



Manual: Cámara de electroforesis Mini Protean Tetra Cell en geles de
poliacrilamina-SDS aplicada al análisis de proteínas vegetales

Isadora Martínez Arellano

2021

Financiamiento (externo)

SECTEI/097/2017

Manual: Cámara de electroforesis Mini Protean Tetra Cell en geles de poliacrilamina-SDS aplicada al análisis de proteínas vegetales

Isadora Martínez Arellano

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Circuito Exterior S/N, C.P. 04510, A.P.70-186, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.

Resumen

En este trabajo se presenta el método de electroforesis en geles de poliacrilamida que permite separar moléculas según la movilidad de éstas bajo la acción de un campo eléctrico. Se indica la preparación de las disoluciones, el armado del equipo y la preparación de los geles a partir de acrilamida/bisacrilamida. Asimismo, se ejemplifica el empleo de la cámara de electroforesis Mini Protean Tetra Cell en la separación de proteínas a partir de legumbres (como frijol, haba, lenteja y garbanzo crudos y cocidos), por ser un tema de interés para el grupo de Ingeniería de Proceso. Se describe la técnica de teñido y desteñido de los geles con las muestras para visualizar las proteínas y su cambio después de la cocción. Finalmente, se describe las medidas de limpieza y cuidado de la cámara de electroforesis, así como la disposición de los residuos generados

Índice

Resumen.....	1
Nomenclatura.....	3
Introducción	4
Especificaciones.....	8
a) Componentes.....	8
2. Preparación de las disoluciones utilizadas en la electroforesis	8
3. Extracción de proteínas a partir de legumbres	10
4. Armado de la cámara de electroforesis Tetra Cell Bio Rad.....	10
5. Separación de las de las muestras.....	12
6. Limpieza de equipo	17
7. Desechos	17
Bibliografía.....	17

Nomenclatura

SDS	Sulfato de dodecilo sódico
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis por sus siglas en inglés
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
HCl	Ácido Clorhídrico
APS	Ammonium persulfate por sus siglas en inglés
TEMED	Tetrametiletilendiamina

Introducción

La palabra proteína proviene del griego “proteios” que significa primario. Como su nombre lo indica las proteínas son de gran importancia en los sistemas biológicos (Vasudevan et al., 2017) porque son parte de la estructura de los tejidos, en el proceso de crecimiento crean y reparan los tejidos, actúan como enzimas u hormonas en el metabolismo (González-Torres et al., 2007)

Por otro lado, la palabra leguminosa proviene del latín *legumen* que indica fruto alargado o en espiral que contiene varias semillas dispuestas en fila. Pertenecen a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae* que es la más amplia y prácticamente la única cuyas especies se cultivan para el consumo humano (Amóros, 2000). La familia de las legumbres son una fuente importante de proteínas, es por ello por lo que se les considera como un alimento de alto valor nutricional que proporciona beneficios a la salud (Duranti et al., 2008). El contenido de proteína en las semillas de legumbres se encuentra entre 13 % y el 18 % de proteína verdadera. Las albuminas son las proteínas que se encuentran en menor cantidad, mientras que las globulinas son las más abundantes. Siendo estas últimas, de dos clases: las vicilinas y las leguminas (Zorica et al., 2012). Las globulinas son proteínas de almacenamiento y son aproximadamente el 50-90% de las semillas. Algunas proteínas son conocidas como compuestos anti-nutricionales, y otras tienen actividad farmacológica (Scarafoni et al., 2005). Asimismo, se encuentra la ferridrina que fue relacionada con la protección contra daño oxidativo, y la germinación de las semillas (Ravet et al., 2009). Por otro lado, hay la presencia de enzimas como la enolasa, β -galactosidasa que degradan los polisacáridos y producen ATP cuando la semilla está lista para germinar (Buckeridge y Reid, 1994).

Para ser consumidas las leguminosas deben ser cocidas por tanto hay modificaciones en la composición química, nutricional y sensoriales, así como en la pérdida y transformación de los aminoácidos esenciales (Wu, 1995).

Por otro lado, la electroforesis conocida como SDS-PAGE es muy usada para analizar proteínas en extractos complejos. La más usada fue descrita por primera vez por Laemmli (1970).

Los componentes implicados en la reacción son:

- a. **Acrilamida.** El monómero fundamental que va a formar el gel. La acrilamida es un compuesto vinílico. La acrilamida es soluble en agua, no es un compuesto con gran toxicidad aguda, pero en una exposición laboral o exposición continua tiene un efecto acumulativo, es cancerígena (en especial puede inducir cáncer de piel), teratogena y es un neurotóxico. Por ello debe manejarse con precaución. Una vez polimerizada, la poliacrilamida resultante es inocua, ya que ha perdido los grupos vinilo altamente reactivos. De hecho, numerosos cosméticos, como geles fijadores de pelo, llevan polímeros acrílicos similares. La toxicidad de la acrilamida se debe en parte a la formación de su epóxido, la glicidamida, que reacciona con bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y proteínas, alterando su función o induciendo mutaciones.
- b. **TEMED y persulfato.** Son la clave del mecanismo de polimerización vía radicales libres. El TEMED y el persulfato generan los radicales necesarios para iniciar la reacción, que prosigue en cadena hasta formar el hidrogel.
- c. **N,N'-metilenbisacrilamida:** Agente responsable del entrecruzamiento de las cadenas de poliacrilamida y la reticulación del gel. Es esencial para regular las propiedades mecánicas y la capacidad de separación del gel.
- d. **SDS:** Tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1,4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada. Por lo tanto, en la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular. Para ello se compara la movilidad electroforética (Rf) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido
- e. **Azul de Coomassie:** Se une fuertemente a la proteína por una combinación de atracción electrostática a aminoácidos básicos (histidina, lisina y arginina) e interacciones hidrofóbicas entre fenilalanina y los grupos fenilo del colorante.

La polimerización depende de la temperatura. Se recomienda utilizar una temperatura por encima de los 20°C para prevenir una polimerización incompleta. Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización.

La velocidad de polimerización está determinada por la concentración de persulfato de amonio y TEMED. Mientras que la porosidad del gel, la determinan las proporciones relativas de poliacrilamida (C) y bis-acrilamida (T), siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida haya en relación con la concentración de acrilamida.

El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el intervalo de separación del gel. Los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

Las siguientes formulas se utilizan para determinar el tamaño de poro, a través del control de la concentración total de T y de C:

$$T = \frac{a + b}{V} * 100$$
$$C = \frac{b}{a + b} * 100$$

Donde:

a: masa de acrilamida en gramos

b: masa de bis-acrilamida en gramos

V: volumen en mL

Cuando C permanece constante y T incrementa, el tamaño del poro disminuye. Cuando T permanece constante y C incrementa, el tamaño del poro sigue una función parabólica. A altos y bajos valores de C, el tamaño del poro es grande, obteniéndose el menor tamaño de los poros a C= 5% (Pérez-Chabela et al., 2015)

El sistema consiste en dos geles (concentrador y separador) en los cuales se concentra y se separan las proteínas según su peso molecular (PM). Antes de que las proteínas entren en el gel separador, pasan por un gel concentrador, a pH 6.8, que evita que las proteínas se dispersen en el gel y provoca que todas las proteínas de las muestras se alineen en una fina banda que entra al mismo tiempo y a la misma velocidad en el gel concentrador. La separación tiene lugar en el gel separador, el cual realiza la separación

a un pH 8.8, donde la glicina tiene un papel importante debido a su punto isoeléctrico y pK . Por tanto, en el gel concentrador, la glicina se encuentra mayoritariamente en forma de zwitterion, aunque prevalece la carga negativa, con lo que la glicina forma una banda que se desplaza lentamente.

La velocidad de migración de las proteínas depende de las propiedades del gel (sistema de separación) y las moléculas mismas. La resistencia que ponga la matriz (gel) al movimiento de las moléculas depende del diámetro del poro. En general mientras más pequeñas sean las moléculas migrarán más rápido. La movilidad de la molécula también se verá afectada por el sistema de solución amortiguadora y la fuerza del campo usada para la separación.

Nikolic et al., 2012 realizó un estudio para las semillas de leguminosas reportó bandas de proteínas entre los 21 y 24 kDa representando las subunidades básicas y una banda por los 40 kDa representa la subunidad ácida. Asimismo, subunidades de albúminas a 15 kDa. Camacho et al., 2010, afirmaron que las proteínas de masa molecular de 50 kDa corresponden a las faseolinas y las de masa molecular de 30 kDa a las lectinas.

Por otro lado, el tratamiento con calor elimina a las proteínas más termosensibles como la faseolina o los inhibidores de tripsina.

En este manual se establecen los parámetros experimentales óptimos para la separación de proteínas contenidas en legumbres como como frijol, haba, lenteja y garbanzo, usando la electroforesis en geles de poliacrilamida. Si se desea conocer con exactitud de que proteína se trata hay que realizar espectrofotometría de masas o western blot.

Especificaciones

a) Componentes



Figura 1. Tetra Cell BioRad

- A. Tanque de amortiguador y tapa con cables
- B. Peines y vidrios espaciadores
- c. Guías para inyectar la muestra
- D. Soporte para gelificar la acrilamida

2. Preparación de las disoluciones utilizadas en la electroforesis

Usar equipo de protección (guantes y mascarilla) para la preparación de los reactivos ya que son tóxicos y se absorben por la piel.

- a) Acrilamida/Bis (30%T, 2.67%C)
7.3 g acrilamida (Bio Rad) y 0.2 g N'N'-bis-metilen-bisacrilamida (Bio Rad) disolver en 15 mL y aforar a 25 mL con agua desionizada. Guardar a 4°C en frasco ambar, tiene una caducidad de 30 días.

b) SDS 10%

Disolver 1 g (Bio Rad) en 9 mL y aforar a 10 mL con agua desionizada. Guardar a temperatura ambiente.

c) 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

4.54 g de Tris (Bio Rad) en 15 mL de agua desionizada y ajustar pH 8.8 con HCl 0.5N (Meyer). Finalmente, aforar a 25 mL con agua desionizada. Guardar a 4°C.

d) 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

3 g Tris base (Bio Rad) disolver en 25 mL de agua desionizada, ajustar pH 6.8 con HCl 5N (Meyer), aforar a 50 mL con agua desionizada. Guardar a 4°C.

e) Azul de bromofenol 0.5%

0.05 g (Bio Rad) en 10 mL de agua desionizada. Guardar a temperatura ambiente.

f) Amortiguador muestra

3.55 mL de agua desionizada, 1.25 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 2.5 mL de glicerol, 2 mL de SDS 10%, 0.2 mL de azul de bromofenol (Bio Rad) 0.5%.

Guardar a temperatura ambiente.

g) 10x Amortiguador de corrida pH 8.3

7.58 g Tris base (Bio Rad), 36 g glicina (Bio Rad), 2.5 g SDS (Bio Rad) disolver en 200 mL de agua desionizada y ajustar a 250 mL. No es necesario ajustar el pH. Guardar a 4°C, si presenta cristales, dejar reposar a temperatura ambiente hasta que se disuelvan. Agitar antes de usar.

h) APS 10%

Se debe preparar cada vez que se vaya a realizar un análisis de electroforesis. En un vial de 1 mL pesar 100 mg (Bio Rad) y disolver en 1 mL de agua desionizada.

i) Solución teñidora

0.02% de Coomassie R250 o 0.01% de Coomassie G250 (Bio Rad), 50% metanol (J. T. Baker) y 7.5% ácido acético (J. T. Baker).

- j) Solución desteñidora
20% de metanol (J. T. Baker) y 7.5% de ácido acético (J. T. Baker).

3. Extracción de proteínas a partir de legumbres

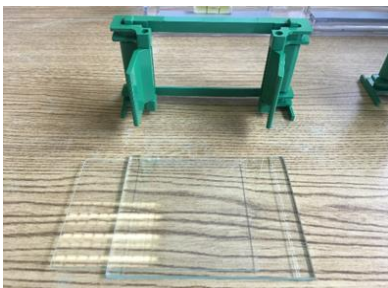
Se seleccionó harinas de legumbres debido a que es el material con el que se trabaja en el Grupo de Ingeniería de Proceso, sin embargo, se puede usar cualquier matriz con proteínas para realizar la técnica. Se pesaron 40 mg de harina de legumbre cruda y cocida (haba, lenteja, frijol), se agregó 1 mL de amortiguador muestra (inciso 2f). Se agitó durante 1 h a 25 °C en agitador vórtex (Vortexer, EUA), posteriormente se centrifugó a 11, 000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante contiene las proteínas solubles (Zórica et al., 2012).



Figura 2. Muestras en agitador vórtex (Vortexer, EUA)

4. Armado de la cámara de electroforesis Tetra Cell Bio Rad

Se identifican las placas de vidrio, unas con un escalón en el borde o separador (las de mayor tamaño) y otras de dimensiones más pequeñas. Se toma una de cada una y se emparejan de manera que entre ellas se forma un espacio libre. Las dos placas se introducen en el marco o soporte de color verde, tal y como se muestra en la Figura 3. El vidrio pequeño siempre debe ir hacia el frente.



3a



3b



3c

Figura 3. Armado del soporte o marco con los vidrios espaciadores (sándwich para la formación del gel poliacrilamida)

En la Figura 4 se muestra el soporte en los que se coloca el marco de color verde, el cual se sujeta con unas pinzas localizadas en la parte superior. Este aditamento debe estar sobre una superficie nivelada.



4a



4b

Figura 4. Soporte transparente para sostener el marco con las placas de vidrio que forman el sándwich para la formación del gel de poliacrilamida

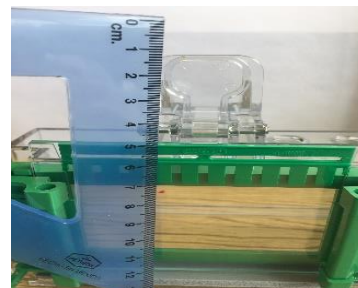
En la Figura 5 se muestra el peine (5a) que sirve para formar los pozos en el que se inyecta la muestra. Este peine se introduce entre los vidrios (5b). Al final del peine se mide 0.5 cm para indicar el nivel donde inicia el gel concentrador y finaliza el gel separador, cuando estos se agreguen en el interior del espacio formado entre las dos placas de vidrio.



5a



5b



5c

Figura 5. Armado de la unidad que contendrá el gel y la muestra incluyendo el peine 5a.

5. Separación de las de las muestras

Se seleccionó el gel concentrador de 5% y el separador de 12% (Zorica et al., 2012). Se mezclan las soluciones de la tabla 1 , enseguida se desgasifican o se meten a baño sónico durante 10 min.

Tabla1. Formulaciones para los geles

Porcentaje de gel %	Agua desionizada mL	Solución de acrilamida/bisacrilamida mL	Amortiguador Tris-HCl mL	SDS 10% mL
4	6.1	1.3	2.5	0.1
5	5.7	1.7	2.5	0.1
6	5.4	2.0	2.5	0.1
7	5.1	2.3	2.5	0.1
8	4.7	2.7	2.5	0.1
9	4.4	3.0	2.5	0.1
10	4.1	3.3	2.5	0.1
11	3.7	3.7	2.5	0.1

12	3.4	4.0	2.5	0.1
13	3.1	4.3	2.5	0.1
14	2.7	4.7	2.5	0.1
15	2.4	5.0	2.5	0.1
16	2.1	5.3	2.5	0.1
17	1.7	5.7	2.5	0.1

A la solución de gel separador, que se agrega primero, antes de ser añadida al sándwich se añade 50 μL de APS (inciso 2) y 5 μL de TEMED, solución que ya viene preparada. Al terminar de añadirla, se agrega un poco de alcohol isopropílico para que no haya deshidratación del gel. Cuando gelifique esta solución se procede a preparar la solución del gel concentrador. Se dará cuenta que la solución a gelificado porque en el recipiente donde la preparó verá la formación del gel. Se quita el alcohol isopropílico por medio de tiras de papel filtro hasta que quede completamente seco.

La solución del gel concentrador antes de ser añadida al sándwich se añade 50 μL de APS (inciso 2h) y 10 μL de TEMED, solución que ya viene preparada. Al terminar de añadirla, se introduce los peines. Hay que esperar a que gelifique la solución del gel concentrador (6a). Cuando ha pasado el tiempo suficiente (esta preparación de los dos geles es aproximadamente 40 min) se abre la pinza del soporte y se saca el marco verde (6b), se abren las pestañas (6c) y se sacan los vidrios con el gel el interior de estos (6d).

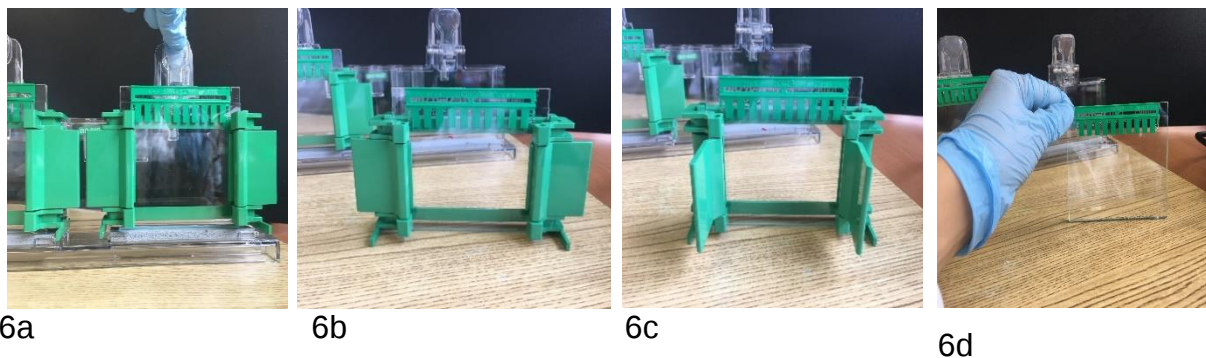


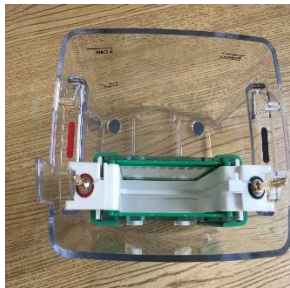
Figura 6. Vertido de soluciones para formar el gel separador y el concentrador.

Se introduce el sándwich con el gel en el módulo, el vidrio pequeño debe quedar en el interior del módulo (7a). Proceder de la misma forma con el otro sándwich (7b). Enseguida, se mete en la cubeta de amortiguador (7c)

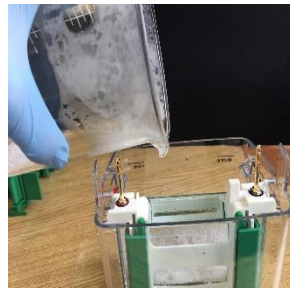


Figura 7. Armado del módulo de electroforesis

Introducir el módulo en la cubeta en la parte trasera, se dará cuenta porque la parte frontal tiene la leyenda de buffer. Verificar que los electrodos coincidan con el color de que indica la cubeta (8a). Añadir el amortiguador de corrida dentro del sándwich, tener especial cuidado de que no haya fugas, si las hay verificar el ensamblaje del módulo (8b). También hay que añadir amortiguador de corrida fuera del sándwich y colocar la guía de inyección color amarillo (8c). Con una micropipeta de 100 μL añadir 15 μL de cada muestra en cada carril que indica la guía de inyección (8d).



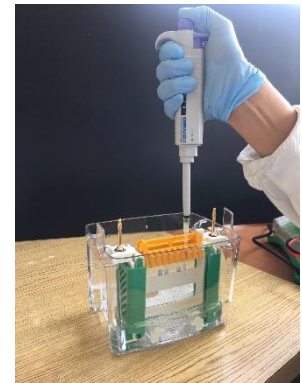
8a



8b



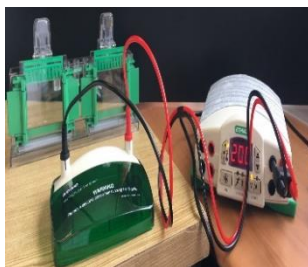
8c



8d

Figura 8. Armado del módulo de electroforesis e inyección de muestras

La tapa se conecta a la fuente de poder con un voltaje de 200 V (9a). Se coloca la tapa en la cubeta verificar que las bananas coincidan en color correspondiente (9b). En la fuente de poder presionar RUN, en la parte inferior de la cubeta se observan burbujas (9c) si se llenó bien, si el amortiguador tiene el pH y la concentración requerida (inciso 2). Se deja correr las muestras hasta que el colorante se encuentre en la parte inferior de los vidrios (pequeñas líneas azules, 9d).



9a



9b



9c



9d

Figura 9. Armado del sistema Tetra cell

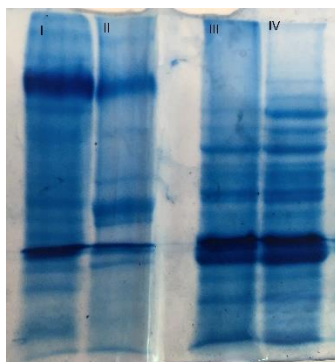
Al terminar la corrida se quita la tapa para poder sacar los geles, estos se colocan en un recipiente para añadirles la solución teñidora (inciso 2, 10a), se quedan en esa solución durante 24 h. Posteriormente, se decantará la solución teñidora para añadir la solución

desteñidora (inciso 2). Ésta se cambiará por solución nueva hasta que los geles no presenten color azul y sólo estén teñidas las bandas de proteína (10b y 10c).

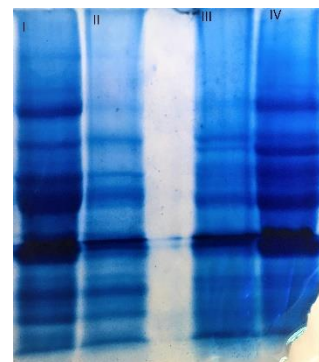
Como se observa en las figuras 10b y 10c, la cantidad de bandas de proteína cambia dependiendo de la legumbre que se trate lenteja, garbanzo, haba o frijol. Asimismo, se observa que según el tratamiento realizado hay más o menos bandas, los carriles I y IV de la figura 10b son de legumbres crudas y tienen mayor número de bandas comparado con los carriles II y III que son legumbres cocidas, donde ya hubo desnaturalización de las proteínas por tanto se observan menor cantidad de bandas.



10a



10b



10c

Figura 10. Teñido de geles

10a. Geles en solución teñidora

10b. Carril I: harina de frijol crudo Carril II: harina de frijol cocido Carril III: harina de garbanzo cocido Carril IV: harina de garbanzo crudo

10c. Carril I: harina de lenteja cruda Carril II: harina de lenteja cocida Carril III: harina de haba cocida Carril IV: harina de haba cruda

El amortiguador de corrida puede ser utilizado 3 veces, posteriormente, se debe desechar. La solución teñidora no tiene límite en el número de veces que puede ser usada.

Finalmente, revisar el siguiente enlace [Mini-PROTEAN Tetra Cell - Bio-Rad Laboratories](https://www.bio-rad.com/web/web-content/quick-reference-manuals/Mini-PROTEAN-Tetra-Cell-Quick-Reference-Manual.pdf).

6. Limpieza de equipo

El equipo se lava con una esponja sin detergente y se enjuaga con agua destilada. Se recomienda secar con algún trapo que no deje pelusa.

7. Desechos

Todos los residuos químicos generados tanto en la preparación de las disoluciones empleadas como en la limpieza del equipo, así como de los geles de poliacrilamida se deben disponer conforme a la normativa dispuesta en la dirección <https://www.icat.unam.mx/secciones/direc/sub4/residuos.html> del ICAT.

Bibliografía

Amorós, M.L.L. 2000. Estudios de compuestos fenólicos en legumbres. Influencia de la variedad y del proceso de germinación. *Tesis Doctoral* Universidad Autónoma de Madrid.

Buckeridge, M.S., y Reid, J.S.G. 1994. Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta*, 192(4), 502–511.

Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., Scarafoni, A., 2008. The major proteins of lupin seed: characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 19 (12), 624–633.

González-Torres, L., Téllez-Valencia, A., Sampedro, J., Nájera, H. 2007. Las Proteínas en la Nutrición. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. 8(2)

Laemmli, U. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Pérez-Chabela, M.L, Soriano-Santos, J., Ponce-Alquicira, E., Díaz-Tenorio, M.L. 2015. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *NACAMEH* 9 (2), 77-96.

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.F.; Gaymard, F.; Cellier, F. 2009. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J*. 57, 400–412.

Scarafoni, A., Kumar, J., Magni, C., Sironi, E., Duranti, M. 2005. Biologically active molecules and nutraceutical properties of legume seeds.

Vasudevan, D., Clark, N.K., Sam, J., Cotham, V.C., Ueberheide, B., Marr, M.T., Ryoo, H.D. 2017. The GCN2-ATF4 Signaling Pathway Induces 4E-BP to Bias Translation and Boost Antimicrobial Peptide Synthesis in Response to Bacterial Infection. *Cell Reports*. 21(8), 2039--2047.

Wu, H. 1995. Studies on Denaturation of Proteins XIII. A Theory of Denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 46, 6-26.

Zorica Nikolic, Vuk Dorpevic, Aleksandra Torbica, Aleksandar Mikic. 2012. Legumes seed storage proteins characterization by SDS-PAGE and Lab-on-a-Chip. Electrophoresis. *Journal of Food Composition and Analysis* 28,75–80