

ANEXO 1

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las proteínas son las macromoléculas más grandes y de más amplia distribución en la célula. Sus propiedades biológicas, así como muchas de sus propiedades físicas y químicas dependen de la integridad de sus estructuras, lo que influye directamente en su funcionalidad, en base a la cual, se pueden clasificar en: enzimas, proteínas estructurales, motoras, reguladoras, transportadoras, hormonas, receptores proteicos, de defensa y de almacenaje. Dada la importancia de los papeles que pueden desempeñar las proteínas en los sistemas biológicos, su análisis se ha vuelto imprescindible y para esto se han desarrollado diversas técnicas que facilitan su estudio.

Una las técnicas habitualmente utilizadas en el análisis de proteínas, es la electroforesis, que se puede realizar en diferentes modalidades y condiciones, los cuales dependerán del interés de estudio. En este caso se utilizó un sistema discontinuo (conformado por dos geles de poliacrilamida: uno de resolución y otro de empacamiento que presentan diferente concentración, composición y pH). El gel de empacamiento generalmente se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositan las muestras. El gel de resolución por su parte forma el cuerpo del gel por donde migran y se separan las proteínas. Las muestras proteicas se trabajaron bajo condiciones desnaturalizantes, empleando un detergente (SDS =dodecil sulfato sódico), que actúa desplegando las proteínas y cargándolas negativamente, esta muestra se coloca en uno de los pocillos del gel y se aplica un potencial eléctrico que lo atraviesa, por lo tanto las moléculas migrarán a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, cuando los polipéptidos más pequeños se acercan a la base del gel, el proceso termina, y se sigue un procedimiento de tinción donde un colorante se une a los polipéptidos para hacerlo visibles y poder así

evaluar y establecer el patrón de separación proteica que finalmente podrá ser analizado e interpretado.

Soluciones para SDS-PAGE

Buffer I: **Separador pH 6.8** (*Trizma base 0.5 M/SDS al 0.4%*).

Buffer II: **Concentrador pH 8.8** (*Trizma base 1.5 M/SDS al 0.4%*). Para la 2DE se aumentó la concentración de SDS al 4%.

Buffer III: **Corrida 5X** (Pesar 72g de glicina, 15.1g de trizma base y 5g de SDS; disolver y aforar a 1L, diluir 1X para realizar la corrida y ajustar el pH a 8.3). Para la 2DE se aumentó la concentración de SDS.

Buffer IV: **Muestra 2X** (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4%, glycerol 20%, 2-mercaptoetanol).

Procedimiento para SDS-PAGE

1.- Preparación del Gel separador/Concentrador

Armar el equipo

Limpiar perfectamente los vidrios formadores del gel. Ensamblarlos en el equipo formador de geles utilizando los separadores correspondientes. Revisar que no existan fugas colocando agua con un transfer, descartar el líquido y secar.

Preparación del gel separador

Tomar los volúmenes correspondientes a la tabla 1 y agregarlos en un vaso precipitado de 50 mL, mezclar y adicionar lentamente entre los vidrios el líquido con ayuda de un transfer, evitando la formación de burbujas (2/3 del total del

vidrio). Posteriormente agregar alcohol etílico al 50% para permitir la polimerización. Esperar hasta que se distinga la interfase entre el gel y el alcohol (20-40 min) y luego esperar 10-15 min para terminar la polimerización.

Preparación del gel concentrador

Retirar el exceso de alcohol sobre el gel separador, secar con papel filtro. Tomar los volúmenes correspondientes a la tabla 1 y agregarlos en un vaso precipitado de 50 mL, mezclar y adicionar el líquido lentamente (evitar la formación de burbujas) sobre el gel separador ya polimerizado, acoplar el peine formador de pozos. Esperar hasta que se distinga la interfase entre los geles (20-30 min) y hasta que se termine la polimerización (10-15 min).

2.- Preparación de la muestra

Mezclar 15 μ L del buffer muestra 2X con 15 μ L de su muestra y agitar en vórtex, calentar a 95°C durante 5 min, pasado este lapso, introducir inmediatamente los microtubos en el congelador e incubar durante 1 min. Centrifugar a 2000 rpm por 1 min.

3.- Corrida electroforética

Una vez que esté listo el gel, se desmonta del equipo formador de geles y se monta en la cámara de corrimiento. Verificar que no existan fugas. Llenar 1/3 de la cámara y la parte interna entre los vidrios con buffer corrida y agregar 25 μ L de la muestra que desea analizar en cada pozo del gel. Conectar a la fuente de poder y aplicar corriente constante (90-100 Volts) hasta que el frente del gel llegue a medio centímetro del borde inferior de los vidrios.

4.- Tinción

Desmontar cuidadosamente el gel, y seguir el protocolo establecido para la tinción con AgNO_3 .

5.- Secado

Adicionar glicerol en la solución preservadora (1 mL/10 mL), agitar mínimo durante 1 hora. Escurrir el gel, colocarlo sobre un soporte plano y rígido (vidrio) y envolverlo cuidadosamente en papel celofán dulce, retirar el excedente de líquido, aire o burbujas, estirarlo perfectamente con ayuda de ganchos. Esperar 2-3 días hasta su secado.

Tabla I. Las cantidades que se describen a continuación están estimadas para un mini gel de 1mm de espesor con una concentración del 10 y 12%.

Reactivo	Gel separador		Gel concentrador (μL)
	12%	10%	
Acrilamida/Bisacrilamida (30%/0.8%) (mL)	2.7	2.21	433
Buffer I (pH 6.8) (mL)	-0-		833
Buffer II (pH 8.8) (mL)	1.7	1.66	-0-
H ₂ O (mL)	2.3	2.77	2000
Persulfato de amonio 10% (μL)	25	20	20
TEMED (μL)	5	4.6	5

ANEXO 2

TINCION CON SALES DE PLATA

Para poder visualizar la proteínas separadas mediante electroforesis (SDS-PAGE) es necesario emplear métodos de tinción con colorantes orgánicos o bien transferir el gel a una matriz para que se unan con anticuerpos específicos en alguna proteína de interés.

El colorante orgánico más utilizado es el Azul de Coomassie Brillante que nos permite detectar alrededor de 50 ng de proteínas por banda, pero cuando se desea obtener mayor sensibilidad se utiliza la tinción con sales de plata, con la que podemos analizar desde 0.3 hasta 10 ng de proteína por banda o mancha.

Esta tinción (sales de plata) fue introducida originalmente por Switzer en 1979, pero a través del tiempo ha tenido diversas modificaciones, encontrando actualmente una gran variedad de protocolos que nos permiten realizarla, pero de manera general estos protocolos se clasifican en dos: la tinción con **plata amoniacal** o también conocida como tinción alcalina y la tinción ácida donde se utiliza **nitrato de plata**. Cada protocolo tiene diferentes ventajas dependiendo del tiempo, sensibilidad, costo y compatibilidad con otros métodos analíticos, especialmente la espectrometría de masas (uso de glutaraldehído o formaldehído). Pero los mecanismos precisos de estas tinciones se basan en la *unión de los iones de plata* a las cadenas laterales de los aminoácidos (principalmente grupos carboxilo), que en condiciones adecuadas se *reducen a plata metálica*, lo que permite visualizar las proteínas fijadas al gel como bandas o manchas de color marrón.

En este caso utilizamos la tinción con Nitrato de plata siguiendo una metodología básica que se desglosa en varias fases; la primera consiste en la **fijación** donde las proteínas son inmovilizadas en el gel y se remueven los

compuestos que podrían causar alguna interferencia en la 2DE (glicina, tris, SDS, y anfolitos acarreadores). La segunda fase corresponde a la **sensibilización** que se usa para incrementar la formación de la imagen, para lo cual se han propuesto numerosos compuestos que se unen a proteínas, y estos se unen a los iones plata para reducirlos a plata metálica o producir sulfato de plata. Otra fase muy importante es la **impregnación** con plata, seguida de la fase de **revelado** de la imagen y finalmente se utiliza una solución “stop” para **estabilizar** la imagen.

RECOMENDACIONES

- Reducir al mínimo la manipulación del gel y usar guantes libres de talco por que puede contaminarse con Keratina de la piel.
- Los volúmenes de las soluciones deben ser suficientes para cubrir por completo el gel y nunca debe secarse.
- Cuando use TCA (9:9:2; alcohol-Ac. Acético-agua) deberá lavar el gel después de la fijación para remover ácido.
- El uso de agentes reductores como el glutaraldehído previo a la tinción plata incrementa la sensibilidad y velocidad de reducción de las proteínas.
- El uso de agua MiliQ aumenta sensibilidad y disminuye fondo.
- El uso de Tiosulfato de sodio, Carbonato y formaldehído puede reducir el fondo.
- Enfriar a 4°C la solución plata previo a su utilización puede aumentar la sensibilidad.
- La solución con carbonato debe prepararse al instante, dura estable alrededor de 10 min.
- La solución reductora de Farmer, es estable por 30 min aproximadamente.

Preparación de Soluciones para Tinción con AgNO_3

Solución Fijadora (*Metanol 50%, Acido acético glacial 12%, Formaldehido 37% 25 $\mu\text{L}/50\text{ mL}$*): Para un gel de 1-1.5 mm preparar un volumen final de 25 mL (lo necesario para que cubra por completo el gel); agregando 10 mL de etanol, 2.5 mL de Ac. Acético y aforar hasta 25 mL con agua MiliQ, al momento de utilizarla agregar 12.5 μL de formaldehído.

Solución Sensibilizadora (*Etanol abs. 30%, Acetato de sodio an. 6.8%, Tiosulfato de sodio 0.2%, Glutaraldehido 25%, 500 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$*): Para 25 mL agregar 7.5 mL de etanol, 1.7 gr de acetato de sodio anhidro, 0.05 gr de tiosulfato de sodio y 125 μL de glutaraldehído.

Solución Plata (*Nitrato de plata 0.25%, Formaldehido 37%, 40 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$*): Pesar 0.0625 gr de nitrato de plata y disolver en 25 mL de agua MiliQ, añadir 15 μL de formaldehído al momento de usarse. Cubrirse de la luz.

Solución Reveladora (*Carbonato de sodio anhidro 2.5%, Formaldehido 37%, 20 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$*): Pesar 0.625 gr de carbonato de sodio y disolver en 25 mL de agua MiliQ. Añadir 5 μL de formaldehído al momento de revelar. Esta solución tiene una estabilidad de 10 min, aprox. Agregar 1 cristal de tiosulfato de sodio para aumentar la sensibilidad.

Solución Stop (*NaEDTA 1.5%*): Pesar 0.375 gr de NaEDTA y disolver en 25 mL de agua MiliQ.

Solución Preservadora (*Etanol Absoluto 30%, Glicerol 4%*): Agregar 7.5 mL de etanol, 1 mL de glicerol y aforar hasta 25 mL con agua MiliQ.

Solución de Lavados: Se recomienda utilizar Etanol 20 - 50% (para evitar que se hinche el gel).

Procedimiento para la Tinción con AgNO₃

Una vez finalizada la SDS-PAGE, retirar el gel de los vidrios y colocarlo en un recipiente que le permita permanecer extendido, se pueden realizar 2-3 enjuagues con la solución de lavado y posteriormente adicionar cada una de la soluciones como se indica a continuación:

1.- Solución fijadora: Agregar el formaldehído a la solución fijadora, homogenizar y cubrir completamente gel. Incubar en agitación constante al menos 30 min. Es recomendable dejarlo toda la noche.

2.- LAVADOS: Realizar 3 lavados rápidos con etanol al 50%.

3.- Solución Sensibilizadora: Se agrega el glutaraldehido a la solución sensibilizadora y se cubre el gel durante 30 minutos.

4.- LAVADOS: Se realizan 3 lavados con etanol al 20%, 10 minutos cada uno.

5.- IMPREGNADO CON AgNO₃: Se agrega el formaldehido a la solución de nitrato de plata y se cubre el gel durante 20-30 minutos (dependiendo del grosor del gel), protegiendo en todo momento de la luz.

6.- LAVADOS: Realizar dos lavados rápidos con etanol al 20%, de 20 seg c/u para quitar exceso de la solución anterior.

7.- Solución Reveladora: Se agrega el formaldehído a la solución de revelado y se cubre el gel. Se debe dejar el tiempo suficiente para que aparezcan bandas de 3-10 min una vez que aparecen con la intensidad deseada retirar de inmediato para evitar fondo.

8.- LAVADOS: Realizar un lavado rápido (20 seg) con etanol al 20% para quitar el exceso de la solución anterior.

9.- Solución STOP: Se cubre el gel con esta solución durante 10 min con agitación constante (se puede usar la solución fijadora 1).

10.- LAVADOS: Se hacen 3 lavados con etanol 50% de 1 min c/u.

11.- Solución de Almacenamiento: Para secar el gel se cubre con esta solución al menos 30 min. Se puede dejar largos periodos.

ANEXO 3

DESTINCION CON FERROCIANURO DE POTASIO

El complejo de iones plata-proteínas del gel es subsecuentemente reducido a metal plata con formaldehído en ambiente alcalino con carbonato de sodio o hidróxido de sodio. El nitrato de plata libre puede ser removido lavando el gel antes de revelar para quitar el exceso. La distinción parcial de los geles usando el agente reductor de Farmers es recomendado para remover el background teñido que obscurece el gel e interfiere con la interpretación de los patrones de proteínas.

SOLUCION REDUCTORA DE FARMER (Ferrocianuro de Potasio/ Tiosulfato de Sodio): Se prepara ferrocianuro de potasio 30 mM y tiosulfato de sodio 100 mM. Mezclar ambas soluciones en volúmenes iguales, el resultado será una solución amarillenta estable por 30 minutos.

Procedimiento: Es necesario remover la solución stop del gel previamente teñido y realizar un lavado con agua durante 5 minutos en agitación. Posteriormente colocarla la solución reductora de Farmers e incubar en agitación entre 5-15 minutos (estable por 30 min) dependiendo de la intensidad del background. Terminar la distinción regresando el gel a la solución stop.

ANEXO 4

ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN (2DE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una técnica indispensable en el análisis y estudio de las proteínas. Existen diferentes modalidades y su aplicación dependerá del interés del estudio que se esté realizando. Sin lugar a duda cada día se requiere del análisis de muestras más complejas, lo que exige el uso de métodos más potentes que permitan ofrecer mayor capacidad de separación. Para lo cual, se ha venido empleado la electroforesis bidimensional (2DE), que involucra la combinación de dos métodos individuales de alta resolución donde generalmente como primera dimensión se utiliza el isoelectroenfoque que separa las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI) seguido de la SDS-PAGE que separa las proteínas en base a su masa relativa (Mr), estos métodos individualmente tienen la capacidad de separar alrededor de 100 proteínas, pero cuando son combinados pueden separar más de 1500.

Los protocolos a seguir cuando se utiliza 2DE son muy variados, y para poder determinarlos se deberá considerar el tipo de muestra y el interés del estudio. Además, deberá considerarse la gran diversidad de tipos y orígenes de proteínas (las podemos encontrar en complejas membranas, ácidos nucleicos u otras proteínas de agregados no específicos). Idealmente los procesos deben permitir la completa solubilización, disgregación, desnaturalización y reducción de las proteínas, siempre buscando seguir la estrategia simple posible para minimizar las pérdidas de proteínas durante el proceso, que básicamente consta de 4 etapas: la rehidratación de la muestra, el isoelectroenfoque (IEF), el equilibrio de las tiras y la SDS-PAGE. También como un proceso opcional se pueden aplicar tratamientos previos a la muestra, para eliminar posibles interferencias (sales, ácidos nucleicos, detergente o lípidos), uno de estos es la precipitación de proteínas con acetona o bien existen casas comerciales

que ofrecen productos específicos para eliminar o reducir cada posible contaminante.

En la rehidratación, la muestra debe ser resuspendida en una solución que permita que las proteínas se mantengan completamente solubilizadas, desnaturalizadas, disgregadas y reducidas. En esta etapa, se permite que las proteínas entren en la tira del gel, ya sea de forma activa o pasiva, lo cual dependerá de la aplicación o no de electricidad. Como agente desnaturalizante se utiliza la Urea 8 M, que además permite solubilizar las proteínas. La completa desnaturalización asegura que cada proteína está presente en solo una configuración y evita la agregación o interacción. El detergente CHAPS 2-4% permite la solubilización y agregación mediante interacciones hidrofóbicas. Como agente reductor se puede utilizar DTT 20-10 mM, el cual abre y une los puentes disulfuro presentes y mantiene a las proteínas en estado reducido. Como agentes solubilizantes se utilizan acarreadores o anfólitos (IPGs), que permiten unión a proteínas y facilitan su solubilización, minimizando la agregación con sus interacciones carga-carga.

En el isoelectroenfoque se recomienda un incremento gradual en el voltaje aplicado, iniciando con valores bajos por varias horas para minimizar agregación y permitir la separación paralela de diferentes muestras con diferentes concentraciones de sales, sobre todo cuando se aplica más de 100 µg de proteína por tira.

En el paso de equilibrio el Tris-HCl mantiene las IPGs en un rango de pH apropiado. La Urea 6 M junto con el glicerol reduce efectos de endosmosis debido a la mezcla de cargas que pudieran interferir en la transferencia a la 2DE. El DTT preserva las proteínas reducidas y desnaturalizadas. La iodoacetamida alquila los grupos tiol de proteínas previniendo oxidación. Finalmente se satura la tira del gel con SDS para culminar con la SDS-PAGE donde se separan todas las bandas que fueron separadas en el IEF.

Soluciones para 2DE

Buffer de Rehidratación (7 M Urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 50 Mm DTT, 0.2% Bio-Lyte 5/8 ampholyte, 0.002% Azul Bromofenol).

Solución de Equilibrio I (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, TRIS-HCl 0.375 M, DTT 2%).

Solución de Equilibrio II (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, TRIS-HCl 0.375 M, Iodacetamida 2.5%).

ANEXO 4

Precipitación de Proteínas con Acetona Fría

1. Se agregaron 400 μ L de acetona fría en un microtubo y se añadieron 100 μ L del extracto proteico de Hp43504 (200 μ g de proteína estimado según el micrométodo Bradford). La concentración final de la acetona será al 80% considerando que se agregó una parte de la muestra por cada 4 partes de acetona al 100%.
2. Se agitó en vórtex hasta disolver por completo (5-10 min).
3. Se incubó a -20°C por 60 minutos.
4. Se centrifugó 10 minutos entre 13 000 – 15 000 xg a 2°C .
5. Decantar el exceso de acetona cuidando que no se disgregue el precipitado. El procedimiento anterior se repite entre 2-5 veces hasta remover completamente la interferencia.
6. Decantar la acetona y evaporar el sobrante a temperatura ambiente en la campana de extracción, cuidando no sobresecar la muestra.
7. Resuspender el pellet en la solución adecuada (buffer rehidratación).

ANEXO 5

Micrométodo de Bradford (SIGMA)

El reactivo de Bradford (RB) puede ser utilizado para determinar la concentración de proteínas en solución. El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre la unión del Brilliant Blue G y las proteínas de solución, lo que genera un cambio en la absorbancia dentro de un rango de 465 a 595 nm. La cantidad de luz que es absorbida es proporcional a la concentración de proteínas presentes. Se puede utilizar el micrométodo empleando placas de 96 pozos. El rango de concentración lineal de proteínas es de 0.1-1.4 mg/mL, usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. El ensayo consiste en mezclar una parte de proteínas con 30 partes del RB, se realiza a temperatura ambiente y el cambio de color inicia inmediatamente.

Procedimiento

- 1.- Preparar una curva estándar de proteína empleando un rango 0.1-1.4 mg/mL de BSA.
- 2.- Agregar 250 μ L del RB en cada pozo, cuidando de la luz y temperatura.
- 3.- Agregar 5 μ L de cada estándar de proteína en cada pozo, así como de muestra y blanco (buffer empleado para disolver BSA).
- 4.- Mezclar en un shaker aproximadamente 30 segundos.
- 5.- Incubar a temperatura ambiente 5-45 minutos. Medir absorbancia a 595 nm en un tiempo no mayor a 60 minutos.
- 6.- Graficar absorbancia contra concentración de cada estándar. Determinar la concentración de proteína de la muestra comparando el valor de la absorbancia de la curva estándar.

ANEXO 6

ReadyPrep 2D-Clenaup Kit

BioRad

Este kit comercial facilita la preparación de muestras con baja conductividad para su uso en IEF y 2DE. Además concentra la proteína de muestras diluidas permitiendo aumentar la señal para la detección de spots.

Procedimiento

- 1.- Transferir de 1-500 µg de proteína en un volumen final de 100 µL a un microtubo de 1.5 mL.
- 2.- Adicionar 300 µL del agente precipitante 1 a la muestra de proteína y mezclar muy bien en vórtex. Incubar en hielo por 15 minutos.
- 3.- Adicionar 300 µL del agente precipitante 2 a la mezcla de proteína y agente precipitante 1. Mezclar muy bien en vórtex.
- 4.- Centrifugar los tubos a velocidad máxima (12000 xg) por 5 minutos para formar el pellet y descartar sobrenadante.
- 5.- Centrifugar 30 segundos a 15 000 xg en la misma posición que el paso anterior y eliminar todo el líquido posible.
- 6.- Adicionar 40 µL del reactivo de lavado 1 sobre el pellet. Centrifugar en las condiciones anteriores.
- 7.- Descartar la solución de lavado.
- 8.- Agregar 25 µL de ReadyPrep proteomic grade water y agitar en vórtex 10-20 segundos.
- 9.- Agregar 1 mL de wash reagent 2 (precongelado a -20°C al menos una hora previa)

- 10.- Incubar el tubo a -20°C por 30 minutos agitando en vórtex 30 segundos cada 10 minutos.
- 11.- Después del periodo de incubación centrifugar a 15000 xg por 5 minutos para formar el pellet. Descartar el sobrenadante. Centrifugar 30 segundos de nuevo, descartar el líquido y dejar secar al aire no más de 5 minutos.
- 12.- Resuspender cada pellet adicionando el volumen adecuado de buffer muestra. Agitar en vórtex 30 segundos. Incubar a temperatura ambiente 3-5 minutos y volver con agitación en vórtex 1-2 minutos.
- 13.- Centrifugar a velocidad máxima 2-5 minutos a temperatura ambiente. Usar el sobrenadante para rehidratar la tira. Se puede almacenar la muestra a -80°C para análisis posteriores.