

Figura 1. Esquema del proceso de identificación de Cx43 en la membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata

Perfil de expresión proteica diferencial de la infección porcina con PCV2 por SDS-PAGE, marcaje enzimático mediante isótopos estables ($^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$) y trampa iónica.

Ramírez-Boo M¹., Serrano H²., Núñez E²., Jorge P²., Vázquez J.², Segalés Q.³, Garrido J. J.¹, Moreno A¹.

¹Dpt. Genética, Universidad de Córdoba- CSIC; Córdoba. ²Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, CBMSO (CSIC-UAM); Madrid. ³Universitat Autònoma de Barcelona (CRSA); Barcelona.

Introducción

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es el agente primario causante del llamado síndrome del destete, enfermedad que afecta al sistema inmune y al patrón de expresión de muchas proteínas del cerdo. Con vistas a caracterizar los mecanismos inmunológicos implicados en la interacción cerdo-PCV2, hemos realizado estudios de expresión diferencial en ganglios linfáticos mediante una combinación

de SDS-PAGE, seguida de una digestión en gel de las proteínas separadas, marcaje de los péptidos con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e identificación y cuantificación con trampa iónica lineal.

Material y métodos

Diez cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro (4 controles y 6 inoculados con PCV2) fueron sacrificados, comprobándose que habían de-

sarrollado una infección subclínica. Los ganglios linfáticos inguinales fueron resuspendidos en tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (p/v), DTT 1% (p/v), anfolitos 0,8%, PMSF 0,2M) y sometidos a disociación mecánica. Los extractos de proteína fueron mezclados en cada uno de los grupos y se analizaron mediante SDS-PAGE, se cortaron en 19 fracciones y se sometieron a digestión en gel, marcaje isotópico estable de los péptidos resultantes con ¹⁶O/¹⁸O, y análisis por trampa iónica lineal, según hemos descrito previamente (Serrano *et al.*, 2007). Para el procesamiento y análisis de datos se utilizaron los programas pRatio y QuiXoT, desarrollados en el Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica (CBMSO, CSIC-UAM, Madrid) (Navarro *et al.*, 2007).

Resultados

Los resultados obtenidos tras la búsqueda fueron analizados por el pRatio con una FDR del 5%, y cuantificados con el QuiXoT. Se realizó un análisis conjunto de todas las fracciones ya que mostraban una distribución semejante. Se eliminaron del análisis aquellos péptidos cuya eficiencia de marcaje fue menor que 0.7. Hasta ahora se ha analizado un 30%

del proteoma total y se han conseguido cuantificar más de 1000 proteínas, de las cuales, una docena presentaron cambios de expresión. La digestión de las muestras fue homogénea y la oxidación de las metioninas no afectó al cálculo de la cuantificación. (Fig.1). Los cambios de expresión encontrados se recogen en la (Fig.2).

Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que, usando la electroforesis 1DE acoplada a un marcaje enzimático mediante isótopos estables con ¹⁶O/¹⁸O y el análisis de los péptidos marcados mediante trampa iónica lineal, es posible detectar cambios de expresión de proteínas en ganglios linfáticos, con vistas a mejorar nuestro conocimiento de la respuesta inmune del cerdo al PCV2.

Bibliografía

Serrano H., Jorge I., Martínez-Acedo P., Navarro P.J. et al., *Proteómica* 2007, 0:29-34.
 Navarro Pj., Martínez P., Serrano H., Jorge I et al., Joint SEProt-EuPA Congress 2007, Valencia, Spain, February 10-14. Abstracts book, P 9, PP. 119.

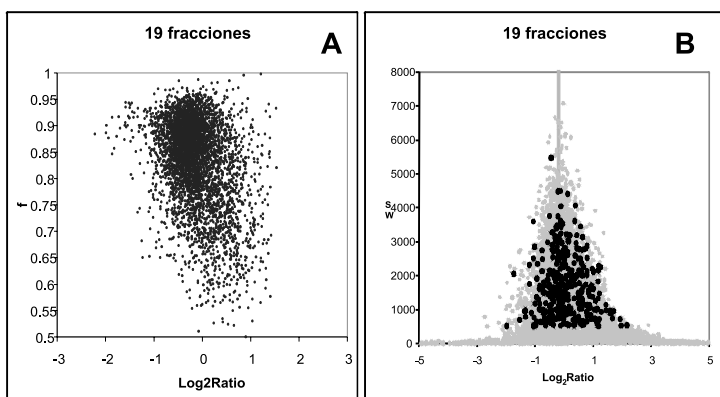


Figura 1.- Análisis estadístico de la cuantificación a nivel de proteína de 19 fracciones de extracto proteico de ganglio linfático porcino inoculado con PCV2. **(A)** Eficiencia de marcaje de O¹⁸ (f) en función del Log₂Ratio de las proteínas cuantificadas y selección de aquellas con f > 0.7. **(B)** Distribución de los cambios de expresión según peso estadístico.

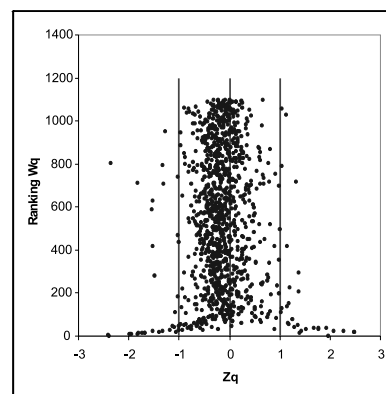


Figura 2.- Distribución de los cambios de expresión significativos Proteínas con valores de Zq de -1 a -3 y, de 1 a 3 aumentan y disminuyen su expresión respectivamente