

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina;
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.

Cada grupo de especialidades tiene su propio color de cubierta.

Todos los artículos publicados son reproducciones exactas de los textos realizados por los mismos autores.

El curso resumido en esta publicación fue impartido entre el 5 y 9 de marzo de 1990, en el Centro de Biología Molecular de Madrid.

Edición no venal de 450 ejemplares que se reparten gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 252-Cur
Curso Experimental de Electroforesis
Curso Experimental de Electrofor
1031500



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Curso Experimental de Electroforesis Bidimensional de Alta Resolución

Organizado por

Juan F. Santarén

Julio E. Celis
James I. Garrels
Joël Vandekerckhove
Juan F. Santarén
Rosa Assiego

FJM
Uni
252
Cur

252

Fundación Juan March

Serie Universitaria

252



Curso Experimental de
Electroforesis Bidimensional de
Alta Resolución

Organizado por

Juan F. Santarén

Julio E. Celis

James I. Garrels

Joël Vandekerckhove

Juan F. Santarén

Rosa Assiego



Fundación Juan March

Castelló, 77. Teléf. 435 42 40

28006-Madrid

Fundación Juan March (Madrid)

El curso resumido en esta publicación fue impartido por sus autores entre el 5 y 9 de marzo de 1990, en el Centro de Biología Molecular de Madrid.

Depósito legal: M-23.018/1990

ISBN: 84-7075-407-6

Impresión: Ediciones Peninsular. Tomelloso, 27. 28026 Madrid

I N D I C E

	<u>Página</u>
PREFACIO.....	5
1. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE ALTA RESOLUCION.....	7
1.1. INTRODUCCION.....	9
1.2. REACTIVOS.....	11
1.3. SOLUCIONES Y BUFFERES PARA LA PRIMERA DIMENSION.....	12
1.4. SOLUCIONES Y BUFFERES PARA LA SEGUNDA DIMENSION.....	14
1.5. MARCAJE DE CELULAS.....	15
1.6. PREPARACION DE LA MUESTRA.....	16
1.7. DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA EN LA MUESTRA.....	18
1.8. PRIMERA DIMENSION.....	19
1.9. COMENTARIOS EN RELACION CON LA PRIMERA DIMENSION.....	23
1.10. SEGUNDA DIMENSION.....	25
1.11. COMENTARIOS EN RELACION CON LA SEGUNDA DIMENSION.....	27
1.12. APLICACION DE LA PRIMERA DIMENSION EN LA SEGUNDA Y CORRIDA DEL GEL EN PLACA.....	28
1.13. COORDENADAS Y MARCADORES.....	28
1.14. PROCESAMIENTO DE LOS GELES.....	30
1.14.1. FLUOROGRAFIA.....	30
1.14.2. TINCION CON AZUL DE COOMASSIE.....	31
1.14.3. TINCION CON PLATA.....	33
2. MAPAS DE PEPTIDOS DE PROTEINAS EXTRAIDAS DE GELES BIDIMENSIONALES.....	37
2.1. INTRODUCCION.....	39
2.2. REACTIVOS.....	40
2.3. SOLUCIONES Y BUFFERES.....	41
2.4. METODO EXPERIMENTAL.....	42
3. TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS DES DE GELES BIDIMENSIONALES A PAPEL DE NITROCELULO <u>S</u> A.....	47
3.1. INTRODUCCION.....	49
3.2. REACTIVOS.....	51
3.3. SOLUCIONES Y BUFFERES PARA ELECTROTRANSFERENCIA.....	51
3.4. METODO EXPERIMENTAL.....	51

	<u>Página</u>
4. BIBLIOGRAFIA.....	55
5. RESUMENES DE LAS CONFERENCIAS IMPARTIDAS POR LOS PROFESORES INVITADOS.....	59
COMPREHENSIVE 2D GEL PROTEIN DATABASES OFFER A GLOBAL APPROACH TO THE STUDY OF THE MAMMA- LIAN CELL: THEIR LINK TO THE HUMAN GENOME - MAPPING AND SEQUENCING PROJECT. J.E.Celis.....	61
PROTEIN DATABASES BASED ON THE ANALYSIS OF - TWO-DIMENSIONAL GELS. J. I.Garrels.....	63
SEQUENCING OF PROTEINS FROM TWO-DIMENSIONAL GELS. J. Vandekerckhove.....	65
6. LISTA DE PARTICIPANTES.....	67

PREFACIO.

Este manual recoge alguno de los protocolos empleados en el curso práctico sobre "ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE ALTA RESOLUCION" organizado por la Fundación JUAN MARCH dentro del Plan de Reuniones Internacionales de Biología durante el mes de Marzo de 1990.

En el se presentan tanto algunas de las tecnicas empleadas para el desarrollo de geles bidimensionales de alta resolución como para su transferencia a papel de nitrocelulosa o el analisis de mapas peptidicos de proteínas extraidas de los geles.

Aunque no se ha intentado hacer una descripción exhaustiva de referencias y técnicas creo que puede ser util al contener la información suficiente que permita al investigador apreciar la complejidad de las técnicas pero que a la vez le faculte para correr con éxito sus propios geles. Espero que con su correcta utilización puedan obtenerse resultados altamente satisfactorios, pero querría hacer en este prefacio una consideracion de gran importancia: "El dominio de una técnica solo se alcanza sobre la base de un conocimiento teórico, lo mas solido posible, de los principios basicos en los que se fundamenta dicha técnica". Este conocimiento ayuda al investigador a comprender mejor las ventajas e inconvenientes de la tecnica y resulta crítico a la hora de la interpretación final de los resultados experimentales. Mi llamada de atención va pues en el sentido de que en el presente manual no se recogen los fundamentos teoricos de las tecnicas descritas tanto por falta de espacio como por caer fuera del contexto lógico del mismo. Mi consejo al lector es que no se conforme con seguir unicamente los protocolos indicados sino que intente buscar y profundizar en sus aspectos teóricos.

Mi agradecimiento a la Fundación JUAN MARCH por haber hecho posible la realización del curso practico así como a los profesores Julio Celis, James Garrels y Joel Vandekerckhove por su destacada contribución en el mismo. Igualmente mi agradecimiento a mi compañera de laboratorio Rosa Assiego por su ayuda en la preparación del curso y del presente manual.

Juan Fernández Santarén

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE ALTA RESOLUCION

**Juan Fernández Santarén
Rosa Assiego Cruz**

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE ALTA RESOLUCION.

1.1. INTRODUCCION

Desarrollada inicialmente por O'Farrell en 1975, la electroforesis bidimensional ha demostrado a lo largo de estos últimos años ser la técnica más poderosa para resolver mezclas complejas de proteínas de muy diverso origen biológico.

Su gran poder de resolución surge al separar las proteínas en función de dos parámetros independientes: el punto isoelectrónico en la primera dimensión y el peso molecular en la segunda. Dichas separaciones tienen la suficiente resolución como para permitir el análisis de los componentes mayoritarios de mezclas de proteínas a la vez que proporciona el dato del punto isoelectrónico y el peso molecular de cada uno de los componentes resueltos.

En la práctica, la muestra de proteínas a analizar se aplica (normalmente disuelta en urea 9.5 M) en un gel de acrilamida cilíndrico que contiene una mezcla de anfólitos capaces de establecer un gradiente de pH en un campo eléctrico. En estas condiciones, se aplica un determinado voltaje durante un tiempo suficiente como para permitir que las proteínas migren y alcancen su punto isoelectrónico. Este gel cilíndrico se coloca posteriormente en la parte superior de un gel de acrilamida en placa en presencia de SDS. Cuando se aplica el voltaje, las proteínas que ahora estarán negativamente cargadas por su asociación con el SDS, migrarán desde el gel cilíndrico hasta el gel en placa en donde se separarán en función de su peso molecular de acuerdo con su tamaño.

Cuando las separaciones se realizan en condiciones standard, el método es capaz de resolver del orden de 1000 proteínas, un grado de resolución satisfactorio para el análisis de un gran número de problemas biológicos. Como ejemplo, la Figura 1 nos muestra los autorradiogramas correspondientes a las separaciones de isoelectroenfoque (IEF) y de no equilibrio (NEPHGE) de proteínas procedentes de discos imaginales de ala de larvas de *Drosophila melanogaster* marcados "in vitro" con ³⁵S-Metionina.

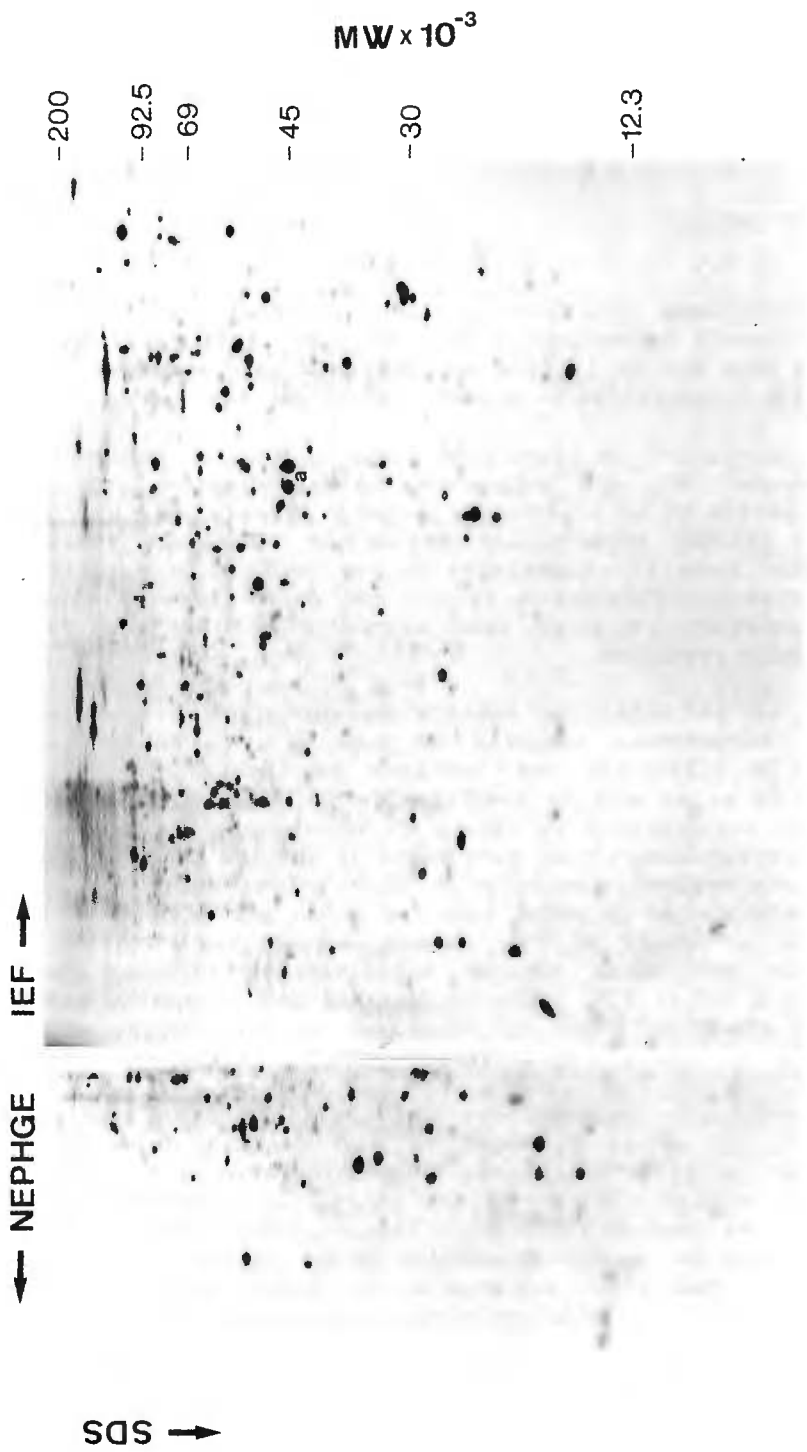


Figura 1

El interes de la tecnica ha ido creciendo progresivamente porque a su alta capacidad de resolución se han ido sumando una serie de nuevas aplicaciones y posibilidades que han aumentado el campo de acción de los geles bidimensionales. El desarrollo de las técnicas de electroelución, la transferencia a papel de nitrocelulosa o la microsecuencia serian alguno de los ejemplos a los que podríamos referirnos. A todo ello hay que unir, mas recientemente, la posibilidad de analisis de geles bidimensionales por computador lo que ha supuesto un paso mas en el desarrollo de la tecnica. El hecho de poder llevar a cabo análisis cuantitativos de geles complejos, así como la comparacion detallada de diferentes geles ha conducido a la generacion de bancos de datos de proteínas de indudable interes por cuanto abren la posibilidad de interconexion con los ya existentes de secuencias de DNA y proteínas.

1.2. REACTIVOS

Acido Fosfórico
Acido tricloroacetico (TCA)
Acrilamida
Agarosa
Anfolitos
Azul de Bromofenol
Bisacrilamida
Cloruro Magnésico
Ditiotreitol (DTT)
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)
DNasa
Glicerol
Glicina
Hidróxido Sódico
Nonidet P-40 (NP-40)
Persulfato Amónico (APS)
RNasa
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED)
Tris-Base
Tris-ClH
Úrea

Resulta obvio señalar la necesidad de cuidar la calidad de todos los reactivos empleados, siendo aconsejable obtenerlos de casas comerciales especializadas en productos de electroforesis.

Quizá convenga en este punto inicial hacer algunos comentarios sobre dos de los reactivos que acabamos de enumerar por ser, posiblemente los más críticos.

Acrilamida: La acrilamida es un reactivo caro, máxime si se corren, de forma rutinaria, un gran número de geles en el laboratorio. No obstante, es fundamental no olvidar nunca la calidad de este producto que puede condicionar el éxito de un experimento. Es imprescindible utilizar una acrilamida de máxima pureza para las primeras dimensiones IEF o NEPHGE y también para las segundas dimensiones en el caso de correr pocos geles. Si el número de geles es elevado puede utilizarse una acrilamida al menos bicristalizada y filtrada a través de 0.45 μm para la segunda dimensión.

Anfolitos: Sin duda son los responsables de una de las mayores fuentes de variación en los geles bidimensionales. La causa se debe a la diversidad de los métodos de síntesis utilizados para su producción y a que la complejidad de dicho proceso no garantiza su reproducibilidad, lo que conduce a una gran variación no solo entre las distintas casas comerciales que los suministran sino incluso entre los diferentes lotes de una misma marca.

Puede ser aconsejable ensayar mezclas de diferentes lotes de Anfolitos que cubran distintos rangos de pH y que el investigador determine cuál es la mejor fuente de anfolitos para sus necesidades. Una vez establecida ésta, debe mantenerse invariable con objeto de estandarizar los métodos y minimizar posibles alteraciones de resultados.

1.3. SOLUCIONES Y BUFFERES PARA LA PRIMERA DIMENSION.

Las soluciones que se detallan a continuación son similares a las descritas en el trabajo original de O'Farrell (1975). Señalar de entrada, la importancia de preparar todas ellas con agua de la máxima calidad posible.

1.3.1. Buffer de Lisis.-

Urea	9.8 M
Anfolitos pH 7-9	2 %
NP-40	4%
DTT	100 mM

Debe guardarse en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf a - 80 °C. Una vez descongelado, debe mantenerse a temperatura próxima a 30 °C para evitar que la Urea cristalice.

1.3.2. Buffer de Recubrimiento.-

Urea	8 M
Anfolitos pH 7-9	1 %
NP-40	5 %
DTT	10 mM

Guardar en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf a - 80 °C.

1.3.3. Buffer de Equilibrado.-

Tris-ClH pH 6.8	0.06 M
SDS	2 %
DTT	100 mM
Glicerol	10 %

Mezclar bien y guardar a temperatura ambiente.

1.3.4. Solución de Acrilamida.-

Acrilamida	28.38 %
Bisacrilamida	1.62 %

Utilizar Acrilamida de la máxima pureza posible. Filtrar a través de 0.45 µm y guardar a 4°C durante una semana como máximo.

1.3.5. Solución de NP-40.-

NP-40	10 %
-------	------

Disolver bien el detergente en agua y guardar a temperatura ambiente.

1.3.6. Solución de Acido Fosfórico.-

Preparar una solución de PO_4H_3 1M que puede guardarse a temperatura ambiente una semana.

1.3.7. Solución de Hidróxido Sódico.-

Preparar una solución de NaOH 1M que puede guardarse a temperatura ambiente dos días.

1.3.8. Solución de Agarosa.-

Agarosa	1 %
Azul de Bromofenol	0.002 %

Preparar en Bufer de Equilibrado. Fundir la Agarosa y guardar en alícuotas de 10 ml a 4 °C.

1.4. SOLUCIONES Y BUFFERES PARA LA SEGUNDA DIMENSION.

1.4.1. Solución A (Gel de Resolución).-

Acrilamida	30 %
Bisacrilamida	0.15 %

Utilizar Acrilamida bicristalizada o de pureza superior. Filtrar la solución a través de 0.45 μm y guardar a 4 °C durante un máximo de dos semanas.

1.4.2. Solución B (Buffer de Resolución).-

Tris-ClH 1.5 M	200 ml
Tris-Base 1.5 M	800 ml

Mezclar bien y chequear el pH, que debe tener un valor entre 8.8 y 8.9. Las variaciones de pH pueden afectar notablemente a los geles. Guardar a 4 °C.

1.4.3. Solución C (Buffer de Concentración).-

Tris-Base 240 mM pH 6.8

Puede prepararse a partir de Tris-Base 1.5 M titulando con ClH 6N. Guardar a 4 °C.

1.4.4. Solución D (Gel de Concentración).-

Acrilamida	10 %
Bisacrilamida	0.5 %

Utilizar Acrilamida al menos bicristalizada. Filtrar a través de 0.45 µm y guardar a 4 °C no mas de dos semanas.

1.4.5. Buffer de Corrida.-

Tris-Base	50 mM
Glicina	380 mM
SDS	0.1 %

Guardar a temperatura ambiente.

1.5. MARCAJE DE CELULAS.

El método habitual de marcaje de células en cultivo para su posterior análisis mediante electroforesis bidimensional hace uso de ³⁵S-Metionina debido, fundamentalmente, a la alta actividad específica con la que se puede conseguir este aminoácido. Este hecho confiere un alto grado de sensibilidad a la técnica y permite obtener patterns complejos de proteínas en tiempos relativamente cortos.

También puede llevarse a cabo el marcaje de proteínas con mezclas de aminoácidos ¹⁴C que lógicamente presenta la ventaja de marcar todas las proteínas aun en el caso de que sean deficientes en algun aminoácido. Teóricamente este método es óptimo para cuantificar proteínas pero en realidad consume mucho tiempo debido a la baja actividad específica de los aminoácidos

^{14}C comerciales, que además poseen un precio considerablemente más elevado que el de la ^{35}S -Metionina.

Desde el punto de vista práctico, digamos que las células pueden crecerse en placas Multiwell con pocillos de 2 cm^2 en presencia de 1 ml de medio de cultivo, que normalmente es medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero. La densidad celular en el momento del marcaje depende del tipo de células empleadas pero, como dato orientativo señalemos que para el caso de fibroblastos puede ser razonable utilizar del orden de 10^5 células por cm^2 .

En el momento del marcaje se retira el medio y se sustituye por 250 μl de DMEM sin Metionina suplementado con 2 % de suero dializado y ^{35}S -Metionina (1mCi/ml).

Si el marcaje va a realizarse por un periodo de tiempo inferior a 4 horas puede utilizarse el medio señalado anteriormente debido al considerable aumento en la incorporación de radiactividad en proteínas, pero si el marcaje se realiza durante un tiempo superior no debe utilizarse medio sin metionina. Lo aconsejable entonces, es disminuir la concentración de metionina a 1/10 de su valor normal en el DMED.

Debemos mencionar, como comentario final, que las preparaciones comerciales de ^{35}S -Metionina contienen normalmente agentes antioxidantes que pueden alterar la viabilidad y función de algunas poblaciones celulares. Es aconsejable por tanto eliminar o diluir esos reactivos antes de efectuar el marcaje.

1.6. PREPARACION DE LA MUESTRA.

La solubilización de las muestras es probablemente la etapa más crítica para obtener "patterns" de proteínas reproducibles y con alta resolución en geles bidimensionales. Hay que tener en cuenta que la técnica es extremadamente sensible a cambios de carga que pueden originar un desdoblamiento de las manchas en el gel y por tanto hay que extremar las precauciones con objeto de evitar modificaciones químicas de las proteínas durante la preparación y manipulación de las muestras.

Se han desarrollado varios métodos de preparación dependiendo de las características de las muestras;

1.- Cuando las células crecen y se marcan en un número inferior a 200000 células/cm² como es el caso de las placas Multiwell no es necesario ningún tipo de tratamiento especial. Simplemente se retira el medio de marcaje con una pipeta e inmediatamente se lisan las células añadiendo 100 µl de buffer de lisis ya que los ácidos nucleicos presentes en la muestra en pequeñas cantidades no interfieren con la primera dimensión. Las muestras se guardan a - 70 °C hasta el momento de su aplicación en la primera dimensión.

2.- Si las células se crecen y marcan en grandes cantidades entonces es necesario tratar la muestra con una solución de nucleasas. Hay que tener en cuenta que los ácidos nucleicos son moléculas cargadas que pueden interactuar con las proteínas, así como alterar los rangos de pI aparentes y por tanto causar problemas.

El tratamiento siguiente, descrito por J. Garrels en 1979, puede llevarse a cabo en frío para evitar degradaciones de las proteínas y puede resumirse de la siguiente forma:

- Resuspender las células en Tris 20 mM pH 8.8; Cl₂Ca 2 mM y sonicarlas.
- Tratar con SDS a una concentración final de 0.3 %.
- Añadir la solución de nucleasas, que en su forma concentrada 10X esta integrada por:

Solución de Nucleasas 10X :

DNasa I	1mg/ml
RNasa A	500 µg/ml
Tris ClH	0.5 M, pH 7
Cl ₂ Mg	50 mM

- Dejar la muestra a 4 °C hasta que disminuya su viscosidad.
- Liofilizar la muestra y resuspenderla en buffer de lisis. Guardar a - 70 °C hasta el momento de aplicarla en la primera dimensión.

Este método también es adecuado para muestras que vayan a teñirse con plata. En estos casos, hay que tener presente que las nucleasas comerciales no están puras y pueden contener un número apreciable de proteínas contaminantes que lógicamente también aparecerán en los geles. Igualmente, las nucleasas

pueden contener proteasas que alteren el "pattern" de proteínas de los geles.

Si la solubilización de las muestras no es correcta pueden surgir algunos problemas en los geles. Uno de los mas frecuentes es la presencia de iones no anfotéricos que pueden alterar el pI aparente de las proteínas. Dado que muchas muestras tienen que concentrarse antes de analizarse por electroforesis hay que tener la precaución de utilizar métodos que concentren las proteínas sin incrementar la concentración de sal.

Las muestras pueden mantenerse a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante varios meses en buffer de lisis sin que se observe ningun efecto en la separación de las proteínas incluso tras varios ciclos de congelación-descongelación. Bajo ninguna circunstancia deben calentarse las muestras por encima de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando estan en buffer de lisis con objeto de evitar la carbamilación de proteínas, hecho que podría tener un enorme efecto en los geles.

1.7. DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA EN LA MUESTRA.

Con frecuencia es necesario conocer la cantidad de radiactividad de las muestras que se aplican en los geles con objeto de poder hacer estudios cuantitativos que permitan determinar el porcentaje de radiactividad incorporado en una proteína dada en comparación con el número de cuentas aplicadas en el gel.

Para hacer estas determinaciones se puede proceder de la siguiente manera:

- Tomar una pequeña alicuota de una dilucion apropiada de la muestra radiactiva y mezclarla con 250 μl de una solución de 0.1 mg/ml de albumina de suero bovina (BSA).

- Añadir 5 ml de TCA 10 % frio. Mezclar vigorosamente y dejar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. En ese tiempo se incuban filtros Millipore (HA 0.45 μm) en TCA 10 % que contiene 1 % de casaminoacidos durante 10 minutos.

- Filtrar la muestra y lavarla 3 veces con TCA 10 % frio.

- Secar el filtro y contar en un contador de centelleo líquido.

1.8. PRIMERA DIMENSION.

1.8.1.- Preparación de los tubos.

Aunque se puede utilizar una amplia variedad de tamaños de tubos para isoelectroenfoque (IEF), el tamaño dependerá del tipo de experimento a realizar. Los tubos pueden tener un diámetro interno constante de 1.0 a 3.0 mm y una longitud que puede variar desde 10 hasta 20 cm. Los tubos deben tener todos la misma longitud al igual que los geles porque estos factores afectan la reproducibilidad de la corrida.

Hay que asegurarse que el gel permanezca firmemente adherido a las paredes del tubo durante la electroforesis por lo que es necesario prestar especial atención a la limpieza de los tubos. Esta puede llevarse a cabo de la siguiente forma:

- Depositar los tubos en mezcla crómica durante 10-12 horas.
- Lavar exhaustivamente con agua.
- Hervir en ClH 0.1 M durante 30 minutos.
- Lavar nuevamente con agua. El último lavado debe hacerse con agua destilada.
- Introducir los tubos en Etanol de buena calidad durante 30 minutos.
- Secar en estufa a 150 °C.

Una vez limpios, se sella la parte inferior de los tubos con parafilm y se colocan en posición vertical en una gradilla.

1.8.2.- Preparación y corrida de primera dimensión.

El método es básicamente el descrito por O'Farrell (1975) y por O'Farrell et al. (1977).

Para preparar 10 ml de mezcla de gel para las primeras dimensiones (IEF o NEPHGE) es necesario mezclar los siguientes reactivos en un erlenmeyer de 125 ml:

	IEF	NEPHGE
Urea (g)	5.5	5.5
Solución de Acrilamida (ml)	1.3	1.3
NP-40 10 % (ml)	2.0	2.0
Agua destilada (ml)	1.7	2.0
Anfolitos pH 5-7 (ml)	0.6	-
Anfolitos pH 3-10 (ml)	0.12	-
Anfolitos pH 7-9 (ml)	-	0.25
Anfolitos pH 8-9.5 (ml)	-	0.25

La composición exacta de Anfolitos puede cambiarse en función del rango de pH que se desee cubrir.

Una vez mezclados todos los reactivos y solubilizada perfectamente la urea se degasifica la solución haciendo uso de una trompa de agua. A continuación se añaden 7 μ l de TEMED y 10 μ l de APS al 10 % a la solución IEF o 15 μ l de TEMED y 20 μ l de APS al 10 % a la solución NEPHGE y se cargan rápidamente en el interior de los tubos. Esta operación de llenado puede hacerse empleando una jeringa provista de una aguja de gran tamaño terminada en punta roma o conectada a un tubo taygon de estrecho diámetro capaz de entrar en el interior de los tubos. Con objeto de evitar la formación de burbujas de aire hay que tener la precaución de colocar la punta de la aguja o el extremo del taygon en el fondo del tubo e irlos desplazando lentamente a medida que asciende la mezcla de acrilamida. Los tubos se llenan hasta alcanzar una altura que diste unos 3 cm del extremo superior. La mezcla de gel se cubre con 200 μ l de agua destilada y se dejan polimerizar durante 3 horas. A continuación se retira cuidadosamente el parafilm sin dañar la parte inferior de los geles.

En ocasiones pueden presentarse problemas con la polimerización de los geles. Los fallos mas habituales son debidos a alguna de las siguientes causas:

- Los tubos de vidrio no estan correctamente lavados y tienen detergente u otros residuos que interfieren con la polimerización.
- Falta de catalizador (TEMED) o mal estado del iniciador de reacción (APS) debido a hidratación.
- Concentraciones incorrectas de acrilamida o bisacrilamida.
- La solución de acrilamida no está adecuadamente degasificada.

Los tubos se transfieren a una cámara de electroforesis y se llena el reservorio inferior con PO_4H_3 10 mM (IEF) o con NaOH 20 mM (NEPHGE). Se eliminan las posibles burbujas de aire de la parte inferior de los geles mediante un suave movimiento de los tubos y se retira la solución de la parte superior de los geles por aspiración con una aguja.

a) Geles de Isoelectroenfoque (IEF).

Una vez depositados los tubos en la cámara de electroforesis como acabamos de mencionar se añaden 12 μl de buffer de lisis en la parte superior del gel y a continuación 12 μl de buffer de recubrimiento seguidos de suficiente cantidad de NaOH 20 mM como para llenar los tubos. La camara superior se llena igualmente con NaOH 20 mM previamente degasificada y se conectan los electrodos de forma que el electrodo positivo se conecta al reservorio inferior y el electrodo negativo al reservorio superior.

Los geles (20 cm de longitud) pueden precorrerse fijando un voltaje de 1000 V y una intensidad de corriente de 0.33 mA/gel. Durante la precorrida la intensidad permanecera constante y el voltaje ira subiendo progresivamente hasta alcanzar los mencionados 1000 V, momento en el que puede darse por terminada dicha operación que en teoría esta encaminada a eliminar los iones sulfato del APS asi como otros iones no anfotéricos que puedan interferir con el enfoque de las proteínas.

Despues de la precorrida se retira la NaOH de la cámara superior y se deshecha. El líquido que queda en la parte

superior de los geles se retira con una jeringa provista de una aguja fina y estos se lavan dos veces con un pequeño volumen de agua destilada. En este momento, el sistema esta listo para cargar las muestras.

Las muestras se pueden cargar con una pipeta Gilson o con una jeringa Hamilton. La primera tiene la ventaja de utilizar tips desechables que eliminan una posible contaminación entre muestras. Una vez cargada la muestra se añaden 12 μ l de buffer de recubrimiento y los tubos se vuelven a llenar con NaOH 20 mM. La cámara superior se rellena y los geles se corren durante 18 horas a 1000 V.

La capacidad de carga del gel depende de la naturaleza de la muestra aplicada. Para un extracto de células totales, el volumen óptimo de muestra debe ser inferior a 25 μ l conteniendo un máximo de 10 μ g de proteína y $0.5-1 \times 10^6$ cpm. Sin embargo, en los casos en los que sea necesario, puede llegar a aplicarse hasta 100 μ l de muestra que contenga 200 μ g de proteína aunque se obtendrá lógicamente una considerable pérdida de resolución. Hay que tener en cuenta, que en el caso de lisados celulares totales la enorme diferencia en las cantidades relativas de los polipeptidos celulares afecta el poder de resolución de la técnica debido a que cuando se aplica mucha cantidad de proteína en un gel el tamaño de las manchas aumenta, disminuyendo la distancia entre manchas vecinas con la consecuente pérdida de resolución. Esto también puede provocar el desplazamiento de proteínas minoritarias de su posición original por un vecino mayoritario. En general, cuanto menos proteína se cargue en la primera dimensión, mejor será la resolución especialmente cuando se analicen muestras complejas de proteínas.

Para sacar los geles de los tubos puede inyectarse agua alrededor de los tubos o aplicar aire a presión teniendo cuidado de no dañar los geles. Estos se recogen en placas petri que contengan 5 ml de buffer de equilibrado.

En ocasiones pueden surgir problemas con la eliminación de los geles de los tubos. A veces los geles IEF no se eliminan con facilidad de los tubos, mientras que otras veces pueden caerse de los tubos antes o durante la IEF hechos que pueden atribuirse a un mal lavado de los tubos, a un tamaño de tubo inadecuado o a que la solución de acrilamida tiene poco NP-40 haciendo que los

geles sean difíciles de eliminar. Si hay demasiado detergente, los geles pueden caerse solos de los tubos.

Los geles se dejan equilibrar durante 10-15 minutos para eliminar los anfolitos y la urea y para permitir la interacción de las proteínas con el SDS. Esta etapa no debe prolongarse durante más tiempo ya que en ella las proteínas pueden difundir y perderse del gel. Tras la equilibración se retira el buffer y se cargan las muestras en la segunda dimensión o se guardan congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b) Geles de no equilibrio (NEPHGE).

Estos geles no se precorren. Las muestras se aplican y se cubren con $12\text{ }\mu\text{l}$ de buffer de recubrimiento y los tubos se llenan con PO_4H_3 10 mM . La cámara superior se llena con PO_4H_3 y se conecta al electrodo positivo. El reservorio inferior se llena con NaOH 20 mM y se conecta al electrodo negativo. Los geles se corren a 400 V durante 4.5 horas. La corriente debe disminuir de forma constante durante la corrida. Los geles se sacan y equilibran de forma análoga a la descrita anteriormente para los IEF.

1.9. COMENTARIOS EN RELACION CON LA PRIMERA DIMENSION.

Aparte de algunos problemas anteriormente comentados que pueden presentarse durante el electroenfoque debemos mencionar algunos otros en este apartado específico.

Un primer problema que puede ser bastante común es la rotura de los geles durante el electroenfoque. Hay varios factores que pueden causar este problema:

1.- Las muestras tienen una concentración de sal muy elevada procedente de sales de buffer liofilizadas o de sulfato amónico. Estas no interfieren con el IEF pero pueden provocar una rotura del gel.

2.- Algunos lotes de anfolitos presentan con frecuencia "agujeros" en el gradiente de pH en el que no migraran anfolitos durante el IEF. Esto puede provocar un calentamiento local que dañe la matriz del gel en ese punto, pero esto puede solucionarse mezclando anfolitos de dos marcas diferentes. Dado

que cada casa comercial prepara los anfolitos de forma distinta, las posibilidades de llenar el "hueco" en el gradiente son altas. El problema es que se añade otra variable al sistema al emplear dos lotes diferentes de anfolitos.

3.- La concentración de proteína es muy alta para el tamaño de gel. La rotura del gel es un problema si se utilizan proteínas impuras o mucha cantidad que se concentra en una parte del gel (su punto isoelectrico).

Otro segundo problema es la obtención de "patterns" de electroenfoque no reproducibles. En primer lugar conviene aclarar que REPRODUCIBILIDAD no necesariamente indica CALIDAD. El problema es cómo obtener la mayor resolución posible o determinar las causas de los "patterns" insatisfactorios. Entre estas últimas podemos mencionar:

1.- Mal estado de las soluciones especialmente la NaOH y la de acrilamida. En muchos casos esto es suficiente para aumentar la resolución del gel.

2.- Problemas en los lotes de anfolitos. Es recomendable aumentar la concentración de anfolitos por encima del 4% y variar la relación de la mezcla de anfolitos (pH 3.5-10 y pH 5-7). También es muy recomendable chequear y mezclar diferentes lotes de anfolitos.

3.- Contaminación de iones en la muestra o en los reactivos.

4.- Cantidad de proteína utilizada para el electroenfoque. Las proteínas tienen pI y pueden actuar como anfolitos alterando la distribución de los anfolitos comerciales. Este efecto es particularmente importante si hay una cantidad excesiva de proteína en la muestra.

5.- Modificaciones químicas de las proteínas antes del IEF. Algunos métodos de marcaje alteran la carga de las proteínas. Por ejemplo el calentamiento de la urea provoca carbamilación que altera dramáticamente las propiedades de carga. Es necesario tener en cuenta todos los métodos químicos que se hayan utilizado para preparar la muestra con objeto de poder determinar si las proteínas se han alterado.

Hay que tener en cuenta no obstante que existen algunas proteínas difíciles de enfocar de forma adecuada bien porque están altamente fosforiladas o por otras propiedades intrínsecas.

6.- Solubilización inadecuada. Si se añade poco buffer de lisis a la muestra de proteínas o se usa un tiempo de solubilización insuficiente muchas de las proteínas no son capaces de entrar en el gel. Es frecuente ver agregados de proteína en el extremo básico de los geles de segunda dimensión.

7.- Burbujas de aire en la poliacrilamida o en la muestra. Afectan dramáticamente. Si se llenan los tubos por capilaridad se evita el problema. A veces es posible eliminar las burbujas de aire con una aguja larga y fina.

8.- Voltios-hora del electroenfoque. Puede ser una de las razones fundamentales. Dado que todas las proteínas no alcanzan su pI en el mismo tiempo es importante optimizar y standardizar las condiciones de corrida con objeto de obtener un electroenfoque adecuado y reproducible. El tiempo y el voltaje necesarios dependen de la longitud del gel y de las condiciones utilizadas para la solubilización. No es correcto fijarse simplemente en el número de voltios totales finales. Por ejemplo un electroenfoque de 15 horas a 800 V da un "pattern" diferente que otro de 500 V durante 24 horas. En general, el uso de altos voltajes durante periodos de tiempo cortos produce una mejor resolución de las proteínas en el gel de electroenfoque.

1.10. SEGUNDA DIMENSION.

1.10.1. Preparación de geles en placa.

La técnica de geles en placa se ha adaptado rápidamente al sistema de geles bidimensionales utilizándose habitualmente el sistema de placa con hendidura descrito por Studier (1973). El gel se forma entre dos placas de vidrio uniformes, cada una de 3 mm de espesor. Una placa es rectangular de 17 x 18 cm y la otra es del mismo tamaño con un entrante de 2 cm de profundidad y 14 cm de ancho. Los espaciadores se hacen de cloruro de polivinilo (PVC) con un espesor uniforme de 1-1.5 mm, una anchura de 1 cm y una longitud de 20 cm. Las placas de vidrio deben encontrarse perfectamente limpias y libres de cualquier resto de grasa que

pudiera afectar a la polimerización. Las dos placas de vidrio y los tres espaciadores se ensamblan juntos, colocando un espaciador en la parte inferior y los otros dos en vertical a ambos lados de las placas de vidrio, teniendo cuidado de que los espaciadores verticales entren en estrecho contacto con el de la parte inferior. Una vez ensambladas, las placas se mantienen juntas mediante pinzas colocadas de forma que presionen sobre los espaciadores. Hay varias formas de sellar y ensamblar las placas. Una de las más convenientes es impregnar ligeramente los espaciadores con vaselina antes de ensamblarlos teniendo cuidado de no engrasar las placas.

Para la segunda dimensión se utiliza el sistema de geles discontinuos con SDS descrito por Laemmli (1970). Se pueden utilizar tanto geles uniformes de cualquier concentración de acrilamida como geles en gradiente. La elección exacta del tipo de gel de separación a utilizar dependerá de la naturaleza de la muestra que se vaya a analizar. El sistema que el autor usa normalmente es el que se describe a continuación. Para preparar 100 ml de gel de resolución se puede utilizar la siguiente tabla:

Porcentaje (%)	Sol A (ml)	SDS 10% (ml)	Sol B (ml)	H ₂ O (ml)	TEMED (μl)	10% APS (ml)
7.5	25	1	25	48.5	20	0.5
9	30	1	25	43.5	20	0.5
12	40	1	25	33.5	20	0.5
15	50	1	25	23.5	20	0.5
18	60	1	25	13.5	20	0.5

La solución debe degasificarse antes de añadir el TEMED y el APS recién preparado. Una vez añadidos estos compuestos la solución se mezcla y se deposita entre las dos placas verticales llenandolas hasta una altura que diste 2.5 cm de la parte superior de la placa con el entrante. La parte superior del gel de resolución se sella cuidadosamente con agua y se deja polimerizar durante al menos dos horas. Se elimina la capa superior y el gel se lava con agua destilada y se seca con papel Whatman antes de añadir el gel de concentración. Para analizar

extractos de proteínas celulares totales el mejor gel de separación es del 15 %.

Para preparar 20 ml de gel de concentración es necesario utilizar los siguientes reactivos:

Porcentaje (%)	Sol D (ml)	SDS 10% (ml)	Sol C (ml)	H ₂ O (ml)	TEMED (µl)	10% APS (ml)
3	6	0.2	10	4	8	0.16
5	10	0.2	10	-	8	0.16

Normalmente, la concentración de este gel es del 5 %. La solución también debe degasificarse antes de añadir el TEMED y el APS. Entonces debe colocarse en la parte superior de la placa que contiene el entrante y recubrirla como se describió para el gel de resolución.

1.11. COMENTARIOS EN RELACION CON LA SEGUNDA DIMENSION.

En términos generales, la segunda dimensión crea muchos menos problemas que la primera. No obstante pueden existir algunas complicaciones derivadas de una polimerización errática del gel que puede venir ocasionada por fallos en la concentración tanto de los catalizadores (TEMED y APS) como de la acrilamida y bisacrilamida.

En ocasiones, las proteínas de bajo peso molecular presentan un comportamiento anómalo en la segunda dimensión consistente en la aparición de un "smear" que en muchos casos puede llegar a ocasionar la aparición de una mancha doble. Este hecho se debe a que la concentración de SDS es demasiado alta y puede venir causado por un exceso de solución de agarosa (2% SDS) empleada para fijar el gel de primera dimensión en la segunda.

También pueden surgir problemas como consecuencia de errores en el ajuste de pH del buffer de resolución (solución B). La movilidad de las proteínas se altera con respecto al "pattern" normal. Este hecho se detecta fácilmente porque el tiempo de corrida del colorante (azul de bromofenol) presente en la solución de agarosa es mayor.

1.12. APLICACION DE LA PRIMERA DIMENSION EN LA SEGUNDA Y CORRIDA DEL GEL EN PLACA.

Antes de aplicar el gel de primera dimension en la parte superior de la segunda dimensión, debe lavarse el gel de concentración con agua destilada y secarse con papel Whatman. A continuación se retiran todas las pinzas y posteriormente el espaciador inferior. La placa se coloca en posición horizontal para facilitar la aplicación del gel de primera dimensión. Este se descongela y se deposita cuidadosamente en la parte superior de las placas evitando cualquier tensión. Esta operación puede realizarse con la ayuda de una espátula cuidando de no dañar el gel. Una vez colocado correctamente el gel de primera dimensión sobre el de la segunda puede inmovilizarse utilizando una solución de agarosa 1 % fundida. Este sellado puede efectuarse con una pipeta Pasteur avanzando desde un extremo de la placa entre el gel de concentración y el gel de la primera dimensión cuidando de eliminar cualquier burbuja de aire con objeto de evitar posteriores artefactos en el gel de SDS. El gel se recubre con agarosa y se deja 2-3 minutos antes de colocarlo en la cámara de electroforesis. A continuación se añade buffer de corrida en los tanques superior e inferior comprobando que no quedan burbujas de aire en la parte inferior del gel que impidan un buen contacto con el buffer. Esta operación puede hacerse mediante una jeringa con una aguja doblada.

Por último se conectan los electrodos y los geles se corren durante toda la noche a corriente constante (12-15 mA). Al final de la corrida se separan las placas de las cámaras de electroforesis y se procesan los geles de acuerdo con alguno de los métodos descritos en este manual.

1.13. COORDENADAS Y MARCADORES.

Uno de los mayores problemas de comunicacion entre laboratorios diferentes que utilizan el sistema de geles bidimensionales es la falta de un metodo preciso para referir la localización exacta de un polipeptido dado resuelto por esta

tecnic. Además, cada laboratorio utiliza su propio sistema de geles bidimensionales.

Teniendo en cuenta que el sistema de geles bidimensionales resuelve proteínas en función de su carga (primera dimensión) y peso molecular (segunda dimensión) la forma más directa de localizar un polipeptido en el gel sería el uso de su punto isoelectrico (pI) y su peso molecular (MW) como coordenadas. Existen buenas razones para no utilizar el pH como eje x. La presencia de alta concentración de urea (9M) que causa una reducción en la actividad de los iones hidrógeno hace que la medida del pH sea muy imprecisa. La urea también tiene un efecto directo en el pH del electrodo. Además, los puntos isoelectricos que se determinan en urea están alterados debido a la desnaturalización de la proteína. En adición a esto, existe una gran discrepancia entre los valores de pI de algunos polipeptidos celulares descritos en diferentes publicaciones. El problema entonces es qué utilizar como referencia en el eje x (abscisa). Para muestras procedentes de lisados celulares totales una de las formas más simple y segura es utilizar ciertos polipeptidos conocidos de la muestra (por ejemplo actina) como marcadores internos y referir la posición del eje x de una proteína en relación a alguna de esas standards. Para otros tipos de muestras, el problema de referencia puede solucionarse añadiendo standards internos como una mezcla bien seleccionada de proteínas purificadas de valores de pI conocidos o bien haciendo uso de proteínas carbamiladas.

Como referencia en el eje y (ordenada) es recomendable utilizar el peso molecular, pero su valor debe considerarse con precaución porque muchos polipeptidos presentan un comportamiento anómalo cuando se cambia la concentración de bisacrilamida en el gel.

Otro problema adicional es la propia orientación del gel. El criterio más habitual es colocar el extremo ácido a la derecha, pero hay laboratorios que utilizan el criterio contrario.

Teniendo en cuenta los problemas mencionados anteriormente, si se quiere comparar resultados de diferentes laboratorios es recomendable intercambiar las muestras en cuestión con objeto de analizarlas en los sistemas utilizados en cada laboratorio.

1.14. PROCESAMIENTO DE LOS GELES.

1.14.1. FLUOROGRAFIA.

La fluorografía es el método de detección recomendable cuando se trabaja con muestras radiactivas de baja energía (^3H) o cuando se dispone de una pequeña cantidad de muestra. La sensibilidad del método puede aumentarse si, una vez tratados, se exponen los geles a baja temperatura como demostraron Laskey y Mills (1975).

REACTIVOS

2,5, Difenil oxazol (PPO)
Dimetil sulfóxido (DMSO)

METODO EXPERIMENTAL.

Los geles pueden tratarse para fluorografía de acuerdo con el método descrito por Bonner y Laskey (1974).

1.- Añadir los geles a una bandeja que contenga DMSO (aproximadamente 200 ml/gel). Dependiendo del tamaño de la bandeja es posible tratar hasta 4 geles a la vez. Incubar durante 30 minutos con agitación circulante que asegure una buena inmersión de los geles.

2.- Pasar los geles a una nueva solución de DMSO e incubar otros 30 minutos.

3.- Transferir los geles a una bandeja que contenga una solución de PPO al 20 % en DMSO e incubar durante dos horas. Este porcentaje de PPO permite obtener la máxima sensibilidad con proteínas marcadas con ^3H , pero es posible reducirlo al 10 % en el caso de proteínas marcadas con ^{35}S sin pérdida de sensibilidad.

4.- Lavar los geles con agua destilada durante 30 minutos procurando hacer frecuentes cambios de agua.

5.- Secar los geles sobre calor y a vacío durante 60-90 minutos, evitando un sobresecado. Para un funcionamiento óptimo, el secador debe estar conectado a una potente bomba de vacío protegida por una trampa de hielo seco.

6.- Exponer los geles secos a una película sensible a rayos X y mantenerlos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un tiempo de exposición de 24-48 horas puede ser razonable para una muestra compleja de proteínas (procedente de un lisado celular por ejemplo) de la que se haya aplicado 10^6 cpm insolubles en TCA en la primera dimensión.

NOTA: El PPO puede recuperarse por precipitación de la siguiente forma:

- Añadir 3 volúmenes de Etanol al 10 % y dejar la mezcla durante 15 - 20 minutos.
- Recoger el precipitado por filtración y lavarlo con 15 o 20 volúmenes de agua antes de secar a temperatura ambiente.

1.14.2. TINCIONES CON AZUL DE COOMASSIE.

Es el método mas clasico de tinción. Su nivel de sensibilidad esta en el orden de $0.1\text{ }\mu\text{g}$ de proteína/ mm^2 .

REACTIVOS.

Acido acético
Azul de Coomassie R-250
Etanol

SOLUCIONES

Solución de Tinción.

Etanol	50 %
Acido acético	5 %
Azul de Coomassie R-250	0.2 %

Filtrar a través de papel Whatman o a través de $0.2 \mu\text{m}$ si se piensa teñir el gel con plata después de la tinción con Coomassie. Es aconsejable utilizar una solución recién preparada si se quiere obtener el máximo de sensibilidad.

Solución de Destinción.

Etanol	20 %
Acido acético	5 %

METODO 1.

1.- Añadir los geles a la solución de tinción e incubar durante 3 o 4 horas en una plataforma oscilatoria cuya velocidad permita una óptima circulación de la solución. Es recomendable utilizar bandejas de cristal sobre todo si los geles se quieren teñir posteriormente con plata.

2.- Retirar la solución de tinción y desteñir los geles mediante varios cambios en solución de destinción con suave agitación. La velocidad del proceso puede acelerarse añadiendo trozos de gomaespuma a la solución.

Recientemente, Anderson (1989) ha descrito una variante de Tinción con Coomassie que, sin cambios apreciables en cuanto a su sensibilidad de detección, presenta la ventaja de dar unos fondos muy transparentes. Por contra, el método presenta el inconveniente de requerir un tiempo muy largo para el proceso de tinción.

REACTIVOS

Acido Fosfórico
Azul de Coomassie R-250
Etanol
Metanol
Sulfato Amónico

METODO 2.

1.- Incubar el gel durante dos horas en una solución de

Etanol	50 %
Acido fosfórico	2 %

2.- Retirar la solución anterior y dar varios cambios de agua destilada durante una hora.

3.- Incubar el gel durante una hora en una solución que contenga:

Metanol	34 %
Sulfato amónico	17 %
Acido fosfórico	3 %

4.- Añadir Azul de Coomassie en polvo (aproximadamente 100 mg por litro de solución) e incubar durante 48 - 72 horas.

5.- Retirar la solución de tinción y lavar con agua destilada fria durante 30 minutos.

1.14.3. TINCION CON PLATA.

El primer problema es seleccionar el método a utilizar de entre los casi 100 descritos en la literatura, la mayoría de ellos desarrollados a partir de la química fotográfica. Vamos a resumir el descrito por J. H. Morrissey, que en opinión del autor es uno de los mas adecuados y el que habitualmente utiliza.

REACTIVOS

Acido acético
 Acido cítrico
 Carbonato Sodico
 Ditiotreitól (DTT)
 Formaldehido
 Glutaraldehido
 Metanol
 Nitrato de Plata

METODO.

1.- Prefijar el gel durante 30 minutos en una solución de

Metanol	50 %
Acido acético	10 %

2.- Retirar el medio anterior y sustituirlo por

Metanol	5 %
Acido acético	7 %

Incubar durante 30 minutos.

3.- Fijar el gel durante 30 minutos en Glutaraldehido al 10 %.

4.- Lavar el gel en un gran volumen de agua destilada durante al menos 2 horas. Es mas conveniente dejarlo durante la noche dando un cambio de agua al dia siguiente de 30 minutos.

5.- Incubar el gel durante 30 minutos en una solución de DTT (5 µg/ml).

6.- Retirar el DTT y añadir una solución de Nitrato de Plata al 0.1 %. Incubar durante 30 minutos.

7.- Lavar el gel rápidamente en una pequeña cantidad de agua destilada y seguidamente dos veces con una pequeña cantidad de Solución de Revelado integrada por:

Formaldehido	0.018 %
Carbonato Sódico	3 %

8.- Introducir el gel en una nueva Solución de Revelado hasta que se alcance un nivel de tinción adecuado.

9.- La tinción puede detenerse añadiendo 5 ml de Acido Cítrico 2.3 M directamente al revelador y agitando durante 10 minutos. Esta solución se desecha y el gel se lava varias veces en agua destilada durante un periodo de 30 minutos.

Para todos los métodos de tinción con plata es aconsejable utilizar soluciones recién preparadas empleando agua destilada de la máxima pureza posible. Los recipientes y bandejas empleadas deben ser de vidrio siendo crítico el empleo de guantes en todos los procesos con objeto de no tocar nunca los geles o los recipientes que los contengan con las manos.

2. MAPAS DE PEPTIDOS DE PROTEINAS EXTRAIDAS DE GELES
BIDIMENSIONALES.

2.1. INTRODUCCION.

Los mapas de peptidos representan una nueva dimension en el análisis de proteínas. Desde su descripción por Ingram (1956,1959) han demostrado su utilidad en un amplio campo de aplicaciones que han ido desde la identificación de proteínas homologas o con propiedades antigenicas especificas hasta convertirse hoy dia en una etapa fundamental en la determinación de secuencias de proteínas.

En resumen, la tecnica consiste en la proteolisis especifica de una proteína, seguida del fraccionamiento y visualización de los peptidos resultantes. Hay considerables ventajas en utilizar geles bidimensionales para preparar polipeptidos para análisis peptidico debido al hecho de que muchos polipeptidos estan razonablemente puros y sin degradar.

La proteolisis específica puede afectar a diferentes sitios siendo posible efectuarla por metodos quimicos o enzimáticos (Tabla I). A su vez, puede ser parcial (Cleveland et al., 1977) o completa segun las necesidades del experimento.

Tabla I. SITIOS DE ROTURA DE PROTEINAS POR METODOS QUIMICOS O ENZIMATICOS.

METODO		NH ₂ -SITIO-COOH
QUIMICO	CNBr	-Met↓
	Acido Formico	-Asp↓Pro-
ENZIMATICO	Tripsina	-Lys↓ -Arg↓
	Quimotripsina	-Tyr↓ -Phe↓ -Trp↓
	Staphylococcus aureus (V8)	-Asp↓ -Glu↓
	Papaina	Amplia especificidad

Para fraccionar los péptidos resultantes se han seguido muchos metodos. Inicialmente fueron cromatografía en papel y electroforesis, pero hoy dia se han visto desplazados por metodos mas sensibles y adecuados como la cromatografía en capa fina (Watanabe y Yoshida, 1971), la electroforesis en gel (Laemmli, 1970) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Hearn, 1980). La elección del metodo experimental a seguir dependerá de la abundancia de la proteina purificada, de los pesos moleculares de los peptidos resultantes y del grado de modificaciones postraduccionales de la proteina que pueden alterar los puntos de rotura de los peptidos. Este ultimo hecho es sin duda la mayor limitacion de la tecnica, haciendose necesario en algunos casos llevar a cabo determinaciones de composición de aminoacidos y/o estudios de secuencia para comprobar de manera inequívoca la autentica relacion entre proteinas.

2.2. REACTIVOS

Acrilamida
Azul de Bromofenol
Bisacrilamida
Dextrano T-500
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)
Etanol
Glicerol
Glicina
 β -Mercaptoetanol
Persulfato Amónico (APS)
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED)
Tris-Base
Tris-ClH

2.3. SOLUCIONES Y BUFFERES.

2.3.1. Buffer de Carga.

Tris-ClH pH 5.8	125 mM
SDS	0.5 %
Dextrano T-500	2.5 %
Azul de Bromofenol	0.01 %

2.3.2. Buffer de Muestra (X2)

Glicerol	20 %
SDS	4 %
β -Mercaptoetanol	10 %
Tris-ClH pH 6.8	125 mM
Azul de Bromofenol	0.002 %

2.3.3. Solución E (Gel de Resolución)

Acrilamida	30 %
Bisacrilamida	0.8 %

Filtrar a través de 0.45 μ m. Guardar a 4 \circ C durante dos semanas como máximo.

2.3.4. Solución B (Buffer de Resolución)

Tris-ClH 1.5 M	200 ml
Tris-Base 1.5 M	800 ml

Mezclar bien y chequear el pH que debe tener un valor entre 8.8 y 8.9. Guardar a 4 \circ C.

2.3.5. Solución de SDS al 10 %.-

Disolver 10 gr de SDS en 100 ml de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

2.3.6. Solución de APS al 10 %.-

Disolver 100 mg de APS en 1 ml de agua destilada. Guardar a 4 °C durante un máximo de 24 horas.

2.3.7. Solución C (Buffer de Concentración).-

Tris-Base 240 mM pH 6.8

Puede prepararse a partir de Tris-Base 1.5 M titulando con ClH 6 N. Guardar a 4 °C.

2.3.8. Solución D (Gel de Concentración).-

Acrilamida	10 %
Bisacrilamida	0.5 %

Filtrar a través de 0.45 µm y guardar a 4 °C durante un máximo de dos semanas.

2.3.9. Buffer de corrida.-

Tris-Base	50 mM
Glicina	380 mM
SDS	0.1 %

Guardar a temperatura ambiente.

2.4. METODO EXPERIMENTAL.

Esencialmente es el método de Cleveland et al. (1977) modificado para mejorar la resolución (Fey et al. 1981). Este método se ha hecho muy popular debido a que la rotura de las proteínas se lleva a cabo sin necesidad de eluirlas del gel de poliacrilamida además de que también es adecuado cuando se utiliza SDS-PAGE porque la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* permanece activa en presencia del detergente.

1.- La cantidad de polipeptido necesaria dependerá del método de detección que se vaya a utilizar posteriormente: Aproximadamente 10 µg si el mapa de péptidos va a teñirse con

Azul de Coomassie y aproximadamente 50 ng si se tiñe con plata. Para polipéptidos marcados con ^3H se necesitan del orden de 20.000 cpm mientras que solo se requieren 5-10.000 cpm en el caso de ^{14}C o ^{35}S (correspondiente a una cantidad tan pequeña como 1-3 ng) si se detecta por fluorografía.

2.- Correr los geles bidimensionales y teñirlos con Azul de Coomassie como se ha descrito en páginas anteriores. Si la muestra es radiactiva, secar el gel sin fijarlo y exponerlo a una película de rayos-X durante 12-36 horas. No pueden utilizarse geles tratados para fluorografía.

3.- Cortar el área que contiene el polipéptido de interés y rehidratarla con 200 μl de agua destilada en un tubo Eppendorf durante 15 minutos.

4.- Colocar el trocito de gel sobre un plástico que previamente se ha limpiado con Etanol y eliminar los posibles restos de papel Whatman que queden adheridos en el gel. Doblar el plástico y con ayuda de una espátula machacar el gel tan finamente como sea posible. Transferir nuevamente el gel "homogeneizado" a un tubo Eppendorf esteril.

5.- Añadir 25 μl de Buffer de carga. Mezclar y centrifugar 5 segundos en la minifuga.

6.- Hervir durante 5 minutos para ayudar a solubilizar las proteínas. Mezclar y centrifugar 5 segundos en la minifuga.

7.- Una vez enfriado el tubo a temperatura ambiente añadir 25 μl de proteasa disuelta en Buffer de carga. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se pueden obtener resultados satisfactorios utilizando las siguientes cantidades de proteasa por μg de polipeptido:

Quimotripsina	10-100 μg
Elastasa	20-200 μg
Papaína	2-20 μg
Tripsina	10-100 μg
Proteasa V8 (Staphilococcus aureus)	20-200 μg

La última es la mas utilizada dado que produce un reducido número de péptidos. Además, el grado de digestión es relativamente independiente de la relación enzima-sustrato lo

cual facilita la comparacion de resultados de experimentos diferentes.

8.- Añadir 50 μ l de Buffer de Muestra (X2) y hervir 3 minutos para inactivar la enzima.

9.- Mezclar, centrifugar 10 segundos en la minifuga y guardar a - 20 $^{\circ}$ C hasta el momento de su aplicación.

10.- Preparar un gel en placa del 15 % Acrilamida de acuerdo con el siguiente protocolo. Para un gel standard con dimensiones internas de 230 x 180 x 1.6 mm mezclar las soluciones siguientes:

Solucion E	33 ml
Solución B	16.5 ml
SDS 10 %	660 μ l
Agua destilada	15.5 ml

11.- Degasificar y añadir 13.2 μ l de TEMED y 330 μ l de APS 10 %.

12.- Colocar la solución entre las placas hasta aproximadamente 4 cm de la parte superior.

13.- Sellar con Isobutanol saturado con Solución B (Buffer de Resolución). Esperar dos horas a que polimerice.

14.- Preparar la solución del Gel de Concentración de 5% Acrilamida mezclando las soluciones siguientes:

Solución D	11.2 ml
Solución C	1.8 ml
SDS 10 %	225 μ l
Agua destilada	9 ml

15.- Una vez polimerizado el Gel de Separación eliminar el Isobutanol y lavar la parte superior de dicho gel con agua destilada. Degasificar la mezcla de Gel de Concentración y añadir 12 μ l de TEMED y 340 μ l de APS 10 %.

16.- Añadir el Gel de Concentración e insertar un peine con pocillos de tamaño adecuado. Dejar que polimerice al menos durante 60 minutos.

17.- Retirar el peine y lavar los pocillos con Buffer de Corrida haciendo uso de una jeringa.

18.- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y añadir Buffer de Corrida en el reservorio inferior. Asegurarse de eliminar cualquier burbuja de aire que pueda formarse entre las placas de vidrio y el gel.

19.- Cargar las muestras cuidando de aplicar incluso los pequeños trozos de gel que contengan. Para realizar esta operación puede utilizarse una pipeta Gilson con la punta del tip cortada.

20.- Llenar el reservorio superior con Buffer de Corrida y conectar la fuente de alimentación. Correr la electroforesis a 15 mA hasta que el Azul de Bromofenol alcance la parte inferior del gel.

21.- Tras la electroforesis, procesar el gel de acuerdo con alguno de los métodos de tinción (Coomassie o Plata) o para fluorografía según se ha descrito en este manual.

Las placas de vidrio que se hayan utilizado en la electroforesis deben lavarse con detergente y calentarse a 150 °C durante al menos una hora con objeto de inactivar las trazas de enzima que pudieran quedar.

3. TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS DESDE GELES
BIDIMENSIONALES A PAPEL DE NITROCELULOSA.

3.1. INTRODUCCION.

La electroforesis en gel de poliacrilamida ha demostrado sobradamente que es la técnica mas util para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Su poder de resolución ha ido aumentando progresivamente y como hemos comentado en hojas anteriores es posible hoy dia llegar a separar mas de 2000 proteínas mediante geles bidimensionales de alta resolución. No obstante, uno de los problemas que se plantean es el posterior análisis de las proteínas separadas, análisis que ha estado muy limitado debido a que las moléculas de proteína quedan atrapadas en el interior de la matriz del gel y por tanto no son facilmente accesibles a posteriores estudios. Inicialmente se desarrollaron algunos métodos para tratar de solucionar este problema, como la elución de proteínas o el análisis directo "in situ" utilizando anticuerpos pero estos métodos aparte de consumir mucho tiempo, son insensibles y normalmente conllevan una excesiva pérdida de resolución.

Ha sido la aplicacion al caso de las proteínas de métodos esencialmente idénticos a las técnicas de transferencia de DNA descritas por Southern lo que ha permitido un considerable avance en su análisis, ya que ha hecho posible trasladar la alta resolución obtenida en la matriz de los geles hasta la superficie de un papel facilitando entonces su posterior análisis mediante una amplia variedad de métodos. Durante los últimos años se ha aplicado la transferencia de proteínas a un gran número de problemas biológicos de muy diversa indole entre los que podríamos mencionar la identificación de proteínas que unen DNA o RNA, la caracterización de glicoproteínas o los ensayos de especificidad de antígenos y anticuerpos.

Existen tres metodos básicos de transferencia de proteínas: Transferencia por capilaridad, Transferencia por Difusión-Contacto y Electrotransferencia. Es de esta última de la que nos ocuparemos brevemente en los próximos apartados.

Descrita inicialmente por Towbin et al. utiliza una disposicion en sandwich similar a la transferencia por Difusión-Contacto, pero en vez de pasar las proteínas por difusión pasiva son conducidas electricamente desde el gel al papel. Con esto se consigue una mayor eficiencia de transferencia en unos

tiempos relativamente cortos empleando unas condiciones precisas y reproducibles.

Existen tres tipos fundamentales de soportes a los que transferir proteínas: los filtros de Nitrocelulosa, los Diazo papeles y los papeles activados con Bromuro de Cianógeno (CBA).

Los filtros de nitrocelulosa son los medios de transferencia mas empleados debido a sus multiples ventajas entre las que podríamos señalar su alta capacidad de union ($80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), su facil manejo al no requerir preactivación, la posibilidad de bloquear los sitios no ocupados y su larga vida (al menos un año a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Entre sus inconvenientes cabría mencionar que la union de proteínas de pequeño tamaño (<20000) puede desestabilizarse durante los lavados y que la transferencia en ausencia de metanol puede disminuir la capacidad de unión.

La naturaleza exacta de la unión nitrocelulosa-proteína no esta del todo clara pero parece que es el resultado de diversos factores que incluyen interacciones hidrofóbicas e iónicas, así como puentes de hidrógeno. La capacidad de unión del filtro de Nitrocelulosa viene determinada por el area de la superficie disponible del filtro que es inversamente proporcional al tamaño de poro. En la mayoría de los trabajos se ha utilizado un diametro de poro de $0.45 \mu\text{m}$, sin embargo, las proteínas de pequeño tamaño se unen mas eficientemente cuando se utiliza Nitrocelulosa con un diametro de $0.20 \mu\text{m}$.

Se han descrito algunas variantes de transferencia electroforetica de proteínas a nitrocelulosa que difieren fundamentalmente en la composición del Buffer de Transferencia. Este punto es crítico ya que con objeto de obtener la mayor eficacia en la transferencia de proteínas desde el gel al papel es necesario no solo que se transfiera un tiempo adecuado sino que la composición del buffer y su pH asegure un máximo de solubilidad de las proteínas. En este sentido, cabe señalar que en la bibliografía es posible encontrar dos tipos fundamentales de bufferes de transferencia dependiendo de que incluyan o no alcohol. Hay argumentos en contra y a favor de ambas alternativas cuya discusión queda fuera de esta breve descripción. El buffer de transferencia que se incluye en este manual es el que habitualmente se utiliza en el laboratorio del autor con buenos resultados.

3.2 REACTIVOS

Acido Tricloroacético (TCA)
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)
Glicina
Metanol
Ponceau S
Tris-Base

Papel Whatman 3MM
Papel de Nitrocelulosa

3.3. SOLUCIONES Y BUFFERES PARA ELECTROTRANSFERENCIA.

3.3.1. Buffer de Transferencia.-

Tris-Base	25 mM
Glicina	195 mM
SDS	0.1 %
Metanol	20 %

3.3.2. Solución de Tinción.-

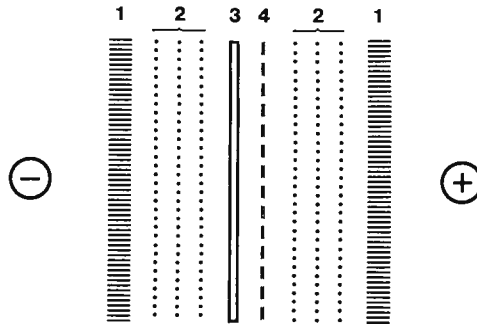
Ponceau S 0.2 % en TCA 3 %

3.4. METODO EXPERIMENTAL.

1.- Llevar a cabo la electroforesis bidimensional de proteínas utilizando los métodos anteriormente descritos en este manual.

2.- Introducir la hoja de Nitrocelulosa en agua destilada durante unos minutos antes de ponerla en contacto con el gel.

3.- Ensamblar el sistema de transferencia como se muestra en el siguiente diagrama:



- 1: SCOTHBRITE
- 2: PAPEL WHATMAN 3MM
- 3: GEL
- 4: PAPEL DE NITROCELULOSA

El gel bidimensional y el papel de Nitrocelulosa deben quedar en contacto formando un "sandwich" entre tres capas de papel Whatman 3MM y una lámina de scothbrite. Hay que tener cuidado para que no queden burbujas de aire entre la nitrocelulosa y el gel así como entre ninguna de las otras capas del ensamblaje para lo cual puede ser recomendable el uso de un pequeño rodillo que asegure un perfecto contacto entre todas ellas. Cada capa de papel Whatman, gel o nitrocelulosa deben humedecerse con el buffer de transferencia mientras se construye el "sandwich". Todo el ensamblaje se coloca en la cámara de electrotransferencia cuidando que el papel de nitrocelulosa quede hacia el ánodo.

4.- Llenar la cámara con el Buffer de transferencia.

5.- Llevar a cabo la Electroforesis. Correr a 30 V (aproximadamente 170 mA en el comienzo y 220 mA al final) durante 6-8 horas. En caso de cambiar las condiciones de corrida y producirse un excesivo calentamiento debe emplearse un sistema de refrigeración.

6.- Eliminar el papel de Nitrocelulosa y colocarlo en una bandeja de vidrio con el lado en el que se han transferido las proteínas hacia arriba.

7.- Teñir el papel de Nitrocelulosa con 250 ml de Solución de Tinción durante 3 minutos aproximadamente. La sensibilidad del Ponceau S es similar a la del Azul de Coomassie.

8.- Retirar la Solución de Tinción y desteñir el papel con agua destilada hasta que se hagan visibles las manchas de proteína. Hay que tener en cuenta que la tinción con Ponceau S es reversible, por lo que un exceso de lavado eliminaría rápidamente las manchas de proteína que deben aparecer en una tonalidad rosa-roja.

9.- El papel puede guardarse a 4 °C durante varias semanas hasta su utilización.

4.-BIBLIOGRAFIA.

- Anderson, L. (1989). "Adaptation of the colloidal Coomassie Blue stain to quantitative, multi-gel 2-D work". 2D News 3,3.
- Bonner, W.M., and Laskey, R.A. (1974). "A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels". Eur. J. Biochem. 46, 83-88.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis". J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.
- Fey, S.J., Bravo, R., Mose Larsen, P., Bellatin, J., and Celis, J.E. (1981). "³⁵S-Methionine labelled polypeptides from secondary mouse kidney fibroblast: Coordinates and one dimensional peptide maps of some major polypeptides". Cell Biol. Int. Rep. 5, 491-500.
- Garrels, J.I., (1979). "Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines". J. Biol. Chem. 254, 7961-7977.
- Hearn, M.T.W. (1980). "The use of reversed phase high performance liquid chromatography for the structural mapping of polypeptides and proteins". J. Liq. Chromatogr. 3, 1255-1276.
- Ingram, V.M., (1956). "A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin". Nature, 178, 792-794.
- Ingram, V.M., (1959). "Abnormal human haemoglobin. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins". Biochim. Biophys. Acta, 36, 402-411.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227, 680-685.



- Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975). "Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography". *Eur. J. Biochem.* 56, 335-341.
- Morrissey, J.H., (1981). "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity". *Anal. Biochem.* 117, 307-310.
- O'Farrell, P.H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., and O'Farrell, P.H. (1977). "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins". *Cell* 12, 1133-1142.
- Studier, F.W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNA's and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79, 237-248.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Watanabe, S., and Yoshida, A. (1971). "Micro-scale peptide mapping method for identification of variant proteins" *Biochem. Genet.* 5, 541-547.

5. RESUMENES DE LAS CONFERENCIAS IMPARTIDAS POR LOS
PROFESORES INVITADOS.

COMPREHENSIVE 2D GEL PROTEIN DATABASES OFFER A GLOBAL APPROACH TO THE STUDY OF THE MAMMALIAN CELL: THEIR LINK TO THE HUMAN GENOME MAPPING AND SEQUENCING PROJECT.

J.E. Celis, P. Madsen, B. Gesser, H. Leffers, B. Honoré, G. Ratz, J.B. Lauridsen, B. Basse, H.H. Rasmussen, A. Celis, G. Bauw, M. Van Damme, M. Puype, M. Van den Bulcke, J. Vandekerckhove.

Institute of Medical Biochemistry, Aarhus University and Bioregulation Research Centre, Ole Worms Alle, Build. 170, 8000 Aarhus C and Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, Ledeganckstraat 85, B-9000 Gent, Belgium.

The total number of proteins synthesized by a mammalian cell is believed to be quite large and current estimates range from 3.000 to 6.000. There are many different cell types in a given organism and the composition of one cell type may differ partially from another, with perhaps 30.000 to 50.000 proteins in the whole organism. To date, only a small portion of the total set of proteins from any mammalian organism has been identified and little is known as to the protein composition of differentiated cell types.

During the last 15 years, elegant and powerful techniques have been devised for the separation and characterization of proteins. Of these, high resolution 2D gel electrophoresis has proven to be the technique of choice to separate proteins from complex samples such as the mammalian cell. This technique, which was originally developed by O'Farrell, separates proteins both in terms of their isoelectric points (pI) and molecular weights. To date, about 2000 (³⁵S)-methionine labelled proteins can be separated from a given mammalian cell type, a number that corresponds to about 2 million base pairs of coded DNA. Even though this number represents a fraction of the total number of proteins thought to be present in a mammalian cell, it is large enough to encourage a global approach to the study of the cell.

Much of the information generated so far using the 2D gel technology, however, has not reached the scientific community in its completeness, and only recently thanks to the development of appropriate computer software, it has been possible to scan, assign numbers to individual polypeptides, compare, quantitate and store the wealth of information contained in the gels. It is therefore possible to use this technology to accurately compare protein patterns between various cell types of normal and abnormal origin and to establish comprehensive databases, that is those containing information concerning various properties (physical, chemical, biochemical, physiological, genetic, biological, immunological, architectural, etc.) of all the proteins that can be detected in a given mammalian cell type. These databases provide with an easy and standardized medium to communicate protein information and offer a global approach to the study of the

cell. Furthermore, since protein and DNA sequence information can now be linked thanks to the advent of microsequencing, it will be possible to assign partial protein sequences to genes for which the full DNA sequence and the chromosomal location is known.

Celis J.E., Ratz G.P., Celis A., Madsen P., Gesser B., Kwee S., and Madsen P.S. (1988).
Leukemia 2 561

Celis J.E., Ratz G.P., Madsen P., Gesser B., Lauridsen J.B., Kwee S., Rasmussen H.H., Nielsen H.V., Crüger D., Basse B., Leffers H., Honorè B., Møller O., Celis A., Vandekerckhove J., Bauw G., Van Damme J., Puype M. and Van den Bulcke M. (1989).

FEBS Lett. 244 247

Bauw G., Van Damme J., Puype M., Vandekerckhove J., Gesser B. Ratz G.P., Lauridsen J.B. and Celis J.E. (1989).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 7701

Celis J.E., Honorè B., Bauw G. and Vandekerckhove J. (1990)
BioEssay in press.

PROTEIN DATABASES BASED ON THE ANALYSIS OF TWO-DIMENSIONAL GELS
James I. Garrels, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Building protein databases that can grow and be shared between laboratories throughout the world is the most challenging goal for the two-dimensional gel field. The QUEST system that we have established at the Cold Spring Harbor Laboratory incorporates a dedicated 2D gel laboratory for routine production of standardized, high-resolution gels and a computer facility for detailed quantitative analysis. Our facility is using this technology in collaboration with other groups at CSHL and elsewhere to build protein databases for mammalian and yeast cells.

We work almost exclusively with radiolabeled protein samples represented lysates of whole cells or cellular subfractions. The spot patterns detected on film contain well over 2000 spots. These images are scanned into the computer, which has automatic programs to detect and quantify the spots and to match the spot patterns from different gels.

Databases are built by linking groups of gels that represent different experiments. Our first major database, developed by James Garrels and Robert Franza, has been constructed from a family of 10 normal and transformed rat cell lines (the REF52 database). A number of the spots on these patterns have been identified, and many of the unknown spots have been grouped into sets according to the pattern of subcellular fractionation, post-translational modification, or quantitative behavior. One of the many interesting results from the REF52 database is the discovery of a set of proteins with PCNA-like regulation.

PCNA, also called cyclin, was discovered on 2D gels by Bravo and Celis, as a growth-related protein. We find that PCNA and a coregulated family of 26 other proteins, are repressed in normal cells at confluence, are stimulated by fresh serum when the cells enter S phase and are elevated in transformed cells. Most interestingly, each of these proteins is overexpressed and completely unregulated in cells transformed by SV40 or adenovirus, however in cells transformed by a retrovirus, growth-regulation of these proteins is normal. Because most of these proteins are nuclear, we suspect that the set of PCNA-like proteins contain many interesting components of the machinery for DNA synthesis and cell-cycle regulation.

Currently a yeast database and a mouse embryo database are being actively developed. Yeast is a powerful system because of its genetics and because of its ease of manipulation for 2D gel studies. Completed experiments, carried out by Calvin McLaughlin, have identified the heat shock proteins, proteins with unusual turnover rates, proteins coded from genes with introns, and proteins that contain N-terminal acetylation.

The mouse embryo database, being built in collaboration with Keith Latham and Davor Solter, contains patterns from synchronized embryos labeled every 3 hours from fertilization through the 4-cell stage (and later stages are being analyzed). The most dramatic result is the massive change of protein patterns as the cells switch from maternally-coded mRNA to embryonic mRNA at the 2-cell stage. More than half of the proteins of the cell either stop being synthesized or begin to be synthesized for the first time during a brief portion of the 2-cell stage.

The future possibilities for 2D gel databases are bright. Some technological improvements and standardization of the technology are still needed, but there seem to be no insurmountable obstacles to building large and informative 2D gel databases that can be shared by researchers throughout the world.

SEQUENCING OF PROTEINS FROM TWO-DIMENSIONAL GELS

Joël Vandekerckhove

Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent.
B-9000 Gent. Belgium

Since its introduction in 1985, the technique of protein electroblotting and microsequencing has become one of the most important tools in obtaining partial sequence information of gel separated proteins, which then forms the basis for the cloning of the corresponding cDNA(s) or for the polymerase chain reaction.

The original procedures of Vandekerckhove et al (1) and Aebersold et al (2) used chemically modified glassfiber sheets as "inert" immobilizing membranes. In order to bind proteins, the glassfiber sheets were modified to a hydrophobic and positively charged membrane. In the first case this was done by dipping the sheets in a water solution of polycations (first Polybrene later poly (4-vinyl-N-methylpyridinium iodide) (P4VMP)) (1,3), resulting in a non-covalently modified membrane. In the second case, the silanol groups of the glass surface were covalently modified by reaction with-N-trimethoxysilyl-propyl N,N,N-trimethylammonium chloride (2). All these membranes showed binding capacities of 20-30 ug of protein/cm² and were shown to be suitable supports for NH₂-terminal protein sequence analysis using the gas-phase sequencing technology (4). Eckerskorn et al (5) demonstrated that siliconized glassfiber sheets equally served this purpose. The protein detection could now be done with classical staining methods (Coomassie blue, Amido Black); there where the positively charged membranes needed the use of either fluorescamine or dipentylloxacarbocyanine as protein staining reagents.

Pluskal et al (6) introduced membranes of polyvinylidene difluoride (PVDF) as an alternative for nitrocellulose or modified nylon. This membrane was later shown to be suitable as protein absorbing support for gas-phase sequencing (7,8). PVDF or Immobilon membranes are now widely used for this purpose: it is commercially available, it does not need modification prior to use and the detection of the proteins is done with classical staining procedures. Its protein binding capacity in blotting experiments is similar to that of the modified glassfiber membranes.

We have used two-dimensional gel electrophoresis as a general "preparative" method to purify proteins for microsequence analysis. In the first experiments, proteins derived from a total extract of *Nicotiana tabacum* leaf tissue, were directly blotted from the gel onto poly (4-vinyl-N-methylpyridinium iodide) coated glassfiber sheets. The major spots were excised and subjected to NH₂-terminal sequence analysis. This allowed the identification of five of the eight selected proteins, while two more were recognized from genera-

ted Internal sequences. In a second set of experiments, proteins of human origin were separated on multiple two-dimensional gels and the Coomassie-stained spots were excised from the gels. The combined spots were re-eluted and concentrated in a new gel and blotted on Immobilon. They were fragmented by *in situ* proteolysis and the generated peptides separated by reversed phase HPLC and sequenced. The obtained internal sequences covered at the average 35 residues per protein and allowed unambiguous identification of 13 of the 23 proteins analysed so far. The sequence information obtained of the unidentified proteins is sufficient for further cloning. These results demonstrate that it is in the reach of current technologies to perform a systematic sequence analysis of the major proteins seen in two-dimensional gels. This offers an unique opportunity to link information contained in protein databases with known or forthcoming DNA sequence data.

REFERENCES

- (1) Vandekerckhove, J., Bauw, G., Puype, M., Van Damme, J. and Van Montagu, M. Eur. J. Biochem. 1985, 152, 9-19.
- (2) Aebersold, R.H., Teplow, D.B., Hood, L.E. and Kent, S.B.H. J. Biol. Chem. 1986, 261, 4229-4238.
- (3) Vandekerckhove, J., Bauw, G., Van Damme, J., Puype, M. and Van Montagu, M. in: Walsh, K.A. (ED.), Methods in Protein Sequence Analysis 1986, Humana Press, Clifton New Jersey 1987, pp. 261-276.
- (4) Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. and Dreyer, W.J. J. Biol. Chem. 1981, 256, 7990-7997.
- (5) Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H. and Lottspeich, F. Eur. J. Biochem. 1988, 176, 509-519.
- (6) Pluskal, M.G., Przekop, M.B., Kavonian, M.R., Vecoli, C. and Hicks, D.A., Biotechniques 1986, 4, 2/2-283.

6. LISTA DE PARTICIPANTES.

LISTA DE PARTICIPANTES

José Santiago Agueda Landero	- Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Madrid.
José Alberola Ila	- Servei d'Immunologia. Hospital Clinic i Provincial. Barcelona.
Montserrat Dabán Marín	- Dpto. de Enginyeria Química. ETSEIB. Barcelona.
Marta Fontes Bastos	- Dpto. de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.
M ^a Elena Martín Palma	- Dpto. de Investigación-Bioquímica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.
Virginia Martín Rojas	- Dpto. de Genética y Biotecnía. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.
M ^a de la Cruz Muñoz Centeno	- Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. C.S.I.C. Universidad de Sevilla.
Nicolás Toro García	- Estación Experimental del Zaidín. C.S.I.C. Granada.

Fundación Juan March

SERIE UNIVERSITARIA

PUBLISHED TEXTS

Green Series

(Mathematics, Physics, Chemistry, Biology, Medicine)

- 2 Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencias de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E. y Alsina, C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F. y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudio sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Alfonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el 4_{He} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.^a D.:
Reacción de amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viétez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M. y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Álvarez, C. y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmucitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Galián Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.^a:
Detección precoz del hiporitoidismo congénito.
- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirotrópa.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las orquídeas españolas.

- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. L.:
Interacción del ciclo de los purín nucleóticos con el ciclo del ácido cítrico en músculo esquelético de rata durante el ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos faunísticos y ecológicos de carábidos altoaragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.
- 151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azoyobacter: células germinales.
- 152 Calle García, C.:
Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.
- 154 Alberdi Alonso, M.^a T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).
- 156 Gella Tomás, F. J.:
Estudio de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.
- 157 Margalef Mir, R.:
Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.
- 158 Álvarez Fernández-Represa, J.:
Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.
- 161 Tomás Ferré, J. M.^a:
Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.
- 163 Ferrándiz Leal, J. M.:
Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.
- 164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.^a J. y Bibiloni Rotger, M.^a A.:
Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.
- 165 Velasco Rodríguez, V. R.:
Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.
- 166 Moreno Castillo, I.:
Ciclo anual de zooplancton costero de Gijón.
- 168 Durán García, S.:
Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo(s) de regulación.
- 169 Martínez Pardo, R.:
Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.

- 171 García Jiménez, J.:
Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.
- 173 Fernández Aláez, C.:
Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.
- 174 Furio Egea, J.:
Citokinas en agrios. Actividades endógenas, efectos fisiológicos y aplicaciones.
- 180 Moreno Rodríguez, J. M.:
Estudios ecológicos en jarales (cistion laurofilii): Variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas.
- 182 Pons Vallés, M.:
Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables.
- 183 Herrero Ruiz de Loizaga, V. J.:
Estudio de reacciones químicas por haces moleculares. Aplicación a la reacción $C_2H_5Br + KBr + C_2H_5Br$.
- 193 Martín García, V. S.:
Utilización sintética en química orgánica de metales pesados como catalizadores. Oxidación asimétrica.
- 195 Badía Sancho, A.:
Receptores presinápticos en el conducto deferente de rata.
- 196 Estévez Toranzo, A.:
Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo.
- 197 Lizarbe Iracheta, M.^a A.:
Caracterización molecular de las estructuras de colágeno.
- 203 López Calderón, I.:
Clonación de genes de «Saccharomyces cerevisiae» implicados en la reparación y la recombinación.
- 211 Ayala Serrano, J. A.:
Mecanismo de expresión de la PBP-3 de «E. coli»: Obtención de una cepa hiperproductora de la proteína.
- 240 **Genetic Strategies in Development.**
Symposium in honour of Antonio García Bellido. Lectures by S. Ochoa, S. Brenner, G. S. Stent, E. B. Lewis, D. S. Hogness, E. H. Davidson, J. B. Gurdon and F. Jacob.
- 244 **Course on Genome Evolution.**
Organized by E. Viñuelas. Lectures by R. F. Doolittle, A. M. Weiner/N. Maizels, G. A. Dover, J. A. Lake, J. E. Walker, J. J. Beintema, A. J. Gibbs, W. M. Fitch, P. Palse, G. Bernardi and J. M. Lowenstein.
- 246 **Workshop on Tolerance: Mechanisms and implications.**
Organized by P. Marrack and C. Martínez-A. Lectures by H. von Boehmer, J. W. Kappler, C. Martínez-A., H. Waldmann, N. Le Douarin, J. Sprent, P. Matzinger, R. H. Schwartz, M. Weigert, A. Coutinho, C. C. Goodnow, A. L. DeFranco and P. Marrack.
- 247 **Workshop on Pathogenesis-related Proteins in Plants.**
Organized by V. Conejero and L. C. Van Loon. Lectures by L. C. Van Loon, R. Fraser, J. F. Antoniow, M. Legrand, Y. Ohashi, F. Meins, T. Boller, V. Conejero, C. A. Ryan, D. F. Klessig, J. F. Bol, A. Leyva and F. García-Olmedo.
- 248 Beato, M.:
Course on DNA - Protein Interaction.
- 249 **Workshop on Molecular Diagnosis of Cancer.**
Organized by M. Perucho and P. García Barreno. Lectures by F. McCormick, A. Pellicer, J. L. Bos, M. Perucho, R. A. Weinberg, E. Harlow, E. R. Fearon, M. Schwab, F. W. Alt, R. Dalla Favera, P. E. Reddy, E. M. de Villiers, D. Slamon, I. B. Roninson, J. Groffen and M. Barbacid.
- 251 **Lecture Course on Approaches to Plant Development.**
Organized by P. Puigdoménech and T. Nelson. Lectures by I. Sussex, R. S. Poethig, M. Delseny, M. Freeling, S. C. de Vries, J. H. Rothman, J. Modolell, F. Salamini, M. A. Estelle, J. M. Martínez Zapater, A. Spena, P. J. J. Hooykaas, T. Nelson, P. Puigdoménech and M. Pagès.

La Fundación Juan March,
creada en 1955, es una institución con finalidades culturales, científicas y
asistenciales, situada entre las más importantes de Europa por su
patrimonio y por sus actividades.

En el campo de la ciencia y de la investigación
la Fundación Juan March
ha colaborado mediante premios, ayudas y becas para la formación
de científicos, realización de trabajos y difusión
de investigaciones.

Desde 1970 dedica
atención específica a la Biología a través de diversos
Planes como los de biología molecular y sus aplicaciones
(1981-88)
y el Plan de Reuniones Internacionales de Biología,
actualmente en vigor, que promueve activamente
las relaciones de la Biología española con la del
resto del mundo.

