de tinción:
  - 56 ml de NaOH 0.1 M
  - 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$
  - 2 g de  $\text{AgNO}_3$  disueltos en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada,  
adicionados gota a gota
  - 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizadaDejar 10 minutos con agitación vigorosa.
4. Cuatro lavados de 1 minuto con agua destilada.
5. Revelar con 50 mg de ácido cítrico disueltos en 200 ml de agua más 1 ml de formaldehído y aforar a 1000 ml. Pasar de 250 a 500 ml al cristalizador y agitar hasta la aparición de las bandas proteicas (10 a 15 minutos aproximadamente)
6. Tirar la solución y parar la reacción con 10 ml de isopropanol al 25 % en ácido acético al 7 % más 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, agitar por una hora y cambiar a agua destilada para almacenar a  $4^\circ\text{C}$  o secar el gel.

Marcador de PM (Estándar para PAGE-SDS, Sigma)

| Proteína                                 | PM (Kd) |
|--|---------|
| Miosina-músculo de conejo                | 205     |
| $\beta$ -Galactosidasa-E. coli           | 116     |
| Fosforilasa B-músculo de Conejo          | 97.4    |
| Albúmina sérica bovina                   | 66      |
| Ovoalbúmina-huevo de gallina             | 45      |
| Anhidrasa carbónica-eritrocito de bovino | 29      |

| PM   | Log PM | RF    | Distancia (cm) |
|------|--------|-------|----------------|
| 205  | 2.31   | 0.024 | 0.15           |
| 116  | 2.06   | 0.24  | 1.5            |
| 97.4 | 1.98   | 0.35  | 2.15           |
| 66   | 1.81   | 0.42  | 2.6            |
| 45   | 1.65   | 0.56  | 3.4            |
| 29   | 1.46   | 0.77  | 4.7            |

## MATERIAL PARA LOS BIOENSAYOS

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Formulación del Agar Mueller Hinton:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| infusión de carne   | 5.0 g  |
| Caseína hidrolizada | 17.5 g |
| Almidón             | 1.5 g  |
| Agar-agar           | 12.5 g |

Pesar 36.5 g de la mezcla y aforar a un litro con agua destilada, dar una precocción y ajustar el pH a  $7.4 \pm 0.2$ , posteriormente colocar el matraz en la autoclave y esterilizar a  $115^{\circ}\text{C}$ , 15 lb de presión por 10 minutos (según instrucciones del fabricante); una vez tibio el medio, vaciar 25 ml aproximadamente a cada una de las cajas de Petri, previamente estériles. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h para pasar prueba de esterilidad.

#### Formulación del Caldo Mueller Hinton:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| infusión de carne   | 5.0 g  |
| Caseína hidrolizada | 17.5 g |
| Almidón             | 1.5 g  |

Pesar 16 g de la mezcla y aforar a un litro con agua destilada, ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.1$ , y hacer alícuotas de 150 ml a matraces de 250 ml.

Posteriormente colócalos en la autoclave y esterilizar a 121°C, 15 lb de presión por 10 minutos (según instrucciones del fabricante). Transcurrido el tiempo incubar a 37°C por 24 h para pasar prueba de esterilidad. Una vez fríos los matraces, se podrán almacenar a 4°C hasta por un año.

#### Controles de crecimiento microbiano

**Positivo:** Caido Mueller-Hinton

Amortiguador utilizado en la columna, membrana, etc.

Bacteria

**Negativo:** Caido Mueller-Hinton

Amortiguador utilizado en la columna, membrana, etc.

Bacteria

Cloranfenicol

Concentración del cloranfenicol:  $5 \mu\text{l} = 12.5 \mu\text{g}$  (MIC para *E. coli*)

## PRUEBAS DE ESTERILIDAD PARA EL MATERIAL BIOLÓGICO

Cada una de las muestras, por su naturaleza profética se esterilizan por filtración con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ . Como ya se mencionó en la metodología, una vez separadas en alícuotas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , antes de utilizarse, se pasan por una prueba de esterilidad de la siguiente manera:

1. Tomar 50  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras (extracción, fracciones 16, 25 y 54 PM y fracción 29 PM) y colocarlas en cajas de Petri con agar nutritivo por separado. En otra caja por separado, en lugar de depositar los 50  $\mu\text{l}$ , tomar tres asadas de cada una de las muestras.
2. Incubar por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , teniendo el cuidado de no mover ni voltear las cajas.
3. Observar crecimiento de mos y nuevamente incubar por 24 horas más.
4. Transcurrido dicho lapso, nuevamente observar y si no hay crecimiento quiere decir que las muestras están en condiciones de ser trabajadas, si lo hay, el frasco debe ser desechado y tomar una alícuota nueva.



## METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTI-RIBOSÓMICA

### EXTRACCIÓN DE RNA (Técnica con Tripure)

1. Lavar  $1 \times 10^7$  células bacterianas o  $5-10 \times 10^6$  células animales con 1 ml de PBS, dos veces.
2. Una vez obtenida la pastilla, agregar 1 ml de Tripure y resuspender varias veces con ayuda de una jeringa de insulina.
3. Dejar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos.
4. Agregar 0.2 ml de cloroformo, agitar vigorosamente (vortex) por 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Microcentrifugar a 12,000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.  
  
(Se obtiene una fase de color roja (fenol:cloroformo-DNA:Proteínas), una interfase de color blanco y una fase superior incolora (acuosa-RNA), que comprende aproximadamente el 60 % del volumen de tripure inicial).
6. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 500  $\mu$ l de alcohol isopropílico frío e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Microcentrifugar el RNA a no más de 12,000 r.p.m., por 10 minutos a 4°C.
8. Tirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75 %.

9. Agitar fuertemente la muestra (vortex) por 30 segundos y centrifugar a 12,000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.
10. Secar la pastilla al aire (no secar con vacío en el SAWAC, pues el secado completo dificulta la resuspensión del RNA).
11. Disolver la pastilla en 20  $\mu$ l de Agua DEPC y calentar a 55-60°C por 10 minutos.
12. Cuantificar en el espectrofotómetro a  $\lambda$  de 260 y 280 nm.
13. Congelar las muestras a -70°C o -20°C, dependiendo del periodo en el que se vaya a utilizar.

#### **Método de eliminación del RNAi**

1. Una vez obtenido el RNAi, por el método antes mencionado, agregar 1V/3V Acetato de Sodio 4 M y congelar a -70°C de 2 a 6 h.
2. Microcentrifugar el RNA a no más de 12,000 r.p.m., por 10 minutos a 4°C.
3. Lavar 2 veces con 500  $\mu$ l de etanol frío al 75%
4. Repetir los pasos 9 a 13 de la metodología anterior.

#### **ENSAYO DE ACTIVIDAD DE N-GLICOSIDASA**

1. Depositar 100  $\mu$ l de amortiguador Tris HCl 20 mM pH 7.8, KCl 50 mM, DTT 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM., en tubos de 1.5 ml para microcentrífuga.

2. Agregar 2  $\mu\text{l}$  de RNA en el caso de células MCF.7 y 3  $\mu\text{l}$  del RNA para *E. coli* por separado.
3. Adicionar 5  $\mu\text{l}$  de MAP, 20  $\mu\text{l}$  del extracto o 30  $\mu\text{l}$  del corio de <30, dependiendo de la prueba a realizar.
4. Incubar a 37°C por una hora con agitación suave.
5. Detener la reacción con 2  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5 mM pH 8.0 y 500  $\mu\text{l}$  de SDS 0.5% en Tris-HCl 50 mM y pH 7.6.
6. En el caso de las muestras tratadas con anilina agregar 700  $\mu\text{l}$  e incubar 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
7. Parar la reacción con 200  $\mu\text{l}$  de agua DEPC y pasar las muestras a 2 viales para extraerlas con éter dos veces.
8. Precipitar todas las muestras con isopropanol v/v a -70°C/2 h.
9. Centrifugar las muestras a 12000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.
10. Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1 ml de etanol al 75%.
11. Centrifugar nuevamente a 12000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.
12. Tirar el sobrenadante y secar la pastilla al aire.
13. Disolver la pastilla en 1-3  $\mu\text{l}$  de Agua DEPC.
14. Preparar las muestras para cargar el gel.

## GEL PARA RNA

Gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturizantes

1. Pesar 0.6 g de agarosa ultrapura
2. Agregar 22 ml de agua DEPC y 3 ml de MOPS 10X.
3. Disolver a 75°C.
4. Agregar 5 ml de formaldehído, una vez que la solución está a 37°C.
5. Agitar y verter en la base previamente lavada con agua DEPC, en la campana de extracción y poner los peines para colocar las muestras.

### Preparación de la Muestra

1. Agregar las siguientes soluciones, cuidando el mismo orden en un tubo para microcentrífuga:

| Solución          | Cantidad en $\mu$ l |
|-------------------|---------------------|
| Formamida         | 4                   |
| Formaldehído      | 1.5                 |
| MOPS 10X          | 0.5                 |
| Buffer de muestra | 1.5                 |
| Bromuro de Etidio | 1                   |
| RNA               | 1 a 3               |

2. Bajar la muestra con una ligera agitación en vortex
3. Centrifugar a 1 toque
4. Calentar a 55-60°C por 10 minutos.
5. Enfriar rápido y centrifugar nuevamente a 1 toque.
6. Cargar el gel con 10 µl de la muestra o menos.

NOTA: La carga de las muestras se hace una vez que la base es pasada a la cámara de geles submarinos y una vez que se le agrega el amortiguador de corrida MOPS 1X.

Pasado este proceso se conectan los electrodos rojo-rojo (+) y negro-negro (-) y se corren las muestras a un voltaje de 50 V a 4°C por 5 horas.

### *Preparación de soluciones*

#### **AGUA DEPC**

Para 1000 ml de agua ultrapura se agregan 2 ml de DEPC y se deja agitando toda la noche. Posteriormente se esteriliza a 121 °C a 15 lb de presión por 15 minutos, una vez enfriada se puede utilizar.

#### **MOPS 10X**

1. Pesar 23.13 g de MOPS y depositarlos en un vaso con 400 ml de agua

#### **DEPC**

2. Ajustar a pH 7.0 con NaOH o ACOOH

3. Agregar 8.3 ml de  $\text{ACOO.Na}$  3 M y posteriormente 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0.
4. Aforar a 500 ml con agua DEPC.
5. Esterilizar por filtración y guardar en un recipiente color ambar.

#### COMPOSICIÓN DEL BUFFER DE MUESTRA

| Compuesto                      | Cantidad en $\mu\text{l}$ |
|--------------------------------|---------------------------|
| Formamida desionizada          | 750                       |
| MOPS-EDTA 10X                  | 150                       |
| Formaldehído                   | 240                       |
| Agua DEPC                      | 100                       |
| Glicerol                       | 100                       |
| Azul de bromofenol-Xilencianol | 80                        |

#### *Marcador de PM para RNA (Boehringer Mannheim)*

|         |
|---------|
| 6948 pb |
| 6742    |
| 2661    |
| 1821    |
| 1517    |
| 1049    |
| 575     |
| 438     |
| 310     |

## PRUEBA CONFIRMATIVA

### ISOELECTROENFOQUE

1. Preparar la solución del ánodo NaOH 0.1 M y del cátodo MES 0.25 M e ir remojando las membranas por lo menos 2 horas.
2. Preparar la solución de rotolitos, para crear un gradiente de pH, de la siguiente manera:

Sol. A ( $\epsilon$ -amino-n-ácido caprónico) 80%                      24 ml

Sol. B (Trisma base) 20 %    6 ml

3. Conectar el aparato (Rotofor, Bio-rad) y aplicar una corriente de 15 Watts, para ir formando el gradiente.  
NOTA: Se deberá ir anotando las lecturas del voltaje hasta que se estabilicen.
4. Inyectar 50  $\mu$ l de la muestra, que previamente es resuspendida en la solución de rotolitos.
5. Aplicar la misma corriente por 2 horas a temperatura ambiente.
6. Transcurrido el tiempo coleccionar el gradiente en 20 tubos previamente lavados y desengrasados.
7. Medir el pH a cada una de las muestras.
8. Posteriormente agregarles v/v isopropanol y precipitar por 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
9. Centrifugar a 14,000 r.p.m. y tirar el sobrenadante.

10. Resuspender la o las pastillas obtenidas en 10  $\mu$ l de agua destilada y tratarlas con solución digestora, para posteriormente cargarlas a un gel de PAGE-SDS al 15%.