

Optimización de técnicas proteómicas para el estudio de la judía común *Phaseolus vulgaris* L

Borrajo López A¹*Sanid. mil.* 2010; 66 (4): 217-222; ISSN: 1887-8571

RESUMEN

La finalidad del presente trabajo es la optimización de la técnica de electroforesis bidimensional (2-DE) y la evaluación de los diferentes métodos de extracción de proteínas para la obtención y estudio del proteoma de la judía común *Phaseolus vulgaris*. Como material biológico se han usado tejidos de semilla y hoja de la línea Calima perteneciente al acervo genético andino y de la línea ICA-Pijao perteneciente al acervo mesoamericano de esta especie, respectivamente. Se han evaluado tres métodos de extracción de proteínas: TCA-acetona, fenol y el kit comercial *clean up*. La electroforesis bidimensional se ha optimizado para geles con un gradiente de pH 4-7 en la primera dimensión. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el método óptimo de extracción de semilla es el fenol y para la hoja, el idóneo es el basado en el kit de precipitación. Con este estudio se puede ver cuál es el protocolo de precipitación más adecuado para cada tejido de *Phaseolus* por lo que con estos resultados se intenta dar solución a uno de los temas más controvertidos de la técnica.

PALABRAS CLAVE: proteína, Acetona-TCA, fenol, extracción proteica en plantas, electroforesis en gel bidimensional, proteoma.

Optimization of proteomic techniques for the study of the common bean *Phaseolus vulgaris* L.

SUMMARY

The purpose of this study is the optimization of two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique and the evaluation of different protein extraction methods to obtain and study the proteome of the common bean *Phaseolus vulgaris*. As biological material, seed and leaf tissues have been used. These tissues belong to the Calima line of the Andean gene pool and to the Ica-Pijao line of the Mesoamerican pool of this species, respectively. Three protein extraction methods have been evaluated: TCA-acetone, phenol and the commercial kit «clean up». Two-dimensional electrophoresis gels have been optimized for a gradient of pH 4-7 in the first dimension. The results show that phenol is the optimal method of seed protein extraction while the optimal method of leaf protein extraction is based on the precipitation kit. This study determines the most appropriate protocol of precipitation for each tissue of *Phaseolus*, and settles one of the most controversial topics of the technique.

KEYWORDS: Protein, TCA-acetone, Phenol, plant protein extraction, two-dimensional gel, electrophoresis, proteome.

ABREVIATURAS

CHAPS: 3-(3-Cocoamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato

DTT: 1,4-Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

IPG: Gradiente de pH inmovilizado

pI: Punto isoeléctrico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TRIS: Tris (hidroximetil)-aminometano

INTRODUCCIÓN

En la era post-genómica, la proteómica se está erigiendo como una herramienta fundamental en la investigación de los sistemas biológicos al abordar el vacío de conocimiento existente entre el genoma y la célula viva, tratando de identificar las proteínas expresadas

en cada momento y que proporcionan a las células sus estructuras y sus funciones^{1,2}.

La electroforesis bidimensional de alta resolución (2-DE), es la técnica central en los estudios proteómicos y la base sobre la cual la proteómica se ha desarrollado ya que ha demostrado ser la técnica más poderosa para separar mezclas complejas de proteínas de muy diverso origen biológico³.

Las técnicas proteómicas se han aplicado en el estudio de un gran número de problemas biológicos, bioquímicos y biomédicos y en un gran número de organismos. En este trabajo se emplean técnicas proteómicas (fundamentalmente 2-DE) para el análisis cuantitativo y cualitativo de la expresión proteica judía común *Phaseolus vulgaris*, uno de los alimentos más antiguos y que han formado parte importante de la dieta humana desde hace miles de años.

En España, el cultivo de esta leguminosa tiene una gran importancia económica. Su consumo está asociado con una disminución de riesgo de padecer enfermedades coronarias, cáncer de colon y enfermedades gastrointestinales⁴⁻⁶.

En este estudio se ha trabajado mediante 2-DE, optimizando la técnica, con dos poblaciones de judía con procedencias diversas: México (mesoamericanas) y Perú (Andes).

La 2-DE permite inferir diferencias cuantitativas y cualitativas entre estos dos organismos basadas en comparaciones de cientos de proteínas codificadas por un gran número de genes.

¹ Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Genética. A Coruña. España.

Dirección para correspondencia: Borrajo López A. C/ Progreso n.º 66 4ºD. 32004 Ourense. España.

Recibido: 14 de julio de 2009

Aceptado: 20 de mayo de 2010

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Recolección de las muestras

Poblaciones de *P.Vulgaris*⁸:

- Línea evolutiva Andina: (CALIMA).
- Línea evolutiva Mesoamericana (ICA-Pijao).

Todo el material es proporcionado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Misión Biológica) de Pontevedra.

Cultivo

El cultivo se realiza a partir de semillas en macetas en el invernadero, manteniendo unas condiciones iguales para todas las variedades cultivadas.

Toma de muestras de los diferentes tejidos de la planta

Hoja y semilla (directamente y sin ser cultivada).

Preparación de los extractos de proteína totales.

Los tres pasos fundamentales en la preparación de las muestras para su análisis mediante electroforesis bidimensional (2-DE) son rotura de las células del tejido a analizar, solubilización de las proteínas presentes en la muestra y eliminación de sustancias tales como lípidos, polisacáridos o ácidos nucleicos que puedan interferir en la posterior separación electroforética. Para romper las células de judía, se liofilizaron las muestras previamente congeladas⁷ y se pulverizaron con ayuda de un mortero.

Para obtener patrones reproducibles y comparables, es necesario que las proteínas estén totalmente solubilizadas, desnaturalizadas y que no interactúen entre ellas. Para conseguirlo, las muestras se disuelven en un tampón de lisis cuya composición es urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 3%.

Valoración de la concentración proteica de las muestras

Para cuantificar la concentración proteica de las muestras se ha usado el kit CB-X Protein Assay que proporciona una rápida estimación, además de ser compatible con detergentes y otros agentes comunes en laboratorios como azúcares reductores, tioles y agentes quelantes. En este proceso no es necesaria la calibración estándar de proteína. Simplemente se mezcla la solución proteica con el CB-X y con los detergentes libres de proteínas. Se suspende el detergente en el CB-X Assay Dye y se lee la densidad de la reacción óptica a 595 nm. El kit nos proporciona una tabla para una rápida y fiable determinación de la concentración. Esta tabla ha sido construida a partir de una compleja mezcla de proteínas cuyas dosis responden a buenas comparaciones con proteínas derivadas de animales, plantas, bacterias así como de levaduras.

Extracción de los diferentes tejidos de judía por diferentes protocolos. Estandarización de la extracción en judía

Un protocolo de extracción ideal debería ser altamente reproducible y solubilizar todos los componentes de las proteínas de la muestra dada y al mismo tiempo, minimizar los artefactos y los contaminantes de naturaleza no proteica formados después de la extracción.

Existen diversos métodos, aunque en este estudio sólo se han hecho experimentos con tres diferentes:

– *Extracción de proteína total con Acetona-TCA* (Ácido tricloroacético)⁹. Las muestras fueron suspendidas en 20 ml de acetona, 10% de TCA y 0,07% de DTT. Las células fueron rotas por sonicación. Seguidamente se dejaron a -20°C durante al menos una hora para después centrifugar las muestras a 4.500 rpm. El siguiente paso fue hacer una serie de lavados, los dos primeros con acetona y 0,07% de DTT y el tercero con H₂O destilada y 90% de acetona y finalmente el pellet fue suspendido en buffer de lisis¹⁰.

– *Extracción de proteínas basado en el fenol*, como método alternativo al anterior, en el cual se usa el fenol para eliminar contaminantes como lípidos, componentes fenólicos, polisacáridos etc., y obtener proteínas de calidad. Las muestras fueron suspendidas en 3 ml de buffer de extracción (1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), 0,7 M de sacarosa, 0,1 M de KCl, 0,5 M de Tris-HCl a pH 7,5, 500 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 2% de DTT). Las muestras se homogenizaron en hielo a 2°C usando un vórtex REAX 2000 (Heidolph) después de lo cual se añadió un igual volumen de fenol saturado en Tris – HCl a pH 7,5 a la muestra y así esta fue nuevamente homogenizada y centrifugada a 10.000 g durante 30 minutos. Se extrajo la fase fenólica con el buffer de extracción utilizado anteriormente y este proceso se repitió tres veces. Seguidamente se añaden cinco volúmenes de amonio acetato saturado en metanol y se deja toda la noche a -20°C . Finalmente se obtiene la precipitación de las proteínas por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos¹⁰. La muestra fue disuelta en buffer de lisis.

– *Extracción de proteínas por el método estándar de precipitación de proteínas* (2-D Clean-Up Kit de GBiosciences).

Estos tres protocolos se realizan de la misma manera para muestras de hoja como para muestras de semilla, cambiando sólo la cantidad inicial de muestra que en los tres métodos es para la hoja 300 mg y para la semilla 200 mg.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

La electroforesis bidimensional de alta resolución está considerada como la técnica experimental más resolutiva para separar mezclas complejas de proteínas en un solo gel. Consta de dos separaciones electroforéticas independientes: en la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (pI) y en la segunda dimensión en base a su peso molecular (PM).

Primera dimensión: el isoelectroenfoco

En la primera dimensión las proteínas se separan según su carga eléctrica en un gradiente de pH. En él, migrarán hacia el ánodo o el cátodo según su carga neta hasta alcanzar la región del gradiente de pH que coincida con su punto isoeléctrico (*pI*, pH específico en el cual la carga neta de la proteína es cero).

Gradiente de pH inmovilizado en el gel (IPGs)

A finales de los 80, se diseñó una nueva metodología¹¹ que usa geles de acrilamida al 4% deshidratados y unidos a un soporte plástico donde el gradiente de pH lo genera las inmovilinas, unas moléculas anfotéricas unidas covalentemente a la matriz del gel (tiras IPG, Immobiline pH gradient DryStrip, GBiosciences). La utilización de



Figura 1. Electroforesis, primera dimensión.

las tiras mejora enormemente la reproducibilidad¹² y el manejo de los geles. En la figura 1 se pueden ver los dispositivos empleados para realizar la primera dimensión; técnica de IPGs (izquierda) y técnica clásica (derecha).

Con el fin de optimizar la técnica para su aplicación al análisis de muestras de judía, se hicieron pruebas con tiras de IPG de varias longitudes y rangos de pH lineales y no lineales. En este caso, empleamos tiras de 11 cm con un gradiente no lineal (NL) que se distribuye sigmoidalmente entre los pH 4 a 7 (donde suelen concentrarse la mayor parte de las proteínas) reduciendo el solapamiento y favoreciendo una distribución de los «spots» más uniforme en el gel.

También se optimizó la cantidad de proteína o carga aplicable a cada gel en la primera dimensión para obtener patrones proteicos de gran calidad, la distancia de separación (longitud de las tiras) y la complejidad proteica de la muestra.

De la muestra, se obtenía un patrón con excelente resolución y una gran cantidad de «spots» sin apenas veteado y solapamiento entre ellos. La rehidratación de las tiras se llevó a cabo de forma simultánea a la aplicación de la muestra, mezclándose tampón de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, azul de bromofenol trazas, DTT 0,3% p/v, tampón IPG 0,5% v/v) y muestra. No se debe sobrepasar un volumen de 250 ml total ya que en caso contrario, el gel no absorbería toda la solución y las proteínas permanecerían en la solución sobrante en vez de entrar en el gel. El isoelectroenfoco se llevó a cabo en una unidad IPGphor (BioRad), siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. Normalmente el recorrido electroforético se realiza en varios pasos en los que el voltaje se aumenta de forma progresiva. Se realizó en este caso una rehidratación activa a 50V durante 12 horas para favorecer la entrada en el gel de las proteínas de alto peso molecular^{13,14}. Transcurridas estas 12 horas se inició inmediatamente el isoelectroenfoco a 500V durante 1 hora, seguidos de 1.000V también durante 1 hora y finalmente 8.000V hasta alcanzar un voltaje acumulado total de 33.500Vh. Una vez finalizada la primera dimensión los geles se sometieron de forma inmediata al proceso de equilibrado.

Equilibrado de los geles de primera dimensión

El equilibrado es un paso intermedio que prepara los geles de primera dimensión para la electroforesis de segunda dimensión. Su función principal es poner en contacto a las proteínas que han sido separadas en el isoelectroenfoco con el detergente SDS. Tras la primera dimensión el equilibrado de los geles se realizó en dos pasos: en el primero los geles se incubaron durante 15 minutos en una solución de DTT (10mg/ml), que reduce los puentes disulfu-

Tabla 1. Composición de geles segunda dimensión (2-DE IPGs).

Solución de Acrilamida/Bis 37,5:1	39,5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	20 ml
SDS 10%	0,78 ml
Agua destilada	18 ml
TEMED	9 µl
APS 10%	0,78 ml

TRIS: Tris (hidroximetil)-aminometano, SDS: Dodecil sulfato de sodio, TEMED: N,N,N', N'-Tetrametil-etilen diamino, APS: Persulfato amónico.

ro y las mantiene completamente desnaturalizadas⁷, en tampón de equilibrado (Tris 50mM, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%). En el segundo, se incubaron también 15 minutos en una solución de iodoacetamida (25mg/ml) en el mismo tampón. La iodoacetamida elimina el exceso de DTT evitando el veteado en los patrones electroforéticos. Tras el equilibrado se retiró la solución y se guardaron los geles a -80°C.

Segunda dimensión: SDS-PAGE

En la segunda dimensión las proteínas se separan en base a su peso molecular mediante la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS). Para la segunda dimensión se utilizó un sistema de electroforesis vertical, ya que éste permite correr varios geles de forma simultánea.

La electroforesis se realizó en geles al 15% de poliacrilamida (200 × 200 × 1,5 mm) y su composición está indicada en Tabla 1.

Tras descongelar el gel de la primera dimensión se situó éste pegado a la parte superior del gel de segunda dimensión, sellándose posteriormente con una solución de agarosa al 0,5% en tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) y trazas de azul de bromofenol. Esta solución de sellado también permite ver el frente de la electroforesis¹⁵. El corrido electroforético se realizó a 5 mA por gel durante 2 horas seguidos de 10 mA por gel durante 2 horas y 16 mA por gel durante 20 horas. Los tiempos indicados para las últimas fases del corrido electroforético son aproximados; se consideró finalizada la electroforesis cuando el frente de azul de bromofenol llegaba al final del gel. La segunda dimensión se realizó en el dispositivo que se muestra en la figura 2, a una temperatura constante de 27°C.



Figura 2. Dispositivo de electroforesis bidimensional, segunda dimensión.

Fijación y tinción de geles

El método de detección empleado es tinción con fluorescencia. Se ha usado para ello Sypro, reactivo fundamental para este proceso. Se ha utilizado mayoritariamente esta técnica porque muestra compatibilidad con un posible análisis por espectrometría de masas.

La fijación de los geles se realizó sumergiendo los geles durante 30 minutos en una solución al 40% de etanol y 10% de ácido acético.

Finalizado el proceso de tinción, se lavan los geles con agua ultrapura Braun y se digitalizan en el densitómetro Las 3.000 (Bio-Rad). Los geles originales se conservarán plastificados a 4°C.

Análisis informático de los patrones proteicos bidimensionales (análisis cuantitativo y cualitativo)

Una vez digitalizados los patrones bidimensionales se analizaron mediante el software PDQuest 8.0.1. (Bio-Rad).

Para llevar a cabo el análisis cualitativo se emplearon dos criterios: reproducibilidad e intensidad. Se desestimaron todos los «spots» no reproducibles. No se consideraron aquellos presentes en los márgenes del gel ya que en esta zona el pH es inestable y la reproducibilidad baja. Se seleccionaron «spots» con una intensidad suficiente como para que se puedan distinguir de forma inequívoca sobre el fondo del gel. Además se ha hecho un análisis cualitativo comparativo entre los diversos protocolos de extracción para poder obtener una lista de spots que presenten diferencias entre los diferentes procedimientos de precipitación de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tres métodos de extracción de proteínas: el comúnmente usado para vegetales TCA-Acetona, aquel basado en la precipitación de proteínas a partir del fenol y el llevado a cabo por un kit comercial han sido comparados en términos de focalización de «spots», número de «spots» resueltos, intensidad y variabilidad. Estos tres protocolos son muy apropiados para los estudios de proteómica de plantas considerando su simplicidad y el número de muestras manejadas en este tipo de estudios.

Para elegir uno de estos protocolos se tiene en cuenta que en cada estrategia de extracción se considera la naturaleza del tejido de la muestra. Los materiales de vegetales son normalmente más problemáticos para los análisis proteómicos que otros tejidos de otros organismos, porque las células vegetales, como en nuestro caso, son ricas en proteasas y componentes que interfieren seriamente en la estabilidad, separación y análisis de las proteínas, además de tener proteínas a muy bajas concentraciones. Entre los componentes interferentes de las plantas se encuentran: polisacáridos, lípidos, componentes fenólicos y una serie de metabolitos secundarios¹⁶⁻¹⁸.

El protocolo TCA/Acetona es extremadamente efectivo para algunos tejidos de algunas plantas, particularmente para tejidos vegetales jóvenes y para la inhibición de proteasas de los mismos, las cuales causan la degradación proteolítica de proteínas y la pérdida de proteínas de alto peso molecular además de la eliminación de interferentes. Sin embargo, puede extraer también contaminantes poliméricos. Además este método es especialmente problemático con tejidos maduros y aquellos que tienen grandes cantidades de células

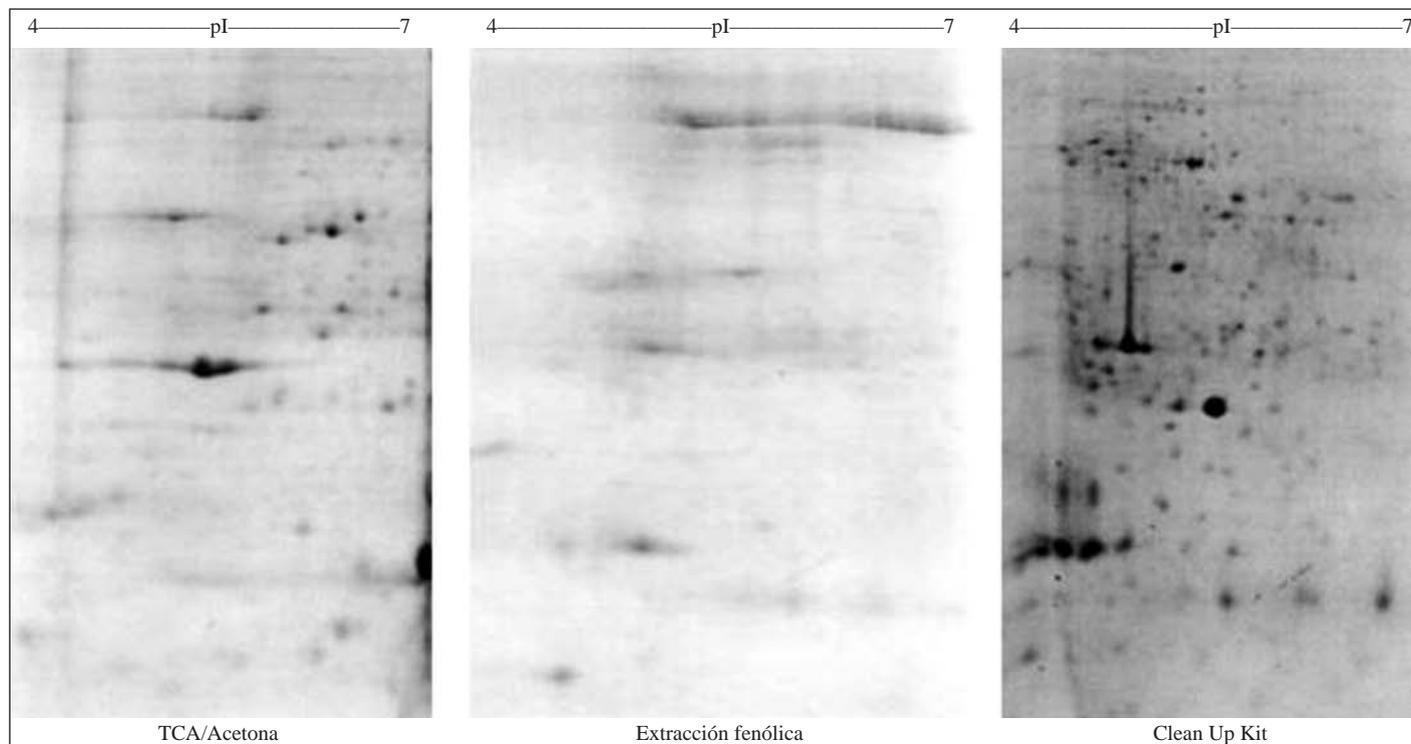


Figura 3. Comparación de los patrones de spots de 2-DE, de hoja Ica-Pijao, obtenidos a partir del uso de tres técnicas de extracción diferentes. Las proteínas fueron precipitadas usando el método TCA/Acetona (a), el protocolo del fenol (b) y el kit de extracción de proteínas, Clean-Up (c). Los geles fueron realizados usando tiras IPG (11cm) de pH 4-7 no lineal en la primera dimensión y geles de SDS al 15% en la segunda dimensión. Fueron teñidos con SYPRO Ruby (fluorescencia) y posteriormente escaneados.

con paredes con altos niveles de polisacáridos y polifenoles¹⁰. Como se puede ver en los resultados, este método no es demasiado efectivo con hoja ya que presenta un patrón con bastantes interferencias debido probablemente a la interacción con algún compuesto contaminante, y los «spots» resultantes no están bien definidos (Fig. 3).

Un protocolo alternativo es aquel que lleva a cabo la solubilización de las proteínas con fenol, con o sin SDS, y la subsecuente precipitación con metanol y amonio acetato^{19,20}. Este método puede, efectivamente, obtener extractos de proteínas de alta calidad con una contaminación mínima aparente.

Muchos estudios demuestran que la extracción con fenol da resultados satisfactorios con tejidos de plantas recalcitrantes, ricas en componentes que inhiben la electroforesis, como el fruto del plátano, meristemos de manzana y hojas de la patata. Con nuestros resultados encontramos que en hoja de judía el método del fenol no extrae adecuadamente el patrón proteico pudiendo ser debido a interferencias en la parte básica (Fig. 3). En semilla, el patrón que se obtiene del fenol puede ser comparable a aquel que se obtiene con el método TCA/Acetona siendo este último de menor calidad en la extracción de proteínas de alto peso molecular, como se puede observar en la parte superior del gel (Fig. 4).

En el método estándar hemos usado para la precipitación el kit, 2-D Clean -Up Kit de Amersham Biosciences. Este kit se basa en la precipitación de proteínas dejando en solución las sustancias interferentes como detergentes, sales, lípidos, compuestos fenólicos y ácidos nucleicos. Después las proteínas son resuspendidas en una solución compatible con la primera dimensión (isoelectroenfoque). Este método es muy eficaz con todo tipo de muestras especialmente con aquellas que contienen muchos contaminantes.

Este tratamiento mejora la calidad de los resultados de la electroforesis bidimensional, reduciendo el «streaking» (interferencias

que aparecen en el gel en forma de líneas horizontales) y otras consecuencias de compuestos interferentes. Esto se demuestra en el gel resultante de hoja donde se consigue un patrón con spots muy definidos, sin interferencias y sin contaminación de fondo (Fig. 3). Esto también se puede aplicar a la semilla en la cual obtenemos spots muy definidos pero en la que vemos algunas interferencias a ambos lados del gel (Fig. 4).

Para hacer una buena comparación entre los diferentes patrones obtenidos se debe de asumir reproducibilidad entre ellos, es decir, que durante todo el proceso de la técnica el tratamiento debe ser exactamente igual con todas las muestras. Para que exista reproducibilidad, las muestras deben de estar en el mismo estado de desarrollo ya que las proteínas expresadas en diferentes estados de desarrollo son diversas y tienen diferente afinidad por unos polisacáridos de la pared que por otros. En este estudio se han usado todas las semillas en el mismo estado de desarrollo y todas las hojas proceden del primer trifolio.

Existen diferencias cualitativas entre los patrones de los diferentes métodos de extracción demostradas con los análisis hechos mediante el programa PDQuest 8.0.1 se detectaron 302 «spots» para el método de TCA/Acetona, 191 «spots» para el método del fenol y 393 «spots» para el método de extracción basado en el kit de precipitación en tejidos de hoja. En el caso de la semilla las diferencias no son tan significativas y se encontraron 223 «spots» para el método de TCA/Acetona, 290 para el protocolo del fenol y 249 para el método basado en el kit.

Con todos estos resultados se puede deducir que el protocolo basado en el kit de precipitación extrae más «spots» y con un patrón más definido en el caso de la hoja. En el caso de la semilla el protocolo que consigue extraer más «spots» es el de fenol, el cual también da el patrón más limpio y definido.

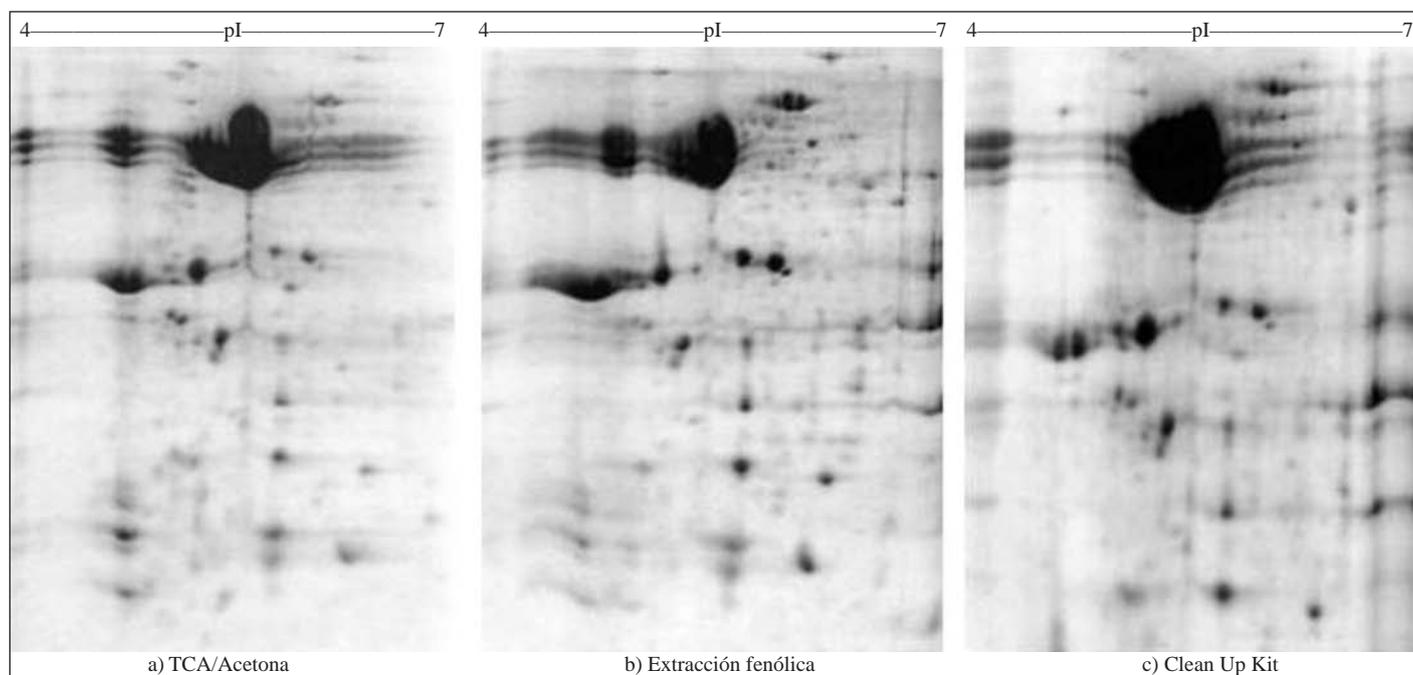


Figura 4. Comparación de los patrones de spots de 2-DE, de semilla Calima, obtenidos a partir del uso de tres técnicas de extracción diferentes. Las proteínas fueron precipitadas usando el método TCA/Acetona (a), el protocolo del fenol (b) y el kit de extracción de proteínas, Clean-Up (c). Los gels fueron realizados usando tiras IPG (11cm) de pH 4-7 no lineal en la primera dimensión y gels de SDS al 15% en la segunda dimensión. Fueron teñidos con SYPRO Ruby (fluorescencia) y posteriormente escaneados.

CONCLUSIONES

La precipitación de proteínas es absolutamente necesaria para poder obtener buenos resultados en estudios proteómicos con vegetales. Precipitación con TCA/Acetona y extracción con fenol son dos de los métodos más usados con tejidos de plantas. La extracción con fenol es óptima eliminando contaminantes y da como resultado geles de alta calidad. Las diferencias con el método de TCA/Acetona son pocas y este es extremadamente efectivo en vegetales pero su mayor dificultad es la resolubilización de las proteínas precipitadas. El protocolo basado en el kit de precipitación es muy común y se usa con todo tipo de organismos. Las proteínas precipitan por centrifugación y el pellet resultante es lavado para eliminar los contaminantes no proteicos. La mezcla es centrifugada de nuevo y el precipitado puede ser fácilmente resuspendido en buffer de lisis.

Con todos nuestros resultados se puede deducir que el protocolo basado en el kit de precipitación extrae más «spots» y con un patrón más definido en el caso de la hoja. En el caso de la semilla el protocolo que consigue extraer más «spots» es el de fenol, el cual también da el patrón más limpio y definido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19:1853-1861.
2. Hochstrasser DF. Proteome in perspective. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:825-836.
3. Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002; 2:3-10.
4. Bazzano L, Odgen LG, Loria C, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women. *Arch Intern Med* 2001; 161:2573-2578.
5. Hagen L and Bennink MR. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus Vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 2002; 44:60-65.
6. Kabagambe EK, Baylin, Ruiz-Narvarez E, Siles X, Campos H. Decreased consumption of dried mature beans is positively associated with urbanization and non-fatal acute myocardial infarction. *J Nutr* 2005; 135:1770-1775.
7. Mosquera E. Análisis genético del mejillón marino *Mytilus galloprovincialis* Lmk. mediante técnicas proteómicas. (Tesis doctoral) 2005.
8. Santalla M, Rodiño AP, De Ron AM. Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. *Theor Appl Genet* 2002; 104:934-944.
9. Santoni V, Bellini C, and Caboche M. Use of 2-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Planta* 1994; 192:557-566.
10. Saravanan RS and Rose JKC. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics in press* 2004.
11. Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; 9:531-546.
12. Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Görg A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 1994; 15:1205-1211.
13. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W. Recent developments in 2-D gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 1999; 20:712-717.
14. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21:1037-1053.
15. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6:103-112.
16. Gegenheimer P. Preparation of extracts from plants. *Meth Enzymol* 1990; 182:174-193.
17. Granier F. Extraction of plant-proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1988; 9:712-718.
18. Tsugita A and Kamo M. 2-D electrophoresis of plant proteins. *Methods Mol Biol* 1999; 112:95-97.
19. Hurkman WJ and Tanaka CK. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 1986; 81:802-806.
20. Meyer Y, Grosset J, Chartier Y and Cleyet-Marel JC. Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* 1988; 9:704-712.