

A n e x o

MANUAL DEL EQUIPO DE ELECTROFORESIS VERTICAL. MODELO GIRON 1 CONSTRUIDO EN CUBA POR EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS "VICTORIA DE GIRON"

Por los Dres.:

LUIS HEREDERO, HILDA GRANDA Y KLAUS ALTJAND*

El equipo de electroforesis consta de las siguientes partes principales:

1. Un tanque electroforético para electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con 8 celdas de separación.
2. Dos soportes para la polimerización del gel.
3. 40 cubetas múltiples para la colección y preparación de 1160 muestras.
4. Una pipeta múltiple para la aplicación de volúmenes de 150 μ l o menos (tipo I).
5. Una pipeta múltiple para la aplicación de volúmenes de 5 μ l (tipo II).
6. Una fuente de poder.
7. Celdas de separación de 90, 60 y 30 mm de longitud, adaptadores para el tanque y el soporte para la polimerización, para el uso de las distintas celdas de separación.

1. El tanque electroforético está construido de acrílico. Por un simple mecanismo dos celdas se fijan a una tira de goma incluida en la parte inferior del tanque superior, produciéndose un absoluto contacto entre ambas. De esta forma se analizan 60 muestras en una corrida.

Las celdas son construidas de acrílico para evitar la adhesión del gel de polia-

crilamida y así facilitar la eliminación de éste, sin daño alguno para la celda o el gel. El riesgo de que el gel sea eliminado de la celda debido a la presión hidrostática del buffer de la cámara superior, se evita de dos formas:

- a) Por la anatomía de la celda que permite un cambio en el grosor del gel en el extremo superior e inferior, actuando como línea de fijación.
- b) La construcción del tanque permite la aplicación de los buffers hasta el mismo nivel en ambas cámaras superior e inferior del electrodo.

2. Soportes para la polimerización. Las celdas de separación se fijan a una tira de goma que cierra el extremo inferior de las mismas. Los moldes se introducen en la parte superior de las celdas de separación, formando en el gel 30 huecos de 6 mm de distancia central, y de un área, en el fondo, de 2 x 4,5 mm.

3. Cubetas múltiples. Se construyeron con el objetivo de usar pipetas múltiples para una rápida preparación de las muestras y su transposición rápida al gel.

Se facilita la documentación insertando la hoja con los datos de las 30 muestras en una ranura en el fondo de la cubeta.

Los orificios en la cubeta tienen un volumen de aproximadamente 200 μ l y

* Dpto. de Genética Médica, ICBP "Victoria de Girón".

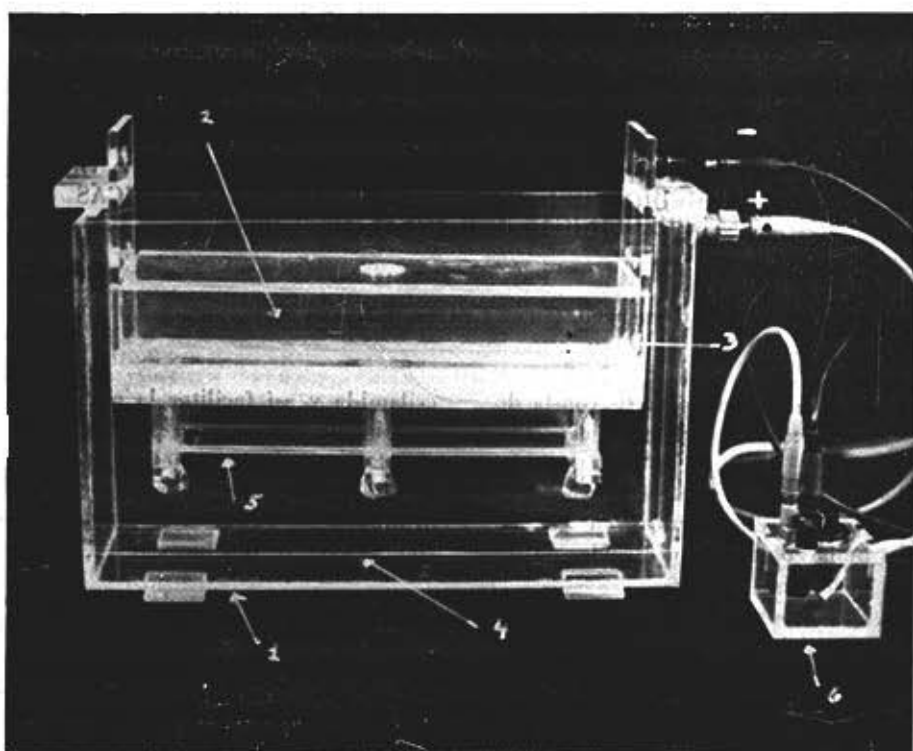


Fig. 1.—(1) Tanque inferior; (2) tanque superior; (3) electrodo del tanque superior; (4) electrodo del tanque inferior; (5) celdas de separación de 30 mm de altura (6) fuente de poder.

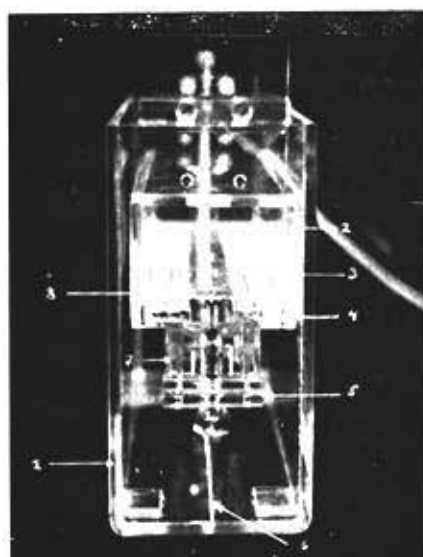


Fig. 2—(1) Tanque inferior; (2) tanque superior; (3) electrodo del tanque superior; (4) tira de goma en la base del tanque superior para fijar las celdas de separación; (5) adaptadores para fijar las celdas de separación; (6) electrodo del tanque inferior; (7) celda de separación de 30 mm de altura; (8) ranura en la base del tanque superior donde se fijan las celdas de separación.

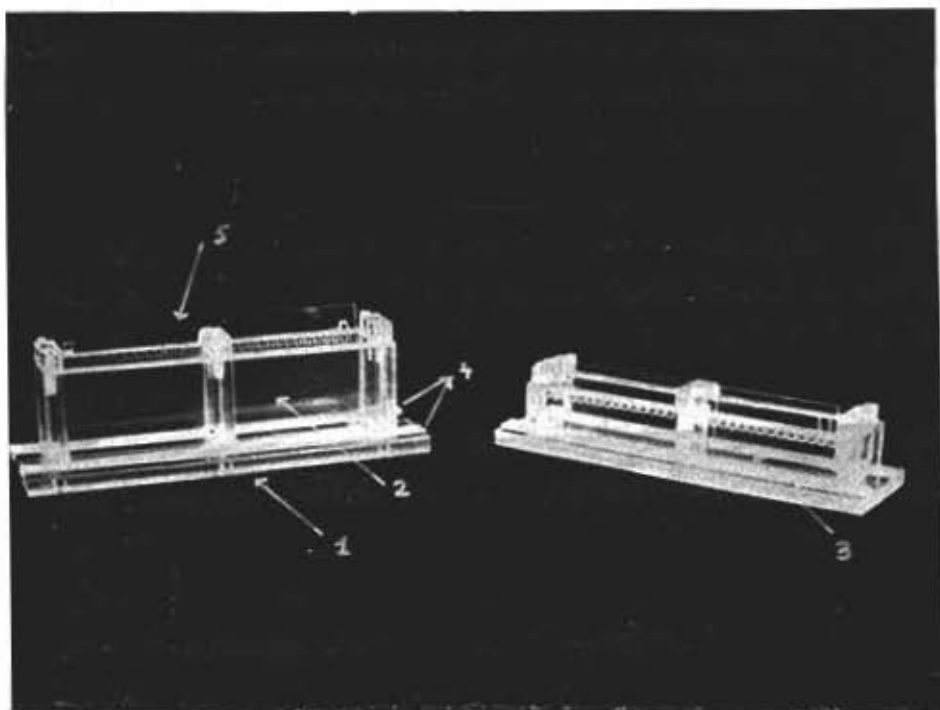


Fig. 3.—(1) Soporte para la polimerización del gel; (2) celdas de separación de 60 mm de altura; (3) celdas de separación de 30 mm de altura; (4) tiras de goma para fijar las celdas de separación por su extremo inferior al soporte para la polimerización; (5) moldes.

una distancia central de 6 mm idéntica a la distancia de las agujas múltiples.

Para evitar la posibilidad de que las cubetas puedan virarse mientras se trabaja, se construyeron soportes para las mismas.

4. Pipeta múltiple (tipo I). Para volúmenes de 150 μ l o menos. Funciona por el movimiento de 15 varillas de PVC de 3 mm de diámetro en huecos de 3,1 mm de diámetro hechos en una pieza de acrílico que se continúan con huecos de 0,9 mm de diámetro, los cuales tienen agujas inoxidables de un diámetro externo apropiado.

Los pequeños espacios entre las varillas de PVC y los huecos en el plástico son cerrados en su parte superior por anillos en O cubiertos por grasa silico-

na, obteniéndose así la succión adecuada.

Las agujas en los huecos de 0,9 mm de diámetro se fijan con cera. Para obtener suficiente reproducibilidad en repetidas aplicaciones de idénticos volúmenes, las varillas se fijan a ambos lados por un mecanismo apropiado.

5. Pipeta múltiple (tipo II), para volúmenes de 5 μ l. Consta de 15 agujas de punción lumbar con un volumen interno de cerca de 6 μ l, que se fijan a una distancia de 6 mm una de otra entre dos piezas de acrílico. Las cabezas de los alambres internos (mandriles) se fijan también entre dos piezas de plástico, las cuales tienen un contacto móvil con las placas que sostienen las agujas; de esta forma se evita la torsión de los alambres

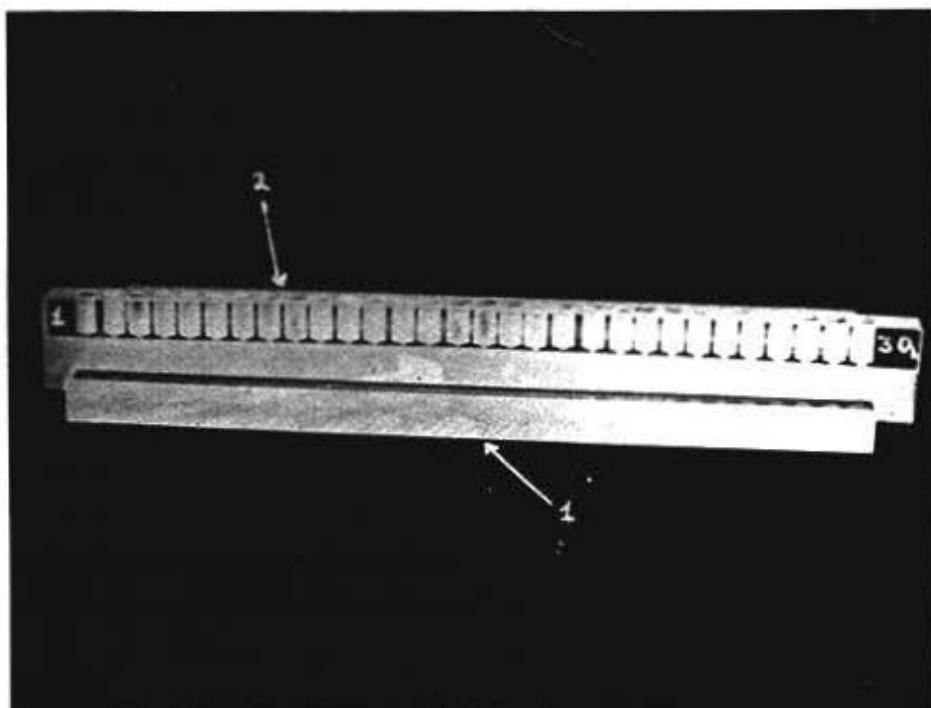


Fig. 4.—(1) Soporte para la cubeta múltiple; (2) cubeta múltiple con capacidad para 30 muestras.

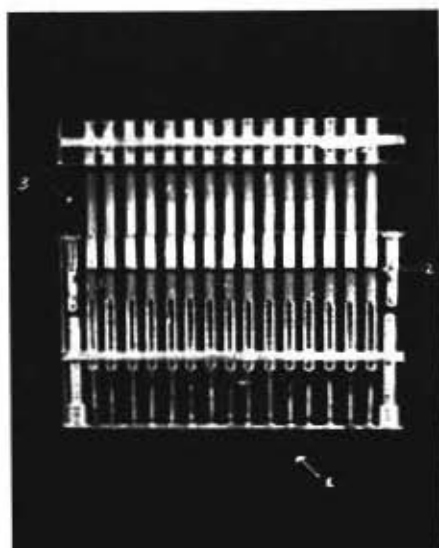


Fig. 5.—(1) Agujas; (2) anillos en O; (3) varillas de PVC.

internos y funciona como un control mecánico hasta el máximo volumen. Con el objetivo de tener un estrecho contacto entre la parte interna de la aguja y el alambre interno, necesario para una succión adecuada, las cabezas de las agujas están parcialmente llenas con tape de teflón.

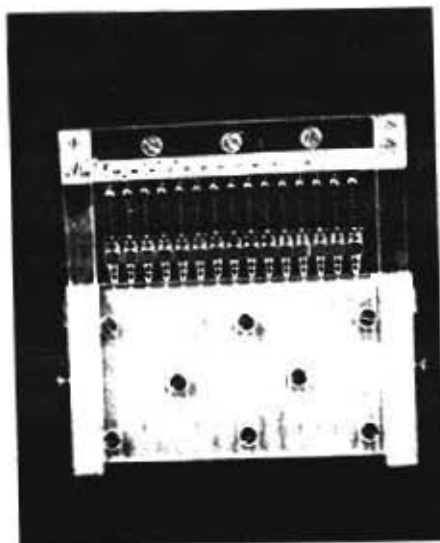


Fig. 6.

6. Fuente de poder. Consiste en un rectificador de 250 mAmp. y 250 volts. de capacidad, colocado en una caja de plástico de 50 x 50 x 50 mm junto con un fusible conectado a los polos positivo y negativo, y una línea para conectar a la red usual.

Para variar el voltaje constante del rectificador, éste se conecta con un regulador de voltaje y un transformador de suficiente capacidad (sólo es necesario el uso de ellos en la separación de determinadas proteínas).

7. Accesorios. Incluyen celdas de separación de 90, 60 y 30 mm de longitud, con adaptadores para fijar las celdas al tanque superior, así como al soporte para la polimerización.

Electroforesis

Dos celdas de separación se fijan al soporte de polimerización y se añade la cantidad necesaria de la mezcla de las soluciones del gel de poliacrilamida.

Los moldes, mantenidos en una solución jabonosa (nosotros usamos *orinoflow* al 1%), se introducen en la parte superior de las celdas.

Cuando la polimerización ha terminado (tiempo de polimerización: aproximadamente 5 minutos), los moldes se eliminan y los orificios en la parte superior del gel se lavan con buffer superior del electrodo.

Con la pipeta múltiple tipo II. 60 muestras, con un volumen aproximado de 4 μ l se transfieren de la cubeta al gel.

Las celdas se fijan al tanque superior, sin hacer demasiada presión a las mismas y se añaden 0,5 litros y 1,5 litros de buffers superior e inferior del electrodo.

El tanque superior se introduce en el inferior y se equilibran los niveles de buffers en ambos tanques para evitar diferencias en la presión hidrostática.

El hecho de que las celdas de separación se encuentren completamente cubiertas por el buffer inferior frío (aproximadamente 8-10°C), hace innecesario un sistema de enfriamiento cuando la electroforesis es de corta duración. Sin embargo, el modelo Girón 2 consta de un sistema de enfriamiento por circulación de agua en la parte inferior del tanque superior: en esta posición a la vez que el equipo no pierde su transparencia, sirve de control efectivo de la temperatura en ambos buffers inferior y superior.

La alta velocidad desarrollada en este sistema se origina por:

1. El uso de pipetas y cubetas múltiples para la preparación de las muestras y su aplicación al gel.

2. La construcción del equipo electroforético, que permite fijar las celdas de separación al tanque superior del electrodo de forma rápida y segura.
3. Poder aplicar un gradiente de voltaje, de cerca de 50 volts. por cm, al gel (cuando se usen celdas de 30 mm de longitud).
4. El uso de buffers discontinuos permite que las muestras sean concentradas en zonas precisas en el gel.
5. Diluir la muestra, cambia la conductividad de ésta con respecto al gel y provoca la concentración de la misma antes de entrar al gel (Hjerten et al, 1965).

Todos estos factores permiten un resultado rápido en el análisis de muchas de las proteínas y enzimas, cuyo método de separación a continuación describiremos:

1. *Electroforesis de hemoglobinas humanas en gel de poliacrilamida.*

Preparación de la muestra: Se utiliza la pipeta múltiple, tipo I, y con 150 μ l de una solución hemolizante se llenan los huecos de la cubeta múltiple; la sangre se obtiene por punción digital con un capilar calibrado unido a un tubo y a un adaptador bucal; 10 μ l de sangre se mezclan con la solución hemolizante hasta obtener una completa

hemólisis de la misma. La solución hemolizante está compuesta por:

- 7 g de sacarosa
- 2 g de saponina
- 25 mg NaN_3

hasta 100 ml de agua desionizada.

Buffer superior del electrodo:

Composición:

- 2,58 g tris
- 1,74 g glicina

hasta 1 litro de agua desionizada (pH 8,9 a 25°C).

Buffer inferior del electrodo:

Composición:

- 14,5 g tris
- 60 ml CHH 1N

hasta 2 litros de agua desionizada (pH 8,07 a 5°C).

Preparación del gel:

El gel se prepara al 7,5%.

Consta de las siguientes soluciones:

Solución 1: 6 ml

30 g acrilamida

0,8 g bisacrilamida

hasta 100 ml de agua desionizada.

Solución 2: 6 ml

9,07 g tris

12 ml CHH 1N

0,24 ml TEMED

hasta 100 ml de agua desionizada (pH 9,1 a 25°C).

Solución 3: 12 ml

0,28 g amonipersulfato

hasta 100 ml de agua desionizada.



Fig. 7.

Procedimiento:

Se mezclan las tres soluciones en la proporción 1:1:2 y se vierten en las celdas de separación, colocando los moldes (mantenidos en solución jabonosa) en la parte superior de las mismas.

Nota: El tiempo de polimerización es de 5 minutos aproximadamente.

Celdas de separación: 30 mm de altura.

Voltaje: 220 volts, con la fuente de poder.

Tiempo: 10 minutos a temperatura ambiente.

Nota: No necesita coloración.

Para el análisis de gran número de muestras, se puede llevar a cabo fotodocumentación de los resultados.

Importante: Los geles se eliminan de las celdas con una placa de plástico del grosor apropiado, no debe utilizarse pieza de cristal alguna u otro objeto duro, pues dañan las celdas.

2. Electroforesis de pseudocolinesterasa del suero (PCHE) locus E_x en gel de poliacrilamida.

Preparación de la muestra: Con la pipeta múltiple, tipo I, adaptada para tomar un volumen de 75 μ l, se llenan los huecos de la cubeta múltiple con una solución de sacarosa al 10%. Se añaden 75 μ l de suero.

El sistema de buffers utilizados y la preparación del gel, son los mismos que se utilizan para la electroforesis de hemoglobinas humanas.

Celdas de separación: 30 mm de altura.

Voltaje: 110 volt con la fuente de poder.

Tiempo: 2½ horas bajo refrigeración.

Coloración: Se preparan las siguientes soluciones:

1 - 25 ml de buffer fosfato pH 6.3 0.25 M (debe tener una temperatura de 37°C), 20 mg, 5 cloro, 2 aminotolueno diazo.

2 - 1 ml de acetona.

80 mg α -naftilacetato.

Se mezclan ambas soluciones y se agitan vigorosamente, se filtra y se incuban



Fig. 8. (1) transferrinas humanas.

los geles a temperatura ambiente hasta que aparezcan las zonas de la enzima de color rojizo (aproximadamente 10 minutos). Se elimina el colorante, se lavan los geles con agua desionizada y se fijan con ácido acético al 5%.

3. *Electroforesis de transferrinas humanas en gel de poliacrilamida.*

Preparación de la muestra: Con la pipeta múltiple, tipo I, adaptada para tomar un volumen de 75 μ l, se llenan los huecos de la cubeta múltiple con una solución de sacarosa al 10%. Se añaden 25 μ l de suero.

El sistema de buffers utilizados es el mismo que se describe para la electroforesis de hemoglobinas humanas, así como la preparación del gel.

El buffer superior debe colorearse con bromofenol azul (0,25 mg en 1 litro) para que sirva de indicador.

Celdas de separación: 30 mm de altura.

Voltaje: 220 volt con la fuente de poder.

Tiempo: 15 minutos a temperatura ambiente.

Coloración: 1 g amido black en 100 ml AcH al 10% (tiempo 2 minutos).

Decoloración: AcH al 10% (toda la noche).

4. *Electroforesis de haptoglobinas humanas en gel de poliacrilamida.*

Preparación de la muestra: Con la pipeta múltiple, tipo I, adaptada para tomar un volumen de 40 μ l de hemolizado, se llenan los huecos de la cubeta múltiple y se añaden 100 μ l de suero.

El hemolizado se prepara de la siguiente forma:

- 100 μ l de glóbulos rojos
- 500 μ l de agua desionizada
- 100 μ l de Cl₂C.

El sistema de buffers utilizados es el mismo que se describe para la electroforesis de hemoglobinas humanas, así como la preparación del gel.

Celdas de separación: 30 mm de altura.

Voltaje: 220 volt con la fuente de poder.

Tiempo: 15 minutos a temperatura ambiente.

Coloración: Se prepara una solución saturada de benidina en alcohol al 95%.

Se prepara una solución de peróxido de hidrógeno al 3%.

Se mezclan ambas soluciones en volúmenes iguales y se disuelve el precipitado formado agregando AcH.

La coloración desaparece al cabo de 15 minutos aproximadamente.

5. *Electroforesis de hemoglobinas de ganado vacuno en gel de poliacrilamida.*

Las muestras se preparan de la misma forma que para la electroforesis de hemoglobinas humanas.

El sistema de buffers utilizados es el mismo que se describe en esa técnica, así como la preparación del gel.

Celdas de separación: 30 mm de altura.

Voltaje: 220 volt. con la fuente de poder.

Tiempo: 5 minutos a temperatura ambiente.

Nota: No necesita coloración.

6. *Electroforesis de transferrinas de ganado vacuno en gel de poliacrilamida.*

Preparación de la muestra: con la pipeta múltiple, tipo I, adaptada para tomar un volumen de 75 μ l, se llenan los huecos de la cubeta múltiple con

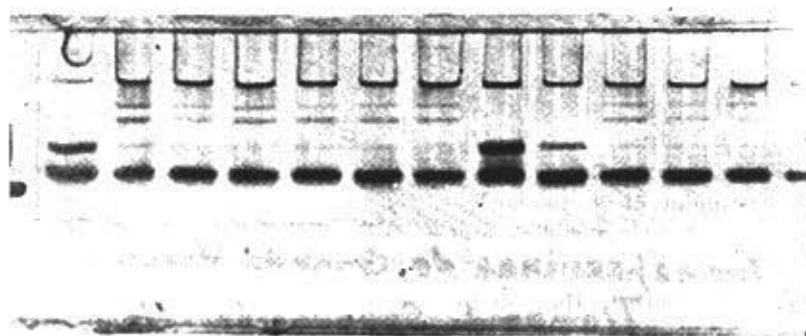
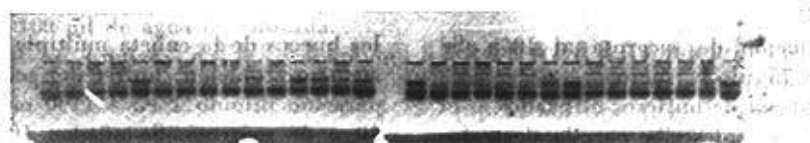
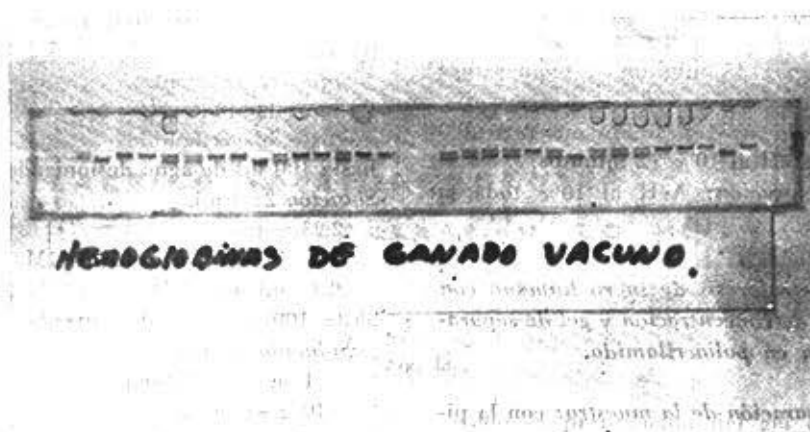


Fig. 9. Foto en detalle de haptoglobinas humanas sin coloración.



HAPToglobinas HUMANAS
 tiempo de separación: 10

Fig. 10.—Visualización de haptoglobinas utilizando el colorante apropiado.



HAPToglobinas DE BOVINO VACUO.

Fig. 11.

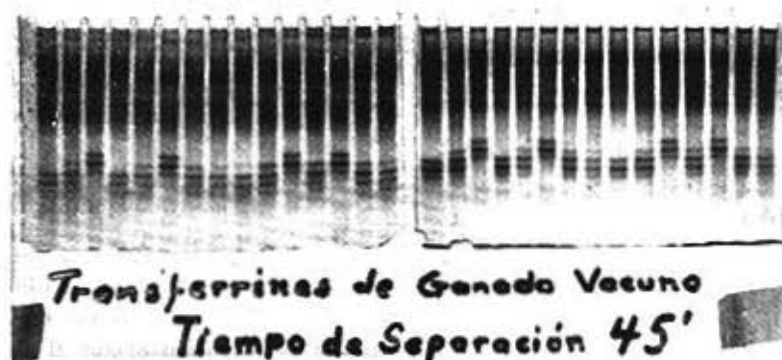


Fig. 12.

una solución de sacarosa al 10%. Se añaden 75 μ l de suero.

El sistema de buffers utilizados es el mismo que se describe para la electroforesis de hemoglobinas humanas, así como la preparación del gel.

El buffer superior debe colorearse con bromofenol azul (0,25 mg en 1 litro) para que sirva de indicador.

Celdas de separación: 60 mm de altura.

Voltaje: 220 volt con la fuente de poder.

Tiempo: 45 minutos a temperatura ambiente.

Coloración: 1 g amido black en 100 ml de AcH al 10% (2 minutos).

Decoloración: AcH al 10% toda la noche.

7. *Electroforesis de suero humano con gel de concentración y gel de separación en poliacrilamida.*

Preparación de la muestra: con la pipeta múltiple, tipo I, adaptada para tomar un volumen de 150 μ l, se llenan

los huecos de la cubeta múltiple con la siguiente solución: buffer del gel de separación diluido 1 en 4 (100 ml) más 10 g de sacarosa. Se añaden 10 μ l de suero a cada hueco.

El sistema de buffers es el mismo que se describe para la electroforesis de hemoglobinas humanas.

Preparación del gel:

Gel de concentración: El gel se prepara al 3%.

Solución 1: 3 ml.

10 g acrilamida

0,8 g bisacrilamida

hasta 100 ml de agua desionizada.

Solución 2: 3 ml.

2,23 g tris

12,8 ml ac. ortofosfórico 1M

0,1 ml TEMED

hasta 100 ml agua desionizada.

Solución 3: 3 ml.

1 mg rivoftabina

40 g sacarosa

hasta 10 ml agua desionizada.

Solución 4: 3 ml

2 partes de solución 3 (gel de separación) en 1 parte de agua desionizada.

El gel se prepara en la proporción 1:1:1:1.

Gel de concentración: El gel se prepara al 8%.

Solución 1: 6 ml
32 g acrilamida.
0,85 g bisacrilamida

hasta 100 ml de agua desionizada.

Solución 2: 6 ml
9,75 g tris
12 ml ClH 1N
0,24 ml TEMED

hasta 100 ml de agua desionizada (pH 9,1 a 25°C).

Solución 3: 12 ml
0,28 g amonipersulfato

hasta 100 ml de agua desionizada.

El gel se prepara en la proporción 1:1:2.

Procedimiento: Se mezclan las soluciones del gel de separación y se vierten en las celdas de separación, se vierte posteriormente agua muy lentamente para no cambiar la composición del gel, hasta que forme una capa por encima de éste. Una vez polimerizado el

gel, se elimina el agua y se vierte la mezcla de las soluciones del gel de concentración y se introducen los moldes.

Celdas de separación: 60 mm de altura.

Voltaje: 220 con la fuente de poder.

Tiempo: 30-45 minutos a temperatura ambiente.

Coloración: 1g de amido blacken 100 ml de AcH al 10% (2 minutos).

Decoloración: AcH al 10% durante toda la noche.

8. Electroforesis de la enzima láctico deshidrogenasa humana en gel de poliacrilamida.

Preparación de la muestra: Puede realizarse con suero o hemolizado. Con la pipeta del tipo 1, se llenan los huecos de la cubeta múltiple con 150 µl de solución hemolizante (la misma usada para hemoglobinas humanas) y se añaden 20 µl de sangre. Cuando se trabaja con suero se adicionan 150 µl de suero a cada hueco de la cubeta múltiple para ser analizados.



Fig. 13.

El sistema de buffers utilizados es el mismo que se describe para la electroforesis de hemoglobinas humanas, así

como la preparación del gel coincide con dicha técnica.

Celdas de separación: 30 mm de altura

Voltaje: 110 con la fuente de poder

Tiempo: 15-20 minutos a temperatura ambiente

Coloración: Para 25 ml de buffer tris-ClH pH 8,07 (mantenidos a 37°C) se añaden los siguientes reactivos:

PMS 0,0025 mg

MTT 0,0025 mg

NAD 0,0025 mg

125 μ l de ácido láctico al 10%.

Se incuban los geles con esta solución a 37°C en la oscuridad; las bandas de la enzima aparecen a los 15 minutos aproximadamente.

Entregado para publicar, Dic. 1973.