

PROTEINAS SOLUBLES DE CEPAS DEL GENERO SACCHAROMYCES POR ELECTROFORESIS DE DISCO

POR M. J. RIGONE DE PRITZ Y MARCELO H. HUNAU¹

SUMMARY

Electrophoresis on polyacrylamide gel is used, to study 6 strains of *Sacch. cerev. var. ellipsoideus*, and 4 strains of *Sacch. rosei*.

This paper report the evaluation of extraction and runnings techniques, to be applied to the yeast. Up to 14 bands in *Sacch. cerev. var. ellipsoideus* and 17 bands in *Sacch. rosei* are detected.

The position and density of the bands inside each species are analyzed.

ANTECEDENTES

El trabajo taxonómico de LODDER y VAN RIJ (1), es el más usado entre nosotros para la correcta denominación y ubicación de una determinada cepa de levadura. Es evidente que no resuelve todos los problemas que al respecto se plantean. Por consiguiente, al criterio morfo-fisiológico, que en el mismo predomina, se trata de sustituirlo, con el criterio bioquímico.

Los patrones electroforéticos de proteínas, son usados como guías en la taxonomía de muchas especies animales (2, 3, 4); de plantas (5, 6, 17), y desde 1962, con el trabajo de CHANG y col. (7), se aplicó a varias especies microbianas. Estos últimos autores trabajaron con *Neurospora*, aplicando el método de ORNSTEIN y DAVIS (8): Electroforésis en Gel de Poliacrílida (electroforésis de disco). El mismo les permitió establecer diferencias netas entre especies, y diferencias menores, dentro de la especie; no obstante llegaron a una perfecta distinción entre cepa salvaje y mutante.

En 1963 CLARE (9), usa electroforésis en gel de almidón, para el estudio de las proteínas de varias ascomicetas, comparando el género *Pythium* con diversos hongos y levaduras de panificación. Llega a la conclusión que hay grandes diferencias entre géneros y también dentro del género *Pythium*. Establece por este método y para este género la presencia de hasta once bandas de proteínas.

En 1964, FREDRICK (10), por electroforésis en gel de acrilamida compara patrones de algas azul-verdes: *Oscillatoria*, con rojas: *Rho-*

¹ Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Agrarias. U. N. C.

dymenia, y verdes: *Spirogyra*. Llega a la conclusión que puede existir una estrecha relación filogenética entre las azul-verdes y las rojas. En cuanto a las verdes determina la existencia de una "pathway" evolucionario hacia las plantas superiores. En 1965 AFFRONTI (11), aplica el mismo método al filtrado de *Mycobacterium tuberculosis* e identifica hasta 19 bandas, cuando trabaja con extracto de sulfato de amonio a saturación total.

También CIARE y col. (12), en 1966 por electroforésis en gel de almidón, efectúan un estudio análogo en *Phytophthora*. Demuestran que en diferentes especies, existen por lo menos tres bandas distintas. En la misma época, DURBIN (13), efectúa un estudio similar en *Septoria*, donde demuestra la existencia de trece bandas proteínicas. La considera como técnica que puede ayudar a otras en la identificación de proteínas.

GOTTLIEB y HEPDEN (14), estudian con la misma técnica, cinco especies de *Streptomyces* y un *Streptoverticillium*. Mediante el análisis de las bandas y el Ef. de las mismas, establecen concordancia dentro de la especie y también entre especies. Señalan el escaso efecto de la temperatura, variantes en el buffer, etc.

Finalmente BENT (15), aplica la electroforésis en gel de acrilamida, a especies de *Penicillium*. Demuestra la importancia del tiempo de cultivo, de la etapa del desarrollo vegetativo y del agotamiento de nutrientes.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resolvimos aplicar la técnica de electroforésis en gel de acrilamida al estudio de las levaduras. En este grupo microbiano existen también problemas filogenéticos y taxonómicos que la misma puede contribuir a resolver.

La técnica de gel de acrilamida (también electroforésis de disco), tiene la ventaja de definir más acabadamente bandas cuya difusión y movilidad las hacen a menudo confusas o irreconocibles en los esferogramas obtenidos por otros métodos. En contraposición a los geles de almidón, los de acrilamida son termoestables, transparentes, resistentes y relativamente, en un sentido químico, inertes; pueden ser preparados con un gran "range" de variación en el tamaño del poro, y son no iónicos. Con respecto a la electroforésis de papel se obtienen más fracciones resueltas, más angostas y un frente recto.

En consecuencia, este trabajo —el primero de una serie— informa acerca de la aplicación del análisis electroforético a extractos de distintas cepas del género *Saccharomyces*. El propósito de esta contribución es, en primer lugar, evaluar la utilidad del método para su aplicación a este extenso grupo microbiano. En segundo lugar, al determinar patrones proteínicos específicos, en base a densidad y desdoblamiento de las bandas establecer grupos dentro de la especie y las relaciones filogenéticas de las mismas.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS USADAS:

- 1 e — *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* J. DE LA CIERVA.
- 2 e — *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* J. DE LA CIERVA.
- 4 e — *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* BORDEAUX.
- 5 e — *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* Mendoza.
- 6 e — *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* Mendoza.
- 7 e — *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* Mendoza.
- 1 r — *Sacch. rosei* J. DE LA CIERVA.
- 2 r — *Sacch. rosei* PEYNAUD.
- 3 r — *Sacch. rosei* J. DE LA CIERVA.
- 4 r — *Sacch. rosei* J. DE LA CIERVA.

CULTIVO

Las cepas utilizadas fueron cultivadas en el siguiente medio: agua de levadura autolizada, glucosada al 2%; e incubadas a $\pm 28^{\circ}$ C, en agitador rotatorio, durante 48 horas. Las células fueron recolectadas inmediatamente con la ayuda de Centrífuga Internacional refrigerada modelo PR2, a 3.000 r.p.m., durante 20 minutos (temperatura 10° C). El paquete celular fue resuspendido en un volumen de agua destilada esterilizada fría y recentrifugado, repitiéndose una vez más la operación. Las pastas celulares así obtenidas, fueron conservadas a -15° C, hasta su uso.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS:

De los métodos ensayados (adición de abrasivos; congelamiento de la masa celular, con los cristales de hielo sirviendo como abrasivos; ondas sónicas; y molido manual); el más efectivo resultó el molido manual en frío de las pastas, con el uso de polvo de alúmina como abrasivo (100-200 mallas). Antes de su uso, las pastas se mantuvieron en desecador sobre silicagel 3 horas, para inducir una deshidratación y aumentar así la consistencia, con lo cual se facilitan las operaciones posteriores.

Dos gr. de células, e igual peso de polvo de alúmina, fueron mezclados con 1 ml. de buffer fosfato 0,1 M. PH : 8 en un mortero preenfriado, triturándose la mezcla durante 7 minutos, seguido de la adición de 2,5 ml de buffer y continuando la operación 3 minutos más.

La suspensión resultante fue centrifugada a 5.000 r.p.m., 15 minutos en centrifuga Lourdes, descartándose el precipitado que contiene células que no han sido rotas, alúmina y debris celular; la fracción sobrenadante, se recentrifugó a 12.000 r.p.m. 15 minutos. El contenido proteico de los extractos así obtenidos fue determinado; los valores están alrededor de 2,5 % para las cepas de *S. rosei* y de 1,5 % para *S. cerevisiae var. ellip.*

ELECTROFORESIS:

El medio soporte consistió en 3 capas polimerizadas y separadas de gel en poliacrilamida. De arriba hacia abajo: Gel de muestra - Gel de concentración (stacking gel) - Gel separador (o de corrida); la gelificación se llevó a cabo en un sistema vertical de tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno y 65 mm de largo; este proceso se lleva a cabo por la luz, en presencia de dos catalizadores: persulfato de amonio y riboflavina. El buffer usado fue tris-glicina pH: 8,3, repartido en un sistema de dos cubas: la superior el cátodo y la inferior ánodo; así las proteínas como aniones, se separan a medida que se mueven hacia abajo. Se aplicó para nuestro sistema de 6 tubos, 12 mA y 150 V. durante 35 minutos y luego 20 mA y 250 V 50 minutos; ya que comprobamos que este sistema de corriente era el que daba mejores resultados en la resolución y separación de las bandas. La coloración se realizó con Amido Schwarz al 1% en acético al 7%, durante media hora; mayores tiempos, por la concentración de proteínas de las muestras daban mucha fijación de colorante. La decoloración fue hecha con ácido acético al 7% aumentado la rapidez del proceso, por medio de la corriente eléctrica.

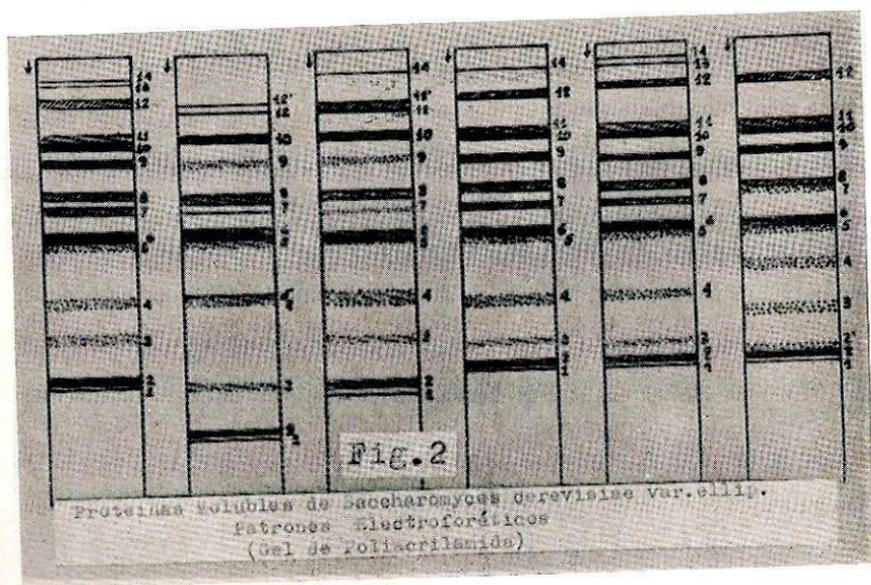
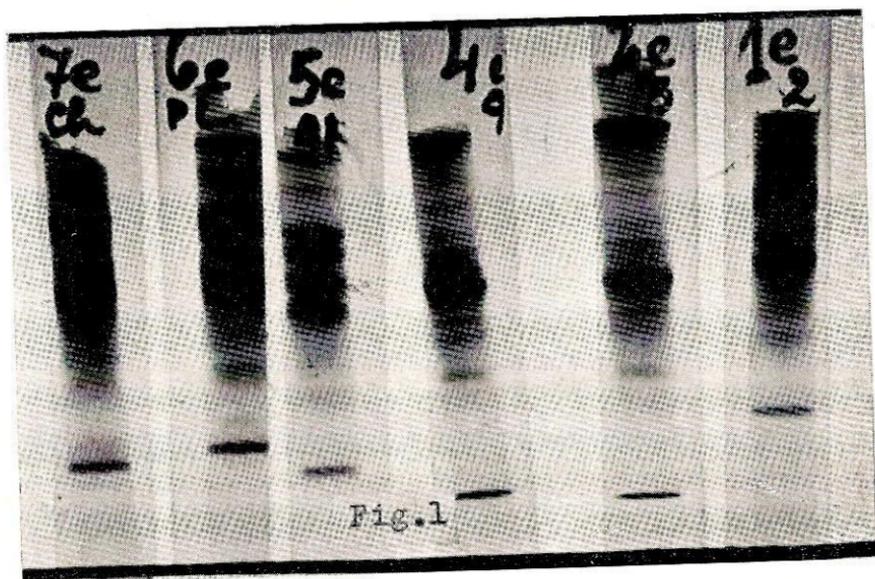
RESULTADOS

El análisis de los electroferogramas permite establecer un determinado número de bandas prácticamente constantes para cada especie analizada, con características particulares en velocidad de corrimiento y desdoblamiento de las mismas.

Saccharomyces cerevisiae var. ellip. (Fig. 1), evidencia en casi todas las cepas la presencia de 14 bandas proteínicas (Fig. 2). En ellas las proteínas de mayor movilidad, se revelan en dos bandas (1-2) de distinta concentración y de igual velocidad de corrimiento. Las bandas (3-6) que corresponden a las de mediana movilidad, se revelan con casi idénticas características de velocidad y concentración, manifestándose en forma más positiva las (5-6).

El tercer grupo está constituido por el conjunto de las bandas de poca y escasa movilidad, corresponde a las proteínas (7-11). La número (7), se muestra de regular concentración en las cepas 1e, 5e y 6e; aparece difusa en la 4e y 7e, y como una única línea fina en la cepa 2e. La banda (9), aparece con insuficiente concentración en las cepas 2e y 4e, y muy concentrada en las restantes. Estas mismas cepas, manifiestan diferencias con respecto a las otras en la la banda (10), que se muestra aislada y de mediana concentración frente a las restantes en las que aparece más fuertemente coloreada y acompañada de la (11), ambas con casi idéntico frente de corrida.

Un cuarto y último grupo estaría constituido por el conjunto de bandas (12-14), que atañe a las proteínas de escasa migración; es



también en las cepas 2e y 4e donde se exterioriza la diferencia respecto a las otras; en ambas la banda (12), aunque con diferente expresión de concentración en cada una, aparece duplicada, pudiendo interpretarse como desdoblamiento de una o señal de dos diferentes proteínas.

El conjunto de las bandas que están más cerca del punto de partida (13-14), aparece duplicado en las cepas 1e y 6e; como una única banda (14) en 4e y 5e, y no se revela en la 2e y 7e.

La otra especie que fue motivo de iguales observaciones: *Saccharomyces rosei* (Fig. 3), se caracteriza por la presencia de mayor número de bandas (17), (Fig. 4). El conjunto de las proteínas de más velocidad, está caracterizado por dos bandas de igual concentración y movilidad (1-2) en todas las cepas, y una fina banda difusa (3) en las cepas 1r y 2r.

La fracción (5) tiene igual característica de concentración en las cepas 1r y 2r por un lado y en 3r y 4r por otro. La banda (6), se encuentra en las dos primeras cepas y falta en las otras.

El segundo conjunto está constituido por las fracciones (7-13). La (7), aparece distinta únicamente en concentración sólo en la cepa 3r; la fracción (8) se encuentra ausente en 4r y en cambio la (9) se presenta en todas con iguales características. Las bandas (10) y (11) se evidencian en las cepas 1r, 3r y 4r casi con iguales características; mientras que en la cepa 2r no aparece la banda (11).

Por último dentro de este grupo de características semejantes de corrida están las fracciones (12-13). La primera está ausente en la cepa 4r, aparece difusa en las cepas 1r y 2r y como una línea fina en la 3r. Entre las de escasa movilidad se observa un conjunto muy uniforme, el constituido por las fracciones (14-15-16), que en todas las cepas exhiben iguales características de concentración y velocidad de corrimiento.

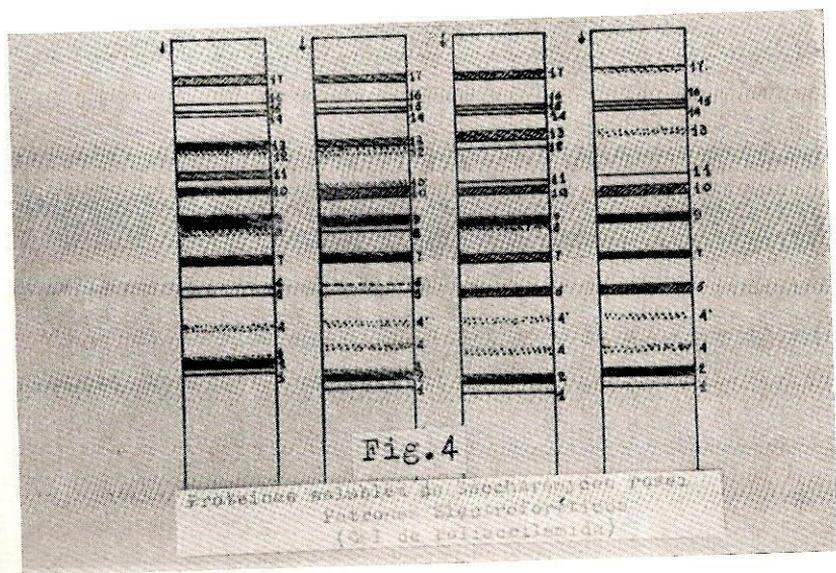
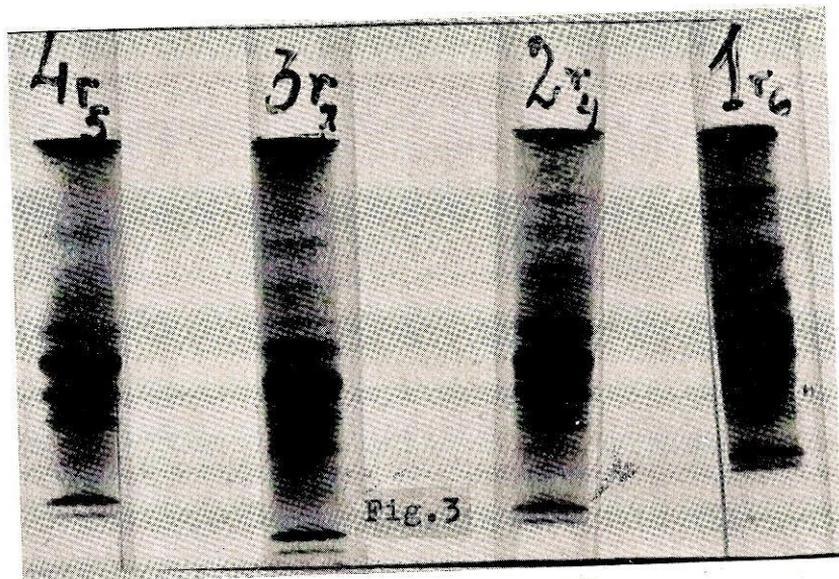
Finalmente la de menor movilidad, la (17), común a todas las cepas, pero con características de escasa concentración en la cepa 4r.

DISCUSION

Es indudable que el método aquí utilizado (electroforesis de disco), permite revelar mayor número de bandas que los otros similares utilizando otros medios soportes.

Las bandas de movimiento más rápido en el gel (1-2), se presentan con iguales características en las dos especies y también en las distintas cepas analizadas.

En el caso de *S. cerevisiae var. ellip.*, la zona correspondiente a las proteínas de poca y escasa movilidad (7-14) es la que presenta las diferencias más netas en cuanto a movilidad y concentración en cada una de las cepas.



S. rosei, evidencia diferencias al igual que la anterior en las bandas comprendidas en la región de mediano y escaso desplazamiento (5-13); por lo tanto la diferencia más notable puede establecerse en la parte intermedia del gel.

Estas observaciones realizadas con las distintas cepas de cada una de las dos especies, son valederas indiscutiblemente para ambas (Fig. 5), en las cuales se encuentra menos concordancia en la comparación de la concentración y desdoblamiento de las bandas. Resultados que estarían de acuerdo con los obtenidos por GOTTLIEB D. and HEPDEN P. M., en 5 especies del género *Streptomyces* y un *Streptoverticillium*.

Estas observaciones estarían de acuerdo con la hipótesis de que "Las proteínas individuales que caracterizan una especie son claro reflejo de los genes que controlan su síntesis" y permite suponer que el fenotipo de una especie dada estaría de alguna manera relacionado con el espectro de sus proteínas.

RESUMEN

Se aplica el método de electroforesis en gel de acrilamida, al estudio de 6 cepas de *Sacch. cerev. var. ellipsoideus*, y a 4 cepas de *Sacch. rosei*.

El propósito del trabajo es evaluar las técnicas de extracción, corrimiento etc., para aplicarlo a las levaduras. Se determinan hasta 14 bandas en *Sacch. cerev. var. ellipsoideus* y hasta 17 bandas en *Sacch. rosei*.

Se analiza la posición y densidad de las bandas dentro de cada especie.

BIBLIOGRAFIA

1. LODDER, J. and N. J. W. KREGER VAN RIJ. 1952. *The yeast, a taxonomic study*. North Holland Pub. Co. Amsterdam.
2. SMITHS, O. 1955. *Biochem J.*, 61, 629.
3. DESSAUCR, H. C. and W. FOX. 1956. *Science* 124, 225.
4. COHEN DE HUNAU, R. 1967. *Variaciones intrapoblacionales de patrones electroforéticos en « Bufo arenarum »*. *Acta Zool. Lilloana* XXIII, 223-242.
5. BECKMAN, L., J. G. SCANDALIOS, and J. L. BREWAKER. 1964. *Catalase Hybrid*.
6. GRAHAM, J. 1963. *Starch gel electrophoresis of wheat flour proteins*. *Australian J. Biol. Sci.* 16, 342-349.
7. CHANG, L. D., A. M. SRB and F. C. STEWARD. 1962. *Nature* 193, 756.
8. ORNSTEIN, L. and B. J. DAVIS. 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321.
9. CLARE, B. G. 1963. *Nature* 200, 4908, 803-804.

10. FREDRICK, J. F. 1964. *Polyacrilamide gel studies of isozimas involved in polyglucoside synthesis in the algae.* Fiton 21 (1), 85-89.
11. AFFERONTI, L. F., R. C. PARLETT and CORNESKY. 1965. *Electrophoresis on polyacrilamide gels of protein and polysaccharide fractions from Mycobacterium tuberculosis.* The Amer. Rev. of respiratory diseases, 91, 5.
12. CLARE, B. C. and G. A. ZENTMYER. 1966. *Starch gel electrophoresis of proteins from species of phytophthora.* Phythopathology, 56, 11, 1334-1387.
13. DURBIN, R. D. 1966. *Comparative gel electrophoresis investigation of the protein patterns of Septoria species.* Nature 210, 5041, 1186-1187.
14. GOTTLIEB, D. and P. M. HEPDEN. 1966. *The electrophoretic movement of Protein from various Streptomyces species as a taxonomic criterion.* J. Gen. Microbiol. 44, 95-104.
15. BENT, K. J. 1967. *Electrophoresis of protein of 3 Penicillium species on acrylamide gels.* J. Gen. Microbiol. 49, 195-200.
16. HUGO, W. B. 1954. *The preparation of cell-free enzymes from microorganisms.* Bacteriol. Rev. 18, 2, 87.
17. STEWARD, R. C. and J. T. BARBER. 1964. *The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 525.