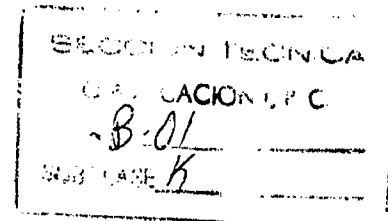




375958



P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para todo el territorio nacional, a favor del Patronato de Investigación Científica y Técnica - Juan de la Cierva" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con domicilio en calle Serrano, 150.- Madrid. (Inventores: José María Camps Mestre, D. Enrique Arias Serrano, D. Agustín Juliá Brugués y D. Carlos Martínez Grau), por un APARATO DE ELECTROFORESIS MULTIPLE CON GEL DE POLIACRILAMIDA", según la siguiente

MEMORIA DESCRIPTIVA

5 La técnica conocida como electroforesis de disco fué des-  
arrollada por ORNSTEIN, en su parte teórica, y por DAVIS, en  
la práctica, en el Hospital Monte Sinaí el año 1.962. Como  
aparatos utilizaron los modelos Canalco 6 y 12, que se dife-  
rencian fundamentalmente en la fuente de alimentación primaria  
de energía.

10 En estos aparatos, el polímero de acrilamida se dispone  
en pequeños cilindros de 5 mm. de longitud. El polímero se  
forma a partir del monómero por distintos procedimientos quí-  
micos, según el tamaño de poro que interese obtener. Una vez  
obtenido el gel, los tubos de vidrio se insertan, mediante ta-  
pones de goma, en el fondo de una cubeta cilíndrica de plásti



15 co, vidrio u otro material aislante -cubeta superior- porta  
dora de un cátodo central de grafito o platino. Los tubos -  
de vidrio, portadores de los geles, regularmente distribuí-  
dos en torno al cátodo, sobresalen del fondo de dicha cubeta,  
estando sumergidos por su parte inferior en el líquido anód-  
ico contenido en otra cubeta similar -cubeta inferior- con  
lo que queda cerrado el circuito.

20 Con estos modelos los tubos quedan agrupados formando  
un todo unitario con las cubetas. El potencial es también -  
único para todos los tubos, y en ello radica su principal -  
inconveniente. En efecto, la preparación individual de cada  
polímero comporta una serie de operaciones muy delicadas, -  
25 especialmente la eliminación de los meniscos de separación  
de fases. De hecho resulta prácticamente imposible, tanto -  
cuando se emplea un sólo polímero, como cuando se opera con  
tres fases polímeras, obtener cilindros de longitud perfec-  
tamente igual. Ello ocasiona, al variar las resistencias in-  
30 dividuales, velocidades diferentes de migración en los dis-  
tintos tubos, incluso dentro de cada serie. La comparación  
de los electroforogramas se hace difícil, especialmente pa-  
ra aquellas bandas poco diferenciadas.

35 Otro de los inconvenientes del aparato de ORNSTEIN y -  
DAVIS es el que se presenta al proceder al fijado y teñido  
de las proteínas fraccionadas. Al desaparecer el campo eléc-  
trico que orientaba las partículas, se produce un desplaza-  
miento por difusión de las mismas, que hace que las bandas  
no queden perfectamente delimitadas.

40 El aparato descrito por WOODWORTH, muy parecido al uti-  
lizado por RAYMOND, tiende a solventar estas dificultades -  
sustituyendo los tubos de polímero por placas de acrilamida,  
con lo que al operar en un frente único, la velocidad de mi-  
gración es idéntica en todos los ensayos. Las placas tienen  
45 un considerable grosor, ocasionando un aumento innecesario  
de material. La exigencia de una eficaz refrigeración para -  
contrarrestar el calentamiento que se produce durante la --  
electroforesis, debido a la gran resistencia que oponen di--  
chas placas, es uno de los inconvenientes que se señalan.

50 La comparación de los electroforogramas de placas distin-  
tas, e incluso de una misma placa cuando no están próximos,  
resulta difícil. La manipulación de los geles es poco prácti-  
ca debido a sus dimensiones. Su conservación y almacenamien-  
to complicada, por lo que resulta obligada su reproducción -  
55 fotográfica; no obstante, las fotografías no pueden conside-

375958



rarse como solución ideal por cuanto las bandas debilmente insinuadas se hacen dificilmente visibles.

60 El aparato que se describe tiende a solventar las dificultades que se presentan con los aparatos existentes, - fundándose en el hecho experimentalmente comprobado, de que la bondad del sistema, depende en primer lugar, de una determinada velocidad de migración que podríamos considerar - límite. A tal efecto los distintos geles polímeros se disponen de tal forma que cada uno de ellos resulta independien-  
65 te de los demás, con lo que si bien existe una fuente de alimentación primaria de energía, los distintos geles polímeros quedan sujetos a diferentes potenciales. Con esta disposi--ción, a los pocos minutos de haberse iniciado el proceso - electroforético, observando las bandas de desplazamiento --  
70 del azul de bromofenol, que constituye el frente de progresión, es posible regular el potencial particular de cada gel, y de esta forma alcanzar la velocidad límite ideal para todos los tubos.

75 La posibilidad de independizar el proceso electroforético por elementos ofrece también la ventaja de facilitar - la última operación de fijado y revelado. Efectivamente, al finalizar el desarrollo electroforético debe procederse a - la separación del polímero para fijar las proteínas, teñir-  
80 las y eliminar el exceso de colorante. Esta separación exige un tiempo bastante considerable si se tiene en cuenta - que estas operaciones se realizan en series, como mínimo de 12 elementos. Con el sistema propuesto es posible disminuir el potencial, en la fase final y anular prácticamente la velocidad de migración manteniendo las partículas en un régi-  
85 men estático.

Finalizado el desarrollo electroforético, indicado por la banda de bromofenol, se detiene en cada tubo, y en un momento dado, la progresión del frente mediante los interrup-  
90 tores del circuito. En estas condiciones los electroforogra<sup>mas</sup> resultan perfectamente comparables al alcanzarse en todos ellos idéntica longitud de recorrido.

Las ventajas que presenta sobre los aparatos de WOODWORTH y RAYMOND vienen dadas por:

95 1° La cantidad de reactivos utilizados con el que se describe es muy inferior al que se necesita con los aparatos descritos por los mencionados autores.

375958



2° Los potenciales empleados son también inferiores - por lo que se hace innecesario un circuito de refrigeración del electrolito.

100 Los electroforogramas que obtenemos son perfectamente comparables, muy manejables por su escaso tamaño y se pueden guardar en pequeñas cajas sin necesidad de acudir a las reproducciones forográficas.

DESCRIPCION DEL APARATO.

105 Con el fin de aclarar y puntualizar cuanto queda expuesto con el presente escrito se acompañan una láminas de dibujos en los que, sin carácter limitativo de ninguna clase, se ha representado un ejemplo de realización práctica del aparato de electroforesis que se preconiza.

110 La fig. I, corresponde al esquema del circuito eléctrico del aparato de desarrollo electroforético.

La fig. II, corresponde a una vista en perspectiva de la realización del antedicho aparato.

La fig. III, es un corte transversal del citado aparato.

115 La fig. IV, es el puente móvil de platino.

La fig. V, representa una vista en perspectiva de un tubo de electroforesis.

Refiriéndonos a estos dibujos y concretamente a la fig. I, se expone un esquema eléctrico del aparato de desarrollo electroforético, en donde 1 representa la cubeta anódica; 2 el electrodo de platino; 3, 3', 3"....3 son los tubos de electroforesis; 4, 4', 4"....4 son los puentes móviles de platino; 5, 5', 5"....5 son unos pocillos que no tienen mercurio; 6, 6', 6"....6 son los potenciómetros 25 K 5 W; 7, 7', 7"....7 son interruptores de dos posiciones; 8 es la fuente de alimentación y 9, 9', 9"....9 son los cilindros de polímero gel de acrilamida.

120 En la fig. II, se expone una realización del citado aparato en donde 1 representa la cubeta anódica de sección rectangular, realizada en material plástico transparente o vidrio. El electrodo 2 es un hilo de platino de 0,5 mm. de diámetro y unos 300 mm. de longitud que ocupa el fondo de la cubeta a lo largo de su eje mayor. Dicho electrodo viene conectado al polo positivo de la fuente de alimentación. En el interior de la cubeta, y sumergidos en el electrolito se disponen los tubos de electroforesis 3, 3', 3"....3 que contienen

130

135



los cilindros de polímero gel 9, 9', 9"....9 la muestra a ana-  
lizar y una pequeña cantidad de electrolito. En el dibujo se  
pueden observar los puentes móviles de platino 4 que ponen en  
140 contacto el electrolito contenido en los tubos de electrofore-  
sis con el polo negativo del circuito a través de las cubetas  
de mercurio 5, 5', 5"....5 contenido en unos pequeños pocillos  
situados sobre la pared posterior del aparato 10. Asimismo se  
observan los mandos de los potenciómetros 6, 6', 6"....6 y -  
145 los interruptores del circuito 7, 7', 7"....7. Una tablilla -  
deslizable 11 situada en la parte superior de la cubeta y con-  
venientemente taladrada para permitir el paso de los tubos de  
electroforesis, asegura la posición vertical y alineación de  
estos tubos en el interior de dicha cubeta. En el interior se  
150 dispone otra tablilla fija convenientemente taladrada, que -  
coadyuga a la acción de la anterior 12.

En la fig. III, se ha representado un corte transversal  
del citado aparato en el que se observa la cubeta anódica 1;  
el electrodo de platino 2; el tubo de electroforesis 3; puen-  
155 te móvil de platino 4; pequeña cubeta que contiene mercurio  
5; potenciómetro 6; interruptor del circuito 7; pared poste-  
rior del aparato 10; tablilla deslizable 11 y la tablilla -  
guía 12.

En la fig. IV, se representan las piezas del puente mo-  
160 vil de platino. Consiste en dos platinas yustapuestas 13 y -  
14 de material aislante, que sujetan entre sí un hilo de pla-  
tino de 0,5 mm. de diámetro y 45 mm. de longitud y cuyos dos  
extremos 16 y 16' quedan doblados en ángulo recto. Con el -  
fin de que dicho hilo de platino quede convenientemente suje-  
165 to entre las dos platinas, la inferior 14, posee una regata  
17 en sentido axial en donde se aloja la parte central del -  
hilo. Las dos ramas terminales de platino, 16 y 16' salen al  
exterior a través de dos orificios 18 y 18' situados en los  
extremos de la citada regata 17. En los extremos de la plati-  
170 na inferior se disponen dos pequeños cilindros 19 y 19' cuya  
misión consiste en proteger los dos extremos del hilo de pla-  
tino. Dichos cilindros sirven además de elementos guía al in-  
troducirse respectivamente o acoplarse en los tubos de electro-  
foresis y en la cubeta que contiene el mercurio. Para facili-  
175 tar el transporte del puente de platino, la platina superior  
lleva un saliente axial o asidero 20. Las dos platinas quedan  
unidas entre sí mediante dos tornillos de sujeción 21 y 21'.



375953

La fig. V, representa una perspectiva de los tubos de electroforesis de vidrio o material plástico transparente. Es un tubo cuyas dimensiones, no limitativas, pueden ser 6 mm. de diámetro interior y 60 mm. de longitud. Presenta en su parte superior un ensanchamiento 22 formando un pequeño depósito cuyo objeto es aumentar el volumen de electrolito catódico. A una distancia apropiada de la parte inferior del tubo se disponen unas señales circulares 23 como indicadores de altura ocupada por la zona o zonas de polímero gel de acrilamida 9.

#### REIVINDICACIONES

Se reivindica como de la nueva y propia invención la propiedad y explotación exclusiva de:

1º) "Aparato de electroforesis múltiple con gel de poliacrilamida", caracterizado porque los elementos que actúan como medios de dispersión integrados por geles polímeros en forma de pequeños cilindros o pequeños paralelepípedos de sección poligonal, constituyen circuitos independientes, conectados en derivación a un circuito de alimentación principal.

2º) "Aparato de electroforesis múltiple con gel de poliacrilamida", según reivindicación 1 y caracterizado además porque cada uno de los circuitos individuales en que se integra cada elemento consta del cilindro de polímero gel, un potenciómetro, regulador del potencial de cada elemento y un interruptor de circuito.

3º) "Aparato de electroforesis múltiple con gel de poliacrilamida", según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado además porque los elementos se conectan en su parte catódica al circuito principal mediante unos puentes móviles de platino u otros conductores y a través de contactos de mercurio. Esta disposición permite la desconexión y manipulación de cada elemento como unidad independiente.

4º) "Aparato de electroforesis múltiple con gel de -



375958

215 poliacrilamida", tal y como se describe en el cuerpo de esta memoria, que consta de siete páginas escritas por una sola cara y dos dibujos.

Madrid, 28 de enero de 1.970.

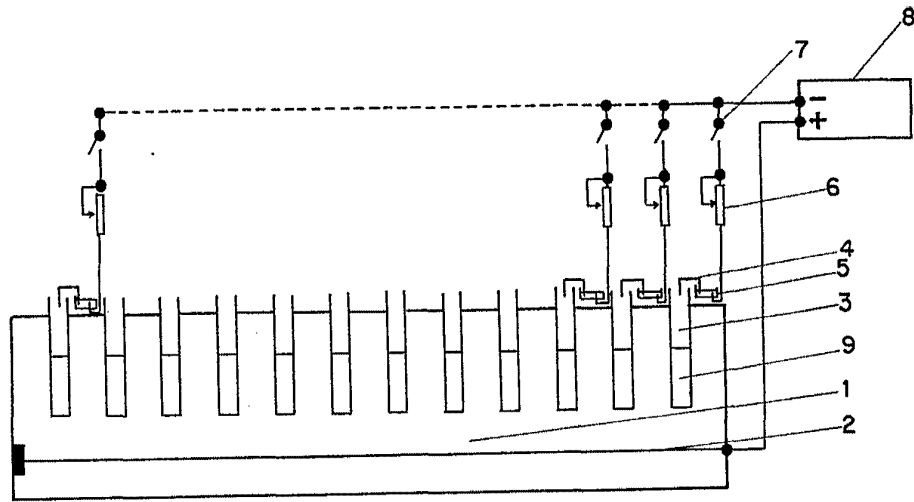


FIG. I

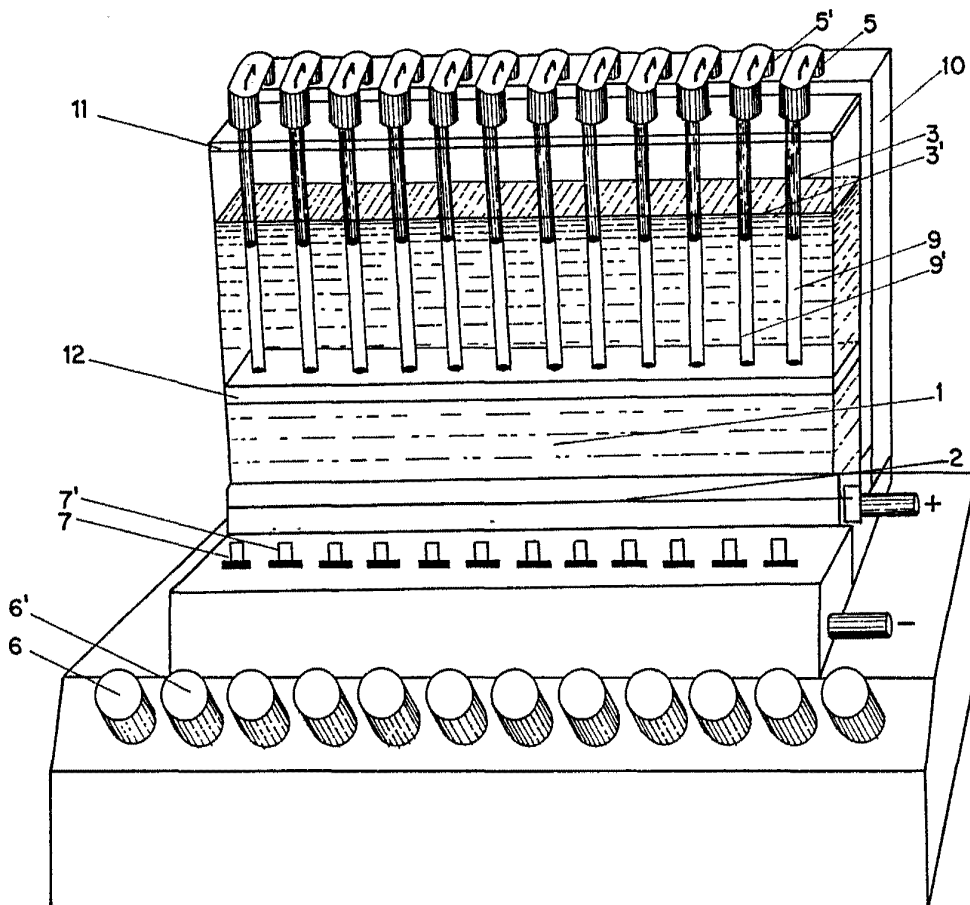


FIG. II

Escala variable

Madrid, 28 de mayo de 1940.

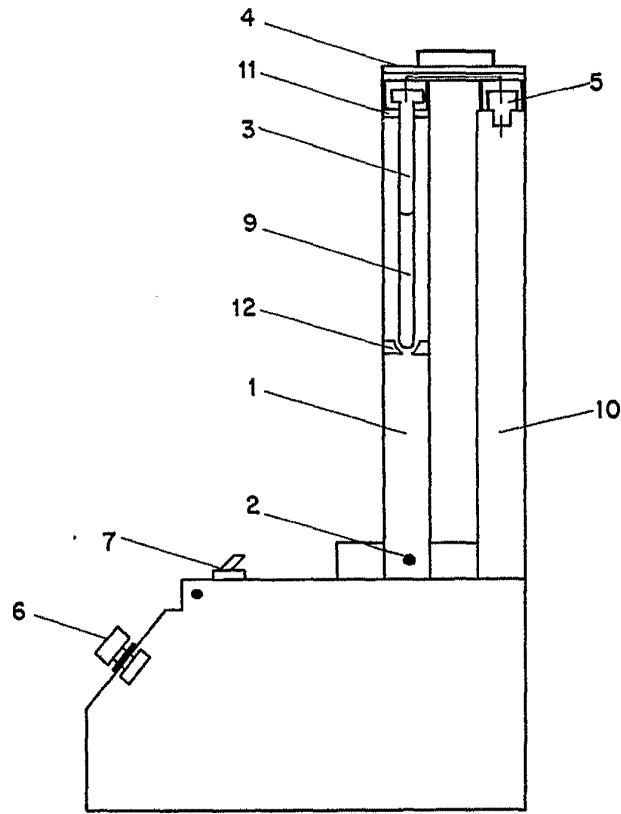


FIG. III

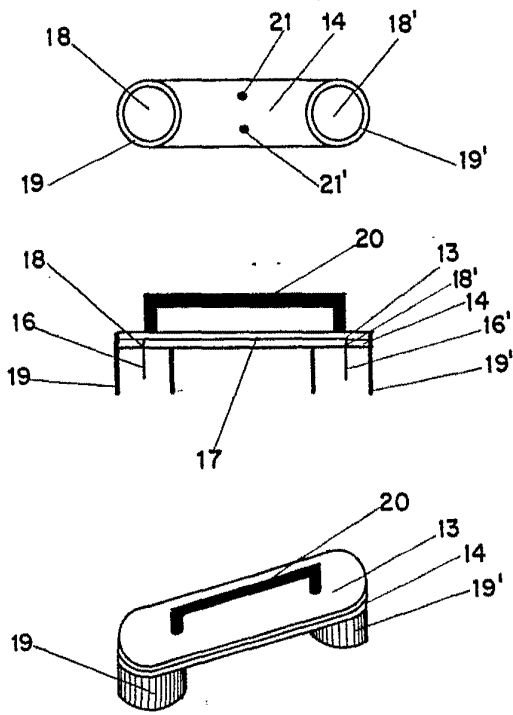


FIG. IV

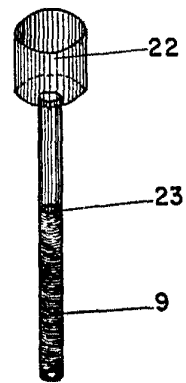


FIG. V

Escala variable

Madrid, 28 de enero de 1970.