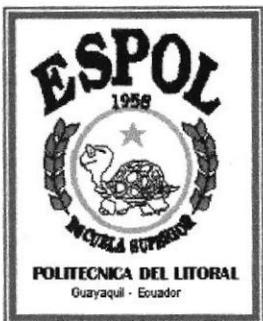


**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN
ALIMENTOS**



**INFORME DE PRACTICAS
PROFESIONALES**

Previo a la Obtención del Título de Tecnólogo en Alimentos

Realizado en:

C.I.B.E

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

Autor:

BRENDA CISNEROS TERAN

PROFESOR DE LA PRIMERA REVISIÓN:

DRA. GLORIA BAJAÑA J.

PROFESOR DE LA SEGUNDA REVISIÓN:

MSc. ANGELA NAUPAY

AÑO LECTIVO

2002.

Guayaquil, 17 de junio de 2002

MTA.
Claudia Icaza
Coordinadora (e) PROTAL
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Yo, Brenda Cisneros Terán, estudiante del Programa de Tecnología de Alimentos, pongo a su disposición el presente informe correspondiente a las Prácticas Profesionales realizadas a nivel de laboratorio en el área de Inmunoquímica en el Centro de Investigaciones del Ecuador.

Las prácticas fueron realizadas desde el 21 de febrero hasta el 21 de mayo del presente año.

Esperando que cumpla con las disposiciones necesarias me despido de usted.

Atentamente,

Brenda Cisneros T.
BRENDA CISNEROS TERAN





ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

"Ciencia, Tecnología y Educación al servicio del País"

A QUIEN INTERESE:

Por medio de la presente certifico que la Srta. Brenda Cisneros Terán con número de matrícula 199910829, realizó prácticas en el laboratorio de Inmunoquímica del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) en el periodo comprendido entre el 21 de febrero y el 21 de Mayo del 2002.

Guayaquil, 31 de mayo del 2002

Ing. Raquel Hernández Rodríguez

Jefa Administrativa CIBE

INDICE

	Página
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	viii
Introducción.....	xii
1. Detalle del Trabajo Realizado.....	1
2. Aspectos Generales de la Empresa.....	2
2.1 Breve historia de la empresa.....	2
2.2 Localización.....	3
2.3 Objetivo.....	3
2.4 Misión	4
2.5 Visión	4
2.6 Organigrama de la empresa.....	5
3. Teoría	
3.1 Electrofóresis de proteínas en geles de poliacrilamida	6
3.2 Tipos de Electroforésis.....	9
3.2.1 SDS-PAGE.....	9
3.2.2 Geles en gradiente.....	9
3.2.3 Isoelectroenfoque.....	10
3.2.4 Electroforésis Bidimensional.....	11

3.3	Detección de proteínas en el gel.....	12
3.3.1	Colorantes	12
3.3.2	Tinción con plata.....	12
4.	Detalle de los Análisis Realizados.....	13
4.1	Extracción de Proteínas.....	13
4.2	Precipitación con Acetona.....	16
4.3	Precipitación con Sulfato de Amonio.....	18
4.4	Precipitacion con Polietilenglycol.....	20
4.5	Geles de acrylamida mediante técnica de gradientes...	22
4.6	Determinación de concentración proteica.....	24
4.7	Electroforésis en geles de poliacrilamida.....	27
4.8	Tinción con nitrato de plata.....	31
4.9	Comparación de diferentes técnicas de precipitación..	35
4.10	Análisis de proteínas mediante electrofóresis de dos dimensiones.....	38
5.	Resultados	47
6.	Conclusiones y Recomendaciones.....	52
7.	Bibliografía	54
8.	Anexos	56





CIB

**Con amor incondicional,
dedico este trabajo a mi familia,
por apoyarme en todo momento.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme vivir y ser una persona de bien, por darme una familia unida y comprensiva.

A mis padres por apoyarme incondicionalmente, por ser mis amigos y mi guía en el camino de la vida.

A mis hermanos por reír y llorar conmigo, por comprenderme y ayudarme. Por ser ejemplo de honestidad y esfuerzo.

A mi mejor amigo y amor, por compartir mis triunfos y caídas, por ayudarme a ser alguien mejor y por hacerme feliz.

A mis amigos, con los que compartí cada momento de trabajo y sacrificio, por ser luchadores y ayudarme a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mis profesores, que con su enseñanza y dedicación me hicieron una profesional capaz y útil para la sociedad.

A cada persona que me demostró su apoyo y cariño.

RESUMEN



CIBT

En el presente informe se describe de manera general la historia de la empresa, sus objetivos y su organización.

Se detalla las técnicas de laboratorio empleadas en el desarrollo de las prácticas, las cuales son específicas para el análisis de proteínas mediante electrofóresis de dos dimensiones. En estas técnicas se detallan los fundamentos, material y equipos necesarios, reactivos a utilizar, el procedimiento e incluso cálculos y ejemplos.

También podemos encontrar conclusiones y recomendaciones sobre las técnicas de laboratorio aprendidas. Se incluye además, un glosario de los reactivos empleados y de los términos científicos usados en este trabajo.

Por último, se anexan gráficos de los equipos e información bibliográfica importante para la comprensión del lector.



INTRODUCCION

El Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador C.I.B.E, tiene como **Objetivo** fundamental obtener variedades y clones promisorios, exóticos y locales, con resistencia genética al hongo *M. fijiensis* para el control de la Sigatoka Negra.

Este centro investiga las Musas porque son la base de la economía agrícola, la alimentación y del equilibrio ecológico de la costa ecuatoriana. El desarrollo del banano y plátano posee un gran impacto económico y social, capaz de incorporar tecnologías de avanzada con un gran efecto multiplicador.

Para conseguir sus objetivos este centro cuenta con 5 áreas diferentes: Inmunoquímica, Biología molecular, Fitopatología, Genética y Biología celular. El área de inmunoquímica es la responsable de estudiar los mecanismos moleculares de defensa de las plantas, por medio de la bioquímica de las proteínas extraídas de hojas de banano.

El trabajo realizado en esta área durante las prácticas profesionales comprendieron el análisis de proteínas mediante electrofóresis de 2 dimensiones. Se realizó estudio bibliográfico, entrenamiento sobre técnicas de inmunoquímica y pruebas experimentales para establecer una técnica de 2 dimensiones que se adapte a las condiciones y recursos del laboratorio.

1. DETALLE DEL TRABAJO REALIZADO

Las prácticas fueron realizadas en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Este centro realiza investigaciones con el fin de conseguir una Musa resistente a la Sigatoka negra, para esto cuenta con 5 laboratorios diferentes. Uno de ellos es el laboratorio de Inmunoquímica dirigido por el PhD Washington Cárdenas, el cual desarrolla el proyecto “Interacción Planta-Patógeno” en convenio con PROMSA (Programa de Mejoramiento de Servicios Agropecuarios). Las prácticas comprendieron el desarrollo de las técnicas de análisis proteica para lo cual se me asignó el tema de “ Análisis de proteínas mediante electrofóresis de 2 dimensiones”.

Horario de trabajo: lunes a viernes de 8H30 a 16H30.

Las labores realizadas se detallan a continuación:

1. Estudio bibliográfico: - Papers (publicaciones de técnicas de otros investigadores)
 - Internet
 - Libros de proteómica
 - Libros de técnicas de análisis de proteínas
2. Entrenamiento en técnicas de Inmunoquímica: - Estudio de las técnicas de laboratorio
 - Práctica bajo la supervisión y guía del técnico del área.
3. Establecer mediante experimentación cual es la mejor técnica de precipitación de proteínas.
4. Preparación de geles de poliacrilamida mediante técnica de gradientes.
5. Desarrollo de ensayos aplicando electrofóresis de 2 dimensiones.

6. Cuantificación proteica mediante espectrofotometría.
7. Tinción con nitrato de plata.

2. ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

2.1 HISTORIA DE LA EMPRESA

Por iniciativa de la ESPOL, atendiendo una convocatoria de la Unión de Universidades Flamencas, fue presentado un proyecto en el cual se concebía la ejecución de 6 actividades denominadas componentes. Entre estos componentes, el número 3, abordaba la investigación en biotecnología; con un mandato inicial de hacer investigación para la resistencia genética de Musa para el control de la Sigatoka negra, con el fin de lograr una agricultura ambientalmente sustentable.



CIBT

En el desarrollo de éste proyecto, que fue financiado por el fondo belga y una contrapartida de la ESPOL, el componente 3 ejecutó un curso de diplomado en biotecnología, y 4 cursos de postgrado. De los estudiantes fueron seleccionados 3 candidatos a cursos "sándwich" de PhD en las universidades belgas de Gante y Lovaina.

Esta actividad avanzó en paralelo con la adaptación y construcción de los laboratorios e instalaciones para entrenar especialistas capaces de ejecutar los objetivos de investigación del proyecto.

La integración del sector productivo en las estrategias y ejecución de las actividades de investigación, logró desde el mismo inicio del proyecto, una excelente comunicación y participación, definiendo los programas de investigación coparticipada.

Adicionalmente, se han conseguido recursos para reforzar el desarrollo de los proyectos de investigación y capacitación. Se siguen generando propuestas para la formación de recursos humanos de cuarto nivel, así como para la investigación, en la óptica de convertir a este centro en una entidad auto sustentable para la investigación, la enseñanza y la extensión participativa.

En el breve plazo de 1 año, con un staff de 21 colaboradores, en pleno desempeño de las investigaciones, con la presencia de las máximas autoridades de la ESPOL, representantes de los productores y de la contraparte belga, fue inaugurado el *17 de Enero del 2001*, como el "Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador" de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



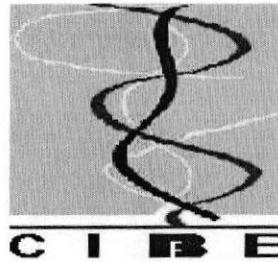
CIBT

2.2 LOCALIZACION

El Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se encuentra ubicado en el primer piso alto del bloque N°47 en el Campus Gustavo Galindo de la ESPOL en el km 30,5 vía Perimetral.

2.3 OBJETIVO

Hacer investigación biotecnológica para el mejoramiento genético de plantas, los agentes causales de enfermedades y su interacción con las plantas huéspedes, las tecnologías de producción con el uso de microorganismos benéficos y las oportunidades de tecnologías para incorporar valor agregado a las cosechas partiendo del primero y gran mandato Musa resistente a Sigatoka en un ambiente sustentable.



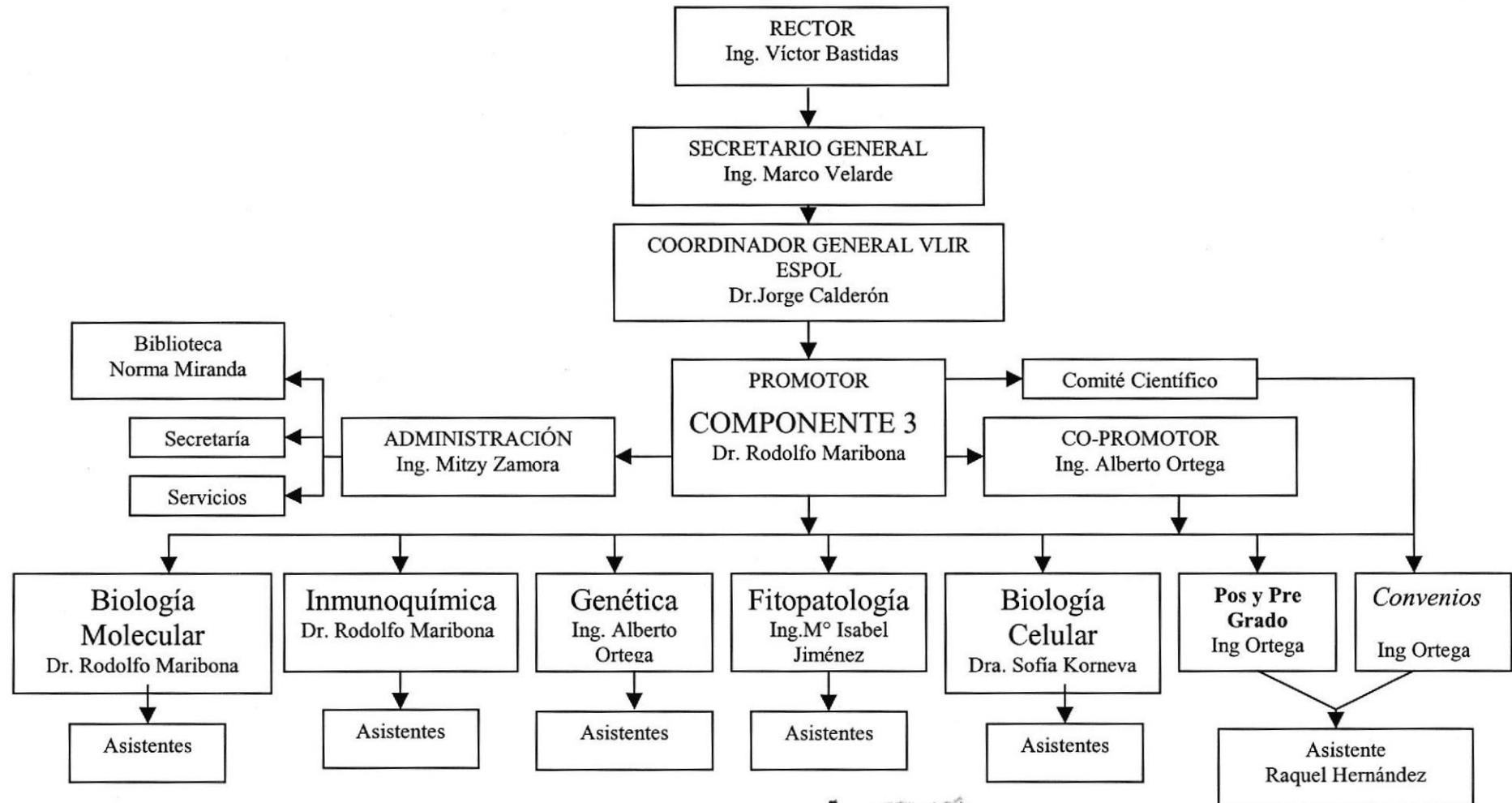
2.4 MISIÓN

Formar líderes capaces de convertir la biotecnología en una herramienta indispensable para el desarrollo social y económico del país en un ambiente sustentable.

2.5 VISIÓN

El futuro del Ecuador es un futuro de conocimiento, conservación y uso de sus grandes recursos genéticos para el bienestar de la especie humana.

2.6 ORGARIGRAMA DEL C.I.B.E



5



3. TEORIA

3.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Introducción y Técnica Básica

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Empleando geles de sílice o de acetato de celulosa y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta (carga total / masa) entre proteínas. Este método se denomina electroforesis zonal. La matriz de poliacrilamida no es un buen soporte para este método pues la migración de las proteínas en su seno no sólo es proporcional a la carga neta sino también al tamaño y forma de las proteínas..

Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica.

Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son :

- Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato (S₂O₈⁻) que se añade en forma de persulfato amónico.
- Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.
- La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
- La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.
- El porcentaje total de acrilamida / bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida /bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.



En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturizantes.

- Una electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.
- Una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas tampón empleados en estos caso son : tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5).

La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón.

3.2 TIPOS DE ELECTROFORESIS

3.2.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis').

Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

3.2.2 GELES EN GRADIENTE

El uso de geles de poliacrilamida que tienen un gradiente creciente de concentración de acrilamida+bisacrilamida, y en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño de

poro, pueden tener ventajas sobre los geles de concentraciones uniformes de acrilamida. Generalmente los gradientes se establecen entre el 3 y el 30% de acrilamida en gradientes lineales o cóncavos. El rango a emplear dependerá del tamaño de las proteínas a separar. En un gel en gradiente la proteína migra hasta que alcanza una zona donde el tamaño de poro impide cualquier avance. Una vez que se alcanza el "límite de poro" no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente.

Una de las ventajas de este tipo de geles es que resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones muy estrechas. Otra es que incrementa el rango de pesos moleculares que se pueden resolver en un mismo gel comparado con los de una concentración fija.

3.2.3 ISOLECTROENFOQUE

Esta técnica, habitualmente denominada electroenfoque se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las moléculas anfotéricas, como los aminoácidos, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. La región del ánodo (+) es ácida y la del cátodo (-) es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoeléctrico dentro del rango. Las sustancias que se encuentran inicialmente en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el cátodo, mientras que aquellas que se encuentren en medios con pH más bajos que su pI (punto isoeléctrico) tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo. La migración les conducirá a una región donde el pH coincidirá con su pI (punto isoeléctrico), tendrán una carga neta nula y se

detendrán. De esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su pI con el pH.

En esta técnica el punto de aplicación no es crítico pues las moléculas siempre se desplazarán hacia la región de su pI. La capacidad de resolución es de diferencias de pI de 0.01 unidades de pH.

El gradiente de pH estable entre los electrodos se consigue usando una mezcla de amfolitos de bajo peso molecular cuyos pI cubren un rango preestablecido de pH. Los amfolitos suelen ser ácidos poliamino policarboxílicos alifáticos sintéticos y son comercializados en mezclas que cubren determinados rangos de pH.



3.2.4 ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional (2D) se basa en separar las proteínas de una mezcla según dos propiedades moleculares, una en cada dimensión. El procedimiento más usado se basa en la separación en una primera dimensión mediante isoelectroenfoco y una segunda dimensión según peso molecular mediante electroforesis en poliacrilamida-SDS.

Uno de los mayores problemas de la 2D PAGE es el análisis y comparación de mezclas muy complejas de proteínas. Actualmente existen bases de datos de geles bidimensionales capaces de comparar patrones. Estos sistemas permiten la comparación automática de manchas ('spots') para la identificación precisa de las mismas necesaria en el análisis cuantitativo.

3.3 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN EL GEL

Las proteínas que se han separado en un gel de poliacrilamida (o otros soportes) pueden ser detectadas por diferentes métodos, entre los que destacan los colorantes y la tinción con plata.

3.3.1 COLORANTES

La tinción con azul de Coomasie permite detectar hasta 0.2 a 0.6 microgramos de proteína, y es cuantitativo hasta 15 a 20 microgramos. Se emplea habitualmente en soluciones de metanol-acético y se destiñe por difusión en soluciones de isopropanol-acético. Para la tinción de geles 2D se recomienda eliminar los amfolitos mediante inclusión de tricloroacético (TCA) en el colorante y la destinción en ácido acético.



3.3.2 TINCIÓN CON PLATA

Es una alternativa a la tinción rutinaria de geles de proteínas (así como de ácidos nucleicos y lipopolisacáridos) por su facilidad de uso y su gran sensibilidad (entre 50 y 100 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomasie). Es una técnica de tinción especialmente recomendable para la tinción de geles bidimensionales y de isoelectroenfoque.

- **Material docente diseñado y elaborado por Manuel Reina.**

<http://www.ub.es/biocel/pbc/prac/tecnicas/page.htm>

4. DETALLE DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS

4.1 EXTRACCION PROTEICA

FUNDAMENTO:

La etapa inicial del proceso de purificación de proteínas consiste en un lavado de tejidos y aplicación de lisis celular mediante pulverización de hojas con nitrógeno líquido, luego empleando un buffer de extracción que posee un pH alcalino se extrae las proteínas de naturaleza soluble y por medio de centrifugación se obtiene un sobrenadante llamado extracto crudo el cual luego es tratado con acetona y centrifugado para conseguir un pellet que es proteína pura y que se resuspende en buffer de extracción para tener una dilución total y facilitar su empleo en procesos subsecuentes.

PROCEDIMIENTO:

1. Recolectar muestras de hojas de banano, tomando muy en cuenta el número de la hoja.
2. Almacenarlas a -80°C para uso posterior.
3. Lavarlas con agua potable y jabón líquido, enjuagarlas con agua destilada y almacenarlas en una hielera.
4. Secarlas con un papel toalla, y cortarla en cuadritos muy pequeños con una tijera limpia y seca.
5. Colocar los cuadritos en un mortero previamente enfriado y adicionarles nitrógeno líquido hasta cubrir la muestra y con la ayuda de un pilón triturar la muestra hasta pulverizarla.
6. Pesar 0,5 g de muestra en un tubo.



7. Adicionar 1,5 ml de buffer de extracción alcalino.
8. Homogenizar la mezcla aplicando vortex (vibración).
9. Dejar reposar por una hora a baja temperatura (con los tubos sumergidos en hielo).
10. Centrifugar los tubos a 4°C, 14000 rpm por 10 minutos.
11. Colectar el sobrenadante (extracto crudo) en nuevos tubos, determinar el volúmen.
12. Recolectar el filtrado y realizar la precipitación con acetona.
13. Dejar en reposo a -20°C por 10 minutos.
14. Centrifugar los tubos a 4°C, 14000 rpm por 5 minutos.
15. Decantar el sobrenadante y conservar el pellet proteico.
16. Resuspender el pellet en buffer de extracción alcalina.

EQUIPOS Y MATERIALES:

- Congelador de -80°C
- Mortero
- Pilon
- Tijeras
- Tubos Eppendof
- Vortex
- Micro pipetas
- Centrífuga refrigerada

REACTIVOS

- Acetona
- Buffer de extracción alcalina



- Nitrógeno líquido

PREPARACION DE REACTIVOS

Buffer de extracción pH 7.5

El buffer esta constituido por TRISMA-base 50mM, EDTA 10mM, Ácido ascorbico 0.2%, NaCl 150mM el cual se completa (al momento de uso) con 140 μ L/ 100 ml de mercapto y 1 μ por ml de PMSF.

Para lo cual se pesan 6.005 gr de TRISMA, 3.72 gr EDTA, 2 gr de Ac. ascórbico y 8.766 gr de ClNa y se disuelven el un matraz aforado de 1000 ml con agua deionizada.

CALCULOS Y EJEMPLOS

Preparación de bufer de extracción alcalino:

P. M de Tris BASE tris(hidroximethyl aminomethane) $C_4H_{11}NO_3 = 121.11$

P. M de EDTA (ácido dietilaminotetraacético) $C_{10}H_{16}N_2O_8 = 292.2$ g

PM de NaCl = 40 g

PM B Mercaptoetanol (C_2H_6OS) = 78.3 g

PM de PMFS (Phenyl sulfonylfluoride) $C_7H_7FO_2S = 174.2$ g

4.2 PRECIPITACION CON ACETONA

FUNDAMENTO

El efecto principal de la acetona es la disminución de la actividad de agua. La acetona desplaza las moléculas de agua altamente ordenadas alrededor de las zonas hidrofóbicas, lo cual implica solubilidad relativamente mayor de estas áreas. Este efecto es el que provoca que las proteínas extremadamente hidrofóbicas, como las localizadas en las membranas puedan disolverse en solventes orgánicos. Sin embargo, el efecto neto es la disminución de la solubilidad, hasta el punto de facilitar la agregación y la precipitación.

PROTOCOLO

1. Añadir 1ml de acetona fría (-20°C) a 200µl de muestra y agitar.
2. Incubar a -20°C por 10 minutos.
3. Centrifugar por 5 minutos en un tubo Eppendorf.
4. Remover el sobrenadante y dejar secar el pellet.
5. Resuspender el pellet en buffer en 1-2 volúmenes del pellet.



EQUIPOS Y MATERIALES

- Tubos Eppendorf
- Vortex
- Micro pipetas
- Centrífuga refrigerada

REACTIVOS

- Acetona
- Buffer de Extracción Alcalina

CALCULOS

Relación: por cada 200µl de muestra se adiciona 1ml de acetona, entonces si deseo conocer cuanto necesito para 750µl de muestra se calcula de la siguiente manera:

$750\mu\text{l} * 1\text{ml} / 200\mu\text{l} = 3,75$ de acetona.



4.3 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

FUNDAMENTO

La mayoría de las proteínas pueden mostrar baja solubilidad a altas concentraciones salinas, lo que se conoce como precipitación por salado, este fenómeno depende de la hidrofobicidad de la proteína. La formación de un precipitado mediante insolubilización por salado comienza con la agregación de las moléculas de proteína a través de los residuos hidrofóbicos. Si las moléculas de agua son atrapadas se produce la precipitación. Por lo tanto la adición de grandes cantidades de sal atrapa el agua porque los iones sal se hidratan.

PROTOCOLO

1. Mantenga la solución de proteína en hielo.
2. Mientras agita gentilmente la muestra añadir lentamente el sulfato de amonio. Este paso debe ser completado en 5-10 minutos.
3. Continúe agitando por 10-30 minutos después de añadir todo el sulfato de amonio.
4. Centrifuge a 14000 rpm por 10 minutos o a 3000 rpm por 30 minutos.
5. Remueva el sobrenadante y resuspenda el precipitado en 1-2 volúmenes de buffer.



EQUIPOS Y MATERIALES

- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Centrífuga refrigerada
- Vortex.
- Micropipetas

REACTIVOS

- Sulfato de amonio.
- Buffer de extracción alcalina

CALCULOS

Por cada 1000 ml de muestra (sobrenadante), se debe adicionar 525,5 g de sulfato de amonio, entonces si deseo conocer cuanto necesitamos para 750 μ l de muestra calculamos:

$525,5 \text{ g de sulfato de amonio} * 750\mu\text{l de muestra}/1000 \text{ ml de muestra} = 0,39 \text{ g de sulfato de amonio.}$

4.4 PRECIPITACION CON POLIETILENGLYCOL (PEG)

FUNDAMENTO

El efecto principal del polietilenglycol es, al igual que la acetona, la disminución de la actividad de agua. Desplaza las moléculas de agua altamente ordenadas alrededor de las zonas hidrofóbicas, lo cual implica solubilidad relativamente mayor de estas áreas. Este efecto es el que provoca que las proteínas extremadamente hidrofóbicas, como las localizadas en las membranas puedan disolverse en este polímero orgánico. El PEG por su naturaleza polimérica no es tan fácil de eliminar de la fracción proteica como las sales o los solventes orgánicos, ya que no dializa fácilmente.

PROTOCOLO

1. A una muestra de 100 ml de proteína añadir 150 ml de polietilenglycol y mezclar con agitación.
2. Dejar precipitar la proteína por 30 minutos en hielo o 15 minutos a -20°C .
3. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm.
4. Remover el sobrenadante por decantación.
5. Resuspender el pellet en 1-2 volúmenes de buffer.
6. Almacenar a -80°C .

EQUIPOS Y MATERIALES

- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Centrifuga refrigerada
- Vortéx.



- Micropipetas

REACTIVOS

- Polientilenglycol
- Buffer de extracción alcalina

CALCULOS Y EJEMPLOS

Por cada 100 ml proteína se debe adicionar 150 ml de PEG. De tal manera que primero debemos determinar el volumen de proteínas que tenemos y luego hacer la relación.

Ejemplo:

Si tenemos 0,750 ml de proteína necesitamos 1,125 ml de PEG, esto lo determinamos mediante una regla de tres simple.

$$g \text{ PEG} = 0,750 \text{ ml de proteína} * 150 \text{ ml PEG} / 100 \text{ ml proteína} = 1,125 \text{ ml PEG.}$$

4.5 GELES DE POLIACRYLAMIDA MEDIANTE TECNICA DE GRADIENTES.

FUNDAMENTO

Esta técnica se basa en el uso de un gradiente creciente de concentración de acrilamida + bisacrilamida, y en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño del poro. En un gel de gradiente la proteína migra hasta que alcanza una zona donde el tamaño de poro impide cualquier avance. Una vez que se alcanza el límite de poro no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente. Este tipo de geles resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones muy estrechas.

PROTOCOLO

1. Preparar el equipo de electroforesis.
2. Preparar running gel de gradientes al 5% y 20%
3. Armar el casting gel (casting frame and glass plate sandwich) y colocar en el casting stand.
4. Añadir el running gel utilizando el equipo para geles de gradiente y dejar polimerizar.
5. Adicionar 100µl de butanol saturado para nivelar el gel, antes de dejarlo polimerizar.
6. Una vez polimerizado el running gel descartar el butanol y añadir el stacking gel.
7. Introducir la peineta (plastic comb) sin formar burbujas.
8. Dejar polimerizar el stacking gel.



EQUIPOS Y MATERIALES

- Equipo para geles de gradientes
- Mini protean
- Micropipetas

REACTIVOS

- Agua deionizada
- Trizma 1,5M pH 8,8
- Trizma 0,5M pH 6,8
- Acrylamida
- Bis acrilamida.
- Lauril sulfato (SDS- sodium dodecyl sulfate)
- Persulfato de amonio
- Temed

PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA AL 5% Y 20%

	5%	20%
- Agua deionizada	3.048 ml	1.173 ml
- Acrylamida	0.625 ml	2.5 ml
- Trizma 1.5M pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml
- SDS	50 μ l	50 μ l
- Persulfato de amonio	6.25 μ l	6.25 μ l
- Temed	0.6 μ l	0.6 μ l

4.6 DETERMINACION DE CONCENTRACION PROTEICA

FUNDAMENTO:

Para determinar proteínas por espectrofotometría se emplea el método de Bradford el cual se basa en el acoplamiento del colorante azul de Comassie con la proteína la cual tiene una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas la cual se determina colorimetricamente a 595 nm (luz visible) en un espectrofotómetro de placa (lector ELISA). La absorbancia se interpola a la curva patrón y se extrapola de esta al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

PROTOCOLO

1. Preparar el lector ELISA (equipo para medir absorbancia).
2. Preparar el reactivo Bradford diluyendo 1 parte de Bradford concentrado con 4 partes de agua deionizada.
3. Preparar 5 diluciones de una proteína standard, la cual es representativa de la solución de proteína a ser estudiada (*alfa-globulina*).
4. Pipetear 10µl de cada standard y de la solución de la muestra dentro del test tube, el cual debe estar limpio y seco. El ensayo se debe hacer por duplicado.
5. Añadir 200µl de Bradford diluido en cada tubo y dar vortex.
6. Incubar a temperatura ambiente en un lugar oscuro por 20 minutos.
7. Medir la absorbancia a 595 nm.
8. Reemplazar en la ecuación de la curva patrón. Recordando corregir la absorbancia restando a los valores el dato del blanco.
9. Obtener la concentración de proteínas. Los resultados se expresan el mg / ml.



EQUIPOS Y MATERIALES

- Espectrofotómetro de placas (Lector de ELISA).
- Cámara plástica ELISA de 96 pozos fondo plano
- Micropipetas automáticas de 10-100uL, 1 - 10uL y 500-1000uL

REACTIVOS

- Reactivo Bradford
- Agua deionizada
- Proteína standard (alfa-globulina)



PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Preparación de Bradford diluido

Tomar 1 ml del reactivo Bradford Bio Rad y diluirlo con 4 ml de agua. Prepararlo al momento del uso.

Preparación de diluciones para curva patrón.

Tomar 50 uL de BSA Stock (1.41 mg/ml) y colocarlos en un tubo, de estos tomar 30uL y mezclarlos con 30uL de agua deionizada (0.705 mg/ml), de aquí tomar 30uL y diluirlos en 30uL de agua deionizada y así sucesivamente hasta obtener 6 diluciones con:

1.41 mg/ml , 0.705 mg/ml, 0.3525 mg/ml, 0.17625 mg/ml, 0.088125 mg/ml, 0.044 mg/ml.

CALCULOS Y EJEMPLOS:

Medidas de absorbancia de muestras de Yangambi. Hoja # 2

1.278 Abs

1.305 Abs

1.2915 Abs

Promedio : 1.2915 ABS

Lectura del Blanco : 0.2395 ABS

Ecuación de Curva patrón = $-0.046388 + 2.574181$ (ABS corregida)

Resultado : $-0.0554 + 2.14599$ (1.2915 – 0.2395)

: 2.2022 mg/ ml



4.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

(SDS - PAGE)

FUNDAMENTO

Este método nos permite separar proteínas basándonos en sus pesos moleculares, para lo cual cada proteína se liga con muchas moléculas del detergente cargado negativamente Lauril sulfato (SDS) atando la parte hidrofóbica de esta destruyendo las estructuras de pliegue lo que da una cadena polipéptida, así el complejo SDS-proteína es proporcional a su peso molecular; adicionalmente se emplea un agente reductor como el mercaptoetanol que rompe los puentes disulfuro permitiendo analizar moléculas separadamente, esto en geles de poliacrilamida y bajo la aplicación de un campo eléctrico permite la migración del complejo SDS-proteína hacia el electrodo positivo, así partículas con mayor peso serán mayormente arrastradas, y viceversa. Lo que se obtiene es una lámina de poliacrilamida mostrando la resolución de una serie de bandas ordenadas por sus pesos moleculares, y que pueden ser visibles después de una tinción con Comassie Blue o Nitrato de plata.



PROCEDIMIENTO

1. Armar el equipo colocando las placas de vidrio en los soportes, previo lavado con agua jabonosa y limpieza con alcohol.
2. Preparar el running gel y colocar 4.5 ml en cada uno.
3. Adicionar 100µl de butanol saturado para alinear y esperar polimerización (40 min).
4. Preparar stacking gel y colocar 2 ml en cada gel.

5. Colocar inmediatamente las peinetas y esperar polimerización (15 min).
6. Tomar las placas con los geles, sacarle las peinetas y colocarlas en el cubo de electroforesis.
7. Adicionar el running buffer 1X.
8. Preparar las muestras, tomando para los geles de 15 posillos 12 μ l de muestra y 3 μ l de Loading buffer, y para los de 5 posillos el doble.
9. Calentar las muestras por 1 minuto a baño de maría.
10. Colocar la muestras en cada posillo del gel con una micropipeta, procurando que no se rebose.
11. Tapar el cubo y encender la fuente de poder.
12. Programarlo a 150 V, y dejar correr hasta que caigan las muestras al running buffer.
13. Parar la corriente y desarmar la caja de electroforesis.
14. Despegar los geles de las placas de vidrio, cuidadosamente evitando que se rompan.
15. Se procede a teñirlos con nitrato de plata.

EQUIPOS Y MATERIALES

- Mini protean
- Micropipetas
- Fuente de poder
- Beackers

REACTIVOS

- Lauryl sulfato 10%
- Persulfato de amonio 10%
- Acrylamida 40%
- Agua deionizada
- Temed
- Triz base 1,5 M pH 8,8
- Triz base 0,5 M pH 6,8

CALCULOS Y EJEMPLOS

RUNNING GEL	GEL 12%
Agua deionizada	2.6 ml
Trizma 1,5M pH 8,8	1.5 ml
Acrylamida	1.8 ml
Lauril sulfato	60 μ l
Persulfato de amonio	30 μ l
Temed	3 μ l

El volumen final es 6 ml y alcanza para un solo gel.

STACKING GEL

❖ Agua deionizada	3.8 ml
❖ Trizma 0,5M pH 6,8	1.5 ml
❖ SDS 10%	60 μ l
❖ Acrylamida	600 μ l

- ❖ Persulfato de amonio 30 μ l
- ❖ Temed 6 μ l

El volumen final es 6 ml y alcanza para dos stacking. Los valores vienen dados en tablas preestablecidas.



4.8 TINCION CON NITRATO DE PLATA

FUNDAMENTO

Se basa en la estabilización de los iones de plata por la formación de complejos de plata-diamino con hidróxido de amonio. Las concentraciones de iones plata son usualmente muy bajas en estas tinciones ya que la mayoría de la plata está unida en los complejos diamina. En esta tinción diamina, la solución de plata amoniacal debe ser acidificada con ácido cítrico para que la producción de imagen ocurra. La adición de ácido cítrico disminuye la concentración de iones libres de amonio, liberando así iones plata a un nivel donde su reducción por formaldehído a plata metálica es posible. La concentración óptima de ácido cítrico resulta en un rango controlado de reducción de ión plata previniendo la precipitación no selectiva de plata.

PROTOCOLO

1. Transferir el gel cuidadosamente al recipiente que contiene la solución de ácido acético al 10%, metanol 50% y agua deionizada al 40%. Usar 50ml de solución para cada gel.
2. Dejar el gel en esta solución por una hora, realizar un cambio con la misma solución a la media hora. El gel puede permanecer por 24 horas en esta solución pero en un cuarto oscuro y a temperatura ambiente.
3. Lavar el gel con agua deionizada cada diez minutos por media hora.
4. Preparar la solución C.
5. Dejar el gel en 50ml de solución C por 15 minutos.
6. Lavar el gel 2 veces con agua deionizada y dejarlo en la misma por 2 minutos.
7. Preparar la solución D.



8. Colocar 50ml de la solución D en un recipiente nuevo, cambiar el gel al nuevo recipiente y mantenerlo en agitación por 10 minutos. La solución D actúa como revelador del gel.
9. Eliminar la solución D y añadir 50ml de ácido acético al 1%, enjuagar al menos 2 veces. El ácido acético detiene el oscurecimiento del gel.
10. Dejar el gel en agua deionizada.
11. Scanear el gel.

NOTAS:

- Por cada cambio de solución lavar el gel previamente con agua deionizada.
- Los recipientes deben ser de vidrio y extra limpios.
- Recolectar la solución C en un frasco y agregarle ácido clorhídrico al 10% y luego enterrar esta solución en la tierra.
- La tinción se realiza a temperatura ambiente, oscuridad y agitación.

EQUIPOS Y MATERIALES

- Bandejas de vidrio
- Shaker
- Micropipetas
- Probetas
- Beackers
- Agitadores magnéticos
- Cronómetro



REACTIVOS

- Nitrato de plata
- Hidróxido de sodio 0,36%
- Hidróxido de amonio 29,7%
- Acido cítrico 1%
- Formaldehido
- Metanol 50%
- Acido acético



PREPARACION DE REACTIVOS

Solución A

- ❖ Nitrato de plata - 0,8 g.
- ❖ Agua deionizada - 4ml

Mezcle hasta disolución.

Solución B

- ❖ Hidróxido de sodio 0,36% - 21ml
- ❖ Hidróxido de amonio 14,8% - 29,7%

Mezcle para homogenizar.

Solución C

Mantener en agitación la solución B y añadir gota a gota la solución A. observar la coloración café que inmediatamente desaparece.

Enrasar esta solución a 100ml.

Mediante pruebas experimentales se determinó que 100ml de solución C es suficiente para teñir dos geles.

Solución D

- ❖ Acido cítrico 1% - 500 μ l
- ❖ Formaldehido 37% - 37,5 μ l

Mezclar ambas soluciones y enrasar a 100ml. Esta solución es suficiente para teñir dos geles.



4.9 PRUEBA EXPERIMENTAL

COMPARACION DE DIFERENTES TECNICAS DE PRECIPITACION

OBJETIVO

Determinar cuál de los reactivos precipitadores disponibles en el laboratorio era el mejor para realizar los análisis de proteínas, tomando en cuenta su capacidad de precipitación, interferencias y resolución en el gel.

PROCEDIMIENTO

1. Escoger muestra para el experimento
2. Cortar la hoja en pedazos pequeños de 1 cm.
3. Triturar la hoja con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino.
4. Pesar 0,5 g de muestra y colocar en tubos Eppendorf de 2ml
5. Adicionar buffer de extracción alcalina en relación 1:3. Centrifugar las muestras a 14000 rpm por 5 minutos.
6. Adicionar los precipitadores: TCA, PEG, acetona y sulfato de amonio, en los tubos Eppendorf respectivos.
7. Dejar precipitar las proteínas por una hora en hielo.
8. Drenar el sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en 750µl de buffer de extracción alcalina, excepto la muestra con TCA. Resuspender el pellet de TCA en 100 µl de NaOH 0,1N y luego añadir 650µl de buffer de extracción alcalina.
10. Determinar absorbancia.
11. Con los datos graficar la curva standard.

12. Determine la absorbancia corregida.
13. Determine los mg de proteína por ml de solución.
14. Llevar todas las muestras a la misma concentración.
15. Centrifugue las muestras por 5 minutos a 14000 rpm.
16. Hierva las muestras por 5 minutos.
17. Centrifugue nuevamente bajo las mismas condiciones
18. Preparar un gel de poliacrilamida de gradientes al 5% y 20%, dejar polimerizar
19. Preparar stacking gel con peineta (plastic comb) de 5 celdas.
20. Sacar el casting frame del plate sandwich e incorporarlo en el clamping frame.
21. Incorporarlo al buffer tank.
22. Añadir 300 ml de running buffer.
25. Colocar en cada celda 10 μ l de muestra, empezando por el marcador de peso molecular.
26. Tapar el buffer tank.
27. Encender la fuente de poder y establecer el voltaje a 150V y dejar que las proteínas migren de acuerdo a su peso molecular, por aproximadamente 1 hora.
28. Cuando la electroforesis haya terminado, apagar la fuente de poder.
29. Realizar tinción con nitrato de plata.



EQUIPOS Y MATERIALES

- Tijeras
- Mortero y pilón
- Tubos Eppendorf
- Micropipetas

- Balanza analítica
- Espectrofotómetro (Lector Elisa)
- Centrífuga refrigerada
- Mini protean
- Plastic comb
- Fuente de poder

REACTIVOS

- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| - Nitrógeno líquido | - Acrylamida |
| - Buffer de extracción alcalina | - Agua deionizada |
| - Acido tricloroacético (TCA) | - Temed |
| - Polietilenglycol (PEG) | - Triz base 1,5 M pH 8,8 |
| - Acetona | - Triz base 0,5 M pH 6,8 |
| - Sulfato de amonio | - Nitrato de plata |
| - PMSF | - Hidroxido de amonio |
| - Mercaptoetanol | - Acido cítrico |
| - Hidróxido de sodio | - Acido acético |
| - Lauryl sulfato | - Metanol |
| - Persulfato de amonio | - Running buffer 3X |

PREPARACION DE REACTIVOS

1. *BUFFER DE EXTRACCION ALCALINA + PMSF (10 μ l por ml de buffer)+
Mercaptoetanol (140 μ l por 100 ml)*
2. *RUNNING BUFFER: Tris base 15 g/l ; glicina 72 g/l ; lauryl sulfato 5 g/l.*

4.10 ANALISIS DE PROTEINAS MEDIANTE ELECTROFORESIS DE 2 DIMENSIONES

FUNDAMENTO

La electroforesis bidimensional separa las proteínas de una mezcla según dos propiedades moleculares, una en cada dimensión. El procedimiento se basa en la separación en una primera dimensión mediante isoelectroenfoque (desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH), y una segunda dimensión según peso molecular mediante electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE)



PROTOCOLO

1. Hacer extracción de proteínas.
2. Incubar las muestras con lysis buffer por 30 min en hielo.
3. Centrifugar 20 min a 14000 rpm.
4. Recoger el sobrenadante
5. Almacenar a -80°C .

GEL-FIRST DIMENSION (Isoelectroenfoque)

6. Disolver en 2 ml de agua destilada poco a poco la urea (2,4 g) con agitación a temperatura ambiente (20°C)
7. Añadir lentamente el CHAPS (0.1 g) hasta disolución
8. Adicionar la acrylamida y enrasar a 5 ml.
9. Coger el sobrenadante.
10. Adicionar los ampholytos.
11. Desgasificar.

12. Adicionar el temed y el persulfato de amonio.
13. Incubar por hora y media en oscuridad.
14. Correr el gel de la primera dimensión
 - Sacar los capilares del gel, armar el mini protean II tube module.
 - Adicionar el lower chamber buffer (H₃PO₄ a 25mM) hasta cubrir el circuito aproximadamente 500 ml.
 - Colocar el upper chamber buffer (NaOH a 0,1M) aproximadamente 200 ml, hasta cubrir los agujeros del circuito.
 - Eliminar las burbujas de los capilares con la ayuda de una jeringa Hamilton.
15. Cargar 25 ml de muestra y 25 ml de sample lysis buffer.
16. Encender la fuente de poder y dejar correr la muestra a 500 V por 15 min y luego a 1500 por 2 horas.

SEGUNDA DIMENSION (SDS – PAGE)

17. Preparar geles de gradientes al 5 y 20% y dejar polimerizar.
18. Añadir 2 ml de buffer (0,125M Tris-HCL, pH 6,8; 2,5 mM dithithreitol; 2,3% SDS) en gel de la segunda dimensión y colocar los geles de la primera dimensión directamente en el buffer por 7 minutos.
19. Al cabo de los 7 minutos eliminar el buffer de equilibración.
20. Adicionar 100µl de sample lysis buffer.
21. Armar el mini buffer tank.
22. Realizar electroforesis por una hora a 150V
23. Tinción con nitrato de plata.

EQUIPOS Y MATERIALES

- Mortero y pilón
- Centrífuga
- Tubos Eppendorf
- Congelador (-80°C)
- Balanza analítica
- Tubos capilares
- Jeringa Hamilton
- Shaker
- Probetas
- Agitadores magnéticos
- Cronómetro
- Bandejas de vidrio
- Beackers
- Equipo para geles de gradientes
- Miniprotean
- Micropipetas
- Fuente de poder



REACTIVOS

1.- EXTRACCION

- Nitrógeno líquido
- **2D LYSIS BUFFER**
 - 0.01M Tris-HCL, pH 7.4
 - 1mM EDTA
 - 8M Urea
 - 0.05M DTT
 - 10% Glycerol (V/V)
 - 2 % CHAPS (W/V)
 - 6% Ampholytes

2.- PRIMERA DIMENSIÓN

- GEL FIRST DIMENSION

- Acrylamida 5% (0.25% N'N methylenebisacrylamide)
 - Urea 8M
 - CHAPS 2%
 - Ampholytes 2,5% pH 4-8 o pH 3,5 – 10
 - Persulfato de amonio 10%
 - Temed 5%
- Butanol saturado
 - Ácido fosfórico (Ánodo) 25Mm
 - Hidróxido de sodio (Cátodo) 0,1M

SEGUNDA DIMENSIÓN

- BUFFER DE EQUILIBRACION

- 0.125 M Tris-HCL pH 6,7
 - 2.5 mM Dithiothreitol
 - 2.3 % SDS
- Sample lysis buffer
 - Running Buffer

PREPARACION DEL SAMPLE LYSIS BUFFER

- Preparar una solución de bromofenol blue al 0,5% (0,01 g en 2ml).
- Adicionar 2,5µl de la solución de bromofenol blue a 500µl de 2D lysis buffer.

PREPARACION DE RUNNING BUFFER

- Tris-base 15 g/L;
- Glycina 72 g/L;
- Lauryl sulfato (SDS) 5 g/L

Almacenar a 4°C.



PRUEBAS DE TECNICAS DE 2D

PRUEBA A

Este experimento se realizó con hojas de banano: genotipo Yangambi-hoja 9.

Prueba con Yangambi-hoja 9.

Fecha: 25-03-02

OBJETIVO

Obtener un gel libre de impurezas para poder apreciar claramente las proteínas.

PROTOCOLO

1. Se precipitaron las muestras extraídas previamente con 2D lysis buffer, mediante dos técnicas diferentes de precipitación: sulfato de amonio y acetona.
2. Se recolectó 200µl de muestras en 2 tubos Eppendorf. A una muestra se le adicionó 1ml de acetona, y a la otra se le adicionó 20µl de TCA. A ambas muestras se las dejó reposar por una hora. La muestra con acetona se mantuvo a -20°C y la de TCA en hielo.
3. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos.
4. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets. El pellet con acetona en 200µl de 2D lysis buffer y el pellet con TCA se resuspendió en 100µl de NaOH 0,1N más 100µl de 2D lysis buffer.
5. Se centrifugó y recolectó el sobrenadante.
6. Se realizó la electroforesis de la primera dimensión.
7. Se realizó la electroforésis de la segunda dimensión.
8. Tinción con nitrato de plata.

RESULTADOS

En el gel de la muestra precipitada con acetona se puede apreciar con mejor resolución las proteínas, no así en la muestra precipitada con sulfato de amonio.

PRUEBA B

Este experimento se realizó con suero humano.

Fecha: 27-03-02

OBJETIVO

Mejorar la resolución de los geles de poliacrilamida de dos dimensiones.

PROTOCOLO

1. Se tomó muestra de suero humano.
2. Se recolectó 200µl de muestras en 2 tubos Eppendorf. A una muestra se le adicionó 1 ml de acetona, y a la otra se le adicionó 32 g. de sulfato de amonio. A ambas muestras se las dejó reposar por una hora a -20°C .
3. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos.
4. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 200µl de 2D lysis buffer.
5. Se centrifugó y recolectó el sobrenadante.
6. Se realizó la electroforesis de la primera dimensión.
7. Se realizó la electroforesis de la segunda dimensión.
8. Tinción con nitrato de plata.

RESULTADOS

Al utilizar suero humano se trata de verificar los resultados de la prueba anterior, ya que es una muestra pura libre de impurezas. Con este experimento se comprobó que con la acetona se obtiene una mejor precipitación de proteínas y un gel con mejor resolución, pero se debe seguir realizando pruebas para conseguir un gel libre de impurezas.

PRUEBA C

Muestra: Musa

Genotipo: Pisang Berlin

Hoja: 1



OBJETIVO

Determinar cual de los reactivos buffer es el mejor para resuspender la muestra. El buffer más efectivo será aquel que nos brinde un gel libre de impurezas; es decir con mejor resolución.

REACTIVOS

- Buffer de extracción alcalina.
- Tritón.
- Polivinilpolipropileno (PVPP)

PROTOCOLO

1. Realizar extracción de proteínas de la hoja 1 del genotipo Pisang Berlin.
2. Precipitar las muestras con acetona.
3. Resuspender en: - Buffer de extracción alcalina
 - Buffer de extracción alcalina +Tritón 1,5%+PVPP 0,1%
 - 2D lysis buffer.
4. Se centrifugó y recolectó el sobrenadante.
5. Se realizó la electroforesis de la primera dimensión de las muestras precipitadas y ~~sin~~ precipitar.
6. Se realizó la electroforesis de la segunda dimensión.
7. Tinción con nitrato de plata.



RESULTADOS

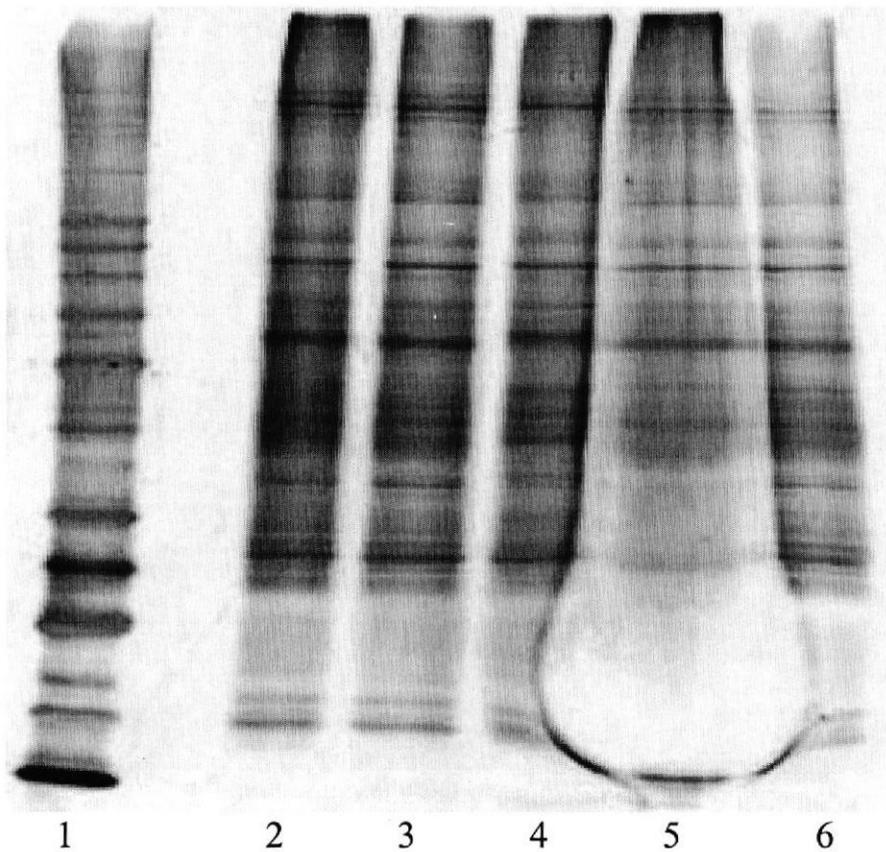
Se obtuvo mejores resultados con el 2D lysis buffer, por lo tanto queda establecido como buffer para resuspender las muestras.

5. RESULTADOS

EXPERIMENTO DE COMPARACION DE PRECIPITADORES

Variedad: Calcuta

Hoja: 4



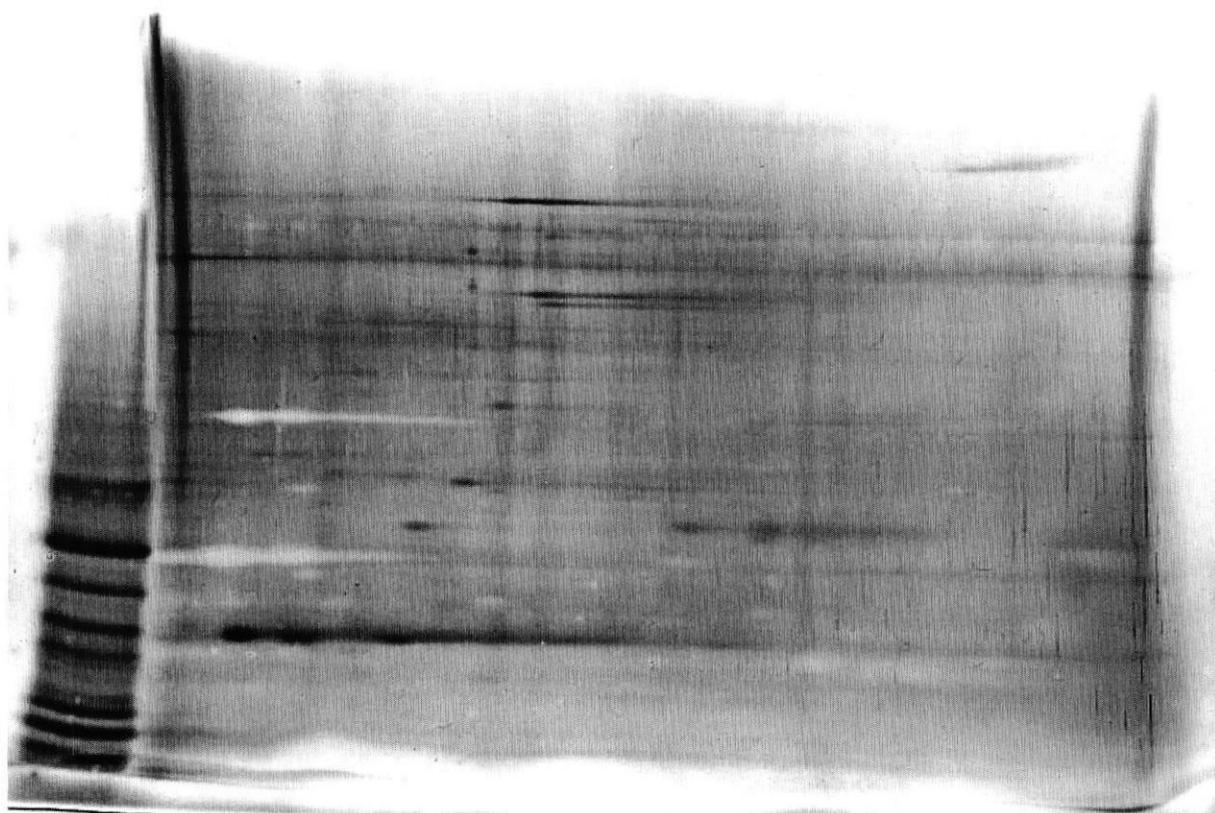
1. Marcador de pesos moleculares
2. Muestra estandar sin precipitar
3. Muestra precipitada con sulfato de amonio
4. Muestra precipitada con TCA
5. Muestra precipitada con PEG
6. Muestra precipitada con Acetona

**PRUEBAS DE ANALISIS DE PROTEINAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS DE 2 DIMENSIONES**

MUESTRA PRECIPITADA CON ACETONA

Variedad: Yamgambi

Hoja: 9



**PRUEBAS DE ANALISIS DE PROTEINAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS DE 2 DIMENSIONES**

MUESTRA PRECIPITADA CON SULFATO DE AMONIO

Variedad: Yamgambi

Hoja: 9



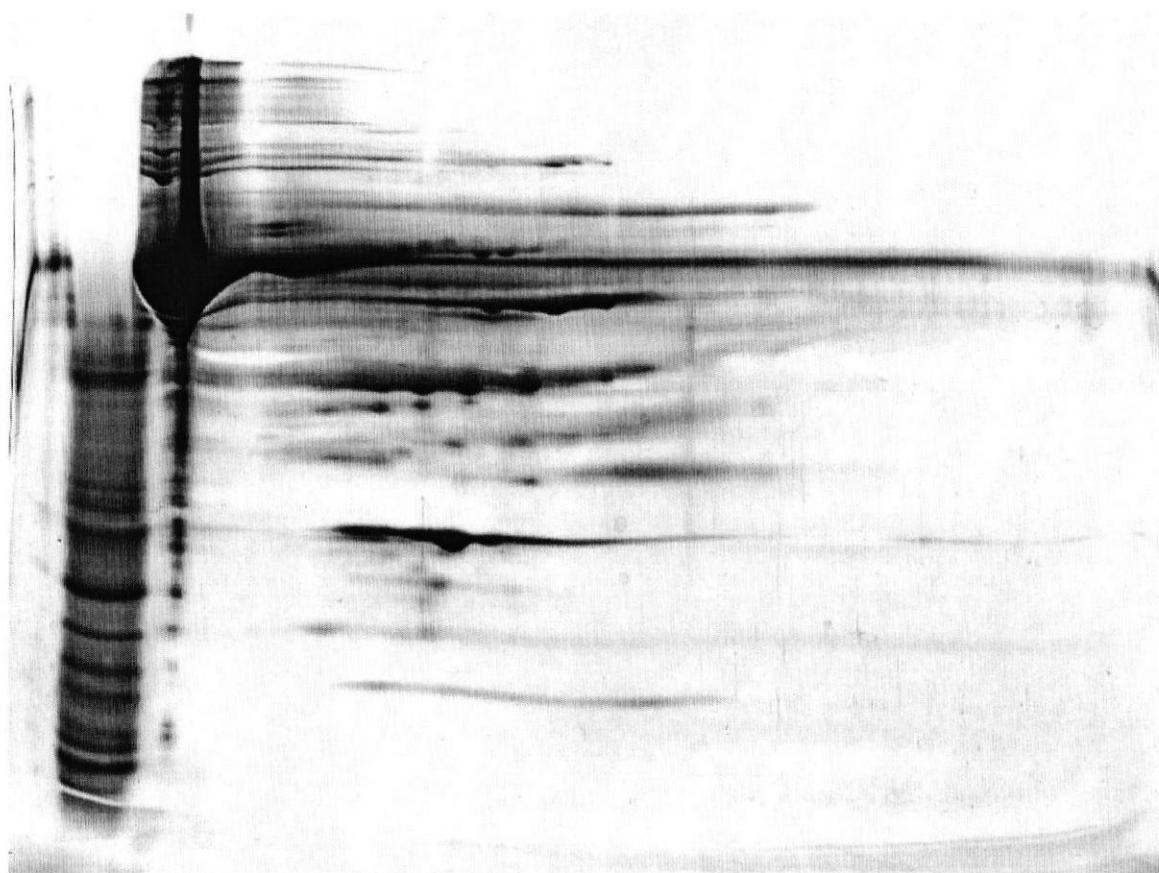
CIBT



**PRUEBAS DE ANALISIS DE PROTEINAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS DE 2 DIMENSIONES**

MUESTRA PRECIPITADA CON ACETONA

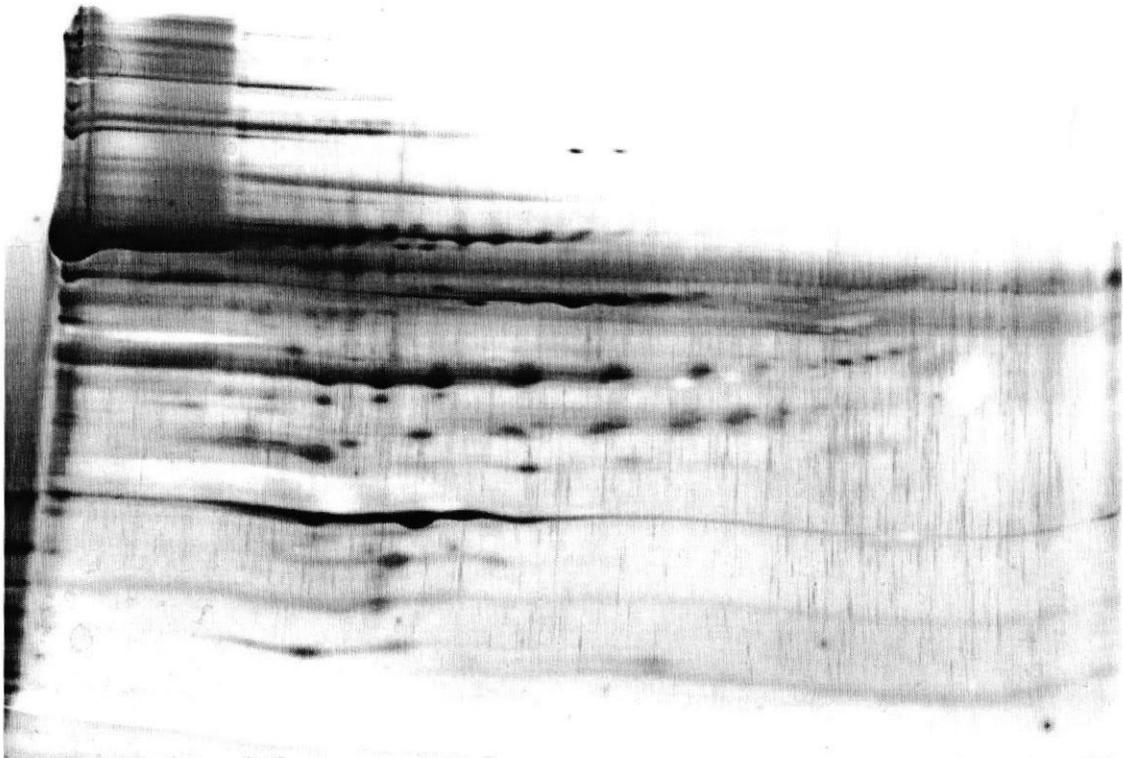
Muestra: Suero Humano



**PRUEBAS DE ANALISIS DE PROTEINAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS DE 2 DIMENSIONES**

MUESTRA PRECIPITADA CON SULFATO DE AMONIO

Muestra: Suero Humano



6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Realizar las prácticas profesionales en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador amplió mis conocimientos y me permitió adquirir la destreza necesaria en el desarrollo de técnicas tan importantes como son las de análisis proteico.

El campo de la inmunoquímica es sumamente amplio. Se necesita mucha dedicación y estudio para comprender la importancia, complejidad, función de los reactivos y cada paso de las técnicas empleadas.

De las técnicas aplicadas pude establecer las siguientes conclusiones y recomendaciones:

La técnica de análisis de proteínas mediante electroforesis de dos dimensiones definitivamente es mucho mejor que la electroforesis SDS-PAGE, ya que presenta mejor resolución de bandas y se pueden revelar mayor cantidad de proteínas.

De manera sencilla se puede decir que la electroforesis es un método analítico que nos permite separar biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y peso molecular, bajo la acción de un campo eléctrico.

Se debe tener en cuenta que las soluciones de acrilamida deben ser desgasificadas pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Es por eso también que se adiciona butanol después de colocar la solución de acrylamida en el casting frame.

La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bis-acrilamida vs. acrilamida se use.

Durante la electroforesis se distinguen dos procesos, el de apilamiento en el stacking gel y el de separación en el gel resolutivo o running gel. El primer gel es de mayor poro que el segundo pero de menor altura, en él la muestra se concentra en una zona muy estrecha y luego pasa al segundo gel donde realmente separa las proteínas por su carga y tamaño molecular.

Se debe recordar que los reactivos que se manipulan son de alto riesgo para la salud, para evitar contaminación con ellos se debe cumplir con las BPL.

Se recomienda a PROTAL que continúe apoyando a los estudiantes para que realicen prácticas en el CIBE, ya que es una extraordinaria oportunidad para aprender sobre investigación científica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ✪ 2D Proteome Analysis Protocols Methods in Molecular Biology. Volume 112.
Edited by Andrew J. Link. Editorial Humana Press 1999. Totowa, New Jersey.
- ✪ Diplomado en Biotecnología. Materia Bioquímica. Dra. Maya Chávez.1999
- ✪ Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology. Edited by Murray. P.
Deutscher . U.S.A. 1990.
- ✪ http://bvs.sld.w/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm
- ✪ <http://ntrri.tamuk.edu/electrophoresis/pde.html>
- ✪ <http://plaza.snu.ac.kr/~dschung/course/ce/cenote.pdf>
- ✪ <http://www.abdn.ac.uk/~mmb023/protocol.htm>
- ✪ <http://www.angelfire.com/scifi/anarkimia/Biologia/tecnicas/electrofresis.htm>
- ✪ http://www.fisher.co.uk/techzone/faqs/lifescience.htm#Q_Electroendosmosis.
- ✪ <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/proteins.html>

- ★ <http://www.jorplast.com.br/cbipep/cbip4ep.html#anchor103506>

- ★ <http://www.ub.es/biocel/pbc/prac/tecnicas/page.htm>

- ★ <http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPpage.html>

- ★ PROTEIN METHODS. Daniel M.Bollag/Michael D.Rozycki/Stuart J.Edelstein.
Editorial Wiley-Liss. Second Edition.1996.USA. Pág. 83-106.

- ★ PROTEOME RESEARCH: Two Dimensional Gel Electrophoresis and
Identification Methods. T Rabilloud. Editorial Springer Verlag Berling Heidelberg.
2000. Germany.

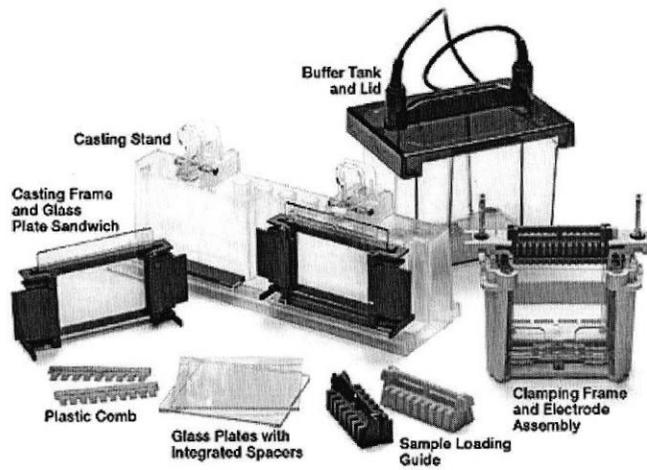
- ★ www.monografias.com/trabajos/vitafermen/vitafermen.shtml



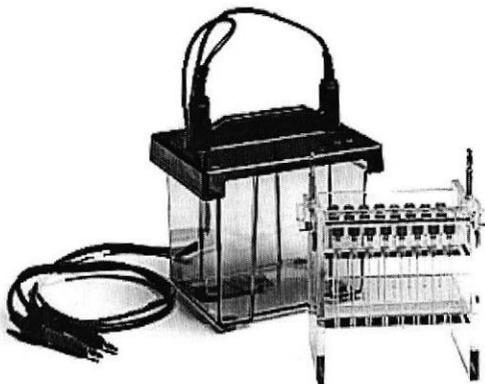
ANEXOS



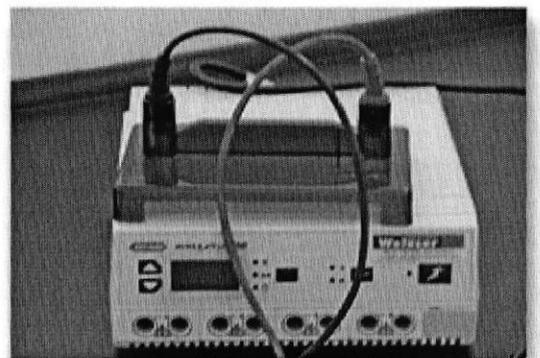
EQUIPOS PARA ELECTROFORESIS



Mini-Protean.



Bio-Rad Laboratories Mini Tube Gel Cell





Centrifuga refrigerada

ESPO
ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DEL LITORAL
CIBT



Laboratorio de Inmunoquímica



Laboratorio de Inmunoquímica

EXPLICACION BREVE DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS

Tris-base.- agente atraviesa la membrana biológica para permitir la liberación de las proteínas membranales.

EDTA.- Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, actúa quelante de metales pesados y reduce los cationes divalentes libres.

Urea.- desnaturalizante de proteínas, añadido a buffer para interacciones fuertes entre proteína-proteína.

DTT o ditioneitol.- es un tiol que actúa como agente reductor evitando la oxidación de los tioles proteicos. Es gran estabilizador, tiene bajo potencial redox y tiene olor suave, razón por la cual algunos lo utilizan en lugar del beta-mercaptoetanol.

Glycerol.-estabilizador de proteínas membranales, no existe explicación razonable para dicho efecto, pero afecta sustancialmente la densidad y viscosidad del medio.

CHAPS.- detergente proteico que actúa sobre la parte lipídica de la membrana dejando libre las proteínas membranales.

Ampholytes.- son polímeros mezclados de aliphatic amino y ácidos carboxílicos, debido a eso mantienen el punto isoeléctrico.

PVPP .- polyvinilpyrrolidone. Se utiliza para aislar polifenoles

Tritón X – 100 .- t – Octylphenoxyethoxyethanol.

Es un detergente no iónico, es decir que tienen grupos hidrofílicos no cargados. Como resultado de esto es poco probable que rompa interacciones proteína-proteína y es particularmente útil para aislar complejos funcionales de proteínas. Además es mucho menos desnaturalizante que los detergentes iónicos.

ELECTROFORESIS

Fundamentos

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con una carga eléctrica neta son colocadas en una campo eléctrico, éstas experimentarán una fuerza de atracción hacia el polo que posea carga opuesta:

Así, si se deja transcurrir un cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

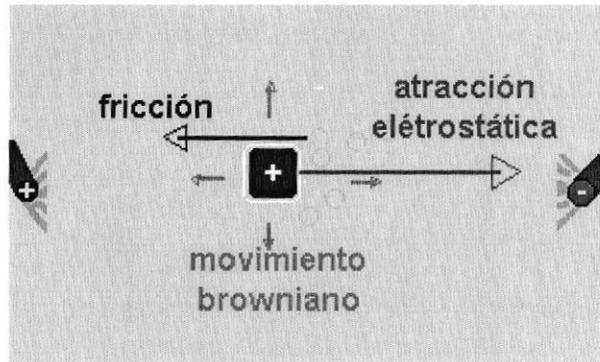
Equipo para Isoelectroenfoque

FUENTE DE PODER

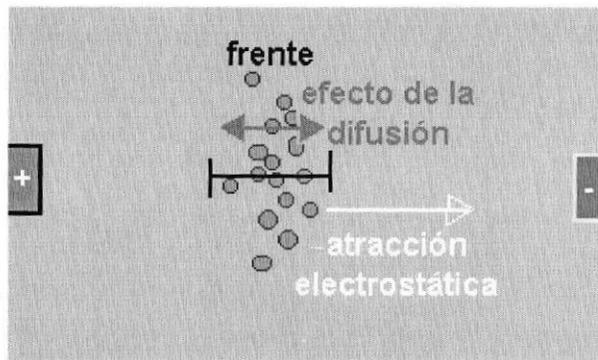
El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; por un lado, la fricción con el solvente dificultará este movimiento (es decir, al moverse los solutos chocarán con las moléculas de solvente que están en su camino), lo que genera una fuerza que se opone al movimiento; por otro lado, las moléculas tienen a moverse en forma aleatoria (movimiento browniano) debido a que poseen energía cinética propia. Esto se denomina difusión y sigue la llamada ley de Fick. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.



CIBT



La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de la solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo.



Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz molecular que dificulta el movimiento de los solutos.

Consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también. Si ahora aumentamos la intensidad del campo eléctrico, podemos acelerar la migración molecular, pero no por ello variará la difusión y nuestro frente migrará de un modo cada vez más compacto. Así, podemos mejorar la definición del frente aumentando la diferencia de potencial entre los polos y esto estará limitado tan sólo la capacidad de la solución para disipar el calor generado por el paso de la corriente eléctrica. Esto último, debido a que si el calor se acumula se puede hacer hervir a la solución, e incluso descomponer el gel y/o los solutos.

La presencia del gel tiene una consecuencia adicional, ya que aquellas moléculas de mayor tamaño hallarán mayor resistencia al avanzar a través de los poros del gel que aquellas moléculas pequeñas. Por lo tanto, la fricción que se observa durante el movimiento electroforético en un gel depende de la masa y la forma de la molécula, en adición a su carga eléctrica.

Aunque el solvente puede, por si solo, producir una fricción diferente sobre diversas moléculas, su efecto es muy poco apreciable cuando no existe el entramado del gel.

ELECTROFÓRESIS

La electroforesis se basa en la migración de iones en un campo eléctrico, es ampliamente utilizada para la separación analítica de moléculas biológicas. La migración dependerá de el campo eléctrico, la carga de la molécula, su tamaño, forma y estado de solvatación, además de la viscosidad de la solución. Así las fuerzas involucradas en la migración son la fuerza eléctrica determinada por el campo eléctrico y la carga de la molécula, y la fuerza de fricción determinada por la velocidad de migración del ion y el coeficiente de fricción, el que depende de los demás factores ya mencionados.

EN PAPEL

En la electroforesis en papel, la muestra es aplicada sobre una tira de papel filtro y sus extremos son sumergidos en recipientes diferentes que contienen el tampón y a los cuales se conectan los electrodos. Los iones migran al electrodo de carga opuesta. Esta técnica puede ser combinada con la cromatografía en papel, separándolos de acuerdo a su carga y a su polaridad. También se puede realizar una electroforesis en dos dimensiones en la cual se usan buffers con diferente pH para cada dimensión.

GEL DE ELECTROFORESIS

La electroforesis en gel es quizás la más poderosa y convencionalmente usada técnica utilizada para la separación de macromoléculas. Los geles más comunes son de poliacrilamida y agarosa, que tienen poros con dimensiones que pueden ser determinadas. Así la separación está basada tanto en la filtración en gel como en las movilidades electroforéticas de las moléculas a ser separadas.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), el gel está compuesto por acrilamida y bisacrilamida y un buffer a elección. La polimerización de estos compuestos va a dar forma al gel y su tamaño de poro dependerá de la concentración de estos. Los extremos del gel son sumergidos en recipientes separados que cuentan con un mismo tampón, con pH cercano a 9 para proteínas.

Los geles de agarosa son utilizados para la separación de macromoléculas de gran tamaño que no pueden ser resueltas por PAGE, normalmente son utilizados para la separación de ácidos nucleicos (DNA, RNA).

Las bandas pueden ser detectadas por tinción, marcación radioactiva o detección con anticuerpos (Inmunoblotting o Western blot). Para proteínas normalmente se utiliza Azul de Coomassie, también pueden ser utilizados compuestos fluorescentes cuando las cantidades de proteínas son menores.

SDS-PAGE

El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un detergente que denatura fuertemente las proteínas y es usado comúnmente en preparaciones bioquímicas. El SDS, una molécula cargada negativamente, es capaz de rodear completamente una proteína enmascarando su carga, lo que permite que las proteínas tengan una idéntica relación de masa/carga y similar forma. Debido a esto, la electroforesis en SDS-PAGE, la separación de las proteínas ocurre de acuerdo a su peso molecular.

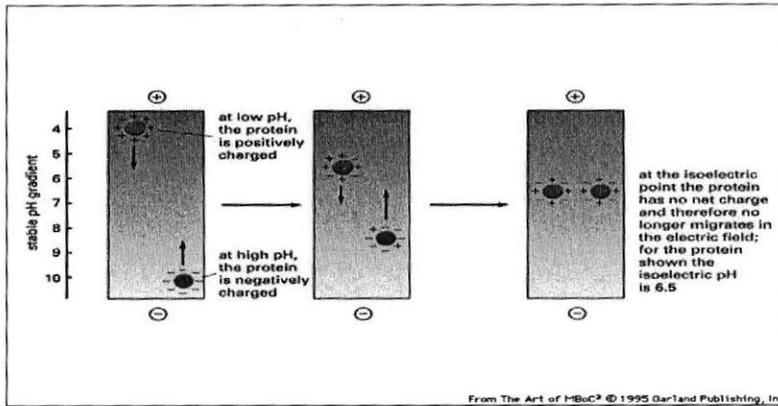
ISOELECTROENFOQUE

Esta electroforesis se basa en el pI de las proteínas, pH al cual las proteínas no tienen movilidad en un campo eléctrico. Aquí la proteína se encuentra en un gradiente estable de pH, en la cual el pH incrementa levemente desde el ánodo al cátodo, y las proteínas migran a la posición en que el pH es igual a su pI. En el isoelectroenfoco, los extremos del gel están sumergidos en recipientes con tampones de distinto pH, uno ácido y otro básico, los que van a producir el gradiente. En esta técnica la muestra es agregada antes de la polimerización del



CIBT

gel.



ELECTROFORESIS CAPILAR

En esta técnica, la electroforesis es llevada a cabo en unos muy delgados capilares. Su uso es relativamente común y es altamente efectivo, sin embargo requiere de muchas horas y es un proceso en el cual la cuantificación y automatización se hace difícil. Su uso es limitado a pequeñas cantidades y para fines analíticos.

Catalizadores

Un catalizador hace cambiar el mecanismo de una reacción química. En presencia de un catalizador la reacción avanza a través de etapas sucesivas más rápidas y la constante de velocidad adquiere un valor más alto. Si examinamos la ecuación de Arrhenius llegaremos a la conclusión que la presencia de un catalizador tiene que traer como resultado una reducción en la energía de activación porque de otra manera no podría explicarse como puede aumentar el valor de la constante de velocidad en comparación con la de la reacción no catalizada ya que en la ecuación de Arrhenius a temperatura constante A , R y T son constantes, de modo que la única forma de hacer que K aumente es que disminuya E_a . Entonces, desde el punto de vista de la ecuación de Arrhenius el efecto que produce un catalizador consiste en reducir la energía de activación a la vez que aumenta tanto la fracción activada de moléculas como la velocidad de la reacción.

Aunque los catalizadores afectan a la velocidad de una reacción no tienen influencia alguna sobre la posición de equilibrio de la reacción. Esto es explicable si tenemos en cuenta que los catalizadores ejercen su acción sobre ambas reacciones, la directa y la inversa. Así, la

velocidad de la reacción en su conjunto estará aumentada sin que se afecte la posición del equilibrio.

De acuerdo con el principio general un aumento de la temperatura modificará la posición de equilibrio de tal manera que el efecto que produzca ese aumento será contrarrestado por el sistema.

Catalizador: Es un metal o elemento que actúa como acelerador de una reacción química sin modificarse en el transcurso de la misma. Son cuerpos que por su presencia hacen variar la velocidad de una reacción. Mientras que las **Enzimas** son proteínas que actúan como catalizadores.

Catalizador : cuerpo que puede producir aceleración o retardo de una reacción química por presencia de una sustancia que permanece aparentemente intacta sin destruirse ni inactivarse en el proceso.

Algunas reacciones se aceleran bajo la influencia ejercida por algunas sustancias que al término del proceso resultan inalteradas. Estas sustancias se denominan catalizadores y el efecto que producen es la catálisis.

Cuando actúan como catalizador negativo disminuyendo la velocidad del proceso, reciben el nombre de inhibidores.

1. No se altera la composición de los catalizadores en las reacciones químicas en que intervienen.
2. Pequeñas cantidades de catalizadores bastan para acelerar el proceso de grandes cantidades de sustancias reaccionantes.
3. Los catalizadores solo pueden modificar, disminuir o aumentar la velocidad de reacción, pero son incapaces de provocar una reacción.
4. Los catalizadores son específicos de la reacción de que se trate.

Iniciadores de la polimerización: Los radicales libres necesarios para iniciar la reacción de polimerización son producidos en los composites por la reacción de los iniciadores. El peróxido de benzoilo y las aminas terciarias aromáticas son los iniciadores mas comunes en la polimerización químicamente activada.

En el pasado la amina terciaria aromática mas comúnmente usada fue el N,N-dimetil-p-toluidina (DMAT). La N,N-dihidroxietil-p-toluidina (DHEpT) es la amina terciaria aromática mas ampliamente usada en estos momentos.

La iniciación del proceso de polimerización activada a través de la luz visible, puede ser inducida por medio de la generación de radicales libres que resulten de la interacción de la luz ultravioleta o luz visible con componentes orgánicos apropiados.

El fotoiniciador en un sistema de luz visible es una alfa-dicetona, tal como la canforoquinona, usada en combinación con un agente reductor tal como el 4-N,N-dimetilaminofetil alcohol (DMAPE), el cual es una amina terciaria alifática.

INICIACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN

La iniciación de una polimerización en cadena puede ser inducida por calor, por agentes químicos (INICIADORES) o por radiación (ULTRAVIOLETA y RAYOS \square). La iniciación por calor o radiación proporciona una HOMÓLISIS del duplo enlace del monómero, resultando en un mecanismo de reacción vía RADICALES LIBRES; mientras que la iniciación química (la que se emplea en la mayoría de las industrias), se consigue con iniciadores, sustancias que pueden provocar tanto la homólisis como la HETERÓLISIS del doble enlace. Por tanto, la polimerización puede transcurrir a través de radicales libres, por vía CATIÓNICA o por vía ANIÓNICA, o todavía, por COORDINACIÓN. Caso la polimerización sea iniciada por un iniciador radicalar se llama polimerización radicalar; caso el iniciador sea un catión se denomina catiónica, si el iniciador es un anión la polimerización se dice aniónica (Figura 3). En el caso de la polimerización por coordinación los iniciadores son también CATALISADORES. Se utilizan complejos constituidos por COMPUESTOS DE TRANSICIÓN y ORGANOMETÁLICOS, como los de Ziegler-Natta. Este tipo de catálisis se aplica solamente a monómeros apolares, y tiene como ventaja, la obtención de polímeros altamente estereorregulares.

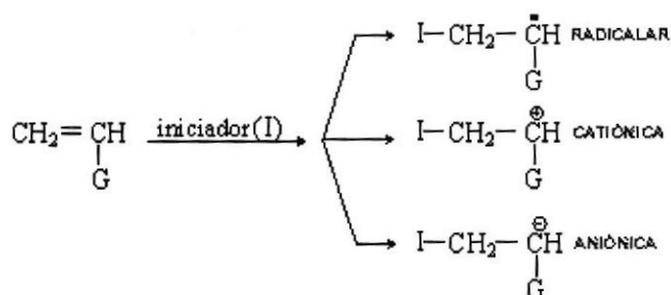
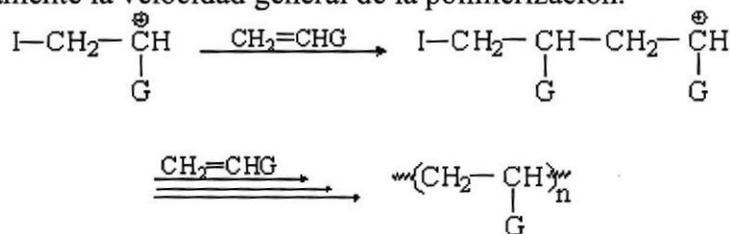


Figura 3 - Reacciones de iniciación de una polimerización en cadena radicalar catiónica aniónica

Durante la propagación, la especie reactiva generada en la iniciación (radical libre, catión o anión) incorpora sucesivamente moléculas de monómero, formando la cadena polimérica (Figura 4). Esta etapa de la polimerización en cadena es muy importante, pues su velocidad influye directamente la velocidad general de la polimerización.



HOMÓLISIS

rompimiento de un enlace químico resultando en la formación de dos radicales libres

RADICAL LIBRE

átomo u grupo de átomos que poseen un electrón sin pareja, o sea, libre

HETERÓLISIS

rompimiento de enlace químico resultando en dos iones de cargas opuestas

CACIÓN

ión con carga positiva

ANIÓN

ión con carga negativa

