

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN PAPEL DE FILTRO

I. Descripción de un equipo y la técnica en uso

por ATILIO A. DREWES

En los últimos años han sido publicados detalles sobre equipos destinados al ensayo electroforético en papel (1, 2, 3, 4, 5).

Distintas substancias han sido analizadas de esta manera, tales como: amino-ácidos, colorantes, proteínas, enzimas, etc., con muy buenos resultados, lo que hace aumentar continuamente el número de laboratorios interesados en su uso.

El método se basa en la observación directa o indirecta de la distinta movilidad de las fracciones poseedoras de carga eléctrica en una banda de papel humedecido con buffer, cuando en sus extremos se aplica un potencial eléctrico.

Comparando la electroforesis libre o clásica con la técnica de electroforesis en papel vemos que mientras la primera sólo separa parcialmente una fracción del total en cada extremo del tubo en U; en el segundo caso, cada fracción se separa íntegramente de las demás marchando aisladamente sobre la banda de papel, escalonándose en función de su movilidad decreciente.

En los trabajos arriba mencionados los autores encaran la solución práctica de diversas maneras. Así Durrum (1), suspende la banda de papel de filtro en una cámara saturada de humedad; Macheboeuf y colaboradores (2), utilizan el mismo principio pero con reservorios de buffer comunicados por sifones a los receptáculos que poseen los electrodos de platino. Biserte (3), construyó un equipo en el cual el papel de filtro se fija entre láminas de vidrio, mantenidas con parafina y con circulación de líquido refrigerante bajo las mismas. Kunkel y Tiselius (4) también utilizan láminas de vidrio pero las fijan con grampas metálicas y los bordes se impermeabilizan con silicones,

ambos extremos de la banda de papel se comunican con las cubetas que contienen el buffer, además las mismas están interconectadas por un tubo de goma con llave que se usa para nivelar el buffer en ambas cubetas. Grassmann y col. (5) construyen el equipo con una cámara de vapor saturada, horizontal, en cuyo interior se tensa la banda de papel de filtro, que sobrepasando ambos extremos de la cámara llega a los reservorios de buffer en los que se han dispuesto tubos que rodeando los electrodos crean un laberinto para disminuir la circulación del buffer cuyo pH se ha modificado por acción electrolítica. Los autores mencionados utilizan fuentes de corriente continua variable entre 50 y 1000 voltios con intensidades de 4 a 20 mA., constituidos por rectificadores de corriente alternada y condensadores con salida a resistencia en forma de potenciómetro.

Descripción del equipo en uso

El equipo actualmente en uso (Fig. 1) consta de una cámara húmeda formada por un vaso de pila de 24 x 13 cm. y 25 cm. de altura con la boca hacia abajo, que cubre las dos cubetas en las que se fijará el papel y el soporte para el mismo. Cada cubeta está comunicada a través del piso de la cámara por medio de un tubo transparente con un frasco tubulado que contiene el buffer. Las tubuladuras de los frascos permiten comunicar ambos frascos entre sí, y cada uno con la cubeta correspondiente dentro de la cámara, la conexión entre los frascos puede anularse por medio de una llave de Hofmann, cuando se ha obtenido el equilibrio de los líquidos.

Los frascos reciben en su interior a través de los tapones perforados los electrodos de platino, cuyos extremos se encuentran rodeados por un tubo de protección; este tubo además de proteger el extremo de platino sirve para impedir la rápida difusión del buffer cuyo pH se modifica dentro del frasco, para ello poseen un orificio pequeño en el fondo que permite la conexión eléctrica del sistema y otro sobre el nivel del buffer para eliminar las burbujas formadas durante la electrólisis del mismo.

El resto del equipo está formado por una fuente rectificadora regulable por resistencia a válvula termiónica que permite fijar la tensión de trabajo entre 200 y 700 voltios de corriente continua y un instrumento para medir tensiones e intensidades, cables de conexión, etc.

Solución Buffer

El buffer utilizado para efectuar electroforesis de proteínas de plasma o suero es el Veronal Sódico-Veronal 0,02 M con pH 8,6 y 0,005 M de cloruro de sodio.

Una forma cómoda de obtener el buffer es partiendo de una solución 0,5 M de Veronal Sódico y ácido clorhídrico N. Se toman 40 ml solución Veronal Sódico 0,5 M se diluye a 500 ml se agregan 5 ml solución ácido clorhídrico N, se controla el pH y se lleva a 1 litro.

Este buffer sirve durante mucho tiempo si se tiene la precaución de variar la polaridad de los electrodos, o de mezclar el buffer de ambos recipientes y repartirlo nuevamente de ambas maneras se equilibra nuevamente el pH.

Para otros pH de trabajo se utilizan buffers de fosfatos y acetatos de Sodio-Acético, etc. de molaridades similares, siendo prudente controlar siempre la intensidad de la corriente que circula.

Disposición y funcionamiento del equipo

Dispuestas las partes como se detalló, se cuida de que el nivel del buffer llegue a media altura en el interior de las cubetas de la cámara húmeda lo que se consigue, ya modificando la cantidad de buffer o subiendo los frascos que lo contienen a altura conveniente. Los tubos estarán llenos de buffer y libres de burbujas lo que se observa por transparencia de los mismos, los electrodos estarán sumergidos, por medio de la interconexión de los frascos se conseguirá que el nivel de las cubetas y de los frascos sea igual.

El papel de filtro, (será de preferencia papel Whatman n° 1) cortado en una banda de ancho conveniente 5 a 12 cm, se dobla por el medio y se marca con lápiz a 7 cm debajo del lomo con trazos horizontales, discontinuos, para delimitar en los espacios que se dejan libres el lugar destinado a la muestra, además con una cruz se indica el extremo positivo del papel; se monta sobre el soporte por su parte media y se introducen sus extremos en las cubetas fijándoselos por medio de varillas de vidrio maciso, que por su peso crea la fuerza necesaria para mantener tenso el papel.

Luego se procede a impregnar totalmente el papel con buffer por medio de una pipeta; se coloca la cubierta en su sitio y se deja

escurrir aproximadamente 10 a 20 minutos para igualar su impregnación, transcurrido el plazo se efectúan las conexiones eléctricas llegando con el polo positivo al frasco de buffer que comunica con la cubeta, en cuyo interior se fijó el extremo marcado positivo del papel. Se cierra la intercomunicación de los reservorios de buffer y desde ese momento puede aplicarse la tensión de trabajo que se fijará entre 400 y 700 V, siendo su intensidad proporcional y variando entre 1 y 5 mA; comprobando el buen funcionamiento del sistema y el desprendimiento normal de pequeñas burbujas en los electrodos, el equipo se encuentra listo para recibir la muestra a analizar electroforéticamente.

La muestra contenida en una micropipeta de punta muy afilada y con capacidad de 1,5 a 5 mm³, según el caso, es transferida al papel de filtro, en la zona comprendida entre los trazos de lápiz (Fig. 2) simplemente apoyando la punta de la pipeta sobre el papel húmedo y efectuando un trazo continuo, para soluciones muy diluídas puede repetirse el trazo en el mismo lugar, aumentándose así la concentración de la substancia. Desde este momento comienza a considerarse el tiempo; se ha observado que procediendo de esta manera se reducen las interferencias creadas por el secado de la mancha sobre el papel y además se consigue un trazo más uniforme no siendo necesario en la mayoría de los casos diluir la muestra; la aplicación previa de la tensión eléctrica impide un pequeño escurrimiento de la muestra, cuando son simultáneos varios análisis en la misma banda, pues se le opone la corriente de electroendósmosis, además, al ser colocada la muestra sobre el papel húmedo se evita totalmente la formación de una zona formada por proteína desnaturalizada por el secado parcial o total de la muestra.

Distintas formas de trazos de muestra pueden ser necesarios de acuerdo a las circunstancias, así para ensayos de impurezas pueden ser útiles manchas circulares de 3-4 mm. de diámetro, para ensayos de reconocimiento de fracciones en sueros son más útiles trazos rectos de 1,5 a 2 cm. de largo por tan sólo 1-2 mm. de ancho; cuando se intenta recuperar microfracciones de una electroforesis con destino a su reconocimiento o ensayos son útiles trazos muy largos de 3 a 10 cm. que pueden abarcar el ancho total de la banda de papel, un ejemplo de la capacidad resolutive del sistema se observa en la Fig. 3 suero humano normal.

Transcurrido el lapso demandado por la electroforesis que oscila entre 2 y 6 horas, según el ensayo a realizar, se suspende la tensión eléctrica, se retira el papel de la cámara húmeda y tal cual estaba en

el soporte se procede a su secado, frente a una fuente de calor o en estufa a 100°.

Reconocimiento de fracciones proteicas

Utilizando el método empleado por Durrin ⁽¹⁾ se logran buenos resultados, y él consiste en impregnar el papel recientemente secado con una solución alcohólica saturada de bicloruro de mercurio que contiene 1 o/oo de azul de bromo fenol, durante aproximadamente 5 minutos, luego se escurre y lava al chorro suave de la canilla. El colorante se habrá fijado por adsorción a la proteína coagulada por el bicloruro de mercurio y que por estar en el medio ácido de éste se tiñe de color amarillo, al lavar el exceso no fijado por el chorro de agua el colorante pasará al pH neutro o alcalino del agua, con viraje al color azul. Un inconveniente de este sistema estriba en que la adsorción del colorante no es igual para todas las fracciones séricas y es por ello que Grassmann ⁽⁵⁾ prefirió el uso del negro amidó 10 B y F. Turva ⁽⁶⁾ utilizó el Azocarmín.

Una vez lavado el papel de filtro al chorro de la canilla se le seca entre papel de filtro y luego en estufa o radiador; de esta manera se hacen visibles pequeñas cantidades de proteína fijas al papel en forma de bandas coloreadas en azul sobre el resto del papel blanco.

Las bandas resultantes son fácilmente comparables entre ellas y la intensidad del color nos da idea de la concentración de la muestra en cada una de sus fracciones, siendo un ejemplo la comparación de las intensidades de color de los ejemplos (Fig. 4).

Es conveniente usar siempre el método comparativo al analizar los trozos o bandas coloreadas, pues existen variables difíciles de fijar tales como, temperatura, evaporación y electroendósmosis que producen variantes en los ensayos electroforéticos y que se eliminan al hacerlo comparativo con un suero o colorantes conocidos.

Así una serie de colorantes pueden servir de referencia; en estos trabajos se utilizaron:

Safranina con movilidad en el papel próxima a la alfa₂ globulina negro lana próxima a la Albúmina. Auramina próxima a la δ -globulina. Amarillo metanilo poco menor en su movilidad que la Albúmina y similar al Naranja Oro.

RESUMEN

Bajo el título de "Electroforesis de proteínas en papel de filtro", se describe un equipo en detalle. Las soluciones usadas y los pasos correspondientes a un ensayo electroforético según la técnica en uso en la Sección Virus del Instituto Malbrán.

SUMMARY

Under the title of "Proteins electrophoresis on filter paper", an equipment is described in details. Also, the solutions used and the corresponding steps taken for an electrophoretic test, according to the technique employed in the Virus Department of the Malbrán Institute.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DURRUM, E. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2945.
- 2) MACHEBOËUF, M., REBEYROTTE, P., BRUNEIRE, M. — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1951, 53, 1545.
- 3) BISERTE, G. — *Biochim. Biop. Acta*, 1950, 4, 416.
- 4) KUNKEL, H. G., TISELIUS, A. — *J. Gen. Physiol.*, 1951, 35, 89.
- 5) GRASSMANN, W., HANNING KNEDEL, M., *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1951, 76, 335.
- 6) TURBA, E., H. J. Eneckel, *Naturwissenschaft*, 1950, 37, 95.

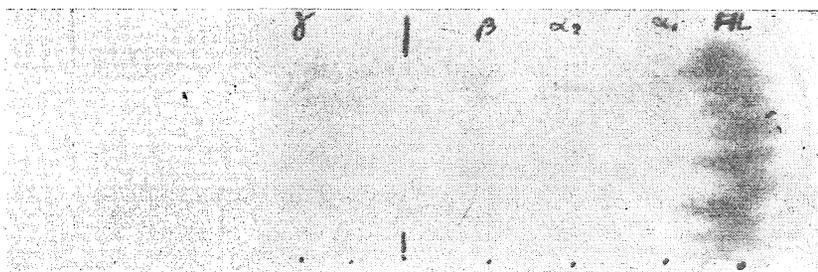


Fig. 3. — Ejemplo del resultado obtenido del ensayo de un suero normal humano en el que pueden apreciarse fácilmente 6 fracciones protéicas.

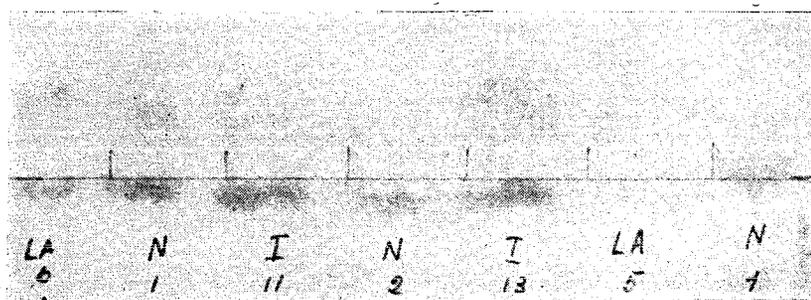


Fig. 4. — Ejemplo de concordancia en la marcha de las fracciones de los sueros, las muestras corresponde a sueros de embriones de pollo normales y en experiencia, la muestra de sangre ha sido obtenida por punción de una vena de la membrana corio-alantoides del huevo embrionario.

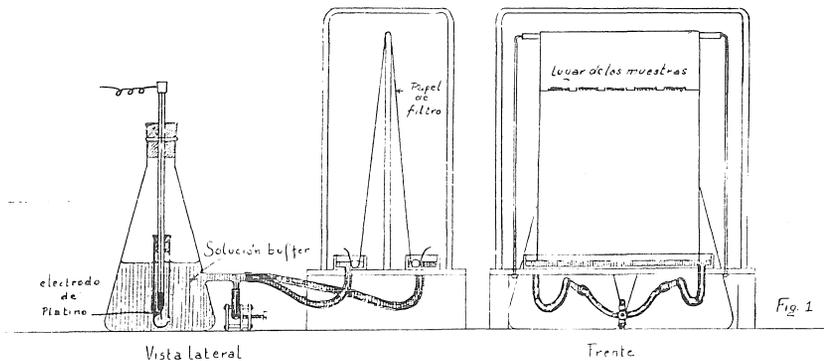


Fig. 1. — Vista lateral y frontal del equipo para electroforesis en papel constituido por una cámara húmeda consistente en un vaso de pila de 24 x 13 de base y 25 cm de altura de vidrio boca abajo y apoyado sobre una plancha de Prexiglas, sobre la cual descansan dos cubetas de plástico perforadas en su fondo para conectarlas por medio de tubos de goma con los reservorios de Buffer a los que se fijan los electrodos de platino. Estos reservorios de Buffer están intercomunicados por un tubo de goma que puede clausurarse por medio de una pinza.

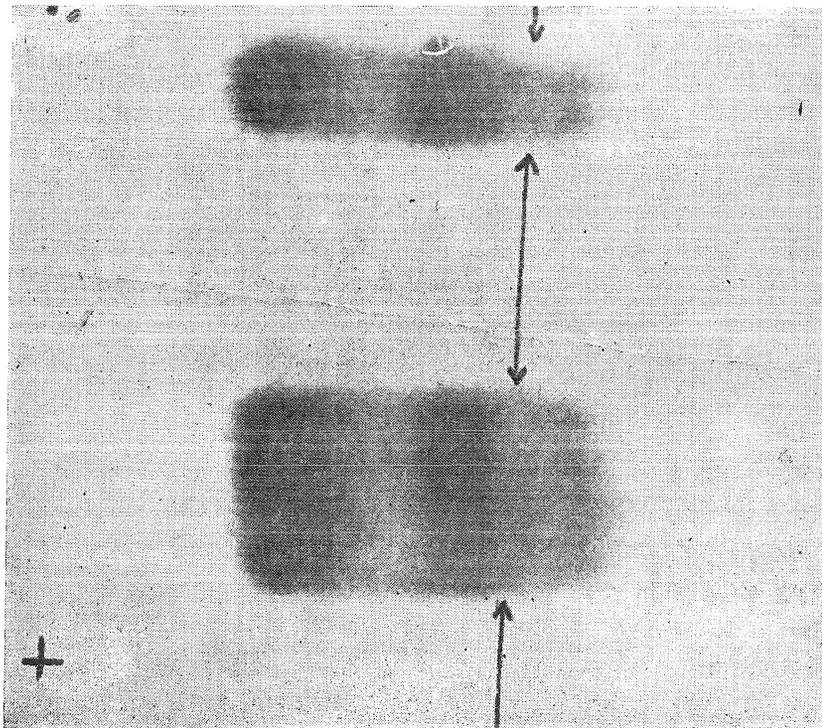


Fig. 2. — La muestra ha sido transferida al papel por medio de una micropipeta de punta muy afilada arriba, formando una gota y debajo formando un trazo continuo que unió los extremos de las flechas. (Suero de laucha).