



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 116 938**

② Número de solicitud: 9602543

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/68

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.12.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.98**

Fecha de concesión: **29.01.99**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.99**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.99

⑰ Titular/es:
**Universidad de Santiago de Compostela
y en su representación el Rector
Centro de Transferencia de Tecnología
Avda. das Ciencias, s/n
15706 Santiago de Compostela, Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Casabiell Pintos, Xesús;
Pérez Rodríguez, Francisco;
Pérez Camiña, Jesús y
Casanueva Freijo, Felipe**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis.**

㉒ Resumen:

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras (0.002 mL) biológicas preparadas en tampón de electroforesis. Las muestras son inmovilizadas sobre papel de cromatografía, y teñidas con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 tras la eliminación del tampón de electroforesis por fijación/lavado con metanol ácido. Las muestras son seguidamente cuantificadas en base a su densidad óptica utilizando un escáner digital y un software de integración. Este método permite realizar mediciones de proteína en micromuestras acuosas, así como en muestras disueltas directamente en tampón de electroforesis, el cual contiene sustancias que interfieren fuertemente con otros métodos de cuantificación de proteínas. El procedimiento rápido, sensible y económico es de aplicación en la investigación biomédica y la práctica clínica.

ES 2 116 938 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis.

5 El procedimiento para la determinación de la concentración de soluciones proteicas está basado en la adsorción de micromuestras a un soporte sólido, seguida de tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250, Color Index 42660) y cuantificación densitométrica. Esta técnica es sensible, de fácil realización y mínimo coste, presentando la particularidad de ser utilizable cuando las muestras han sido disueltas con dodecilsulfato de sodio (SDS: sodium dodecyl sulfate) o tampón de electroforesis (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 5 % beta-mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0.002 % azul de bromofenol) (*Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227. 680-685. 1970*).

15 La determinación de proteínas en los laboratorios de investigación clínica y biomédica se realiza en general mediante espectrofotometría UV-V, bien analizando la absorbancia a 280 nm (A_{280}) de la solución proteica, o bien mediante pruebas colorimétricas, de las cuales las más empleadas son las del biuret, el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford y el ensayo del BCA.

20 La medición de la A_{280} (*Warburg O, Christina W: Isolierung und Kristallisation des Gaerungsferments Enolase. Biochem. Z 310: 384-421. 1941*) no constituye una medición directa de la cantidad de proteína presente, sino que refleja la abundancia de residuos aromáticos en la cadena polipeptídica, por lo que el coeficiente de extinción molar de cada proteína varía entre amplios márgenes. Su uso se restringe fundamentalmente a la monitorización de fracciones en técnicas cromatográfica, y su rango de sensibilidad abarca de 0.2 a 2 mg/mL. Su principal ventaja es la de ser un método no destructivo.

25 La reacción del biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros métodos desarrollados para el análisis colorimétrico de las mismas (*Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol. Chem. 177. 751-766. 1949*) y se usa todavía hoy extensamente en aplicaciones que requieren rapidez pero no una elevada sensibilidad. Se basa en el complejamiento del cobre en una disolución alcalina con el enlace peptídico de las proteínas, y también con los residuos de tirosina. Su principal inconveniente, es el gran número de sustancias que interfieren con la misma, entre ellas numerosos tampones utilizados frecuentemente en biología (Tris, Hepes, Pipes, Mes, etc.).

35 El ensayo de Lowry (*Lowry OH, Rosebrough NJ, Far LA, Randail RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol. Chem. 193:265-275. 1951*) ha sido la técnica más empleada para la determinación de proteínas hasta hace relativamente poco tiempo. Es una ampliación del procedimiento del biuret en la que se forma un complejo de cobre-proteína en solución alcalina, que a su vez reduce un reactivo Fosfomolibdico-fosfotúngstico para dar un color azul intenso. A pesar de ser una técnica sensible (0.005 a 0.1 mg/mL) y muy específica, presenta varias desventajas que la han desplazado: Los reactivos utilizados son inestables; la cinética de la reacción es lenta, y numerosas sustancias interfieren con la reacción.

40 El ensayo del BCA (bicinchoninic acid assay) (*Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85. 1985*) es una variante del método de Lowry desarrollada recientemente, más sencilla de realizar y menos sujeta a interferencias. En ella se utiliza el BCA como un sistema indicador para monitorizar el ion Cu^{1+} producido durante la reacción del biuret. Presenta un rango de sensibilidad de 0.01 a 1.2 mg/mL, pero la cinética de la reacción es lenta, requiriéndose incubaciones relativamente largas a temperaturas de hasta 60 °C para lograr la máxima sensibilidad.

45 El ensayo de Bradford (*Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254. 1975*) es un método rápido para la determinación de la concentración de proteínas. Su rango de sensibilidad va de 0.1 a 2 mg/mL (en su formulación estándar) o de 0.01 a 0.2 mg/mL (formulación micrométodo). La base de la técnica es la formación de un complejo insoluble azulado entre el colorante y la proteína que es cuantificado posteriormente en base a su absorbancia a 595 nm.

60 La posibilidad de determinar la concentración de proteína en micromuestras con las técnicas espectrofotométricas mencionadas, está condicionada al volumen mínimo necesario para realizar la lectura de la absorbancia, que es de 1.5 mL para las cubetas estándar, 0.5 mL para las cubetas semimicro, y 0.1 mL

sample buffer. *Anal. Biochem.* 223: 329-331. 1994) se basan en la aplicación directa de las muestras a una membrana de nitrocelulosa, eliminándose los pasos de precipitación con ácido tricloroacético y filtración. Las muestras adsorbidas a la membrana son posteriormente teñidas con AmidoBlack 10B, que es a continuación eluido y cuantificado espectrofotométricamente. El procedimiento resulta menos laborioso, pero se requiere todavía la elución del colorante para la cuantificación de la proteína. Este problema es obviado en un procedimiento similar (*Sportsman JR, Elder JH. A microanalytical protein assay using laser densitometry. Anal. Biochem.* 139: 298-300. 1983), en el que la cuantificación del colorante se realiza mediante un densitómetro láser. Esta última técnica resulta sencilla de realizar y permite la cuantificación rápida y fiable de proteínas en el rango 0.1-1.0 mg/mL, usando muestras de 0.0025 mL (0.25 a 2.5 μ g de proteína). Su principal problema lo constituye el soporte utilizado, la nitrocelulosa, quebradiza y poco manejable, y cuya capacidad de ligazón de proteínas se ve reducida por la presencia de SDS, por lo que la concentración utilizada se ha limitado al 1 % p/v.

El fundamento de la invención que aquí se describe es un procedimiento utilizado frecuentemente para la valoración semicuantitativa de proteínas (*Coluccio LM, Bretscher A: Calcium-regulated cooperative binding of the microvillar 110K-calmodulin complex to a F-actin. J Cell. Biol* 105: 325-333. 1987) en fracciones cromatográficas. En este procedimiento las muestras (0.003 mL) son aplicadas directamente sobre una tira de papel de cromatografía, tras lo cual son teñidas simplemente con el colorante estándar utilizado para la tinción de los geles de electroforesis (Azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-acético), y destañadas con la solución de destinción estándar. Este procedimiento ha sido modificado para permitir la utilización directa de muestras preparadas en tampón de electroforesis mediante la adición de un paso de fijación-lavado previo a la tinción, y se ha hecho cuantitativo mediante evaluación de la densidad óptica de las manchas proteicas en imágenes digitalizadas por medio de un escáner de sobremesa. Estos aparatos constituyen en la actualidad un accesorio ampliamente difundido en todos los laboratorios y centros de investigación debido a su precio reducido (menos de un 10 % del coste de un videodensitómetro o un densitómetro láser) y buenas prestaciones. Su utilización, acoplada a un software adecuado de análisis de imagen, permite mediciones precisas y fiables de densidad óptica en muestras digitalizadas (*Shea TB: An inexpensive densitometric analysis system using a MacintoshTM computer and a desktop scanner. BioTechniques*, 16. 1126-1128. 1994); (*Velleman SG: Quantifying immunoblots with a digital scanner. BioTechniques*. 18:1056-1058.1995).

La presente invención resuelve el problema técnico de la determinación de la cantidad de proteína en muestras de pequeño tamaño (0.002 mL), por lo que proponemos su uso como ensayo de proteínas de aplicación general para micromuestras. Muy en especial, resuelve el problema de las muestras solubilizadas previamente con SDS o tampón de electroforesis. Esta técnica es muy sencilla, rápida, reproducible, y requiere un equipamiento de bajo coste, disponible en la gran mayoría de los laboratorios clínicos y de investigación. Permite la determinación de la concentración de proteína en el rango 0.1-1 mg/mL, un rango similar al abarcado por el ensayo de Bradford, el más utilizado en la actualidad, aunque el pequeño volumen requerido permite la detección de cantidades de proteína tan pequeñas como 0.2-2 μ g. Por último, la técnica no resulta afectada por la presencia de SDS hasta un 2 % p/V, o tampón de electroforesis.

El procedimiento se basa en el descrito originalmente por Coluccio y Bretscher en 1987 (op. cit.), que es únicamente semicuantitativo, modificado para eliminar la interferencia por SDS, beta-mercaptoetanol y azul de bromofenol (componentes del tampón que se utiliza habitualmente para disolver las muestras que van a ser analizadas por electroforesis sobre gel de poli(acrilamida), y adaptado para la determinación cuantitativa.

Modo de realización:

Material:

- 1.- Papel de filtro de calidad, grueso (BioRad, o Whatman 3MM Chr). Manipularlo siempre con guantes para no contaminarlo con proteínas cutáneas.
- 2.- Solución patrón de proteína: Albúmina Sérica Bovina (BSA), solución a 1 mg/mL en agua destilada (si se van a medir muestras acuosas) o en tampón de electroforesis (para muestras disueltas en el mismo). Disponible comercialmente de varias fuentes, o preparada en el laboratorio a partir de una disolución de albúmina bovina a 10 mg/mL (absorbancia a 280 nm de 6.6).
- 3.- Solución de tinción: Azul Brillante de Coomassie R-250 (SERVA blue R) 1 mg/mL, disuelto en Metanol:Acético:Agua (10:4:10), y filtrado a través de una membrana de 0.44 mm.

ES 2 116 938 B1

- 4.- Tampón de electroforesis de Laemmli (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 5 % beta-mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0.002 % azul de bromofenol):
- 5.- Solución de destinción: 12.5 % Metanol-10 % Acético.
- 5 6.- Secador: Lámpara de infrarrojos o secador de pelo manual.
- 7.- Escáner: Cualquier escáner de oficina capaz de trabajar a 8 bits (256 grises) y con una resolución de al menos 150 puntos por pulgada (En nuestro caso, AppleTM Color One).
- 10 8.- Ordenador personal: Cualquier ordenador capaz de controlar el escáner (MacintoshTM o PC compatible. En nuestro caso un MacintoshTM LC 475).
- 9.- Software de Integración: Cualquier paquete de software capaz de realizar lecturas de densidad óptica integrada a partir de la imagen generada por el escáner. En nuestro caso hemos utilizado
15 NIH Image, un programa de dominio público para análisis digital 2, de imagen en ordenadores Apple MacintoshTM, elaborado por Wayne Rasband (U.S. National Institutes of Health) y disponible sin coste a través de Internet (por ftp al servidor <zipy.nimh.nih.gov>) o en diskette (National Technical Information Service, Springfield, Virginia, item número PB93-504868). Los mismos resultados pueden obtenerse con otros muchos paquetes de software, entre ellos Adobe PhotoshopTM,
20 disponible para ordenadores MacintoshTM y PC-compatibles.

Método:

Preparar una curva estándar a partir del patrón de proteína. La utilizada por nosotros se prepara
25 como sigue:

Muestras acuosas

Concentración (mg/mL)	Estándar 1 mg/mL (acuoso)	Agua
0.00	0	100
0.10	10	90
35 0.25	25	75
0.50	50	50
0.75	75	25
40 1.00	100	0

Muestras preparadas en tampón de electroforesis

Concentración (mg/mL)	Estándar 1 mg/mL (en tampón)	Tampón de Electroferesis
0.00	0	100
0.10	10	90
50 0.25	25	75
0.50	50	50
0.75	75	25
55 1.00	100	0

Pipetear 0.002 mL de cada uno de los puntos de la curva sobre el papel de filtro, espaciados regularmente, cuidando de no arañar la superficie del papel con la punta de la micropipeta. Podemos ayudarnos de un retículo de 1 x 1 cm dibujado previamente sobre el papel con un lápiz blando, depositando cada muestra cuidadosamente en el centro de los cuadrados.
60

Pipetear 0.002 mL, de cada muestra problema sobre el papel, de la misma manera que los patrones. Si la concentración inicial es totalmente desconocida, pueden pipetearse varias diluciones diferentes de

cada muestra.

Secar completamente el papel con la lámpara de infrarrojos o el secador. Alternativamente, dejar secar al aire, resguardándolo del polvo.

5

Fijación/lavado: Colocar el papel de filtro, una vez seco, en una cubeta con solución de destinción. Incubar con agitación suave hasta que el azul de bromofenol que contienen las muestras desaparezca completamente. Si ninguna de las muestras a analizar contiene tampón de electroforesis, este paso puede eliminarse, procediéndose directamente desde el secado a la tinción.

10

Tinción: Retirar la solución de destinción y sustituirla por solución de tinción. Incubar 15 minutos, con agitación suave.

15

Destinción: Eliminar la solución de tinción (que puede ser reciclada varias veces) y sustituirla por solución de destinción. Incubar con agitación suave y cambiarla cada 15 minutos hasta obtener un fondo claro y uniforme.

20

Secado: Con la lámpara de infrarrojos, el secador, o en estufa. Alternativamente, dejar secar al aire en lugar resguardado del polvo.

25

Digitalización: De acuerdo con las instrucciones que acompañan al escáner, a 8 bits (256 grises) y 150 puntos por pulgada. Grabar la imagen resultante en un formato compatible con el software de integración (en general, en formato TIFF - *Tag Image File Format*-. No utilizar formatos que resulten en compresión con pérdida de datos, como JPEG).

30

Cuantificación: La metodología concreta dependerá del software utilizado. En general, definir una región de tamaño ligeramente superior al de la mancha de mayor tamaño, y utilizarla para tomar lecturas de densidad óptica de cada uno de los estándares y las muestras. Representar gráficamente la curva estándar y extrapolar la concentración de proteína de las muestras problemas. El ensayo es lineal para la BSA en el rango 0.1-1 mg/mL tanto en muestras acuosas como en muestras preparadas en tampón de electroforesis. Es decir, aproximadamente el mismo rango que abarca el ensayo estándar de Bradford. Se obtienen resultados similares para otras proteínas, como amilasa, alcohol deshidrogenasa (ADH) y citocromo C (Citocr. C). Los resultados obtenidos para varias proteínas en solución acuosa se reflejan en la Tabla II. La Tabla III recoge los resultados para las mismas proteínas disueltas en tampón de electroforesis. En ambos casos se han realizado 14 determinaciones para cada una de las proteínas (n = 14). Los resultados obtenidos para la BSA se muestran gráficamente en la Figura 1 (en solución acuosa) y en la Figura 2 (en buffer de electroforesis), como las medias y desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas (eje Y) para cada concentración de proteína (eje X).

35

40

TABLA II

Concentración vs. densidad óptica para varias proteínas en solución acuosa (media ± desviación estándar, n=14)

45

mg/mL	BSA		Amilasa.		Alcohol Deshidrog.		Citocromo C	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0.00	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03
0.05	0.05	0.01	0.04	0.02	0.02	0.02	0.19	0.03
0.10	0.15	0.02	0.09	0.02	0.03	0.02	0.30	0.04
0.25	0.33	0.03	0.25	0.03	0.15	0.05	0.56	0.09
0.50	0.54	0.07	0.48	0.05	0.33	0.06	0.86	0.12
0.75	0.74	0.03	0.71	0.06	0.50	0.11	0.99	0.14
1.00	0.95	0.04	0.83	0.05	0.55	0.11	1.14	0.18

55

60

TABLA III

*Concentración vs. densidad óptica para varias proteínas en tampón de electroforesis
(media \pm desviación estándar, n=14)*

5

10

15

20

	BSA		Amilasa.		Alcohol Deshidrog.		Citocromo C	
mglmL	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0.00	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.16	0.07
0.10	0.13	0.06	0.09	0.05	0.13	0.06	0.33	0.13
0.25	0.40	0.08	0.32	0.08	0.40	0.08	0.71	0.17
0.50	0.70	0.10	0.63	0.11	0.66	0.11	1.08	0.15
0.75	0.92	0.13	0.83	0.10	0.88	0.08	1.27	0.12
1.00	1.07	0.14	1.00	0.12	1.00	0.09	1.42	0.13

Posibilidades de aplicación industrial:

25

30

Es una técnica de utilidad general como método para microdeterminación de proteínas en muestras de pequeño volumen. Es de destacar su utilidad en casos de muestras que contengan sustancias que interfieran con los métodos estándar de determinación de proteínas (concentración elevada de sales, presencia de detergentes o colorantes), ya que éstas son eliminadas durante la fijación/lavado en metanol ácido. Resulta especialmente aplicable en laboratorios clínicos y de investigación biomédica, al permitir evaluar de un modo rápido y sencillo la concentración de proteína de las muestras previamente a su caracterización electroforética.

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis, **caracterizado** por la evaluación de la densidad óptica de las mismas tras: i) adsorción a papel cromatográfico de las muestras problema; ii) fijación/lavado en metanol ácido; iii) tinción con azul brillante de Coomassie R-250; iv) digitalización de la imagen obtenida con un escáner de sobremesa y v) análisis de la misma con un software de integración y un ordenador personal.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

**Densidad
óptica**

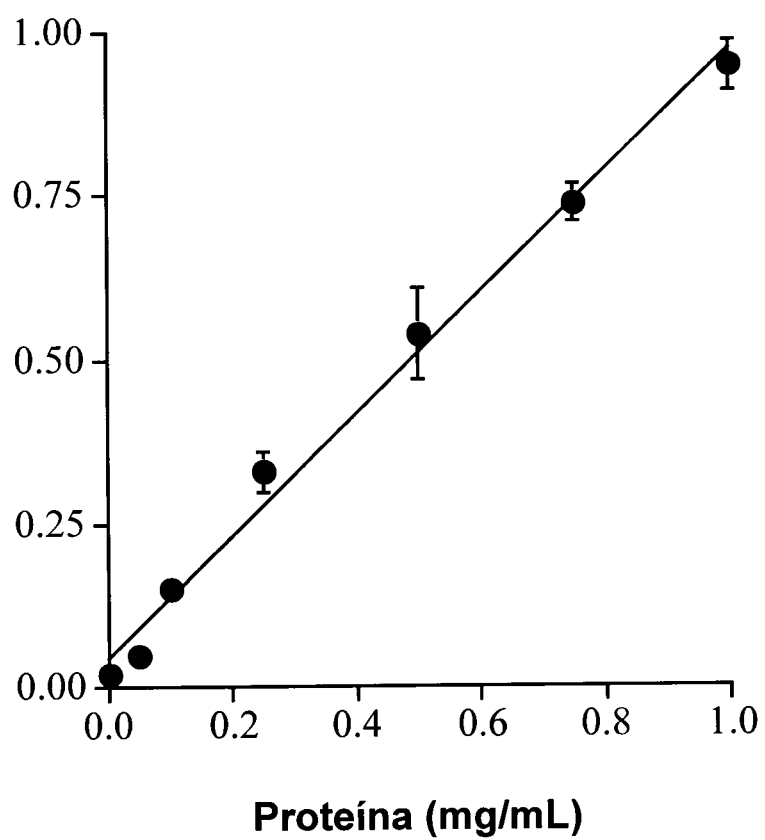


Figura 1

**Densidad
óptica**

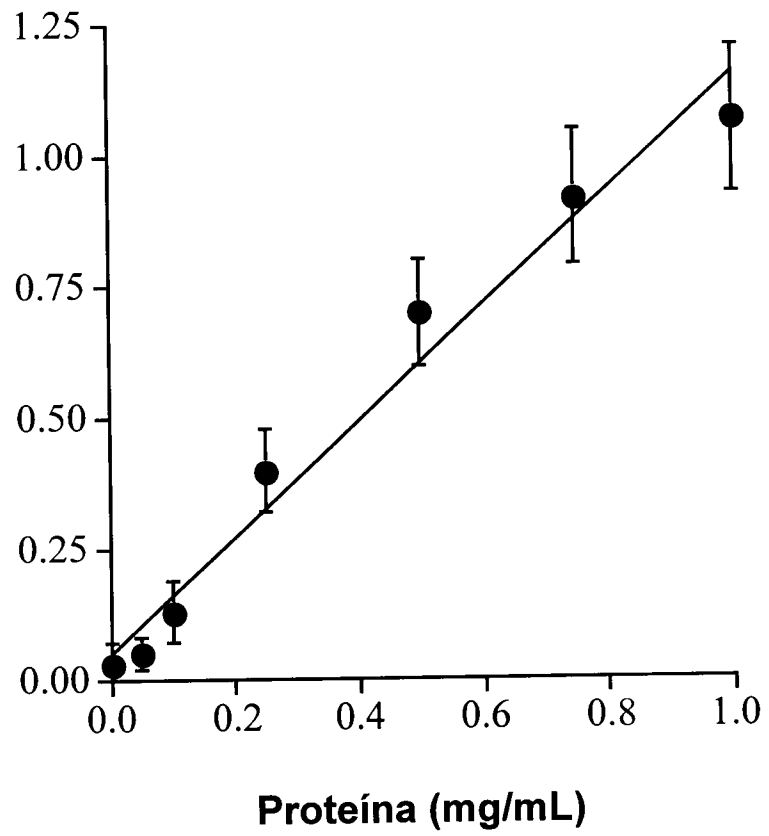


Figura 2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SHEA, T.B. "An Inexpensive Densitometric Analysis System Using a Macintosh TM Computer and a Desktop Scanner". BIOTECHNIQUES. 1994. Vol. 16, N° 6, páginas 1126-1128 * Todo el documento *	1
X	KENDRICK, N.C. et al. "Optimization of an HP Scanjet for Quantification of Protein Electrophoresis Gels". ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1994. Vol. 219, páginas 297-304 * Todo el documento *	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

11.06.98

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1