

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos particulares.....	2
2. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1. La palma del cocotero.....	3
2.2. Proteínas de reserva.....	6
2.3. Proteínas cinasas.....	9
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Colecta del material biológico.....	13
3.2. Extracción de proteínas del cocotero.....	13
3.3. Cuantificación de proteínas.....	13
3.4. Concentración de proteína.....	14
3.5. Electroforesis en geles de 10% de poliacrilamida.....	14
3.5.1. Electroforesis en geles nativos de 10% de poliacrilamida.....	14
3.5.2. Electroforesis en geles disociantes de 10% de poliacrilamida.....	14
3.6. Purificación de proteínas.....	15
3.7. Caracterización bioquímica de p47.....	16
3.7.1. Identificación de glucoproteínas.....	16
3.7.2. Electroforesis bidimensional de p47 (isoelectroenfoque y SDS-PAGE).....	16
3.7.3. Detección de polipéptidos con actividad cinasa.....	18

3.7.3.1. Detección de cinasas en geles nativos de 10% de poliacrilamida.....	18
3.7.3.2. Detección de cinasas en geles disociantes de 10% de poliacrilamida.....	18
3.7.3.3. Fosforilación de sustratos.....	18
3.7.3.4. Ensayos de cinasa en gel.....	19
3.7.3.5. Inmunodetección de p47 con un anticuerpo contra MAP cinasa.....	20
3.8. Generación del anticuerpo policlonal contra p47.....	21
3.8.1. Obtención de suero preinmune.....	21
3.8.2. Inmunización de los conejos.....	21
3.8.3. Obtención del suero inmune.....	22
3.8.4. Titulación del anticuerpo contra p47.....	22
3.8.5. Inmunodetección de p47 en el extracto total y en la fracción S-100.....	22
3.8.6. Inmunodetección de p47 después de ser separada en geles de isoelectroenfoque.....	23
3.8.7. Inmunoreconocimiento de p47 en distintos tejidos del cocotero.....	23
4. Resultados.....	25
4.1. Cuantificación de la proteína total	25
4.2. Electroforesis en geles nativos de 10% de poliacrilamida	25
4.3. Electroforesis en geles disociantes de 10% de poliacrilamida.....	25
4.4. Purificación de la proteína p47.....	26
4.4.1. Filtración en gel (columna de Sephacryl S-100).....	26

4.4.2. Intercambio iónico (columna de Q-Sepharosa).....	26
4.5. Caracterización bioquímica de p47.....	27
4.5.1. Identificación de glucoproteínas.....	27
4.5.2. Electroforesis bidimensional de p47 (isoelectroenfoque y SDS-PAGE).....	28
4.5.3. Detección de polipéptidos con actividad cinasa.....	29
4.5.3.1. Detección de cinasa en geles nativos 10% de poliacrilamida.....	29
4.5.3.2. Detección de cinasa en geles disociantes de 10% de poliacrilamida.....	30
4.5.3.3. Fosforilación de sustratos.....	31
4.5.3.4. Ensayo de cinasa en gel.....	33
4.5.3.5. Inmunodetección de p47 con un anticuerpo contra MAPK.....	33
4.6. Generación del anticuerpo policlonal contra p47.....	34
4.6.1. Titulación del anticuerpo contra p47.....	34
4.6.2. Inmunodetección de p47 en el extracto total y en la fracción S-100.....	35
4.6.3. Isoelectroenfoque e Inmunodetección de p47.....	36
4.6.4. Inmunodetección de p47 en distintos tejidos de cocotero.....	37
5. Discusión.....	39
6. Conclusiones.....	46
7. Referencias bibliográficas.....	47
8. Anexos.....	53

Resumen

Desde el punto de vista económico el endospermo sólido de cocotero es importante porque a partir del mismo se obtiene el aceite de copra, el cual tiene diferentes aplicaciones industriales. Este tejido también tiene importancia bioquímica y molecular ya que es un tejido especializado en la acumulación de lípidos, carbohidratos y proteínas, entre estas últimas podemos encontrar a las proteínas de reserva y las proteínas cinasas que desempeñan un papel importante en los procesos de desarrollo y germinación de la semilla.

En este trabajo se realizaron ensayos de electroforesis de proteínas en geles nativos de poliacrilamida (PAGE), geles disociantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y geles de isoelectroenfoque. El patrón de proteína se reveló utilizando distintos métodos de tinción. Con el fin de purificar y caracterizar a una proteína de reserva de 47 kDa (p47) del endospermo sólido del cocotero, se realizaron cromatografías en columna, ensayos de glucosilación y se estimó el punto isoelectrico (pI) de las isoformas encontradas. Se realizaron ensayos de fosforilación con $^{32}\text{P}_{\gamma}\text{-[ATP]}$ para poder determinar las características de p47 como proteína cinasa.

A partir del endospermo sólido del cocotero se purificó a p47 y se generó un anticuerpo policlonal contra la misma. El anti-p47 producido se utilizó para detectar a su antígeno en los tejidos de embrión, plúmula (meristemo apical del embrión cigótico) y callos embriogénicos y no embriogénicos de la misma especie.

Se determinó que p47 está glucosilada y que existen al menos dos isoformas de esta proteína con puntos isoelectricos de 6.75 y 6.8. También se determinó que p47 presenta características enzimáticas y de inmunoreconocimiento que la asocian con el grupo de las cinasas activadas por mitogenos (MAPK).

Palabras clave. *Cocos nucifera*, Purificación y caracterización de proteína, p47, Producción de anticuerpos.