



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA  
FOSFOLIPASA C EN LA LINEA J1 DE RAICES  
TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus*"**

**T E S I S**



**PRESENTADA POR**

**María Luisa Piña Chable**

**EN SU EXAMEN PROFESIONAL**

**EN OPCION AL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**MERIDA, YUCATAN, MEXICO.**

**1 9 9 7**

# INDICE

PAG.

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPITULO I</b>	
ANTECEDENTES.....	6
GENERALIDADES.....	6
1.2. PURIFICACIONES PARCIALES DE LA PLC EN PLANTAS.....	7
1.3. CARACTERIZACIÓN DE LA PLC.....	8
1.4. INMUNODETECCIÓN E INMUNOPRECIPITACIÓN.....	14
1.5.MODELO EXPERIMENTAL.....	15
<b>CAPITULO II</b>	
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	21
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
<b>CAPITULO III</b>	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
III.1. MATERIALES.....	23
III.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
III.1.2. REACTIVOS.....	23
III.2. MÉTODOS.....	24
III.2.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	24
III.2.2. MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA J1.....	24
III.2.3. EXTRACCIÓN.....	25
III.2.4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PLC.....	26
III.2.5. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL.....	27
III.2.6. ELECTROFORESIS.....	30

III.2.7. TINCIÓN CON PLATA.....	33
III.2.8. INMUNODETECCIÓN.....	31
III.2.9. QUIMIOLUMINISCENCIA.....	33
III.2.10. TÉCNICA PARA REVELAR NEGATIVOS DE PELÍCULA.....	35
III.2.11. TÉCNICA PARA IMPRIMIR EN PAPEL.....	36
III.2.12. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	37
<b>CAPITULO IV</b>	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
IV.1. DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO.....	38
IV.2. EFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES.....	42
IV.2.1. SULFATO DE NEOMICINA.....	42
IV.2.2. METALES DIVALENTES.....	44
IV.2.2.1. $\text{NiCl}_2$ .....	44
IV.2.2.2. $\text{ZnSO}_4$ .....	47
IV.2.2.3. $\text{CuSO}_4$ .....	49
IV.2.2.4. EFECTO DE DIFERENTES CATIONES EN AUSENCIA DE CALCIO.....	52
IV.2.2.5. $\text{NiCl}_2$ EN AUSENCIA DE CALCIO.....	53
IV.2.2.6. $\text{AlCl}_3$ .....	55
IV.2.2.7. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 ( $\text{IC}_{50}$ ).....	58
IV.3. USO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA PLC DE <i>C. roseus</i> .....	59
IV.3.1. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE.....	59
IV.3.2. INMUNODETECCIÓN.....	59
IV.3.3. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	64
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## RESUMEN

Los mecanismos de señales de transducción, por medio de los cuales se comunica la célula con el medio que la rodea se realizan a través de diversos mecanismos, los cuales generan segundos mensajeros. La fosfolipasa C es una enzima que cataliza una reacción en la cual se producen dos segundos mensajeros el 1,2-diacilglicerol y el 1,4,5-trifosfato de inositol, por medio de la hidrólisis de 4,5-difosfato de fosfatidilinositol. Estos dos segundos mensajeros activan a la proteína cinasa C y liberan calcio de almacenes intracelulares respectivamente.

Se han reportado purificaciones parciales de esta enzima en plantas, y se han caracterizado. En este trabajo se presenta la caracterización de la PLC en raíces transformadas de *C. roseus*, en base a diferentes parámetros y también se ha realizado la inmunodetección de la isoforma de PLC presente en fracciones membranales y citosólicas.