

M
M
M



**DISEÑO DE INSTRUMENTAL CIENTIFICO
DESTINADO A LA CARACTERIZACION Y
ESTRUCTURA DE NUCLEO-PROTEINAS Y
POLIMEROS EN GENERAL.**

Tesis Doctoral JOAQUIN LLOVERAS MACIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
Biblioteca



1400069100

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES - BARCELONA





UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Diseño de instrumental científico destinado a la caracterización y estructura de nucleo-proteínas y polímeros en general

Joaquín Lloveras Maciá

ADVERTIMENT La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del repositori institucional UPCCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) i el repositori cooperatiu TDX (<http://www.tdx.cat/>) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual **únicament per a usos privats** emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei UPCCommons o TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a UPCCommons (*framing*). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del repositorio institucional UPCCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) y el repositorio cooperativo TDR (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=es>) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual **únicamente para usos privados enmarcados** en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio UPCCommons. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a UPCCommons (*framing*). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the institutional repository UPCCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) and the cooperative repository TDX (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=en>) has been authorized by the titular of the intellectual property rights **only for private uses** placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading nor availability from a site foreign to the UPCCommons service. Introducing its content in a window or frame foreign to the UPCCommons service is not authorized (*framing*). These rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ETSIIB

Tesis doctoral
Primera parte

Joaquín Lloveras Maciá

1400069100



DISEÑO DE INSTRUMENTAL CIENTIFICO DESTINADO A LA CARACTERIZACION

Y ESTRUCTURA DE NUCLEO-PROTEINAS Y POLIMEROS EN GENERAL.

PRIMERA PARTE: DISEÑO DE APARATOS PARA MICRO Y MACRO ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

SEGUNDA PARTE: DISEÑO DE UNA CAMARA DESTINADA AL ESTUDIO DE LA DIFRACCION DE RAYOS X EN LAS ZONAS DE BAJO ANGULO DE DIFRACCION.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ingenieria (Pl. 57) por la ETSIIB, por Joaquin Lloveras Maciá, bajo la dirección de L. Puigjaner Corbella, Dr. Ingeniero Industrial, profesor adjunto de la Cátedra de Tecnologías Químicas Especiales.

Barcelona, Noviembre 1973

Este trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Tecnologías Químicas Especiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona (U.P.B.).

Quiero agradecer al Dr. Luis Puigjaner Corbella, profesor adjunto de la Cátedra de Tecnología Química Especial de la ETSIB y colaborador científico del C.S.I.C., por la dirección y corrección de esta Tesis, por su interés, consejo, ayuda y estímulo, en todo momento.

Quiero agradecer también al Dr. J. Antonio Subirana Torrent, catedrático de Tecnología Química Especial de la ETSIB y Director del Departamento de Química Macromolecular, por su consejo y estímulo así como por la corrección de la primera parte de esta Tesis.

Agradezco al Dr. C. Mezquita, a la Sra. R. Llois y a la Srta. N. Corrales por su amistad, ayuda, y consejo en los experimentos de electroforesis.

A los Sres. L. Otzet, Srta. Jenny Colom, Sra. N. Tur, Sr. F. Suau, Sr. L. Cornudella, Sr. J. Roca, Sr. F. Recasens y demás colaboradores del Laboratorio por su amistad y camaradería, así como a los Sres. R. Martín, Sr. J. Subirats y Sr. J. Aigé por su ayuda en la realización de los trabajos de fotografía de esta tesis.

Asimismo agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la ayuda recibida como beneficiario de una beca para formación de personal investigador durante el curso académico 1972-1973.

Agradezco especialmente a mi esposa E^a Elena, su paciencia y ánimo constante, y por la realización material de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

		<u>PAG.</u>
I	<u>INTRODUCCION Y OBJETIVO DEL TRABAJO.</u>	1
II	<u>PRIMERA PARTE: DISEÑO DE APARATOS PARA MICRO Y MACRO ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.</u>	
II-1	<u>INTRODUCCION</u>	
II-1-1	PRINCIPIOS DE LA ELECTROFORESIS.	
II-1-11	<u>Definición y tipos de electroforesis.</u>	5
II-1-12	<u>Movilidad electroforética. Efectos.</u>	6
II-1-2	PROCESOS DURANTE LA ELECTROFORESIS.	13
II-1-3	VARIABLES DE LA ELECTROFORESIS.	16
II-1-4	GELES POLIACRILAMIDA. NATURALEZA. EFECTOS.	19
II-2	<u>MICROELECTROFORESIS.</u>	
II-2-1	INTRODUCCION. SOLUCIONES ACTUALES.	25
II-2-2	EFECTOS FISICOS RESULTANTES DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE ACRILAMIDA. ADOPCION DEL METODO APROPIADO.	31
II-2-3	DESCRIPCION DE LOS APARATOS EMPLEADOS Y ACCESORIOS.	33
II-2-31	<u>Capilar.</u>	33
II-2-32	<u>Diseño del aparato de electroforesis. Cubeta Superior y Cubeta Inferior.</u>	34

	<u>PAG.</u>
II-2-33 <u>Electrodos.</u>	37
II-2-34 <u>Copa de Montaje.</u>	38
II-2-35 <u>Cubeta de tinción y de destinción.</u>	42
II-2-36 <u>Sonorte para fotografía.</u>	42
II-2-37 <u>Base metálica ranurada.</u>	43
II-2-38 <u>Otros accesorios.</u>	44
II-2-4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA GELES DE BAJA CONCENTRACION EN ACRILAMIDA.	
II-2-41 <u>Introducción. Método empleado.</u>	52
II-2-42 <u>Solución Tampón.</u>	53
II-2-43 <u>Composición del gel.</u>	54
II-2-44 <u>Preparación de los capilares.</u>	55
II-2-45 <u>Llenado de capilares.</u>	57
II-2-46 <u>Preparación de muestras.</u>	59
II-2-47 <u>Equilibrado.</u>	61
II-2-48 <u>Colocación de las muestras.</u>	62
II-2-49 <u>Electroforésis.</u>	63
II-2-410 <u>Extracción del gel.</u>	64
II-2-411 <u>Tinción.</u>	65
II-2-412 <u>Destinción.</u>	67
II-2-413 <u>Fotografiado.</u>	68
II-2-414 <u>Trazado de las curvas de densidad óptica.</u>	68
II-2-415 <u>Resultados.</u>	69
II-2-5 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA GELES DE MEDIA Y ALTA CONCENTRACION DE ACRILAMIDA.	
II-2-51 <u>Introducción. Métodos.</u>	71
II-2-52 <u>Desarrollo de la técnica de microelectrofore- sis, para concentración media de Acrilamida, según el método de Chalkley.</u>	72
II-2-52-a <u>Composición del gel y soluciones tampón.</u>	72

	<u>Pág.</u>
II-2-52-b Preparación y llenado de capilares.	73
II-2-52-c Preparación y colocación de las muestras.	74
II-2-52-d Equilibrado y electroforesis.	74
II-2-52-e Extracción, Tinción y Destinción.	75
II-2-52-f Fotografiado. Resultados.	75
II-2-53 <u>Desarrollo de la técnica de microelectroforesis para alta concentración de acrilamida. Según el método de Gunther Bretzel.</u>	
II-2-53-a Composición del gel y soluciones tampón.	79
II-2-53-b Diferencias respecto el procedimiento anterior.	80
II-2-53-c Resultados.	80
II-2-6 <u>MICROELECTROFORESIS EN CAPILAR DE 0,4 m/m. DE DIAMETRO INTERIOR.</u>	
II-2-61 <u>Introducción. Métodos. Acoplamiento al aparato de electroforesis.</u>	82
II-2-62 <u>Modificación del Método. Accesorios.</u>	83
II-2-63 <u>Preparación y llenado de capilares.</u>	85
II-2-64 <u>Equilibrado. Colocación de las muestras.</u>	85
II-2-65 <u>Electroforesis. Extracción del gel.</u>	88
II-2-66 <u>Tinción y Destinción.</u>	88
II-2-67 <u>Resultados.</u>	89
II-3 <u>ELECTROFORESIS PREPARATIVA.</u>	
II-3-1 INTRODUCCION.	91
II-3-2 SEPARACION ELECTROFORETICA DE LOS COMPONENTES.	
APARATO USADO.	93
II-3-21 <u>Llenado. Colocación del ranurador. Gelificación.</u>	94
II-3-22 <u>Equilibrado. Colocación de la muestra. Electroforesis.</u>	94

II-3-3 RECUPERACION DE LOS COMPONENTES.

II-3-31	<u>Método de extracción por elución.</u>	97
II-3-32	<u>Método de doble electroforesis.</u>	100
II-3-33	<u>Comprobación de los Resultados, según el método de doble electroforesis. Electroforesis analítica.</u>	103

III SEGUNDA PARTE: DISEÑO DE UNA CÁMARA DESTINADA AL ESTUDIO DE LA DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN LAS ZONAS DE BAJO ANGULO DE DIFRACCIÓN.

III-1 INTRODUCCION.

III-1-1	GENERALIDADES	107
III-1-2	MOTIVACION DEL PRESENTE ESTUDIO	111
III-1-3	CARACTERISTICAS GENERALES DEL SISTEMA DE DIFRACCIÓN EN BAJO ANGULO (DBA).	114
III-1-4	TEORIA DE DIFRACCIÓN EN BAJO ANGULO.	
III-1-41	<u>Introducción.</u>	118
III-1-42	<u>Difusión por un electrón libre, por un átomo de hidrógeno y por un átomo de varios electrones.</u>	120
III-1-43	<u>Formulas de Laue y Bragg. La esfera de la reflexión.</u>	125
III-1-44	<u>Factor de estructura de un plano reticular.</u>	130
III-1-45	<u>Intensidad de radiación difractada por un cristal muy pequeño. Poder reflector de un cristal.</u>	135

III-1-46	<u>Generalidades sobre la determinación de la estructura de un cristal a partir de su espectro de difracción.</u>	139
III-1-47	<u>Diagramas de polvo cristalino. Diagramas de difracción de cristales únicos: Método del cristal giratorio.</u>	141
III-1-48	<u>Difracción por fibras. Difracción por moléculas helicoidales.</u>	146
III-2	<u>TECNICAS EXPERIMENTALES EN BAJO ANGULO.</u>	
III-2-1	TIPOS DE OPTICA DE RAYOS X, CARACTERISTICAS. SISTEMAS DE RECOLECCION DE RAYOS. ELECCION DEL TIPO DE CAMARA.	151
III-2-2	DESCRIPCION DEL SISTEMA MONOCROMADOR.	
III-2-21	<u>Principio del Monocromador. Tipos.</u>	161
III-2-22	<u>Estudio óptico-geométrico.</u>	162
III-3	<u>DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UNA CAMARA PARA EL ESTUDIO DBA</u>	
III-3-1	DESCRIPCION GENERAL DE LOS ELEMENTOS INTEGRANTES DE LA CAMARA.	165
III-3-2	DISEÑO DE LOS ELEMENTOS COMPONENTES.	
III-3-21	<u>Pie del Monocromador.</u>	168
III-3-22	<u>Módulo común de deslizamiento sobre la guía.</u>	170
III-3-23	<u>Soporte para la muestra.</u>	171
III-3-24	<u>Tubo de hidrógeno.</u>	172
III-3-25	<u>Soporte para la placa fotográfica.</u>	173
III-3-26	<u>Microscopio posicionador.</u>	175

III-4	<u>ENSAYO DE LA CAMARA. ALINEACION.</u>	
III-4-1	CONSIDERACIONES GENERALES.	179
III-4-2	ALINEACION DE LA CAMARA.	
III-4-21	<u>Prealineación.</u>	183
III-4-22	<u>Alineación del Monocromador.</u>	188
III-4-23	<u>Alineación del Monocromador y del resto de componentes de la cámara.</u>	197
III-5	TECNICA FOTOCRAFICA. OPTIMIZACION DE RESULTADOS.	200
IV	<u>BIBLIOGRAFIA: LISTA DE FIRMAS.</u>	
	<u>LISTA DE PLANOS.</u>	207

I INTRODUCCION Y OBJETIVO

DEL TRABAJO

I INTRODUCCION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

B A J O.

El presente trabajo expone el diseño de aparatos y la consecución de técnicas en dos líneas de investigación distintas pero complementarias: electroforesis y estudios de difracción de Rayos X. La electroforesis es un procedimiento analítico de determinación de composiciones. En cuanto al estudio de la difracción de rayos X, permite hallar la configuración estructural de la muestra en estudio a nivel atómico y molecular.

Cada técnica tiene aplicaciones en diversos campos. Así actualmente la electroforesis se aplica en la industria química de la alimentación, en química clínica, en análisis forenses, en toxicología, en farmacología, en inmunología, en microbiología, en biología molecular, etc, para citar los más importantes. El método de difracción de rayos X tiene también una importante aplicación en la industria como por ejemplo en las industrias de cemento, plásticos, textiles y en ingeniería biomédica. Las industrias en constante auge, están en continua búsqueda de nuevos métodos y técnicas de investigación. Al mismo tiempo la técnica de Rayos X ofrece una solución rápida y ventajosa en control de fabricación.

Este trabajo expone nuevos métodos técnicos en electroforesis, utilizando geles continuos de poliacrilamida, y se diseña una cámara para el estudio de la difracción de rayos X en zonas de bajo ángulo.

Concretamente, en electroforesis, se desarrolla la técnica de microelectroforesis (II-2), en tubos capilares de 1,2 y 0,4 mm. de diámetro interior que permitirán el análisis electroforético de muy pequeñas cantidades de muestra, y la técnica macroelectroforé

tica de separación y posterior recuperación por electroforesis de componentes de una muestra, conociéndose esta última con el nombre de electroforesis preparativa (II-3).

El estudio de la difracción de rayos X, permite hallar la estructura tridimensional de la muestra, siendo apropiado el estudio de las zonas de bajo ángulo para estructuras de carácter repetitivo con espaciados relativamente grandes, como son los que se encuentran en las fibras naturales y sintéticas de elevado peso molecular.

Las muestras que se han utilizado son básicamente nucleoproteínas, siguiendo la línea de investigación actual que lleva el Laboratorio de Investigación básica y aplicada de la Cátedra de Tecnologías Químicas Especiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona (U. P. B.).

II PRIMERA PARTE



DISEÑO DE APARATOS PARA MICRO Y
MACRO ELECTROFORESIS EN GELES
DE POLIACRILAMIDA.

DISEÑO DE APARATOS PARA MICRO Y MACRO

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRI-

LAMIDA.

II-1 INTRODUCCIÓN

II-1-1 PRINCIPIOS DE LA ELECTROFORESIS.

II-1-1-1 Definición y tipos de electroforesis.

La electroforesis es un proceso de separación por campo eléctrico de moléculas cargadas en un medio generalmente viscoso (líquido o gel). Las muestras pueden correr en un medio líquido con gran libertad de movimiento de las cargas o bien a través de un medio sólido.

En el primer caso se denomina electroforesis libre y en el segundo - sobre soporte.

En cuanto a la electroforesis sobre soporte; existen diversos tipos de soporte; soporte sólido; empleándose principalmente papel y acetato de celulosa. Y en soporte de gel existiendo los de almidón y poli-acrilamida.

Según sean las aplicaciones del procedimiento puede tener ventajas los de un tipo sobre otro. En muchos casos los geles de poli-acrilamida substituyen ventajosamente a otros tipos de soporte. En éstos con menores cantidades de muestra tienen menor resolución pues apenas existen efecto de adsorción (II-1-3), ni presentan electroósmosis.

Existen dos modalidades en los geles poli-acrilamida; los geles de composición continua y los de composición discontinua (Disc. Electro-phoresis: II-1-4).

Otro tipo de electroforesis, llamada de punto isoeléctrico, en el que la separación de los componentes de la muestra se obtiene por la diferencia de carga neta que adquieren en un medio con gradiente de PH. - Deteniéndose en su migración en el punto en que su carga neta es nula.

Este trabajo se ciñe a la electroforesis en geles de poliacrilamida - de composición constante o uniforme.

II-1-12 Movilidad electroforética. Efectos

La movilidad electroforética m de una partícula se define como el cociente entre la distancia de migración (d) respecto al tiempo t y el campo eléctrico E

$$m = \frac{d}{t E}$$

La fuerza que obliga a emigrar la partícula con velocidad constante es igual a la resistencia de fricción del medio f, que la partícula debe vencer. $QE = f$ (1)

Q: Carga eléctrica de la partícula

E: Campo eléctrico

En solución libre la resistencia de fricción f obedece a la ley de Stokes

$$f = 6\pi r v \eta$$

r : radio de la partícula

v : velocidad

η : viscosidad del medio.

Llamando a $\frac{d}{t}$ la velocidad (v) con que se mueve la partícula:

$$m = \frac{v}{E}$$

junto con la ecuación (1): queda

$$m = \frac{V Q}{f}$$

En la electroforesis sobre soporte; particularmente sobre gel, la resistencia de fricción es una función compleja indeterminada, de la densidad del gel y del tamaño de las partículas entre otros factores. Bajo condiciones idénticas de composición de gel, tiempo de recorrido y campo eléctrico; pueden compararse directamente las distancias de migración.

El campo eléctrico E corresponde a la relación de densidad de corriente J ($A \text{ cm}^2$) y la conductividad específica κ ($\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$$E = \frac{J}{\kappa} \quad \frac{\text{Volts}}{\text{cm}}$$

$$\text{La velocidad de la partícula } v = E m = \frac{m J}{\kappa} \quad \left[\frac{\text{cm}}{\text{seg.}} \right]$$

La carga neta de la partícula depende del PH del tampón en que se encuentre; el cual lo determina el grado de disociación del ácido débil, de la base o del compuesto anfótero. Esta carga es la que se verá atraída por el potencial eléctrico creado en los electrodos y es por tanto el PH del tampón una variable de la movilidad electroforética.

La fuerza iónica determina el potencial electrocinético, el cual reduce la carga neta de la partícula a la carga efectiva. En aproximación

la movilidad es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la fuerza iónica.

La fuerza iónica μ es
$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$
 siendo c_i concentración molar de las especies iónicas simples z_i carga (valencia) de las especies iónicas i en una solución conteniendo n iones.

Bajas fuerzas iónicas de las soluciones tampón dan paso a altas velocidades de migración con pequeño desprendimiento de calor. En caso contrario, fuerzas iónicas altas producen velocidades bajas de migración, gran paso de corriente y generación alta de calor.

La movilidad de los iones crea dos efectos:

(A) El efecto electroforético y (B) El efecto de relajación

(A) El efecto electroforético, el cual explica que la movilidad real de la partícula es menor que la que teóricamente tendría debido a que en la zona inmediata a la partícula cargada que avanza, viajan en dirección contraria iones (contraiones) que van hacia el electrodo opuesto, produciendo una fricción física que actúa de freno a la movilidad que tendrían por sí mismas las partículas.

(B) El efecto de relajación; Si tenemos partículas cargadas junto con la atmósfera iónica que lo acompaña, (Ver Fig. 1) y sometemos este conjunto al potencial de campo eléctrico entre electrodos; cada partícula con su atmósfera iónica tenderán a colocarse, como muestra la fig. 2, en forma de dipolo. Creando este dipolo un pequeño campo eléctrico que se opone al campo eléctrico a que sometemos las partículas.

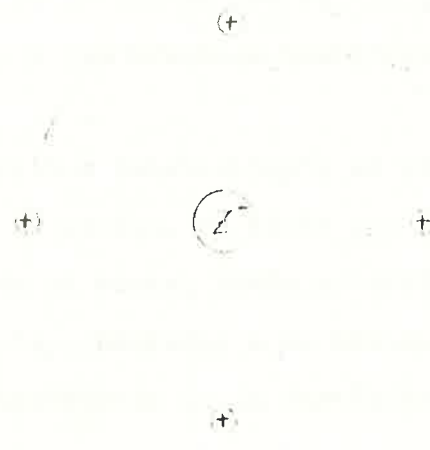


Fig. 1 Atmósfera iónica que acompaña a la partícula.

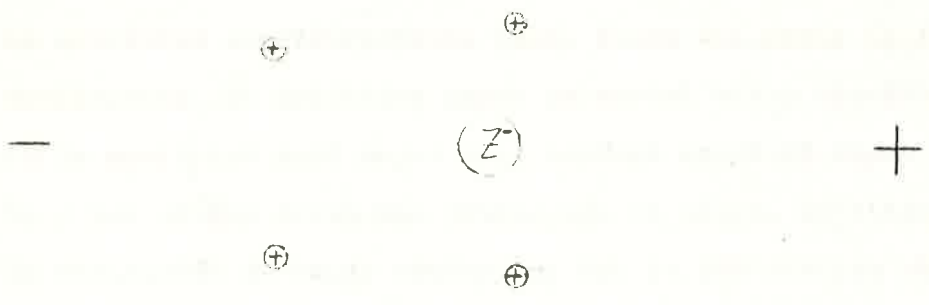


Fig. 2 Dipolo formado entre la partícula y la atmósfera iónica.

las en la electroforesis, y el campo eléctrico resultante es menor (relajación).

En el estudio de la movilidad iónica hay otros factores que se suman a los ya indicados, y que producen distorsiones en esta movilidad.

Efecto de los "ovillos penetrables"; en el caso de que la partícula macromolecular sea un ovillo, es decir una larga cadena molecular parcialmente enroscada en si misma, puede existir un flujo iónico por el interior de este ovillo, contrario a su movimiento, friccionando a éste y haciendo que el movimiento de la partícula sea más lento.

Otro efecto es el de la conductividad superficial; pueden circular los iones H^+ (Ver fig. 3) a través de los grupos negativos de la molécula, influyendo así sobre la movilidad de la molécula.

Asociación de iones. Es probable que estos iones asociados (Ver fig. 4) se muevan con la macromolécula. No actuando bajo campo eléctrico a efectos de movilidad, pero si al hacer una valoración con ácido o base, - siendo pues la carga electroforética distinta a la carga de valoración.

La movilidad electroforética pues, tiene una serie de factores que la condicionan. Si aplicamos mayor potencial entre electrodos evidentemente la movilidad será mayor pero también existirá mayor paso de corriente y por efecto Joule más producción de calor. Existiendo un límite para la disipación de calor producido; uno de los mayores problemas de cada método electroforético. Y por lo tanto un límite a la rapidez del método.

El calor H generado por la corriente I por unidad de tiempo es:

$$H = \frac{R I^2}{A} = \frac{V I}{A} = \frac{V^2}{R A} \quad \text{watts}$$

R: Resistencia eléctrica

V: Voltaje

A: Equivalente mecánico del calor $4,185 \times 10^7$ Erg / cal.

La movilidad iónica y la Libre difusión crecen al aumentar la temperatura, junto con el decrecimiento de la viscosidad del medio.

La movilidad crece aproximadamente un 2,4 % por grado centigrado de incremento de temperatura.

El calor producido es mayor en el centro del gel que no en las paredes del mismo. Existirá en la zona central un mayor movimiento browniano de las moléculas del gel y podrán correr con mayor facilidad las partículas, dando un aspecto curvo a las bandas de las macromoléculas (Ver fig. 5).

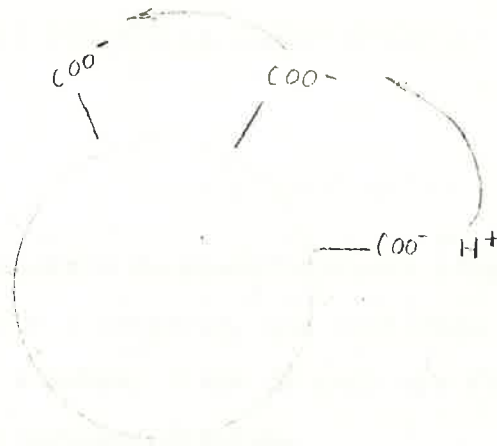


Fig. 3 Efecto de la Conductividad Superficial

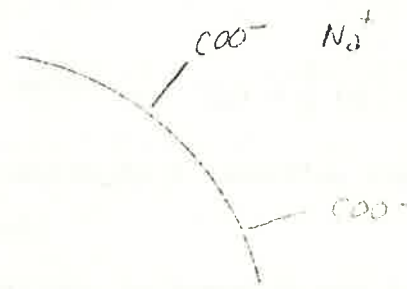


Fig. 4 Asociación iónica

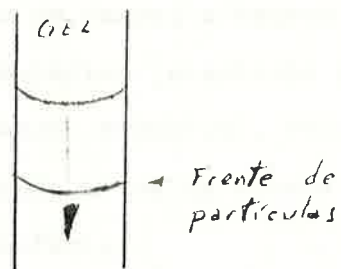
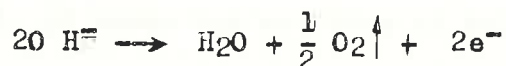


Fig. 5 Distorsión de las bandas en el gel debido al exceso de temperatura producido por un voltaje excesivo

II-1-2 PROCESOS DURANTE LA ELECTROFORESIS

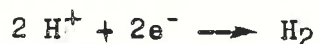
Supongamos un aparato de electroforesis (fig. 6), compuesto por dos cubetas: superior e inferior, que contienen soluciones tampón. Un tubo que conecta a ambas, lleno de gel; una fuente de alimentación y los electrodos correspondientes.

El tampón de las cubetas está iónizado: A^- ; H^+ , generalmente colocamos el mismo tampón en ambas cubetas. En el electrodo positivo hay la siguiente reacción:



La concentración relativa de H^+ aumenta, con lo cual el valor de PH disminuye (más ácido).

En el electrodo negativo, la reacción que tiene lugar es:



Disminuyendo por tanto la concentración de H^+ y aumentando el valor de PH .

Se registra un flujo de cargas a través del gel: el radical A^- es atraído hacia la cubeta superior (electrodo positivo) y los H^+ hacia la cubeta inferior (electrodo negativo), resultando por tanto un aumento de la concentración tampón A^- en la cubeta superior y una disminución del mismo en la cubeta inferior.

Los H_2 que desaparecen en el electrodo negativo son la suma de los H^+ que llegan y de los radicales A^- que se van. Al disminuir la concentración de H^+ tiene por efecto el que aumente el PH ; volviéndose más básico.

El tampón en que se disuelve la muestra es la quinta o décima parte de la concentración del tampón de la cubeta.

Al ser diluida la concentración del tampón de la muestra su conductividad eléctrica es menor; esta resistencia al paso de la corriente, crea una elevada diferencia de potencial.

Al empezar la electroforesis, una vez colocada la muestra disuelta en su tampón, encima del gel. El elevado potencial que se forma en la interfase de la muestra tiene como objeto hacer que todas las partículas cargadas que constituyen la muestra se coloquen rápidamente en el borde superior del gel y empiecen a correr en el gel - prácticamente al mismo tiempo. Lo que redundará en la nitidez de las bandas (Ver II-1-2). Al pasar las muestras al gel, se encuentran - que tiene la concentración iónica inicial, lo que contribuye a hacer menor la marcha.

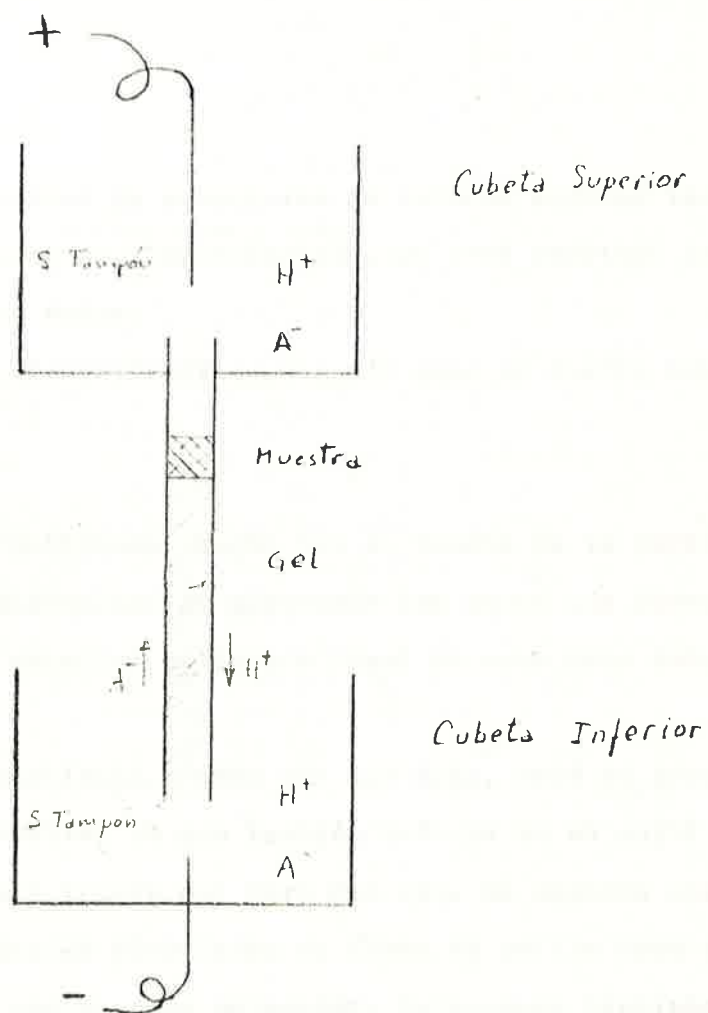


Fig. 6 Aparato simplificado de electroforesis

II-1-3 VARIABLES DE LA ELECTROFORESIS

De las propiedades ya enumeradas se deducen algunas variables que tiene el proceso de electroforesis. En este apartado se exponen más detalladamente éstas.

La migración electroforética depende pues de cierto número de parámetros:

Tamaño de la partícula. Según sea el tamaño de la partícula tendrá más o menos dificultad en atravesar los poros que forma la red del gel. Incluso existirá un tamaño ideal de poro para cada partícula.

Forma de la partícula. Puede ser que ésta, esté en forma globular o en forma de ovillo, lo que también influye en su mayor o menor facilidad de paso a través del poro del gel. En algunos casos se desnaturalizan partículas globulares en forma de ovillo para mejor relacionar la carga con su peso molecular. Influyendo distintamente la forma en la movilidad electroforética.

Carga eléctrica de la partícula. Si la partícula está más cargada, tendrá más movilidad electroforética.

Tampón (PH). Según sea el PH, se hace patente la carga de la partícula, influyendo en la movilidad. La concentración del tampón también influye en la movilidad pudiendo crear rozamiento en su movimiento (contraiones). La concentración también influye en la conducción de la corriente creando gradiente mayor o menor de potencial e influyendo como consecuencia en la producción de calor.

Composición del gel. La composición del gel tiene como consecuencia el tamaño del poro (Ver II-1-4) y éste deja pasar con mayor o menor facilidad a las partículas dejando que corran con mayor o menor rapidez.

Temperatura. Una mayor temperatura hace que sea mayor el movimiento browniano de las moléculas del gel dejando pasar con más facilidad a las partículas.

Dimensiones del gel. Si la sección del gel por la que atraviesan las partículas, es mayor, influirá en mayor transporte de corriente y mayor movilidad de las partículas.

Voltajes. Es evidente que mayores voltajes producirán mayores movilidades.

Intensidad. La cantidad de electricidad que pase es también proporcional a la movilidad. Hay que contar que una de los límites de la electroforesis es la disipación de calor por efecto Joule, existiendo por tanto límite de paso de intensidad

Tiempo de electroforesis. A más tiempo de proceso electroforético máyor movilidad de las partículas.

Los parámetros de voltajes, intensidad y tiempo están ligados. Así con menos voltaje y más tiempo de recorrido electroforético existe mayor difusión superponiéndose las bandas. En caso contrario; con voltajes altos y tiempo corto, hay más paso de corriente, desprendimiento de calor y las bandas se curvan y superponen. Hay que buscar una solución de compromiso entre estas tres variables, para conseguir mejor resultado.

Existen además otros factores en la electroforesis con soporte que -
influyen la movilidad y la forma de separación de las bandas, es-
tas son:

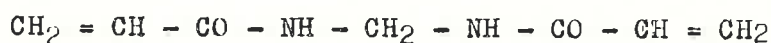
Adsorción. Existe sobre todo en los geles de Almidón con la afinidad
química de los grupos ácidos. En los geles de poliacrilamida, este -
efecto es prácticamente despreciable, pues no tiene grupos ionizados.

Inhomogeneidad. La inhomogeneidad del gel puede provocar diferencias
en el paso de corriente produciendo bandas distorsionadas en el avan-
ce de las partículas.

II-1-4 GELES POLIACRILAMIDA. NATURALEZA. EFECTOS.

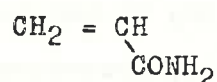
El gel de poliacrilamida es la polimerización y entrecruzamiento del monomero acrilamida: $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$

y del cromonómero, usualmente bisacrilamida (N, N - metilen - bis - acrilamida):



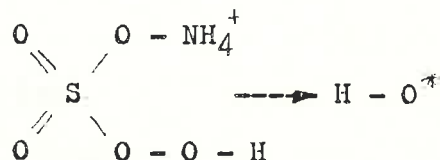
Formando una red tridimensional.

La poliacrilamida es un polímero de tipo vinílico



La polimerización se hace mediante un iniciador que engendra radicales libres del tipo peróxido.

El persulfato amónico:



Da espontánea y continuamente un radical libre con electrón solitario que se agrega al $\text{CH}_2 = \overset{*}{\text{CHR}}$ quedando $\text{HOCH}_2 - \overset{*}{\text{CHR}}$

que junto con otro $\text{CH}_2 \text{ CHR}$:



continuandose de esta forma la reacción; $\text{HO} (\text{CH}_2 \text{ CHR})_n \text{CH}_2 \overset{*}{\text{CHR}}$

Hasta que se encuentra otro grupo $\text{HO} (\text{CH}_2 \text{ CHR})^*_m$

reaccionando: $\text{HO} (\text{CH}_2 \text{ CHR})_n \text{CH}_2 \overset{*}{\text{CHR}} - \text{HO} (\text{CH}_2 \text{ CHR})^*_m \longrightarrow$



Estas reacciones de polimerización son exotérmicas.

El Temed (N, N, N, N, - tetrametitetilendiamida) se usa para acelerar el proceso de Polimerización.

Interesa dar una cierta estabilidad, rigidez, tamaño de poro, etc y esto se consigue añadiendo bisacrilamida a la cadena acrilamida. La cadena de bisacrilamida establece malla tridimensional con la acrilamida. Produce enlaces transversales. (Fig. nº 7)

Se define como densidad de gel (T) al porcentaje total de la concentración de ambos monómeros relativos al volumen total de la disolución tampón:

$$T = \frac{a - b}{m} \cdot 100 (\%)$$

a: acrilamida (gr)

b: bisacrilamida (gr)

m: volumen del tampón (ml)

Asimismo se define la concentración de gel C' como: el porcentaje de la concentración de la cadena transversal (bisacrilamida) respecto a la concentración total:

$$C = \frac{b}{a - b} \cdot 100 (\%)$$

Según los experimentos de Ott (1); la relación de pesos entre acrilamida y bisacrilamida (Bis) son críticos: Si la razón es menor de 10 los geles son rígidos y opacos. Si superan el valor 100 los geles son pastosos y fácilmente rompibles. Los geles elásticos y transpa-

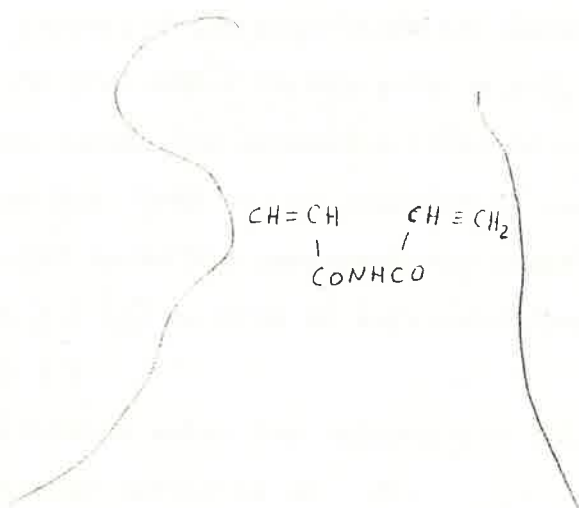


Fig. 7 Enlace Transversal de la Bisacrilamida

Punto de
entrecruzamiento



Fig. 8 Forma de la molécula de acrilamida (4-15%) Acrilamida

rentes se obtienen alrededor del valor 30 entre la relación de pesos de acrilamida respecto de la bisacrilamida. Debiendo ser la acrilamida mayor que el 3%.

Davis (2) investigó los intervalos de concentración de acrilamida - entre el 1,5% y el 60% y de Bis entre 0 y 0,625%. Halló que no hay gelificación cuando las concentraciones de acrilamida era menor que 2% y 0,5% de Bis. Notó que al aumentar la concentración de acrilamida debía bajar la de Bis para producir geles elásticos.

Richards et al. (3) propuso el siguiente compromiso:

$$C = 6,5 - 0,3 T$$

Formula utilizable entre los valores 5 - 20%. Siendo C un valor no crítico pudiendo variar en un 1%.

La variable más importante en la naturaleza del gel es el tamaño - de poros. Lo determina la concentración de acrilamida. También influye la bisacrilamida pero de forma secundaria.

Una molécula de acrilamida (Fig. nº 8), tiene movimiento browniano. Las partículas han de abrirse paso a través de estas moléculas.

Si hay mucha bisacrilamida, los poros son más estables y rígidos. Existiendo mayor dificultad de la partícula en avanzar.

Ornstein (4) en su investigación, dá para un gel del 7,5% en acrilamida un tamaño promedio de poro de unos 50 A y para un gel del 30% un diámetro de alrededor 20 A.

El tamaño del poro del gel produce el llamado efecto del tamiz molecular, es decir; la malla tridimensional de las moléculas que forman el gel actúa como criba para cierto tamaño de moléculas. La calidad del poro influye en la movilidad de las partículas pues produce rozamiento en éstas. Rozamientos que lógicamente son mayores cuanto mayor sean las partículas, dificultando su paso.

Así pues en la electroforesis sobre soporte de gel, si bien elimina los fenómenos de convección y difusión que aparecen en la electroforesis Libre, el gel participa activamente en el proceso de separación de las partículas interaccionando con éstas. Esta interacción depende del tamaño de las partículas ya que al pasar por el poro - del gel sufrirán mayor o menor fricción y por tanto variación en la movilidad.

Existe un tipo de electroforesis que utiliza un sistema de separación discontinuo (Disc. Electrophoresis). Una capa del gel de distinta concentración y por tanto de distinto tamaño de poro. Junto con tampones de diferentes PH, todo lo cual crea gradientes de PH y gradientes de voltaje (Ornstein y Davis (5)).

Principalmente se crea una banda de muestra muy estrecha (efecto de concentración) entre la primera capa de gel (gel de poro ancho) y la segunda capa, propiamente de carrera. Lo cual interesa para obtener buenas separaciones.

Las ventajas del sistema discontinuo sobre el continuo son de una mejor resolución en muestras muy diluidas y también en muestras cuya diversidad de tamaños moleculares necesitaría unas longitudes de gel excesivas.

Asimismo el riesgo de desnaturalización y degradación durante el proceso se reduce. (H. R. Maurer (6)).

Sin embargo no hay una ventaja clara entre este método sobre el otro. Existe mayor complicación en la preparación de tampones y geles en el método discontinuo que en el continuo.

Algunos investigadores rechazan los sistemas discontinuos, Raymond (7) y Hjerten et al. (8) ya que el efecto de concentración entre las dos primeras capas de gel, en el método discontinuo; También puede obtenerse en los sistemas continuos: (II-1-2).

Asimismo ciertas substancias solo son estables en determinado PH, en el caso de electroforesis discontinua hay gradiente de PH y puede tener consecuencias nocivas. Debiendo, en este caso, tener previo conocimiento de las influencias del cambio de PH sobre la muestra.

El sistema de electroforesis continua en la cual los geles tienen - composicion constante y los tampones PH constante (Raymond (7)), es el desarrollo en el presente trabajo.

II-2 MICROELECTROFORESIS

II-2-1 INTRODUCCION. SOLUCIONES ACTUALES

La electroforesis nace con la necesidad de analizar muestras en minimas cantidades, bien sea porque es difícil y costosa la obtención de cantidad o bien sea porque exista poca cantidad de muestra. Empleándose también en los casos en que existe cantidad sobrada desplazando a la electroforesis normal por su mayor rapidez de proceso y por su mayor definición.

Es pues un proceso de alta sensibilidad y detección de cantidades minimas. Ello es posible utilizando geles de pequeña sección, lo cual aumenta la resolución. Existe la posibilidad en la microelectroforesis de aplicar gradientes de tensión mayores, ya que el calor se evacúa del gel con mayor rapidez, mayores voltajes junto con menores - longitudes de recorrido hacen que los tiempos de recorrido sean menores.

Otra ventaja de la aminoración de la sección del gel es que se disminuye la difusión, debido a que en la tinción (II-2-411), la fijación de las muestras es más rápida.

Estas ventajas compensan la desventaja que representa la dificultad de manipulación y operación que tiene el reducir el tamaño de los aparatos y accesorios de la microelectroforesis.

La microelectroforesis, como la electroforesis normal tiene principalmente dos formas geométricas en la presentación de los geles. Es-

tas dos formas geométricas son: gelificación dentro del tubo de cristal cilíndrico, y gelificación en recinto rectangular. Denominándose respectivamente electroforesis en tubo y electroforesis en capa.

En la electroforesis normal que se usa en el Laboratorio, de Tecnología Química Especial, se utiliza electroforesis en tubo, con dos clases de tubos cuyas dimensiones son:

Tubo largo;

Longitud 200 mm.

Diámetro externo 7,5 mm.

Diámetro interno 5,5 mm.

Se llena de liquido de gel en una longitud aproximada de 160 mm.

El Volumen total de gel es de 3.800 microlitos (lambdas).

Volumen específico 238 microlitos / cm.

La cantidad de muestra óptima son 70 microgramos disueltos en 70 microlitos.

Tubo corto:

Longitud 100 mm.

Diámetro externo 8,4 mm.

Diámetro interno 6,7 mm.

Se llena de gel a una altura de unos 60 mm.

El volumen total de gel es de 2.112 lambdas.

El volumen específico 352 microlitos / cm.

La cantidad de muestra óptima son 50 microgramos disueltos en 50 microlitros.

En la electroforesis normal se entiende el tubo adoptado standard de 5 mm. de diámetro cuya sensibilidad mínima es de 30 a 50 microgramos de muestra.

En la microelectroforesis las cantidades que se detectan van del orden del microgramo al picogramo, hablándose en este último caso de ultramicroelectroforesis.

Los primeros trabajos en microelectroforesis aparecen en el año 1964 con Pun y Lombrozo (9), que construyó unas microceldillas de 1,8 x 1,0 x 70 mm., detectando cantidades del orden de 1 microgramo.

Grossbach (10), en 1965 dio un gran avance a esta técnica, utilizando tubos capilares de 0,45 mm. y 0,2 mm. de diámetro interior. Utilizó el método electroforético de Ornstein y Davis (5) y acopló estos capilares a un aparato de electroforesis normal. Detectando de esta manera cantidades de proteína del orden del nanogramo (10^{-9}).

Hydén et al. (11), en 1966 usaron capilares de 0,2 mm. de diámetro - para detectar entre 10^{-7} y 10^{-9} aplicando el método de Koenig y Bra ttgard (12). Sin embargo fue Neuhoff (13) que obtuvo óptimos resultados en este método. Usó capilares de 0,5 y 0,3 mm. de diámetro interior. Llegando también al orden de nanogramos.

Se consideran a Grossbach y Neuhoff como los pioneros de la microelectroforésis.

Matioli y Niewisch (14), desarrollaron un procedimiento para la separación de cantidades del orden del picogramo.

Otros autores han desarrollado técnicas de microelectroforésis usando determinados métodos. H. Gainer (15), usa capilar de 0,58 mm. y - detecta hasta 5×10^{-10} gr.

En la electroforesis en capa es importante el trabajo desarrollado - por H.R. Maurer y F.A. Dati (16), en 1972 en que utilizan una celdilla de medidas interiores 75 x 18 x 0,75 mm., como molde de gelifica

ción, practicando tres ranuras en éste para otras tantas muestras. Llegando a detectar cantidades de 1×10^{-7} gramos.

Existen ventajas y desventajas en la consecución de la microelectroforesis en capilar o en capa.

Los microgeles en capa pueden evaluarse mejor en fotografía y en densitometría cuantitativa. Sin embargo no se obtienen malos resultados en la evaluación de los microgeles de tubo capilar.

La utilización de dos piezas molde para la microcapa, hace que pueda ser extraída con más rapidez que no en el caso de extracción de los geles del capilar (II-2-37). Lo cual es una ventaja para fijar más rápidamente la muestra mediante tinción, evitando la difusión de esta en el gel a través del tiempo. El método referido, utilizando en este trabajo completa la extracción del último gel en unos veinte minutos a partir del fin del tiempo de recorrido electroforético. Sin que este tiempo influya apreciablemente en los resultados.

En las técnicas autoradiográficas (H.R. Maurer y F.A. Dati: 16), tiene ventaja el gel rectangular sobre el cilíndrico.

En el caso de microgeles cilíndricos requieren equipo relativamente más simples que los de capa. Presentando diversos problemas técnicos el método de la microcapa. Así pueden existir complicaciones en fugas si los dos moldes de la celdilla no están perfectamente ajustados. También pueden formarse burbujas de aire, si el líquido de gel no llena completamente todos los rincones. El grueso del ranurador - que formará los huecos para colocar las muestras y su extracción, es crítico. También existe mayor dificultad manual en la colocación de las muestras dentro de los huecos habilitados.

Una ventaja de los geles en capa es que tienen mejor posibilidad de comparación cuantitativa, las muestras estudiadas en una misma capa que no tendrían las estudiadas en distintos capilares, pues éstos - siempre tienen pequeñas diferencias entre sí. No afectando este razonamiento en la comparación cualitativa.

Otra ventaja de la microelectroforesis en capilar, por razones técnicas, es el único método de análisis de cantidades del orden de picogramos, llegándose solo al orden de nanogramos en el caso de microelectroforésis en capa.

Las pequeñas diferencias en cuanto a resultados de los dos procedimientos y teniendo en cuenta las necesidades de análisis cualitativo del L. T. Q. E.*, unido a una relativa mayor facilidad en la consecución de la miniaturización, han aconsejado la adopción del método de electroforésis en capilar frente al de capa.

En una primera fase de este trabajo se realiza microelectroforesis en capilar de 1,2 mm. de diámetro interior. Y en una segunda fase, - para aplicaciones especiales, se desarrolla la microelectroforesis en capilar de 0,41 mm. de diámetro interior (II-2-6).

Las magnitudes del capilar de 1,2 mm. de diámetro interior son:

Longitud 70 mm.

Diámetro externo 2,3 mm.

Diámetro interno 1,2 mm.

Volumen total capilar 80 microlitros

Se llena gel hasta una altura de unos 55 mm.

Sección del gel 1,13 mm²

Volumen específico 11,3 microlitros / cm.

Volumen total gel 62 microlitros

* Laboratorio de Tecnología Química Especial.

Cantidad óptima de muestra 1 microgramo en 2 microlitros
Ver otros datos en (II-2-31)

El capilar empleado en la segunda fase es de 0,41 mm. de diámetro - interior (II-2-61). Sus magnitudes características, una vez seccionado a la longitud conveniente son:

Longitud 20 mm.

Diámetro externo 1,25 mm.

Diámetro interior 0,41 mm.

Sección del gel 0,132 mm²

Volumen específico 1,32 microlitros / cm.

Volumen total 2,64 microlitros

Sensibilidad óptima.

A continuación se detalla los distintos aparatos y accesorios originales resultantes de la miniaturización de la electroforesis tomando como base el capilar de 1,2 mm. de diámetro interno y posteriormente los del capilar de 0,41 mm. de diámetro interno. Detallando los dos métodos que se usan en el capilar "1,2" para geles de distinta concentración en acrilamida.



II-2-2 EFECTOS FISICOS RESULTANTES DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DE ACRILAMIDA. ADOPCION DEL METODO APROPIADO.

Como ya se ha descrito anteriormente (II-1-4) la concentración de acrilamida en el gel influye en sus propiedades físicas; tamaño de poro, rigidez, etc.

Clasificando los geles según la concentración de acrilamida en tres tipos:

De baja concentración 4-10%

De concentración media 10-25% y

De alta concentración 25%.

Apreciándose una mayor unión del gel a las paredes del tubo capilar, conforme aumenta la concentración de acrilamida.

En este apartado se trata este fenómeno, el cual es decisivo a la hora de la consecución del método en la extracción del gel y posterior tinción de las bandas. Lo cual conduce a la adopción de dos métodos - distintos de extracción del gel.

Mientras que a concentración baja se extrae el gel del capilar por el procedimiento de enfriamiento a baja temperatura, seguido de un rápido calentamiento a temperatura ambiente de las paredes del tubo que provoca una diferencia de diámetro entre el capilar y el gel. Mediante la inyección de agua a presión el gel sale sin ninguna dificultad del interior del capilar (Ver II-2-410).

En cambio, en los geles más concentrados de acrilamida este procedimiento no es viable. En este caso se adopta un método sencillo y eficaz, que consiste en quebrar el tubo capilar por percusión pero sin

que se llegue a dañar el gel (Ver II-2-37).

Este método da buenos resultados pero no es aconsejable usarlo en los geles de baja concentración en acrilamida, porque el gel es poco consistente y poco manejable.



II-2-3 DESCRIPCIÓN DE LOS APARATOS EMPLEADOS Y ACCESORIOS

II-2-31 Capilar

El capilar empleado es nacional fabricado por Gricel (Firma 1), sus medidas aproximadas son:

Diámetro interior	1,2 mm.
Diámetro exterior	2,3 mm.
Longitud	70 mm.
Sección	1,13 mm ²
Volumen	80 l

Estos capilares se lavan con detergente tipo Extran Flüssing, (Merck F2). Luego se quita el detergente con agua destilada y se seca en una estufa a 100° C.

En el apartado II-2-6, se relata la Microelectroforésis en capilar - de 0,4 mm. de diámetro interior. Los aparatos que a continuación se describen y las técnicas empleadas son también en buena parte de aplicación a esta técnica aún más miniaturizadas. (Ver concretamente II-2-6)

II-2-32 Diseño del Aparato de electroforesis. Cubeta superior y cubeta inferior

La elección de tubo capilar comporta una natural disposición vertical de éstos. Con una cubeta superior que contiene tampón, llamado - tampón superior y una cubeta inferior que contiene tampón inferior. La distribución de capilares puede ser en línea recta o en circunferencia.

La distribución simétrica respecto del electrodo es importante ya - que el "camino" eléctrico que une los dos electrodos pasando a través de los geles ha de ser idéntico para poder cumplir una de las - condiciones de comparación de movilidades electroforéticas.

La colocación de una línea o dos de capilar requiere un electrodo - longitudinal que abarque a éstos para una correcta distribución del potencial.

La distribución en circunferencia necesita unos electrodos pequeños colocados en el centro de la circunferencia, con el consiguiente ahorro de material de Platino.

Se eligió la distribución de los capilares en circunferencia. Las cubetas lógicamente cilíndricas.

El material de las cubetas es de metacrilato transparente.

El primer prototipo que se construyó; tenía capacidad para doce capilares, sin embargo las necesidades del Laboratorio, así como la conveniencia de repetir en varios tubos la colocación de la misma muestra para obtener el resultado mejor, aconsejaron ampliar la capacidad del aparato a veinticuatro tubos.



La cubeta superior del aparato de veinticuatro tubos (Fig. nº 9), es un cilindro de diámetro exterior 120 mm, de grosor de pared 3mm. y de altura 40 mm. Tapado en su base por un disco del mismo material que tiene veinticuatro agujeros distribuidos simétricamente en una sola fila, sus centros están en un radio de 52 mm. El diámetro de los agujeros es 2,9 mm. El arco entre centros es 13,606 mm. y el ángulo central respecto a estos centros es 15°.

Los capilares tienen un diámetro externo de 2,3 mm. y ajustan perfectamente en estos agujeros de 2,9 mm. de diámetro por medio de un pequeño trozo de tubo de silicona. El tubo de silicona tiene por diámetro interior 2 mm. y diámetro exterior 3 mm.

La base de la cubeta superior posee cuatro topes también de metacrilato, colocados a 90° uno del otro, a 3 mm. del borde exterior, de 6 mm. de ancho y 6 mm. de alto.

Por su parte exterior, permiten ajustar a la cubeta inferior, detallada más adelante. Por su parte interior ajustan a la copa de montaje de los capilares (II-2-34), permitiendo girar libremente en ambos casos.

Sobre la base, y en el interior del cilindro hay una tira de metacrilato de 7 mm. de ancho y 3 mm. de grueso, curvada en forma de puente con un agujero en su parte más alta de 3 mm. de diámetro.

Por este agujero se situará el electrodo superior. Se abre a 5 mm. del agujero central a cada lado, un agujero de 1,5 mm. de diámetro para evacuar mejor el gas liberado por el electrodo.

La longitud entre las bases de este puente es de 95 mm. y la altura es de 24 mm. Sus bases se sitúan enfrente de un trozo entre agujeros de la circunferencia de los 24 agujeros. Esta disposición hace que el "camino" eléctrico desde el electrodo al capilar no se vea estorbado por dicho puente.

El hecho de que el puente esté por dentro de la circunferencia de los 24 agujeros, permite acceder libremente a éstos por encima de la cubeta, en cualquier posición.

Por último existe en el centro de la base de la cubeta, por su parte interna una hendidura cónica de 1,5 mm. de profundidad por 2 mm. de ancho. Tiene el objeto de acabar de centrar el electrodo mismo, lo cual es importante al objeto de la uniformidad de distribución de la intensidad eléctrica a través de cada capilar.

Cubeta inferior: Es un cilindro de metacrilato del mismo diámetro que la cubeta superior y del mismo grueso de pared (Fig. nº10). Su altura es de 67 mm. Está tapado en su base inferior por un disco del mismo material y del mismo grueso. Lleva un agujero en su centro de 2,9 mm. de diámetro en donde se insertará el electrodo inferior.

Tiene la cubeta, cuatro apoyos que la mantiene elevada 25 mm. del suelo. Estos apoyos, del mismo material, son cuatro sectores de cilindro colocados en los bordes de una circunferencia cuyo radio es 50 mm. ocupando un ángulo central de 45°.

La cubeta tiene seis respiraderos (agujeros de 3,5 mm. de diámetro) a 6 mm. del borde superior distribuidos en los vértices de un exágono interior imaginario, que permiten la comunicación con el exterior del ambiente dentro de la cubeta inferior, una vez colocada la cubeta superior.



En la cubeta inferior se ajustan los 24 capilares y todo este conjunto, se introduce en la cubeta inferior. Los tonos que lleva la cubeta superior ajustan dentro de la inferior y permiten a ésta girar libremente pivotando encima de la cubeta inferior.

II-2-33 Electrodos

Se utiliza como electrodo un trozo de alambre de Platino inalterable con las soluciones tampón. De 0,5 mm. de diámetro y de 12 mm. de largo, el cual se introduce 6 mm. dentro de un capilar (Ver II-2-31), cortando éste a una longitud de 30 mm. Se cierra el capilar al fuego por medio de un soplete de gas, aprisionando el platino.

Por el extremo abierto del trozo de capilar, se introduce un cable eléctrico de Cobre, de longitud 50 cm. al que previamente se le ha cortado 3 cm. de la funda plástica y se le ha estañado. Puesto en contacto el cable de cobre estañado con el platino, se calienta suavemente desde el exterior del capilar, fundiéndose el estaño y soldándose de esta forma al cobre y al platino; formando continuidad eléctrica (Fig. nº 11). Por medio de cinta aislante se hace una unión flexible entre el capilar y la funda protectora del cable de cobre.

II-2-34 Copa de Montaje

Se utiliza para la preparación y llenado de los capilares. Tiene forma de copa, está hecho de metacrilato. Consiste en un pié de cuadrado de 10 cm. de lado y 14 mm. de grosor. La parte central es una barra cuadrada cuya sección es de 14 mm. de lado y 22,5 cm. de altura. La parte superior es un cilindro hueco de 3mm. de grosor de pared, - tapado por su base. Su diámetro exterior es de 100 mm., su altura - 53 mm. Se apoya centrado sobre la barra central. (Fig. nº 12).

Tiene una prominencia en la base inferior de la copa (Ver Fig. nº 13) que lleva marcado un trazo (nivel I). Sus medidas son: alto 15 mm., ancho 5mm. y grueso 2 mm. Va colocado en el borde de la cubeta.

Tiene marcado otro trazo en la cara externa del cilindro (nivel II) y desplazado 90° del primero. Esto se debe a la comodidad en el llenado de capilares (II-2-45).

El nivel I está a 61,5 mm. por debajo del borde superior del cilindro y el nivel II, está a 7,5 mm.

El nivel I sirve para enrasar los extremos inferiores de los capilares (Ver II-2-44) y el nivel II para el enrase del líquido a gelificar dentro de los capilares (Ver II-2-45).

El objeto de estos niveles es lograr una longitud de gel uniforme en todos los capilares; siendo éste, un punto importante para lograr igualdad en el "camino" eléctrico entre electrodos.



Fig. 9 Cubeta Superior

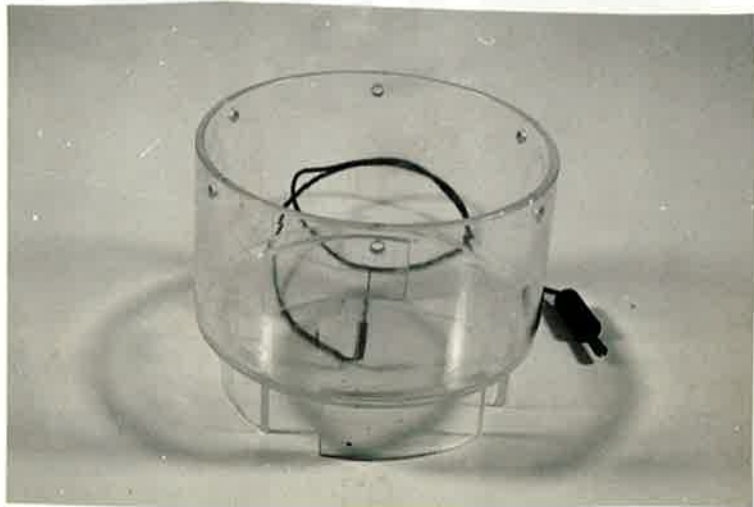


Fig. 10 Cubeta Inferior

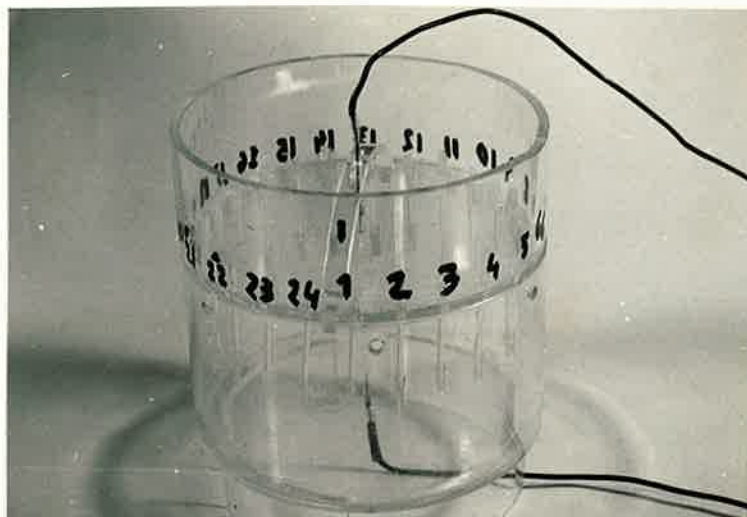


Fig. 11 a

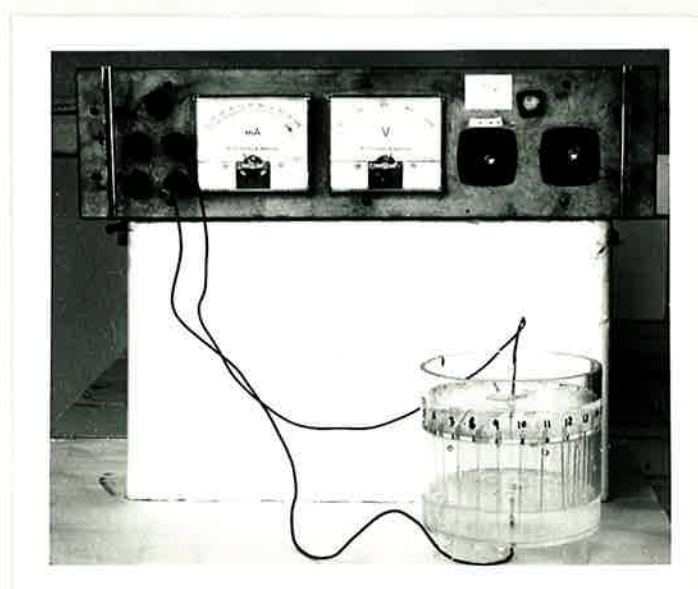


Fig. 11 b

- Fig. 11 a. Aparato de electroforesis con sus electrodos
 b. Aparato de electroforesis conectado al generador de corriente continua

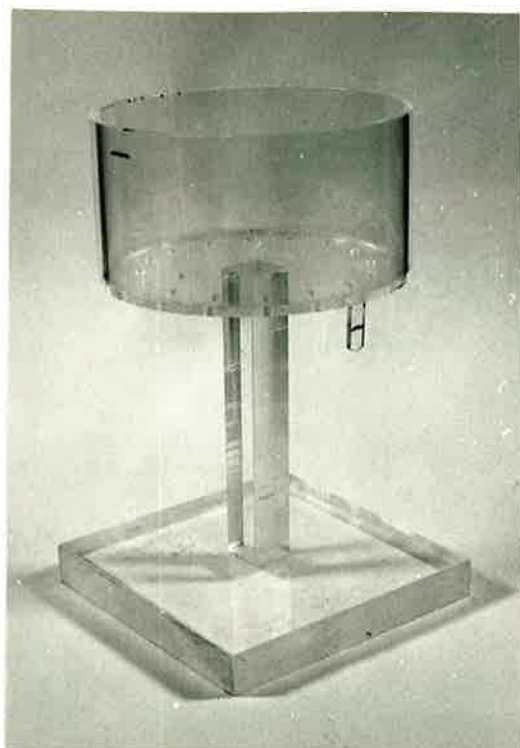


Fig. 12

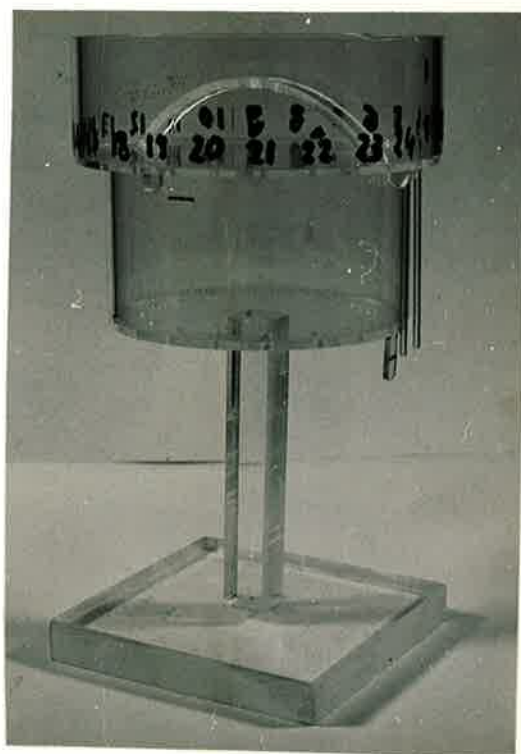


Fig. 13

Fig. 12 Copa de montaje, mostrando los niveles I y II

Fig. 13 Copa de montaje y llenado de capilares. Con la cubeta superior, mostrando el enrase de dos capilares en el nivel I

II-2-35 Cubeta de tinción y de destinción

Una vez extraídos los geles del capilar se procede al teñido del gel, en el cual quedarán teñidas las bandas de proteína. En sucesivos lavados con el líquido de destinción, se eliminará el colorante en exceso del gel.

Para ello se emplean una cubetas rectangulares, cada una de las cuales tiene cuatro compartimientos. En cada compartimiento se coloca un gel. El material es metacrilato de 2 mm. de grosor (Fig. nº 14). Las dimensiones de la cubeta son:

Base: largo 76 mm., ancho 33 mm. Sobre esta base se colocan 5 tiras de 6 mm. de altura y 70 mm. de largo que forman los compartimientos. Estos tienen una anchura útil de 5 mm.

Dos tiras transversales de 6 mm. de altura y 31 mm. de largo cierran los compartimientos.

Son necesarias siete cubetas para teñir y desteñir los geles (Ver II-2-411 y 412).

II-2-36 Soporte para fotografía

Los geles se fotografían por transparencia. Sobre una plancha de me-

metacrilato transparente de 112 x 95 x 3 mm. se colocan 25 capilares "microcaps" de 50 de la firma Drumond (P3), cerrados al fuego por ambos extremos. Separados unos de otros 2,5 mm., quedando un espacio entre ambos de 2mm. (Fig. 15). Los extremos de los capilares - se pegan al metacrilato por medio de pegamento.

Por efecto de tensión superficial y viscosidad los 24 geles quedan adheridos a estos capilares quedando rectilíneos y uniformemente separados. Preparados para fotografiarlos por transparencia, es decir; interponiéndolos entre el foco de la luz y la máquina fotográfica.

II-2-37 Base metálica ranurada.

En el procedimiento de extracción de gel, adaptado en el método (II-2-52-e) para geles de media y alta concentración de acrilamida, se rompe el capilar para extraer el gel. Naturalmente interesan no dañar el gel al golpear el capilar para quebrarlo.

Para quebrar los capilares se utiliza una pieza de listón rectangular de 75 x 55 x 10 mm. a la que se le ha hecho centrado en una de sus caras, un canal semicircular de 3 mm. de profundidad (fig. 16). El capilar se coloca en este canal y se golpea con un martillo. El golpe del martillo incide sobre la parte del capilar no introducido en el canal, pero no llega a tocar el gel, pues se lo impide la ba-

se metálica. Lográndose de esta forma quebrar el vidrio sin dañar al gel.

A su vez esta base metálica, en la cara opuesta tiene otro canal semicircular de 1,5 mm. de radio, que sirve para efectuar el mismo procedimiento con el capilar superfino de 0,4 mm. de diámetro interior (Ver II-2-66).

II-2-38 Otros Accesorios

- Capilar portamuestras. Las muestras que hay que pesar en las balanzas de alta precisión (Metler F4), de sensibilidad 10 microgr., necesitan de un recipiente adecuado. Normalmente se pesan unos 20 o 30 microgr. para luego disolverlos (Ver II-2-46).

Este recipiente se hace aprovechando el mismo tipo de capilar (II-2-31). Se corta un trozo de longitud 25 mm, mediante una sierra metálica para vidrio y se cierra al fuego por un extremo (Fig. nº 17). El peso de este tubo es menor que un tubo normal portamuestras, lo que hace que el error relativo de peso sea menor.

Asimismo para recoger la proteína disuelta, este capilar portamuestras ofrece la ventaja frente al tubo portamuestras normal, de que no existe prácticamente pérdida de muestra pesada o de disolución añadida ya

que no hay la dispersión que ofrece un tubo mayor. Se recoge la muestra disuelta mediante una microjeringa (Ver detalles más adelante). Estos capilares portamuestras se almacenan en una capsula Petri de 40 mm. de diámetro, tapándose a continuación.

- Microespátula. Adecuado al capilar portamuestras se han realizado unas microespátulas. Se corta un alambre de acero inoxidable de 1 mm de diámetro, de 125 mm. de longitud. Se enderezan y se aplanan sus extremos mediante percusión de martillo sobre yunque. Una vez aplanados se eliminan los bordes y se pulen mediante una muela abrasiva que gira 3.000 rpm. Dando una forma de punta redondeada al extremo de la pala. Esta punta se tuerce 45° respecto al plano de la pala (Fig. nº 18). Posteriormente se temple cada pala. Las puntas de las palas hechas en los extremos del alambre están en oposición (180°). Esta microespátula puede introducirse en el capilar portamuestras.

- Agitador. Una vez pesada la muestra dentro del capilar portamuestras, se introduce en éste el líquido de disolución de las mismas. Se ayuda a completar la disolución mediante el agitador. El agitador es también un tubo capilar cerrado al fuego por sus extremos y en uno de ellos se le introduce previamente un trozo de alambre de platino de 0,5 mm. de diámetro y 25 mm. de largo, sobresaliendo 20 mm. del tubo capilar (Fig. nº 19). El platino se introduce dentro del capilar portamuestras para agitar la disolución.

- Base portatubos. Para el traslado y almacenaje de los capilares portamuestras se ha diseñado una gradilla o base portatubos adecuado. Esta base portatubos es un trozo rectangular de plástico de 14 mm. de grueso, 84 mm. de largo y 30 mm. de ancho. Al cual se han practicado 3 filas de agujeros, cada uno de 8 mm. de profundidad y de 2,75 mm. de diámetro. Cada fila tiene 10 agujeros separados sus centros entre si 7 mm. La separación entre filas es de 7 mm. (Fig. nº 20).

- Soporte para incubación. En el caso de que una vez introducidas las muestras en el capilar portamuestras, con la disolución pertinente, se necesite incubarlas a determinada temperatura en un baño termostatzado, se utilizará este soporte. Este soporte se compone simplemente de un trozo rectangular de plástico de medidas 55 x 30 x 2 mm., con dos filas de agujeros. Cada fila con 4 agujeros. Cada agujero tiene un diámetro de 2,9 mm. y están separados los centros 10 mm.

Se engancha a esta base, a ras de su parte inferior un trozo rectangular de 100 x 10 x 2 mm. que servirá para asir exteriormente a este soporte. Los capilares portamuestras se empalman a estos agujeros por su parte inferior con trozos de tubo de silicona (Ver II-2-32). Se tapan y el conjunto se introduce en el Baño María, hasta que el nivel del baño llegue a 4 mm. por debajo del extremo superior de los capilares portamuestra.

- Jeringas. En el método de microelectroforésis se utilizan dos tipos de jeringas normales: Una jeringa de plástico de 2 cc de capacidad de medidas: interior 8 mm. y carrera aproximada de émbolo: 40 mm. Y otra jeringa de plástico, de tipo insulina, de 1 cc de capacidad y medidas: interior 5 mm. y carrera de émbolo aprox. 50 mm. La primera se utiliza para llenar con solución de gel los capilares (Ver II-2-45), empalmada con tubo de silicona (II-2-32). Asimismo se utiliza conectado también con tubo de silicona para impulsar el gel (II-2-410) del interior del capilar en el método (II-2-4).

Microjeringa. Se utilizan de dos capacidades; de 10 microlitros - (lambdas) y de 1 lambda, fabricadas por Hamilton (F5). (Fig. nº 21). Se emplean en la preparación de muestras (II-2-46) y en colocación de las muestras (II-2-48).

- Pinzas. Se recomienda para el manejo de los capilares, de los capilares portamuestras, etc. utilizar unas pinzas dobladas en su punta (Fig. nº 22).

También se emplean pinzas de tipo normal.

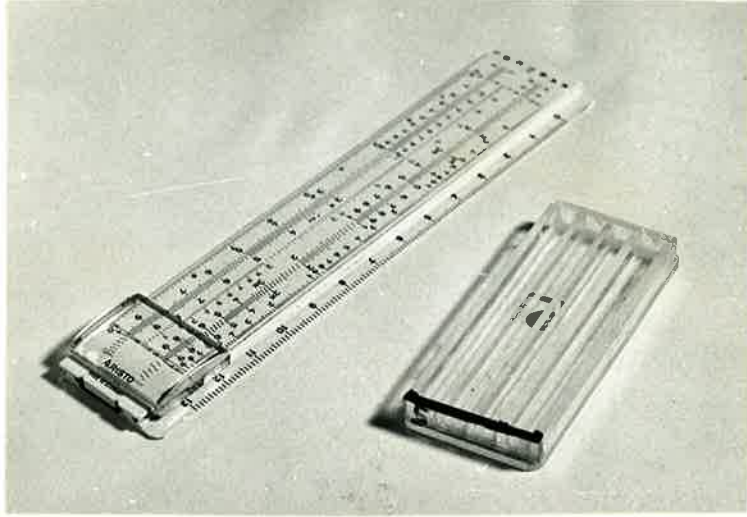


Fig. 14 Cubeta de tinción y destinción

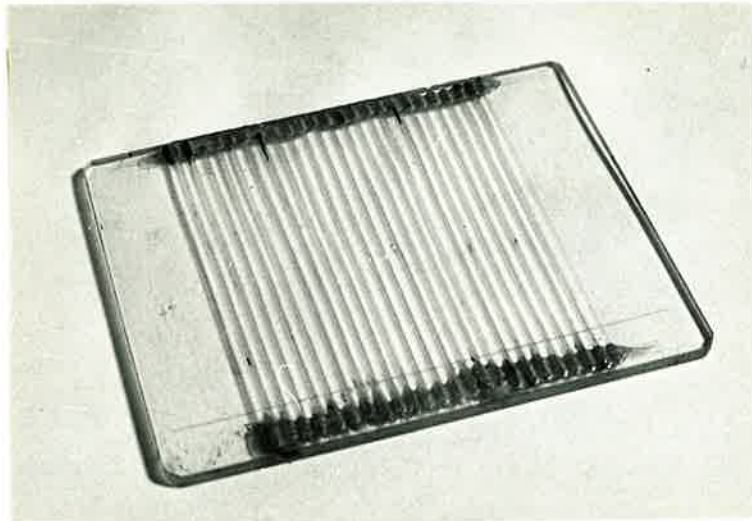


Fig. 15 Soporte para fotografía



Fig. 16 Base metálica ranurada

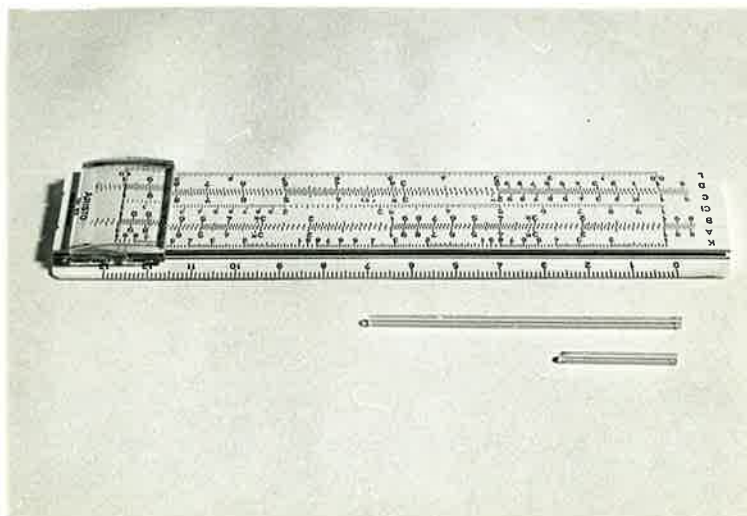


Fig. 17 Capilar de 1,2 mm de diámetro interior
y capilar portamuestras de 25 mm de longitud

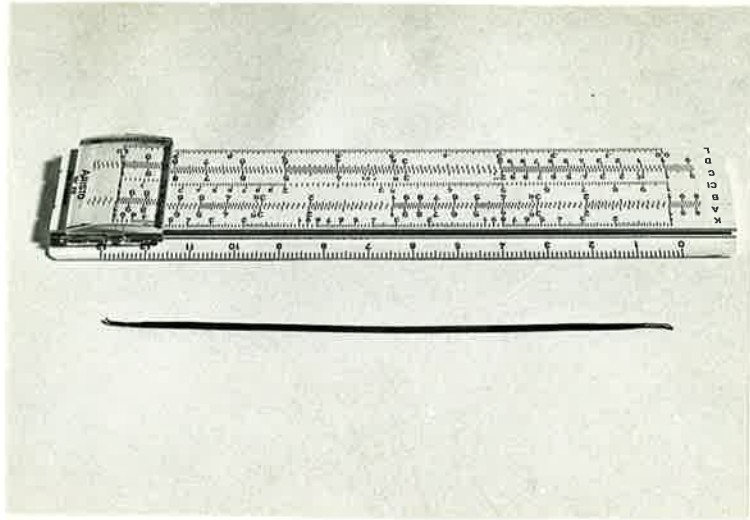


Fig. 18 Microespátula

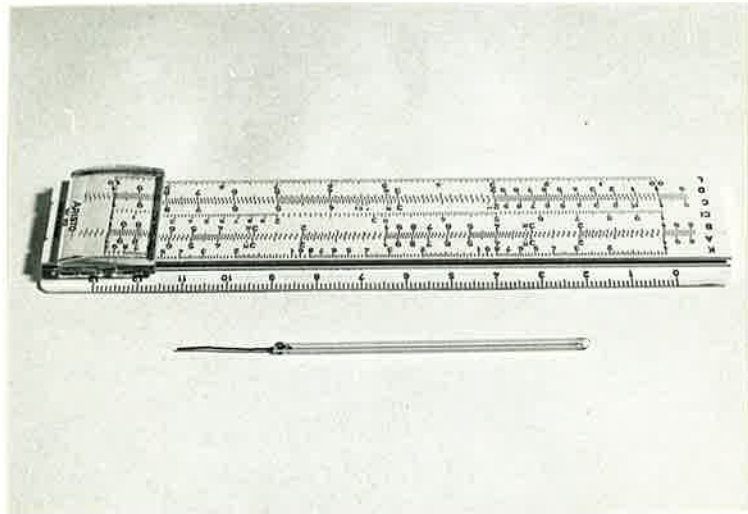


Fig. 19 Agitador

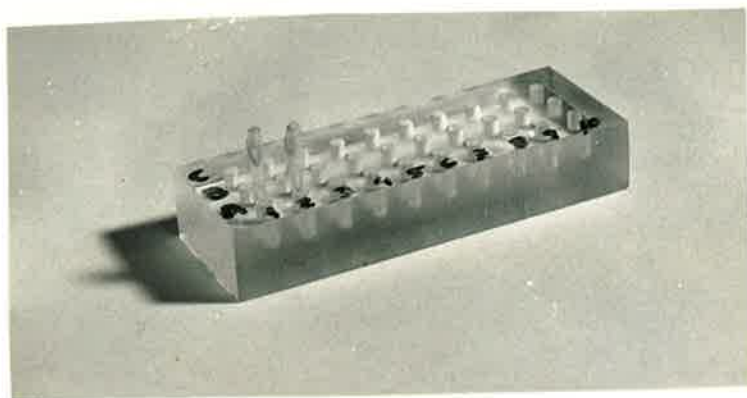


Fig. 20 Base portatubos. Puede apreciarse dos tubos portamuestras cerrados



Fig. 21 Microjeringas de 1 y 10 microlitros

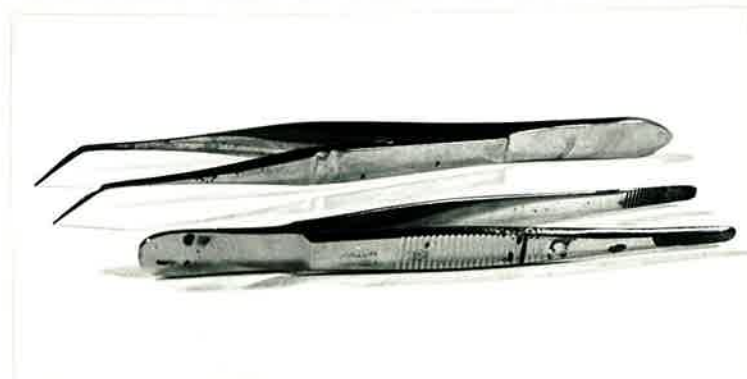


Fig. 22 Pinza con puntas finas y acodadas, y pinza normal

II-2-4 DESCRIPCION DEL METODO EMPLEADO PARA GELES DE BAJA CONCENTRACION EN ACRILAMIDA

II-2-41 Introducción. Método empleado

En los geles de baja concentración de Acrilamida la consistencia física de estos aparece más elástica que en los de mayor concentración. En este caso su mayor elasticidad permite alargamiento y tención del gel. Por concentración baja de acrilamida se entiende del 5 al 10% de Acrilamida (Ver II-1-4).

Estas propiedades físicas diferentes, originan un método distinto en la extracción del gel del capilar.

El método electroforético empleado es de A.L. Shapiro (17), modificado por el Dr. C. Mezquita. El porcentaje de acrilamida es del 6%. Utiliza el Sodio dodecil Sulfato (SDS), como detergente para desnaturalizar las proteínas.

Este método es apropiado, dado el tamaño de poro del gel y del empleo del SDS para moléculas de gran tamaño (p.e. proteínas globulares).

A continuación se describe el método, su aplicación en microelectroforesis y la técnica que ello comporta.

II-2-42 Solución tampón

Se utiliza una solución tampón para llenar las cubetas electroforéticas, superior e inferior. Así como solvente de las soluciones integrantes de la mezcla a gelificar (Ver II-2-43).

Se denomina solución "Tampón Fosfato" ya que éste la caracteriza.

Se compone de:

(1) Fosfato monosódico con 1 H ₂ O	0,2 M	27,6 gr/litro
(2) Fosfato disódico con 2 H ₂ O	0,2 M	35,6 gr/litro

Normalmente se prepara 1 litro de cada disolución (1) y (2) disolviéndose en agua destilada los gramos correspondientes de cada producto.

Se mezclan 280 ml de disolución (1), con 720 ml de disolución (2).

El resto de estas disoluciones puede guardarse en la cámara refrigeradora.

Una vez mezcladas estas cantidades se añade 1 litro de agua destilada. Obteniéndose pues en total, 2 litros. Se añade 2 grs. de Dodecil sulfato Sódico (SDS), con lo que la concentración de éste en la disolución es del 0,1 %.

Se mide con un phímetro su PH inicial; se añade la cantidad necesaria de solución de hidróxido sódico (NaOH) concentrado, hasta que el PH final sea de 7,2.

II-2-43 Composición del Gel

La solución a gelificar es mezcla de tres soluciones previas, denominadas A, B y C.

Solución A:

Se preparan 50 ml

Acrilamida 12% 6 grs.

Bisacrilamida 0,40% 0,20 grs.

Enrasando con tampón fosfato (II-2-42), hasta los 50 ml. y filtrándose a continuación.

Solución B:

Se preparan 50 ml

Temed 0,5%

Enrasando con tampón fosfato hasta los 50 ml.

Solución C:

Se preparan 7,5 ml

Persulfato Amónico 0,6% 45 mgr.

Enrasando con tampón fosfato hasta los 7,5 ml.

A título indicativo, puede prepararse las cantidades indicadas de solución A y B ya que puede guardarse durante cierto tiempo en cámara refrigerada. Y utilizarse varias veces sin tener que hacer de nuevo.

La solución C hay que prepararla inmediatamente antes de proceder a la mezcla, ya que se deteriora con rapidez.

Antes de proceder a la mezcla, las cantidades a mezclar, se colocan en la nevera al objeto de estar fríos.

La mezcla de las 3 soluciones para 24 tubos capilares es:

Solución A:	2 partes	4 ml
Solución B:	1 parte	2 ml
Solución C:	1 parte	2 ml

Una vez hecha la mezcla dentro de un Erlenmeyer apropiado, que previamente estaba en la nevera con el objeto de estar frío y retardar la gelificación, se procede a la extracción del aire disuelto en la misma. Se conecta el erlenmeyer a una bomba de vacío (de agua), y se agita facilitando así la extracción del aire. Esta operación se completa en dos minutos. El objeto de extraer el aire es el de que no se formen burbujas luego en el gel. Todas las manipulaciones de llenado de capilares (Ver II-2-45), una vez hecha la mezcla y extraído el aire disuelto, se efectúan en la cámara. Pues a temperatura ambiente la mayor rapidez de gelificación no daría tiempo al llenado de los capilares.

II-2-44 Preparación de los capilares

Se separan veinticuatro capilares de los almacenados limpios (Ver II-2-31).

Se preparan 24 trozos de tubo de silicona (II-2-32) cortados en vi

sel y de una longitud de 8 mm. y asimismo 24 trozos de 25 mm. Estos trozos de tubo flexible de silicona se introducen en los ex tremos del capilar; el de 8mm. en el extremo superior adentrán-do le la mitad. Y el de 25 mm. en el extremo inferior del capilar, a dentrándolo unos 4 mm.

Una vez preparados de esta forma los capilares, se introducen sus extremos superiores en los agujeros de la cubeta superior de electroforesis, ajustándo perfectamente por medio del tubito empalme. Una vez montados los veinticuatro capilares a sus lugares correspondientes en la cubeta superior, se lleva el conjunto sobre la copa de montaje.

En la copa de montaje, la cubeta superior puede girar libremente (II-2-34). Aquí se enrasan los extremos inferiores del tubo capilar, frente al nivel I marcado en el apéndice de la copa de montaje.

Se procede de la siguiente manera; Se empieza por el tubo n° 1 - (marcado en la cubeta de electroforesis superior), el cual se enfrenta al nivel I mediante giro de la cubeta de electroforésis. Según esté el extremo inferior del capilar por encima o por debajo de este nivel se empujará a éste hacia abajo o hacia arriba - respectivamente para lograr su enrase.

Acabada la operación, se procede de la misma manera con el segundo capilar, el cual se pone frente al nivel de enrase, por giro de la cubeta montada. Continuando de esta forma hasta tener los veinticuatro capilares al mismo nivel.

Esta operación se efectúa con la intención de lograr igualdad en las longitudes del gel.

II-2-45 Llenado de capilares

El paso siguiente luego de montados los capilares y recién desgasi-
ficadas la mezcla de las tres soluciones (II-2-43), es el llenado -
de capilares.

Para el llenado de capilares utilizaremos como accesorios neces-
arios la jeringa de 2 cc y veinticuatro clips sujetapapeles (inoxida
bles de tipo mediano).

Las operaciones se efectúan en la cámara fría, se llena la jeringa
de 2 cc con la disolución a gelificar.

Se coloca el nivel II (II-2-34) frente al operador y el capilar nú-
mero uno frente al nivel II.

Se introduce un clip por el extremo inferior del tubo de silicona -
colocado en el extremo inferior del capilar, por el hueco entre las
dos espirales alargadas que lo forman.

A continuación se conecta la jeringa y se introduce el líquido a ge-
lificar, en el capilar.

Se llena el capilar aproximadamente hasta 1 cm. por debajo del ni-
vel II. En este momento se deja de presionar el émbolo y se yugula
el tubo de silicona por su parte central, mediante el clip, introdu-
ciendo a éste por un costado alargado su espiral en el tubo de sili-
cona. Se quita la jeringa.

La yugulación del tubo elástico de silicona produce una elevación -
de nivel del líquido a gelificar dentro del capilar. Si este nivel
supera la cota II se desplaza hacia abajo del tubo de silicona, el
clip. Procediendo a la inversa en caso contrario. Logrando de esta
manera un enrase uniforme de todos los geles.

Este enrase deja unos 15 mm. de la parte superior del tubo capilar
sin llenar de solución de gel, al objeto de dejar un espacio para

colocar la solución de la muestra.

La gelificación del líquido dentro de los capilares es rápida. Una vez llenos todos los capilares, se saca el conjunto a la temperatura ambiente. En donde gelifica completamente en unos 20 minutos a 18° de temperatura ambiente.

Posteriormente se introduce de nuevo en la cámara fría, hasta que haya de ser utilizado. Normalmente se deja reposar el gel de 12 a 24 horas.

Cuando van a ser utilizados los geles, se sacan de la cámara y se les extrae con cuidado, para que no quede burbuja de aire, los trozos de tubo de silicona colocados en el extremo inferior del capilar, sin tocar estos colocados en la cubeta electroforética superior.

Una vez extraídos estos tubitos se llena la cubeta electroforética inferior con solución tampón, llenando hasta la mitad. Y se introduce los 24 capilares montados sobre la otra cubeta.

Al objeto de extraer el líquido sobre gel se cortan unas tiras de papel absorbente, tipo cerámica fino, de unos 50 mm. de largo por 2 mm. de ancho. Estas tiras se enrollan en longitud sobre sí mismas. Y se introducen por la parte superior del tubo capilar hasta tocar el gel. El líquido sobre gel queda impregnado en este papel extrayéndose de esta manera.

A continuación se llena la cubeta superior de líquido tampón. Con la jeringa de 1 cc con aguja larga, se va llenando el espacio del capilar por encima del borde superior del gel, extrayéndose de esta forma la burbuja de aire que se forma al introducir el tampón. Se coloca el electrodo superior y el conjunto está listo para el equilibrado (II-2-47).

II-2-46 Preparación de muestras

Normalmente las muestras son "pesables" es decir pueden pesarse can-tidades como mínimo de unos 20 microgramos. A veces existen cantida-des de menor peso a analizar. En el primer caso, se pesa 20 microgramos, de cada muestra a estudiar. Colocándose directamente en los capilares portamuestras. Estos se almacenan en la gradilla portatubos guardando orden y previa numeración.

Este método electroforético está especialmente indicado para conocer los pesos moleculares de las cadenas polipépticas de una gran variedad de proteínas. En particular se emplea principalmente en las proteínas globulares de carga normal, existiendo una relación -gráfica standard entre movilidades electroforéticas y pesos moleculares. Para histonas y ribonucleasas que son fuertemente básicas -tiene otra gráfica.

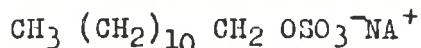
Las muestras globulares se desnaturalizan en forma de ovillo median-te la siguiente disolución:

Tampón fosfato (PH = 7,2)		1 cc
SDS	1%	10 mgr.
B-mercaptóetanol	1%	10 lambdas

De esta disolución se extraen 20 lambdas y se añaden a cada capilar portamuestras. Cerrándose a continuación con papel parafilm "M" de American (F6).

Al objeto de acelerar y completar la desnaturalización, se introduce con unas pinzas este capilar portamuestras en un vaso de precipitados que contiene agua en ebullición, agitándose durante dos minutos.

El Sodio dodecil sulfato (SDS); es un detergente típico:



Se asocia en la cadena polipéptica regularmente, quedando una carga negativa en cada molécula de SDS asociada.

De esta manera la carga que puede asociarse, es proporcional a la longitud de la cadena proteica, es decir a su peso molecular. Por lo tanto se hace proporcional la movilidad con el peso molecular.

En otros capilares portamuestras, tantos como los haya llenos de muestra, se pesa 3,42 mgr. de sacarosa.

Se trasladan las 10 lambdas de disolución de muestra a estos que contienen sacarosa.

La adición de sacarosa no tiene otro fin que aumentar la densidad de la muestra respecto del tampón de la cubeta superior, para que no se difunda en éste, una vez colocada inmediatamente encima del gel. Se guardan estos tubitos en la gradilla en espera de ser colocados.

Algunas veces interesa analizar electroforéticamente muestras que están en tan poca cantidad que no pueden pesarse normalmente. En estos casos es necesario recuperar la muestra que se encuentra enganchada en las paredes del tubo de ensayo con 50 lambdas de la disolución reseñada anteriormente. Este proceso se efectúa con una micropipeta de 50 lambdas y se repite la operación de lavado varias veces recogiendo de nuevo la disolución.

Se va recogiendo el líquido muestra con una microjeringa introduciéndose a continuación en varios capilares portamuestras a los que previamente se les ha colocado sacarosa.

En este caso al analizar la muestra electroforética, se utilizan - varios geles (generalmente tres). Colocándose diferentes cantidades de líquido-muestra en cada gel (II-2-48), al objeto de poder - seleccionar luego, el de mejor resultado.

II-2-47 Equilibrado

Una vez preparados los geles, llenas las cubetas con tampón y conec tados los electrodos. Se procede al equilibrado (o pre-electrofore-sis). El equilibrado consiste en hacer pasar la corriente a través del gel sin haber colocado la muestra.

El objeto del equilibrado es sacar del gel iones extraños, que se - hacen emigrar por efecto electroforético. Quedando éste, homogéneo para el paso de las muestras en la electroforé-sis propiamente dicha.

El equilibrado se completa en una hora conectándose los electrodos en una fuente de corriente continua de tensión constante (20 Volts)

siendo la intensidad normal en este tipo de gel de 0,33 m A/gel. Es decir en total 7,92 m A.

En la electroforésis se usan los mismos valores electricos.

II-2-48 Colocación de las muestras

Para depositar la disolución de la muestra encima del borde superior del gel se utiliza una microjeringa de 10 microlitros de capacidad. El aparato de electroforesis dispone de 24 tubos pudiendose analizar veinticuatro muestras diferentes. Sin embargo normalmente no hay tantas muestras a analizar ni tampoco hay la certeza de la cantidad exacta de disolución-muestra que debe colocarse, con lo que es necesario repetir la misma muestra en distintos capilares y con distintas cantidades para escoger el de mejor resolución.

Así pues se repartirán, sobre el papel los capilares y las muestras. Asignando a cada capilar la muestra correspondiente.

Es mejor que el aparato de electroforésis esté situado a la altura de los ojos del operador, para que este pueda manipular cómodamente en el momento de la colocación de las muestras.

Se situa el capilar número uno, frente al operador, introduciendo a

continuación la primera muestra mediante la microjeringa "10 μ l" - cuidando que la punta de la aguja de la jeringa quede cerca del gel, sin tocarlo, pues podría dañar al gel y producir discontinuidad en su superficie. Generalmente para las muestras "pesables" se inyectan los microlitros necesarios de forma que la cantidad de muestra colocada sea de 1 microgramo. Para las muestras no pesables se utilizan generalmente 3 capilares introduciendo en cada uno distintos volúmenes entre los 5 y los 20 microlitros, ya que no se conoce la cantidad de muestra exacta.

Una vez finalizado el llenado del primer capilar, se da un giro a la cubeta superior, de forma que quede encarado frente al operador el capilar número dos.

Se limpia repetidamente la microjeringa con agua destilada, en caso de cambiar de muestra, y se repite la misma operación de llenado.

II-2-49 Electroforesis.

En este apartado se sobreentiende; electroforesis propiamente dicha es decir el período de tiempo, en que bajo un potencial determinado las muestras empiezan a correr a lo largo del gel y se separan, según la carga y el tamaño.

Una vez finalizada la colocación de las muestras, se conectan los -
electrodos a la fuente de corriente continua. Se utiliza una fuente
de tensión constante 20 Voltios del tipo PE 4864/ 00 de Philips -
(F7). La intensidad que circula es de 0,33 m A/gel; en total apró-
ximadamente unos 8 m A.

Para un recorrido normal (Ver II-2-415), el tiempo de recorrido es
de 1 hora y 45 minutos.

II-2-410 Extracción del gel

Acabado el tiempo de recorrido, se desconecta la fuente de alimenta-
ción. Se saca el electrodo superior y a continuación se separa la -
cubeta superior de la inferior, tirando el tampón contenido.

Inmediatamente la cubeta superior con sus 24 capilares se sitúa en
el congelador de la nevera. Esta medida tiene la doble finalidad de
frenar la difusión de la muestra en el gel conservándose así duran-
te cierto tiempo, y la de preparar los geles para su extracción.

El lapso de tiempo entre el final de la electroforésis y la tinción
de los geles (II-2-411) es conveniente que sea pequeño.

Se extrae del congelador uno a uno y por orden, los capilares. Se -
conecta seguidamente mediante un trozo de silicona, el extremo supe

rior del capilar y la jeringa de 2 cc llena de agua destilada. Se sumerge el capilar en una cápsula Petri, llena de agua destilada a la temperatura ambiente y se presiona el ámbolo de la jeringa. La pequeña dilatación de las paredes del capilar debido al cambio de temperatura, respecto del gel, hace que este se desprege y salga expulsado por la presión ejercida a través de la jeringa. Se coge el gel con dos pinzas y se colocá en la cubeta de tinción (II-2-35) en la que previamente se ha colocado el líquido de tinción (II-2-411). Se pone el origen del gel en la base señalada de la cubeta. Repitiendo la operación con el resto de los capilares.

II-2-411 Tinción

Con la tinción se pretende fijar las bandas separadas de la muestra dandoles una coloración (azul) que las distinga.

El líquido de tinción empapa todo el gel pero solo se combina con la proteína. En sucesivos lavados (Ver II-2-412) se extrae el tinte que empapaba el gel sin que se modifique el tinte de las bandas. Pudiendose visualizar éstas, perfectamente.

El líquido de tinción apropiado está formado por:

Coomassie Blue	0,25%
Metanol	5%
Acético	1%
Agua destilada	5%

Una vez mezclado y agitado conviene filtrarlo y dejarlo reposar unos días.

El Coomassie Brillante Blue R utilizado tiene por estructura (Ver Fig. nº 23)

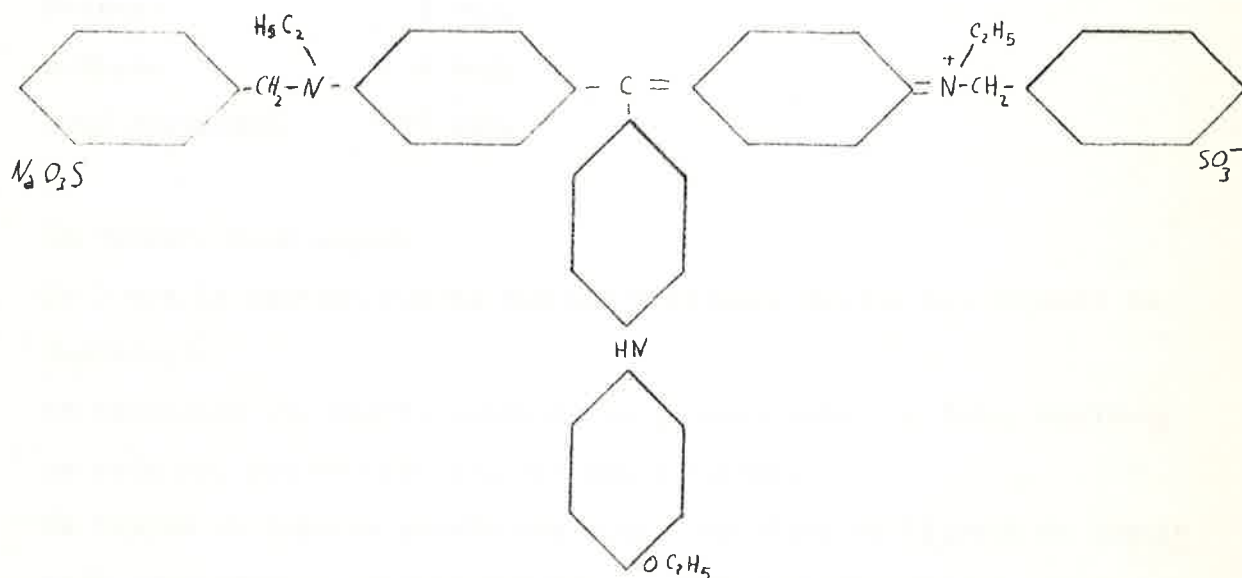


Fig. nº 23 Coomassie Brilliant Blue R

Uniéndose por medio del radical SO_3^- a la muestra.

El tiempo de tinción es de 1 hora.

II-2-412 Destinción

Una vez efectuada la tinción, en la que las bandas de proteína ha reaccionado con el tinte formando un compuesto insoluble, interesa eliminar el tinte que ha absorbido el resto del gel. Para ello se utiliza el líquido de destinción que diluye y elimina en sucesivos lavados este tinte sobrante.

Líquido de destinción:

Metanol	1 vol.
Acético	2 vol.
Agua destilada	17 vol.

Se procede como sigue:

Se llena la séptima cubeta que había quedado vacía, con líquido de destinción.

Se trasladan los cuatro geles de la primera cubeta a ésta. Cogiéndose cada gel con dos pinzas, por sus extremos.

Se limpia la primera cubeta con agua y se llena de líquido de destinción, volviéndose a trasladar los geles a sus respectivas posiciones en la primera cubeta.

Continuándose así con las demás cubetas.

Al cabo de un par de horas se procede a renovar en la misma forma el líquido de destinción con otro limpio.

Se efectúa un par de lavados más antes de que quede en la parte de gel sin proteína, completamente transparente.

Esta operación se completa en veinticuatro horas. No obstante los resultados pueden apreciarse a partir de las tres horas de efectuar la destinción. Procediendo a continuación al fotografiado de los resultados.

II-2-413 Fotografiado

Se colocan los geles a lo largo de las separaciones del soporte de fotografía (II-2-36), en orden, cuidando que los orígenes estén a la misma altura.

La fotografía se hace por transparencia es decir se coloca una - fuente luminosa entre el gel y la máquina de fotografía.

Generalmente se efectúan diversas fotografías; En una se fotografían todos los geles y en otras se efectúa una selección de los - que mejor han salido o de los grupos más interesantes.

Se archivan por fin las fotografías con los resultados observados.

II-2-414 Trazado de las curvas de densidad óptica

Mediante el microdensitómetro M K II de Joyce Loeb (F8), se halla la curva de densidad óptica de cada gel.

Puede seguirse dos caminos, analizar con el microdensitómetro los negativos de las fotografías de los geles, o bien analizar los geles directamente.

El primer caso es correcto, si se quiere solo tener una idea de los resultados. Más exactitud se tiene analizándolos directamente. Se

colocan encima del cristal portamuestras del aparato, junto con un porta de microscopio, que tiene por objeto darle una conformación rectilínea. Los mejores resultados se obtienen enfocando los bordes del gel. Ver resultados (II-2-415).

II-2-415 Resultados

Se han hecho pruebas con muestra de Albúmina suero bovina (Ver Fig. nº 24) a diversas concentraciones, dando los mejores resultados - (geles números 5,6 y 7) con valores alrededor de 1 microgramo.

Así pues la sensibilidad óptima del capilar se centra en 1 microgramo de muestra por capilar.

Otra prueba realizada con Albúmina suero bovina y Ovoalbúmina (Fig nº 25)

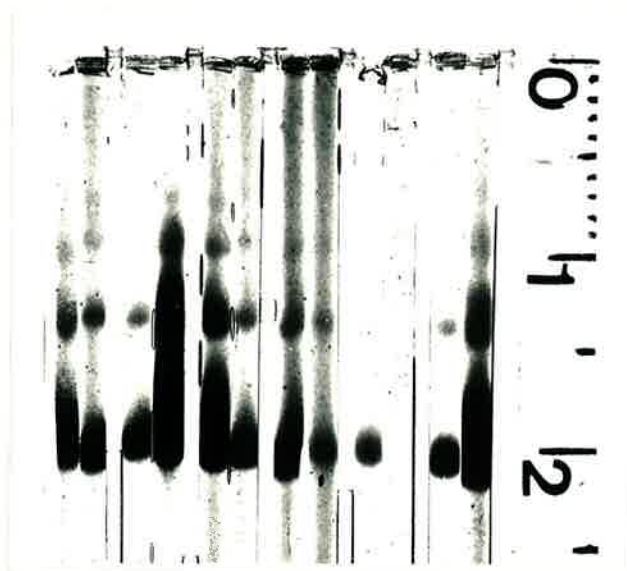


Fig. 24 Bandas de separación electroforética de los componentes de albúmina-suero-bovina, en gel de baja concentración de acrilamida.

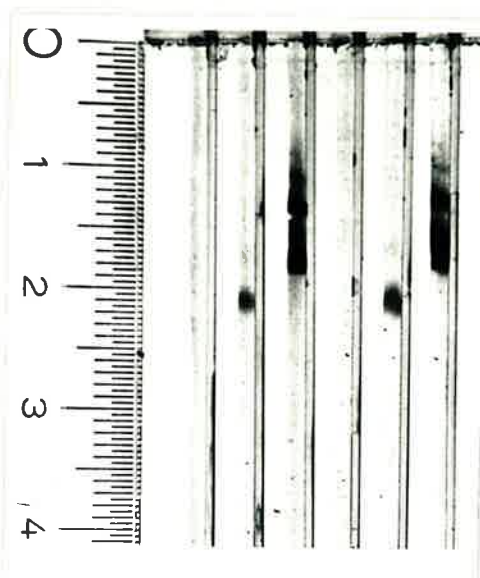


Fig. 25 Idem con albúmina-suero-bovina (geles 3 y 6) y ovoalbúmina (geles 2 y 5).

II-2-5 DESCRIPCION DEL METODO EMPLEADO PARA GELES DE MEDIA Y ALTA
CONCENTRACION DE ACRILAMIDA

II-2-51 Introducción. Metodos

Para los geles de concentración de Acrilamida de alrededor de un - 15% (concentración media) y de alrededor de un 25% (alta concentración) se realiza un método común de extracción de gel (II-2-52-e) diferente que en el caso anterior.

Se sigue el método de G.R. Chalkley (18) modificado, en el estudio de muestras macromoleculares de peso molecular media. La concentración de acrilamida es del 15% (Ver II-2-52).

En el estudio de Macromoléculas de bajo peso molecular es indicado el metodo de Gunther Bretzel (19), en el cual el tamaño del poro - del gel se hace menor, aumentando la concentración de acrilamida (30%). (Ver II-2-53)

Básicamente se usa en estos dos métodos, los mismos aparatos y técnicas descritos en el método empleado en geles de baja concentración de Acrilamida (II-2-4). Detallándose a continuación los procedimientos y las diferencias.

II-2-52 Desarrollo de la técnica de microelectroforésis, para con-
tracción media de Acrilamida, según el Método de Chal-
kley.

II-2-52-a Composición del gel y soluciones tampón.

Para preparar el gel hay que preparar tres tipos de disoluciones: A, B y C, que una vez adecuadamente mezcladas, comprendan el líquido a gelificar.

Solución A:

Acrilamida	60%
Bisacrilamida	0,40%

Solución B:

Acético glacial	v/v	43,2%
Temed	p/v	4%

Es conveniente verter el temed sobre el acético, manejando éstos con propipeta y pipeta.

Las soluciones A y B pueden guardarse en la nevera bastante tiempo. El día anterior al de preparación del gel, se saca la solución A de la nevera.

La solución C, debe ser hecha cada vez que se prepare el gel.

Solución C:

Persulfato amónico	0,21%
Urea	10 M

La mezcla que compondrá el líquido a gelificar para 24 tubos es:

Solución A	2 partes	1,6 ml.
Solución B	1 parte	0,8 ml.
Solución C	5 partes	4 ml.

Se preparan estas cantidades en tres Erlenmeyer y se hace el vacío

durante 5 minutos en una campana apropiada, con el objeto de extraer el aire disuelto, que podría provocar burbujas en el gel.

Los tampones que se utilizan son diferentes en ambas cubetas del aparato de electroforésis.

En la cubeta superior la concentración de acético es mayor que en la inferior.

Tampón cubeta superior:

Acético (Merck) 1,4 N 74,1 ml por litro

El PH inicial es aproximadamente 2,3. Se prepara una solución concentrada de sosa y se le añade hasta tener un PH final de 2,6.

Tampón cubeta inferior:

Acético glacial 0,4 N 22,9 ml por litro

Como en el caso anterior se añade sosa hasta obtener un PH = 3,7

II-2-52-b Preparación y llenado de capilares

La preparación de los capilares es igual a la descrita en (II-2-44).

El llenado de los capilares varía con respecto al punto (II-2-45), en que puede efectuarse a temperatura ambiente.

El llenado de los capilares empieza inmediatamente después de la mezcla de las tres soluciones una vez desgasificadas.

Generalmente empieza la gelificación a los 20 minutos de efectuar la mezcla. Una vez gelificada, se colocan en la cámara fría en espera de ser utilizadas al día siguiente.

II-2-52-c Preparación y colocación de las muestras.

Las muestras que por su cantidad obtenida, pueden pesarse en las balanzas de precisión se separan de las no pesables. Se pesan unos - 20-30 microgramos, introduciéndose en los capilares portamuestra. La muestra pesada, se disuelve en disolución "Y" cuya composición - es:

Urea	10 M	4,8040 gr.
Tris		0,0048 gr.

Enrasar en 10 ml de agua destilada.

Para las muestras no pesables se sigue un procedimiento distinto. Normalmente se obtienen unos pocos microgramos enganchados a las paredes del tubo de ensayo. Se lavan las paredes del tubo con 100 microlitros de Tris (10^{-2} M, PH = 8,5). A continuación se cogen 6 microilitros y se echan en un capilar portamuestras, al que previamente se han añadido 50 mgr. de urea sólida. Los 94 microlitros restantes se guardan en el congelador por si se necesitan hacer nuevos experimentos.

Las muestras que necesiten incubarse, se disolverán en Tris, con urea y con 5% de β -Mercaptoetanol, empleando las lambdas necesarias para tener aproximadamente 1 microgramo por microlitro. Calentándose durante una hora a 37°. Utilizando en este caso el soporte para incubación (II-2-46 y 48).

II-2-52-d Equilibrado y Electroforesis.

El equilibrado dura 1 hora a 300 v y una intensidad total de 12 mA. La electroforesis propiamente dicha se efectúa a 300 v, intensidad 12 mA., durante 22 minutos. Produciéndose de igual manera que en - los puntos (II-2-47 y 49).

II-2-52-e Extracción, Tinción y Destinción.

Una vez efectuado el recorrido electroforético de las muestras, se procede a la extracción de los geles del interior del capilar.

Para ello se utiliza un soporte de latón en el cual se le ha practicado una ranura (canal) de 1,5 mm de radio (Ver II-2-37).

Se coloca el capilar en dicha ranura. Golpeándose la parte superior del capilar con un martillo, quebrándose el cristal pero sin que el martillo llegue a dañar el gel, ya que éste queda protegido dentro de la ranura.

Se quitan cuidadosamente los trozos de cristal, aún adheridos al gel, mediante unas pinzas. Estando el gel dentro de una cápsula Petri llena de agua destilada.

Efectuada esta operación, se colocan en la cubeta de tinción.

Procediéndose a la tinción y destinción de la misma forma que la indicada en (II-2-411 y 412). Excepto la composición de los líquidos empleados. En este caso son:

Líquido de tinción:

Amido Black 0,2%

Etanol 20%

Acético 7%

Se remueve y se filtra.

La duración de la tinción es de 30 minutos.

En cuanto a la destinción, se emplea:

Etanol 35%

Acético 7%

II-2-52-f Fotografiado. Resultados.

Para el fotografiado se procede como en el método anterior (II-2-413)

Analogamente si se desea el trazado de curvas de densidad óptica
(II-2-414).

Resultados (Ver Fig. 26, 27 y 28).

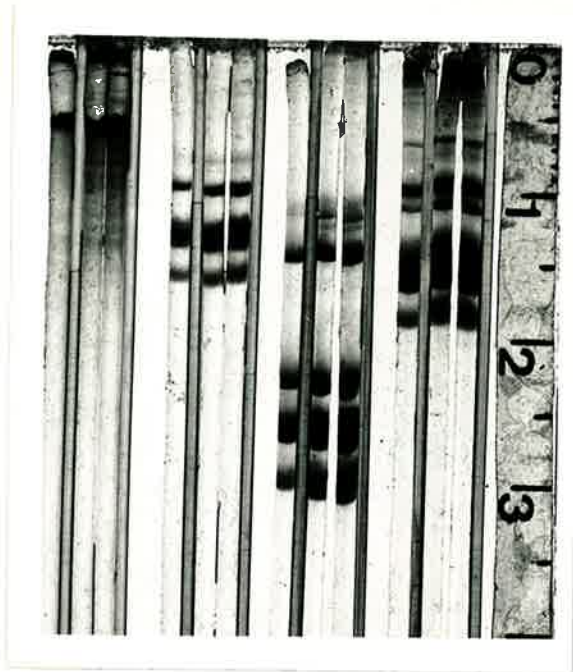


Fig. 26 Bandas de separación electroforética de distintas muestras. Cantidad analizada aprox. 1 microgr.
 Geles: 1, 2, 3; proteína de esperma de Spísula S.
 Geles: 4, 5, 6; Histonas totales de timo de ternera.
 Geles: 7, 8, 9; Proteínas esperma Chiton divarens.
 Geles: 10, 11, 12; Proteínas esperma de ostra.

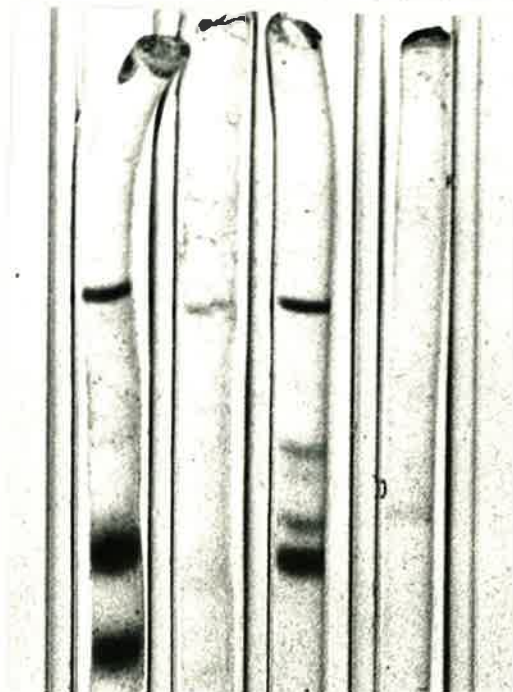


Fig. 27 Idem de un fraccionamiento de histonas nucleares de rana.

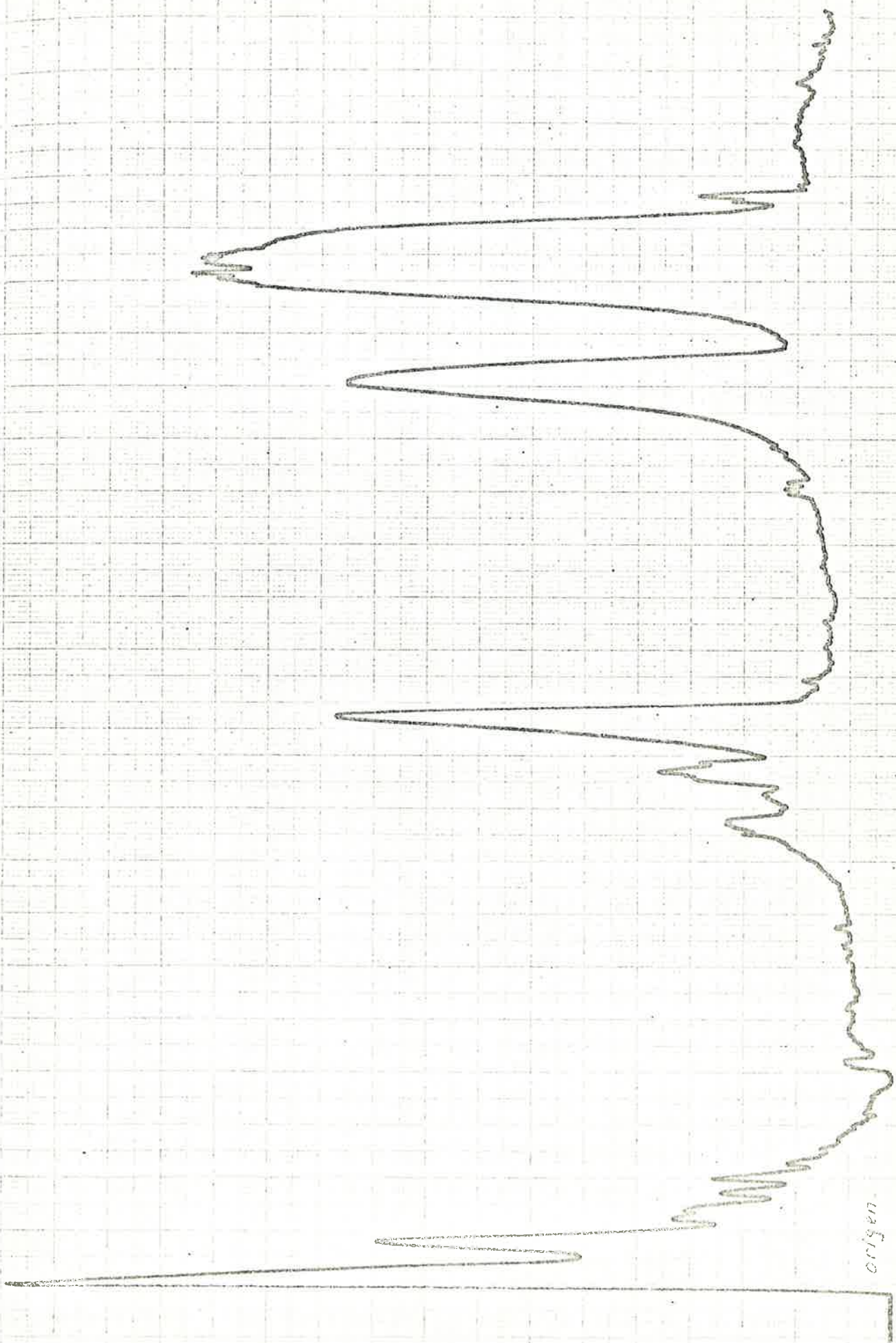


Fig. 28 Curva de densidad óptica de las bandas del gel nº7 (Fig. 26).

origen

II-2-53 Desarrollo de la técnica de microelectroforésis para alta concentración de acrilamida. Según el método de Gunther Bretzel.

II-2-53-a Composición del gel y soluciones tampón.

En este método la proporción total de acrilamida es del 30%. El tamaño del poro es menor con lo que es más apropiado para la separación de macromoléculas de bajo peso molecular.

La consistencia física del gel es de mayor rigidez que los anteriormente descritos siendo quebradizos.

Las soluciones de que se compone el gel son:

Solución A:

Acrilamida	40%
Bisacrilamida	1,2%

Solución B:

Temed	16%
-------	-----

Solución C:

Acido acético	9,2 N - 528 ml/litro de H ₂ O
---------------	--

Solución D:

Persulfato Amónico	0,4%
--------------------	------

Todos los porcentajes son sobre agua destilada como solvente.

La mezcla se efectúa con la siguiente proporción:

Solución A	6 partes	4 ml
Solución B	0,5 partes	0,33 ml
Solución C	1 parte	0,66 ml
Solución D	0,5 partes	0,33 ml

Se utiliza como tampón; tanto en la cubeta superior como en la inferior;

A. Acético 1N

Para disolver las muestras, se usa la disolución:

A. Acético 0,1 N

Sacarosa 1 N

II-2-52-b Diferencias respecto al procedimiento anterior.

Básicamente todos los procesos descritos para el método de Chalkley (II-2-52), tales como preparación, llenado de capilares, colocación de muestras, etc son los mismos.

Solamente hay que tener en cuenta los nuevos parámetros:

Equilibrado	300 V ;	10,5 mA ;	1 hora
Electroforésis	300 V ;	10,5 mA ;	15 minutos
Tinción			45 minutos

Notas:

No es recomendable meter el gel en la nevera, luego de que ha gelificado.

Por su naturaleza, no quedan unas bandas muy definidas, sino unas zonas teñidas.

II-2-53-c Resultados

Ver fig. nº 29

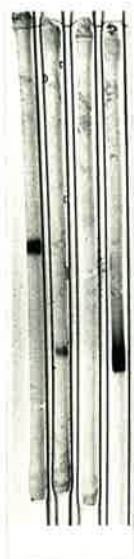


Fig. 29 Recorrido electroforetico en gel de alta concentración de acrilamida, de distintos extractos de - protaminas nucleares básicas de esperma de calamar.

II-2-6 MICROELECTROFORESIS EN CAPILAR DE 0,4 m/m DE DIAMETRO INTERIOR

II-2-61 Introducción, Métodos, Aconplamiento al aparato de electroforesis

El capilar de 0,4 mm. de diámetro interior supone una reducción - importante respecto al tamaño del capilar, descrito anteriormente, esta reducción de tamaño redonda en una mayor sensibilidad. Situándose ésta sensibilidad óptima alrededor de la décima parte de la del capilar de diámetro 1,2 mm., es decir $1 \cdot 10^{-7}$ gr. de muestra por gel. En contrapartida el manejo se hace más delicado y difícil.

Estos capilares tipo Yankee Micropet 10 de la casa B-D (F9), - ver (Fig. nº 30) se cortan en trozos de 22 mm. de longitud.

Sus dimensiones son:

Longitud	22mm.
Diámetro interior	0,41 mm.
Diámetro exterior	1,2 mm.
Sección	$0,132 \text{ mm.}^2$
Volumen específico	1,32 /cm
Volumen total	2,64

Se han efectuado pruebas según se detalla más adelante, con un método de Chalkley modificado, no existiendo aparentemente ningún impedimento para aplicar los métodos de Shapiro (II-2-4) o el de Gunther Bretzel (II-2-53)

Se aprovecha el mismo aparato de electroforesis utilizado con el capilar de 1,2 mm., mediante tubo de silicona de 0,7 mm. de diámetro interior y 1 mm. de diámetro exterior cortado en trozos de unos 8 mm., se empalma el capilar 1,2 con el de 0,4.

Se corta el capilar 1,2 en una longitud de 30mm. empalmándose éste a la cubeta superior.

Dado que este tipo de dimensiones del gel para electroforesis es de uso apropiado en casos especiales, no es necesario utilizar - los 24 geles, que el aparato es capaz de utilizar a la vez. Se - colocan el número de geles a usar, simétricamente distribuidos - respecto al centro, tapándose los restantes agujeros mediante ca pilares 1,2 colocados al revés.

II-2-62 Modificación del Método. Accesorios

Básicamente se usa el método dado por Chalkley y descrito en (II-2-52), modificando la composición de los tampones de la cubeta y de las muestras; La modificación tiene por efecto crear un mayor potencial eléctrico en la solución de la muestra, con lo que esta se concentra rápidamente en el origen del gel empezando a la vez a recorrer el gel.

El nuevo tampón de la cubeta superior e inferior, es:

Acido Acético 0,9 N Ajustando el PH a 2,9 con solución concentrada de hidróxido sódico.

Solución para las muestras:

Urea 8 M

Acido acético 0,05 N

El aparato de electroforesis y algunos accesorios utilizados para el capilar 1,2 mm. son también de uso con el capilar 0,4. Necesitándose otros accesorios más adecuados; así:

Microjeringa: de 1 microlitro (Ver fig. 21)

Base metálica ranurada: ranura de 1,5 mm. (Ver II-2-37)

Cubetas de Tinción y destinción: medidas exteriores:

53 mm x 35 mm x 6 mm, con 8 departamentos (Ver fig. 31).

Vaciador: consiste en un pequeño trozo de alambre de diametro 0,25 mm. que se introduce dentro del capilar y mediante rotación, vacia de gel, el trozo correspondiente.(fig. 32). Esta construido con el capilar de 0,4 mm.

II-2-63 Preparación y llenado de capilares

El capilar original tiene una longitud de 100mm.

Por capilaridad y ayudado con una perilla de goma, se llena completamente de líquido a gelificar. Cada capilar, una vez formado el gel, se corta en cinco trozos de 20 mm. de longitud. Calculándose el número de capilares enteros que se necesitan en función de los geles a utilizar.

El líquido a gelificar debe estar muy bien desgasificado y una vez llenos los capilares se colocan en posición horizontal dentro de la Cámara fría. Como prevención de la formación de burbujas de aire en el gel.

A continuación se empalma al capilar normal y éste a la cubeta superior del aparato de electroforesis.

II-2-64 Equilibrado. Colocación de las muestras

Se llenan las cubetas con el tampón. Se rellenan los capilares 1,2 de tampón, eliminando la burbuja de aire mediante inyección con la jeringa de lcc.

Seguidamente se conectan los electrodos a la fuente de alimentación; con una tensión de 200 Voltios circula una corriente de unos

160 microamperios por gel.

Se finaliza el equilibrado en 15 minutos. Circulando una corriente de unos 70 microamperios por gel.

Se guarda en un recipiente el líquido tampón superior, se quitan uno por uno los capilares que contienen el gel y se les elimina mediante el vaciador (fig. 32), medio o un milimetro de la longitud del gel.

Vaciar medio mm. supone dejar un hueco de 0,066 y

Vaciar 1 mm. es eliminar 0,132 de gel.

Este hueco producido sirve para colocar la solución de la muestra. Si esta está relativamente concentrada, bastará vaciar medio mm., en el caso que esté diluida convendrá vaciar 1 mm. Ha de tenerse en cuenta que la sensibilidad óptima, es decir la cantidad más adecuada a este capilar es del orden de 1×10^{-7} gr.

Se coloca el líquido-muestra mediante una microjeringa de 1 de capacidad introduciendo la punta de la aguja en el hueco vaciado de gel. De esta forma se introduce el líquido muestra sin que quede burbuja de aire.

Puede ocurrir que solo se tenga una idea aproximada de la cantidad de muestra que haya que analizar. En estos casos se harán diversas pruebas a diferentes concentraciones para lograr un buen resultado. Colocado la muestra encima del gel se vuelve a colocar empalmándolo con el capilar 1,2. Este capilar aún conserva el líquido tampón. Se le introduce con cuidado, de forma que no quede burbuja de aire, ni se diluya el líquido muestra en el tampón.

Se coloca de nuevo el tampón que se había guardado anteriormente, - estando listo para el recorrido electroforético.

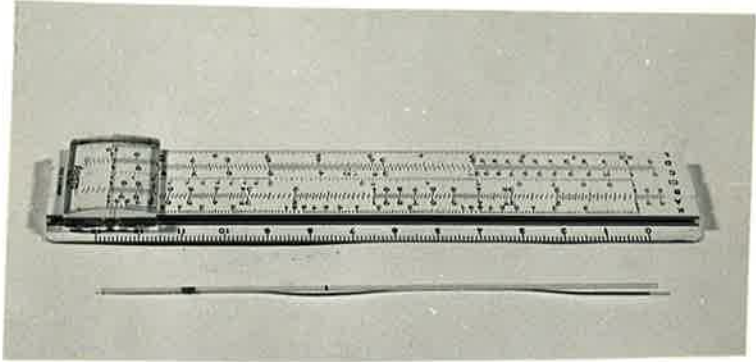


Fig. 30 Capilar de 0,4 mm de diámetro interior

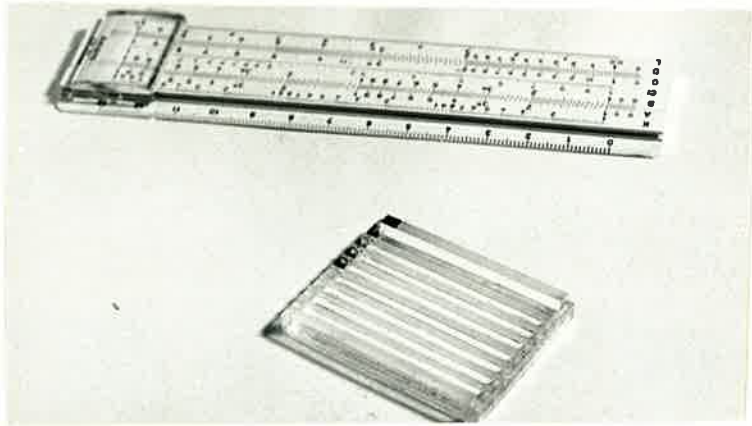


Fig. 31 Cubeta de tinción y destinción

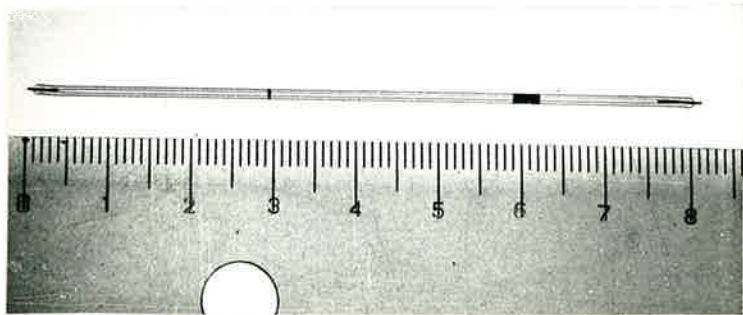


Fig. 32 Vaciador

II-2-65 Electroforesis. Extracción del gel

Se conectan los electrodos a un potencial de 125V. circulando unos 45 microamperios por gel. La operación finaliza entre los 5 y 10 minutos, según se quiera mayor o menor separación y recorrido de muestras. Se obtienen buenos resultados con tiempo de recorrido, de 8 minutos.

Finalizada la electroforesis se extrae uno a uno los capilares y se introducen en la ranura de la base metálica, quebrándose el cristal del capilar mediante percusión cuidándose con la base plana de un martillo.

II-2-66 Tinción y Destinción

Con cuidado se coge el gel extraído con las pinzas de punta acodada (fig. 22) y se deposita en la cubeta apropiada (fig. 31).

La tinción dura 10 minutos.

A continuación se lavan con líquido de destinción según el procedimiento descrito (II-2-412).

Los trozos de cristal adheridos al gel se van desprendiendo durante la tinción y la destinción. Pueden acabarse de quitar ayudado con -

pinzas, en una cápsula Petri mojada con líquido de destinción.
El tiempo de destinción es de 15 a 20 minutos.

II-2-67 Resultados

Las fotos nos. 33 y 34 muestran la electroforesis realizada con ovoalbúmina y esperma de mejillón apreciándose claramente en és ta última las tres bandas características de separación.

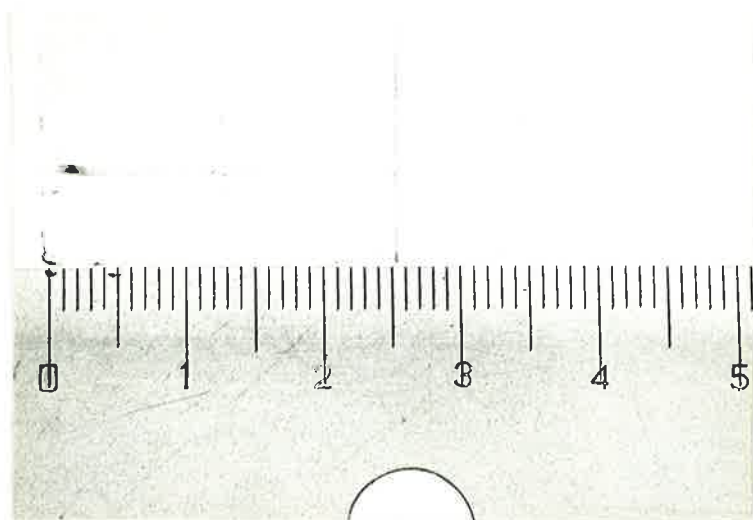


Fig. 33 Microelectroforesis en gel de 0,4 mm de diámetro. Muestra: ovoalbúmina.

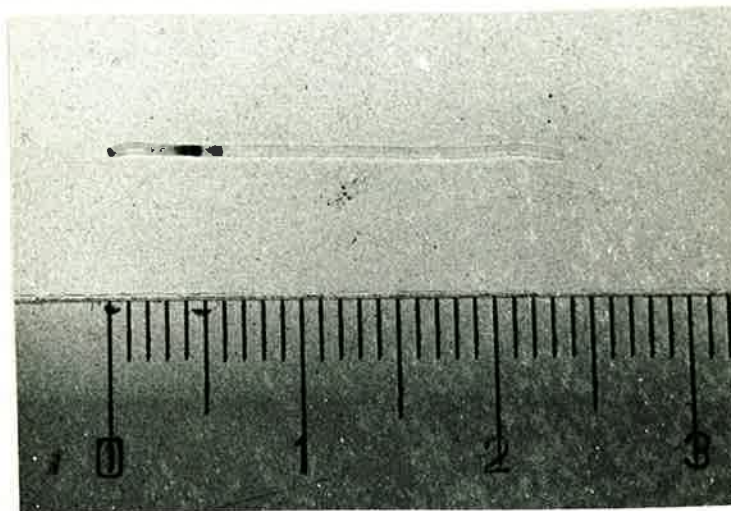


Fig. 34 Microelectroforesis en gel de 0,4 mm de diámetro. Bandas de separación de proteína del espermatozoide de mejillón.

II-3 ELECTROFORESIS PREPARATIVA

II-3-1 INTRODUCCION

La electroforesis preparativa es una modalidad de electroforesis distinta de la analítica. Mientras que el fin de la analítica es conocer la cantidad, el peso molecular o simplemente la composición de la muestra a estudio, en la electroforesis preparativa - se trata de recuperar los componentes de ésta una vez separados por el proceso de electroforesis.

Así pues el proceso consta de dos fases:

La primera fase es la de separación electroforética de los componentes de la muestra.

La segunda fase es la recuperación de estos componentes.

En esta segunda fase se describen dos métodos de recuperación que han sido probados: Por elución y por doble electroforesis.

Se realiza la separación electroforética de los componentes de la muestra en un aparato, tal como muestra la fig. 35, usándose el método de Chalkley para esta electroforesis. El gel es de tipo capa, colocándose la muestra en una ranura única horizontal, practicada a lo largo de la parte superior del mismo. Finalizado el tiempo normal de recorrido electroforético, quedan separados los componentes tal como se muestra en la fig. 36.

En la fase de recuperación; por el método de elución del tinte, - se procede de la siguiente manera: Una vez extraído el gel del aparato, luego del recorrido electroforético, se le tinte y destiñe según el procedimiento usual, con lo cual quedan perfectamente -

visualizadas las bandas de separación. Se cortan las bandas que interesen recuperar y se trinchan en trozos pequeños. Por elución se separa la proteína con el tinte del gel. Finalmente se precipita la proteína y se seca al vacío.

En esta segunda fase y por el método de segunda electroforesis; una vez hecha la primera electroforesis y extraído el gel del aparato se cortan los bordes del mismo, teniendo por confrontación de la parte central del gel, con los extremos teñidos se sabe aproximadamente donde están situadas las bandas. Se cortan estas zonas donde han de estar las separaciones de la muestra y se efectúa con ellas una nueva electroforesis hasta que pasan del gel al tampón inferior. A continuación se liofiliza y lava el producto, obteniendo la separación deseada.

En las pruebas efectuadas, los mejores resultados se han obtenido con este último método de extracción por doble electroforesis.

A continuación se describe el proceso de la electroforesis preparativa y luego los dos métodos de extracción de los componentes de la muestra.



II-3-2 SEPARACION ELECTROFORETICA DE LOS COMPONENTES. APARATO USADO

Esta electroforesis propiamente llamada electroforesis preparativa, tiene por objeto separar los diferentes componentes de la muestra. Interesa colocar el máximo de muestra para poder obtener mayores - cantidades en las separaciones, sin que llegue a saturarse el gel. La cantidad óptima se encuentra en unos 80 miligramos de muestra.

Se usa el aparato que se muestra en la fig. 35. Diseñado por Rosario Gonzalez(20), sus principales características son:

Aparato tipo capa vertical, refrigerado por serpentín en ambas caras del gel.

Volumen necesario aproximado de líquido de gelificación 150ml.

Volumen aproximado de tampón necesario en cada cubeta: 3/4 de litro

Se ha construido un ranurador que produce un agujero uniforme en - el gel de unos 7 mm. de profundidad con un ancho de 4 mm. y largo 100 mm.

Se utiliza el método de Chalkley (II-2-52), modificado en la composición tampón:

Tampón c. Superior:

A. Acetico 1,4 N

Tampón c. Inferior:

A. Acetico 0,4 N

II-3-21 Llenado. Colocación del ranurador. Gelificación.

La composición del gel es la misma que la usada por Chalkley, aquí las cantidades que se emplean son:

Solución A 40 ml

Solución B 20 ml

Solución C 100 ml

Estas tres soluciones se desgasifican por vacío antes de mezclarse. Se coloca la parte de la cubeta superior del aparato, apretándose ligeramente las tuercas de sujeción.

Se pone el aparato, sobre un lugar llano y horizontal y se eleva la parte delantera mediante las patas que van roscadas, inclinándose el aparato ligeramente hacia atrás, a continuación se va llenando poco a poco el espacio entre la base y la cubeta superior, de líquido a gelificar, cuidando que no quede burbuja entre ambos.

Se coloca el ranurador de lámina única y se deja gelificar, lo que ocurre al poco rato, dejándose luego el conjunto en la cámara fría hasta el momento en que deba ser usado.

II-3-22 Equilibrado. Colocación de la muestra. Electroforesis.

Se corta y quita el gel que sobresale del ranurador. Se aprietan más las tuercas de sujeción y poco a poco se procede a remover

de su sitio el ranurador.

A continuación se coloca el aparato en posición vertical, llenándose la cubeta inferior con su tampón hasta que supere en un centímetro - aproximadamente el nivel del electrodo, llenándose asimismo la cubeta superior con su tampón hasta que su nivel suba 1 cm por encima - del borde del gel.

La evacuación de calor del gel, al paso de la corriente, se consigue haciendo pasar por el doble serpentín del aparato, una mezcla de agua destilada y metanol al 50% a 0°C., procedente de un minicriostato de la casa Colora (F10).

Se conectan los bornes de los electrodos a la fuente de alimentación de corriente continua, iniciándose de esta forma el equilibrado, con una tensión de 300V y 150 mA, durante 8 horas. La tensión y corriente al final de las 8 horas es de 320V - 45 mA.

Finalizado el equilibrado se extrae 1/3 parte del tampón de la cubeta superior, secándose el líquido remanente sobre el gel y en la ranura por medio de papel absorbente.

Se pasan 80 gr de muestra y se disuelven a 1 ml de solución para muestra. En el caso de que queden partículas sin disolver, se depositan éstas por centrifugación. Por medio de la jeringa de lcc. se coloca la muestra en la ranura. El aparato, en posición vertical, debe tener la ranura del gel horizontal para que la muestra se reparta uniformemente.

Colocada la muestra, se vuelve a poner el tampón extraído anteriormente en la cubeta superior. Conectándose a continuación la fuente de corriente continua. La electroforesis se efectúa con miliamperaje inicial de 45 mA. y 300V, durante 6 horas. En la fig. 36 se aprecia las bandas de separación de componentes de una muestra de esperma de mejillón.

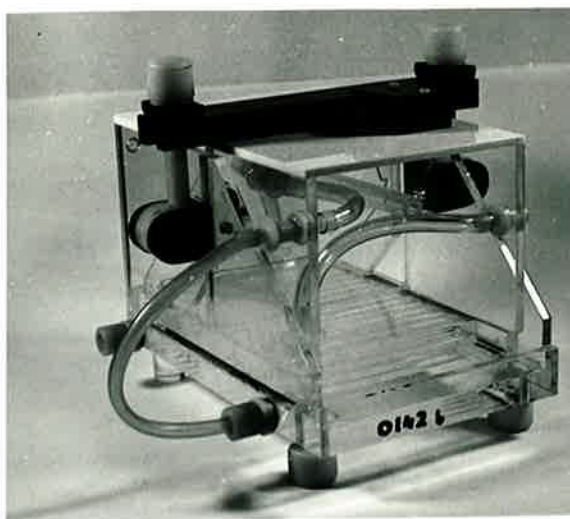


Fig. 35 Aparato usado para la electroforesis preparativa



Fig. 36 Bandas de separación de una muestra en la electroforesis preparativa

II-3-3 RECUPERACION DE LOS COMPONENTES

Se describe a continuación dos métodos distintos de recuperación de los componentes separados por la electroforesis preparativa.

El primer método tiene la ventaja de visualizar, por tinción donde se encuentran las bandas, sin embargo es un proceso algo más lento y su rendimiento es algo menor que el segundo. En las pruebas efectuadas no se ha logrado eliminar totalmente el tinte ya sea con Amido Black o Coomassie Blue. El segundo método, por doble electroforesis, tiene la dificultad que el corte de la zona del gel donde se sitúa el componente a extraer, es aproximado, existiendo el peligro de coger solo parte del componente o incluso coger mezcla de varios sin embargo se ha elegido como método de trabajo en el L Q E, este segundo método por su mayor eficacia.

II-3-31 Metodo de extracción por elución

Realizada la electroforesis preparativa propiamente dicha, se extrae el gel del aparato de electroforesis (II-3-2) y en este método se tiñe todo el gel con "Coomassie Blue".

Las pruebas efectuadas indican que este tinte tiene ventaja frente al Amido Black, pues al ser menor la fuerza de unión con la muestra, es más fácil separar ésta.

Este proceso se basa en el método descrito por P. C. Huang y C. Mura (21).

La composición del líquido de tinción, es la siguiente:

Coomassie Blue	0,25 %
Metanol	5 partes
Acético	1 parte
Agua Destilada	5 partes

La tinción dura un par de horas.

Al cabo de las cuales se procede a destear el tinte sobrante.

Líquido de destinción:

Metanol	1 volumen
Acético	2 volúmenes
Agua Destilada	17 "

Se puede apreciar claramente los resultados al cabo de 24 horas de destinción pasiva, habiendo renovado un par de veces este líquido. Si se hiciese una destinción electroforética, su duración sería solo de unas seis horas. En la destinción electroforética se hace correr el tinte frente a un potencial eléctrico, extrayéndose así del gel. El tinte usado, tiene una carga negativa; yendo por tanto hacia el Ánodo. Las bandas teñidas no tienen carga, por lo que quedan invariables. Dos masas de algodón hidrófilo empapado en líquido de destinción, se colocan a lo largo de los bordes del gel, introduciéndose en estas los electrodos que se conectan a la fuente de corriente continua. El tinte queda en el algodón que empapa el ánodo. Una vez indicadas claramente las bandas de separación de componentes de la muestra original, por medio del tinte, se procede a cortar del gel la/s banda/s que interese recuperar. Separada la banda

a recuperar se trocea ésta mediante unas tijeras muy limpias, en trocitos de aproximadamente un milímetro cúbico. Puede usarse para este menester, el cuenco que ofrece un vidrio de reloj mediano. Se echa por encima agua destilada y se escurre.

Se extrae la muestra, junto con el tinte por elución con vibración, a temperatura de 37°C.

La disolución para elución es:

Fosfato Sódico	0,05 %	PH 7,5
Sodiododecilsulfato (SDS)	0,1 %	
Fenilmetil sulfonil fluor	1	

Se coloca la muestra troceada en un frasco añadiéndole aproximadamente un volumen doble de disolución para elución, del volumen que tenía la banda del gel. Se coloca en un Rotovapor, cuya misión es dar movimiento de giro al conjunto y a su vez se semisumerje en un baño de agua de temperatura regulada automáticamente a 37°C. Al cabo de unas 6 horas, se recoge el líquido resultante renovándose con una cantidad igual. Al cabo de unas 10 horas se recoge de nuevo el líquido resultante, añadiéndose el ya recogido. Pueden hacerse unas extracciones pero cada vez se obtienen menores rendimientos.

Se precipita la muestra mediante HCl con una concentración final 0,2 M. En el congelador, durante 15 minutos. El precipitado puede recuperarse por centrifugación a 10.000 x g, durante 20 minutos y lavado;

Primer lavado:

Acetona	50 %	0,5 ml
Clorhídrico	50 %	0,5 ml

Segundo lavado:

Acetona

Finalmente la muestra se seca la vacío.

II-3-32 Método de doble Electroforesis

Extraído el gel del aparato, se deposita en una placa plana de metacrilato bien limpia y se cortan mediante una hoja de afeitar, los laterales verticales del gel, en una anchura de unos 22 mm. Introduciéndose en líquido de tinción de Amido Black durante una hora. Al cabo de la cual se destiñen electroforéticamente.

La destinción electroforética tiene la ventaja frente a la destinción empleada normalmente, de su mayor rapidez.

En las tiras extremas, ya desteñidas, se pueden observar los laterales de las bandas. Estas se colocan junto al trozo de gel central y por comparación se cortan las bandas correspondiente (fig. 37).

Es conveniente el manejo del gel con guantes del tipo uniuso para evitar su contaminación. Para la extracción de la muestra se realiza una segunda electroforesis en un aparato, tal como muestra la fig. 38.

El aparato utilizado para la segunda electroforesis consta de dos compartimentos separados por una cámara de refrigeración. Estos dos compartimentos hacen las veces de cubeta superior y cubeta inferior del aparato de electroforesis usado normalmente. En la cubeta "Superior" se encuentra el ánodo (+); la denominaremos cubeta-ánodo. La cubeta "inferior" se encuentra el cátodo (-) y el gel, la denominaremos cubeta-gel.

Los electrodos son de platino, situados a lo largo de las cubetas, a una altura de 2,5 mm. del fondo y a una distancia de 5 mm. de la pared. El objeto de que estén a tan poca altura, es el de usar la cantidad mínima de tampón en la cubeta-gel, con vistas a que el líquido resultante sea más rápido de liofilizar.

Los tampones que se utilizan son:

Cubeta-ánodo	A. Acetico	1	N
Cubeta-gel	A. Acetico	0,2	N



La cantidad de tampón que se coloca en la cubeta-gel es de 10 ml. En la cubeta-ánodo 20 ml.

En la cámara de refrigeración, tiene su entrada el líquido del minicriostato, por el agujero situado más bajo; la salida se realiza por el otro agujero. Ambos son de 10 mm. de diámetro.

El trozo de gel que contiene la banda de muestra separada, suele tener unas medidas de 80 x 20 x 7 mm. Se coloca en la cubeta-gel encima de los 3 apoyos situados junto a la cámara de refrigeración de medidas 8 x 3 x 2 mm., y pegado a la pared de la cámara de refrigeración.

La unión entre la cubeta-ánodo con el gel y cubeta-gel, se hace a través de una hoja doblada de papel celulosa. Este papel se coloca encima del gel, procurando que quede bien pegado a su sección superior. Y siguiendo la forma de la cámara de refrigeración, se empape en el tampón de la cubeta-ánodo.

La corriente pasa a través del papel y del gel hasta el cátodo cerrando el circuito. La muestra por efecto electroforético va pasando del gel hacia el tampón de la cubeta-gel en donde se mezcla con dicho tampón.

Los parámetros de esta segunda electroforesis son:

350 Volts. - 25 mA - 3 horas - Refrigeración 0°C.

Extraída la muestra separada del gel, queda ésta en el tampón. Se separa por liofilización la muestra del tampón. La liofilización se consigue congelando la mezcla tampón-muestra y evaporando el tampón al vacío.

Posteriormente se lava el producto con solución de Clorhídrico - 0,25 N y Acetona 6 Vol. con lo cual precipita la proteína, se centrifuga durante 10 minutos a 6.000 rpm, depositándose ésta. Se la va tres veces con acetona y se seca al vacío.

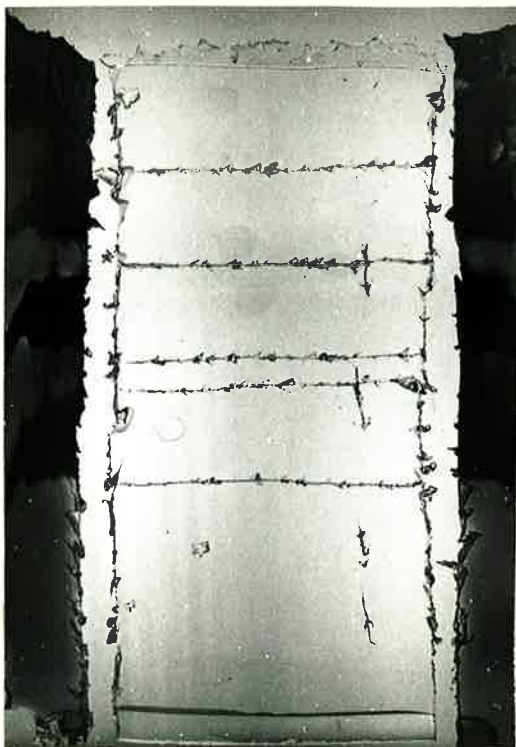


Fig. 37 Laterales del gel de electroforesis preparativa mostrando las bandas de separación de una muestra, teñidas, y los cortes de la parte central del gel según la situación de las bandas de separación

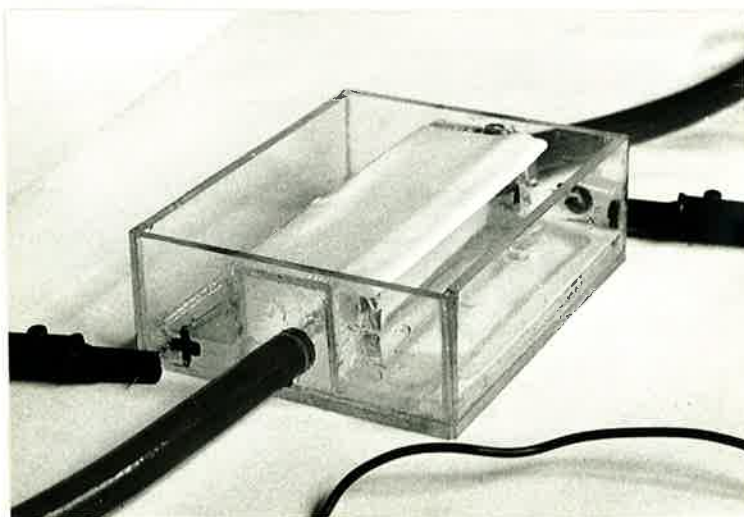


Fig. 38 Aparato para la segunda electroforesis.

II-3-33 Comprobación de Resultados según el método de doble electroforesis. Electroforesis analítica.

Para comprobar la pureza de la separación obtenida se procede a analizar cada muestra separada mediante electroforesis.

Se ha usado el procedimiento de microelectroforesis de 0,4 mm. de diámetro para comprobar la separación.

En la fig. 39 se ve la comparación entre las tres bandas de separación de la muestra de Esperma de mejillón y la electroforesis del resultado de la separación por electroforesis preparativa según el método de doble electroforesis.

Las muestras se hicieron correr durante 8 minutos a un potencial de 125 Voltios, circulando unos 45 microamperios por gel.

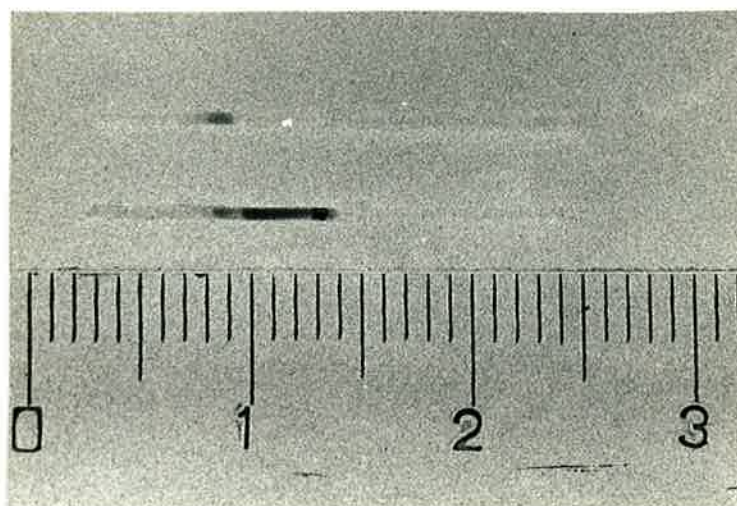


Fig. 39 Electroforesis analítica efectuada sobre una muestra con sus características bandas de separación (Y), y sobre la recuperación por segunda electroforesis, de la primera banda separada por electroforesis preparativa de la misma muestra (II). Realizada en geles de 0,4 mm de diámetro.

Esta Tesis fue leída el día 11 de Marzo de 1974
y fue calificada en Sobresaliente "cum laude"

R. P.

J. Galvan

F. B.

Subisana

G. Casanova

M. M.