



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA
DE BIOTECNOLOGIA.**



**PROYECTO
ESTABLECER UN METODO PARA DETERMINAR
ACTIVIDAD Y PURIFICACION DE LA FOSFATASA
ÁCIDA DE
*Actinobacillus pleuropneumoniae.***

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO BIOTECNOLOGO**

**PRESENTA:
ALTAMIRANO SEGOVIA AGUSTIN.**

DIRECTOR INTERNO: M. EN C. RODRIGO MARTINEZ ZUÑIGA.

México, D.F. Mayo, 2007.



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México D. F. a 13 de noviembre del 2006
Of. No. SA-UPIBI-1652-2006

ALTAMIRANO SEGOVIA AGUSTÍN
ALUMNO DEL 7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con fecha 24 de marzo del 2006, queda registrado su Proyecto Terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" denominado "ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA FOSFATASA ÁCIDA DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*", bajo la dirección del M. en C. Rodrigo Martínez Zúñiga.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar, en el mismo, el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el mencionado Comité.

CONDICIONES

- 1.- Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
- 2.- Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
- 3.- Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas
- 4.- Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PAZ" PATRIA



[Firma manuscrita]

DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
SUBDIRECTOR ACADÉMICO

**INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA
SUBDIRECCION ACADEMICA**

ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo

GVD/RC/D

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por que el fue quien me ilumino
el camino que debía de seguir
siempre. Para llegar a cumplir
mi gran sueño de acabar mi
carrera.

A MIS PADRES:

Que me dieron el mayor regalo que se le puede dar a una persona, la vida.
gracias por estar conmigo en mis éxitos y en mis derrotas
creo no haberlos defraudado y espero que se sientan orgullosos
de lo que han logrado junto conmigo y que vean que sus sacrificios no han
sido en vano.

Para ustedes queridos padres que dios los bendiga y que los guarde por
siempre.

A MIS HERMANOS:

Por su apoyo moral que me han brindado
desde siempre y sobre todo
por la dicha de poder compartir la vida con ellos.

A MIS ABUELITOS:

Quienes me enseñaron a luchar por alcanzar mis sueños
y se que desde el cielo estuvieron cuidando mis pasos
por este largo camino.

A LOS MAESTROS:

Que con su enseñanza nos ayudaron
a terminar nuestros estudios
a nivel superior pero
principalmente a mi asesor
RODRIGO MARTINEZ ZUÑIGA

INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 DEFINICIÓN DE ENZIMA.....	3
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.....	4
1.3 ENZIMAS HIDROLASAS.....	4
1.4 FOSFATASAS.....	5
1.5 FOSFATASA ÁCIDAS.	6
2. JUSTIFICACION.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
4. METODOLOGÍA.....	10
4.1 CEPAS Y CULTIVOS BACTERIANOS.....	10
4.2 LAVADO DE CÉLULAS.....	10
4.3 EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA A PARTIR DE LAS CÉLULAS.....	10
4.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ÁCIDA.....	10
4.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	10
4.6 SDS-PAGE DE PROTEÍNAS PERIPLASMICAS.....	10
4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL GEL DE POLIACRILAMIDA.....	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1 CEPAS Y CULTIVOS BACTERIANOS.....	12
5.2 CURVA TIPO DE PNP.....	13
5.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	14
5.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	15
5.5. ELECTROFEROGRAMA DEL EXTRACTO.....	16
5.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	18
6. CONCLUSIONES.....	19
7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	21
7.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
8. TÉCNICAS.....	26
9. BIBLIOGRAFÍA.....	27
10. GLOSARIO DE TERMINOS.....	28

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla1. Propiedades de las fosfatasa.....	7
Tabla2. Absorbancias obtenidas de la Curva tipo de PNP para actividad enzimática.....	13
Tabla3. Absorbancias obtenidas en la cuantificación de proteínas por Bradford.....	14
Tabla 4. Absorbancias de actividad y de la proteína.....	15
Tabla5. Ingredientes del caldo infusión cerebro y corazón.....	22
Tabla6. Ingredientes del caldo luria bertani.....	22

INDICE DE FOTOS.

	Pág.
Foto1. Cerdo con sospecha de haber adquirido La bacteria De <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> . (PCP)	2
Foto2. aborto de cerdos por causa de la bacteria (PCP)	2
Foto3. Infección bacteriana secundaria sobre aguda.....	2
Foto4. Necropsia de los pulmones de cerdos con la bacteria alojada en estos.....	2
Foto5. La necropsia áreas de consolidación Pulmonar con apariencia nodular.....	2
Foto6. <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u>	12
Foto7. Actividad del extracto	15
Foto8. Liofilizado del extracto	16
Foto 9. Expresión del extracto en el gel de poliacrilamida se observa la banda.....	17
Foto10. Gel de poliacrilamida con actividad.....	18

INDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1.....	13
Grafica 2.....	14

ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA FOSFATASA ÁCIDA DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



ALTAMIRANO SEGOVIA AGUSTIN, * M. en C. RODRIGO MARTINEZ ZUÑIGA.

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA. Av. Acueducto s/n, col. Barrio la Laguna Ticomán C.P. 07340 México, D.F. Tel. 57296000 Ext. 56318 y 56320 Fax 56305 Mail. Rmartinez2002@yahoo.com.es

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*(Ap), Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

Introducción. En México, la producción y consumo de carne de cerdo es de gran importancia nacional; esta industria es afectada económicamente por una gran variedad de enfermedades que puede contraer el cerdo entre ellas se encuentra la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). Producida por el *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El conocimiento de su agente etiológico, constituye un elemento clave, tanto para el diagnóstico como para el control de la enfermedad; es un coco bacilo Gram Negativo, dotado de poderosos factores de virulencia entre los que destacan toxinas RTX; esta es una enfermedad de vías respiratorias, que se presenta a nivel mundial; esta bacteria induce una neumonía fibrinohemorrágica que eventualmente desencadena la muerte de los cerdos.

Metodología. Se siembra la cepa *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en Medio de cultivo agar infusión de cerebro y corazón (BHI) y agar luria bertani (LB). Se adiciona NAD como suplemento para su crecimiento, incubando toda la noche. Se centrifuga el medio de cultivo 5000rpm durante 30 min, recuperando la pastilla y se realiza un lavado con Tris 10 mM pH 8.4, posteriormente se centrifuga a 5000rpm durante 30 min, el precipitado lo resuspendemos con Tris con un pH de 7 y se adiciona desoxicolato de sodio al 0.05%, se incubaba a 180rpm/30/37°C, a continuación se procede a centrifugar a 8000rpm/15/4°C, se recupera el sobrenadante y este es el extracto celular.

Resultados y discusión. Se logro determinar actividad enzimática y cuantificación de proteínas.

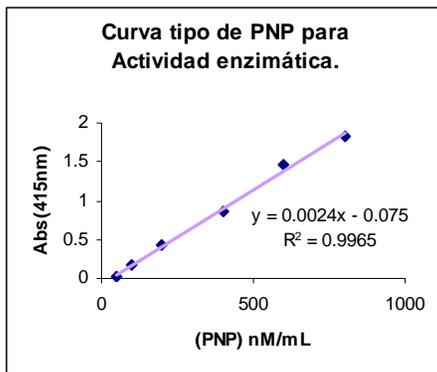
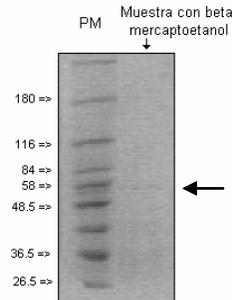


Figura 1. Esta curva tipo se construye para evaluar la actividad enzimática. Se emplearon concentraciones de 50 a 800 nM/mL, en volúmenes de 50 µL, también se utilizaron reactivos reguladores de acetatos 0.2M pH 5.5 e hidróxido de sodio 1M.

También se determinó la presencia de la enzima en el gel con un peso molecular de 58 a 84 KDa como se observa en la foto.



La actividad en el gel de poliacrilamida es momentánea pero en la siguiente foto se observa la presencia de las bandas una vez que se le agrega p-NPP. Tienen una tonalidad de color amarillo pero desafortunadamente el fenómeno es momentáneo.



Conclusiones y perspectivas. Como ya se mencionó anteriormente la actividad que se obtuvo con esta técnica fue bastante alta y en cuanto a la cuantificación se prefirió hacer con el reactivo de Bradford ya que es más estable hasta por 6 meses, la liofilización se llevó a cabo para una mayor concentración de la proteína y una mayor estabilidad. La actividad en el gel de poliacrilamida fue la esperada para posteriormente la purificación.

Agradecimientos. A la unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología, al departamento de bioquímica, al M. en C. Rodrigo Martínez Zúñiga.

Referencias.

1. Fenwick B. (1994). Porcine pleuroneumonía, JAVMA 204: 1334-1340.
2. Fuller T; Thacker B; Mulks-m. (1996). A Riboflavin Auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Is Attenuated in Swine. Infect. Immun. 64:4659-4664.
3. Meyer, D; Fives-Taylor p. (1993)(characteristics of Adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to Epithelial Cell. Infect. Immun. 62:928-935.



1. INTRODUCCION.

En México, la producción y consumo de carne de cerdo es de gran importancia nacional; esta industria es afectada económicamente por una gran variedad de enfermedades que puede contraer el cerdo entre ellas se encuentra la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). Producida por el *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El conocimiento de su agente etiológico, constituye un elemento clave, tanto para el diagnóstico como para el control de la enfermedad; es un coco bacilo Gram Negativo, dotado de poderosos factores de virulencia entre los que destacan toxinas RTX; esta es una enfermedad de vías respiratorias, que se presenta a nivel mundial; esta bacteria induce una neumonía fibrinohemorrágica que eventualmente desencadena la muerte de los cerdos.

El cerdo es el único portador natural de *A. pleuropneumoniae*, aislándose del aparato respiratorio, siendo fundamental el contacto estrecho entre enfermos y sanos, aunque en algunos cerdos los brotes se han observado la difusión entre granjas sin intercambio de animales, lo que parece sugerir el contagio por aerosoles a medias distancias o la difusión mediante los empleados, a través del vestuario o mediante la intervención de invertebrados artrópodos como moscas y mosquitos de forma experimental no se ha podido obtener transmisiones con aerosoles a distancias superiores a 1 m.

Los animales con infección crónica y los portadores asintomático se consideran las fuentes principales de infección, especialmente cuando son introducidos en poblaciones libres. En los portadores asintomático, recuperados clínicamente de la enfermedad, los microorganismos sobreviven en la cavidad nasal o en las lesiones necrotico-hemorrágicas del pulmón, por lo que se convierten en focos de infección peligrosos.

La supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en el medio ambiente es escasa (1-2 días), aunque puede prolongarse protegido por el mucus u otro tipo de material orgánico. Las bajas temperaturas no parecen reducir su viabilidad, al menos en algunas condiciones.

La pleuroneumonía puede adoptar formas sobreaguda, aguda o crónica. Las dos primeras se dan en explotaciones indemnes, infectadas por primera vez, mientras que la crónica se relaciona con áreas endémicas.

La forma sobreaguda aparece súbitamente, con apatía, pérdida de apetito e hipertermia seguido ocasionalmente de vómitos, diarrea ligera, tos, epistaxis o movimientos masticatorios. A las pocas horas, los animales se tienden en el suelo sin signos respiratorios claros, pero con aceleración manifiesta del pulso y comienzo de fallos cardiaco y circulatorio que conducen a una cianosis generalizada de piel y mucosas.

En la fase terminal hay una sintomatología respiratoria acusada, con disnea intensa y respiración bucal, poco antes de la muerte suele producirse una abundante descarga sanguinolenta a través de boca y hocico. La muerte sobreviene en el transcurso de las primeras veinticuatro horas, pero en algunos casos, sobre todo en lechones, ocurren tan rápidamente que no llegan a observarse síntomas. También se han descrito abortos.



FOTOS DE CERDOS CONTAGIADOS POR LA BACTERIA.



FOTO 1. Cerdo con sospecha de haber adquirido la bacteria de Actinobacillus pleuropneumoniae.



FOTO 2. Aborto de cerdos por causa de la (PCP)



FOTO 3. Infección bacteriana secundaria sobreaguda se presenta en forma de muerte súbita con espuma sanguinolenta En boca y nariz.



FOTO 4. En la necropsia, los pulmones de cerdos que han desarrollado la forma sobreaguda de la pleuroneumonía

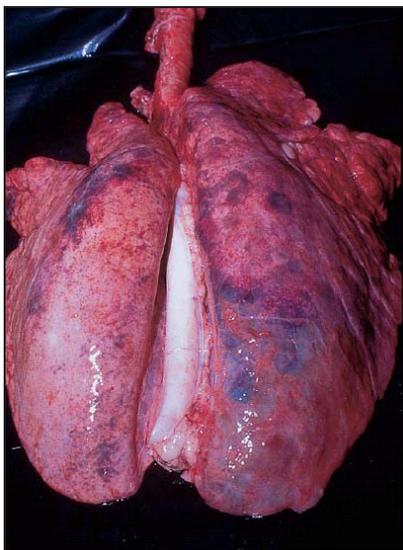


FOTO 5. Se observa en la necropsia áreas de consolidación pulmonar con apariencia nodular.



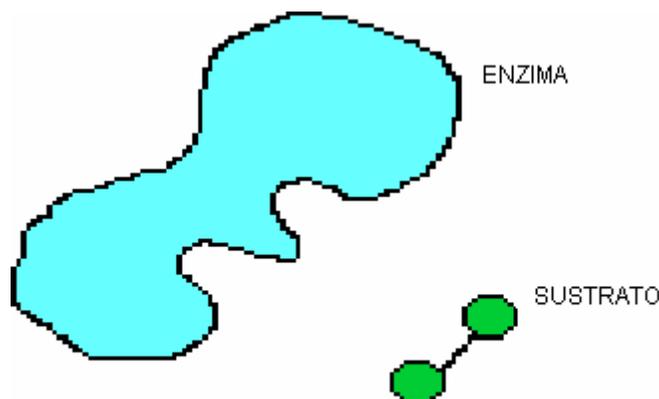
1.1 DEFINICION DE ENZIMA.

Las enzimas en **griego in ferment**, son biocatalizadores compuestos por una parte proteica llamada apoenzima y una no proteica llamada coenzima, que en su totalidad son moléculas de proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos, disminuyendo el nivel de la "energía de activación" propia de la reacción. Se entiende por "energía de activación" al valor de la energía que es necesario aplicar (en forma de calor, electricidad o radiación) para que dos moléculas determinadas colisionen y se produzca una reacción química entre ellas. Generalmente, las enzimas se nombran añadiendo la **terminación "asa"** a la raíz del nombre de la sustancia sobre la que actúan.

Las enzimas no reaccionan químicamente con las sustancias sobre las que actúan (que se denominan **sustrato**), ni alteran el equilibrio de la reacción. Solamente aumentan la velocidad con que estas se producen, actuando como catalizadores. La velocidad de las reacciones enzimáticas dependen de la concentración de la enzima, de la concentración del sustrato (hasta un límite) y de la temperatura y el pH del medio.

La característica más sobresaliente de las enzimas es su elevada especificidad. Esta es doble y explica que no se formen subproductos:

- Especificidad de sustrato: el sustrato (s) es la molécula sobre la que la enzima ejerce su acción catalítica.
- Especificidad de acción. Cada reacción esta catalizada por una enzima especifica.





1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.

En función de su acción catalítica específica, los enzimas se clasifican en 6 grandes grupos o clases:

- Clase 1: OXIDORREDUCTASAS
- Clase 2: TRANSFERASAS
- Clase 3: HIDROLASAS
- Clase 4: LIASAS
- Clase 5: ISOMERASAS
- Clase 6: LIGASAS

1.3 HIDROLASAS

Hidrolasas: Es un grupo muy numeroso que comprende cerca de 200 enzimas. Poseen en común la capacidad de introducir los elementos del agua (H⁺ y OH⁻), en el sustrato atacado produciendo así una hidrólisis.

Catalizan las reacciones de hidrólisis:



Tipos:

- Lipasa
- Proteasas
- Amilasas
- Fosfatasas



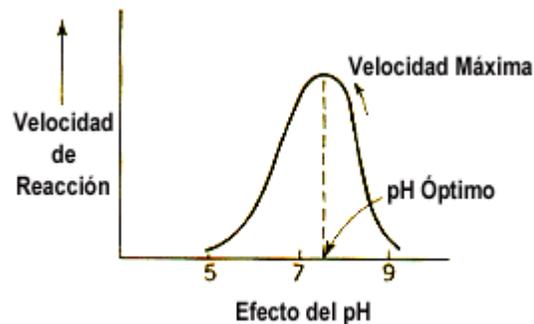
1.4 FOSFATASAS.

El fósforo es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento de este tipo de enzimas. Las enzimas de la fosfatasa son de tipo hidrolíticas donde estas catalizan la hidrólisis de los ésteres glicero fosfóricos, se consideran reguladoras del fosfato, pero su función de esta en la célula, no es muy conocida debido al gran número y homogeneidad de las fosfatasas.

Estas enzimas catalizan la reacción: monoéster del ácido ortofosfórico + H₂O = alcohol (fenol) + ortofosfato. Las fosfatasas alcalinas son además hidrolasas de ciertos compuestos fosfoanhídridos como adenosin, inosin y uridinfosfatos, tiaminpirofosfato y pueden catalizar ciertas reacciones fosfotransferasas.



El pH óptimo para las fosfatasas ácidas es entre 4 y 5, y para las fosfatasas alcalinas entre 9 y 10. Las fosfatasas ácidas se localizan en los lisosomas. Las fosfatasas alcalinas se localizan en membranas celulares donde hay transporte activo como en el endotelio de arteriolas y capilares, retículo endoplasmico, aparato de Golgi y vesículas de pinocitosis





1.5 FOSFATASAS ACIDAS.

La fosfatasa ácida también conocidas como fosfatasas de bajo peso molecular, las cuales se han reportado en estudios en mamíferos, levaduras y bacterias donde son secretadas fuera de la membrana plasmática donde ellas son lanzadas al limite de la membrana de la proteína.

Algunas fosfatasas ácidas asociadas a la membrana se caracterizan en diferentes microorganismos infecciosos las cuales son secretadas al medio de cultivo y otras liberadas por proteasas. Su pH optimo va entre 4.5 y 5.5 y sus sustratos mas utilizados son el metil umberil fosfato (MUP) y p-nitrofenilfosfato (pNPP), su purificación se lleva a cabo por medio de cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico, su peso molecular van de 18KDa a 130KDa.

Mediante el uso de técnicas de microscopia electrónica y fraccionamiento subcelular, Gottlieb y Dwyer (1981), demostraron que la mayor parte de la actividad de la fosfatasa ácida asociada a las células esta localizada en la superficie externa del parásito. También encontraron que la actividad de la fosfatasa ácida en la superficie de los promastigotes es resiente a L-(+)-tartrato, un inhibidor específico de fosfatasas al cual son sensibles las fosfatasas ácidas; esta actividad, al ser fraccionada por cromatografía de intercambio iónico (QAE-sephadex) y analizada en geles en condiciones no desnaturalizantes, mostró estar constituida por al menos tres componentes con las siguientes propiedades.



fosfatasas	Abundancia relativa (%)	Punto isoelectrico	pH optimo	Peso molecular
ACP1	80	4.1-0.25	5.5	120.000
ACP2	10	5.4-0.14	5.2	108.000
ACP3	10	7.1-0.05	5.0	133.000

Tabla 1. Propiedades de las fosfatasas ácidas (ACP).

Esta técnica es una opción para determinar la actividad en el gel de poliacrilamida.

FOSFATASAS ÁCIDAS, método de Gomori.

(Modo de acción) Las hidrolasas (fosfatasas) introducen una molécula de agua H₂O en el glicerofosfato (sustrato) dejando en libertad el ácido fosfórico PO₄H₃, que reacciona inmediatamente con el nitrato de plomo Pb(NO₃)₂, formando fosfato de plomo (incolore), que al enfrentarse al Sulfuro de amonio da sulfuro de plomo de fuerte color pardo.

1°.- Cortes frescos o fijados en formol.

2°.- Incubarlos a 37 °C en la Solución incubadora. (1-2 horas, en cortes por congelación. y 8-12 horas en cortes de parafina hidratados).

3°.- Lavar bien los cortes con AD.

4°.- Poner en acético al 1% en AD, dos minutos.

5°.- Lavar bien en AD.

6°.- Introducir en solución de sulfuro amónico amarillo al 2%, 2 minutos.

7°.- Lavar en agua corriente y montar con glicerina, o deshidratar aclarar y montar con depex..

Resultados.- Los lisosomas tienen un color pardo oscuro.



2. JUSTIFICACION.

La pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), ocasionada por Actinobacillus pleuropneumoniae es una enfermedad respiratoria para los cerdos la cual trae como consecuencia grandes pérdidas económicas para la industria porcícola a nivel internacional y mundial.

El Actinobacillus pleuropneumoniae es un coco bacilo Gram negativo. Dotado de poderosos factores de virulencia entre los que destacan toxinas RTX.

La enfermedad en los cerdos se presentan en fase aguda, grave y sobre aguda; con signos de fiebre, baja en el consumo de alimentos, dificultad para respirar, tos, en algunos casos vomito y posteriormente la muerte.

Puede transmitirse por vía indirecta (viento, herramientas, personal, equipo, etc.). Aunque la manera más común de transmisión es por la introducción de animales infectados a las granjas.

Desgraciadamente no hay información suficiente sobre este microorganismo causante de esta enfermedad; al no tener la patogenicidad y fisiología. Ocasiona que no podamos manejarla y tratarla correctamente.

En esta bacteria no se han reportado la presencia de fosfatasa ácida pero estudios preliminares en nuestro laboratorio nos han permitido definir su presencia en el periplasma de la misma, por lo que en este proyecto pretendemos, extraer y purificar esta enzima con técnicas ya conocidas y económicas.

Por otra parte; en cualquier proceso de purificación este paso es el más costoso por lo cual el propósito de este es que la purificación de la fosfatasa ácida de Actinobacillus pleuropneumoniae sea económica y sencilla, comparada con los equipos tan costosos que existen en el mercado.



3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- Establecer un método para determinar actividad y purificación parcial de la fosfatasa ácida de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Obtención del extracto crudo.
- Determinación de actividad de fosfatasa ácida.
- Realizar ensayos de concentración del extracto.
- Electroferograma del extracto.
- Obtención de la enzima purificada a partir de electroferograma.



4. METODOLOGIA.

4.1 Cepas y cultivos bacterianos.

Se emplean para este proyecto la cepa shope de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 donadas por la Dra. Mireya de la Garza Amaya del laboratorio 52 del departamento de biología celular del CINVESTAV, todos los cultivos se crecen en medio Luria bertani con glucosa (LBG). Líquido y las cepas se mantienen en agar del mismo medio de cultivo o en BHI (infusión cerebro corazón); en cualquier caso el medio es suplementado con NAD (nicotin adenosin dinucleotido) (10µg/ml). Para todos los ensayos se emplean cultivos de toda la noche, a menos que se especifique lo contrario.

4.2 Lavado de células.

Se centrifuga el cultivo 5000rpm/20min, recuperar la pastilla y resuspender con amortiguador (Tris 10nM pH 8.4) y volver a centrifugar 5000rpm/20min, recuperar la pastilla y resuspender con el regulador.

4.3 Extracción de la enzima a partir de las células.

A la pastilla resuspendida con Tris adicionar desoxicolato de sodio a una concentración de 1g/L, agitar durante 30 min./37°C/180rpm, después centrifugar a 5000rpm/15min/25°C colectar el sobrenadante libre de células y almacenar a -25°C hasta su uso. Siendo este nuestro extracto crudo, se debe medir actividad y determinar la cantidad de proteínas presentes.

4.4 Determinación de actividad de fosfatasa ácida.

Se preparan 450µL de sustrato para fosfatasas p-nitrofenilfosfato (p-NPP) 7.6 mM en amortiguador de acetatos pH 5.5 se agregan 50 µl de la muestra problema, incubar a 37°C durante 4hrs, al termino de la incubación la reacción se detiene con 1.1 ml NaOH 1M, dejar reposar por 15 minutos y leer en el espectrofotómetro a una absorbancia de 415nm.

Preparar un blanco con 50 µl de amortiguador más 450µl de sustrato para fosfatasas pNPP y adicionar también 1.1ml NaOH 1M.

4.5 Cuantificación de proteínas.

Colocar 150 µl de cloruro de sodio + 50µl de muestra problema, adicionar 1.5ml del reactivo de Bradford y leer a 595nm preparar un blanco con 200µl de cloruro de sodio + 1.5ml del reactivo de Bradford.

4.6 SDS-PAGE de proteínas periplasmicas.

La separación electroforética de las proteínas del extracto se realiza en un gel de poliacrilamida al 10% o 12%. Una de las muestras se trata con β-mercaptoetanol con reactivó de laemmli y se calienta durante tres minutos y el otro solo con reactivo de laemmli sin calentar, el corrimiento se realiza a 100V, las bandas de proteína se tiñen con azul de coomassie o bien con plata.



4.7 Determinación de la actividad enzimática en el gel de poliacrilamida.

El gel obtenido después del corrimiento electroforetico se sumerge en amortiguador de renaturalización durante 4h con varios cambios del amortiguador (Tris-HCL 100mM de pH 7.0 MgSO₄ 1mM, ZnSO₄ 0.05mM, MgCL₂ 1Mm y Triton X-100 1% v/v). A continuación se sumerge el gel en el amortiguador al pH deseado durante 1h con varios cambios del mismo, finalmente se le adiciona el sustrato y se deja actuar durante 1h a 37°C.

Al concluir este tiempo se enjuaga y se trata con la mezcla de revelador a 42°C hasta la aparición de las bandas. El revelador es una mezcla 6:1 v/v de molibdato de amonio acidificado y ácido ascórbico (4.2g/l de molibdato de amonio y 28.6 ml/l de ácido sulfúrico: ácido ascórbico al 10% p/v). Alternativamente si el sustrato fue pNPP, las bandas se pueden evidenciar alcalinizando la solución que contiene al gel con NaOH 1M.

Otra opción para la determinación de la actividad de la enzima puede ser el método de Gomori. Que ya se menciona anteriormente.



5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 Cepas y cultivos bacterianos.

Al principio se presentaron varios problemas para mantener la cepa viable; debido a que esta, es muy sensible a la manipulación. los problemas principales fueron la muerte total de la cepa y la rápida contaminación, lo cual trajo como consecuencia que no permitía trabajar adecuadamente, después de tomar experiencia con la cepa se pudo manipularla satisfactoriamente, como la temperatura de congelamiento es de -25°C , puede permanecer hasta 6 meses viable con glicerol al 60% ; también se determino que al estarlo manipulándolo; este microorganismo es muy débil , al saber esto se trabaja con extremas medidas de esterilidad sin olvidar el cofactor NAD (nicotin-adenosin-dinucleotido). Para su crecimiento. No olvidar que al día siguiente de la resiembra volver a resembrar un control pero este sin NAD para corroborar que esta sea *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Todos estos procedimientos dichos anteriormente se realizan también para las extracciones en medio líquido, esto para verificar que la enzima deseada sea del microorganismo de nuestro interés.

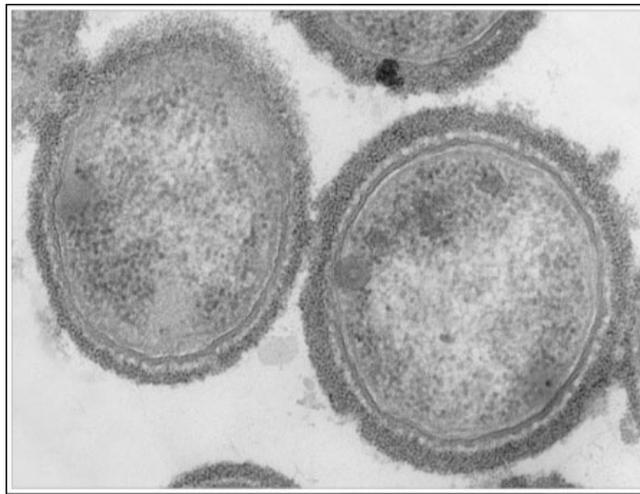


FOTO 6. *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



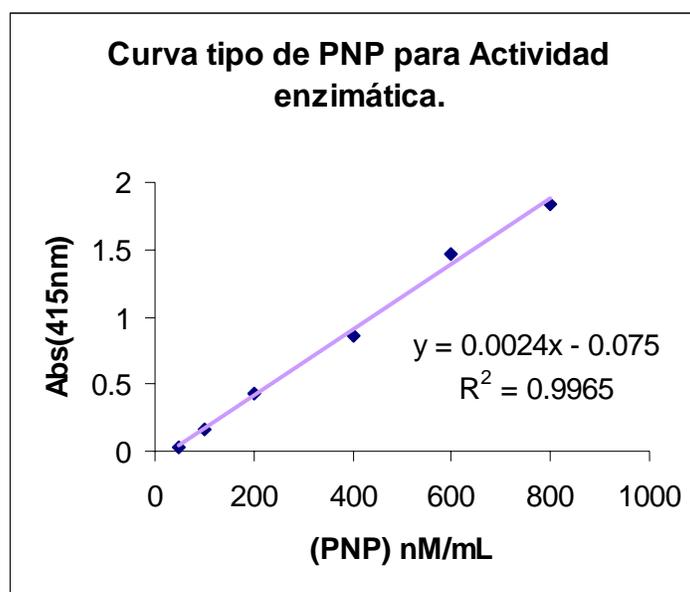
5.2 Curva tipo de PNP.

Esta curva tipo se construye para evaluar la actividad enzimática. Se emplearon concentraciones de 50 a 800 nM/mL, en volúmenes de 50 μ L, también se utilizaron reactivos reguladores de acetatos 0.2M pH 5.5 e hidróxido de sodio 1M.

[PNP]
(nM/mL) Abs
(415nm)

50	0.0321
100	0.1667
200	0.4342
400	0.8624
600	1.462
800	1.835

Tabla 2. Absorbancias obtenidas de la curva tipo de PNP para actividad enzimática.



Gráfica 1. Curva de PNP en la cual se observa una tendencia lineal, con concentraciones de 50 a 800 nM/mL.

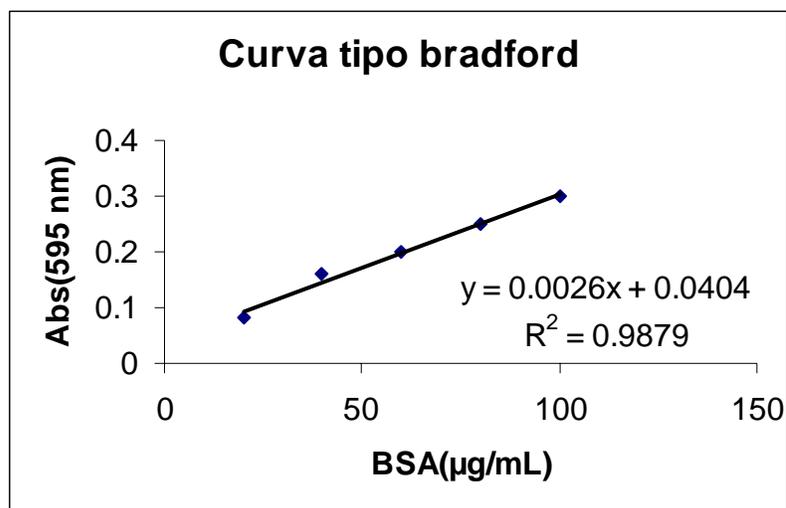


5.3 Cuantificación de proteínas.

Se realizaron pruebas con diferentes métodos (Lowry, Folin-Ciocalteu y Bradford). Para determinar el más factible. De todos los anteriores el que fue mas practico de manipular y duradero es el de Bradford, los reactivos son estables hasta 6 meses, es rápido, conocido y común para cuantificar proteínas. Pero se debe de tener cuidados para que no se contamine ya que este es muy susceptible a contaminarse.

BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (595nm)
20	0.082
40	0.16
60	0.201
80	0.25
100	0.301

Tabla 3. Absorbancias obtenidas en la cuantificación de proteínas por Bradford.



Gráfica 2. Curva tipo para cuantificar proteínas (Bradford).

La curva tipo para la cuantificación de proteínas donde se utilizo como proteína patrón Albúmina Serica Bovina (BSA) ya que esta es la mas común para este tipo de ensayos, las concentraciones utilizadas fueron de 0 a 50 $\mu\text{g/mL}$ y se completa el volumen correspondiente con NaCl 0.15M de 150 a 200 $\mu\text{g/ml}$ y se le agrega el reactivo de Bradford se leen en el espectro con una longitud de onda de 595nm.



5.4. Actividad enzimática y concentración de proteínas

Para llevar a cabo la actividad enzimática se trabajó con la metodología antes mencionada, la obtención del extracto se realizó a 4000 rpm durante 30 minutos esto se realizó de esta manera por que a mayor agitación obtenemos una mayor actividad y de este mismo modo se determinó la concentración de proteína; las absorbancias obtenidas se muestran en la siguiente tabla.

	MUESTRA
Actividad (As)	1.633
(Proteína)	0.805

Tabla 4. Absorbancias de actividad y de la proteína.

Para calcular unidad de enzima:

$$Y=0.0024x - 0.075$$

$$R^2 = 0.9965$$

$$x=0.075+Y/0.0024$$

$$x=711.66/120 \text{ min.}$$

$$x=5.930 \text{ uz/min.}$$

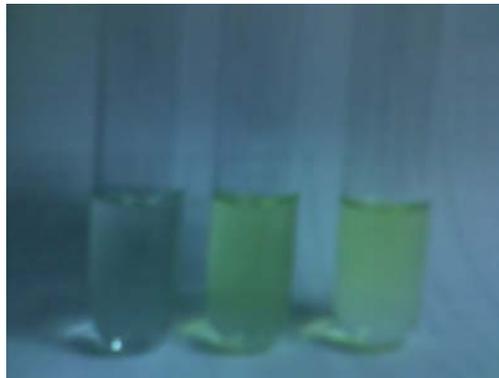


FOTO 7. Se observa la actividad dando una Tonalidad de amarillo y el blanco incoloro

Nota: las unidades de enzima se utilizan para determinar si el extracto sirve para la liofilización ya que es necesario que el extracto a liofilizar tenga una actividad muy alta para que en el gel pueda expresarse para su purificación.



5.5. Electroferograma del extracto.

En este punto del proyecto se tuvo un problema el cual provoco el retraso, consistió de que el gel de poliacrilamida no permitía expresar bien las muestras esto trajo como consecuencia que no se pueda ver nada en el gel, se revisó las cantidades de cada solución para la elaboración de este, lo cual no era el problema, también checamos las soluciones como amortiguadores, acrilamida-bisacrilamida, temed, persulfato de amonio. Después de estar checando todo lo anterior se pudo determinar que el problema era el persulfato de amonio ya que este no polimerizaba y trajo como consecuencia que el gel no polimerizaba correctamente.

Cambiando el persulfato de amonio el gel de poliacrilamida polimerizo de forma correcta y permitió la expresión de las bandas de las muestras con β -mercaptoetanol como se observa en la foto 9; de acuerdo con lo reportado en artículos nos dice que el peso molecular aproximado de estas fosfatasa ácidas es aproximadamente de 18 KDa a 130KDa con lo cual estamos corroborando que efectivamente el liofilizado que se desarrollo del extracto es una fosfatasa ácida.

Para preparar la muestra utilizamos una técnica llamada precipitación de solventes la cual consistía en agregarle agua desionizada, cloroformo, alcohol; posteriormente se centrifugaba a 3000rpm durante 3 minutos se forma una pequeña tela de proteínas, con mucho cuidado se elimina el sobrenadante para dejar únicamente la proteína. A esta se le disuelve con reactivo de laemmli con β -mercaptoetanol y esta lista para cargarse en el gel.

Un problema que surgió con esta técnica fue que la proteína que se obtenía de esta forma no era la suficiente para que se pudiera expresar en el gel y que trae como consecuencia que no se lograban ver las bandas bien definidas.

Esto fue resuelto liofilizando el extracto con una actividad muy alta y de esta forma es mucho mas fácil y práctico para preparar las muestras, de esta forma se conserva mas y puede manipularse a la hora que sea necesaria, rápidamente. Lo único que se hace es pesar cierta cantidad del liofilizado y disolverlo en reactivo de laemmli.



FOTO 8. Liofilizado del extracto con una actividad de 1.633.

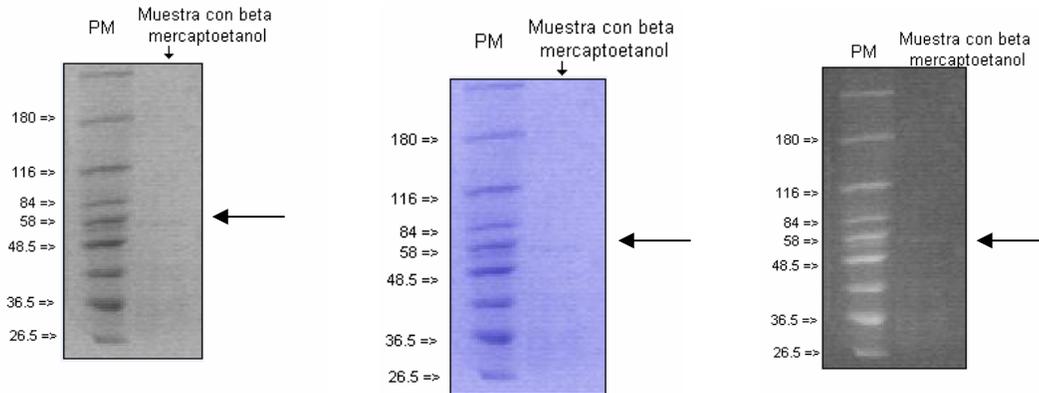


FOTO 9. Expresión del extracto en el gel de poliacrilamida se observa la banda.

En la foto anterior en la parte izquierda el marcador de peso molecular y en el derecho se logra observar una ligera banda la cual es la que estamos buscando se encuentra entre 58 y 84 KDa.



5.6. Determinación de actividad en gel de poliacrilamida.

Para la determinación de la actividad en gel, lo primero que debemos de tomar en cuenta es que la preparación de la muestra se realiza pesando primero el liofilizado y se disuelve en 100 μ l de reactivo de laemmli.

Lo siguiente es hacer los geles de poliacrilamida para posteriormente cargarlos con los 100 μ l del extracto disuelto en reactivo de laemmli, cada pozo tiene un volumen de 25 μ l.

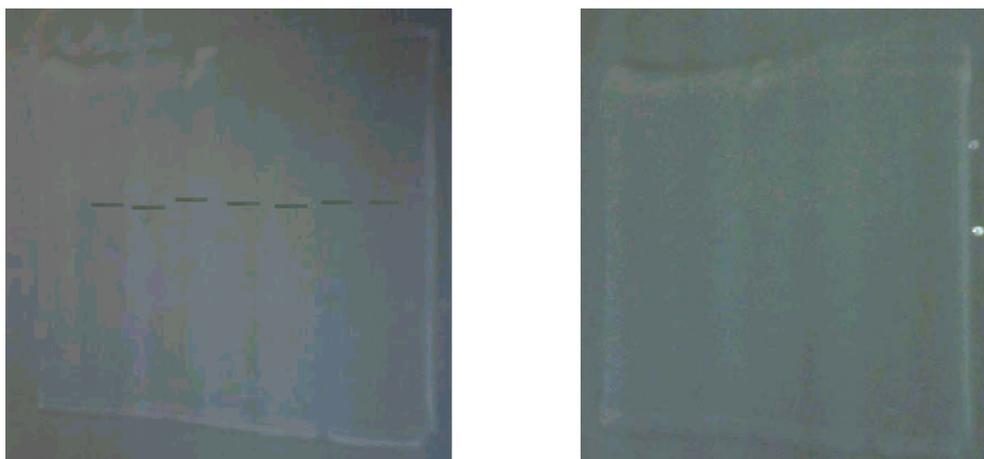


FOTO 10. Gel de poliacrilamida; se observa la actividad formándose las bandas momentáneamente con un color amarillo.

Este fenómeno es momentáneo una vez que salio el gel se sumerge en Triton X-100 al 2.5% durante 1 hora; posteriormente se sumerge en amortiguador de activación con un pH de 7 por 12 horas a 37°C.

Finalizando se saca el gel y se pone en un papel filtro, el cual esta mojado con p-NPP y es cuestión de segundos cuando aparecen las bandas de color amarillo indicando donde se encuentra la proteína que estamos buscando; en ocasiones no es suficiente el p-NPP y se le agrega NaOH para que este reaccione y evidencie las bandas.

Por ultimo para la purificación de la fosfatasa se corta con mucho cuidado el gel verificando que se corte donde se haya evidenciado la proteína para que este se sumerga en Tris con un pH de 8.4; y se deja en agitación durante 12 horas para posteriormente extraer el Tris y determinar en este la actividad de la proteína.

Se determina la actividad de la misma forma que en el gel se le agrega p-NPP y se deja reposar durante 2 horas. posteriormente se le adiciona NaOH e inmediatamente se observa un color amarillo el cual es indicativo de que en el tris se encuentra la fosfatasa ácida.



6. Conclusiones.

☒ La manipulación del *actinobacillus pleuropneumoniae* es muy difícil y muy sensible por lo que se recomienda sembrar cada 10 días.

☒ De acuerdo con las diferentes pruebas para la cuantificación de proteínas el más factible fue el de Bradford por que es fácil de trabajar y es estable hasta seis meses.

☒ En cuanto a la actividad enzimática en general fue bastante alta y la cuantificación de igual forma.

☒ El cambio de técnica para la precipitación de la proteína fue adecuada debido a que la de precipitación por solventes obtenía una baja concentración la cual no era suficiente para que al momento de cargar el gel esta se expresara; por lo que se determinó hacer una liofilización del extracto con una actividad alta y se observó que la expresión de la banda en el gel es bastante buena como se observa en la foto 9.

☒ En la elaboración del gel de poliacrilamida una vez resuelto el problema la expresión de las bandas son bastantes buenas y se puede determinar que lo que se liofilizó es una proteína que tiene el peso molecular aproximadamente de 58 a 84 KDa.

☒ En la determinación de la actividad en gel de poliacrilamida resultó satisfactoria la prueba, por lo que el siguiente paso ha seguir es la extracción de la proteína.

☒ En la extracción de la proteína la actividad que se observó es bastante buena por lo que la técnica utilizada es confiable para la purificación.

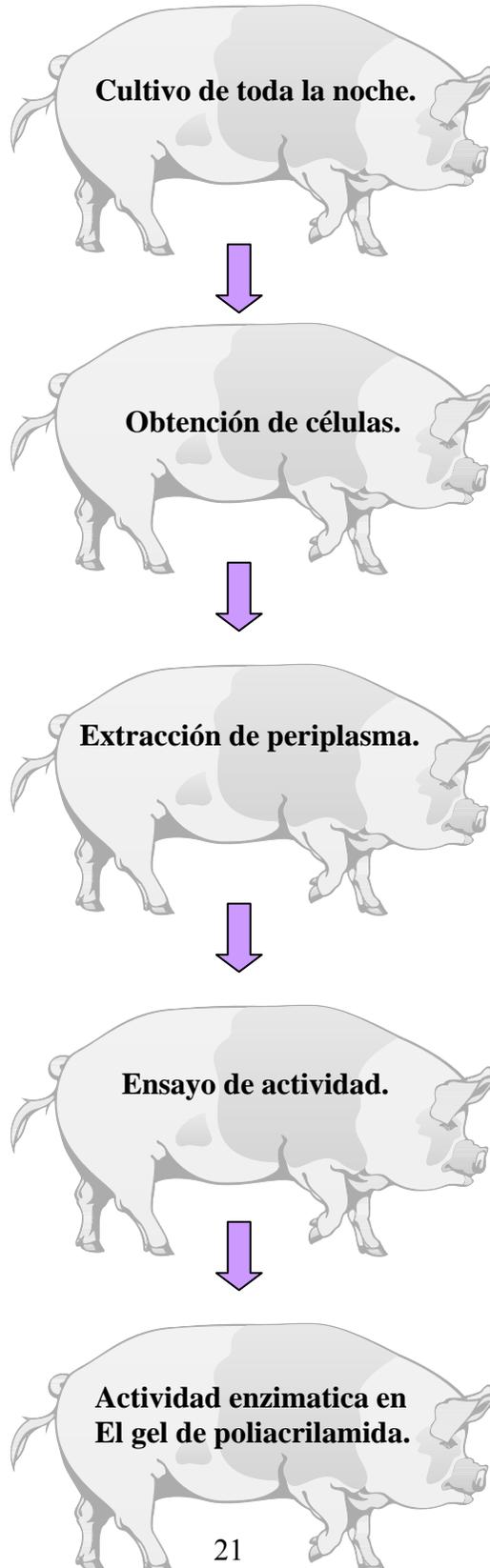


7. PERSPECTIVAS PARA TRABAJO A FUTURO.

- Determinar la funcionalidad de la enzima en la bacteria.
- Realizar investigaciones de patogenicidad de la enzima en la bacteria.
- Una vez que la enzima esta purificada el paso siguiente es hacer un protocolo de inmunización para la elaboración de una vacuna.
- Una vez inmunizado el animal hacer un estudio de la formación de antígenos contra este anticuerpo.
- Verificar que efectivamente la formación de antígeno- anticuerpo identifique para todos los tipos de serotipos que existen de esta bacteria.



7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.





7.1 MATERIALES Y METODOS.

Preparación de medios de cultivo.

- **Agar infusión cerebro corazón (BHI).**
Pesar 52g y diluirlos en 1000ml de agua destilada
- **Caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI).**

INGREDIENTES	CANTIDAD
Infusión de cerebro de ternera	200g
Infusión de corazón de res	250g
Peptona de gelatina	10g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato disodico	2.5g
Dextrosa	2g

Tabla 5. Ingredientes del caldo infusión cerebro y corazón.

pH final = 7.4+(-)0...2

Disolver 37g de polvo en un litro de agua destilada, si es necesario calentar suavemente para disolverlo.

Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos, para obtener buenos resultados el medio debe utilizarse el mismo día de su preparación.

- **Caldo Luria Bertani (LB).**
Para 1000ml de medio de cultivo

INGREDIENTES	CANTIDAD
Peptona biotriptasa	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de sodio	5g
Glucosa	5g

Tabla 6. Ingredientes del caldo Luria Bertani.

Agregar 900ml de agua destilada y ajustar pH entre 7 y 7.4, se recomienda que se deje a un pH 7.2 una vez ajustado el pH aforar con agua destilada a 1000ml.

- **Nicotin adenosin dinucleotido (NAD).**
Preparar una solución de NAD de 10mg/ml, una vez preparado el reactivo se esteriliza por medio de filtración y se almacena a 4°C hasta su uso.



Reactivos para actividad enzimática.

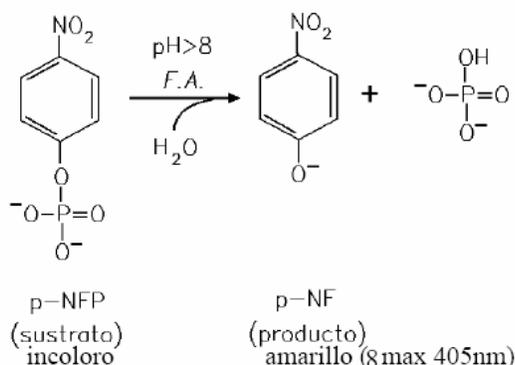
➤ P-nitrofenil

Para preparar 1mg/ml se pesa 1mg de p-nitrofenil y se disuelve en 1ml de agua destilada. Para realizar una disolución 1:10 se toma 0.1ml de p-nitrofenil y se disuelve en 0.9ml de regulador de acetato.

➤ P-nitrofenilfosfato 5mM

PM=371.1g

Para preparar 1000ml. Se pesa 1855.5g de p-nitrofenilfosfato y se disuelve en 1000ml de regulador de acetatos.



➤ Hidróxido de sodio

PM=40g/mol

$M = \frac{g(\text{solute})}{(PM * VOL)}$

Despejando gramos queda: $g(\text{solute}) = M * PM * V$

➤ Desoxicolato de sodio a 0.5%

50mg en 10ml para que quede 0.5g en 100ml

➤ Regulador de acetato de sodio 0.2M

PM=82.04g/mol

$M = \frac{g(\text{solute})}{(PM * Volumen)}$

Despejando $g(\text{solute}) = M * PM * V$

Reactivos para el metodo de Bradford.

➤ Preparacion de NaCl 0.15M

Pesar 0.8766g de cloruro de sodio disolverlo en agua desionizada y aforar a 100ml almacenar a 4°C hasta su uso.



➤ **Preparación de Albúmina Serica Bovina (BSA) 1mg/ml**

Pesar 10mg de BSA y disolverlo en 10ml de NaCl 0.15M, aforar a 100ml. Esta solución se prepara en el momento que se va a utilizar.

Gel de electroforesis 10%.

Gel separador 10%

	1 vidrio	2 vidrio
Amortiguador 4X pH 8.8 1.5M.....	1.50mL	2.40mL
Acrilamida- bisacrilamida.....	1.98mL	3.17mL
Agua desionizada.....	2.54mL	4.06mL
Temed	30µL	48µL
Persulfato de amonio (PSA).....	60µL	96µL

Gel concentrador

Medir:

Acrilamida-bisacrilamida.....	0.33mL	0.66mL
Amortiguador 4X Ph 6.8 0.5N.....	0.50mL	1.00mL
Agua desionizada.....	1.16mL	2.32mL
Temed 8.4%(v/v).....	13µL	26µL
Persulfato de amonio (PSA).....	27µL	54µL

Amortiguador 4X pH 6.8.

Tris-OH.....	6.055g
SDS 20%.....	2.0mL
Agua desionizada cbp.....	100mL
Ajustar pH antes de aforar	
Filtrar a 0.45µm	

Amortiguador 4X pH 8.8.

Tris-OH.....	18.16g
SDS 20%.....	2.0mL
Agua desionizada cbp.....	100mL
Ajustar pH antes de aforar	
Filtrar a 0.45µm	

Acrilamida-bisacrilamida 30%.

Acrilamida.....	73.0g
Bisacrilamida	2.0g
Aforar a 200mL de agua desionizada	
Filtrar en papel whatman #1	



Amortiguador de corrida 10X pH 8.3

Glicina144.1g
Tris base.....30.2g
SDS.....10.0g
Agua destilada cbp....1000mL
Ajustar pH antes de aforar

Reactivó de laemmli con β -mercaptoetanol.

SDS.....2g
Glicerol.....10mL
 β -mercaptoetanol.....5mL
Azul de bromofenol.....0.001g
Agua desionizada cbp...100mL

Azul de coomase.

Azul de coomasie R-250.....2.5g
Metanol.....400mL
Ácido acético.....70mL
Agua destilada cbp.....1000mL

Tris 10 mM pH 8.4

1.2114g de Tris, 1000ml de agua destilada.
Ajustar el pH a 8.4.



8. TECNICAS.

➤ Preparación de placa para cultivo de AP.

Prepara 200ml de agar infusión cerebro corazón, esterilizar el medio y adicionar 100µl NAD por 100ml de medio de cultivo, vaciar en placa en estado de esterilidad, incubar las placas durante toda la noche para comprobar su esterilidad de las placas, después sembrar por estría cruzada la cepa.

➤ Método de congelación.

Utiliza glicerol 60% estéril

Se mezcla el cultivo nuevo con el glicerol 1:1, se mete a congelar y se va resemebrando el lro en 15 días y los siguientes después de cada semana así se ve cual es la resistencia de la bacteria y su resistencia ideal.

➤ Reactivo de Bradford.

Azul de coomassie G-250

Etanol 95%

Ácido fosforico (H₃PO₄) 85%

Disolver 100mg de azul brillante de coomassie G-250 en 50ml de etanol al 95% a esta solución se le agrega 100ml de ácido fosforico al 85% y aforar con agua destilada a 1 litro. Agitar durante toda la noche y filtrar la solución con papel whatman, guardar el reactivo a 4°C hasta su uso.

El reactivo se mantiene estable hasta por 6 meses.

➤ Electroferograma.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida se fragmenta en 2 partes el gel “stacking” y el gel “separating”.

Gel “stacking”.

- Menor concentración de archilamida.
- Tamaño de poro mayor.
- pH ácido neutro.

Función: acumular las proteínas a la entrada del gel separador para que salgan al mismo tiempo.

Gel “separating”.

- Mayor concentración de archilamida.
- Tamaño de poro menor.
- pH alcalino.

Función: separar las proteínas.



FIG.1. fragmentación del gel de poliacrilamida



9. BIBLIOGRAFIA.

1. Fenwick B.(1994). Porcine pleuroneumonía, JAVMA 204: 1334-1340.
2. Fuller T; Thacker B; Mulks-m. (1996). A Riboflavin Auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Is Attenuated in Swine. *Infect. Immun.*64:4659-4664.
3. Meyer, D; Fives-Taylor p. (1993)(characteristics of Adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to Epithelial Cell. *Infect. Immun.* 62:928-935.
4. Nicolet J.(1992). *Actinobacillus pleuropneumoniae* Capitulo 31:401-408.
5. Bioquímica, mathews van holde, 2ª edición. Editorial Mc Graw hill, 200 Madrid.
6. *journal of biotechnology*. Volumen 45 revista #2.25 february 1995 155N0168-1656.
7. Enciclopedia microsoft® encarta ® 2002.©1993-2001 microsoft corporation. Reservados todos los derechos.
8. purificacion parcial de una enzima fosfatasa acida, noel tejeda, marleni olivera, carmen iribarne, carmen lunch. Departamento de fisiologia vegetal de ciencias, universidad de granada campus de fuentenueva s/n, 18071,granada.
9. *Archives of biochemistry and biophysics*, vol.242, #1, november 15, pp.150-160,1985.
10. *bioquimica* tomo 1. lubert stryer, 4ª edicion. Editorial REVERTE, S.A, 1995 barcelona.
11. *Archive of biochemestry and biophycis*, volumen #243, No.1, November 15, 1985.
12. *journal of biotecnology*, julio 2001, volumen 183#13.
13. Gionocchio, C, Pace , J, and Galan, J.E. (1992) Identification and molecular characterization of a salmonella typhimurium gene involved in triggering the internalization of salmonellae Into Cultured Epithelial Cells *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5976-5980.
14. Boyer P.D. Lardy H. And Mayback K. (1961) *The enzymes*, vol 5, Academic Press, New York.
15. Becham I R, 1979 *Periplasmic Enzymes in Gram-negative bacteria*. *Int. J. Biochem.* 10:877-883.
16. www.racve.es/muestra_actividad.php?id=124.
17. www.pcca.com.ve/va/articulos/va36pag39.html.
18. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/enzimas/>.
19. www.inegi.gob.mx/estadistica/español/economia/biosa/bio11.htm.
20. ENZIMAS:<http://www.arrakis.es/~lluengo/biologia.html>.
21. <http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ1.htm>.
22. <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/6/inf.htm>.



10. GROSARIO DE TERMINOS.

- **(PCP):** Pleuroneumonía contagiosa porcina.
- **PROMASTIGOTES:** Formas flageladas y móviles, se replican y diferencian en el intestino del insecto vector.
- **(ACP):** Fosfatasas ácidas.
- **(BHI):** Agar infusión cerebro corazón.
- **(LBG):** Medio luria bertani con glucosa.
- **(PNP):** Paranitrofenilfosfato.
- **(NAD):** Nicotin Adenosin Dinucleotido.
- **(BSA):** Albúmina serica bovina.
- **Toxinas RTX:** denominadas Apx (Apx-I a Apx-IV), codificadas por un conjunto de cuatro genes *apxACBD* dispuestos en tandem en un operón. El gen estructural (*apxA*) codifica para una proteína inactiva, que se activa por intervención del producto del gen *apxC* y que luego es transportada al exterior por mediación de los productos de expresión de los genes de transporte *apxC* y *apxD*. Las Apx son porinas y forman poros en las membranas celulares, lo que conduce a la lisis de sus células diana. Apx-I, Apx-II y Apx-III son citotóxicas para macrófagos alveolares y neutrófilos, pero solo las dos primeras son hemolíticas. La presencia de una y/u otra, depende de la cepa y el serotipo, de tal modo que algunos serotipos son capaces de producir diferentes combinaciones de dos de ellas, mientras que otros producen solo Apx-I o solo Apx-II. En algunos, se presentan operones truncados que contienen únicamente dos de los 4 genes aunque su función puede mantenerse a partir de los genes disponibles para el otro tipo de toxina.

Resumen de la producción de toxinas por los serotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i> .			
Serotipos	Apx I	Apx II	Apx III
1, 5 a, 5b, 9 y 11	+	+	
2, 3, 4, 6 y 8		+	+
7 y 12		+	
10	+		