

Método rápido y sencillo de extracción de proteínas en tejidos de *agave*

Rapid and simple method to protein extraction in *agave* plant tissues

Resumen

Este trabajo presenta un protocolo rápido de extracción de proteínas para tejidos de *Agave* para llevar a cabo estudios básicos de proteómica. Este método únicamente consta de tres pasos: maceración, homogenización y filtrado. Específicamente, se demuestra la obtención de rendimientos de hasta aprox. 120 mg de proteína total por gramo de peso fresco de tejido. Los extractos proteicos así obtenidos mantuvieron la actividad enzimática de catalasa y superóxido dismutasa. El protocolo de extracción definido en este trabajo mostró ser adecuado para la obtención de proteínas en su estado nativo, y por su simplicidad y rapidez, resulta muy útil para estudios iniciales de proteómica los cuales en muchos casos requieren en análisis de gran cantidad de muestras.

Palabras clave: *Agave*, extracción de proteínas totales, SDS-PAGE

Abstract

This paper presents a rapid protein extraction protocol for *Agave* tissues to carry out basic proteomic studies. This method consists of three steps: maceration, homogenization and filtering. Specifically we obtained average yields of 120 mg of total protein per gram of fresh weight of tissue. The protein extracts thus obtained maintained the enzymatic activity of catalase and superoxide dismutase. The extraction protocol defined in this work proved suitable for obtaining proteins in their native state, and for its simplicity and speed, is very useful for initial studies of proteomics, which in many cases require in analysis of large numbers of samples.

Keywords: *Agave*, total protein extraction, SDS-PAGE

Introducción

La familia de las Agaváceas abarca 20 géneros y unas 700 especies, las cuales se encuentran distribuidas preferentemente en las zonas tropicales y subtropicales, y son especialmente abundantes en regiones áridas de América. Se ha reconocido a México como lugar de origen de las principales especies con uso industrial, entre ellas el *agave azul* (*Agave tequilana*), maguey (*A. americana*) y henequén (*A. fourcroydes*) (García-Mendoza & Galván-Villanueva, 1995; García-Mendoza 2007). En México, el cultivo de agaves ha tenido una gran importancia desde antes de la colonización, siendo reconocido mundialmente por la producción de bebidas alcohólicas a partir de estas plantas. *Agave tequilana* Weber var. Azul es la especie más cultivada para estos fines, a partir del cual se obtiene el tequila, licor de alta demanda internacional (Flores-Berrios et al., 2005).

Las agaváceas se caracterizan por desarrollarse en hábitats con condiciones extremas como déficit hídrico, elevada irradiación solar y temperatura, suelos pobres nutricionalmente y escasos (Martínez-Hernández et al., 2007). Lo anterior es posible debido a adaptaciones metabólicas y fisiológicas que estas plantas han ido desarrollando a lo largo de la evolución. Entre estas características podemos mencionar una cutícula foliar gruesa, el cierre diurno de los estomas, metabolismo fotosintético tipo CAM (Metabolismo ácido de las Crasuláceas), acumulación de fructanos como almacén de carbono y fuente de osmolitos. Dichas modificaciones metabólicas les permiten hacer un uso más eficiente del agua, una mejor regulación del balance hídrico y tener una mayor eficiencia fotosintética que cualquier otro tipo de plantas desarrollándose en condiciones de estrés hídrico y osmótico (Nobel, 2003; Nobel, 2010).

Existe un creciente interés científico y biotecnológico en estudiar las bases bioquímicas y moleculares de la respuesta al estrés abiótico en los miembros de la familia Agavaceae (Kelly & Olsen, 2011; Martínez-Hernández et al., 2007; Nobel, 2010; Simpson et al., 2011). Existen muy pocos reportes que han estudiado los mecanismos metabólicos responsables de dichas características fenotípicas, pero aún queda mucho por descubrir (Cortés-Romero et al., 2012; Martínez-Hernández et al., 2010; Simpson et al., 2011). La secuenciación detallada del transcriptoma, análisis del proteoma y del metaboloma de las plantas CAM podría ser un paso importante en la maximización de este y otros cultivos de importancia (Borland et al., 2009; Simpson et al., 2011). Para llevar a cabo estudios de proteómica es necesario desarrollar inicialmente un protocolo eficiente para la extracción de proteínas totales de Agave. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento solo ubicamos el reporte de Lledías et al., (2017), en donde realiza un estudio similar en diferentes especies de suculentas, de tal forma que se deben explorar métodos diferentes para obtener proteínas utilizables en los análisis enzimáticos. Algunos aspectos a considerar para el diseño de un protocolo de extracción eficiente para esta familia es la alta concentración de carbohidratos en sus tejidos, la dureza de los tejidos foliares y del tallo y la presencia de proteasas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un protocolo rápido de extracción de proteínas para tejidos de *Agave tequilana*, con fines de su utilización en pruebas de proteómica para esta especie y para especies relacionadas del género *Agave*.

Materiales y métodos

Material vegetal

En este trabajo se utilizaron plantas de *A. tequilana* y *A. fourcoides* de cuatro años después de siembra. Las plantas de *A. tequilana* fueron colectadas del campo experimental del Colegio de Postgraduados campus Campeche y las plantas de *A. fourcoides* fueron colectadas en el municipio de Huhí, Yucatán. Las plantas fueron disectadas en sus diferentes partes (hojas, piña y raíz) y fueron lavadas con agua corriente y etanol al 70 % con el fin de eliminar contaminantes en los tejidos. Se colectaron hojas ubicadas en la posición 2 y 4 (hoja joven, HJ) y la posición 6 y 8 (hoja madura, HM), contando a partir del primordio foliar. Bloques de tejido de la parte media longitudinal de la hoja fueron cortados y disectados a fin de eliminar la cutícula, y posteriormente almacenados en hielo. En cuanto

a la piña (tallo), le fueron retiradas todas las hojas y posteriormente fue cortada a la mitad. Se determinó la ubicación del meristemo apical y se eliminó. Un bloque de tejido inmediatamente después del ápice fue colectado y almacenado en hielo. Por otra parte, se colectaron raíces de la planta, las cuales fueron lavadas con abundante agua corriente y posteriormente con agua destilada en dos ocasiones. Las raíces fueron seccionadas en porciones de 3 cm de longitud y almacenadas en hielo. Las plántulas *in vitro* fueron obtenidas por organogénesis directa y mantenidas en cultivo hasta su enraizamiento, mediante un protocolo de propagación clonal establecido en el Colegio (Caamal-Velázquez, datos no publicados). Posteriormente fueron colectadas cuando habían desplegado al menos 3 hojas. Las plántulas fueron lavadas con agua destilada, disectadas para eliminar las raíces y almacenadas en hielo. Además, se colectaron semillas procedentes de plantas adultas del campo experimental. Las semillas fueron lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente y almacenadas en hielo. Todos los tejidos fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su uso.

Extracción de proteínas totales

Los tejidos colectados fueron molidos con mortero y pistilo utilizando N₂ líquido, hasta obtener un polvo fino. Aproximadamente 500 mg de tejido molido y congelado fueron mezclados con 1 mL de disolución de extracción conteniendo 50 mM de amortiguador de fosfatos pH 5.7, sacarosa (10%), glicerol (5%), ácido ascórbico (10 mM), aprotinina (1 µg/mL), leupeptina (1 µg/mL), PMSF (1 mM), 1,4-ditio-DL-treitol (DTT, 10 mM). La mezcla se homogeneizó en el mortero y posteriormente se aplicó en un filtro prensa (ver la Figura 1) elaborado con una jeringa de 50 mL

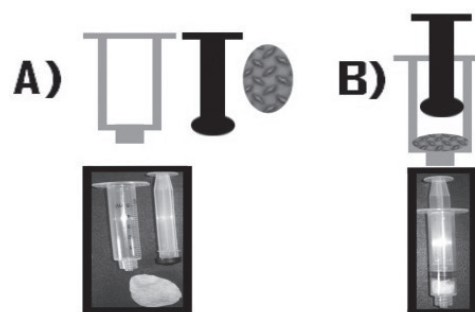


Figura 1. Representación esquemática de la columna para el filtrado de proteínas totales.; A) Jeringa de 5 mL y el filtro fabricado con Magitel®, B) El filtro insertado dentro de la jeringa cuya función es remover el desecho celular del extracto crudo.

y un disco de papel filtro. El filtrado se recuperó en un tubo Eppendorf de 1.6 mL estéril y se centrifugó a 12,000 xg por 10 min a temperatura ambiente (25°C). El sobrenadante se recuperó, se separó en alícuotas de 200 µL y se almacenó a -20°C hasta su uso. El contenido de proteína total del extracto fue determinado por el método de Bradford modificado (Zor & Selinger, 1996). Alícuotas de extracto crudo fueron diluídas en 100 µL de NaCl 0.15 M, y mezcladas con 1 mL de disolución de azul de Coomassie. Las muestras se mezclaron con vortex e incubaron por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm y se determinó la concentración de proteína total, utilizando albúmina de suero bovina (BSA) como estándar.

SDS-PAGE y determinación de actividad enzimática en gel

Para demostrar la integridad de los extractos proteicos, se procedió a separar las proteínas electroforéticamente mediante el método de (Laemmli, 1970). Aproximadamente 20 µg de proteína total fueron mezclados con amortiguador de SDS y calentados 5 min a 100°C para la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un sistema de geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE), a una concentración de 10% de acrilamida para el gel resolvidor. La separación se llevó a cabo con una intensidad de corriente de 15 mA durante 2 h. La tinción de las proteínas en gel se realizó haciendo uso del kit Colloidal Blue Staining kit (Cat. # LC6025, Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el fin de demostrar la utilidad del método de extracción para subsecuentes análisis proteómicos, se determinó la actividad “en gel” de las enzimas catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) de los extractos proteicos de hojas inmaduras de *A. tequilana* y *A. fourcroydes*. Para tal fin se siguieron las condiciones de electroforesis en gel nativo y ensayo enzimático establecidas por (Woodbury et al., 1971) para CAT, (Zimmermann et al., 2006) para APX y (Momčilović et al., 2014) para SOD.

Resultados y discusión

La premisa fundamental para llevar a cabo estudios proteómicos es la de contar con un protocolo de extracción de proteínas adecuado para el tipo de muestra analizada, disminuyendo al mínimo la actividad de las protea-

sas intrínsecas en las muestras, así como la eliminación de compuestos inhibidores de la actividad enzimática, aunque este segundo aspecto es necesario estandarizarlo para cada enzima analizada de manera particular. Es deseable que el protocolo sea sencillo, reproducible, rápido, económico y sobre todo que tenga la capacidad de aislar el mayor número de proteínas para tener una buena representación del metabolismo al momento del muestreo.

Al analizar los extractos proteicos obtenidos a partir de las muestras de Agave con el protocolo propuesto se obtuvieron rendimientos que oscilaron entre 17 mg/g de tejido fresco (raíz) y 56 mg/g de tejido fresco (piña) (ver la Tabla 1). El promedio del tiempo de ejecución de este protocolo fue de aproximadamente 2-3 h, procesando 10 muestras simultáneamente. La reproducibilidad de este método se demostró al observar errores estándar menores al 5% de la media de tres repeticiones en todas las muestras analizadas (ver la Tabla 1). Las concentraciones de proteínas totales más altas fueron obtenidas en Hoja madura y piña; las concentraciones más bajas fueron obtenidas en raíz (ver la Tabla 1).

Lledías et al., (2017) reportan un método rápido y fidedigno el cual probaron que funciona muy bien para el análisis desnaturalizante de proteínas de especies de plantas de la familia Agavaceae, sobre todo para el análisis de los proteomas (2DE gel), comparado con el método descrito en este trabajo en el cual reportamos una extracción de proteínas nativas las cuales son utilizadas para el análisis enzimático, en cuanto al tiempo de extracción el método descrito representa un trabajo de una hora más del reportado por Lledías et al., (2017), el método aquí descrito proporciona otra forma de poder extraer proteínas totales de plantas CAM, los cuales son escasos y aportan al desarrollo de nuevos y mejores métodos de extracción para diferentes metodologías utilizadas en la proteómica.

Las plantas de la familia *Agavaceae* presentan una gran adaptabilidad a condiciones medio ambientales extremas. Esta adaptabilidad se ha adjudicado a sus

Tabla 1. Concentraciones de proteína en tejidos de *A. tequilana*

Tejidos	CONCENTRACION (µg/µL)			
	S1	S2	S3	Media ± E.E.
Hoja joven	33.21	32.26	31.30	32.26±0.54c
Raíz	16.07	17.02	18.45	17.18±0.69d
Piña	57.26	55.11	56.07	56.15±0.61a
Hoja madura	43.21	51.30	50.83	48.45±2.62b
S= muestra; número (1,2 y 3)= repeticiones; E.E.= error estándar; letras diferentes= diferencia estadística (p≤0.05)				

características metabólicas, fisiológicas, morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios bioquímicos y moleculares que expliquen cómo estas características intrínsecas de los agaves les permite vivir bajo condiciones en donde la mayoría de las plantas no vivirían. Estudios previos en el transcriptoma de *A. tequilana* revelan una actividad inusual en genes relacionados con respuesta al estrés y con el metabolismo de carbohidratos (Del Viso et al., 2009; Livingston, Hinch, & Heyer, 2009; Martínez-Hernández et al., 2010; Martínez-Hernández et al., 2007). El desarrollo de técnicas experimentales para el estudio de los elementos metabólicos involucrados, específicamente en el campo de la proteómica y metabolómica, darían un fuerte impulso a la investigación en esta familia de plantas tan peculiar.

Posteriormente, los extractos fueron cargados en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se procedió a realizar la electroforesis de las proteínas contenidas en ellos (ver la Figura 2). Se observó en el gel teñido con Azul de Coomassie un buen despliegue de las proteínas, mostrando diferencias en los patrones de bandeo entre los diferentes tejidos utilizados. En el extracto de semilla (ver la Figura 2, S), se pudo observar una alta concentración de proteínas de 50 KD y de proteínas de menor tamaño, probablemente correspondientes a proteínas de reserva acumuladas en el endospermo de la semilla. En cuanto a los extractos de hoja, observamos un patrón de bandeo similar entre hojas jóvenes y maduras (ver la Figura 2 HJ, HC). Sin embargo, existen diferencias en la abundancia de algunas bandas entre estos dos tejidos, lo cual implica diferencias metabólicas y fisiológicas

entre ambos estadios. Los extractos de piña mostraron un patrón de bandeo sumamente peculiar, distinto a los demás tejidos (ver la Figura 2, PI), de igual forma en los tejidos de hoja muestran por lo menos dos bandas diferentes al resto de los tejidos (ver figura 2, HJ y HC). En general, el protocolo de extracción propuesto permite la obtención de extractos proteicos sin degradación apreciable en los geles de electroforesis, mostrando un buen despliegue de bandas (ver la Figura 2). La estabilidad de los extractos proteicos fue demostrada al realizar electroforesis con extractos almacenados durante 1 mes a -20 °C obteniéndose patrones de bandeo muy similares (Datos no mostrados).

Para corroborar la utilidad los extractos crudos obtenidos en estudios de enzimología, se determinó la actividad en gel de las enzimas catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD). Para llevar a cabo lo anterior, los extractos proteicos fueron aplicados a geles de acrilamida no desnaturalizantes y se llevó a cabo la electroforesis de las proteínas, seguida de los ensayos de actividad particulares para cada enzima (ver la Figura 3, At). Los extractos de tejidos de *Agave tequilana* (At.) mostraron actividad en gel de las tres enzimas antes mencionadas. Para el caso de CAT se puede observar la presencia de una sola isoenzima en hojas de *A. tequilana*, mientras que en el caso de APX se pueden observar por lo menos 3 isoenzimas. Adicionalmente, para el caso de SOD se puede observar la presencia de por lo menos 5 isoenzimas. Para demostrar la utilidad de este protocolo en la obtención de extractos proteicos en otras especies del género *Agave*, tejidos de plantas de henequén (*A. fourcroydes*) fueron procesa-

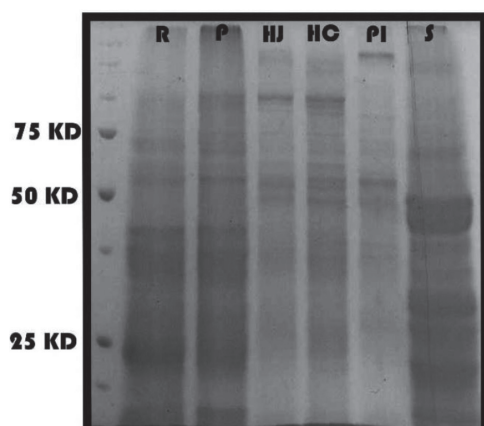


Figura 2. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) de los extractos proteicos obtenidos a partir de raíz (R), Plántula (P), Hoja Joven (HJ), Hoja Madura (HC), Piña (PI) y Semilla (S) de *Agave tequilana*. Carril izq. marcador de peso molecular.

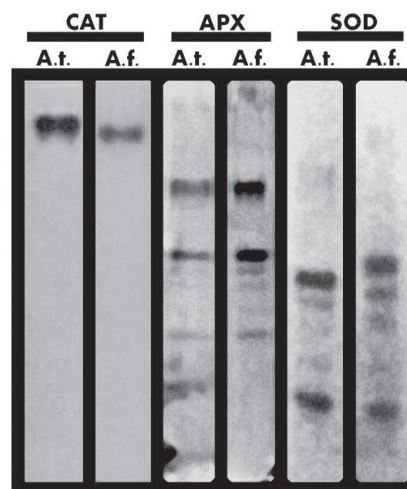


Figura 3. Actividad enzimática en gel de los extractos proteicos obtenidos a partir hoja joven de *Agave tequilana* (At) y *Agave fourcroydes* (Af), utilizando el protocolo propuesto en este trabajo. CAT, catalasa; APX, Ascorbato peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa.

dos con este protocolo y la actividad en gel de las tres enzimas anteriores fue evaluada en extractos de hoja (Af). Se pudo observar actividad de estas tres enzimas en los ensayos en gel de los extractos proteicos de *A. fourcroydes* (ver la Figura 3, Af), presentando perfiles similares a los observados para *A. tequilana* (ver la Figura 3, At). Con estas determinaciones pudimos demostrar la integridad y utilidad del método de extracción de proteínas totales y sobre todo la factibilidad de utilizarlo en otras especies de Agaves.

El procedimiento que reportamos utiliza un único buffer, permitiendo recuperar proteínas totales de una alta cantidad y calidad de hojas, piña, raíz, semilla y plantas *in vitro*. Esto nos permite sugerir la utilización de dicho protocolo para estudios básicos de proteómica y enzimología en tejidos de *A. tequilana*. Este es el primer paso hacia avanzar en el estudio de la proteómica de los Agaves, este reporte dará la pauta para estudios más complejos como son la electroforesis de doble dimensión y para estudios de aislamiento y caracterización de proteínas aisladas.

Conclusiones

Después de analizar los resultados de la investigación, podemos concluir que el método descrito cumple con la obtención de un extracto proteico, de rápida obtención, con una cantidad necesaria para realizar análisis más complejos de proteínas y que en particular abona al estudio proteómico de los agaves, el cual hasta el momento es limitado, si bien el trabajo reportado por Lledías et al., (2017) aporta bases para el desarrollo de análisis de los proteomas de suculentas, este trabajo aporta una metodología específica para agaves, permitiéndonos el uso de las proteínas para análisis de estrés en los agaves y que nos permita entender la razón por la cual la familia Agavaceae puede tolerar condiciones adversas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Fondo Sectorial SEP-CONACYT Ciencia Básica, con el proyecto CONACYT 99982 (México).

Bibliografía

Borland, A. M., Griffiths, H., Hartwell, J., & Smith, J. A. C. (2009). Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2879-2896.

Cortés-Romero, C., Martínez-Hernández, A., Mellado-Mojica, E., López, M. G., & Simpson, J. (2012). Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from *Agave tequilana*. *PLOS ONE*, 7(4).

Flores Berrios, E. P., Alba González, J. F., Arrizon Gaviño, J. P., Romano, P., Capece, A., & Gschaedler Mathis, A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in Applied Microbiology*, 41(2), 147-152.

Del Viso, F., Puebla, A. F., Fusari, C. M., Casabuono, A. C., Couto, A. S., Pontis, H. G., Hopp, H. E., Heinz, R. A., (2009). Molecular characterization of a putative sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) of the cold-resistant Patagonian grass *Bromus pictus* associated with fructan accumulation under low temperatures. *Plant and Cell Physiology*, 50(3), 489-503.

García-Mendoza, A., & Galván-Villanueva, R. (1995). Richness of the Agavaceae and Nolinaceae in Mexico. [Agavaceae; phytogeography; endemics; Mexico; Nolinaceae]. *Botanical Sciences*, 56, 7-24.

García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves en México. *Ciencias*, 87, 14-23.

Kelly, J., & Olsen, M. W. (2011). Problems and pests of Agave, Aloe, Cactus and Yucca. *Plant Disease Bulletin*, 1-9. Recuperado de <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1399.pdf>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Livingston, D. P., Hinch, D. K., & Heyer, A. G. (2009). Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. [journal article]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(13), 2007-23.

Lledías, F., Hernández, F., Rivas, V., García-Mendoza, A., Cassab, G.I., Nieto-Sotelo, J., (2017). A rapid and reliable method for total protein extraction from succulent plants for proteomic analysis. *Protein Journal*, 36(4), 308-321.

Martínez-Hernández, A., Mena-Espino, M. E., Herrera-Estrella, A. H., & Martínez-Hernández, P. (2010). Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista Latinoamericana de Química*, 38(1), 21-44.

Martínez-Hernández, A., Pastrana-Chávez, J., Sánchez-Villareal, A., Lara-Reyna, J., Herrera-Estrella, L., Herrera-Estrella, A., Martínez, O., Simpson-Williamson, J. (2007). *Genómica de Agave tequilana: Identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de usos alternativos del agave*. Paper presented at the 2ª. Reunión de Innovación Tecnológica Agrícola y Forestal RNIAF, Guadalajara, MEX.

- Momčilović, I., Pantelić, D., Hfidan, M., Savić, J., & Vinterhalter, D. (2014). Improved procedure for detection of superoxide dismutase isoforms in potato, *Solanum tuberosum* L. [journal article]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(8), 2059-66.
- Nobel, P. S. (2003). *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Nobel, P. S. (2010). *Desert wisdom/agaves and cacti: CO₂, water, climate change*. New York, USA: iUniverse.
- Simpson, J., Martínez-Hernández, A., Abraham-Juárez, M. J., Delgado-Sandoval, S., Sánchez-Villarreal, A., & Cortés-Romero, C. (2011). Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *GCB Bioenergy*, 3(1), 25-36.
- Woodbury, W., Spencer, A.K. and Stahmann, M.A. (1971) An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isoenzymes. *Analytical Biochemistry*, 44, 301-305.
- Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G., Zentgraf, U., (2006). Senescence –specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell and Environment*, 29(6): 1049-60.
- Zor, T. and Selinger, Z. (1996) Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236, 302-308.

Autores:

José Humberto Caamal Velázquez¹
 Ignacio Islas Flores²
 Joel Lara Reyna¹
 José Efraín Ramírez Benítez^{3*}
 José Luis Aragón Gastélum³

¹ Colegio de Postgraduados Campus Campeche

² Centro de Investigación Científica de Yucatán

³ Universidad Autónoma de Campeche

Correspondencia:

*jeramire@uacam.mx

Recibido: 07-10-2019 Aceptado: 05-12-2019
 (Artículo Arbitrado)