

# PROTEÓMICA DIFERENCIAL:

Técnicas, aplicaciones y dificultades



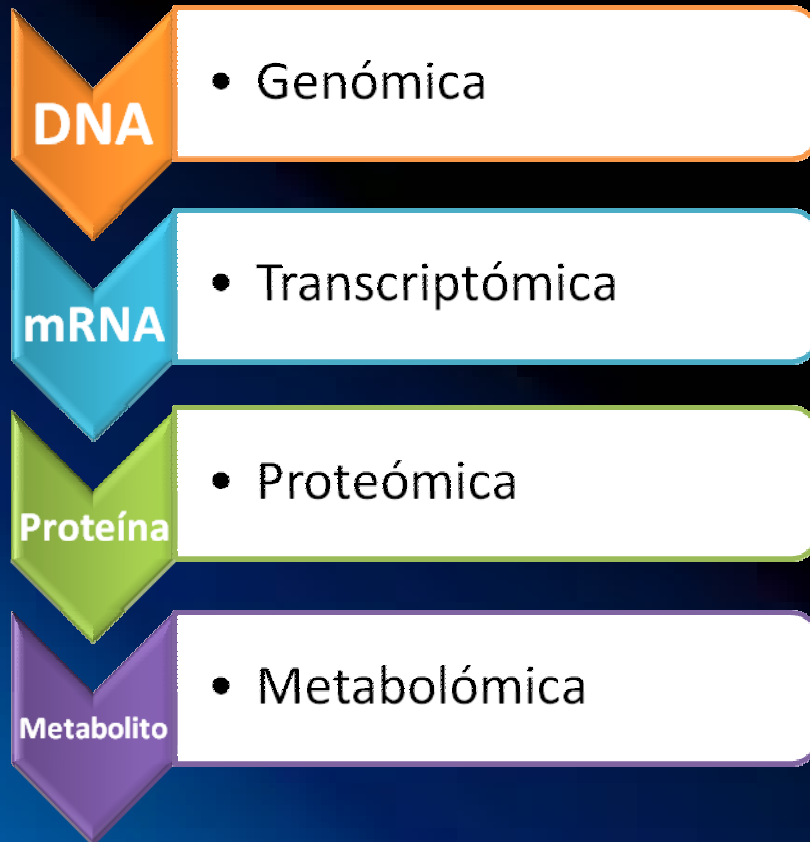
**Plant Stress Physiology**



ESTACIÓN  
EXPERIMENTAL  
DE AULA DEI



# Proteómica: ¿Qué es? ¿Para qué sirve?

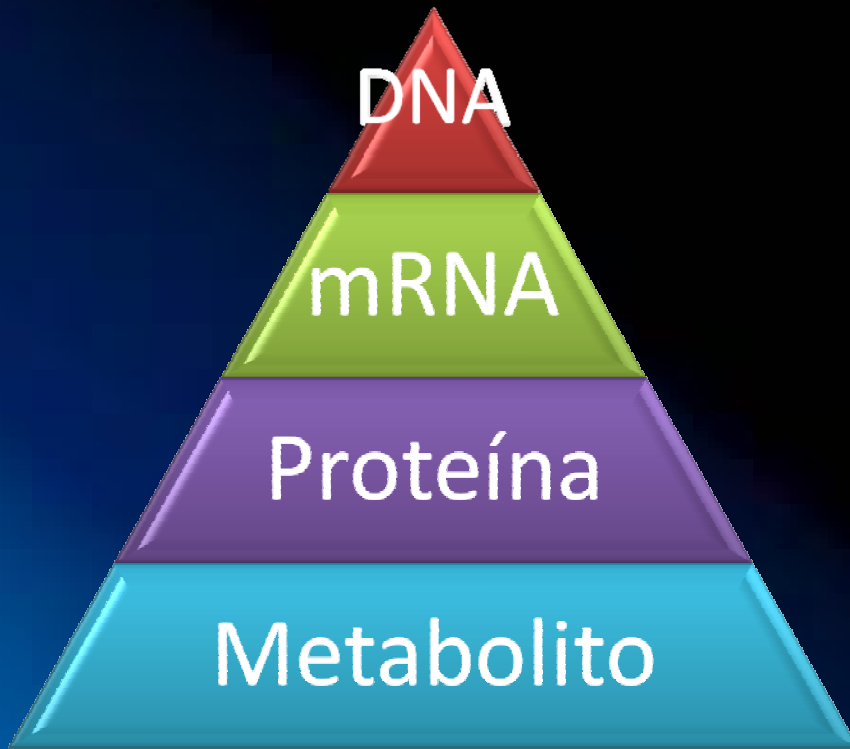


Conocer el **proteoma** de un organismo es tener una imagen dinámica de **todas las proteínas expresadas** por ese organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente.

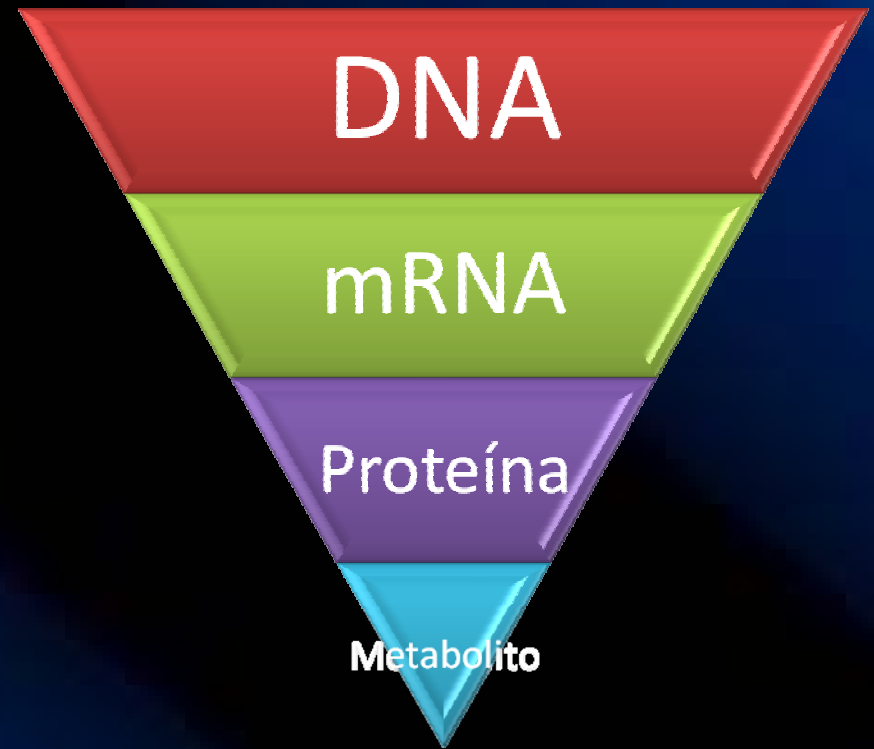


# Proteómica: ¿Qué es? ¿Para qué sirve?

Complejidad



Grado de estudio



# ¿Proteómica diferencial?

---

- Enfrentar al organismo a dos ambientes diferentes y comparar los proteomas
  - Obtener proteomas reproducibles
  - Cuantificar proteínas en cada ambiente
  - Comparación estadística (réplicas)
  - Identificación de diferencias
  - Inferir respuesta biológica



# Técnicas: alta resolución

---

## Electroforésis 2D

- IEF-SDS-PAGE
  - DIGE
  - Standard
- BN-SDS-PAGE
- BAC-gels
- ...

## Cromatografía 2D

- iTRAQ
- SILAC
- ICAT
- Label-free proteomics



# Flujo de trabajo

---



# Flujo de trabajo

## Electroforésis 2D: cuantificas proteínas

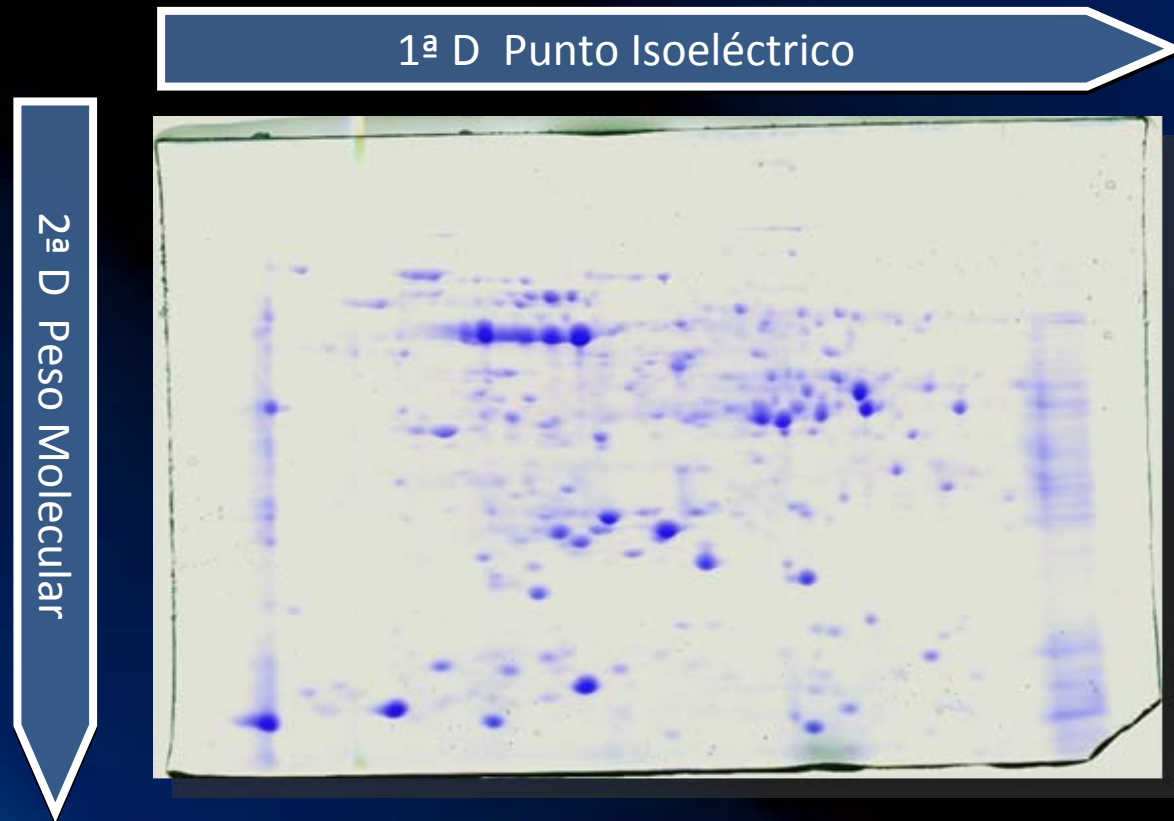


## Cromatografía 2D: cuantificas péptidos



# Electroforésis Bidimensional

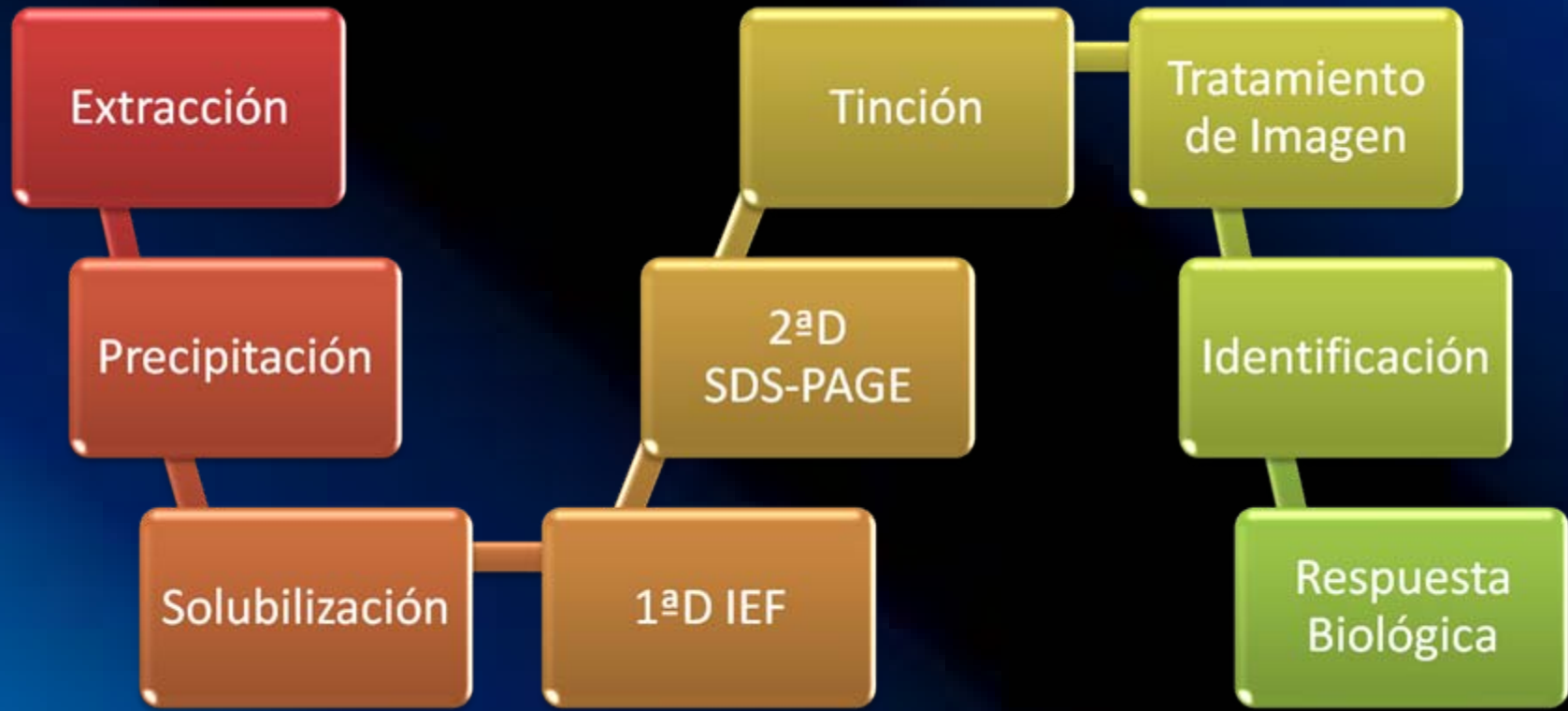
- IEF-SDS-PAGE:



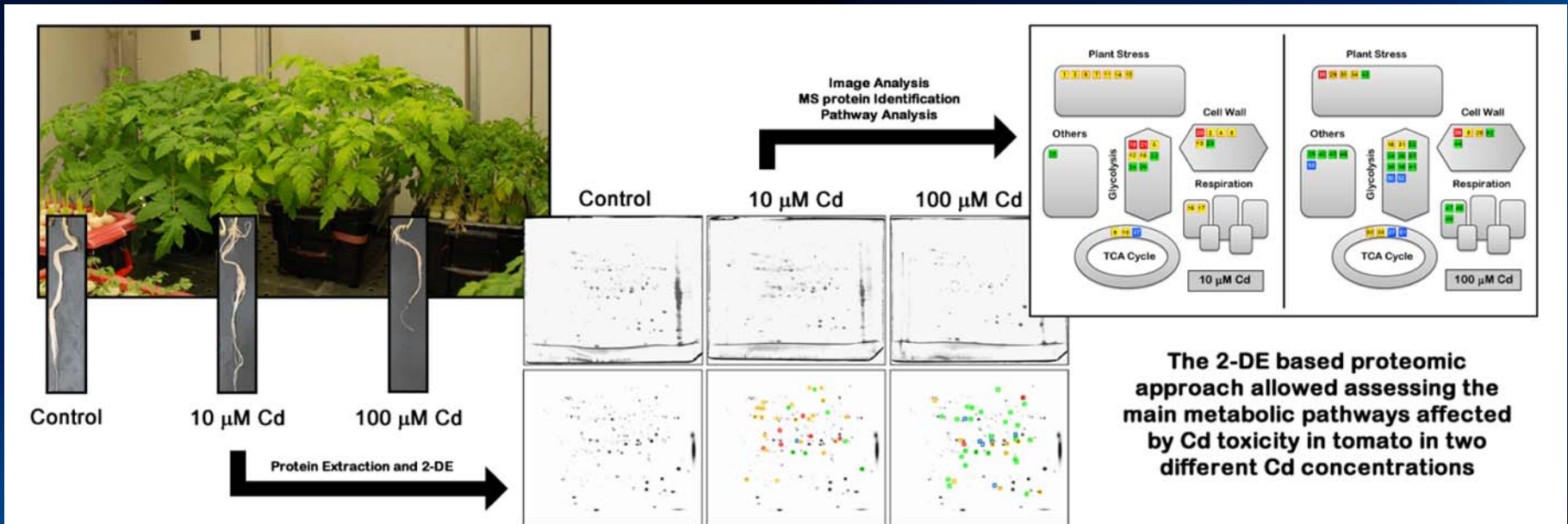


# Electroforésis Bidimensional

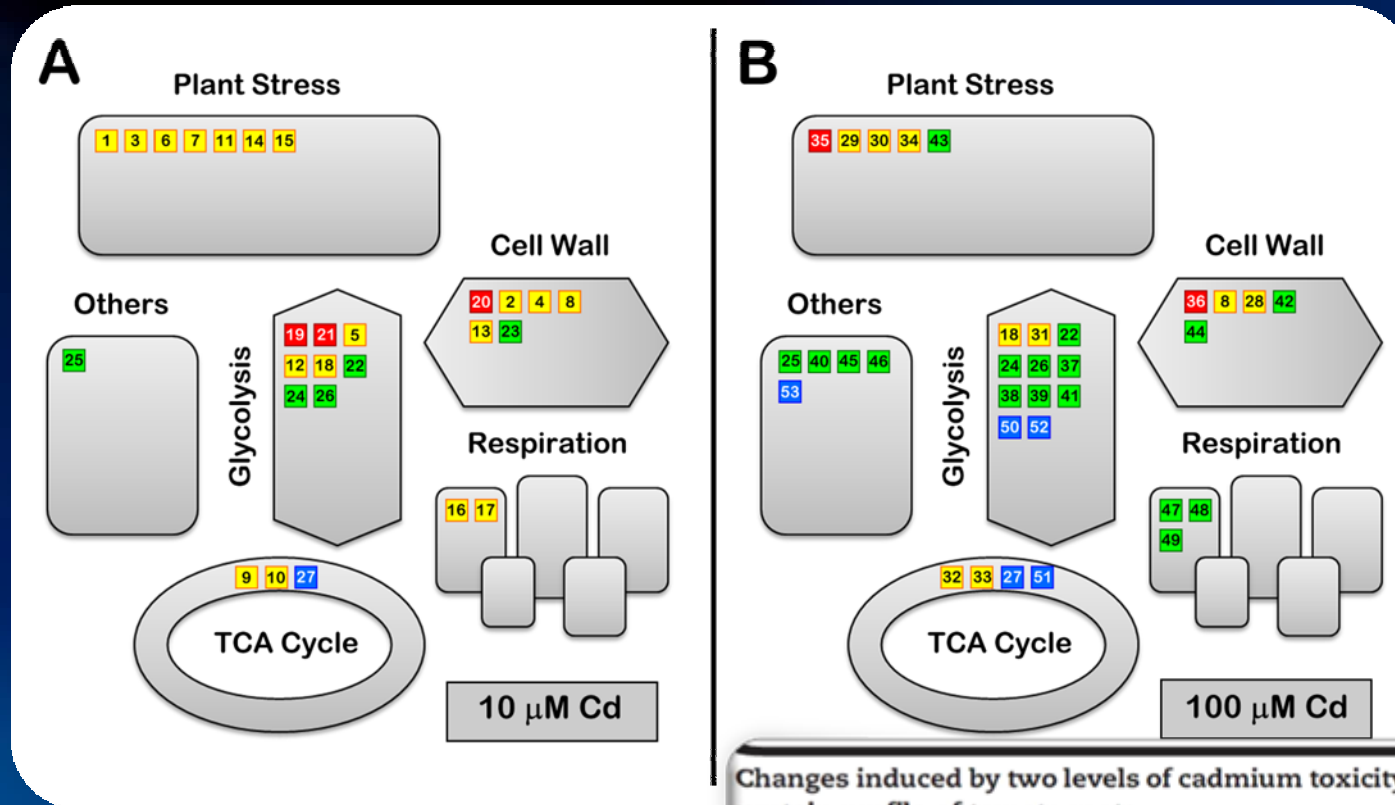
- IEF-SDS-PAGE:



# Si todo va bien...



# Si todo va bien...



Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots

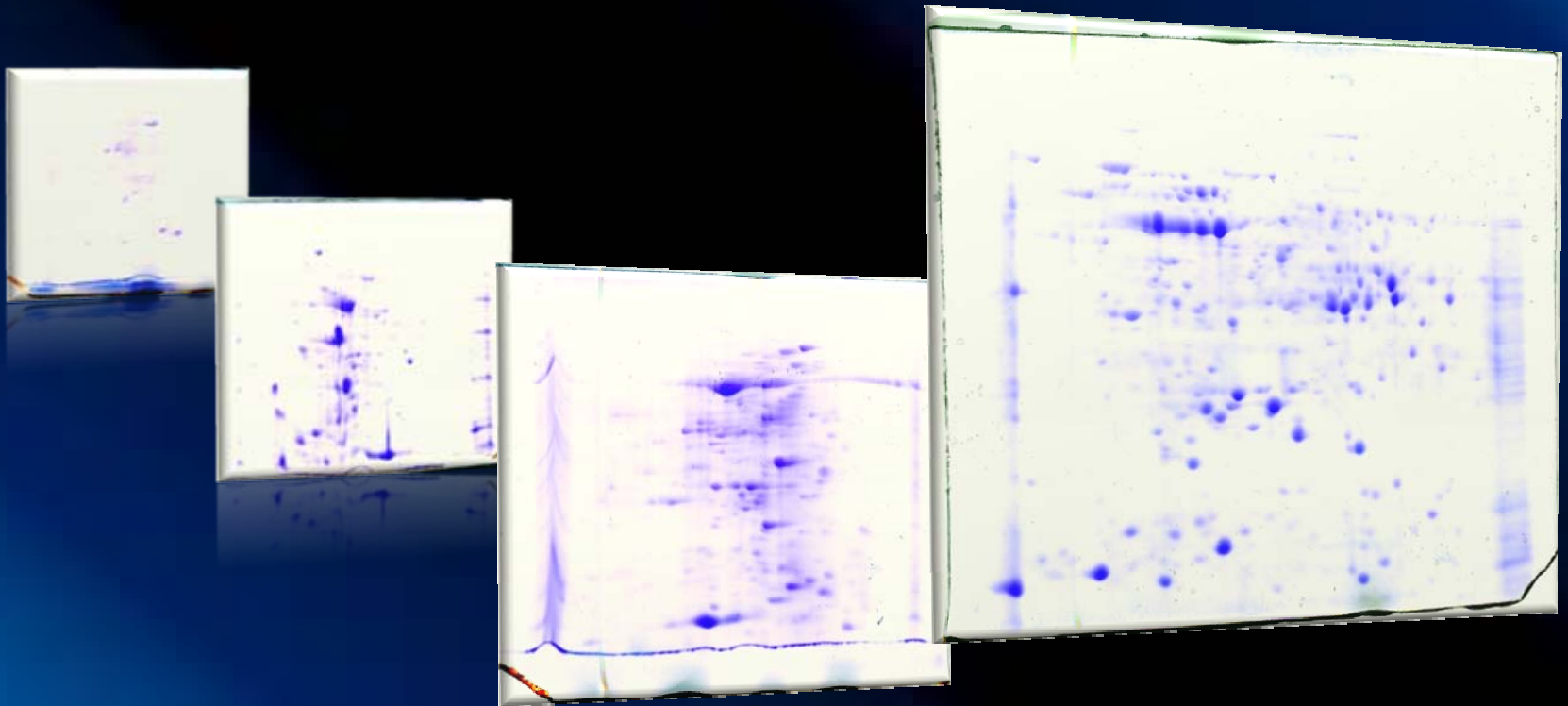
Jorge Rodríguez-Celma, Rubén Rellán-Álvarez, Anunciación Abadía, Javier Abadía\*, Ana-Flor López-Millán

Plant Nutrition Department, Aula Dei Experimental Station (CSIC), P.O. Box 13034, E-50080, Zaragoza, Spain



# El camino para tener un buen gel...

---



# IEF-SDS-PAGE



# Problemas más comunes

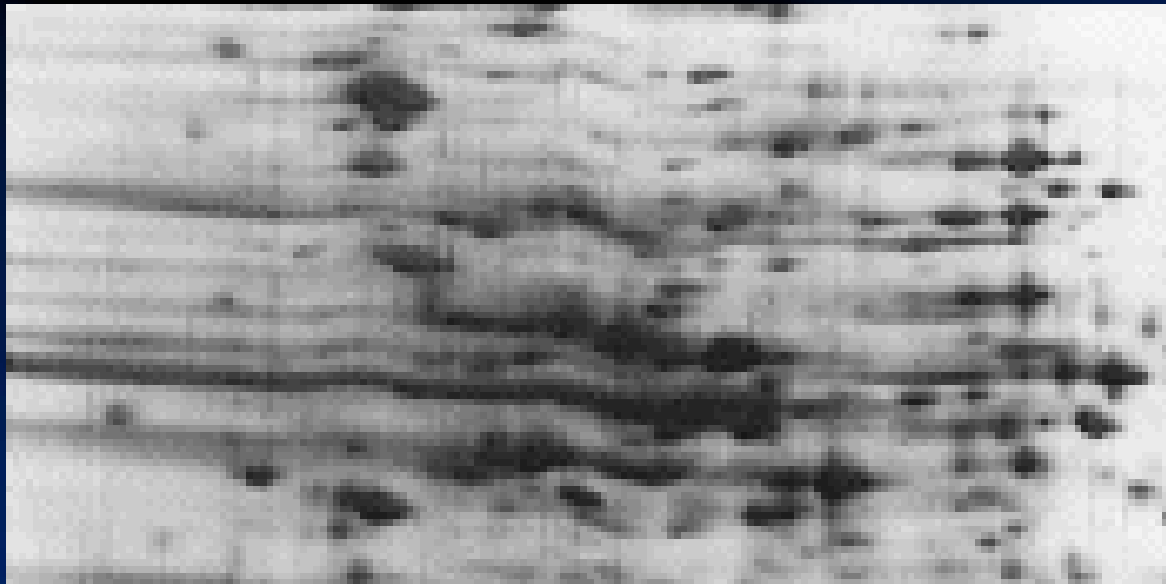
- **Baja cantidad de proteína**
  - Optimizar protocolo de extracción
  - Mejora del buffer de solubilización
  - Cambiar de tinción o tamaño de geles



# Problemas más comunes

---

- Arrastre Horizontal: problemas de IEF
  - Contaminación de sales o lípidos



# Problemas más comunes

---

- Arrastre Vertical: problemas SDS-PAGE
  - Mejorar incubación pre-SDS-PAGE





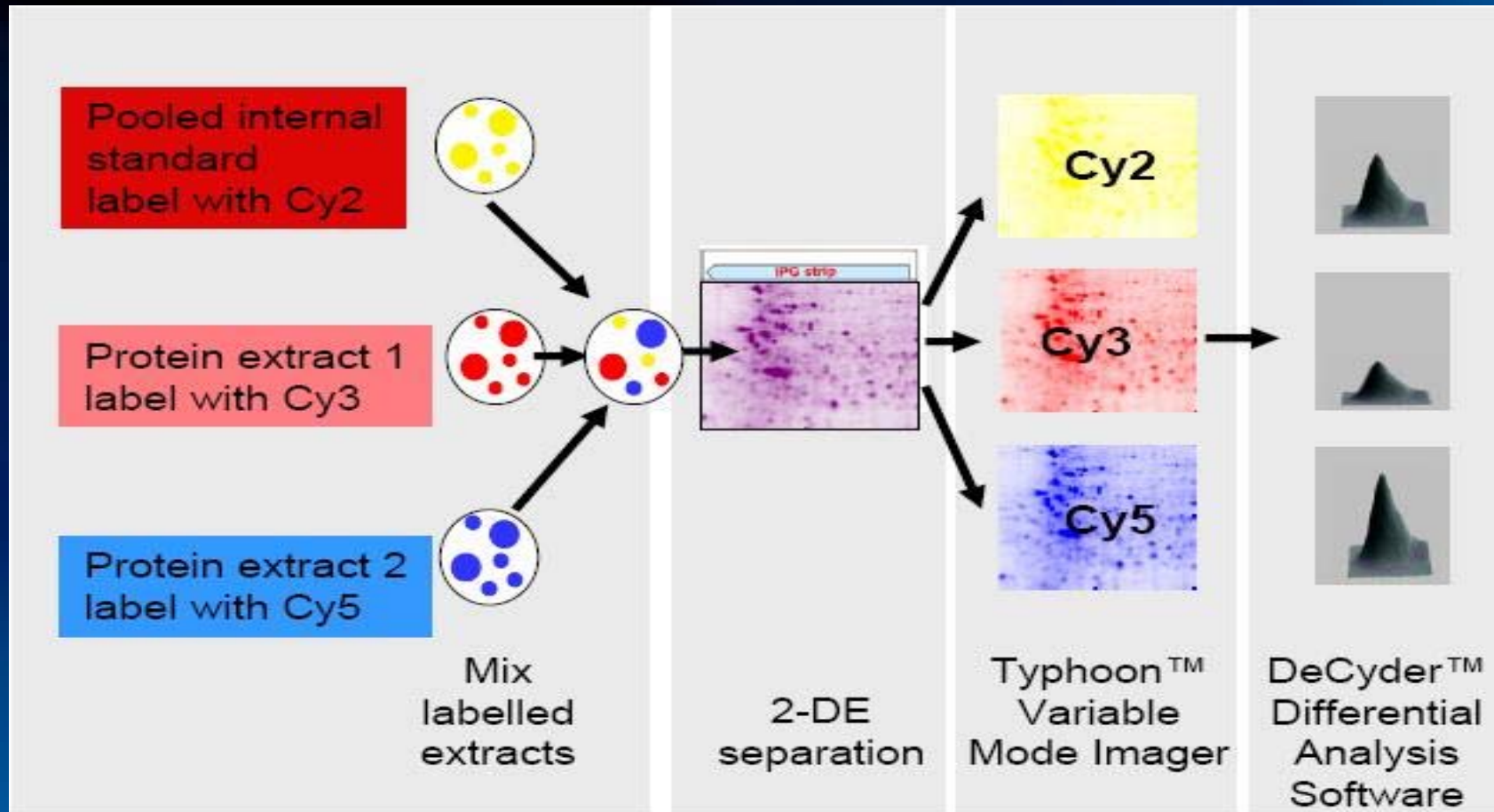
# Problemas de la técnica

---

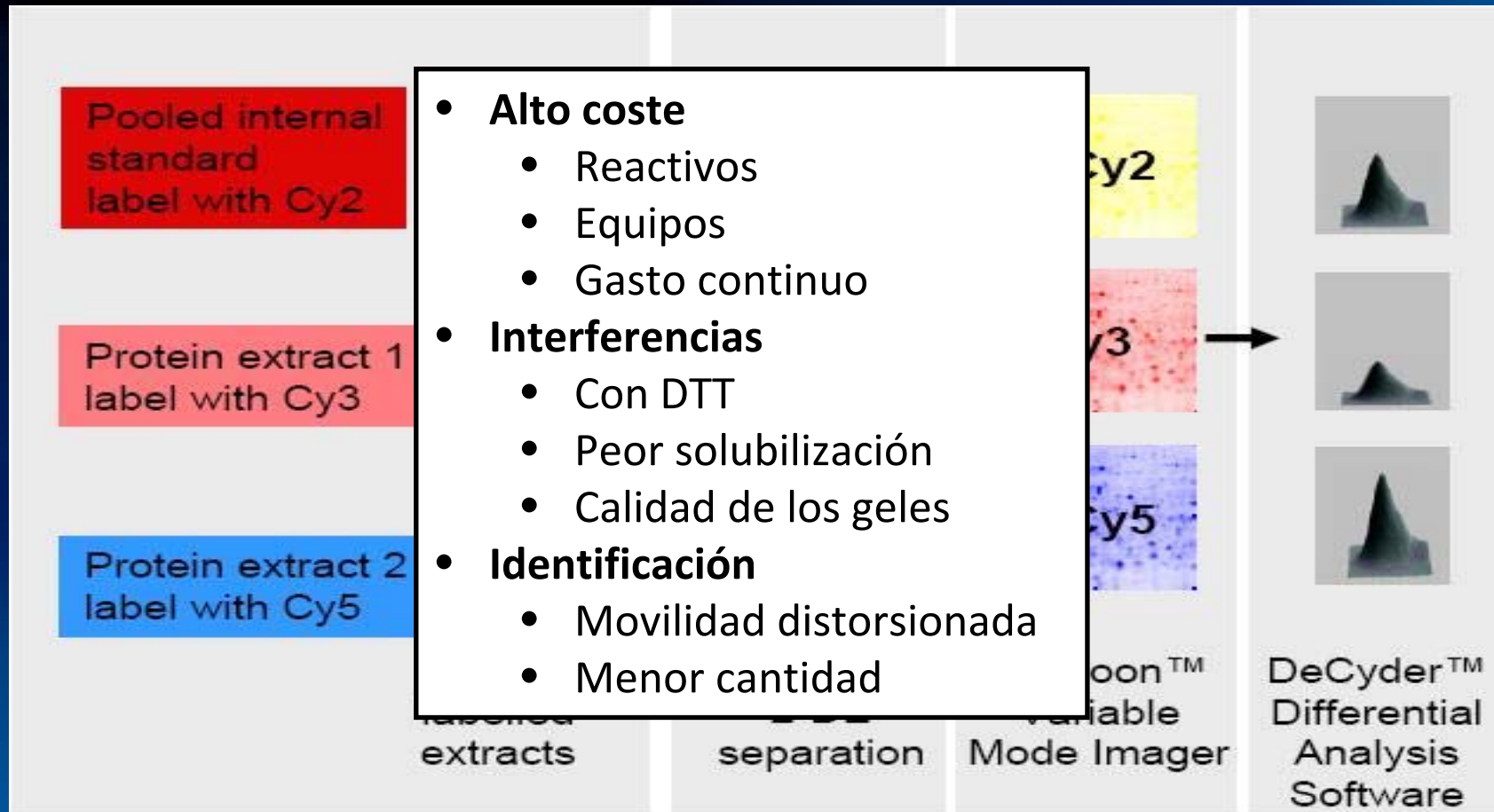
- **Reproducibilidad**
  - Variabilidad de hasta el 40%
- **Necesidad de ser estricto**
  - Estandarización máxima del protocolo
    - Desde la extracción hasta la tinción
  - Estricto control de manejo de datos
    - Escaneado y tratamiento de imagen reproducible
  - Control estadístico
    - Inputación de datos perdidos, diferencias significativas



# Mejoras de reproducibilidad: DIGE



# Mejoras de reproducibilidad: DIGE



# Problemas de la técnica

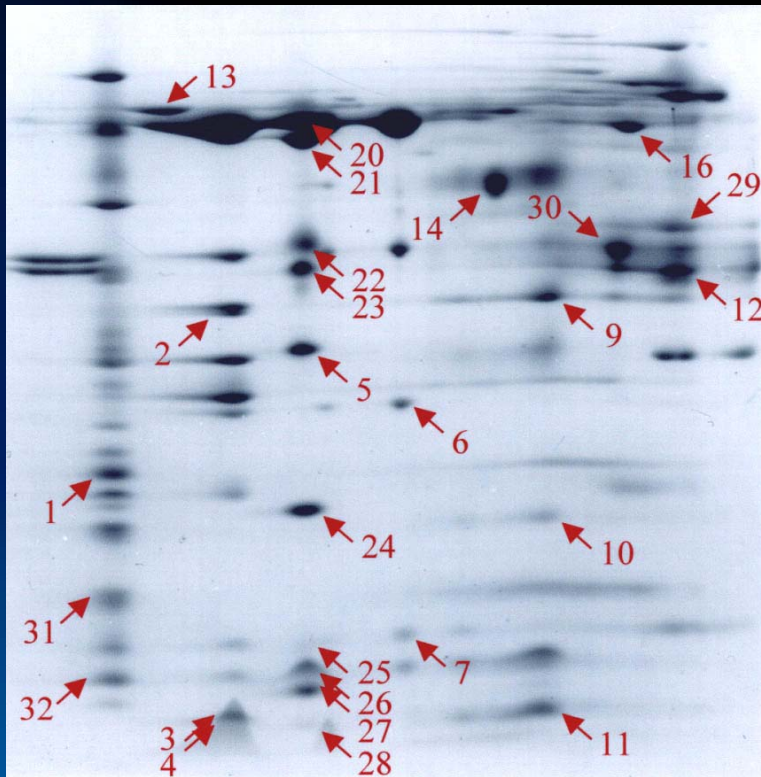
---

- **Proteínas de membrana**
  - Las proteínas integrales de membrana se solubilizan mal en los buffers de IEF
- **Soluciones: complicado...**
  - Técnicas más difícilmente reproducibles
  - Dificultad de conseguir resultados y muestras homogéneas

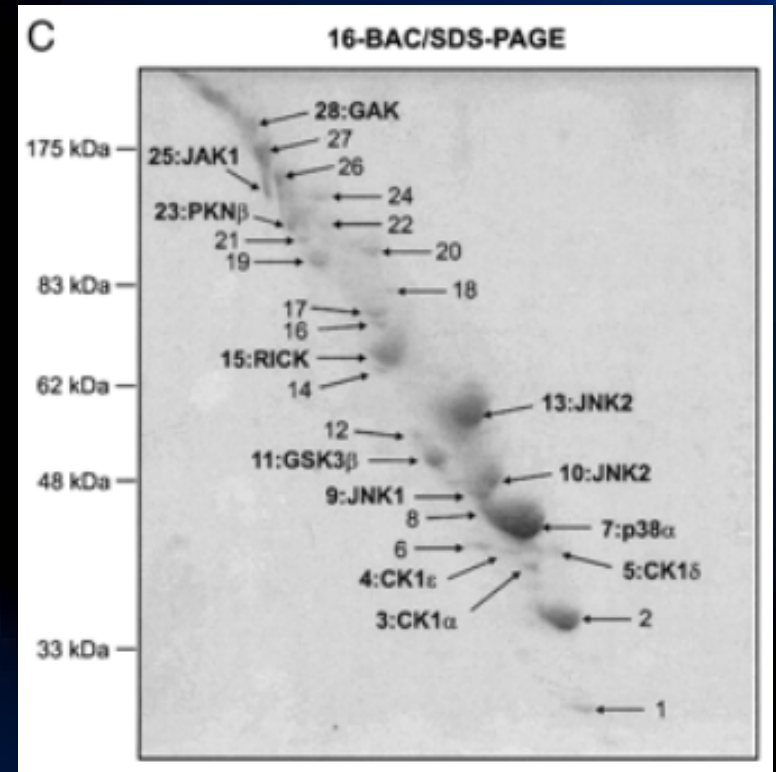


# Proteínas de Membrana

## BN-SDS-PAGE



## BAC-Gels

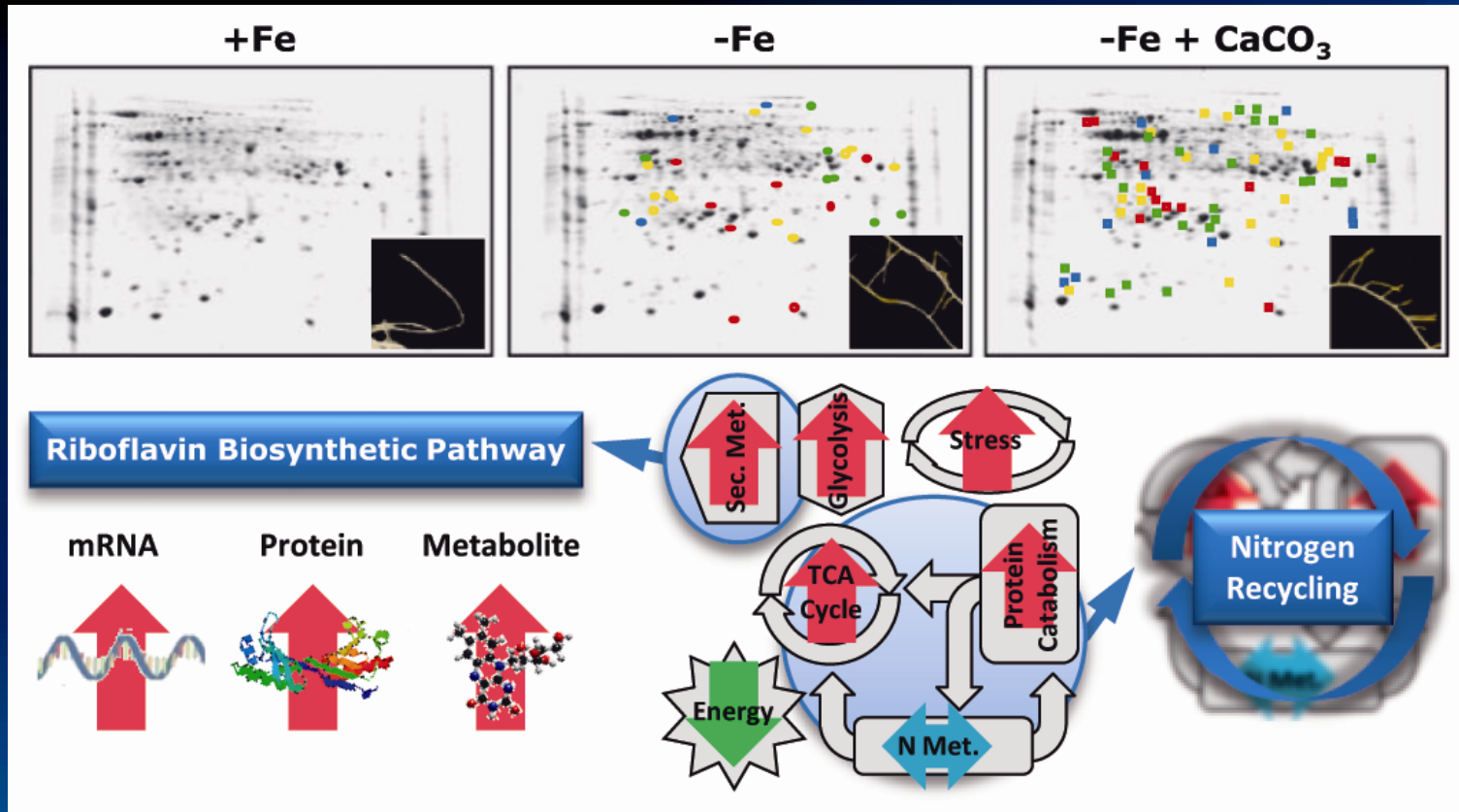


# Datos que obtenemos

- Dependiendo del tamaño de los geles y la complejidad de la muestra
  - Entre 200 – 1000 spots individuales
  - 15-20% varían en intensidad → 40-150 diferencias
- Mayoría de identificaciones son proteínas solubles
  - Procesos metabólicos afectados
- Imagen global de la respuesta, pero descriptiva
  - Solo cantidad de proteína, no actividad/función
- Revistas específicas de proteómica



# ¿Qué utilidad tiene? Enfocar



# Cromatografía Bidimensional

- **Cuantificas péptidos:**
  - Técnicas de Marcaje: iTRAQ, SILAC, ICAT
  - Label-free





# Ventajas

## Ventajas

- Número mayor de proteínas identificadas
  - 3000-5000
- Aparecen también integrales de membrana
- Menor cantidad de muestra necesitada
- Más reproducible

## Inconvenientes

- Alto coste de equipación y reactivos marcados
  - Marcadores
  - Cromatógrafo 2D
  - MS de alta resolución



# Problemas

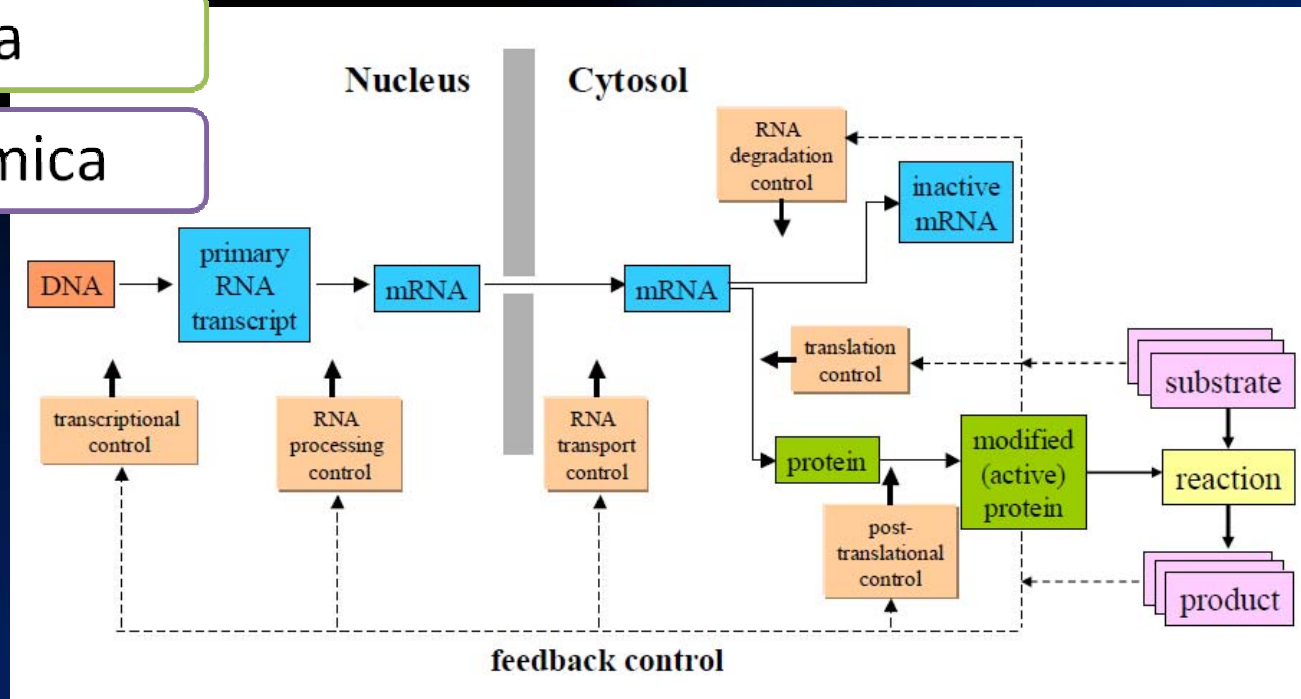
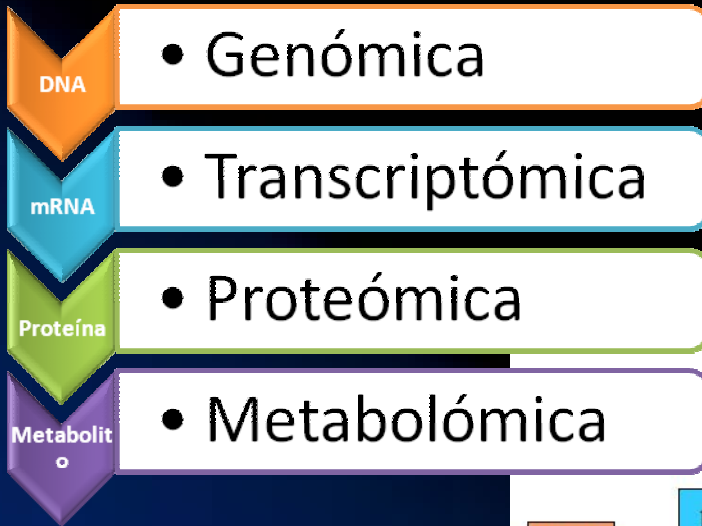
---

- Se ven proteínas de membrana
  - Pero suelen ser fragmentos o degradaciones
- Problemas de solubilización
  - IEF
    - No iónicos pero desnaturalizantes
  - Cromatografía 2D
    - Compatible con digestión (nativo) y con marcaje

**MÁS EXIGENTE**



# Proteómica: Problemas teóricos





¡Gracias!



**Plant Stress Physiology**

 **CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN  
EXPERIMENTAL  
DE AULA DEI

