

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

**Evaluación de Procedimientos de Tinción para el
Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE)**

TESIS

Que para obtener el Título de
1942
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta

JORGE GUILLERMO CARRILLO SOTO

H. CABORCA, SONORA

MARZO DEL 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACION

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis profesional de **Jorge Guillermo Carrillo Soto**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez

Presidente

MC. Ramon Efraín Lugo Sepúlveda

Secretario

MC. Eligio Espinoza Ojeda

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi **Director de tesis**, Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, por ofrecerme sin su ayuda no fuera posible la realización de este trabajo de tesis además de su valiosa amistad.

A **mi** Asesor MC. Ramon Efraín Lugo Sepúlveda, gracias por su aportación en este trabajo de tesis.

A **mi** Asesor Eligio Espinoza Ojeda, gracias por su confianza y amistad que me brindo en este proyecto.

DEDICATORIAS

A mis **Padres** José Arturo Carrillo Parra y Elizabeth Gpe. Soto Angulo, Gracias por creer y apoyarme en mi vida, por siempre estar conmigo y por el gran esfuerzo que realizaron para poder darme esta educación.

A Mi **Esposa** Rosa Isabel Padilla Ramírez, por estar conmigo todo el tiempo, apoyarme y por su ayuda incondicional en todas mis metas. Gracias.

A mis **Hermanos**, Mayra, Arturo, Iohanan, por su apoyo y aliento a seguir adelante. Gracias.

Jorge Guillermo Carrillo Soto

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos particulares.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Estructura y función de proteínas.....	6
Relación de las proteínas con el análisis clínico.....	8
Separación Electroforética de Proteínas.....	9
Fundamentos de la Electroforesis.....	14
Revelado de Proteínas en Geles de Poliacrilamida SDSPAGE.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	19
Preparación de Geles.....	21
Ensamblado de los Moldes.....	22
Polimerización.....	24

Aplicación de Muestra y Desarrollo Electroforético.....	27
Revelado de los Geles de SDS-PAGE.....	30
DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	33
Análisis de Muestras de Suero.....	35
Experimentos de Validación de la Metodología.....	35
RESULTADOS Y DISCUCIONES.....	38
Estandarización de la Técnica de Análisis de SDS-PAGE para Muestras de Suero Humano.....	38
Revelado de Geles con Diferentes Colorantes.....	40
Validación de las Modificaciones al Procedimiento de Tinción.....	44
Intervalo Dinámico Lineal.....	40
Limite de Detección para la Tinción con Violeta de Genciana.....	46
Reproducibilidad.....	48
Comparación con el Método de Referencia.....	50
Análisis de Muestras Clínicas.....	52
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
ANEXOS.....	58
Procedimientos para la Preparación de Soluciones...	58
Procedimientos para la preparación de diferentes Porcentajes de Entrecruzamiento.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la poliacrilamida.....	13
2. Componentes para la preparación de geles de electroforesis del sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad)...	20
3. Ensamblado de cristales para formar el molde para geles de electroforesis PAGE.....	23
4. Preparación del gel separador y concentrador.....	26
5. Montaje, carga de muestra y desarrollo electroforético.....	29
6. Procedimiento para el revelado de los geles.....	32
7. Comparación de geles revelados con diferentes colorantes disponibles en el laboratorio.....	39
8. Comparación de diferentes colorantes utilizados.....	41
9. Comparación de diferentes colorantes utilizando diferentes concentraciones de suero.....	42
10. Intervalo dinámico lineal.....	45
11. Tinción violeta de genciana utilizando muestra BSA...	47
12. Comparación de reproducibilidad del método de tinción	49
13. Correlación entre los métodos de tinción con violeta de genciana y azul de Coomassie.....	51
14. Comparación de distintos colorantes y tinción violeta de genciana utilizando como muestra suero humano...	53
15. Tinción azul mezclilla 23 y azure A utilizando como muestra suero humano.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pagina
1	Volumen de soluciones requeridas para la preparación de geles de poliacrilamida al 12% para el sistema Mini-Protean® 3 de Bio-Rad.....	25
2	Características de los colorantes utilizados.....	34
3	Comparación de análisis de la electroforesis en muestras de suero humano y BSA reveladas con distintos colorantes.....	43
4	Concentraciones para la preparación de diferentes porcentajes de entrecruzamiento.....	61
5	Concentraciones para gel concentrador.....	62

RESUMEN

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) fue descrita por primera vez por Laemmli en 1970 y hasta ahora son mínimas las modificaciones realizadas a la metodología original. Sin embargo, el consumo de tiempo excesivo para el revelado de los geles la hace poco atractiva para que se pueda aplicar en los análisis de rutina de un laboratorio clínico. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de distintos procedimientos de tinción para el revelado de geles en el análisis de proteínas del suero humano por electroforesis SDS-PAGE. Se utilizaron los colorantes Violeta de Genciana, Azure A y Azul Indigo 23, con el fin de investigar la capacidad de resolución en el revelado de geles usando Como colorante control al Azul de COOMASSIE. Se estandarizó la técnica de SDS-PAGE para el análisis de muestras de suero humano logrando reducir hasta un 25% el tiempo total. El violeta de genciana presentó mayor sensibilidad para la tinción de proteínas en los geles de SDS-PAGE. El método fue validado con pruebas de control de calidad analítica, resultando una excelente linealidad ($R^2 > 0.995$), con un límite de detección similar al del Azul de COOMASSIE ($< 1.0 \mu\text{g}$) y excelente reproducibilidad ($m= 1.045$). El análisis de muestras clínicas se validó con suero fresco humano presentando una correlación aceptable (0.971) para la albumina que fue la proteína que se utilizó como estándar de comparación en todo este estudio. Los resultados de este trabajo demuestran que es posible utilizar colorantes comunes disponibles en cualquier laboratorio de análisis.

INTRODUCCIÓN

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es un método rápido, reproducible y de bajo costo a nivel de muestra. Esta técnica es ampliamente utilizada para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Esta técnica analítica en su forma semi-preparativa primeramente separa las biomoléculas según su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico y posteriormente se transfiere para estudios inmunológicos.

La electroforesis permite separar mezclas complejas de proteínas de acuerdo con su tamaño molecular, haciéndolas pasar por un copolímero entrecruzado de Bis-Acrilamida, sobre el cual se adhieren las proteínas. El SDS (dodecil sulfato de sodio), es un detergente que consta de doce átomos de carbono, este se une a las proteínas y las desnaturaliza parcialmente, y debido a que se encuentra cargado negativamente les confiere esta carga a las proteínas. Se dice que (la separación se realiza en condiciones desnaturalizantes) debido a que se añaden compuestos que alteran las condiciones nativas de las proteínas y que se incorpora en una solución llamada búfer de muestra, el cual consiste en un agente reductor como el 2-mercaptoetanol que se encarga de

eliminar los puentes disulfuro formados en la estructura terciaria de las proteínas entre los aminoácidos. Al aplicar un campo eléctrico a la muestra inmersa en un búfer de corrida, el complejo proteína-SDS se transfiere hacia el polo positivo y se separa según su tamaño ya que se produce pérdida de la estructura terciaria y secundaria y se generan las cadenas polipeptídicas lineales que conforman la proteína. Las moléculas de menor longitud y peso molecular, migrarán más rápido, mientras que la que posean un peso molecular mayor lo harán posteriormente.

El método electroforético SDS-PAGE es utilizado cada día más en el estudio de enfermedades en los que el suero juega un papel importante, ya que sabemos que es muy difícil que haya una enfermedad que no altere este líquido principalmente la forma de complejos proteicos presentes. La determinación de estos complejos separados dentro de un campo eléctrico por la influencia ejercida por los electrodos clásicos como son el cátodo y el ánodo (- y +), permite al investigador por comparación de sus valores normales con los encontrados en la enfermedad, conocer y precisar numerosos cuadros patológicos. No solo las albúminas del suero sanguíneo es susceptible de un estudio electroforético sino que también las de tejidos, toxinas y venenos.

La técnica de electroforesis SDS-PAGE fue descrita por primera vez por Laemmli (1970) y hasta ahora son mínimas las

modificaciones realizadas a la metodología original. Sin embargo, el consumo de tiempo excesivo para el revelado de los geles la hace poco atractiva para que se pueda aplicar en los análisis de rutina de un laboratorio clínico. Se han intentado la simplificación de esta técnica y se han desarrollado equipos altamente costosos para resolver esta problemática.

En este trabajo se analizaron distintos procedimientos de revelado de geles de electroforesis SDS-PAGE, además de la utilización de distintos tipos de colorantes para presentar una alternativa en este procedimiento y a su vez lograr reducir los tiempos en el revelado de tal manera que se puedan aplicar en un laboratorio clínico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluación de distintos procedimientos de tinción para el revelado de geles en el análisis de proteínas del suero humano por electroforesis SDS-PAGE.

Objetivos Particulares

1. Estandarización de una técnica de electroforesis SDS-PAGE para el análisis de muestra de suero.
2. Comparación de diferentes colorantes de fácil disponibilidad para la tinción de proteínas en el revelado de los geles con la metodología original.
3. Evaluar la posibilidad de realizar el pre-teñido de las proteínas para disminuir el tiempo de análisis.
4. Validar la metodología establecida para el análisis de muestras de suero humano.

ANTECEDENTES

Durante las últimas décadas, la electroforesis en geles de poliacrilamida ha sido la técnica de elección para el análisis de la composición proteica de un determinado tipo de célula y el seguimiento de los cambios en la actividad de los genes a través del análisis cuantitativo y cualitativo de miles de proteínas que orquestan varias funciones celulares.

La técnica de electroforesis es una técnica altamente sensible, útil para la separación de biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius (1937), quien al trabajar con proteínas descubre una técnica para su separación por acción de un campo eléctrico y es en inventor de un equipos para la electroforesis¹. Raymond y Weintraub (1959), emplearon como un soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente la técnica fue perfeccionada por otros investigadores. Laemmli (1970) describió una nueva técnica que logra un aumento en la resolución por la utilización del SDS. Dos años después en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación de peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS o bien

SDS-PAGE, además se han realizado innumerables procedimientos de tinción en la literatura desde los tiempos de Ornstein y Davis^{2,3}. Esta técnica es la que se ha venido empleando desde su surgimiento hasta los tiempos actuales.

Estructura y Función de las Proteínas

Las proteínas se sintetizan dependiendo de cómo se encuentren regulados los genes que las codifican por lo tanto son susceptibles a señales o factores externos. El conjunto de proteínas expresadas en una circunstancia determinada es denominado proteoma. Las proteínas son macromoléculas compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. La mayoría también contienen azufre y fósforo. Las mismas están formadas por la unión de varios aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. El orden y disposición de los aminoácidos en una proteína depende del código genético.

Las proteínas constituyen alrededor del 50% del peso seco de los tejidos y no existe proceso biológico alguno que no dependa de la participación de este tipo de sustancias. En el metabolismo, el principal producto final de las proteínas es el amoníaco (NH_3) que luego se convierte en urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}_2$) en el hígado y se excreta a través de la orina.

Las proteínas son clasificables según su estructura química en:

- Proteínas simples: Producen solo aminoácidos al ser hidrolizados.
- Albúminas y globulinas: Son solubles en agua y soluciones salinas diluidas (lacto albumina de la leche).
- Glutelinas y prolaninas: Son solubles en ácidos y álcalis, se encuentran en cereales fundamentalmente el trigo. El gluten se forma a partir de una mezcla de gluteninas y gliadinas con agua.
- Albuminoides: Son insolubles en agua, son fibrosas, incluyen la queratina del cabello, el colágeno del tejido conectivo y la fibrina del coagulo sanguíneo.
- Proteínas conjugadas: Son las que contienen partes no proteicas.
- Proteínas derivadas: Son producto de la hidrólisis.

Las funciones principales de las proteínas son:

- Ser esenciales para el crecimiento. Las grasas y carbohidratos no las pueden sustituir.
- Proporcionan los aminoácidos esenciales fundamentales para la síntesis de tejidos.
- Son materia prima para la formación de los jugos digestivos, hormonas, proteínas plasmáticas, hemoglobina, vitaminas y enzimas.

- Funcionan como amortiguadores de pH, ayudando a mantener la reacción de diversos medios como el plasma.
- Actúan como catalizadores biológicos acelerando la velocidad de las reacciones químicas del metabolismo. (son las enzimas)
- Actúan como transportadoras de gases como oxígeno y dióxido de carbono en sangre. (hemoglobina)
- Actúan como defensa, los anticuerpos son proteínas de defensa natural contra infecciones o agentes extraños.
- Permiten el movimiento celular a través de la miosina y actina (proteínas contráctiles musculares).
- Resistencia. El colágeno es la principal proteína integrante de los tejidos de soporte.

Relación de las Proteínas con el Análisis Clínico

En la actualidad la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es uno de los métodos que cada día es más empleado en la detección de enfermedades en que el suero sanguíneo juega algún papel, que consiste en valorar la cantidad y calidad de diversas fracciones proteicas que la forma. (por otra parte las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos). Las proteínas forman un papel muy importante en la vida y son las biomoléculas más versátiles y diversas, además que son imprescindibles para el crecimiento del organismo.

En la actualidad se ha ido introduciendo esta técnica no solo en el trabajo de investigación si no que también en el trabajo de el laboratorio clínico. Estas técnicas se están empleando en análisis como los son:

- Electroforesis de proteínas en suero: Este examen se realiza para examinar las proteínas globulínicas en la sangre. La identificación de los tipos de globulinas (electroforesis de globulinas) puede ayudar en el diagnóstico de ciertos trastornos como pueden ser; mieloma múltiple, enfermedad inflamatoria múltiple (artritis reumatoide, LES), infección aguda.
- Albumina en suero: Este examen ayuda a determinar si un paciente sufre de una enfermedad hepática o de una enfermedad renal o si no hay una absorción suficiente de proteína por parte del organismo.(la albumina es también la responsable de mantener el pH en la sangre ⁴)

Separación Electroforética de Proteínas

La separación y purificación de proteínas es necesaria para llevar a cabo el estudio y caracterización del proteoma de los sistemas biológicos. Para ello, éstas deben de ser separadas a

partir de mezclas complejas mediante un procedimiento de fraccionamiento adecuado. Para obtener los mejores resultados influyen factores como la naturaleza de la muestra que sirve de guía para alcanzar las condiciones en las que se deben obtener los mejores resultados⁵. Los métodos para la separación de proteínas se basan en aprovechar diferentes características de las proteínas tales como solubilidad, tamaño o carga. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis.

El termino electroforesis fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis para definir el fenómeno por el cual una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño y forma de las moléculas y así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo.⁶

Existen numerosas variaciones de estas técnicas en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico químicas en la cual se van a llevar a cabo la separación:

- Electroforesis capilar
- Electroforesis en papel
- Electroforesis en gel de agarosa

- Electroforesis en gel de poliacrilamida
- Isoelectroenfoque
- Electroforesis bidimensional

Los geles de poliacrilamida son soportes que poseen buena resolución y gran versatilidad al trabajar con proteínas. Además que estos soportes poseen una serie de ventajas tales como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerzas iónicas y fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida.

Los geles que se emplean son geles tridimensionales de polímeros ramificados que tienen los espacios entre ramificación rellenos de líquido. De este modo la electroforesis en gel tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que transmite las moléculas por la relación carga/tamaño y el tamizado, que separa principalmente por el tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.

La agarosa es un polímero derivado de un polisacárido neutro, que gracias a su poder de gelificación y propiedades físico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de Biología Molecular. La poliacrilamida es un copolímero formado a partir de acrilamida y N, N' metilen-bis-acrilamida. La concentración de ambos reactivos define el grado de reticulación

del gel. Ambos geles tienen en común que adquieren la misma forma y están prácticamente libres de cargas iónicas. Esto es importante para evitar que la disolución búfer se desplace por el gel cuando se active el campo eléctrico. La Figura 1 muestra la estructura de la formación de gel de poliacrilamida. La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida se puede llevar a cabo en condiciones nativas (Nativa-PAGE) o desnaturalizante (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del búfer de electroforesis, así como el tratamiento de las muestras.

Como su nombre lo indica la electroforesis desnaturalizante se incluyen agentes desnaturalizantes como son: detergentes y reductores. En el caso de los reductores, las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no solo por su carga eléctrica, sino también por su tamaño y forma. Por el contrario cuando las proteínas se solubilizan en presencia de un detergente aniónico como lo es el SDS, este se une a las proteínas rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturalizándolas. Las proteínas desnaturalizadas aportan una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, por lo que la carga nativa original está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS.

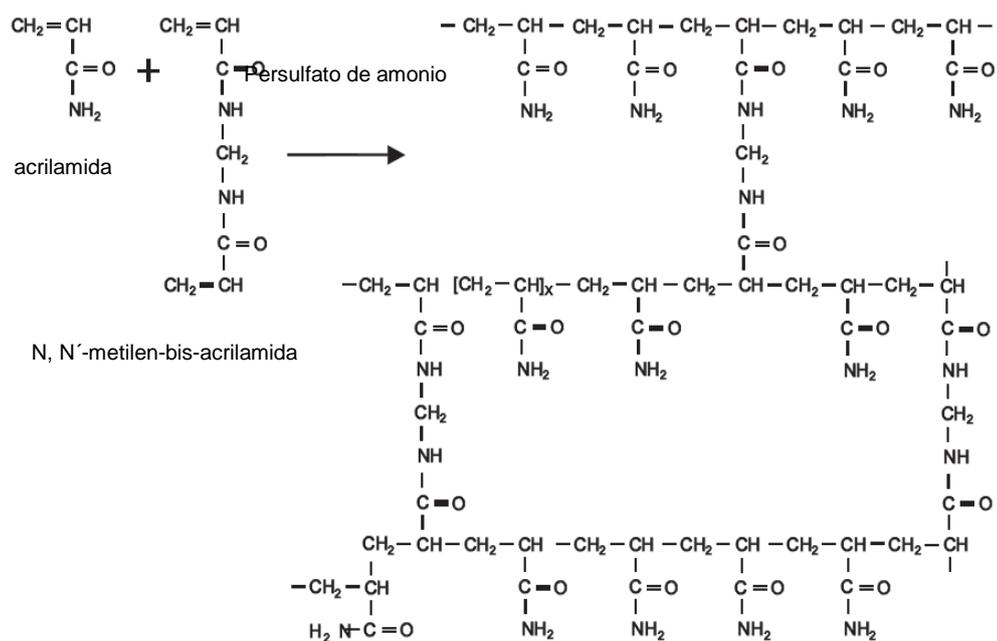


Figura 1. Estructura química de la poliacrilamida

Actualmente existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en base a los búferes utilizados:

- 1.- El sistema continuo de Weber y Osborn. En este sistema existe un único gel separador que emplea el mismo búfer en los tanques y en el gel.
- 2.- El sistema discontinuo o de Laemmli que consta de dos tipos de geles: un gel llamado concentrador con un tamaño de poro restrictivo (grande) que se forma sobre el segundo gel llamado separador. En este sistema cada uno de los geles se prepara con tampones de diferente pH y fuerza iónica, y el búfer de electroforesis es un tercer tipo de búfer.

Fundamentos de la electroforesis

La electroforesis es la migración de partículas bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas emigran hacia el cátodo o el ánodo (- y +) en combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La velocidad de migración de las partículas es directamente proporcional al producto de su carga efectiva y el gradiente de potencial eléctrico e inversamente

proporcional al coeficiente de fricción relativo a la talla y forma de la molécula, ósea a la resistencia que le ofrece el medio.

Es de destacar que a escala analítica los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza, además de ser estos métodos de los más baratos en cuestión de muestra ya que se utilizan unidades en el orden de pico gramos para la resolución de algunos complejos proteicos. Es útil además no solo para la separación sino para determinar otros parámetros como lo son el peso molecular, punto isoelectrico y numero de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula, el voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no puede aumentar indiscriminadamente por el cual se puede generar un excesivo calor. En contraste, al aplicar un bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa la separación ocurrirá en un tiempo muy prolongado.

Las aplicaciones más comunes de esta técnica electroforética son:

- análisis del grado de pureza de una proteína.
- determinación de su peso molecular

- verificación de la concentración de proteínas
- detección de proteólisis
- identificación de proteínas inmunoprecipitadas
- separación de proteínas marcadas con isótopos radia activos

Se han realizado comparaciones con otros métodos de diagnóstico para la detección de rotavirus. Sulbarán⁷ desarrollo un método de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), el cual no necesita de equipos sofisticados resultando mucho más económico que las pruebas de ELISA y MET además es confiable e informativo para el diagnóstico de enfermedad retroviral se utilizo este método para la comparación de dos inmuno ensayos enzimáticos. Se comparó la sensibilidad de los métodos entre sí, y la especificidad se determinó por microscopia electrónica de transmisión como método de referencia. Las tres técnicas resultaron con una sensibilidad del 100%, sin embargo, PAGE tuvo la mayor especificidad.

La prueba de PAGE resultó ser la más ventajosa por tener alta sensibilidad y especificidad de detección se pudo realizar en un tiempo relativamente corto y resultó mucho más económica.

Revelado de Proteínas en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE pueden ser visualizadas en el gel mediante diversos métodos de tinción como

lo son fluorescencia, nitrato de plata y azul de Coomassie, siendo este último el más utilizado.

Las proteínas coloreadas como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo c, pueden ser observadas directamente en los geles, sin embargo la visualización de la mayoría de las proteínas requieren del uso de colorantes, siendo los colorantes orgánicos fueron los que se emplearon primero para teñir proteínas en los geles.

Una rápida tinción, distinción y fijación son esenciales en el caso de las proteínas pequeñas para evitar su elución; la omisión del metanol de la solución de tinción es beneficiosa ya que se reduce el tiempo de tinción y disminuye el hinchamiento de los geles.

Entre los diferentes tipos de tinción, entre ellos el uso de nitrato de plata es uno de los más sensibles y tiene la característica de producir generalmente coloraciones carmelita (café claro) o negro, sin embargo algunas proteínas tienen colores característicos como son las lipoproteínas que tienden a colorearse azul y algunas glicoproteínas que aparecen amarillas, carmelitas (café claro) o rojas⁸. Este efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata. Se han desarrollado algunos procedimientos de tinción con plata

para identificar ciertas proteínas, con el empleo de combinaciones de tinción.

La tinción de coomassie puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, pero no para la determinación de pureza de proteínas trazas. Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de atracción electroestática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas.⁹

Se ha reportado la tinción de proteínas por otros métodos en los que se encuentran: ericromo negro, compuestos fluorogénicos y modificación de los aminoácidos de las proteínas.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte campus Caborca. Se utilizó un sistema para electroforesis Mini-Protean®3 (Bio-Rad). (Figura 2) para medir los volúmenes con alta precisión se utilizaron micro pipetas de volumen variable (100-1000 μ L y 10-100 μ L) de la marca comercial Rainin Instrument (SL1000 y SL100) y sus respectivas puntas desechables para micro pipetas. Las muestras fueron preparadas en tubos Eppendorf de 2 mL. En todo el trabajo se utilizó agua bidestilada y des ionizada. Los reactivos fueron grado analítico especiales para electroforesis todos de la Marca SIGMA-ALDRICH, Acrilamida (cat. A-3553), Trizma base (cat. T1503), N,N'-methylen-bis-acrilamida (cat. M-7279), Azul brillante coomassie R-250 (cat. 27816), Azul de bromo fenol (cat. B5525), glicina (cat. G-8898), SDS (cat. L3771) Persulfato de amonio (cat. A3678). Los procedimientos para la preparación de soluciones se encuentran descritos en el ANEXO A.

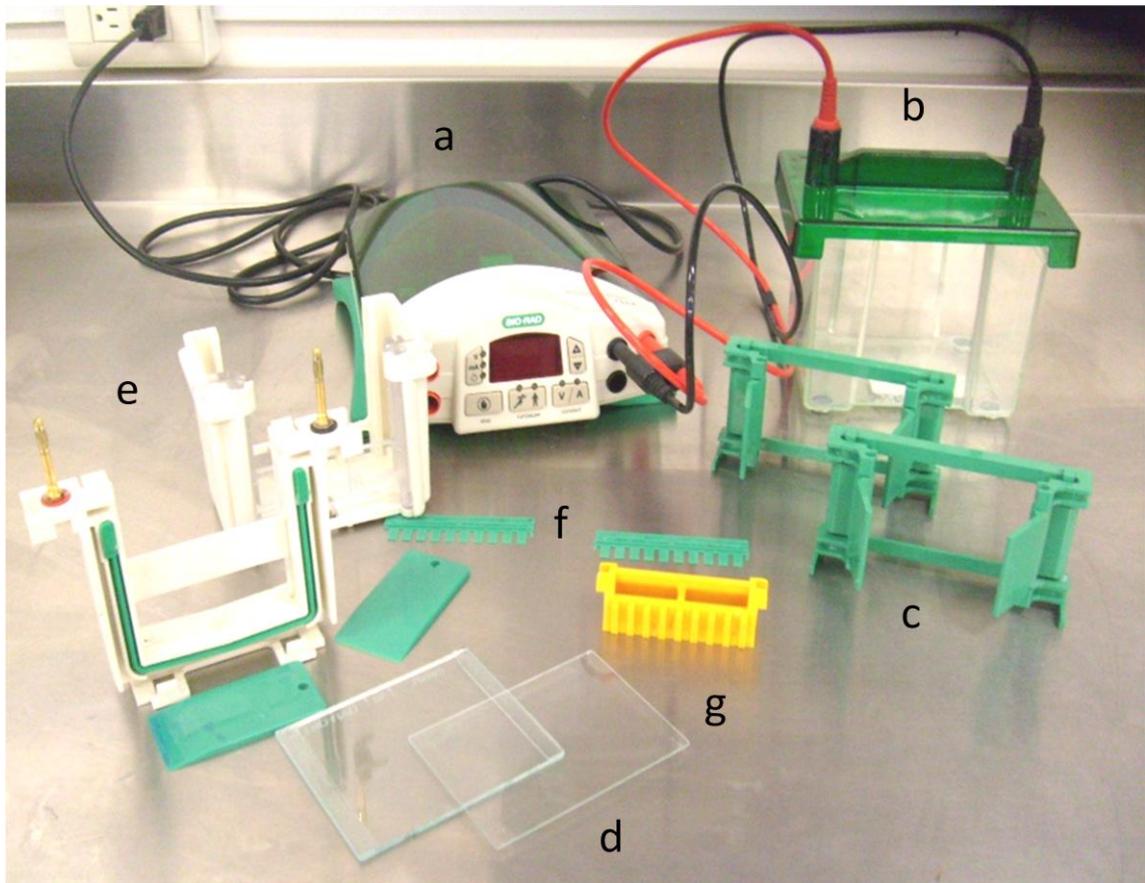


Figura 2. Componentes para la preparación de geles de electroforesis SDS del Sistema Mini-Protean® 3 (Bio-Rad)

a) Fuente de poder, b) tanque para corridas, c) soportes para elaboración de geles, d) moldes de cristal para formación de geles, e) soportes para tanque de corrida, f) peines para formación de pocillos, g) Guía para carga de muestra.

En la Figura 2 se observa el sistema Mini-Protean® 3 de Bio-Rad. En este sistema se fabrican los geles o se puede utilizar geles comerciales prefabricados. Este sistema incluye placas de cristal con el espaciador (0.75mm) unido en forma permanente que simplifica el manejo de los moldes.

El empleo de reactivos de alta calidad y agua desionizada es un prerrequisito para hacer geles reproducibles y de alta resolución, en particular esto es muy importante para la acrilamida, ya que es el constituyente más abundante del gel y sus principales impurezas son ácido acrílico residual (que puede retardar la actividad electroforética de algunas proteínas), poliacrilamida lineal e iones¹⁰.

Preparación de Geles de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida (PAGE) son los soportes de elección para la electroforesis, porque son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida. Además, escogiendo distintas cantidades de acrilamida y metileno-bis-acrilamida (un reactivo que realiza enlaces cruzados) y, variando los tiempos de polimerización, se pueden conseguir tamaños de poro controlados¹¹, que servirán como tamices moleculares que potencian la separación. Se ha planteado que la resolución de moléculas generalmente aumenta con la disminución

del grosor del gel¹². Los geles de poliacrilamida utilizados, constan de dos partes y se preparan sobre moldes verticales de vidrio. El gel superior (gel concentrador) tiene alrededor de 2 cm de longitud y los pocillos para aplicar las muestras. El gel inferior (gel separador) tiene un recorrido de unos 6 cm. Se debe tener especial precaución debido a que la acrilamida es un compuesto químico neurotóxico, mientras que la poliacrilamida no lo es; por lo que para la preparación de geles es necesario del uso de guantes de látex.

Ensamblado de los moldes

Previamente al ensamble de los moldes para la preparación de geles el material se lavó con una solución de extrán al 2% y enjuagados con agua desionizada. Se dejan secar en una estufa para secado de material (100°C, 1h), y posteriormente se enjuagaron con etanol al 70% procurando manipular los vidrios solamente por los bordes para evitar cualquier contaminación, una vez secos se procede a realizar el ensamble del molde para la formación de geles. Se utilizaron los vidrios con espaciador de 0.75 mm de espesor, se colocan en el soporte para los moldes y se verificó que no existieran fugas agregando agua hasta el borde superior de los moldes dejando por unos minutos para asegurar de que no existan fugas. Después se descartó el agua inclinando el soporte con los moldes ensamblados (Figura 3)

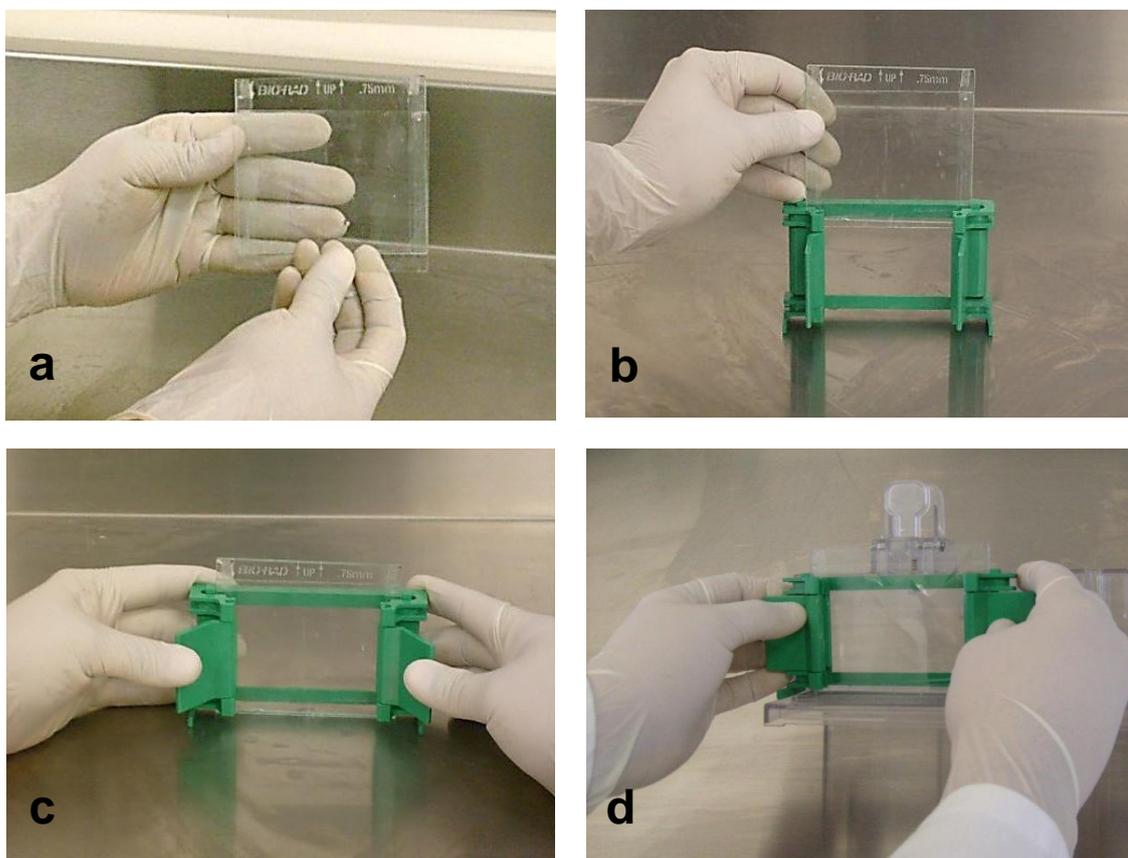


Figura 3. Ensamblado de cristales para formar el molde para geles de electroforesis PAGE.

- a) Alineado de vidrios para geles con espaciador de 0.75mm de espesor,
- b) introducción de vidrios en el marco, c) Emparejamiento y ajuste de vidrios en el marco. d) Colocación y aseguramiento del marco en la base de soporte.

Polimerización del gel de poliacrilamida

En la Tabla 1 se describen las cantidades de soluciones requeridas para la formación de geles para el sistema Mini-Protean® 3 de Bio-Rad con 12% de entrecruzamiento. Estas cantidades pueden adaptarse para otras cámaras de diversa capacidad, conservando las proporciones. En el anexo B se dan las concentraciones para otros porcentajes de entrecruzamiento.

En un tubo Falcon se mezclaron los reactivos para la preparación del gel separador y en otro tubo para el gel concentrador en las cantidades descritas en la Tabla 1: El persulfato de amonio al 10 %, se agregó un instante antes de vaciar la mezcla en los moldes (agregar los geles).

En la Figura 4 se observa el procedimiento para la preparación de los geles. Primeramente se descartó el agua de los moldes una vez que se verificó que no existían fugas. Al agregar el persulfato de amonio a la mezcla de reactivos para gel separador, se agregó la mezcla al interior de los moldes hasta alcanzar tres cuartas partes del volumen. Después se agregó agua desionizada para eliminar cualquier burbuja que se hubiera formado, además que esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno.² Se permitió la polimerización durante un tiempo de 20 min aproximadamente.

Tabla 1. Volumen de soluciones (microlitros) requeridas para la preparación del gel de poliacrilamida al 12%, para el sistema Mini-Protean® 3 de Bio-Rad.

Soluciones	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8%)	4000	325
4x Trizma HCl/SDS	2500	625
Agua des ionizada	3500	1250
Persulfato de amonio (10%)	40	12.5
TEMED	6.6	2.5

La solución de persulfato de amonio (10%) se agrega antes de chorrear los geles ya que este es el que inicia la reacción de polimerización.

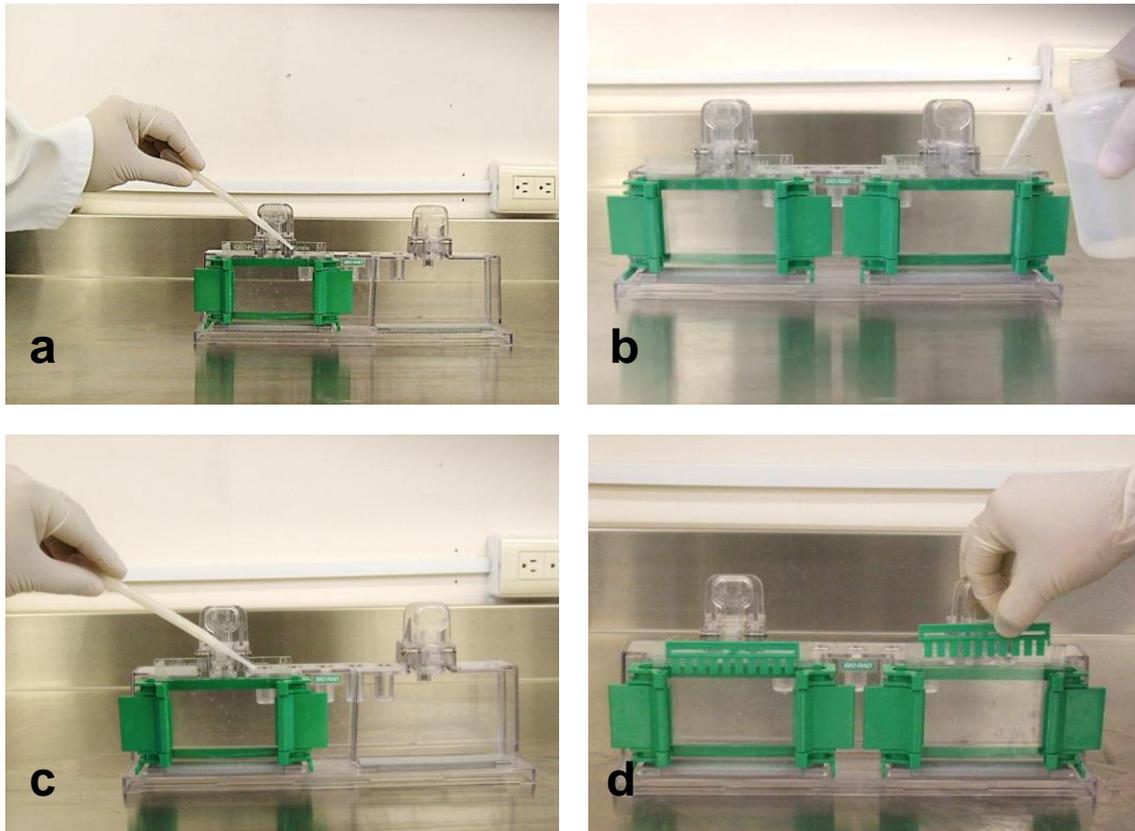


Figura 4. Preparación del gel separador y concentrador.

- a) Agregar el gel separador en el molde, b) Nivelación de la superficie del gel con agua, c) Agregar el gel concentrador, d) Colocación de peines para formar los pozos.

Una vez que polimerizó la mezcla se descartó el agua inclinando el molde ensamblado. Posteriormente, se agregó el persulfato de amonio a la mezcla correspondiente al gel concentrador. Inmediatamente después se agregó la mezcla en el interior de los moldes y se colocaron los peines para la formación de los pocillos para la carga de las muestras. Se dejaron polimerizar durante 20 minutos aproximadamente. Una vez que polimerizó el gel concentrador se retiraron los peines deslizándolos suavemente hacia arriba. Los geles formados se enjuagaron depositando agua desionizada en el interior del casete para eliminar los residuos no polimerizados.

Aplicación de Muestra y Desarrollo Electroforético

En el caso de la SDS-PAGE es necesario lograr una completa desnaturalización de las proteínas, para evitar la aparición de bandas fantasmas en la electroforesis. Las muestras de proteína se disolvieron en una solución reguladora con pH de 6.8 (búfer de muestra 2x) en el que contiene SDS, 2-mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro, azul de bromo fenol y glicerol. Se prepara colocando 2 μ L de muestra por 80 μ L de búfer de muestra 2x.

Una vez polimerizados los geles se realizó la carga de las muestras. En la Figura 5 se describe el procedimiento usado para el montaje, carga de muestra y corrida electroforética. Los casetes con los geles polimerizados se desmontaron y se colocaron en el soporte con electrodos. Después se insertó la guía para la carga de muestra, las cuales fueron agregadas en cada pocillo utilizando una micropipeta con puntillas especiales para cargar la muestra colocando hasta 20 μL .

Una vez cargadas las muestras, el soporte se colocó dentro de la cámara de corrida y se llenó, incluyendo el interior del soporte de los geles, con solución búfer reguladora la cual contiene glicina (concentraciones en anexo A), Trizma base y SDS (búfer para corrida 1x). Los electrodos se conectaron a la fuente de poder después de colocar la tapa sobre la cámara de desarrollo. Para iniciar el desarrollo electroforético, se energizó la fuente de poder aplicando una corriente eléctrica de 100 Volts, manteniéndola constante durante 2 h. aproximadamente o hasta que el frente de la corrida alcanzó el borde inferior del gel. Es importante la uniformidad de temperatura a través del gel mientras ocurre la corrida electroforética, generalmente elimina el efecto de deformación de las bandas en forma de sonrisa ¹⁰.

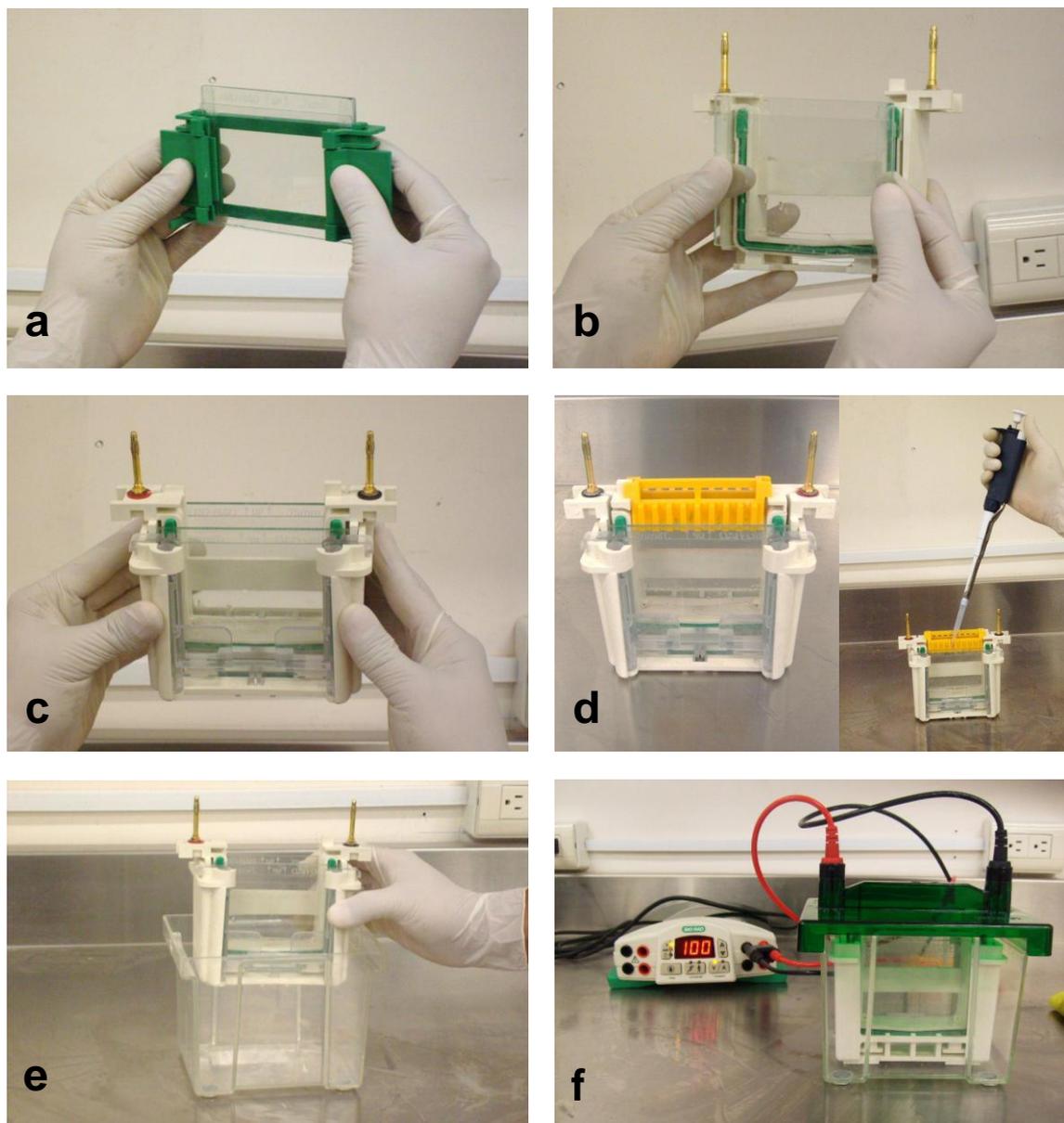


Figura 5. Montaje, carga de muestra y desarrollo electroforético. a) desmontado de los casetes del marco, b) colocación del casete en el soporte con electrodos, c) introducción del porta electrodos en el bastidor, d) colocación de guías y carga de muestra, e) montaje del bastidor dentro del mini tanque, f) llenado de la cámara de desarrollo y conexión de electrodos para iniciar la corrida.

Revelado de los Geles de SDS-PAGE

Una rápida tinción, destinción y fijación son esenciales en el caso de las proteínas pequeñas para evitar su elución, la omisión del metanol de la solución de tinción es beneficiosa ya que se reduce el tiempo de tinción y evita el hinchamiento de los geles.¹⁴. Cuando se ha completado una electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo, entonces se pueden 'revelar' mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Se emplean compuestos como el bromuro de etidio, para los ácidos nucleicos, o tinción de plata, azul de COOMASSIE o tinción fluorescente, para las proteínas.

El colorante azul de COOMASSIE es generalmente el más aceptado para el revelado de geles de electroforesis. se une a las proteínas y la intensidad de coloración es relativamente hasta cierto punto independiente de la concentración y naturaleza química de las proteínas, de esta forma cuando se tiene que cuantificar una proteína es el colorante mas recomendado.

Por otra parte la tinción con nitrato de plata tiene una detección de concentraciones más pequeñas que varía entre 2 a 5

ng. sin embargo detección con plata es exclusivamente cualitativa y no puede ser utilizada para cuantificar proteínas.

Para la tinción con Azul de COOMASSIE se utilizó una solución de tinción compuesta por metanol (50%), ácido acético (10%), agua destilada (40%) y 0.05 % p/v de Azul de COOMASSIE, mientras que la solución uno para desteñido consistió de la misma mezcla con excepción del colorante, y la solución dos para desteñido consistió de una mezcla de agua des ionizada (88%) ácido acético (7%) y metanol (5%).

Una vez concluida la corrida electroforética, se inició el procedimiento de revelado de los geles como se muestra en la Figura 6.

Primeramente se retiraron los geles de los cristales depositándolos en un recipiente de plástico descartando el gel concentrador y dejando el gel separador para su tinción. Se agregó la solución para tinción de Azul de COOMASSIE procurando que el gel quedará totalmente sumergido.

Para evitar los gases y olores que se desprenden, el recipiente de plástico se tapó y se colocó sobre la placa de agitación orbital, y agitándose por 12h o dejándolo por un periodo de 12 h (overnight).

Después del tiempo transcurrido se procedió a realizar el desteñido de los geles. Primeramente se retiró la solución de tinción y se agregó la solución uno de desteñido. Se agitó por espacio de 30 min y posteriormente se cambió la solución uno de desteñido por la solución dos de desteñido, dejándose en agitación por 30 min. en agitador orbital hasta que se observó el gel transparente.

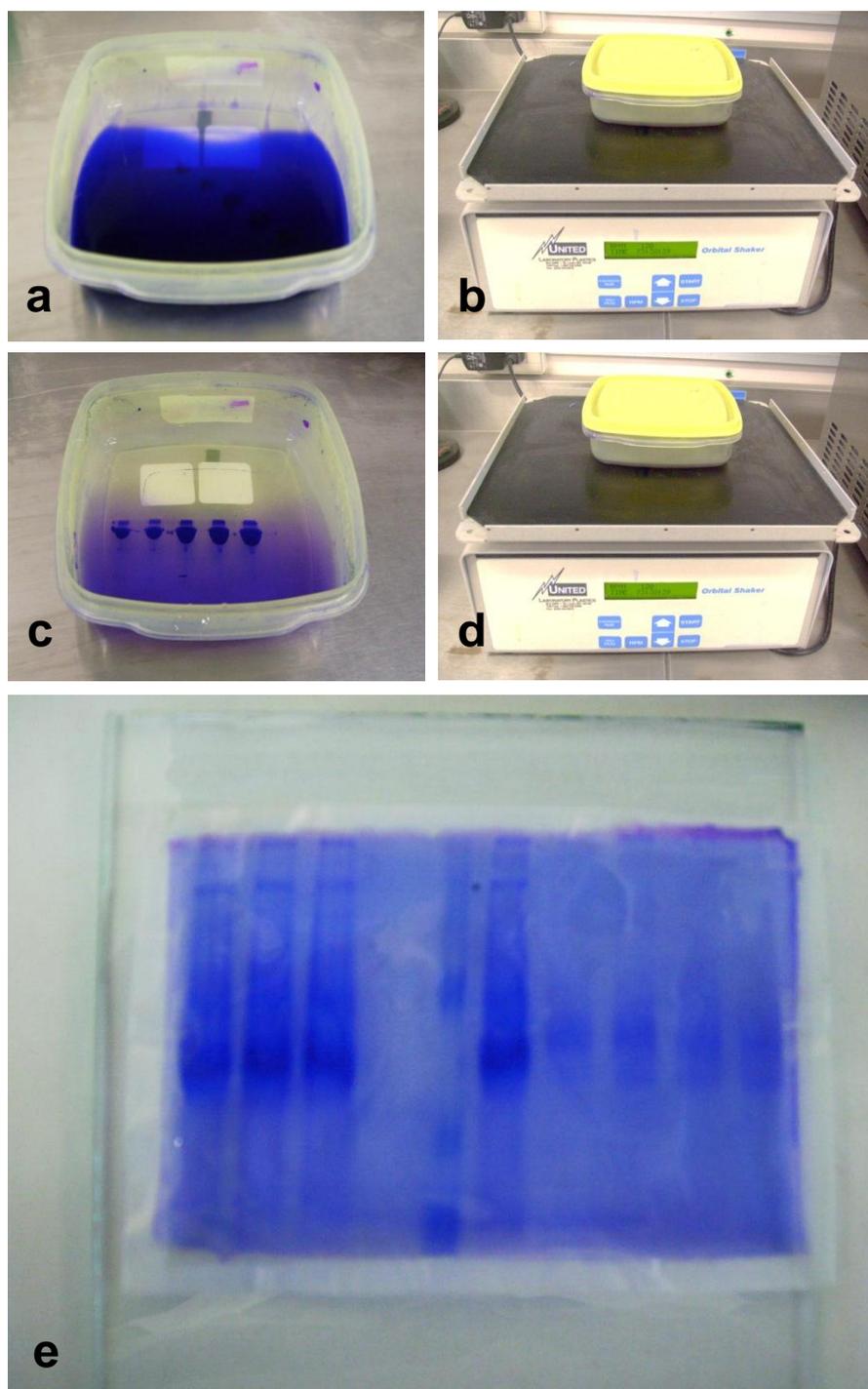


Figura 6. Procedimiento para el revelado de los geles.

- a) Sumergido de los geles en colorante para la tinción, b) Agitación de los geles en agitador orbital, c) Introducción de los geles teñidos en solución para desteñir, d) Agitación de los geles en agitador orbital, e) Enmicado de los geles en papel celofán dulce listo para su escanear y analizar.

Una vez terminado el revelado se colocan los geles en papel celofán transparente en forma de emparedado esto permitirá que el gel se seque sin causar ruptura, deformación, pérdida de la transparencia y sin necesidad de emplear calor o presión reducida ni ningún aparato especial para su manipulación, escaneo y almacenaje.¹⁵ Una vez escaneado se hace la comparación con los estándares adecuados.

Diseño de la Investigación

En este trabajo se evaluaron distintos procedimientos para el revelado de los geles de electroforesis utilizando los colorantes Violeta de Genciana (cloruro de hexametildisilazano-p-rosanilina), Azure A (N',N'-dimethylphenothiazin-5-ium-3,7-diamine), Azul Indigo 23 (2,2'-Bis(2,3-dihydro-3-oxoindolyliden), con el fin de investigar la capacidad de resolución en el revelado de geles SDS-PAGE. Como colorante control se utilizó al Azul de COOMASSIE, ya que es que describe el método de referencia para poder lograr su comparación. En la Tabla 2 se describen las características de los colorantes utilizados en la presente investigación.

Tabla 2. Características de los colorantes utilizados

Nombre del colorante	Estructura química	Formula Molecular	color	Solubilidad
Azul de coomassie		$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	Azul brillante	Etanol
Violeta de genciana		$C_{24}H_{28}N_3Cl$	Violeta intenso	Agua
Azure A		$C_{14}H_{14}ClN_3S$	Café oscuro	Agua
Azul mezclilla 23		$C_{16}H_{10}N_2O_2$	Azul cristalino	Agua

Análisis de Muestras de Suero

Con la finalidad de trabajar con muestras de interés clínico, se utilizaron muestras de suero sanguíneo, probando la gran cantidad de resultados que se pueden obtener a partir de este tipo de muestras, ya sea en los laboratorios clínicos o de investigación.

Las muestras de suero fresco, se desnaturalizaron mediante calentamiento en baño maría por un tiempo de 30 segundos. Se trasvasa una alícuota de 2 μL a un tubo de Eppendorf y se adicionó 80 μL el búfer de muestra 2x.

Experimentos de Validación de la Metodología

Una vez definida la técnica para el desarrollo y tinción de muestras de proteína por SDS-PAGE se procedió a la validación del método establecido aplicando las siguientes pruebas de control de calidad.

Linealidad

Con el fin de obtener el intervalo dinámico lineal, en este trabajo se realizaron corridas con muestras de suero humano (5

%v/v) y BSA (0.625 mg/mL) a diferentes volúmenes de carga (0, 5, 8, 10, 15 y 20 μ L) para la detección de las bandas de proteínas respectivamente. Para estos experimentos se utilizaron los distintos colorantes antes descritos, siguiendo los mismos procedimientos de tinción. Los geles fueron escaneados y analizados por densitocolorimetría en el programa de cómputo Image J (NIH, institute), determinando el área bajo la curva de los respectivos electrograma. Posteriormente los datos fueron analizados por regresión lineal en el programa Excel (Microsoft Office 2010).

Límite de detección

Las cantidades de proteína cargadas en cada pozo fueron del orden de microgramos. Para estos experimentos se utilizaron los distintos colorantes antes descritos, siguiendo los mismos procedimientos de tinción para determinar la cantidad mínima detectable por cada uno de los colorantes.

Se analizó la capacidad de detección del método de tinción a diferentes concentraciones de muestra utilizando suero humano y BSA a distintas concentraciones indicando una relación lineal a las diferentes concentraciones. Cuando el análisis densitocolorimétrico no produjo un pico cuantificable se estableció la cantidad mínima detectable.

Reproducibilidad

Con el fin de lograr una reproducibilidad comparable con otros métodos, además de que se arrojen resultados confiables. Se realizaron corridas utilizando diferentes concentraciones de muestra con distintos colorantes. Se analizó la capacidad de reproducibilidad del método a diferentes concentraciones de muestra y colorantes, obteniendo resultados iguales en las repeticiones realizadas, de esta forma se logra realizar la reproducibilidad de este método, logrando un análisis confiable en la detección de proteínas por medio de revelados de geles de electroforesis SDS-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El análisis por medio de electroforesis a demostrado ser uno de los mejores métodos de separación para complejos proteicos, además de necesitar cantidades muy pequeñas de muestra. La estandarización de métodos de electroforesis están siendo utilizados en laboratorios de análisis en los que utilizan muestras de interés clínico importantes ayudando a la detección de enfermedades y sustancias de importancia clínica.

Estandarización de la Técnica de Análisis de SDS-PAGE para Muestras de Suero Humano

Basados en la técnica de electroforesis de proteínas descrita por Laemmli (1970) se logró la estandarización de un método SDS-PAGE para el análisis de una proteína estándar de BSA y muestras de suero humano. Se determinó que los geles de poliacrilamida al 12% de concentración fueron los más convenientes para la separación de este tipo de muestras.

En la Figura 7 se pueden comparar los resultados del método de tinción azul de Coomassie utilizando las mismas condiciones de análisis utilizadas en el método de electroforesis descrito por

Laemmler 1970, Las muestras fueron separadas bajo las condiciones de corrida descritas por este método utilizando las condiciones de corriente constante, amperaje y tiempo, estas condiciones son las siguientes: aplicación de corriente eléctrica constante de 270 volts, 400 mA y durante un tiempo 40min.

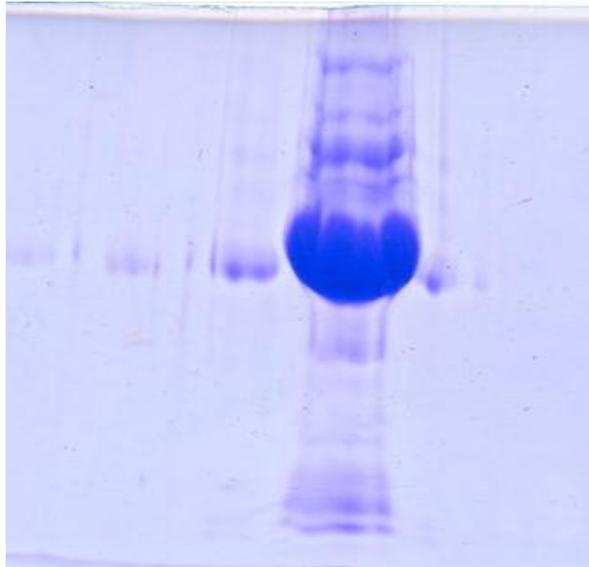


Figura. 7 Revelado se geles utilizando el método Azul de COOMASSIE.

Revelado de Geles con Diferentes Colorantes

Se realizaron corridas con las mismas cantidades de muestra utilizando suero humano y BSA para verificar si este método de detección es reproducible, al realizar los revelados para los geles SDS-PAGE con distintos tipos de colorantes, bajo las mismas condiciones y utilizando la metodología para azul de COOMASSIE logrando la reducción del 75% del tiempo en el análisis de proteínas por el método SDS-PAGE.

Se realizaron corridas y revelados utilizando distintos tipos de colorantes, además de lograr calcular la mínima y máxima cantidad de muestra para analizar en la separación de proteínas. En este método se logró reducir el tiempo de revelado de geles de electroforesis SDS-PAGE. Utilizando tres diferentes colorantes tales como: violeta de genciana, azure A, azul mezclilla 23 (índigo). Se comparó con el método de tinción recomendado para esta técnica y utilizando las mismas condiciones de revelado.

En la Tabla 3 se observa la comparación de análisis de la electroforesis en muestras de suero humano y BSA reveladas con distintos colorantes, y en las Figuras 8 y 9 se observan los revelados con los diferentes colorantes y muestras de suero humano y BSA.

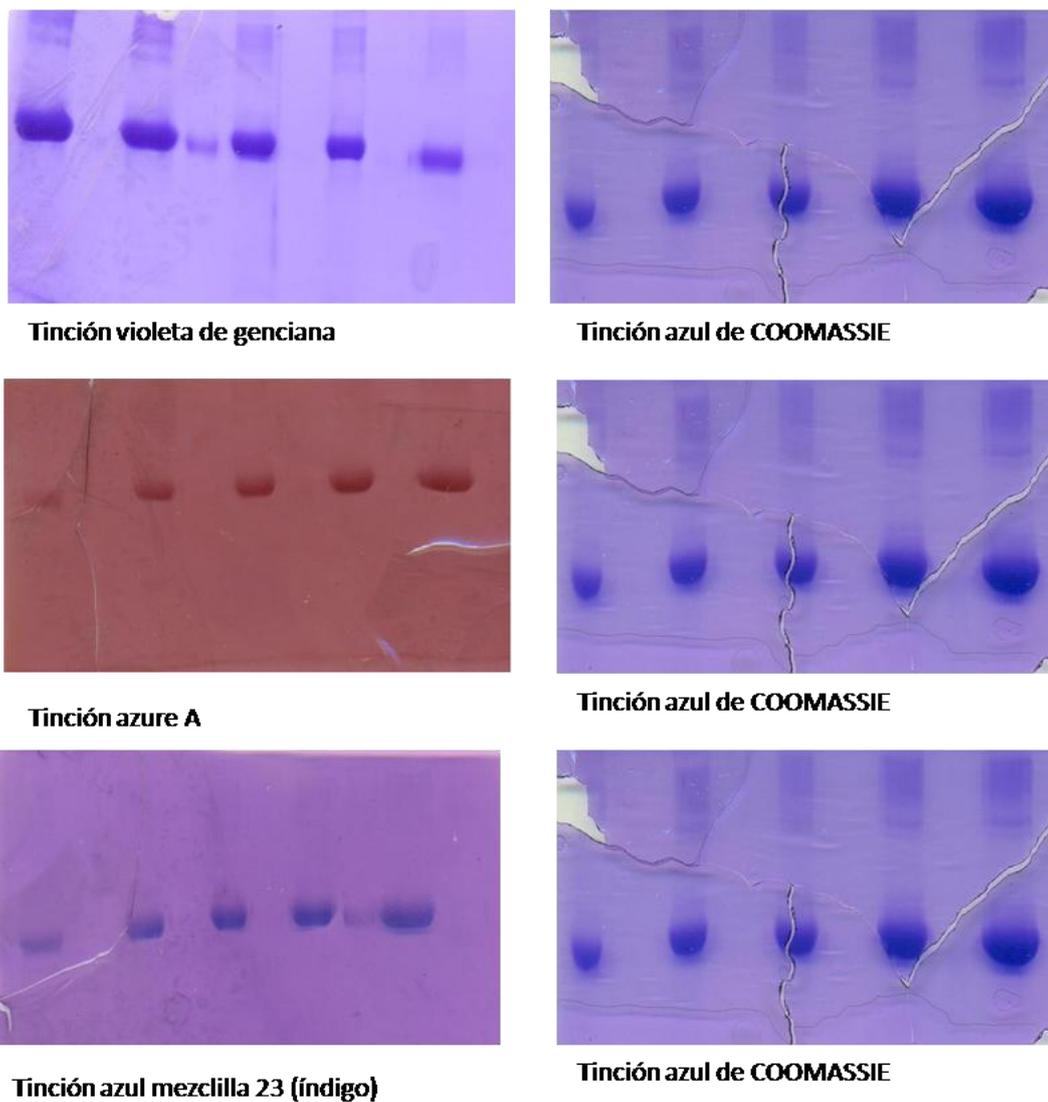
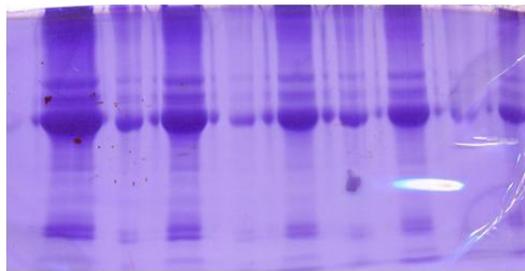
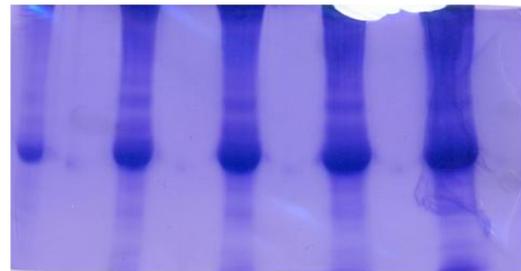


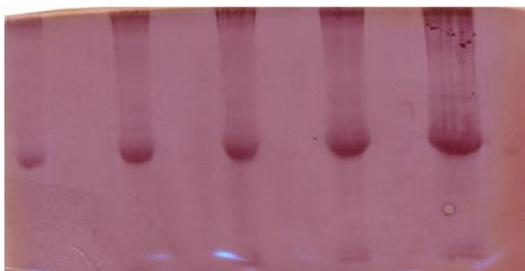
Figura. 8 Comparación de diferentes colorantes utilizando como muestra de BSA.



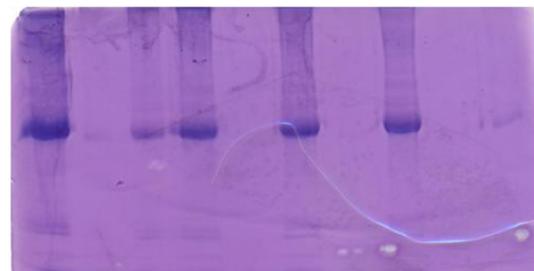
Tinción violeta de genciana



Tinción azul de COOMASSIE



Tinción azure A



Tinción azul mezclilla (indigo)

Figura. 9 Comparación de diferentes colorantes utilizando diferentes concentraciones de suero humano.

Tabla 3. Comparación de análisis de la electroforesis en muestras de suero humano y BSA reveladas con distintos colorantes

Metodología	Azul de coomassie	Violeta de genciana	Azure A	Azul índigo 23
Tiempo de tinción	12h (overnight)	1h	1h	1h
Tiempo de destinción	1h	1h	1h	1h
Resultado disponible	16 h	4h	4h	4h

Validación de las Modificaciones al Procedimiento de Tinción

Se realizaron experimentos cargando diferentes cantidades de muestra en los pozos para determinar la linealidad, el límite de detección y reproducibilidad en los métodos de tinción estandarizados en este trabajo.

Intervalo Dinámico Lineal

La Figura 10 muestra la regresión lineal aplicada a los datos experimentales de las áreas de los picos obtenidos por el análisis de densito colorimetría usando el programa Image J. Se puede observar un buen ajuste del modelo lineal a los datos experimentales ($R^2 > 0.98$), Sin embargo el reactivo de violeta de genciana es el colorante que presentó la mayor correlación lineal ($R^2 = 0.995$). Bajo estas condiciones, se estableció que los tres colorantes podrían ser útiles para la tinción de los geles de electroforesis en el intervalo de 3 μg hasta 12.5 μg de proteína cargados en los pozos del gel. Sin embargo, los colorantes Azure A y Azul Mezclilla 23 (índigo) presentaron dificultad en el análisis del área de las bandas respectivas a 0.1 μg , lo que estableció como la cantidad mínima de detección para estos dos colorantes.

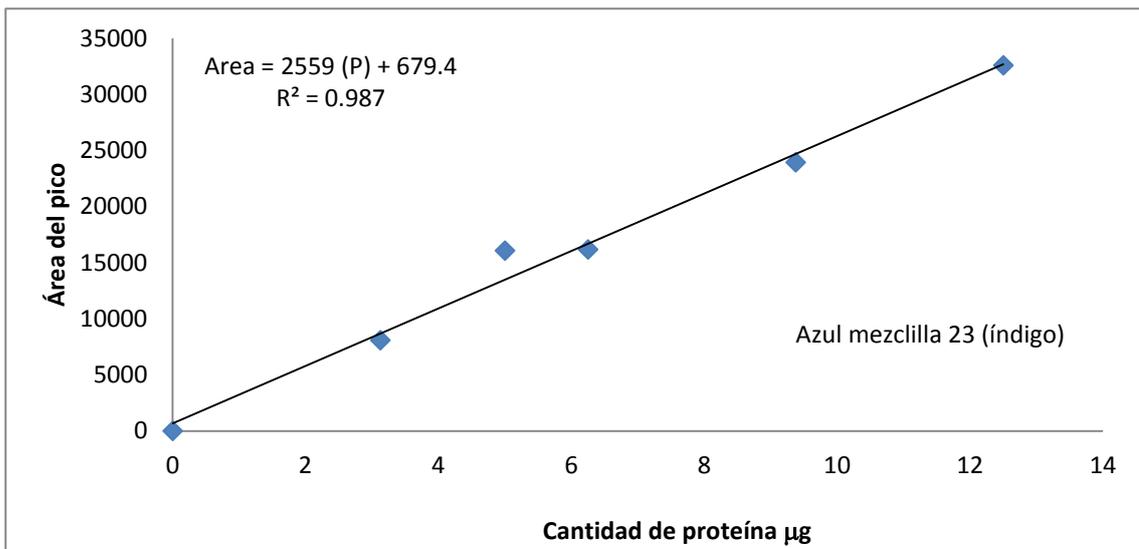
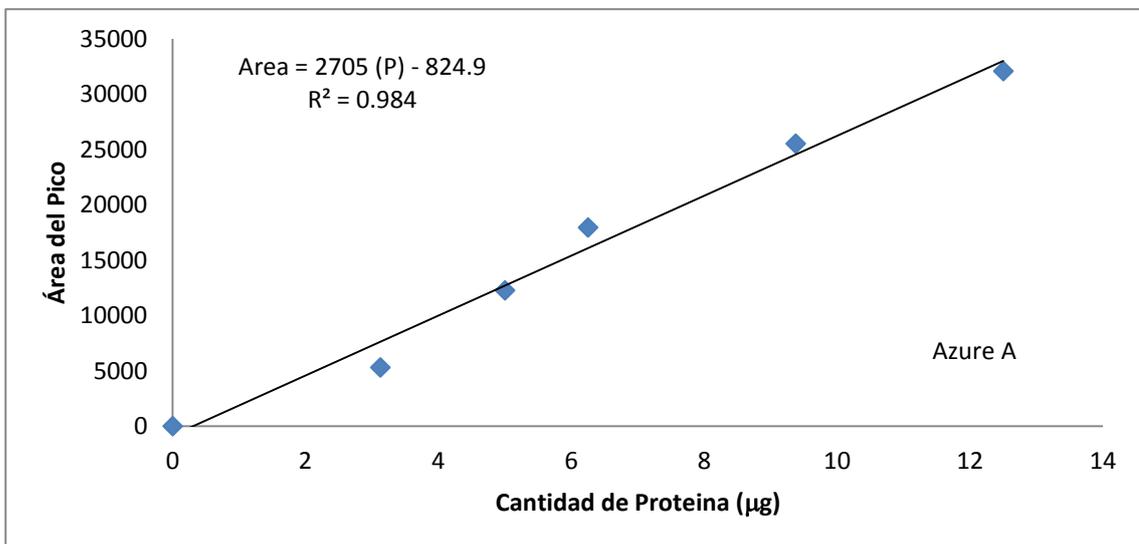
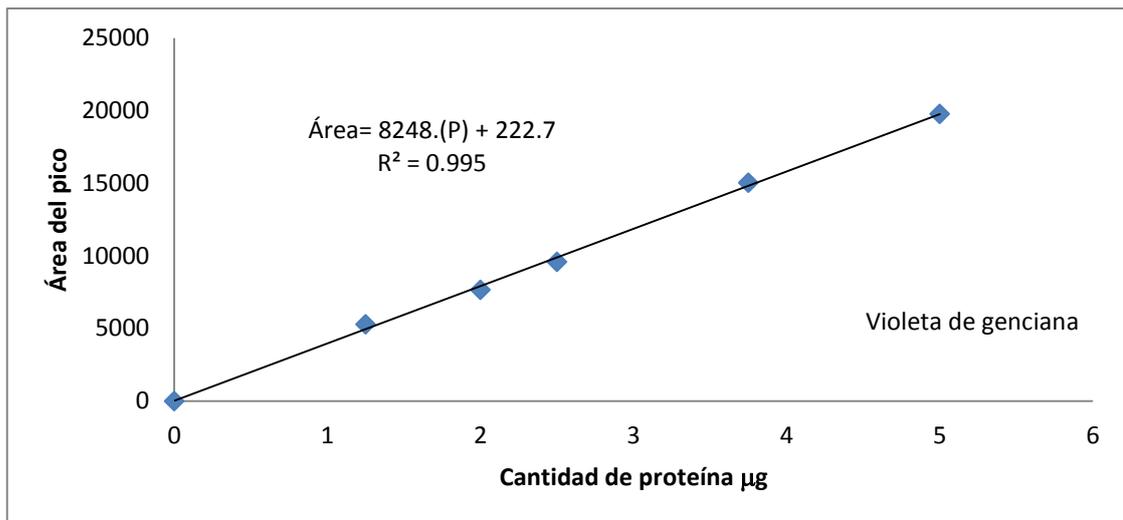


Figura 10. Intervalo Dinámico Lineal.

Límite de detección para la tinción con Violeta de Genciana

Se realizó una corrida adicional cargando menor cantidad de proteína BSA en los pozos del gel para determinar la mínima concentración detectable utilizando el colorante de violeta de Genciana. Los resultados mostraron que este colorante puede detectar la cantidad menor a 1.0 μg , además de que presentó un intervalo lineal desde 1 a 5 μg con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.998$. Este análisis demuestra que el violeta de genciana podría sustituir al azul de COOMASSIE el cual presenta un límite de detección similar en el procedimiento de tinción de geles.

Bajo estas condiciones se estableció que el violeta de genciana puede detectar desde 1.0 μg hasta 12 μg proteínas manteniendo un intervalo lineal. Las ecuaciones de regresión obtenidas en este trabajo pueden ser utilizadas para la determinación de la cantidad de proteína de alguna muestra de tal manera que después de escanear el gel revelado con algún colorante se substituya en la ecuación el área del pico analizado por densito colorimetría.

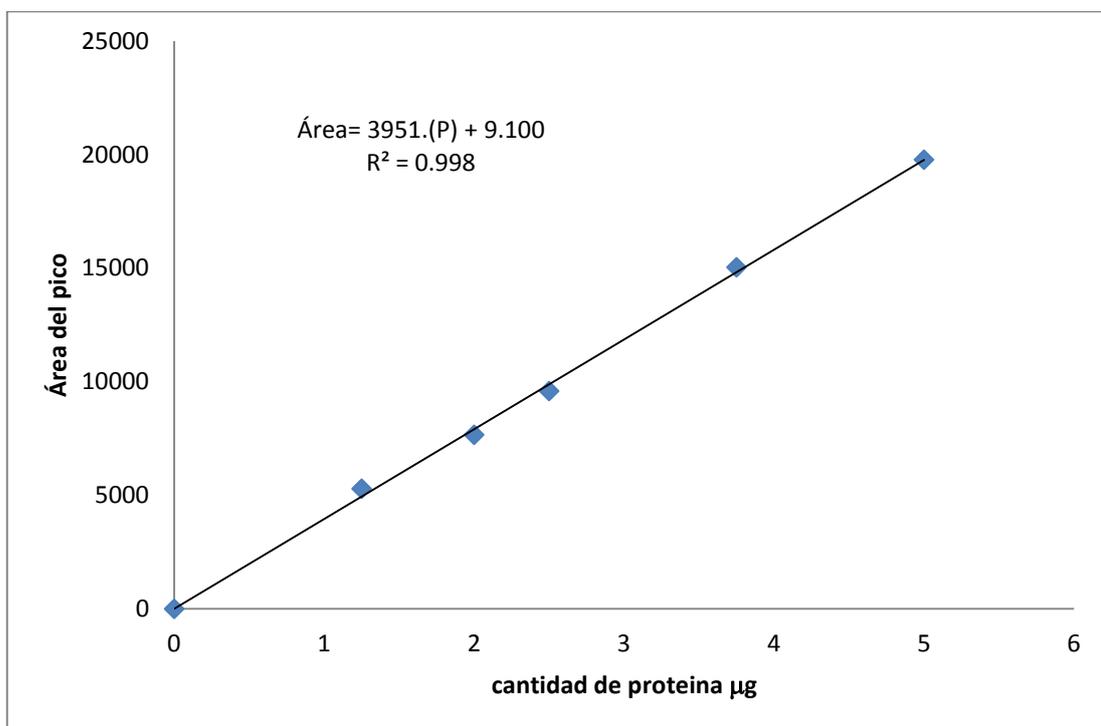


Figura 11. Tinción violeta de genciana utilizando muestra de BSA

Reproducibilidad

Por medio de correlación lineal, se realizó la prueba de comparación del método de tinción con violeta de genciana en dos geles con una muestra de BSA a diferentes concentraciones. La Figura 12 muestra los geles revelados utilizando el violeta de genciana y el resultado de la correlación de las áreas de los picos correspondientes a cada banda. Se puede observar una buena correlación en los datos experimentales entre ambos geles (0.992). Además la pendiente de la correlación resultó muy cercana al valor ideal (1.045), con una desviación de 4.5%.

Se puede decir entonces, que el método de tinción con violeta de genciana presenta una reproducibilidad aceptable dentro del intervalo de concentraciones probadas.

Los geles muestran que las bandas de las proteínas se electro transfieren con la misma intensidad y a la misma distancia relativa.

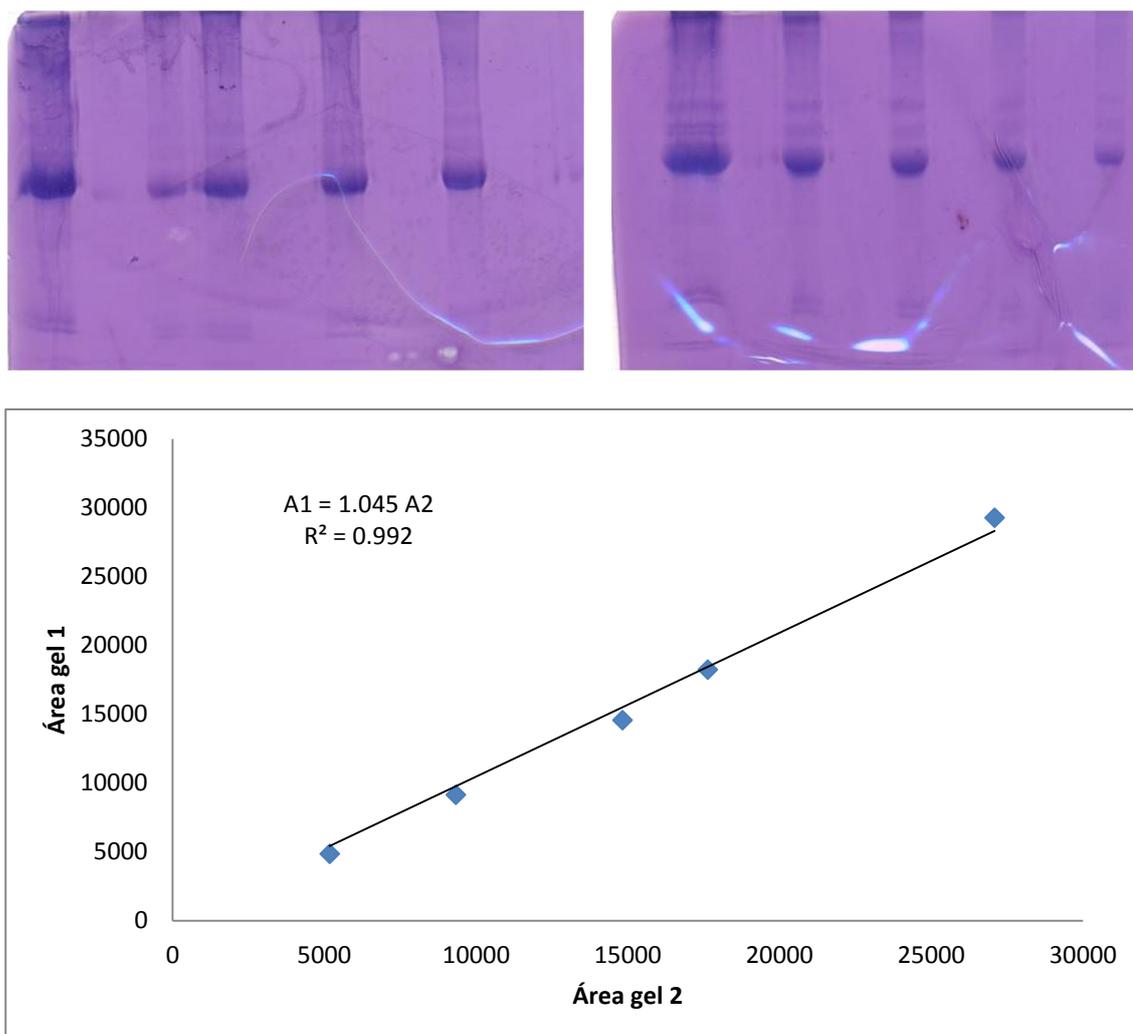


Figura 12. Comparación de reproducibilidad del método de tinción con violeta de genciana.

Comparación con el método de referencia

Por medio de correlación lineal, se realizó la prueba de comparación del método de tinción con violeta de genciana y la tinción de COOMASSIE como método de referencia. La Figura 13 muestra la línea diagonal como ideal, para que el método de prueba correlacione totalmente al método de referencia. Se puede observar una discrepancia en los datos experimentales respecto a la correlación ideal (0.511). Esto implica que para concentraciones mayores los valores del método de tinción con violeta de genciana quedan por debajo de los obtenidos por el método de azul de COOMASSIE.

Se puede decir entonces, que el método de tinción con violeta de genciana presenta errores proporcionales dependientes de la concentración de proteína en la muestra. Esto es, para concentraciones de proteína alta existirá mayor desviación de los valores obtenidos con el azul de COOMASSIE. Sin embargo, cuando las concentraciones de proteína son bajas los valores de ambos métodos se encuentran con mejor correlación. Para efectos prácticos los métodos deben presentar buena correlación a bajas concentraciones de proteína. Además, con la calibración del método utilizando los estándares de proteína estos errores se pueden desprestigiar.

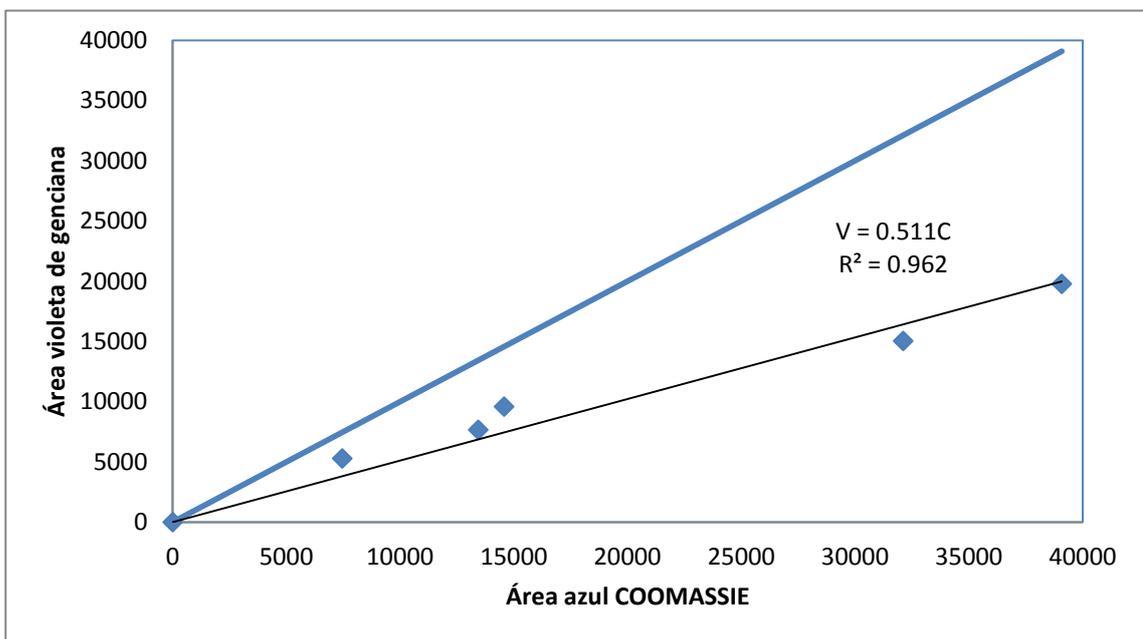
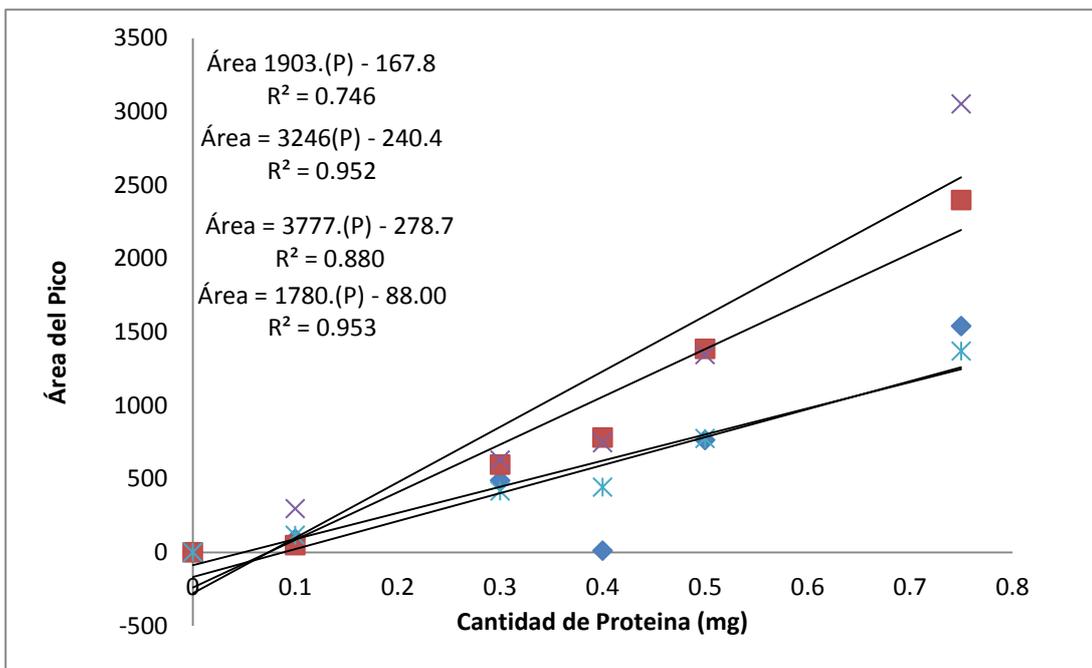


Figura 13. Correlación entre los métodos de tinción con violeta de genciana y azul de COOMASSIE.

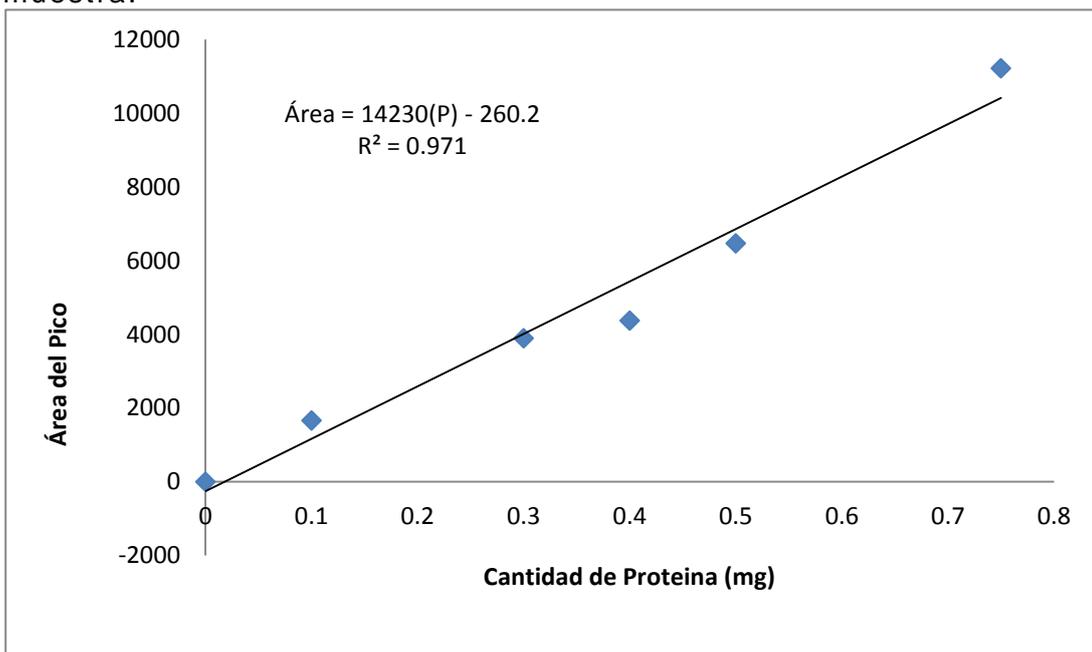
Análisis de Muestras Clínicas

Por medio de la correlación lineal se analizaron muestras de suero humano utilizando el método de tinción violeta de genciana. En la Figura 14 y 15 se muestra el análisis de correlación aplicado observando el resultado de la detección de diferentes áreas de picos, siendo estos las diferentes tipos de proteínas analizadas en la muestra de suero humano.

Se puede decir que el método de tinción con violeta de genciana se puede utilizar en trabajos en los cuales utilice muestras de suero humano y es capaz de arrojar resultados confiables comparables con distintos métodos de tinción como lo es el azul de COOMASSIE.

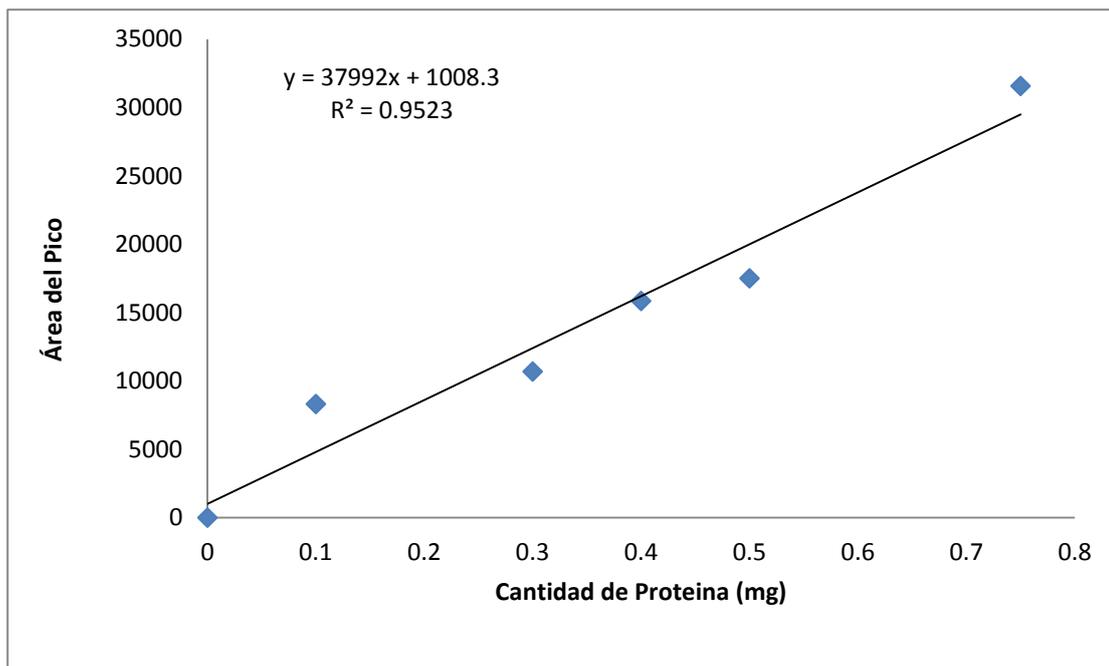


Comparación de distintos colorantes utilizando suero humano como muestra.

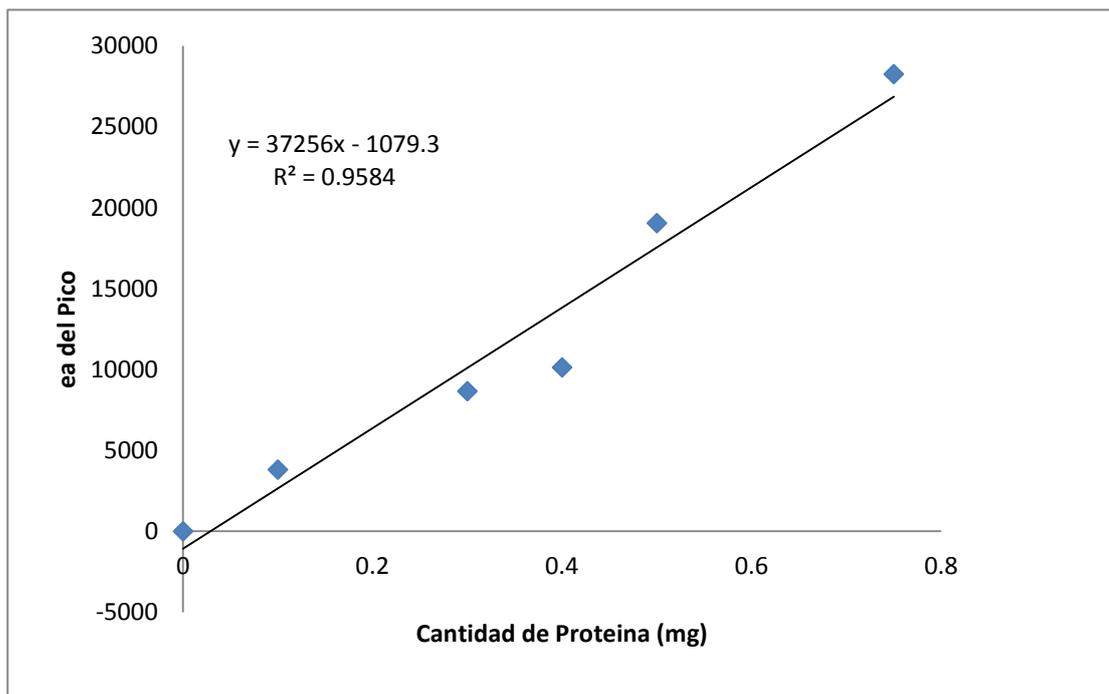


Tinción violeta de genciana utilizando suero humano como muestra

Figura 14. Comparación de distintos colorantes y tinción violeta de genciana utilizando suero humano como muestra.



Tinción mezclilla 23 utilizando como muestra suero humano



Tinción Azure A utilizando como muestra suero humano

Figura 15. Tinción azul mezclilla 23 y azure A utilizando como muestra suero humano.

CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica de electroforesis para el análisis de proteínas en suero humano, validando su desarrollo a través de pruebas de reproducibilidad, linealidad y límites de detección.

Se redujo el tiempo de análisis al modificar el revelado de geles utilizando diferentes tipos de colorantes.

Es posible el uso de colorantes comunes disponibles en cualquier laboratorio de análisis. Dentro de los colorantes investigados el violeta de genciana presentó mayor sensibilidad, reproducibilidad, linealidad y mayor límite de detección a bajas concentraciones de muestra de el orden de los μL .

Los resultados de este trabajo pueden ser utilizados para posteriores investigaciones donde se requiere el uso de electroforesis.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Tiselius (1937). A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*, **33** 524.
- 2 Ornstein L (December 1964) DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *121*, 321–349.
- 3 Davis, B.J. (December 1964) Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *121*, 404–427.
- 4 Carter, D. C., Chang B., J. X. Ho, K. Keeling, and Z.Krishnasami. (1994). Preliminary crystallographic studies of f our crystal forms of serum albumin. *Eur. J. Biochem.*226:1049–1052.
- 5 Hooper HH inventor; 1999 Soane Biosciences assignee, Us-crosslinked polymeric media for electrophoresis. *US patent 5 885 432*. march 23.
- 6 Chávez Planes MA,Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. 1990*Temas de enzimología*. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana,
- 7 SULBARAN M., Tesis de pregrado, 1996 Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

- 8 Da Woon J, Gyoung Hoon T, Jin Wook L, Chan Jin B, Gil Young K, Gyurng Soo Y, y Jung Kap 1998 C. Detection of proteins in poliacrilamida gels using eriochrome black T rhodamina B. *Anal. Biochem.*; 263:118-120.
- 9 García HM. 2000 *Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem*. Tesis de Maestría. Facultad de Biología Universidad de la Habana, La Habana Cuba.
- 10 Garfin DE. 1990. *One dimensional gel electrophoresis*. Methods in enzymology. vol 182. Academic press. p. 425
- 11 Campell MK. 1995 *Biochemistry*. Second edition: p. 525. Saunders College Publishing..
- 12 Starr CM, inventors; Glyko, Inc., assignee. Utilization of additives and defined storage systems to increase the stability and performance of electrophoresis media. *US patent 5,660,702*. 1997 Aug 26
- 13 Schägger H, Von Jagow G. 1987 Tricine-sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Analytical Biochemistry*; 166, 368-379.
- 14 Notsu K. And Shiratori M, inventors; Daiichi Pure Chemicals Co., assignee. Method for drying polyacrylamide gel after electrophoresis, *US patent 5 635 046*. 1997 june 3.

15 Moi MK, Chan RT, Becker RG, Chalmers KC, inventors; 1999 C C IMEX assignee. Horizontal gel electrophoresis casting cassette. US patent 5 938 906. Aug 17.

16 Laemmli UK (August 1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227** (5259): 680–685

ANEXOS

Procedimientos para la Preparación de Soluciones

Búfer de corrida 5x (Tris-Glicina)

Disolver 72 g de glicina, 15.1 g de trizma base, 5 g de SDS en agua desionizada y aforar a 1000 mL sin ajustar pH. Para preparar la solución de corrida 1x (SDS 0.1% en Tris-Glicina pH 8.3); diluir 1:5 la solución 5x, ajustando el pH de la solución 1x a un pH 8.3 y aforar.

Búfer de muestra 2x (Tris-HCl/SDS 0.04%; pH 6.8)

Disolver 0.38 g de trizma base en 10 mL de agua desionizada y ajustar pH a 6.8. Añadir 1 g de SDS, 5 mL de glicina (0.72 %p/v), 0.5 mL de 2-mercaptoetanol, 0.5 mg de azul de bromofenol y aforar a 25 mL con agua desionizada.

Glicina (0.72%p/v). Disolver 7.2 g de glicina en 100 mL de agua desionizada. Ajustar cantidades requeridas

Acrilamida 30% / bis acrilamida 0.8%:

La acrilamida monomérica es neurotóxica, se debe usar guantes y mascarilla para su manipulación. En un volumen de 100

mL de agua desionizada mezclar 30 g de acrilamida, 0.8 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida. Para conservar la solución se debe colocar en frasco de vidrio color ámbar. La mezcla permanece estable por 30 días, ya que la acrilamida se hidroliza a ácido acrílico y amoníaco.

Solución 4x Tris-HCl/SDS pH 6.8:

Se mezcla 6.05 g de trizma/base en 40 mL de agua desionizada ajustar pH a 6.8 con HCl 1 N, adicionar 0.4 g de SDS. Aforar a 100 mL con agua desionizada.

Solución 4x Trizma-base pH 8.8

Mezclar 18.2 g de Trizma-base en 40 mL de agua desionizada ajustar pH a 8.8 con HCl 1 N y adicionar 0.4g de SDS. Aforar a 100 mL.

Conservar a una temperatura no mayor a 4°C las soluciones: Búfer de corrida 5x (Tris-Glicina), Búfer de muestra 2x (Tris-HCl/SDS 0.04%; pH 6.8), Acrilamida 30% / bis acrilamida 0.8%, Solución 4x Tris-HCl/SDS pH 6.8, Solución 4x Trizma-base pH 8.8

Persulfato de amonio al 10%

Disolver 0.01 g de persulfato de amonio en 100 μ L de agua desionizada.

Solución de Tinción Azul de COOMASSIE

Mezclar 50% de metanol, 10% de ácido acético, 40% de agua destilada, 0.05% (p/v) azul de COOMASSIE. Ajustar cantidades a utilizar. Esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente hasta por un mes.

Solución Desteñidora 1

Mezclar 50 %v/v de metanol, 10 %v/v ácido acético, 40 %v/v de agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución Desteñidora 2

Mezclar 5%de metanol, 7% de ac. Acético, 88% de agua des ionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO B

**Procedimientos para la preparación de diferentes
porcentajes de entrecruzamiento.**

Tabla 4. Concentraciones para gel separador

	5	6	7	8	9	10	12	13	15
Acrilamida/bis (30%/0.8%) mL	0.83	1	1.16	1.33	1.55	1.66	2	2.16	2.5
4x tris Hcl/SDS pH 8.8 mL	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
H2O mL	2.9	2.75	2.58	2.41	2.25	2.08	1.75	1.58	1.25
Persulfato de amonio al 10% μ L	17	17	17	17	17	17	20	17	17
TEMED μ L	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3

El persulfato de amonio es el ultimo reactivo que se agrega porque es el que inicia la reacción de polimerización.

Tabla 5. Concentraciones para gel concentrador.

Acrilamida/ bis (30%/0.8%)	325 μ L
4x Trizma- base-SDS pH6.8	625 μ L
H2O	1.25 mL
Persulfato de amonio al 10%	12.5 μ L
TEMED	2.5 μ L

El persulfato de amonio es el ultimo reactivo que se agrega porque es el que inicia la reacción de polimerización.