



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**Departamento de Biología Animal,
Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola.**

Área de Parasitología

MÁSTER EN ENFERMEDADES TROPICALES

Proteómica en Enfermedades Tropicales

Código 302731 (3 créditos ECTS)



Objetivos

Capacitar a futuros profesionales e investigadores relacionados con el campo de Ciencias de la Salud con las herramientas y habilidades necesarias y suficientes para poner en práctica técnicas proteo-inmunológicas que sean resolutivas en el estudio de parásitos en un laboratorio.

Objetivos específicos

- Conocer algunas de las herramientas necesarias para el estudio proteico e inmunológico de parásitos causantes de enfermedades tropicales.
- Adquirir las habilidades necesarias por parte del alumno para el manejo de dichas técnicas en investigación básica y/o aplicada, búsqueda y mejoras de técnicas para el diagnóstico, etc.



Definiciones

Inmunología

Ciencia que estudia todos los mecanismos fisiológicos de defensa de la integridad biológica del organismo. Dichos mecanismos consisten esencialmente en la identificación de lo extraño y su destrucción. La inmunología también estudia los factores inespecíficos que coadyuvan a los anteriores en sus efectos finales.

Proteómica

Es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas.



Parasitología

- Actualmente, las técnicas inmunológicas y de proteómica que se emplean en el laboratorio para el estudio de enfermedades parasitarias son de vital importancia.
- La mayoría de ellas se emplean para estudiar las relaciones entre el parásito y el hospedador como, por ejemplo, los mecanismos de evasión por parte del parásito, la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador, y en su caso, el estudio de posibles moléculas que pueden llegar a inhibir el desarrollo del parásito, su diagnóstico, su modulación, su control, ser moléculas diana, etc...



Técnicas, metodologías y búsquedas

- 1. Obtención de antígenos somáticos.**
- 2. *Enzyme Linked Immunoasorbent Assay* (ELISA).**
- 3. Electroforesis monodimensional SDS-PAGE.**
- 4. Western Blot.**
- 5. Electroforesis bidimensional.**
- 6. Identificación y búsqueda de proteínas en bases de datos.**

1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS

- Los vermes adultos de *D. immitis* se maceran en un mortero en PBS estéril y se añaden inhibidores de proteasas.
- El macerado se sonica con 3 ciclos de 70 Khz durante 30 segundos a intervalos de 1 minuto, en hielo.
- Centrifugar a 10.000 xg durante 30 minutos a 4°C.
- El sobrenadante se almacena en eppendorfs estériles a -80°C.
- Se mide la concentración de proteínas con el kit comercial BCA (Pierce).





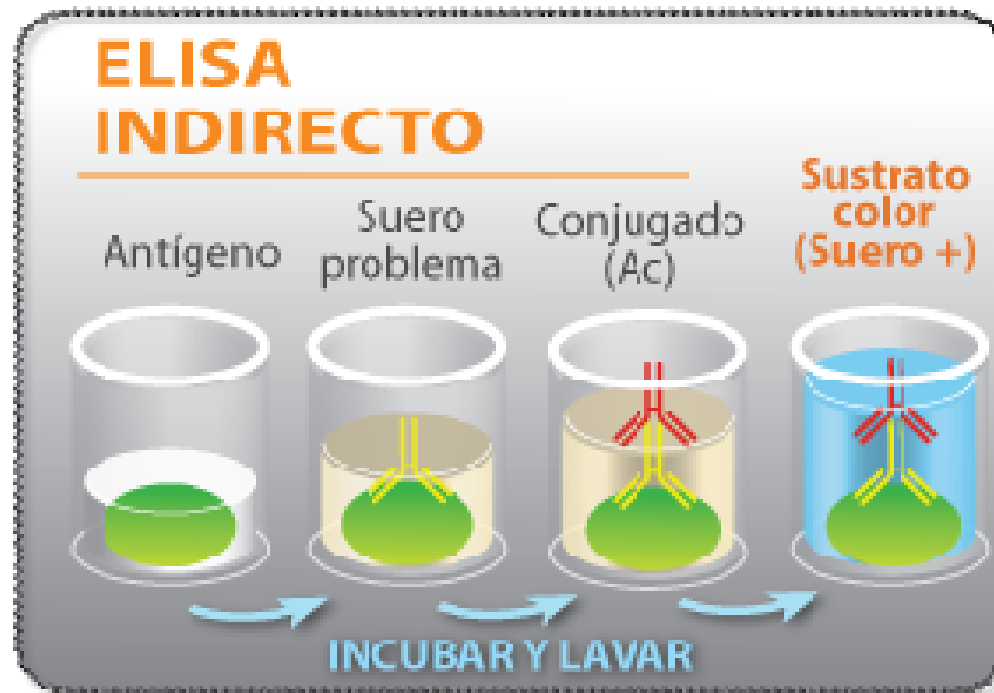
2. ELISA

Tipos de ELISA

- La técnica de ELISA se emplea de forma rutinaria en Parasitología. Con ella se pueden llegar a detectar Acs generados por los hospedadores (**ELISA INDIRECTO**) y Ags producidos por los parásitos (**ELISA DIRECTO**) en sangre, suero, orina y plasma.
- Se emplean Acs marcados normalmente con *peroxidasas* para detectar o, en su caso, visualizar la reacción Ag-Ac.



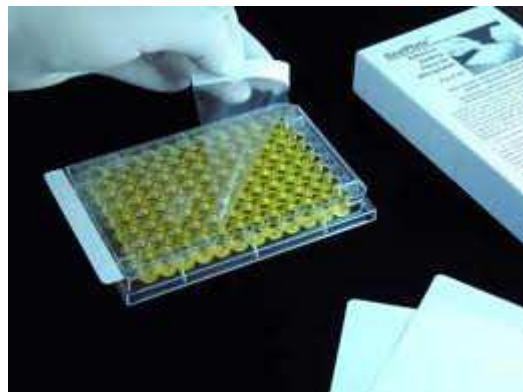
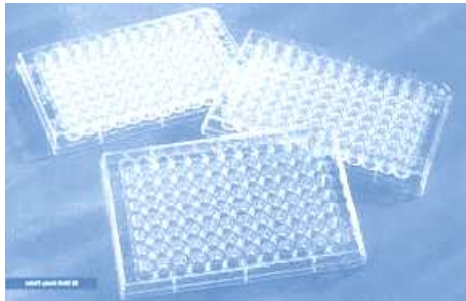
2.1. ELISA INDIRECTO



2.1. ELISA INDIRECTO

PRUEBA

**Diagnóstico en gatos
de la dirofilariosis
cardiopulmonar felina.**



Tapizado	0,8 µg
Lavado	Sol. lavadora/200 µl
Postapizado	BSA 5%/200 µl
Lavado	Sol. lavadora/200 µl
Sueros	1:100/100 µl
Lavado	Sol. lavadora/200 µl
Ig-Perox.	IgG_T 1:16000
Lavado	Sol. lavadora/200 µl
Sustrato	Tampón OPD/100 µl
Detención	H₂SO₄ 3N/100 µl



2.1. ELISA INDIRECTO

-La coloración de la reacción Ag-Ac se mide en un lector de ELISA (Bio-Rad) en unidades de D.O.

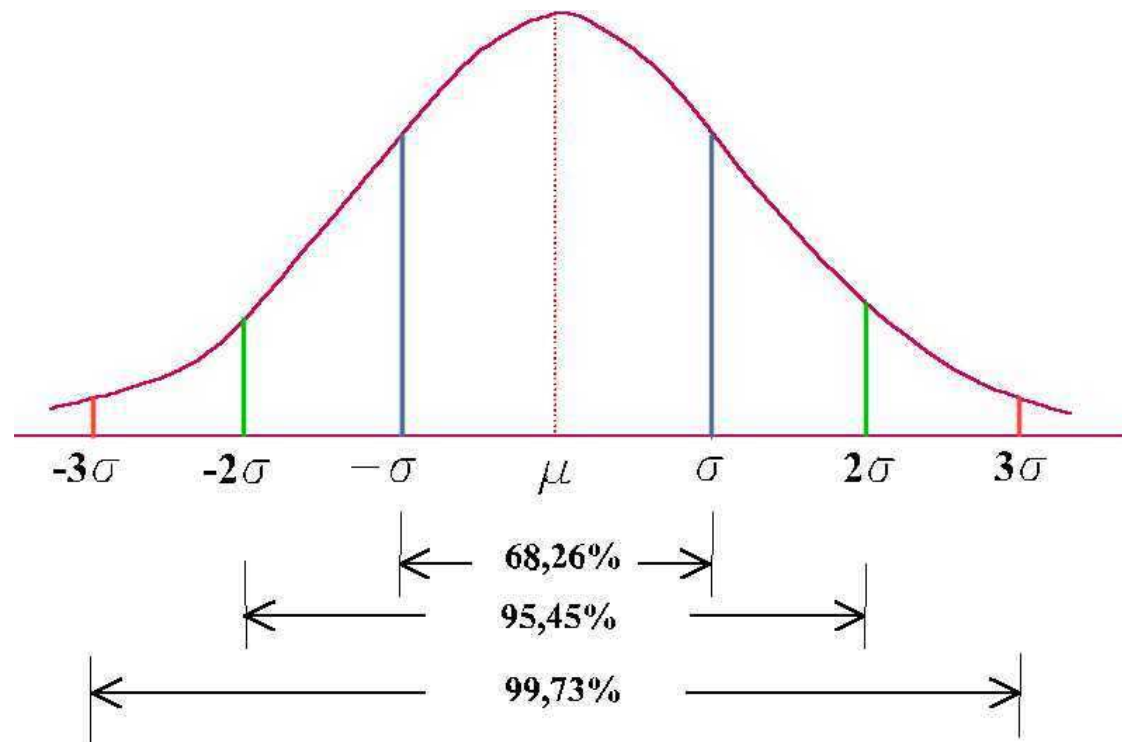


- Las muestras cuya D.O. es superior a 0,7 son positivos y los que no negativos.



2.1. ELISA INDIRECTO

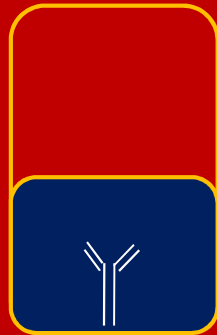
- El punto de corte (cut-off) para discriminar entre muestras positivas y negativas se calcula como la media (D.O.) de las muestras negativas de una zona no endémica ± 3 su desviación estándar.



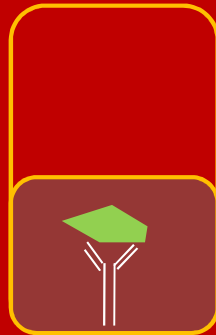


2.2. ELISA DIRECTO

MUESTRA POSITIVA



Ac



Ac-Ag
(Muestra)



Ac marcado
con enzima



Sustrato
color

2.2. ELISA DIRECTO

PRUEBA: Diagnóstico en perros de la dirofilariosis cardiopulmonar canina.

- Muestras de sangre de perros con anticoagulantes.
- Kit comercial Canine Heartworm Antigen Test Kit, Petchek® HTWM PF, de los laboratorios IDEXX Inc., MA, USA.



IDEXX
LABORATORIES

2.2. ELISA DIRECTO

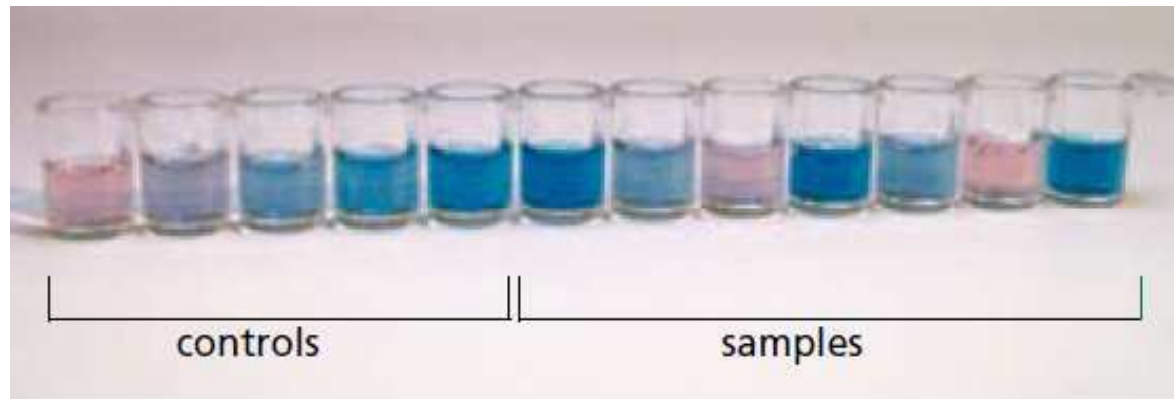
¿Cómo realizar una prueba?

- En cada pocillo se incuban 100 μ l de sangre durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se retira el fluido y se añaden 2 gotas del conjugado HRPO Anti-Heartworm.
- Una vez retirado el fluido, los pocillos se lavan 5 veces con una solución de tampón lavador.
- Descartado el tampón lavador y secos los pocillos, se añade 1 gota de TMB (solución sustrato) a cada uno de ellos. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.



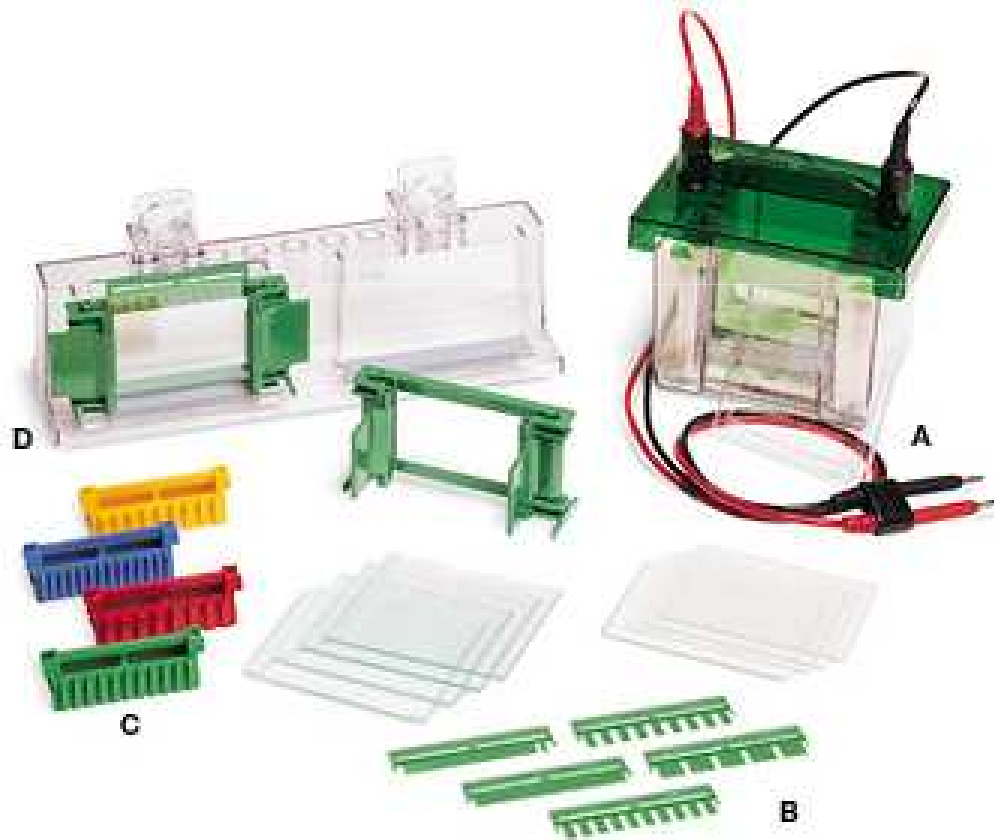
2.2. ELISA DIRECTO

- Finalmente se añade 1 gota de solución STOP por pocillo y tras incubar 15 minutos a temperatura ambiente, se leen visualmente los resultados, comparándolos con los controles.
- El control negativo debe permanecer sin coloración, mientras que el positivo se tiñe de un fuerte color azul. La aparición de coloración (superior a la del control negativo) en los pocillos problema, se considera como resultado positivo.



3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

PRUEBA: Separar proteínas de *D. immitis* por su peso molecular en geles de poliacrilamida al 12%, 1 mm de grosor.



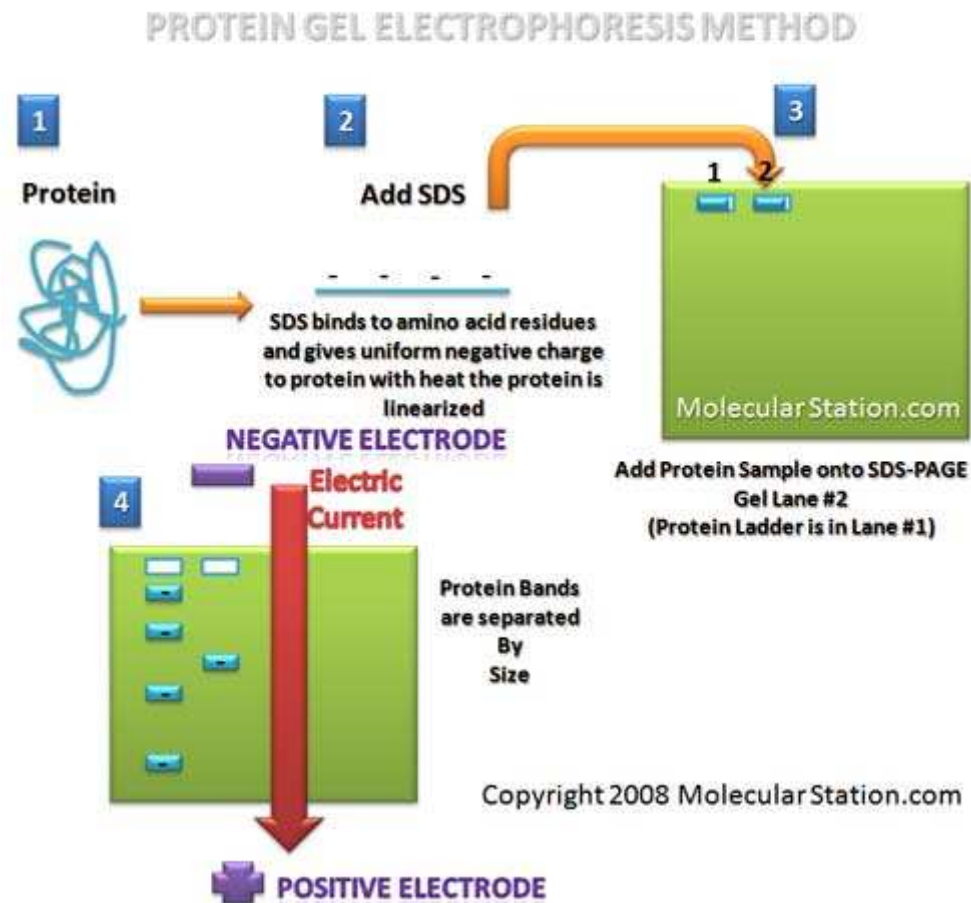
BIO-RAD



Equipo Mini-PROTEAN de Bio-Rad.

3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

PRUEBA: Separar proteínas de *D. immitis* por su peso molecular en geles de poliacrilamida al 12%, 1 mm de grosor.



3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

Preparación de geles

- Preparar el Running Gel.

1. Preparar el gel de electroforesis al porcentaje del 12%. Mezclar agua + acrilamida 30% + bisacrilamida 0,8% + Tris 1,5M pH 8,8 + APS 10% + TEMED (agentes polimerizantes).
2. Se añaden entre los cristales y se echa isobutanol con una pipeta para evitar el contacto de la solución con el oxígeno ya que éste impide la polimerización. Polimeriza en ± 30 minutos.
3. Quitar el isobutanol volcando ligeramente el montaje.

3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

Preparación de geles

- Preparar el Stacking Gel.

1. Poner el peine entre los cristales y añadir el gel de carga con una punta de pipeta teniendo mucho cuidado con que no queden burbujas.



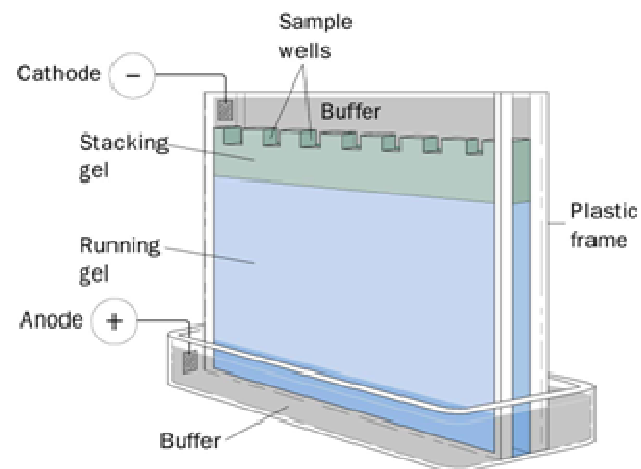
3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

Montaje de la cubeta

1. Poner los geles de acrilamida en la cubeta de electroforesis (Mini Protean III), añadir el tampón de electroforesis 1X y quitar los peines.

Funcionamiento

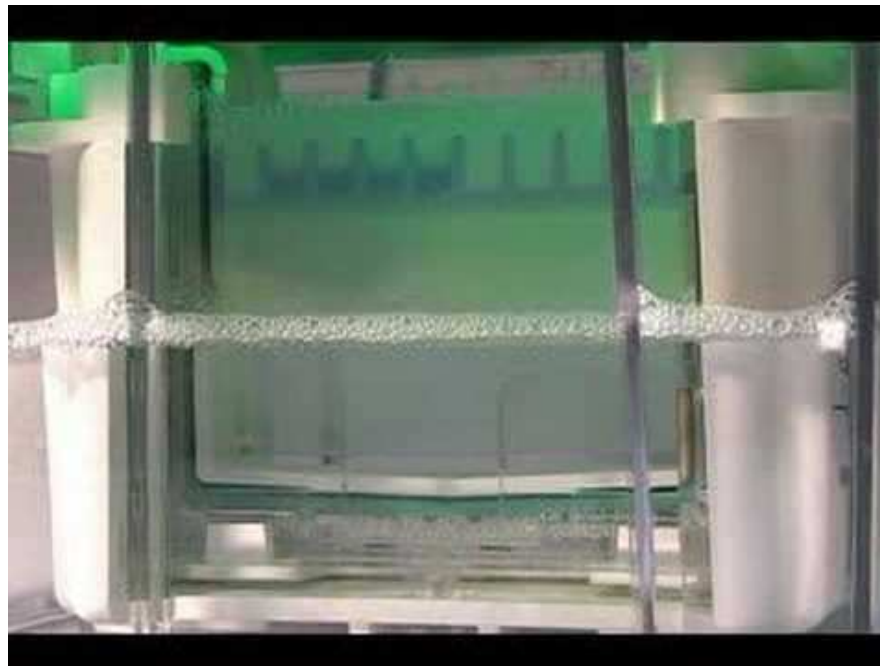
1. Cargar en los pocillos y añadir el volumen de muestra adecuado incluyendo un marcador de peso molecular dependiendo del peso molecular de la proteína.





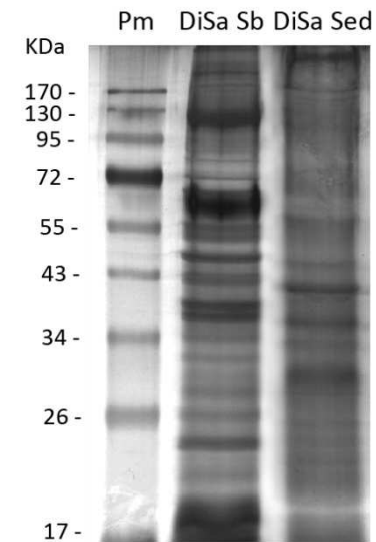
3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

2. Poner la tapa con los cables de forma que coincidan los colores y conectarlos a una fuente de alimentación. El tiempo que dura la electroforesis depende del peso molecular de la proteína, el porcentaje del gel y el voltaje (**80-120V por gel**).
3. La electroforesis se para cuando el frente del gel llega hasta el borde del gel.

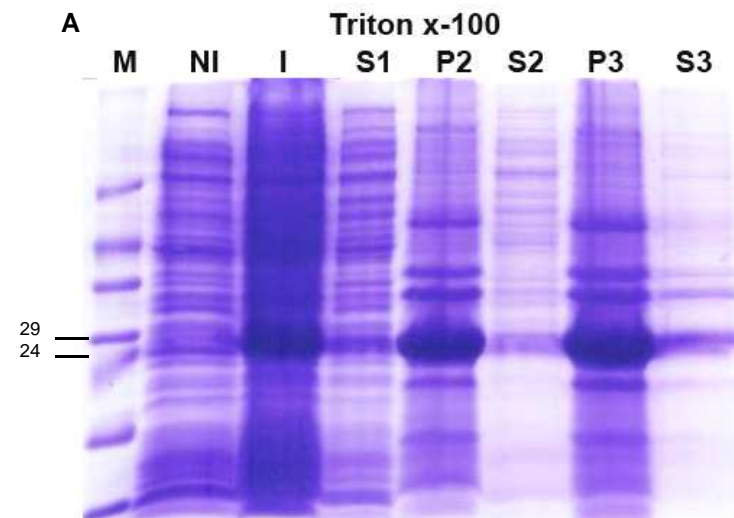


3. ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

4. Se puede teñir el gel con nitrato de plata



y/o Colorante de Commassie.



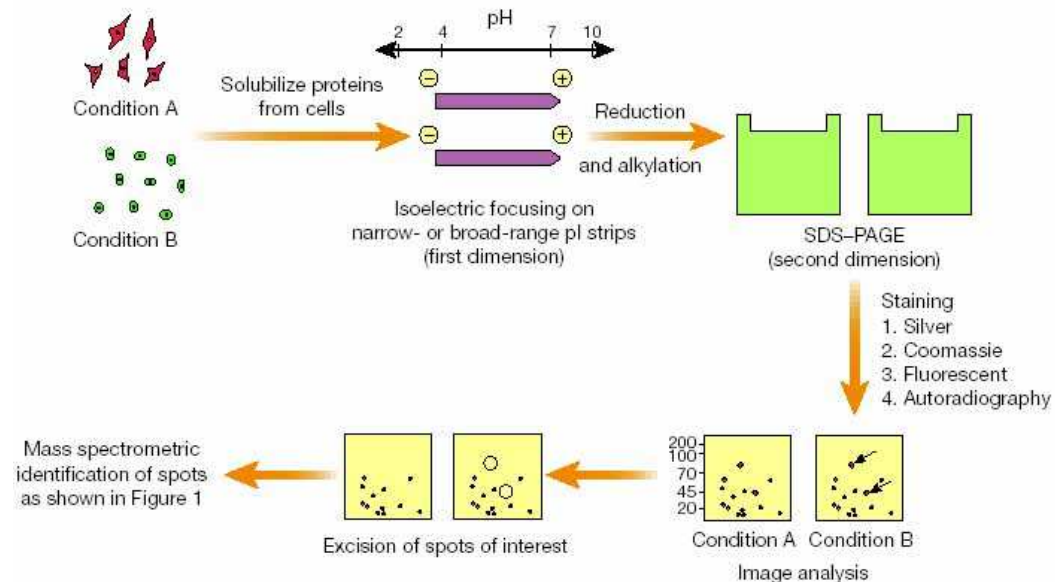
4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

- El **objetivo** es separar las proteínas mediante un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque) y por su peso molecular en gel de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE).
- El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es su pH cuando su carga neta es 0 no desplazándose cuando se le aplica un campo eléctrico.
- En un gel con un gradiente de pH, tanto los extremos N y C terminal como las cadenas laterales ionizables de las proteínas captan o liberan protones de acuerdo con el pH, de modo que la carga eléctrica global de las proteínas dependerá del pH del entorno.
- Cuando se aplica un campo eléctrico, todas las moléculas con carga neta positiva serán atraídas hacia el cátodo, y todas las moléculas con carga neta negativa hacia el ánodo. A medida que las moléculas de proteína se van acercando a su punto isoeléctrico irán perdiendo carga eléctrica o ganando cargas de signo contrario, hasta llegar al valor de pH en que la carga neta sea cero y las proteínas dejen de moverse y se *focalizan*.

4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

¿Qué significa focalizar un proteínas?

- Se dice que las proteínas están focalizadas, cuando una proteína, isoformas... se han concentrado en un solo punto del gradiente de pH, que corresponde a su pI.
- Los isoelectroenfoces se llevan a cabo a muy altos voltajes, de hasta 8000V en su fase terminal, y en condiciones fuertemente desnaturizantes (8M urea) con tal de obtener la máxima resolución y los resultados más limpios y reproducibles.



4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

PRUEBA: Separar proteínas de *D. immitis* por su peso molecular y mediante un gradiente de pH en geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE) al 12%, 1 mm de grosor.

1. El homogenado de antígeno se **ultracentrifuga** a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C, se **dializa** durante 24 horas frente a agua milli-Q. Este antígeno se denomina “fracción sobrenadante”. Se divide en alícuotas y se almacena a -80 °C hasta su utilización.

• Solubilización del extracto antigénico

1. Descongelar el extracto antigénico y poner de 1-500 µg de proteína en un volumen final de 100 µl en un *Eppendorf* de 1,5 mL. Utilizar el kit comercial **ReadyPrep 2-D Clean Up** (Bio-Rad) para precipitar las proteínas de la muestra.

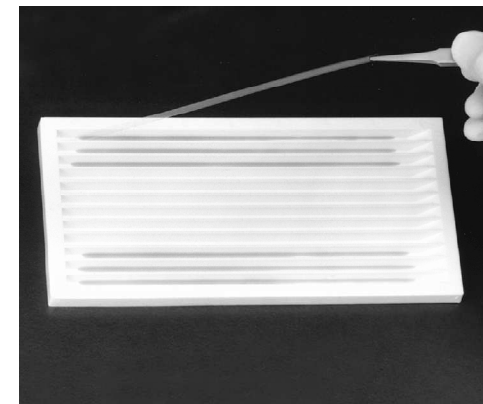
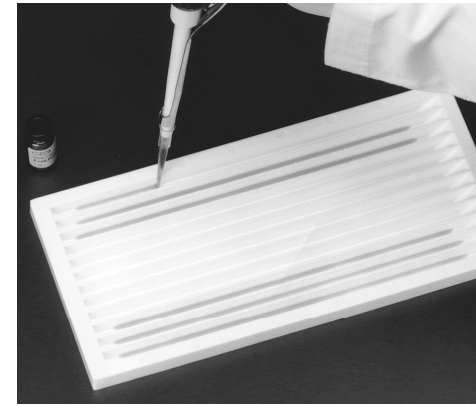
4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

2. El sedimento resultante se resuspende en un tampón de solubilización/rehidratación Urea 7M - Thiourea 2M.
3. Las muestras se dividen en alícuotas de 125 μ l de tampón de rehidratación, conteniendo cada una de ellas 40 μ g aproximadamente de proteína.
4. Finalmente se almacenan a -20°C hasta su utilización. Cuando se van a utilizar, se añade a la alícuota de 125 μ l de muestra DTT 5M y anfolitos del intervalo de pH 3-10 en proporción 1:100. Se **incuban** durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave.
5. El producto de la incubación se **centrifuga** durante 15 minutos a 16.000 xg a 4°C .

4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

• Rehidratación de las muestras en tiras IPG

1. Una vez solubilizadas, las proteínas (125 μ l) se aplican en tiras IPG de 7 cm de longitud (Bio-Rad) de intervalos de pH 3-10. En primer lugar, repartimos los 125 μ l de muestra en uno de los carriles de la bandeja de rehidratación.
2. A continuación, se retira la tira protectora de plástico de la tira y la ponemos con el gel boca abajo sobre la muestra.



4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

3. Se esperan unos 10 minutos, se cubren las tiras con 2 mL de aceite mineral y se introduce la bandeja en el aparato de IEF. Este se programa para que realice uno de los métodos de rehidratación (pasiva o activa):

- Rehidratación pasiva: método en el cual no se aplica un campo eléctrico durante el proceso. Se lleva a cabo en bandejas de rehidratación (Bio-Rad). El proceso se realiza durante 14-16 horas a 20°C en el equipo de isoelectroenfoco (IEF) *Protean IEF Cell* (Bio-Rad).

- Rehidratación activa: método en el cual se aplica un pequeño voltaje constante de 50 v durante el proceso. Se procede del mismo modo que en la rehidratación pasiva, pero se utiliza una bandeja de IEF (Bio-Rad).

4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

• Isoelectroenfoque (IEF)

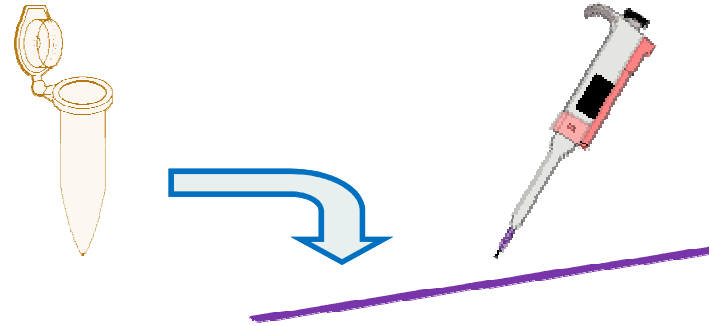
1. Se colocan las tiras IPG en bandejas de IEF para tiras de 7 cm dentro del equipo *Protean IEF Cell* con una temperatura constante de superficie de 20°C y un amperaje máximo de 50 μ A por tira IPG. Cubrir con unos 2 mL de aceite mineral, tapar la bandeja IEF y programar el aparato IEF para el intervalo de pH 3-10.

	Tiempo	Voltaje	Rampa
Step 1 (S1)	15 minutos	250 v	Rápida
Step 2 (S2)	2 horas	4.000 v	Rápida
Step 3 (S3)	16.000 v/hora	4.000 v	Rápida
Step 4 (S4)	99 horas	500 v	Rápida



4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

- **Equilibrado de las tiras IPG**



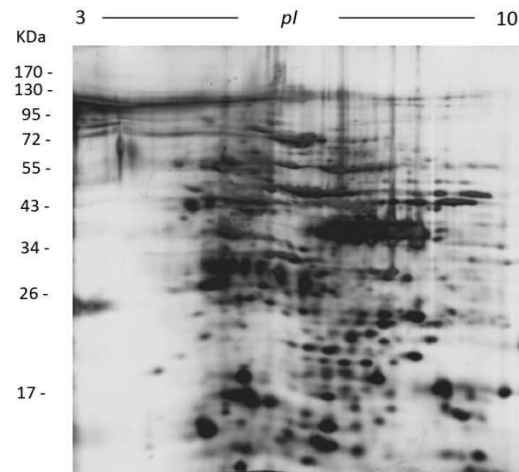
1. Sacar la tira de la bandeja IEF y colocarla en una bandeja de rehidratación.
2. Incubar la tira IPG con 2,5 ml de tampón de equilibrado más 0,05 g de ditioneitol (DTT) durante **15 minutos** en agitación suave.
3. Incubar la tira IPG con 2,5 ml de tampón de equilibrado más 0,0625 g de iodoacetamida durante **10 minutos** en agitación suave.

4. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

- Electroforesis de las tiras IPG o 2^a separación
- Tinción de plata y/o Colorante de Coomassie.

PDQuest (Bio-Rad Laboratories)

Tras la tinción del gel las proteínas aparecen formando manchas circulares (spots).

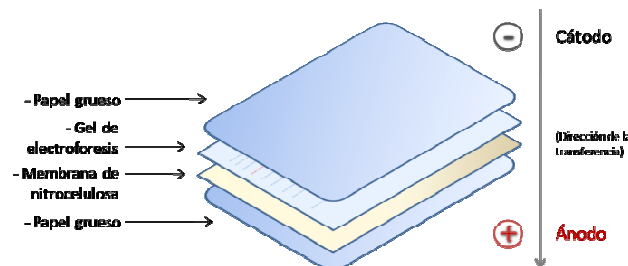




5. WESTERN BLOT

Transferencia semiseca

1. Preparar 100-200 ml de tampón de transferencia 1X 20% de metanol y ponerlo a 4°C.
2. Una vez finalizada la electroforesis, se corta la membrana NITROCELULOSA y se hace una pequeña muesca en una esquina para saber el orden de las muestras. Protegerlas de la luz.
3. Preparación del *Sandwich*:
 - ✓ Se humedece con el tampón papel grueso y el gel de electroforesis.
 - ✓ **Poner en orden:**
 - **Un papel grueso humedecido en tampón de transferencia.**
 - **La membrana de NITROCELULOSA** con pinzas.
 - **El gel de acrilamida sin burbujas** entre el gel y la membrana.
 - **Poner otro papel grueso humedecido en tampón de transferencia.**





5. WESTERN BLOT

4. Cerrar el aparato de electrotransferencia semiseca y conectar los electrodos a una fuente de alimentación.
5. Parámetros de la fuente de alimentación: **20 V (constantes)**, 30 min.
6. Una vez terminada la transferencia sacar la membrana y hacer un lavado rápido con tampón de lavado.
7. Se puede comprobar que todo ha salido bien tiñendo el gel con AgNO_3 y con Colorante de Coomassie.

Bloqueo

1. Bloquear las membranas durante **1 h a temperatura ambiente**. Las membranas se colocan en bandejas con 15 ml de volumen total de tampón de bloqueo. Es posible guardarlas a -20°C en papel albal.



5. WESTERN BLOT

Incubaciones con Ac

D.1. Anticuerpo primario

1. Finalizado el bloqueo se añade el suero de la muestra problema. El anticuerpo primario se diluye en el mismo tampón de bloqueo directamente. Mantener el suero en agitación durante **1:30 h a temperatura ambiente** tapado con papel albal.
2. Retirar la dilución del anticuerpo y hacer 3 lavados de 5 minutos con tampón de lavado dependiendo de la membrana empleada en agitación.

D.2. Anticuerpo Secundario

1. El anticuerpo secundario, al igual que el primario, puede ir disuelto en tampón de bloqueo. Dejarlo **1 hora en agitación a temperatura ambiente**.
2. Retirar la dilución del anticuerpo y hacer 3 lavados de 5 minutos con tampón de lavado.

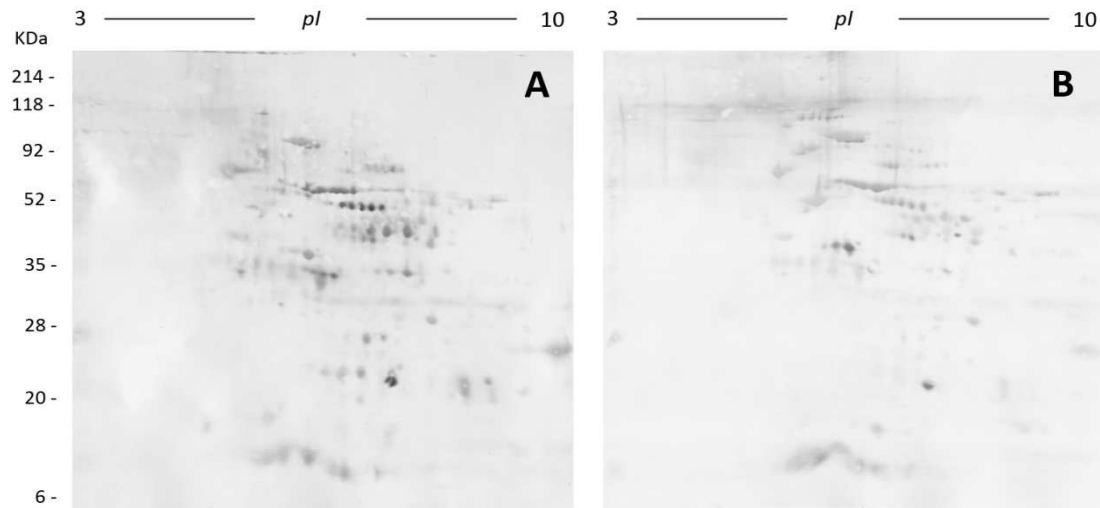


5. WESTERN BLOT

Revelado

1. Añadir el SISTRATO CON PEROXIDASA al momento:
2. A los 10-20 minutos se para la reacción con AGUA DESTILADA, se coloca la membrana en papel de filtro para que se seque y se escanea.

PDQuest (Bio-Rad Laboratories)





7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

UniProt - Windows Internet Explorer
http://www.uniprot.org/

Search in Query [Advanced Search »](#)

WELCOME

The mission of UniProt is to provide the scientific community with a comprehensive, high-quality and freely accessible resource of protein sequence and functional information.

What we provide

UniProtKB	Protein knowledgebase, consists of two sections: <ul style="list-style-type: none">★ Swiss-Prot, which is manually annotated and reviewed.★ TrEMBL, which is automatically annotated and is not reviewed. Includes Complete Proteome Sets .
UniRef	Sequence clusters, used to speed up sequence similarity searches.
UniParc	Sequence archive, used to keep track of sequences and their identifiers.
Supporting data	Literature citations , taxonomy , keywords and more .

Getting started

- [Text search](#)
- [Sequence similarity searches \(BLAST\)](#)
- [Sequence alignments](#)
- [Batch retrieval](#)
- [Database identifier mapping \(ID Mapping\)](#)

NEWS

UniProt release 2011_01 - Jan 11, 2011
10K UniProtKB/Swiss-Prot Arabidopsis thaliana entries · [Cross-references to Allergome](#)

- › [Statistics for UniProtKB: Swiss-Prot · TrEMBL](#)
- › [Forthcoming changes](#)
- › [News archives](#)

SITE TOUR

Learn how to make best use of the tools and data on this site.

PROTEIN SPOTLIGHT

the twisted way of things
January 2011

Imagine reading these words and not being able to pronounce them. Or reading them and not being able to grasp their meaning. These are just two of the drawbacks that many children and adults suffer from...



7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Dirofilaria immitis in UniProtKB - Windows Internet Explorer

http://www.uniprot.org/uniprot/?query=Dirofilaria+immitis&sort=score

Google uniprot

UniProtKB

Search Blast Align Retrieve ID Mapping *

Search in **Query**

Protein Knowledgebase (UniProtKB) Dirofilaria immitis Search Clear Advanced Search »

1 - 25 of 153 results for **Dirofilaria** AND **immitis** in UniProtKB sorted by **score** descending

Browse by taxonomy, keyword, gene ontology, enzyme class or pathway | Reduce sequence redundancy to 100%, 90% or 50% | Download

Page 1 of 7 | Next »

Results [Customize](#)

Show only reviewed (9) (UniProtKB/Swiss-Prot) or unreviewed (144) (UniProtKB/TrEMBL) entries

Quote terms: "dirofilaria immitis"

Restrict term "dirofilaria" to organism (132), taxonomy (132)

Restrict term "immitis" to organism (131), taxonomy (131)

Accession	Entry name	Status	Protein names	Gene names	Organism	Length
P13392	MYSF_DIRIM	★	Paramyosin		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	848
Q9U518	ASPG_DIRIM	★	L-asparaginase		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	590
P52033	GPXC_DIRIM	★	Glutathione peroxidase		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	221
Q27384	API_DIRIM	★	Pepsin inhibitor DIT33	DIT33	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	234
P46426	GSTP_DIRIM	★	Glutathione S-transferase		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	208
O17433	1CPX_DIRIM	★	1-Cys peroxiredoxin		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	235
P41974	SODE_DIRIM	★	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	195
A8KQP1	A8KQP1_9RICK	★	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomera...	dxr	Wolbachia endosymbiont of Dirofilaria immitis	390
Q70GM5	Q70GM5_DIRIM	★	Glutamate-gated chloride channel alpha3A subu...	avr-14	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	419
O61357	O61357_DIRIM	★	Beta-tubulin	tub	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	448
Q70GM4	Q70GM4_DIRIM	★	Glutamate-gated chloride channel alpha3B subu...	avr-14	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	427
D3IN7	D3IN7_DIRIM	★	Ecdysone receptor isoform A	EcR	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	672
Q8ST32	Q8ST32_DIRIM	★	Nuclear receptor RXR	RXR	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	474
D3IN8	D3IN8_DIRIM	★	Ecdysone receptor isoform B	EcR	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	662
O97372	O97372_DIRIM	★	Calreticulin		Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	387
Q70UR8	Q70UR8_DIRIM	★	Cytochrome c oxidase subunit 2	coii	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	232
Q70US3	Q70US3_DIRIM	★	Cytochrome b	cytb	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	360
Q967S1	Q967S1_DIRIM	★	Nuclear receptor nhr-7C	nhr-7	Dirofilaria immitis (Canine heartworm)	463

Listo Internet | Modo protegido: activado 100%

ES 12:56 07/02/2011



7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Beta-tubulin - Dirofilaria immitis (Canine heartworm) - Windows Internet Explorer

http://www.uniprot.org/uniprot/O61357

Google uniprot

Favorites | [Pensión Extremeño, Béjar ...](#) | [PubMed home](#) | [Sitios sugeridos](#) | [Más complementos](#)

Beta-tubulin - Dirofilaria immitis (Canine heartw...

Names | Attributes | General annotation | Ontologies | Sequences | References | Cross-refs | Entry info | Customize order

Sequence length	448 AA.
Sequence status	Complete.
Protein existence	Evidence at transcript level.

General annotation (Comments)

Function	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha-chain. By similarity RuleBase RU003505V0
Subunit structure	Dimer of alpha and beta chains By similarity RuleBase RU003505V0
Sequence similarities	Belongs to the tubulin family. RuleBase RU000352V1

Ontologies

Keywords

Cellular component	Microtubule RuleBase RU000352V1 SAAS SAAS003008
Ligand	GTP-binding SAAS SAAS017975 RuleBase RU000351V1 Nucleotide-binding

Gene Ontology (GO)

Biological process	microtubule-based movement Inferred from electronic annotation. Source: InterPro protein polymerization Inferred from electronic annotation. Source: InterPro
Cellular component	microtubule Inferred from electronic annotation. Source: UniProtKB-KW
Molecular function	GTP binding Inferred from electronic annotation. Source: UniProtKB-KW GTPase activity Inferred from electronic annotation. Source: InterPro structural molecule activity Inferred from electronic annotation. Source: InterPro

[Complete GO annotation...](#)

Sequences

Internet | Modo protegido: activado

ES 12:57 07/02/2011



7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

The Gene Ontology - Windows Internet Explorer
http://www.geneontology.org/

amigo protein

Search []
gene or protein name go!

Downloads Tools Documentation Projects About Contact

Welcome to the Gene Ontology website!

The Gene Ontology project is a major bioinformatics initiative with the aim of standardizing the representation of gene and gene product attributes across species and databases. The project provides a [controlled vocabulary of terms](#) for describing gene product characteristics and [gene product annotation data](#) from GO Consortium members, as well as [tools to access and process this data](#). [Read more about the Gene Ontology...](#)

Search the Gene Ontology Database

Search for genes, proteins or GO terms using [AmiGO](#) :

[] GO!

gene or protein name GO term or ID

[AmiGO](#) is the official GO browser and search engine. [Browse the Gene Ontology with AmiGO](#).

The Gene Ontology project very much encourages input from the community into both the content of the GO and annotation using GO. We are very happy to work with others to ensure that the GO is both complete and accurate, and we also very much encourage communities to submit GO annotations for inclusion in the GO database. [Please contact us](#).

The Gene Ontology Consortium is supported by a P41 grant from the National Human Genome Research Institute (NHGRI) [grant [5P41HG002273-09](#)]. See [the full list of funding sources](#). The Gene Ontology Consortium would like to acknowledge the assistance of many more people than can be listed here. Please visit the [acknowledgements page](#) for the full list.

Quick Links

- Tools
- [AmiGO browser](#)
- [OBO-Edit ontology editor](#)
- [Ontology downloads](#)
- [Annotation downloads](#)
- [Database downloads](#)
- [Documentation](#)
- [GO FAQ](#)
- [GO on SourceForge](#)
- [Contact GO](#)

News

- [GO on Twitter](#)
- [Exciting Software](#)
- [Developer opportunity to support The Gene Ontology Project](#) (17 days ago) [News item](#)
- [7th Quarterly Renal GO Annotation Initiative Newsletter](#) (January 2011) (25 days ago) [News item](#)
- [Cardiovascular GO Annotation Initiative](#)

Internet | Modo protegido: activado

12:57
07/02/2011



VNIVERSIDAD
DSALAMANCA

7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>



7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

P22U [Dirofilaria immitis]
GenBank: AAD11968.1
FASTA [GenPept](#)

LOCUS AAD11968 212 aa linear INF 02-FEB-1999

DEFINITION P22U [Dirofilaria immitis].

ACCESSION AAD11968

VERSION AAD11968.1 GI:4254097

DBSOURCE locus DIU29533 accession [U29533.1](#)

KEYWORDS

SOURCE Dirofilaria immitis (dog heartworm nematode)

ORGANISM [Dirofilaria immitis](#)
Eukaryota; Metazoa; Nematozoa; Chromadorea; Spirurida; Filarioidea; Onchoerceridae; Dirofilaria.

REFERENCE

REFERENCE 1 (residues 1 to 212)
AUTHORS Frank,G.R., Wisniewski,N., Brandt,K.S., Carter,C.R., Jennings,N.S. and Selkirk,M.E.
TITLE Molecular cloning of the 22-24 kDa excretory-secretory 22U protein of Dirofilaria immitis and other filarial nematode parasites
JOURNAL Mol. Biochem. Parasitol. 98 (2), 297-302 (1998)

REFERENCE 2 (residues 1 to 212)
AUTHORS Frank,G.R., Wisniewski,N. and Grieve,R.B.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-JUN-1998) Glenn R. Frank, Saravak, Inc., 1825 Sharp Point Drive, Fort Collins, CO 80528, USA

REFERENCE 3 (residues 1 to 212)
AUTHORS Frank,G.R., Wisniewski,N. and Grieve,R.B.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-JUN-1998) Glenn R. Frank, Hekta Corporation, 1825 Sharp Point Drive, Fort Collins, CO 80528, USA

REMARK
COMMENT Nucleotide and amino acid sequence updated by submitter. On Jun 25, 1998 this sequence version replaced gi:1777445.
Method: conceptual translation.

FEATURES

source
1..212
/organism="Dirofilaria immitis"
/db_xref="taxon:6287"
/dev_stage="fourth stage larvae and adults"

Protein
1..212
/product="P22U"

Region
113..150
/region_name="LYTE"
/note="LyteB protein: c100507"
/db_xref="CID:186044"

CDS
1..212
/coded_by="U29533.1:38..676"
/note="protein found in larval (L3/L4) excretory-secretory product"

ORIGIN
1 mmmrfvlllv wakviemsgg qmikekcs diapqqlnav qvlpcaqdc qkyiteigm
61 ydqiancfkq lqsiindamk caqdaipnac aqgepbavpk rfgkglqlav mdinkelqr
121 mqlangvraq lsggrffkfc fqcmmkly scspdqglldl pdnwmvqvvc kncaqtegiq
181 tasvqlcfc veqagixrls dvcpiqifk tk



7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

The screenshot shows a Windows Internet Explorer browser window displaying the NCBI protein result page for P22U [Dirofilaria immitis]. The address bar shows the URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3253097>. The page content includes:

REFERENCE 2 (residues 1 to 212)
AUTHORS Frank,G.R., Wisnewski,N. and Grieve,R.B.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-JUN-1995) Glenn R. Frank, Paravax, Inc., 1825 Sharp Point Drive, Fort Collins, CO 80525, USA

REFERENCE 3 (residues 1 to 212)
AUTHORS Frank,G.R., Wisnewski,N. and Grieve,R.B.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-JUN-1998) Glenn R. Frank, Heska Corporation, 1825 Sharp Point Drive, Fort Collins, CO 80525, USA

REMARK Nucleotide and amino acid sequence updated by submitter
COMMENT On Jun 25, 1998 this sequence version replaced gi:[1777445](#).
Method: conceptual translation.

FEATURES

source Location/Qualifiers
1..212
/organism="Dirofilaria immitis"
/db_xref="taxon:6287"
/dev_stage="fourth stage larvae and adults"

[Protein](#) 1..212
/product="P22U"

[Region](#) <113..>150
/region_name="LYTB"
/note="LytB protein; c100507"
/db_xref="CDD:186044"

[CDS](#) 1..212
/coded_by="U29533.1:38..676"
/note="protein found in larval (L3/L4) excretory-secretory product"

ORIGIN

```
1 mmmrfvllv vaiwiemsqg qqmikqckcs diapcqltav qsvlpcadqc qkyitsiggn
61 ydqisncfkq kqsiindamk caqdafpnac aggepkmpvk rfgkglqlav mtdinkelqr
121 mgianqvtql isqgrrffkc fqscmmkklg scspdcglldl psdnvmvqtv kncaqksgiq
181 tasvqdlcfc veqagirqls dvcpriqifk tk
//
```

The browser interface includes a search bar with 'pubmed' entered, a toolbar with various utility icons, and a taskbar at the bottom showing the system clock as 10:32 on 09/02/2011.



7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

NCBI Blast:gb|AAD11968.1| (212 letters) - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Google pubmed

Favoritos

NCBI Blast:gb|AAD11968.1| (212 letters)

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

Query seq. Superfamilies

LVTB superFamily

Distribution of 86 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Magenta
>=200	Red

Query

1 40 80 120 160 200

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Links
AAD11968.1	P22U [Dirofilaria immitis]	428	428	100%	3e-118	
AAD11969.1	22 upper [Onchocerca volvulus]	354	354	99%	3e-96	
AAD11970.1	24 kDa secreted protein [Brugia malayi]	301	301	99%	2e-80	
XP_003138787.1	hypothetical protein LOAG_04202 [Loa loa] >qb EFO24285.1 hyp	278	275	92%	3e-72	G
CA410209.1	Alt-1 protein [Brugia pahangi]	190	190	99%	1e-46	
XP_003112257.1	hypothetical protein CRE_29767 [Caenorhabditis remanei] >qb EFF	154	154	97%	9e-36	G
XP_002639670.1	Hypothetical protein CBG12388 [Caenorhabditis briggsae] >emb C	150	150	94%	1e-34	G
NP_492398.1	hypothetical protein F55H12.4 [Caenorhabditis elegans] >emb CAE	148	149	95%	2e-34	U G
P047819.1	24 kDa protein of A223 [Ascaris suum]	106	106	68%	7e-21	

Internet | Modo protegido: activado

75%

ES 10:34 09/02/2011