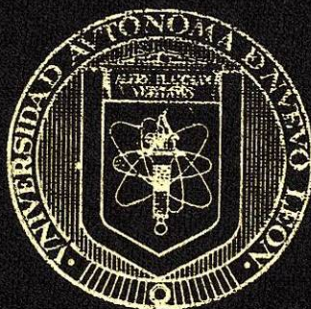


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



P61 DE *Nocardia brasiliensis* PURIFICADA
A PARTIR DE UN FILTRADO DE CULTIVO

POR

BLANCA YANETH CANTU SUAREZ

Como requisito parcial para obtener
El Título de Licenciatura de la Carrera de
Químico Farmacéutico Biólogo

Marzo 1999

TL

QR82

.N6

C35

1999

c.1



1080092524



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Facultad de Ciencias Químicas

Salvador
Dr. Mario César Salinas Camacho
Asesor Principal

**P61 DE *Nocardia brasiliensis* PURIFICADA
A PARTIR DE UN FILTRADO DE CULTIVO**

Comité de Tesis

PRESIDENTE
M.C. Martha Suárez

POR

SECRETARIO
Q.F.B. Ma. E...

BLANCA YANETH CANTÚ SUÁREZ

PRIMER VOCAL
Q.F.B. E...

**Como requisito parcial para obtener
El Título de Licenciatura de la Carrera de
Químico Farmacéutico Biólogo**

SEGUNDO VOCAL
Q.F.B. Ma. Elena Cruz Garza

Marzo 1999



TZ

GR 82

.N6

C 35

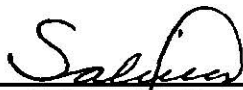
1999

**P61 DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 PURIFICADA
A PARTIR DE UN FILTRADO DE CULTIVO**

Por:

**Blanca Yaneth Cantú Suárez
Q.F.B.**

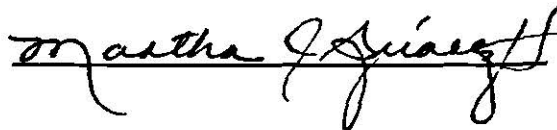
Aprobación de la Tesis



**Dr. Mario César Salinas Carmona
Asesor Principal**

Comité de Tesis

**PRESIDENTE
M.C. Martha Suárez**



**SECRETARIO
Q.F.B. Ma. Elena Cantú**



**PRIMER VOCAL
Q.F.B. Elida Aguilar Bravo**



**SEGUNDO VOCAL
Q.F.B. Ma. Elena Cruz Garza**



DEDICATORIA

A mis padres, *Gustavo Cantú González* y *Blanca E. Suárez*, por su apoyo incondicional y su guía constante.

Con profundo cariño a mis hermanas, *Ericka* y *Nayeli*.

A *Sergio Solís*, quién siempre ha estado a mi lado dándome su apoyo y motivándome a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Con profundo respeto a mi asesor, Dr. Mario César Salinas Carmona, por el honor de permitirme participar en este proyecto. Agradezco su tiempo, sus consejos y su asesoría.

Con especial agradecimiento a la M.C. Luz Isabel Pérez por todo su apoyo, por su paciencia y su disponibilidad de ayudarme siempre.

A la Q.F.B. Graciela Guerrero Ramirez, por su ayuda y comprensión.

A la Q.F.B. Alejandra Gallegos, B.M. Juan Manuel Zuñiga, M.C. Ernesto Torres, Dra. Angeles Castro, Dr. Fernando Sifuentes que me ayudaron con sus sugerencias.

A todos mis compañeros del Departamento de Inmunología, quienes me brindaron su amistad: Edgar, Vicente, Lilith y Alejandro.

Al personal del Departamento de Inmunología, Aracely, Lizzy, Francisco, Paty y Lucy .

A la M.C. Martha Suárez, por sus sugerencias e interés en la revisión de este trabajo.

A la Q.F.B. Emilia Vázquez, por su valiosa asesoría y disponibilidad.

P61 DE *Nocardia brasiliensis* PURIFICADA A PARTIR DE UN FILTRADO DE CULTIVO

Por:

Blanca Yaneth Cantú Suárez

Trabajo realizado en el Departamento de Inmunología de
La Facultad de Medicina, U.A.N.L., bajo la asesoría del
Dr. Mario César Salinas Carmona.

Proyecto apoyado por PAICYT No. SA085

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	6
III. OBJETIVOS	12
IV. MATERIAL Y METODOS	13
V. RESULTADOS	26
VI. DISCUSIONES	36
VII. CONCLUSIONES	38
VIII. BIBLIOGRAFIA	39
IX. APENDICE	42

INTRODUCCIÓN

Nocardia brasiliensis es una bacteria gram positiva, aerobia estricta, catalasa positiva, no móvil, que produce un micelio aéreo de 0.3 a 1.5 mm de diámetro que se fragmenta en elementos cocoides y bacilares (Fig No. 1). Se clasifica dentro del orden de los Actinomycetales, donde también se encuentran los géneros ***Rhodococcus***, ***Mycobacterium*** y ***Corynebacterium***.

Se han desarrollado técnicas taxonómicas para diferenciar estos géneros bacterianos, algunos basados en el estudio de los componentes de la pared celular, en el contenido de arabinosa y galactosa, en el número de carbonos de las cadenas de ácidos micólicos. También se clasifican de acuerdo a las características de sus ácidos nucleicos, donde los mismos géneros presentan un alto contenido de guanina y citosina. (Tabla # 1)

Las similitudes bioquímicas y estructurales de estos géneros provoca que se observen reacciones cruzadas entre sueros inmunes contra uno u otro de los géneros mencionados, por esto es muy importante diferenciarlos.

El género ***Nocardia*** se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, descomponiendo sustancias orgánicas complejas como celulosa, proteínas, polisacáridos y lípidos. Las especies de este género incluyen:

N. asteroides, ***N. amarae***, ***N. brevicatena***, ***N. carnea***, ***N. farcinica***, ***N. nova***, ***N. caviae***, ***N. vaccinii***, entre otros. Las especies más importantes desde el punto de vista clínico son: ***N. brasiliensis***, ***N. asteroides*** y ***N. otidiscaviarum***.

Las colonias de las diferentes especies de *Nocardia* cuando crecen en agar Sabouraud pueden ser lisas y húmedas, o rugosas, con una superficie aterciopelada debida al micelio aéreo (Fig No. 2). Cuando crecen en un medio líquido como el medio de infusión cerebro-corazón (BHI) se forma una película superficial seca y cerosa (Fig No. 3). Cuando *Nocardia brasiliensis* se cultiva en agar dextrosa Sabouraud, muestra colonias secas de aspecto cerebriforme y pigmentadas de color naranja, debido a que poseen pigmentos tipo carotenoides.

De acuerdo a las características clínicas y anatomopatológicas de las infecciones por *Nocardia spp*, se han clasificado éstas en 6 formas que son: nocardiosis pulmonar; nocardiosis sistémica (involucrando dos o más sitios); nocardiosis de sistema nervioso central; nocardiosis extrapulmonar; nocardiosis cutánea, subcutánea y linfocutánea.

Nocardia brasiliensis es el principal agente etiológico causal del micetoma actinomicótico en México. El micetoma es una dermatosis crónica que se caracteriza por un proceso inflamatorio fistuloso que afecta principalmente piel, tejido celular subcutáneo, músculo, hueso y en ocasiones puede diseminarse a vísceras. Inicia cuando la bacteria entra por la piel a través de una herida, generalmente en la planta de los pies o manos, que ha estado en contacto con la tierra o materia vegetal en descomposición, y se forma un nódulo indoloro desarrollándose días o meses después de la infección (Fig No. 4). Este nódulo aumenta de tamaño llegando a ser purulento y necrótico. El pus es descargado a través de varias fistulas y va acompañado de los típicos granos que son característicos de la enfermedad. Estos granos representan a las microcolonias del agente infeccioso, el cual se encuentra rodeado de células inflamatorias. Se observan cicatrices retráctiles fibrosas hipo o hiperpigmentadas.

La incidencia mundial más alta del micetoma se localiza alrededor del trópico de Cáncer, entre las latitudes 15° S y 30° N. Los países más afectados son India, Sudán, Senegal, Somalia, Venezuela y México. Los estados de la república más afectados son los del centro, entre los que se encuentran Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo, y Nuevo León.

La patogenia del micetoma ha sido descrita en ratones, en donde, la respuesta inflamatoria inicial está compuesta predominantemente por un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares. Después de una semana, la pata de los ratones inoculados muestra una reacción inflamatoria granulomatosa. Después de los 14 días aparece el micetoma característico con granuloma, donde se observan pequeños abscesos con gránulos actinomicósicos.

Los gránulos se encuentran rodeados de numerosos granulocitos y restos celulares formando un microabsceso. En los cortes histológicos se observa un anillo de histiocitos y granulocitos alrededor del microabsceso, y en una tercera zona excéntrica, un infiltrado inflamatorio conteniendo macrófagos con abundante citoplasma granular, células plasmáticas, linfocitos y células epiteliales.

La respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos es importante en las infecciones causadas por microorganismos extracelulares e intracelulares. En el caso de la infección por *Nocardia* parece ser que los anticuerpos son de escasa importancia en la resistencia a la enfermedad.

El tratamiento específico no es conocido, el micetoma usualmente es crónico y progresivo y puede causar deformaciones importantes y siguiendo su curso natural puede ser fatal o aún con tratamiento puede recidivar en el mismo sitio o en otro distinto.

Inicialmente para el tratamiento de la infección por *N. brasiliensis* se utilizó Diamino difenil sulfona DDS y sulfametoxazol por un lapso de 6 a 9 meses. Se han utilizado varios medicamentos tales como sulfonamidas, estreptomicina, dapsona, isoniacida, etambutol, tetraciclina y minocidina.

Welsh y cols en 1987 reportaron un tratamiento combinado de Sulfametoxazol-Trimetropim y amikacina para la infección de micetoma por *N. brasiliensis*.

Características	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Micobacterium</i>
Carbohidratos de pared celular	Tipo IV	Tipo IV	Tipo IV	Tipo IV
Azúcares	Arabinosa-Galactosa	Arabinosa-Galactosa	Arabinosa-Galactosa	Arabinosa-Galactosa
# de átomos de las cadenas de ác. Micólicos.	44-60	34-52	20-38	60-90
% molar de Guanina y Citosina	64-72	63-73	52-68	62-70
Motilidad	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Acido-alcohol Resistente	Parcial	Parcial	Negativa	Alto

TABLA # 1. Quimiotaxonomía de los Actinomycetos.

ANTECEDENTES

En 1888, Edman Nocard aisló por primera vez *Nocardia* de lesiones granulomatosas en bovinos. En el año siguiente, Rabe, encontró organismos filamentosos en un perro y en 1890, Eppinger aisló un organismo de una persona con una infección letal. En 1889, Tremisan, creó el género *Nocardia* para integrar al organismo aislado por Nocard. Este organismo fue llamado *N. farcinica* y el que se aisló Rabe, del perro, lo llamaron *N. asteroides*. Aproximadamente 80 años después los estudios taxónomicos de la *Nocardia* original revelaron que se trataban de 2 microorganismos diferentes, uno era *Mycobacterium* y el otro *Nocardia*.

Posteriormente en 1956, Mackinnon y Artageveytia-Allende inocularon ratones intraperitonealmente con *N. brasiliensis* y encontrando que se formaban abscesos y granos, después de tres semanas, alrededor del páncreas y entre el hígado y el diafragma. Además, el inocular cobayos en los testículos los mismos investigadores obtuvieron granos.

En 1960, González-Ochoa y Sandoval, y en 1962, González-Ochoa demostraron la patogenicidad de cepas de *N. brasiliensis* aisladas de suelos al ser capaces de producir lesiones y granos en ratones después de 20-30 días.

Más tarde, Macotela Ruiz y Mariat, 1963, produjeron lesiones con granos al inocular ratones, hamsters y cobayos con *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. En 1967, González-Ochoa y Kumico-Hojyo encontraron que, después de inocular con una sola dosis de *N. brasiliensis* a ratones de laboratorio en la almohadilla plantar, se producía el típico micetoma caracterizado por la presencia de senos y granos.

En 1980, Zlotnik y Buckley confirmaron los hallazgos de González-Ochoa al inocular ratones BALB/c con células vivas de *N. brasiliensis* en la almohadilla plantar. Los ratones desarrollaron micetomas los cuales variaban en tamaño y involucramiento del miembro dependiendo de la dosis y el vehículo en que se administrarán las células (salina vs adyuvante). El efecto de dosis había sido notado por González-Ochoa y Kumico-Hojyo.

El modelo animal descrito ha sido utilizado para estudiar la respuesta inmune humoral contra *N. brasiliensis* (Rodríguez y Zlotnick). Los hallazgos de este estudio demostraron que la respuesta inmune humoral contra *Nocardia* puede ser detectada al mes de haber sido inoculados los animales y según evoluciona la infección aumenta el número de antígenos reconocidos por la técnica de Western blot.

Tanto los antígenos extracelulares como los antígenos somáticos de *N. brasiliensis* han sido investigados sobre todo por su potencial diagnóstico. El primer material somático que se aisló y se encontró que producía una reacción de hipersensibilidad retardada fue el de Drake y Henrici (1943). Estos investigadores obtuvieron una proteína de *N. asteroides* al centrifugar una suspensión de células maceradas. El sobrenadante así obtenido se trató con ácido tricloroacético y se la aisló la proteína precipitante. Al ser inyectada ésta

en animales sensibilizados se produjo eritema, induración y una pequeña área de necrosis. En controles no sensibilizados no se produjo reacción alguna. González-Ochoa y su grupo (González-Ochoa y Baranda, González-Ochoa y Vázquez-Hoyo , 1953) aislaron un polisacárido crudo de *N. brasiliensis* que producía una reacción de hipersensibilidad retardada en 16 pacientes infectados con *N. brasiliensis*. Este polisacárido no produjo reacción alguna en un paciente con tuberculosis pulmonar avanzada ni en dos pacientes con actinomicosis. Además, aquellos individuos que tenían infección por *N. brasiliensis*, de pronóstico grave carecían de la reactividad intradérmica. Sin embargo, un polisacárido de *N. asteroides* obtenido de la misma manera que el de *N. brasiliensis*, producía reacciones positivas en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, aunque la reacción era menos intensa. (González-Ochoa, et.al., 1962).

Kingsbury y Slack en 1967 aislaron un polipéptido activo a partir de células deslipidizadas de *N. asteroides* al seguir la técnica que se había diseñado para la recuperación de péptidos activos de micobacterias. Dicho polipéptido fue preparado de tres cepas de *N. asteroides* y demostraba reactividad cruzada con géneros distintos al género *Nocardia*.

Ortiz-Ortiz y su grupo en 1972, prepararon dos fracciones antigénicas siguiendo un procedimiento complejo. Dichas fracciones eran un polisacárido y un extracto citoplásmico proteico. El polisacárido inducía una reacción de hipersensibilidad retardada en cobayos sensibilizados con *Nocardia spp* e inhibía la migración de macrófagos obtenidos de dichos animales. Como también se observaba en los animales una respuesta anafiláctica, que era independiente de la especie de *Nocardia* usada, los autores consideraron que la respuesta de hipersensibilidad estaba mediada por un polisacárido diferente al responsable de la reacción anafiláctica. Un hecho

que corroboró esto fue que no producía reacción de hipersensibilidad retardada en cobayos sensibilizados con *Mycobacterium*.

El mismo extracto crudo que se usó para la purificación del polisacárido antes mencionado fue usado por Ortiz-Ortiz et.al. en 1972, para preparar proteínas ribosomales. Los ribosomas fueron precipitados con sulfato de amonio, redisoluidos y sedimentados a 165 000 x g. Las proteínas ribosomales fueron separadas luego de precipitar el RNA con 2-cloroetanol. Cuando estas proteínas ribosomales fueron utilizadas intradérmicamente en animales sensibilizados, se produjo una reacción de hipersensibilidad tardía cuando la dosis era 1 µg. Aunque se presentó reactividad cruzada entre *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, el uso de pruebas recíprocas indicó que había diferencias específicas entre los antígenos. Debido a esto, dichos antígenos se probaron incluso en humanos. Las investigaciones recientes se orientan hacia el aislamiento, purificación y caracterización de antígenos somáticos específicos de *Nocardia*.

Recientemente, en 1992 Salinas y cols demostraron que las proteínas de *N. brasiliensis* p61 y p24 son inmunodominantes y en 1993 éstos investigadores implementaron una técnica ELISA utilizando éstas proteínas para el diagnóstico serológico del micetoma. Vera y cols en 1992 aislaron y purificaron p24 y p61. Sin embargo, el rendimiento de p61 siempre fue muy bajo porque se purificó a partir de un extracto celular.

En el presente trabajo nosotros nos propusimos diseñar una estrategia más eficiente que nos de un rendimiento mayor de p61.

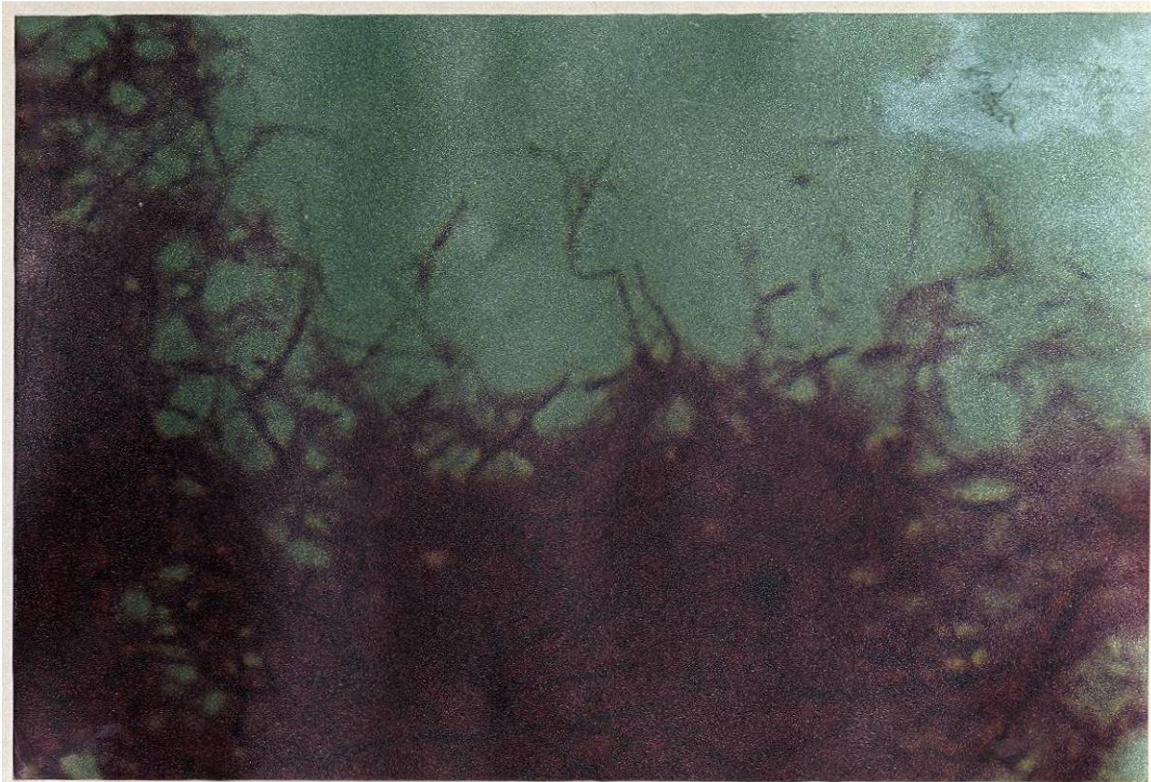


Fig No. 1. Frotis de *Nocardia brasiliensis* teñido con Ziehl Neelsen



Fig No. 2. *Nocardia brasiliensis* cultivada en Agar Sabouraud



Fig No. 3. *Nocardia brasiliensis* cultivada en medio BHI

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL :

Encontrar una fuente de Proteína P61 producida por *Nocardia brasiliensis* con mayor rendimiento que el obtenido en el extracto celular y establecer la metodología para su aislamiento y purificación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. - Seleccionar un medio de cultivo adecuado para que *Nocardia brasiliensis* produzca P61 en grandes cantidades.
2. Obtener el extracto celular y el filtrado de cultivo de una cosecha de *N. brasiliensis*
3. Aislamiento y purificación de P61 extracelular e intracelular por electroforesis preparativa en gel y elución mecánica.
4. Comparar las cantidades de P61 de *Nocardia brasiliensis* obtenidas del extracto celular y del filtrado de cultivo.
5. Realizar la caracterización bioquímica parcial de la proteína p61, incluyendo determinación del Peso molecular por el método de movimiento electroforetico, además de investigar su actividad enzimática.

MATERIAL Y METODOS

CEPA DE *Nocardia brasiliensis*

La cepa que se usó en este estudio se aisló de un micetoma dorsal de un paciente que acudió a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Fue identificada mediante pruebas bioquímicas por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y confirmada por la Dra. J. Brown en el Centro de Control de Enfermedades en Atlanta GA, EUA y la cepa es referida como *N. brasiliensis* HUJEG-1 y fue registrada por el Dr. Mario César Salinas Carmona en la ATCC con el # 700358.

El mantenimiento de *Nocardia brasiliensis* en el laboratorio se realiza mediante pases sucesivos en agar dextrosa-Sabouraud (Bioxon), a partir de suspensiones unicelulares de la bacteria, y con almacenamiento intermedio a 4° C (Lechevalier HA).

1. – OBTENCIÓN DE LA SUSPENSION UNICELULAR DE *Nocardia brasiliensis*.

A partir de cultivos de *N. brasiliensis* en agar dextrosa-Sabouraud se realizaron pases a matraces Erlenmeyer de 125 ml (PYREX) con 30 ml de caldo BHI (caldo de infusión cerebro-corazón. Difco Laboratories), y se procedió a incubarlos a 37° C en baño María con agitación (GCA/Precision Scientific) durante 48 horas. Los cultivos se colocaron en tubos de 50 ml y se centrifugaron a 166 x g durante 10 minutos en una centrífuga Beckman TJ-6 (Beckam Instruments). Las bacterias obtenidas se lavaron dos veces con solución salina al 0.85% (p/v). La masa bacteriana se disgregó con un agitador de vidrio estéril y se dejaron sedimentar aquellas colonias que no estaban fragmentadas. El sobrenadante que se obtuvo después de sedimentar el cultivo se utilizó para inocular 8 matraces Erlenmeyer con 30 ml de caldo BHI, los cuales se incubaron a 37° C en baño con agitación durante 48 horas. Las bacterias se recuperaron y se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85% a 166 x g, y se hicieron pasar a través de un homogenizador Potter-Elvehem. El homogenizado obtenido se centrifugó a 100 x g por 5 minutos. Una muestra del sobrenadante obtenido se mezcló con hidróxido de potasio y se observó al microscopio para comprobar que realmente era una suspensión unicelular de *N. brasiliensis*.

La suspensión unicelular se almacenó en un frasco de vidrio estéril y se utilizó como inóculo.

2.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CELULAR Y DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis* EN MEDIO BHI Y EN MEDIO DE CATALINA RIVAS.

2.1 Obtención del Filtrado del medio de Cultivo BHI y C. Rivas

Se inocularon 8 matraces con 30 ml de medio BHI y 8 con medio Catalina Rivas cada uno con 0.4 ml de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*, con el fin de observar en cual de los dos medios se encontraba la banda de la proteína inmunodominante p61. Se incubaron a 37° C durante 3 días en agitación. Los matraces fueron decantados para retirar el máximo del medio y los cultivos fueron recuperados en matraces Erlenmeyer con la ayuda de un embudo Buchner sobre un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío.

2.2 Obtención del Extracto Celular Crudo de *Nocardia brasiliensis*

La masa bacteriana húmeda que se obtuvo de ambos medios se colocó en un cristizador para ser deslipidizada. Se adicionó solución de alcohol etílico-éter etílico (1:1) hasta que se cubrió el paquete bacteriano y se mantuvo en agitación por 10 minutos, al cabo de los cuales el sobrenadante se retiró cuidadosamente con una pipeta serológica. El procedimiento anterior se realizó las veces necesarias hasta que el sobrenadante perdió la coloración amarilla. Posteriormente se agregó 2 veces la solución de etanol-éter (1:2), y una sola vez la tercer solución (1:3). Este último sobrenadante se retiró por vacío y la masa bacteriana deslipidizada se colocó en un desecador durante toda la noche.

Para la obtención del extracto celular crudo, el material deslipidizado y seco se colocó en un mortero al que se le agregó una cantidad igual de vidrio molido.

Las bacterias se trituraron mecánicamente en el mortero por 90 minutos. La mezcla resultante se colocó en un matraz erlenmeyer de 500 ml con el amortiguador de extracción Tris-HCl 0.1 M, pH 6.5, en agitación constante a 4°C durante 12 horas. La mezcla resultante se centrifugó a 200 x g durante 30 minutos para retirar el vidrio y bacterias intactas, el sobrenadante se recolectó y se filtró por membrana Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro; mientras que el sedimento se volvió a resuspender en el amortiguador de extracción por 2 veces más. Este material de las tres extracciones corresponde al extracto celular crudo de *N. brasiliensis* (esto se llevó a cabo para cada medio).

Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Se llevó a cabo la determinación de proteínas del extracto y del filtrado de cultivo obtenidos de ambos medios, mediante la construcción de una curva de calibración que se realizó con una solución estándar de albúmina sérica bovina (1mg/ml). Las soluciones estándar se prepararon a una concentración entre 2 y 18 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras diluidas (0.25 ml) se colocaron en presencia de 0.25ml del reactivo de Bradford (6mg de azul de Coomassie G-250 en 100 ml de ácido perclórico al 3% v/v en agua destilada) por 25 minutos a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro DU-6 (Beckman Instruments).

3.- COMPARACIÓN DEL MEDIO BHI Y DEL MEDIO DE C. RIVAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE P61 DE *N. brasiliensis*.

3.1 Patrón electroforetico en Gel PAGE 8-18% C/SDS del Extracto y del Filtrado del Medio de BHI y del Medio de C. Rivas

Para analizar los componentes proteicos de cada medio (filtrado y extracto) se llevó a cabo una electroforesis PAGE 8-18% con SDS de los extractos y de los filtrados de cultivo del medio de BHI y del medio de C. Rivas. Se utilizó un sistema discontinuo de Laemmli con un gel de empaquetamiento al 5%T y un gel de corrimiento en gradiente de 8.75-18% T, los cuales se prepararon de la siguiente manera:

Gel de corrimiento 8-18%

Concentración % T	8.75	18
Acrilamida-bisacrilamida	2.04 ml	1.32 ml
Buffer Tris-HCl 3MPH 8.8	1.32 ml	1.32 ml
SDS 10%	0.069 ml	0.069 ml
Agua tri-destilada	3.060 ml	0.645 ml
Glicerina 50%	0.480 ml	0.740 ml
Persulfato de Amonio 5%	0.025 ml	0.025 ml
TEMED	0.003 ml	0.003 ml
	7.0 ml	7.0 ml

Se utilizó un formador de gradiente (BIO-RAD Laboratories) el cual estaba formado por una cámara reservorio y una cámara mezcladora, ambas cámaras tienen las mismas dimensiones. En la cámara reservorio se colocó la solución de acrilamida de menor porcentaje (8.75 % T) mientras que la cámara mezcladora contenía la solución de acrilamida de mayor porcentaje (18%). Ambas cámaras están unidas por un canal que está en la parte inferior, el cual se abrió en el momento en el que se empezó a vaciar la solución de acrilamida al cassette, utilizando una bomba peristáltica, la cual se conectó a la cámara mezcladora a través de una manguera. El formador de gradiente se colocó sobre una placa agitadora. El cassette que se utilizó para hacer el gel en gradiente estaba formado de 2 placas de vidrio entre las cuales se colocaron 3 espaciadores de teflón de 0.75 mm uno en cada lado del cassette, dejando la parte superior libre para vaciar la mezcla de acrilamida-bisacrilamida. Una vez que se vació la solución de acrilamida-bisacrilamida al cassette, se agregó agua tri-distilada quedando ésta en la parte superior del gel. El gel se polimerizó en un tiempo de 20 min.

Gel de empaquetamiento 5%

El gel concentrador al 5% T se preparó de la siguiente manera:

Acrilamida-bisacrilamida	0.1665 ml
Buffer Tris-HCl 1M pH 6.8	0.125 ml
Agua Tri-distilada	0.660 ml
SDS 10%	0.01 ml
Persulfato de Amonio	0.014 ml
TEMED	0.001 ml

Antes de vaciar al cassette la solución de acrilamida- bisacrilamida 5 % T, la humedad de la parte superior del gel se eliminó introduciendo papel filtro. Posteriormente se colocó un peine de teflón y luego se vació la solución de acrilamida-bisacrilamida 5 % T. Después de la polimerización se quitó el peine y posteriormente se lavó el gel con agua tridestilada.

Para empezar la electroforesis se utilizó un buffer de corrimiento Tris 125 mM, glicina 192 mM con SDS L 0.1 %, el cual se colocó en la parte inferior y superior de la cámara de corrimiento. Se utilizó una concentración de proteínas de 30 μ g mezclado con amortiguador de muestra (SDS 10%, 2- ME 10% v/v, sacarosa 50% en amortiguador Tris-HCl 123 mM, pH 6.8 con azul de bromofenol como indicador del frente de iones). Antes de aplicarse la muestra en el carril, se calentó a ebullición por 2 minutos, luego se enfrió y se aplicó al carril utilizando una jeringa, al mismo tiempo se aplicaron los marcadores de PM.

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 v hasta que el frente del colorante llegó a donde inicia el gel de corrimiento y en ese momento se aumentó el voltaje a 150 v, hasta que el colorante indicador del frente de iones llegó al extremo inferior del gel.

Tinción Azul de Coomassie

El gel se sumergió en una solución de Coomassie blue R-250 al 0.1 % en solución fijadora (metanol 40% y ácido acético 10%) por un tiempo de 30 min. Para desteñir el gel se utilizó una solución metanol 40% y ácido acético al 10%, para remover el colorante.

4.- OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA INMUNODOMINANTE P61 DE *Nocardia brasiliensis* a partir del extracto y del filtrado de Cultivo.

4.1 Obtención del extracto y del Filtrado de Cultivo

Se inocularon 40 matraces de 2 litros con 160 ml de medio BHI cada uno con la suspensión celular de *Nocardia brasiliensis* que se preparó anteriormente. Se incubaron a 37° durante 7 días sin agitación. Los matraces se decantaron y se separaron la masa bacteriana y el medio de cultivo, el cual se filtró con papel Whatman No. 0.22 con un embudo Buchner sobre un matraz quitasato conectado a una bomba de vacío. Se concentró después utilizando una unidad de Ultrafiltración de fibra de vidrio.

A partir de la masa bacteriana se obtuvo el extracto celular de *N. brasiliensis* (como se explicó anteriormente).

Y para obtener el extracto semipurificado se procedió de la siguiente manera:

Se tomó una alícuota del extracto celular completo para determinar la cantidad de proteínas y el resto se liofilizó. Se disolvieron 100 mg de proteínas totales contenidas en el extracto liofilizado en 12 ml de PBS 0.1M a pH 7.2. El volumen obtenido se colocó en un matraz erlenmeyer con un magneto y se le agregó el mismo volumen de una solución saturada de sulfato de amonio (100%) con un embudo y gota a gota se dejó caer sobre la solución de proteína, la cual estaba en hielo sobre una placa de agitación. Se agitó por 30 minutos. Se centrifugó a 3200 rpm durante 30 minutos. Se separó el sobrenadante del precipitado y ambos se liofilizaron.

4.2 Precipitación de Proteínas del Filtrado de Cultivo

Se procedió a precipitar las proteínas presentes en el filtrado de cultivo por la técnica de Precipitación con Sulfato de Amonio al 50%

5.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE P61 de *Nocardia brasiliensis*

5.1 Electroforesis preparativa en gel PAGE al 12% sin SDS

Preparación del cassette

Los vidrios y los separadores se lavaron con alcohol y se secaron con gasa. Se le agregó un poco de vaselina en ambos lados a los separadores laterales y al separador inferior. Se colocó en una base el vidrio rectangular, a los lados se colocaron los separadores laterales dejándolos a 1.5 cm de la parte inferior. Se colocó el separador inferior y sobre esto el vidrio superior. Se fijaron con la ayuda de unas pinzas, primeramente la parte inferior y después se bajaron los vidrios laterales y se colocaron las pinzas en cada lado de los vidrios.

Gel preparativo PAGE 12 % sin SDS

La formulación de los geles fue la siguiente:

Gel de corrimiento 12 %

Acrilamida-bisacrilamida	17.190 ml
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	5.3740 ml
Agua Destilada	20.20 ml
Persulfato de amonio	0.215 ml
TEMED	0.0215 ml

Gel de Empaquetamiento 4% T

Acrilamida-bisacrilamida	0.975 ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.937 ml
Agua Destilada	5.589 ml
Persulfato de amonio	0.037 ml
TEMED	0.007 ml

La electroforesis se realizó de la misma manera que con geles analíticos.

Tinción con Azul de Coomassie

Terminada la electroforesis se desensamblaron las placas de vidrio y se cortaron verticalmente los extremos derecho e izquierdo, así como una pequeña sección central para realizar la tinción con azul de Coomassie, mientras que las porciones intactas del gel se congelaron inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la difusión de proteínas.

En el gel teñido se observó la banda de la P61 y se midió con ayuda de una regla la distancia recorrida para determinar el sitio de migración electroforética de las proteínas en el gel, obteniendo el Rf de la proteína.

5.2 Elución mecánica de la proteína

Determinado el Rf de la proteína, se cortó la banda correspondiente de la p61, con la ayuda de un bisturí en el gel congelado. La banda del gel se fragmentó en trozos pequeños y se colocó en un vaso de precipitado de 10 ml al que se le agregaron 3 ml de agua destilada y se dejó agitando a 4°C durante 18 horas.

Posteriormente se obtuvo el sobrenadante tomando una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método Bradford y para hacer un gel 8-18 % teñido con nitrato de plata para comprobar pureza.

El resto se liofilizó y se guardó a 4°C .

6. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA PARCIAL DE LA PROTEÍNA P61

6.1 Determinación del peso molecular de la proteína por movimiento electroforético en un gel 8-18% c/sds-page.

Para determinar el peso molecular de la proteína extracelular, se preparó un gel 8-18% con SDS-PAGE con tres carriles, en el primer carril se colocaron los marcadores, en el segundo la proteína purificada anteriormente a una concentración de 20 mg/ml y en el tercer carril otra concentración de la misma proteína. Una vez terminada la electroforesis, se tiñó el gel con azul de Coomassie y se observaron los sitios de migración de los marcadores y de la proteína en sus diferentes concentraciones. Con la ayuda de una regla se midió la distancia que recorre cada marcador y se dividió entre la distancia total del gel para así obtener los Rf de cada marcador. De la misma manera se obtiene el Rf de la proteína extracelular de *Nocardia brasiliensis*. Una vez determinados los sitios de migración se graficaron en papel semilogarítmico, en el eje X se graficó la movilidad relativa o Rf y en el eje Y el PM de los marcadores. Con esta gráfica de referencia se graficó el Rf de la proteína y se extrapoló en línea recta hasta el eje de las Y para obtener el PM de la proteína.

6.2 Determinación de la Actividad Enzimática de P61.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel 8-18% c/SDS como se explicó anteriormente.

Se aplicaron 5 μ g de P61 purificada en cada carril con buffer de muestra 4X s/SDS, así como marcadores de peso molecular.

Cuando la electroforesis terminó se dividió el gel en dos partes:
A la primera parte se le agregó directamente H₂O₂ para observar la actividad enzimática, Mientras que la segunda parte se tiñó con azul de Coomassie.

RESULTADOS

1.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CELULAR Y DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 A PARTIR DE LOS MEDIOS BHI Y C. RIVAS.

Del cultivo de 8 matraces realizado en medio BHI se obtuvieron 225 ml de filtrado y 3.9 g de masa bacteriana (peso seco), mientras que en el cultivo realizado en el medio C. Rivas se obtuvieron 219 ml de filtrado y 5.4 g de masa bacteriana.

Una vez que se obtuvieron los extractos celulares y los filtrados de ambos cultivos, se le determinó proteínas por el método de Bradford, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla No. 1.

TABLA # 1. Determinación de Proteínas del Extracto celular y del filtrado de cultivo del medio BHI y del medio C. Rivas.

	BHI $\mu\text{g/ml}$	C. Rivas $\mu\text{g/ml}$
Extracto Celular	14.2	9.2
Filtrado de Cultivo	26.2	11

2.- COMPARACIÓN DEL MEDIO BHI Y DEL MEDIO C. RIVAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE P61 DE *Nocardia brasiliensis*.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE 8-18% c/SDS para observar en cual de los medios estaba la banda de P61.

El gel fue teñido con azul de Coomassie, observándose la banda de P61 en el filtrado del medio de cultivo de BHI, tal como se muestra en la figura No. 4.

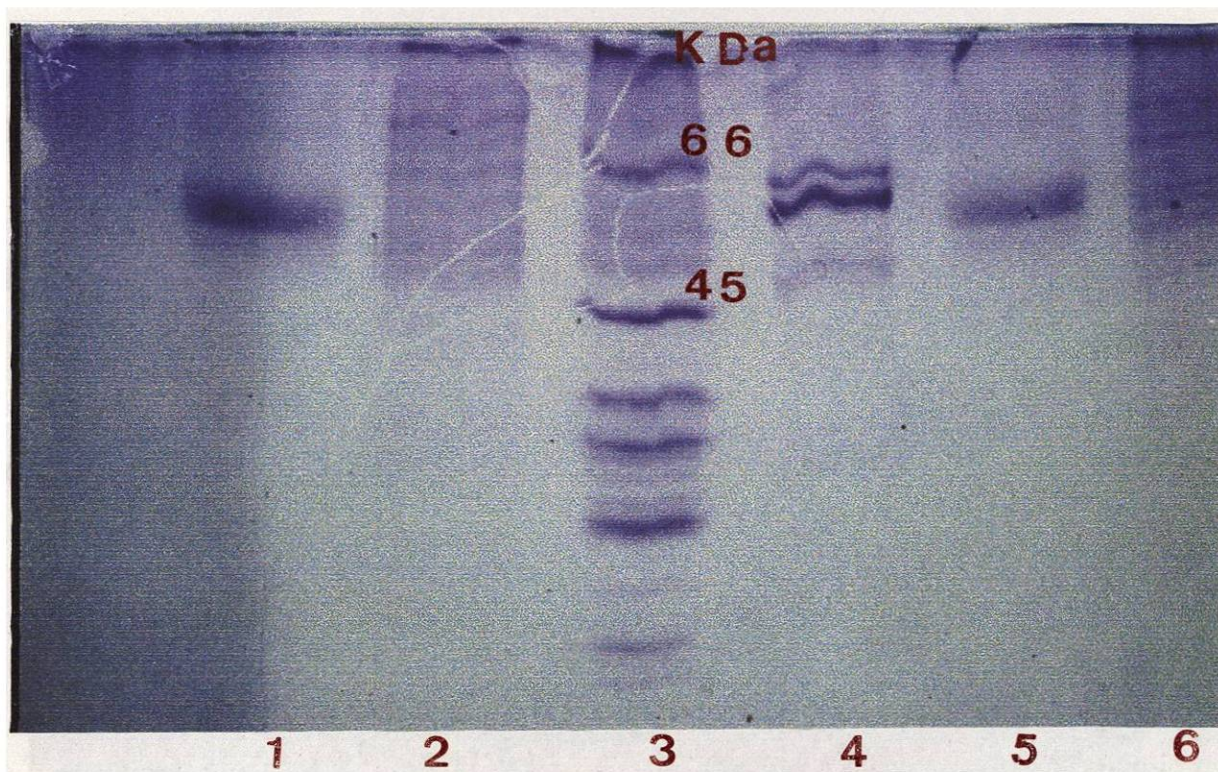


FIGURA No.4 Identificación de P61 en medio BHI, carril 1.Filtrado de BHI, 2. Filtrado de C. Rivas, 3. Marcadores, 4. Extracto Celular BHI, 5. Filtrado de BHI, 6. Filtrado C. Rivas.

3.- IDENTIFICACIÓN DE P61 EN EL SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVO BHI.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE 8-18% c/SDS, colocándose en el carril 1. Marcadores de PM, 2. Extracto Celular, 3. Sobrenadante de BHI, 4. Precipitado de BHI, 5. Extracto celular, 6. Sobrenadante de BHI, 7. Precipitado de BHI. El gel fue teñido con azul de Coomassie observándose en el sobrenadante del medio BHI que fue precipitado con sulfato de amonio al 50%, la banda de P61, tal como se muestra en la figura No. 5.

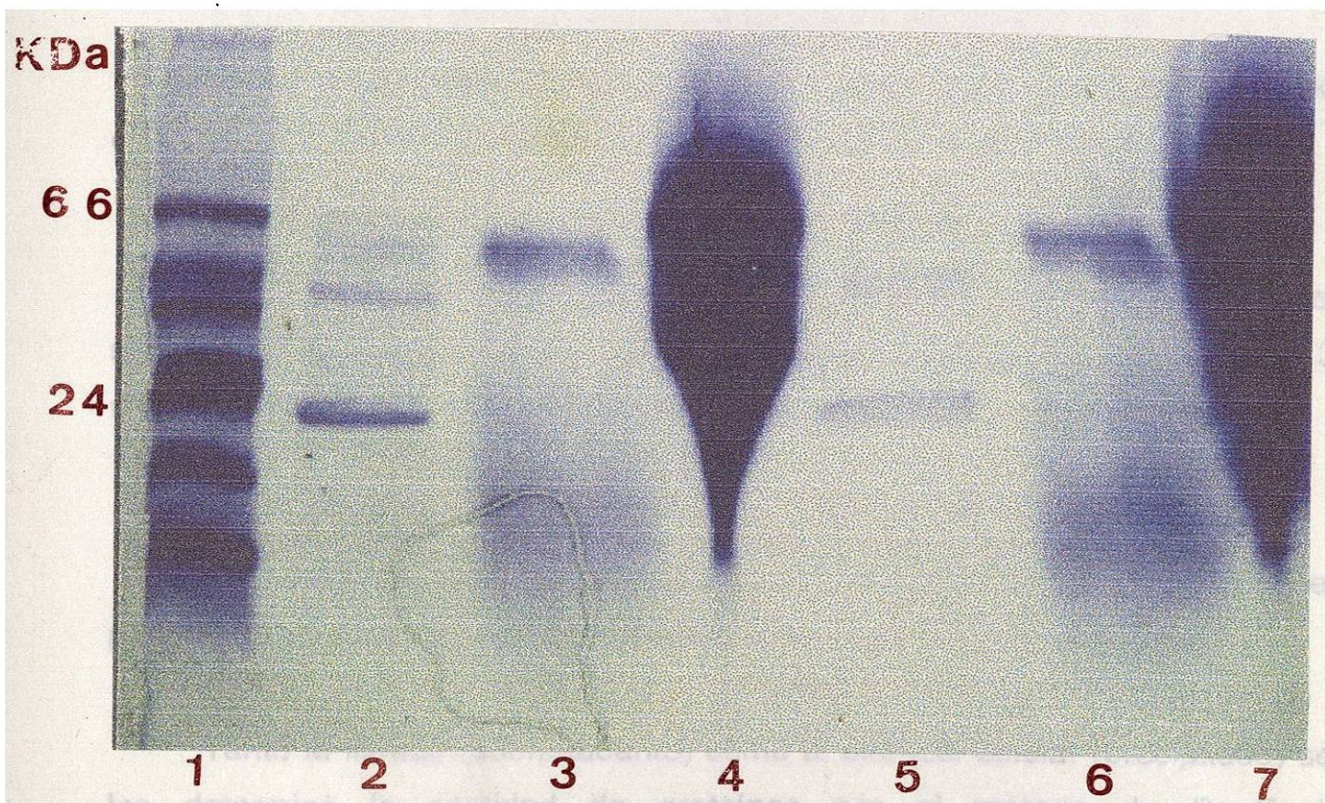


FIGURA No. 5. Identificación de P61 en el sobrenadante obtenido de la precipitación con sulfato de amonio.

4.- OBTENCIÓN DE P61 DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1

A partir de una cosecha de 40 matraces en medio BHI se obtuvieron los resultados expresados en la tabla No. 2.

TABLA No. 2 Cantidad de masa bacteriana y de filtrado de cultivo que se obtuvieron de una cosecha de *N. brasiliensis* a 37°C por 7 días, sin agitación.

	Masa bacteriana (g)	Filtrado de cultivo (L)
Medio BHI	11.7	5.820

El filtrado de cultivo (5.820 litros) se concentró y se obtuvo una cantidad de 115 ml y a partir de la masa bacteriana se obtuvo el extracto celular.

El filtrado concentrado se precipitó con sulfato de amonio y se obtuvo el sobrenadante, el cual se liofilizó en 7 viales con 15 ml cada uno y un vial de 3 ml.

El extracto celular también se precipitó con sulfato de amonio y se obtuvo el precipitado, el cual se liofilizó en viales.

Tanto al filtrado (sobrenadante) como al extracto celular (precipitado) se les determinó la cantidad de proteínas por el método de Bradford, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla No. 3.

TABLA No. 3. Determinación de proteínas del precipitado del extracto celular y del sobrenadante del filtrado de cultivo obtenidos de una cosecha de *Nocardia brasiliensis*

	PP ext. celular	SN Filtrado de Cultivo
Proteínas Totales $\mu\text{g/ml}$	325	470

5.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE P61 DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.

A partir de los liofilizados del sobrenadante del filtrado y del precipitado del extracto se procedió a realizar electroforesis preparativas PAGE 12% s/SDS para el aislamiento y purificación de P61.

Al termino de cada electroforesis, los geles se cortaron verticalmente en tres partes y se procedió a teñir las tiras con azul de Coomassie, congelando los restos de los geles. Posteriormente las bandas se destiñeron, observándose una banda muy marcada que corresponde a P61 de *N. brasiliensis*, como se muestra en la figura No. 6.

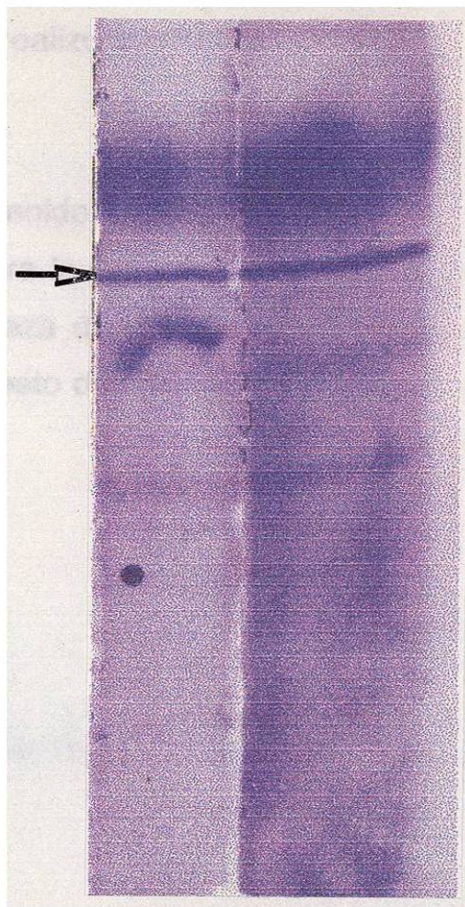


FIGURA No. 6
Electroforesis preparativa en gel PAGE 12% s/SDS
Teñido con azul de Coomassie, la flecha indica la banda
De P61 de *N. brasiliensis*.

Posteriormente la banda se midió con una regla, con el fin de conocer la posición de dicha banda, y se procedió a cortar la porción donde se encontraba la banda en el gel que se había congelado.

Una vez cortada la banda en todos los geles (15 a partir del filtrado y 13 a partir del extracto celular), la proteína de interés fue eluída mecánicamente,

utilizando agua destilada para su extracción a 4° C por 18 horas en agitación, este procedimiento se realizó tres veces.

De los eluidos obtenidos se tomaron muestras representativas para las cuales se utilizaron para la determinación de proteínas (Bradford), así como para comprobar la pureza de la proteína eluída (Electroforesis PAGE 8-18 % c/SDS). Fig No. 7. El resto de los eluidos se liofilizó para la conservación de la muestra.

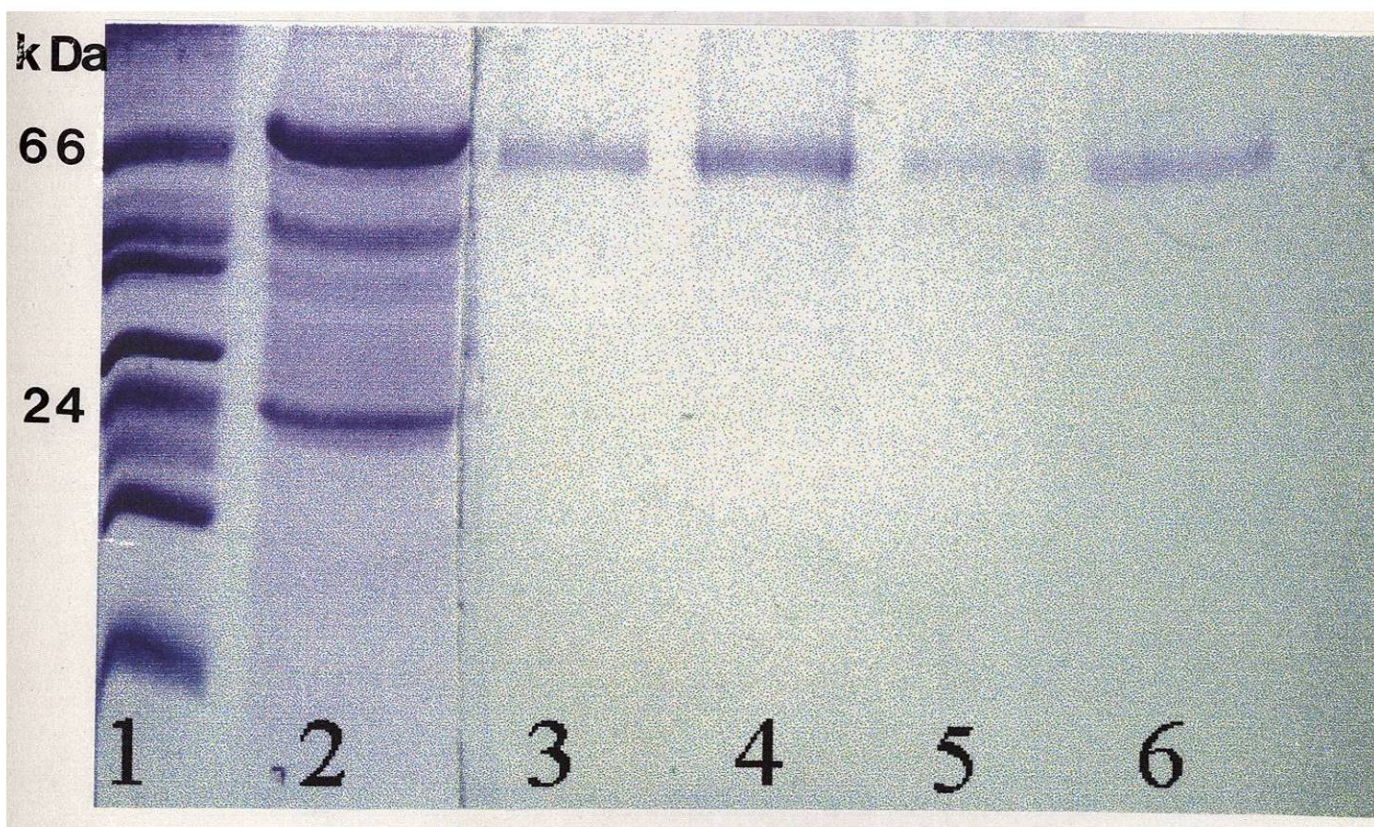
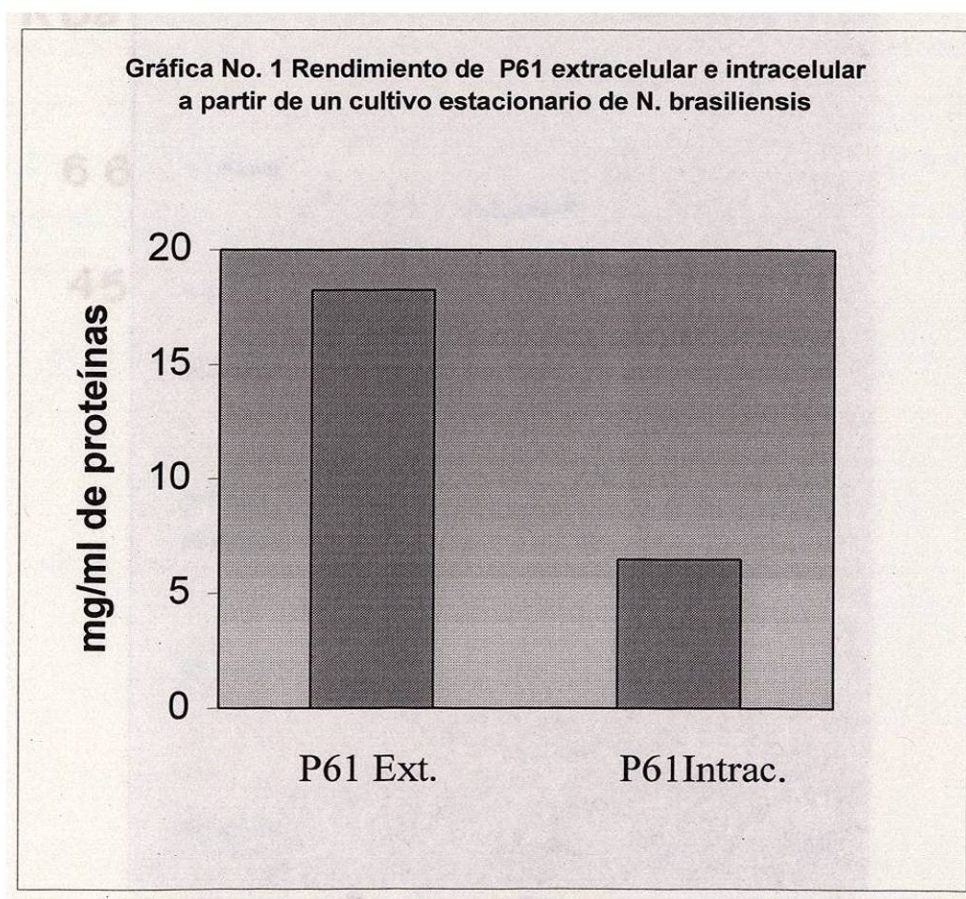


FIG. No. 7 Electroforesis PAGE c/SDS 8-18%
A. Carril. 1 Marcadores, 2. Extracto celular,
3. y 5. P61 purificada a partir del extracto,
4 y 6. P61 purificada a partir del filtrado.

6.- RENDIMIENTO DE P61 EXTRACELULAR E INTRACELULAR A PARTIR DE UN CULTIVO ESTACIONARIO DE *N. brasiliensis*.

El rendimiento obtenido de P61 extracelular comparado con P61 intracelular fue mucho mayor, los resultados se pueden observar en la gráfica No. 1



7.- CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA PARCIAL DE P61.

7.1 Determinación del Peso Molecular

Se realizó un gel 8-18% c/SDS, donde en el carril 1 se colocaron marcadores de Peso molecular y en los carriles 2 y 3 se colocó P61 purificada. El gel se tiñó con azul de Coomassie. Fig No. 8.

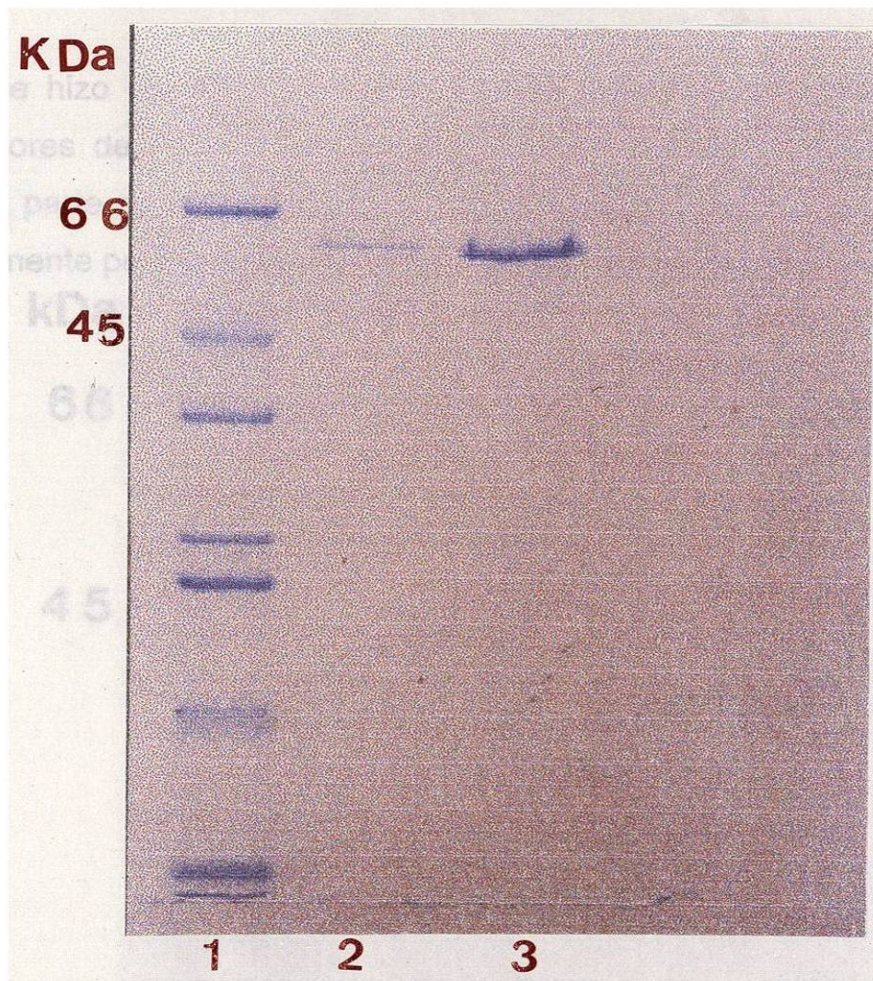


FIG No. 8 Determinación del Peso Molecular de la Proteína

Se midió el Rf de cada marcador así como el Rf de la proteína de interés y se graficó en papel semilogarítmico de doble ciclo. De esta manera, se pudo obtener el peso molecular de la proteína que fue de 61 000 Da, tal como se muestra en la gráfica No. 2

7.2 Determinación de la Actividad Enzimática.

A uno de los eluidos obtenidos se le agregó peróxido de hidrógeno y se observó la formación de burbujas.

Se hizo un gel 8-18% c/SDS en el cual se colocó en el carril 1 y 5. Marcadores de Peso molecular, carril 2,3, 6, 7 libres, carril 4 y 8. P61. La primera parte se tiñó con azul de Coomassie y a la otra parte se le agregó directamente peróxido de hidrógeno, observándose efervescencia. FIG No. 9

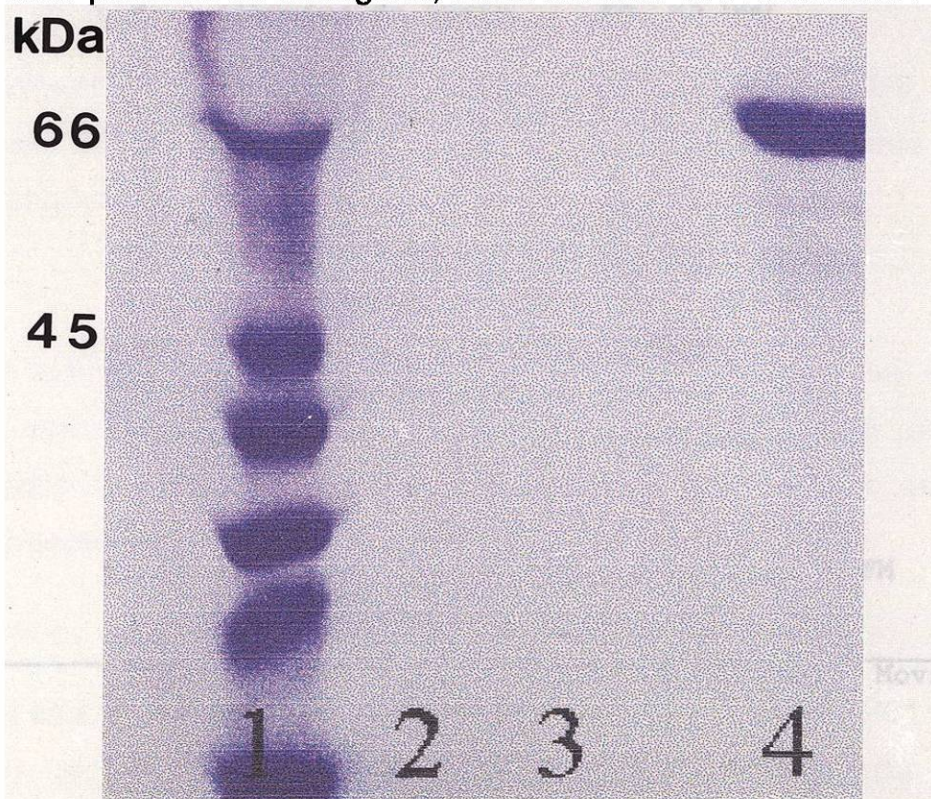
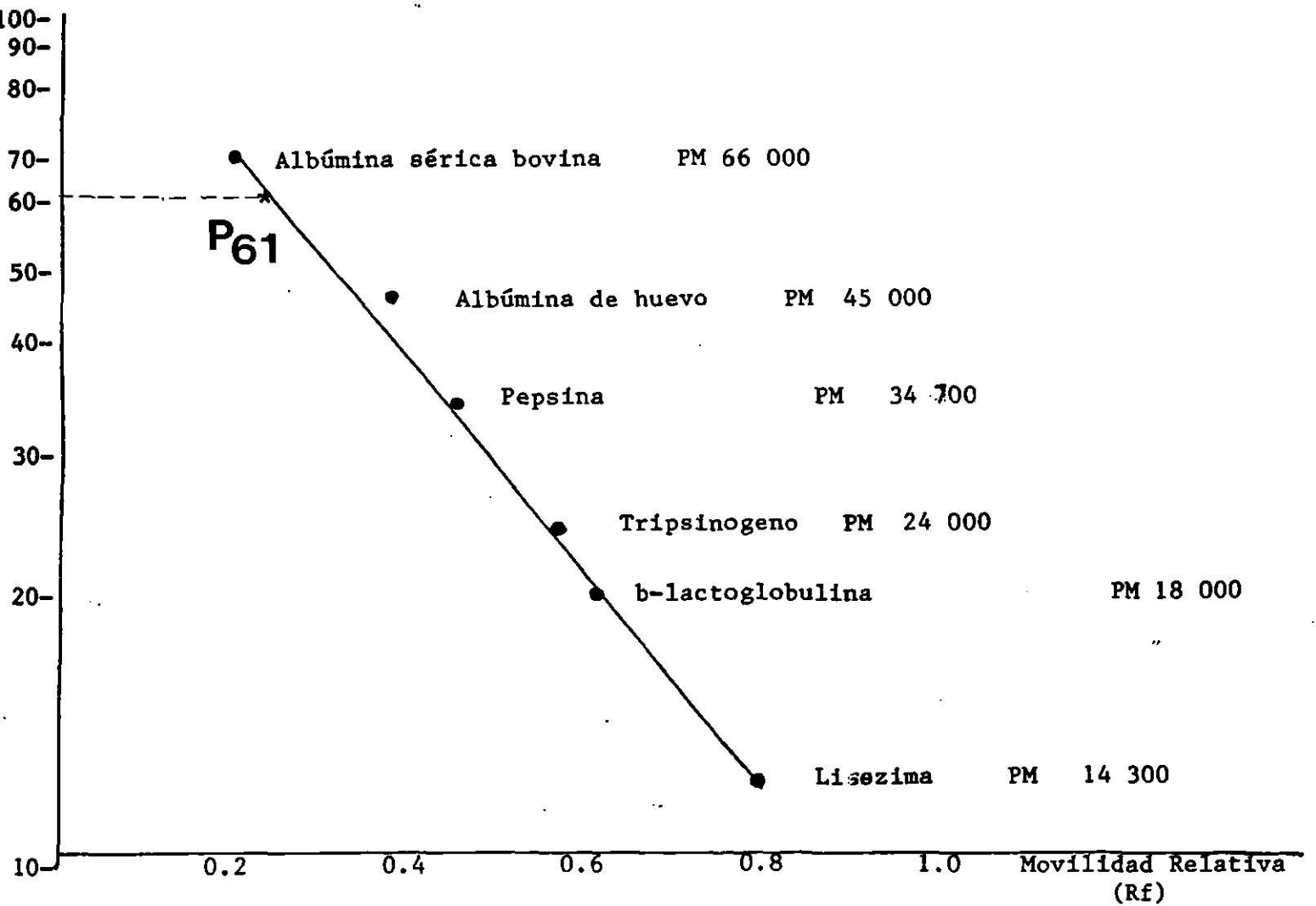


FIG No. 9 Electroforesis 12% c/SDS Teñido con Coomassie

GRAFICA NO. 2
CURVA DE CALIBRACION TIPICA



DISCUSIONES

En el presente trabajo se encontró una nueva fuente de purificación de P61 de *Nocardia brasiliensis*. Anteriormente esta proteína se purificaba a partir de un extracto celular crudo de *N. brasiliensis*, método por el cual, se obtenían rendimientos muy bajos.

Con el fin de incrementar el rendimiento de P61 se analizaron los extractos y los filtrados de los medios BHI y C. Rivas (medio diseñado en el Laboratorio de Inmunología, Rivas-Salinas, 1998).

El purificar P61 a partir del filtrado de cultivo del medio BHI, nos llevó a obtener una mayor cantidad de la proteína, que cuando se obtenía a partir del extracto celular.

En contraste, en el filtrado del medio C. Rivas no se encontró la proteína, esto indica que P61 podría ser una proteína inducible, esto es, que dependiendo de los nutrientes que se encuentren en el medio de cultivo, la bacteria puede o no producir la proteína.

No se conocen aún, el o los mecanismos por los cuales P61 es liberada al medio de cultivo, lo que nos deja una puerta abierta a nuevas investigaciones.

Como se mencionó anteriormente P61 es un antígeno inmunodominante de *N. brasiliensis* y no se conoce si existe alguna relación con la inmunoprotección. P61 tiene actividad de catalasa, se han reportado datos que nos indican que la actividad enzimática que tiene esta proteína podría ser uno de los factores de virulencia en la inducción del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Este paso ha sido de gran ayuda para el Laboratorio de Inmunología, debido a que se necesitan cantidades muy grandes de P61, ya que todavía hay muchos experimentos por realizar, como la determinación de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, conocer si se puede llevar a cabo una técnica de diagnóstico (actualmente se usa P24), además de investigar la relación que existe entre la inmunodominancia y la inmunoprotección.

CONCLUSIONES

- 1.- El medio de cultivo más adecuado para que *Nocardia brasiliensis* produzca P61 es el medio BHI.
- 2.- La mejor fuente para purificar P61 es el filtrado de cultivo.
- 3.- El rendimiento obtenido al purificar P61 a partir del filtrado fue mucho mayor que cuando se purificó a partir del extracto en una misma cosecha de *Nocardia brasiliensis*.
- 4.- La proteína tiene un peso molecular de 61 000 Da y presenta actividad de catalasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas, R., 1988, **Dermatología. Atlas, Diagnóstico y Tratamiento**, 1ª ed, Editorial Mac Graw-Hill, México, pp 415-421.
2. Blaine L. Beaman, Michael A. Saubolle and Richard J. Wallace, **Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oerskovia and other Aerobic Actinomycetes of Medical Importance**, pp 379-398.
3. Bradford M, 1976, **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding**, Anal. Biochemistry. 72: 248-254
4. Chrambach A. and Rodbard D. 1987. **Quantitative and preparative polyacrylamide gel electrophoresis. In gel electrophoresis of proteins, a practical approach**. Pages 93-143. Edited by Hames B.D. and Rickwood D. IRL Press. Oxford, U.K.
5. Goodfellow, M., E. G., Thomas, A.C. Ward and A.L. James, 1989, **The actinomycetes I. Suprageneric classification of actinomycetes. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Volume 4., pp 2333-2339. Edited by Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams & Wilkins. Baltimore MD. USA.
6. Hames B.D. 1987, **An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In gel electrophoresis of proteins, a practical approach**, pp 1-91. Edited by Hames B.D. and Rickwood D. IRL Press. Oxford, U.K.
7. Harrington M.G. 1990, **Elution of protein from gels. In Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology**, Volume 182, pp 488-495. Edited by Deutscher M.P. Academic Press. San Diego, CA. USA.

8. Horwitz, Marcus, 1997, **A New TB Vaccine**, pp 15-20, *The immunologist*, Edited by Hogrefe&Huber Publishers, Los Angeles, USA.
9. Lechevalier H.A., 1989. **Nocardioform Actinomycetes**. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Volume 4, pp 2348-2361. Edited by Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams&Wilkins. Baltimore, MD. USA.
10. Licon Trillo Angel, 1997. **Estudio de la Inmunogenicidad de las proteasas de *Nocardia brasiliensis* y su Efecto Inductor de Protección en el Micetoma Experimental en Ratones BALB/c**. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
11. McKinney, M.M. Perkinson, **A simple, non-Chomatografic procedure to purification inmunoglobulins from serum and ascitis fluid**.
12. Merrill C.R., Dunau M.L. and Goldman D. 1981. **A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels**. *Anal. Biochem*.
13. Pérez-Rivera L.I. 1992. **Identificación de Proteínas con Actividad Caseinolítica en un Extracto Celular de *Nocardia brasiliensis***. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
14. Rico G., Ochoa R., Oliva A., González-Mendoza A. Walker S.M. and Ortiz-Ortiz L. 1982. **Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells**. *The journal of Immunology*., pp 1688-1693.
15. Salinas M.C., Rivas C., 1998, **Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* a escala piloto para la obtención de proteasas caseínicas**, Tesis para obtener el grado de Doctor en Inmunología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.
16. Salinas M.C. Vera L., Welsh O. And Rodríguez M. 1992, **Antybody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man**. *Zbl.Bakt.* , pp 390-397.

17. Salinas-Carmona M.C., Pérez L.I., Welsh O., Rodríguez M. And Rinaldi M.G. 1992. **Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis***. *J. Mycol. Méd.* , pp 1-6.
18. Salinas-Carmona M.C., Welsh O. And casillas S.M., 1993. **Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections.** *J. Clin. Microbiology.* Pp 2901-2906.
19. Sandoval Trujillo, 1993, Horacio. **Actinomycetos**, Ed. Universidad Autónoma Metropolitana, pp 345-432
20. Stryer Lubert, 1988, **Biochemistry**, 3^a ed, Editorial W.H. Freeman and Co., USA, pp 44-50.
21. Torres López E. 1995, **Estudio de la Respuesta Inmune Humoral en el Establecimiento y Resolución de la Infección Experimental por *Nocardia brasiliensis* en Ratones.** Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
22. Vera-Cabrera, Salinas-Carmona M.C., Welsh O. And Rosdríguez M. 1992. **Isolation and Purification of two Inumodominant antigens from *Nocardia brasiliensis***. *Journal of Clinical Microbiology.*, pp 1183-1188.

APENDICE

A. Solución salina 0.85 % p/v, Lab PISA.

B. KOH 5%,

5 gr KOH en 100 ml de agua destilada.

C. (NH₄)₂SO₄ Saturado

D. Etanol:Eter etílico 1:1, 1:2 y 1:3

E. Tris HCl 1 M pH 6.8

6.055 gr Tris HCl en 100 ml de agua, antes de aforar ajustar el pH.

F. PBS 0.1 M pH 7.2

NaCl 8 gr

Na₂HPO₄ 1.22 gr

KH₂PO₄ 0.2 gr

KCl 0.2 gr, aforar a 1 litro

G. Acrilamida-bisacrilamida 30% T, 2.5 % C

Acrilamida 29.2 gr

Bisacrilamida 0.8 gr

Disolver en 80 ml de agua destilada, dejando agitar por 18 horas a 4° C, posteriormente filtrar en papel Whatman y aforar a 100 ml. Mezclar con amberlita por 1 hora para quitar impurezas en agitación a 4°C y filtrar, después guardar en frasco oscuro a 4°C.

H. Tris HCl 3 M 8.8

Trisma Base 18.16 gr, aforar a 100 ml, ajustar el pH antes de aforar.

I. Lauril Sulfato de Sodio 10%, 10 ml de SDS en 100 ml de agua destilada

J. Glicerol 50%,

K. Persulfato de Amonio 5%, 5 gr de PSA en 100 ml de agua destilada

L. TEMED (N, N, N', N' tetrametiletildiamino, Lab SIGMA.

M. Buffer de corrimiento c/SDS 1X

Tris 125 mM,	3.02 gr
glicina 192 mM	14.41 gr
SDS 0.1%.	1.0 gr, aforar a 1 litro

N. Buffer de muestra 4X

SDS	1.0 gr
2-Mercaptoetanol 10%	1.0 ml
Sacarosa	5.0 gr
Azul de bromofenol	0.005 gr, disolver en Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

O. Azul de Coomassie R-250 0.1%,

Azul de coomassie	0.1 gr en 100 ml de Solución desteñidora.
-------------------	---

P. Solución desteñidora

Metanol 40%
Acido acético 10%.

Q. Solución fijadora

Metanol	50%
Acido acético	12%

R. Solución de lavado

Etanol 10 %
Acido acético 5 %

S. Solución Oxidante

Dicromato de Potasio	3.4 mM
Ac. Nítrico	3.22 mM

T. Nitrato de Plata 0.012 M

AgNO ₃	0.509 gr en 250 ml de agua destilada
-------------------	--------------------------------------

U. Solución Reveladora

Carbonato de sodio	2.965 gr
Formaldehído	0.05 ml, aforar 100 ml con agua.

V. Acido acético 0.1 %

W. HCl 1N

X. NaOH 1N

Y. Reactivo de Bradford

60 mg de azul de coomassie G-250 y se disuelve en 1 litro de ácido perclórico al 3 %. Se filtra.

Z. Albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml

AA. BaCl₂

BB. Acido caprílico

Peróxido de Hidrógeno.

