



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 337 225**

⑫ Número de solicitud: 200802554

⑮ Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **04.09.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.04.2010

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Extremadura
Campus Universitario - Avda. de Elvas, s/n
06071 Badajoz, ES**

⑱ Inventor/es: **Redondo Liberal, Pedro Cosme;
Rosado Dionisio, Juan Antonio;
Pariente Llanos, José Antonio y
Salido Ruiz, Ginés María**

⑳ Agente: **Carpintero López, Mario**

㉔ Título: **Procedimiento para la elución, separación e identificación de proteínas y aparato para realizarlo.**

㉖ Resumen:

Procedimiento para la elución, separación e identificación de proteínas y aparato para realizarlo.

La invención comprende una técnica para el aislamiento y posterior identificación de proteínas pertenecientes a un complejo que permite una mejora en la eficacia de la identificación proteica. Para su realización se requiere el empleo de un novedoso aparato de electroforesis que comprende una base soporte (1) en el interior de la cual se encuentra al menos una cubeta de refrigeración (2) que alberga hielo o cualquier elemento refrigerante y dentro de la misma al menos una subcubeta (3) que contiene agua, comprendiendo cada subcubeta (3) al menos una minicubeta (4) de transferencia en el interior de las subcubetas que comprende dos electrodos (5) conectables a la fuente de energía eléctrica, entre los cuales se disponen los sujetadores (6) del gel (9) que aseguran que el gel esté transversalmente posicionado con respecto a la dirección de transmisión de la corriente, lo que permite que las proteínas se desplacen transversalmente en el gel y abandonen el mismo.

ES 2 337 225 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la elución, separación e identificación de proteínas y aparato para realizarlo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de los procedimientos que incluyen la electroforesis para la separación de proteínas y sus complejos y aparatos para realizarla.

10 **Antecedentes de la invención**

En la fisiología de tejidos y órganos, las proteínas de las células que los constituyen establecen interacciones específicas que son críticas para el correcto funcionamiento de estos. El estudio de las interacciones proteicas en el contexto celular se llama señalización celular y su comprensión es imprescindible para elucidar la base molecular de las patologías que afectan a tejidos y órganos tanto animales como vegetales. Con este objetivo se han adaptado métodos basados en técnicas electroforéticas. La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas que poseen grupos ionizables a través de una matriz porosa o gel, introducido en un gradiente electro-voltaico; la carga neta de estas sustancias depende del pH del medio en que se encuentren. Si la molécula tiene carga positiva migrará hacia el ánodo y si tiene carga negativa, hacia el cátodo. Las moléculas suelen ser ácidos nucleicos o proteínas. Los ácidos nucleicos están cargados negativamente y migran de manera natural hacia el cátodo. Las proteínas, sin embargo, pueden tener cargas positivas o negativas y su movilidad específica en un gel de electroforesis es menos predecible. Las proteínas están compuestas de aminoácidos que poseen grupos ionizables (principalmente -COO- y -NH_3^+) y pueden encontrarse cargadas positiva o negativamente o bien permanecer eléctricamente neutras. Según sea la proporción de los diversos grupos ionizados a un determinado pH. En su punto isoelectrico (pI), la proteína tiene carga neta cero. En función de pI, las proteínas presentan una relación carga/masa (z/m) específica que determina su movilidad a través del gel: por debajo del pI las proteínas estarán cargadas positivamente y por encima del pI, negativamente. Esta técnica se aplica en los campos de la bioquímica, la biología celular y la biomedicina para la identificación de proteínas. Sin embargo, debido a que las proteínas sufren modificaciones post-translacionales y asociaciones entre ellas, la electroforesis no es suficiente para su identificación.

Los anticuerpos son complejos proteicos que se caracterizan por su capacidad de unirse con extrema afinidad a proteínas o fragmentos de ellas dependiendo de su topología molecular. Un gran avance en el campo de la identificación de proteínas ha venido dado por el método de separación inmunológica de proteínas también conocido como inmunoprecipitación. Este método permite seleccionar una proteína específica de una solución de proteínas altamente concentrada proveniente de un tejido u órgano. Por ejemplo, la inmunoprecipitación permite aislar factores celulares, tales como aquellos que modulan la expresión genética. Para ello, un órgano, tejido o cultivo celular ha de ser homogeneizado y lisado de manera que se abran los compartimentos celulares y se viertan las proteínas en una solución tampón adecuada. El volumen de esta solución tampón es crítico puesto que a ella se añadirán los anticuerpos, reactivos muy costosos y en ocasiones difíciles de obtener. Debido a la especificidad de los anticuerpos, una solución muy concentrada de proteínas varias no impide el aislamiento de la proteína en estudio. Al contrario, una concentración alta de proteínas favorece la afinidad de la unión. Por ello en ocasiones se añade albúmina o gelatina de pescado en la mezcla de reacción. El anticuerpo se añade al lisado celular donde se une específicamente a la proteína de interés y se rescata posteriormente mediante centrifugación, unido todavía a dicha proteína, con un segundo anticuerpo que está a su vez unido a partículas de agarosa. Una solución desnaturalizante (que contiene un detergente, generalmente SDS) libera las asociaciones entre proteínas lo cual permite su identificación mediante una electroforesis en gel seguida de un análisis por western blot. La técnica de western blot consiste en una transferencia de las proteínas de un gel de electroforesis, separadas en bandas según su relación z/m, a un soporte, generalmente de polivinilo, mediante una electroforesis horizontal. Tras la transferencia, el soporte, al cual se han adherido las proteínas, se incuba con una mezcla de albúmina o gelatina y anticuerpo específico. Así se pueden identificar las proteínas mediante su peso molecular (altura en el gel) y su unión específica al anticuerpo, que será detectado por un segundo anticuerpo unido a una molécula detectable (generalmente capaz de impresionar un film de radiografía). A menudo, la unión específica al anticuerpo no es suficiente para la identificación de la proteína puesto que aparecen bandas adicionales en el western blot. Esto tal vez sea debido a degradación de la proteína durante su manipulación o tal vez a que las proteínas adicionales se asocian en la fisiología normal de la proteína en estudio y por lo tanto, un anticuerpo policlonal es capaz de unirse a ellas. La identificación de tales proteínas es de gran importancia a la hora de comprender la fisiología de los tejidos. Sin embargo, un problema de esta técnica es que el lisado celular favorece asociaciones inespecíficas entre proteínas anteriormente separadas por compartimentos celulares; algunas de las proteínas que obtenemos en la centrifugación no deberían estar unidas al complejo proteína-anticuerpo. Como hemos dicho, en la fisiología normal de la célula se establecen asociaciones proteína-proteína que son de interés en el estudio de la señalización celular. En procesos patológicos dichas asociaciones son aberrantes, por ello urge encontrar un método de identificación de proteínas que garantice la especificidad de las asociaciones y pueda utilizarse para el estudio de las bases moleculares de las patologías. Algunos investigadores han intentado deshacerse de las asociaciones inespecíficas por medio de una electroforesis previa a la inmunoprecipitación. Las proteínas, organizadas en bandas según su relación z/m eluyen del gel de electroforesis de manera organizada permitiendo su selección. Sin embargo, hasta ahora no ha sido práctico realizar la separación inmunológica de proteínas mediante esta metodología puesto que el volumen de electroforesis es demasiado grande para permitir el uso de los anticuerpos (dado su alto coste y porque han de utilizarse a elevadas concentraciones de proteínas).

Los inventores de la presente invención han solucionado este antiguo problema mediante el diseño de un nuevo aparato de electroforesis que permite eluir la banda proteica de interés en un volumen pequeño, de manera que los anticuerpos pueden utilizarse efectivamente. Por lo tanto, este nuevo aparato supone una revolución en el campo del aislamiento, separación e identificación inmunológica de proteínas eliminando el problema de asociaciones proteicas inespecíficas al permitir una electroforesis previa a la inmunoprecipitación y la posterior identificación de las proteínas asociadas a los complejos de señalización celular.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención comprende, en un aspecto, un aparato de electroforesis que permite eluir proteínas contenidas en fragmentos seleccionados de un gel de electroforesis para su posterior análisis e identificación. El aparato comprende al menos dos minicubetas de transferencia. En dichas minicubetas se alojan 2 electrodos y los elementos de sujeción del gel de electroforesis que comprenden: los elementos de sujeción del gel, los clip fijadores y el elemento de sujeción integrada. Cada minicubeta, conteniendo sus correspondientes elementos de sujeción se aloja asimismo en una subcubeta de un tamaño superior al de la minicubeta de transferencia. Cada subcubeta está contenida en otra cubeta de refrigeración de mayor tamaño que a su vez se aloja en una base de soporte de la estructura.

Otro aspecto de la presente invención comprende un nuevo método para la elución y el aislamiento de proteínas contenidas en un gel de electroforesis. Este método comprende los pasos de: a) recorte del fragmento del gel que contiene las proteínas con el peso molecular de interés; b) Alojamiento del fragmento de gel recortado en el paso a) entre los soportes y ajuste de los elementos de sujeción c) Introducción del gel alojado en el paso b) en una minicubeta del aparato de electroforesis objeto de la presente invención, d) Rellenar la minicubeta del paso c) con una solución tampón adecuada; e) Eluir las proteínas del fragmento de gel mediante un gradiente electro-voltáico según el funcionamiento del aparato objeto de la presente invención y f) Recogida de la solución tampón de la minicubeta del paso c) y conservación adecuada para su posterior análisis.

Otro aspecto de la presente invención comprende un nuevo método para la separación inmunológica de proteínas o inmunoprecipitación que comprende: a) homogeneización o lisado del material biológico a estudiar; b) desnaturalización del lisado del paso a) con una solución tampón apta para la electroforesis; c) electroforesis en gel del material biológico desnaturalizado en el paso b); d) selección de una banda proteica del gel de electroforesis del paso c); e) elución, recogida y conservación de la banda seleccionada en el paso d) según el método de elución objeto de esta invención; f) mezcla del contenido proteico de la banda seleccionada en el paso d) con anticuerpos específicos; g) recuperación de los anticuerpos y análisis de proteínas asociadas a ellos.

Un último aspecto de la presente invención comprende un método para la identificación de proteínas que forman parte de complejos proteicos que comprende: a) Homogeneización o lisado del material biológico; b) desnaturalización del lisado del paso a) con una solución tampón apta para la electroforesis; c) electroforesis en gel del material biológico desnaturalizado en el paso b); d) selección de una banda proteica del gel de electroforesis del paso c); e) elución, recogida y conservación de la banda seleccionada en el paso d) según el método de elución objeto de la presente invención; f) inmunoprecipitación según el método de separación inmunológica de proteínas objeto de la presente invención; g) electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas asociadas a los anticuerpos del paso f); h) Identificación de las proteínas del gel del paso f) mediante la técnica de western blot.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere en un aspecto a un nuevo procedimiento para la elución, el aislamiento y la identificación de proteínas. Este procedimiento se apoya de manera esencial en un aparato de electroforesis que es otro aspecto de la presente invención.

El procedimiento de la invención comprende tres métodos independientes que, potencialmente, tienen distintas aplicaciones por separado. En un aspecto, el procedimiento de la invención se refiere a un método de elución de proteínas provenientes de un gel de electroforesis. En otro aspecto, el procedimiento de la invención se refiere a un nuevo método de separación inmunológica de proteínas. En un tercer aspecto, el procedimiento de la invención se refiere a un método para la identificación de proteínas de complejos proteicos.

El primer aspecto del procedimiento objeto de la invención comprende los pasos de:

a) recorte del fragmento del gel que contiene las proteínas con el peso molecular de interés: En un gel, el peso molecular de una proteína se puede calcular por comparación con estándares proteicos cargados en una línea adyacente del gel. En un gel de electroforesis, las líneas son verticales, en ellas se carga o deposita el total del lisado a estudiar. Un gel suele tener entre 8-12 líneas. Las bandas aparecen como resultado de la migración proteica en el campo electrovoltaico. Representan grupos de pesos moleculares y son horizontales. Se hacen visibles gracias a tinciones específicas (p. ej. comasie). Así podemos recortar de una línea concreta un peso molecular específico al que sabemos corresponde nuestra proteína de interés.

b) Alojamiento del fragmento de gel recortado en el paso a) entre los soportes (6, Fig. 1) y ajuste de los elementos de sujeción (7 y 8, Fig 1). Introduciremos el fragmento recortado, entre los soportes especialmente diseñados, indicados en la figura 1, para sujetar piezas pequeñas de gel.

ES 2 337 225 A1

c) Introducción del gel alojado en el paso b) en una minicubeta del aparato de electroforesis objeto de la presente invención. El aparato tiene al menos 2 minicubetas para poder eluir varias bandas simultáneamente.

d) Rellenar la minicubeta del paso c) con una solución tampón adecuada; El gel recortado, introducido en los soportes especiales será sumergido en unos pocos mililitros de solución tampón contenida en una minicubeta especialmente diseñada en el aparato objeto de la invención.

e) Eluir las proteínas del fragmento de gel mediante un gradiente electrovolumétrico según el funcionamiento del aparato objeto de la presente invención. Al conectar el aparato de la presente invención a la corriente eléctrica se producirá un gradiente electrovolumétrico. Las proteínas que se hallan embebidas en dicho gradiente, se movilizarán en función de su relación z/m hacia el ánodo hasta que salgan de la matriz porosa del gel y se viertan a la solución tampón. La fuerza iónica de la solución tampón tiene una importancia fundamental en la electroforesis, puesto que cuando es baja, permite velocidades de migración de los solutos más rápidas y con menor desprendimiento de calor. En el campo de la bioquímica, la biología celular o la biomedicina, las soluciones tampón que se utilizan para la electroforesis se ajustan al pH celular de manera que las proteínas se encuentren en su pl fisiológico.

f) Recogida de la solución tampón de la minicubeta del paso c) y conservación adecuada para su posterior análisis. Tras la elución, si las proteínas no van a ser analizadas inmediatamente, deben congelarse a temperaturas de entre -20 a -80°C . Las proteínas eluidas de esta banda podrán utilizarse en el campo de la bioquímica, la biología molecular o la biomedicina en múltiples procedimientos y ensayos, incluyendo el análisis del contenido proteico de muestras de pacientes o la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas, etc.

El segundo aspecto del procedimiento objeto de la presente invención comprende un nuevo método para la separación inmunológica de proteínas o inmunoprecipitación que comprende:

a) homogeneización o lisado del material biológico a estudiar. Las proteínas se encuentran en el interior de la célula separadas en compartimentos especializados según sus funciones. Para poder estudiarlas hay que romper estos compartimentos mediante fuerzas mecánicas. Normalmente ayudados de morteros, batidoras u homogeneizadores dependiendo de la consistencia del órgano o tejido a estudiar. En ocasiones, cuando en vez de un tejido se parte de un cultivo celular, basta para romper dichos compartimentos utilizar una solución tampón que contenga un detergente. Este detergente desestabiliza las membranas celulares abriendo los compartimentos en un proceso que se llama lisis celular.

b) desnaturalización del lisado del paso a) con una solución tampón apta para la electroforesis. La lisis celular suele realizarse con un detergente no iónico como el NP-40 o el tritón. Sin embargo, para la electroforesis es necesario utilizar un detergente iónico como el SDS para desnaturalizar (desplegar) las proteínas y facilitar su migración en el gel.

c) electroforesis en gel del material biológico desnaturalizado en el paso b). Mediante el establecimiento de un gradiente electrovolumétrico.

d) selección de una banda proteica del gel de electroforesis del paso c). Una vez realizada la electroforesis, seleccionamos una banda correspondiente al peso molecular de la proteína a estudiar y recortamos el área correspondiente para alojarla en el aparato objeto de la presente invención.

e) elución, recogida y conservación de la banda seleccionada en el paso d) según el método de elución objeto de esta invención (ver aspecto anterior de la presente invención).

f) mezcla del contenido proteico de la banda seleccionada en el paso d) con anticuerpos específicos. En la solución se incluirá albúmina de suero bovino, gelatina de pescado, caseína de la leche o cualquier otra proteína genérica capaz de reducir interacciones inespecíficas. A este paso se refieren los expertos en el campo de la técnica como "incubación con anticuerpo primario". Puede durar de 1 a 16 horas en agitación suave dependiendo de las condiciones de temperatura y astringencia de la mezcla.

g) recuperación de los anticuerpos y análisis de proteínas asociadas a ellos. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se añade el anticuerpo secundario o una molécula equivalente que cumple la función de detectar la región constante del anticuerpo primario y de unirse a ella con gran afinidad. Esta molécula secundaria puede ir unida a elementos que faciliten su separación por centrifugación; por ejemplo microesferas de agarosa. El anticuerpo secundario irá fijado a estas microesferas de manera que tras una incubación en las condiciones apropiadas, al someter la mezcla a centrifugación suave, las bolas de agarosa arrastran al anticuerpo secundario unido al anticuerpo primario, unido a la proteína de interés y a todas aquellas con las que se asocia en sus procesos fisiológicos. Tras descartar el sobrenadante, se lavarán las microesferas de agarosa y se resuspenderán en una solución desnaturalizante para liberar las asociaciones entre proteínas. Si estas no van a ser utilizadas inmediatamente, deben conservarse en una solución apropiada entre -20 y -80°C . Las proteínas obtenidas con este método se pueden utilizar en el campo de la bioquímica, biología

celular o biomedicina para diversos fines, como el estudio mediante espectroscopia de masas, ensayos de actividad enzimática y cálculo de parámetros bioquímicos. Ensayos de unión a otras proteínas *in vitro* etc.

Un último aspecto del procedimiento objeto de la presente invención comprende un método para la identificación de proteínas que forman parte de complejos proteicos. Las proteínas obtenidas con el método de inmunoprecipitación anteriormente detallado, pueden ser identificadas mediante el siguiente método que comprende:

- a) Homogeneización o lisado del material biológico;
- b) desnaturalización del lisado del paso a) con una solución tampón apta para la electroforesis;
- c) electroforesis en gel del material biológico desnaturalizado en el paso b);
- d) selección de una banda proteica del gel de electroforesis del paso c);
- e) elución, recogida y conservación de la banda seleccionada en el paso d) según el método de elución objeto de la presente invención;
- f) inmunoprecipitación según el método de separación inmunológica de proteínas objeto de la presente invención. (Todos los pasos anteriores, incluyendo este, han sido explicados en el aspecto anterior de la presente invención).
- g) electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas asociadas a los anticuerpos del paso f). Tras descongelar las proteínas obtenidas en el método anterior, se cargarán en un gel de electroforesis para su separación en función de su relación z/m .
- h) Identificación de las proteínas del gel del paso f) mediante la técnica de western blot. Una vez distribuidas las proteínas por medio de electroforesis, se introduce el gel completo, junto con una membrana de polivinilo, en una cubeta de transferencia y se establece un campo electrovoltaico de manera que las proteínas migran hacia la membrana de polivinilo donde quedan depositadas. La membrana se somete después a sucesivas incubaciones con anticuerpo primario y secundario que en este caso estará unido a una molécula que permite su detección visual, normalmente una molécula capaz de impresionar un film radiográfico. Así sabiendo el peso molecular y utilizando un anticuerpo primario específico podemos identificar las proteínas que se han unido a nuestra proteína de interés (contra la cual fue dirigido el anticuerpo primario).

Ejemplos

El objeto de la presente invención ha sido empleado por los inventores, de modo satisfactorio, en dos casos prácticos, en los que se debía solucionar dos aspectos totalmente diferentes dentro del campo biológico de la señalización celular y que representan tres ejemplos básicos a los que cualquier científico que trabaje en el ámbito de la biología molecular se enfrenta de modo rutinario.

Ejemplo 1

Estudio de la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas: Fosforilación de la p60^{src}

El hecho de que la proteína p60^{src}, posea un peso molecular similar a muchas otras proteínas, el cual ronda los 60 kDa, junto con la similitud estructural que presenta con otras proteínas de la misma familia, hace que sea fácilmente enmascarada por esas otras proteínas que poseyendo la misma o similar masa, y por tanto idéntica movilidad electroforética, aparecen en el mismo lugar a la hora de ser detectada mediante técnicas inmunohistoquímicas comúnmente empleadas a tal fin como son el Western Blotting. Estas coincidencias comentadas anteriormente representan un obstáculo para llevar a cabo un estudio adecuado de la proteína, p60^{src}, y las modificaciones postraduccionales que sufre por lo que es necesario emplear técnicas que garanticen el total aislamiento de esta proteína de aquellas otras que pueden interferir durante su estudio.

En la figura 2 se representan los resultados del análisis de la fosforilación en residuos de tirosina de la p60^{src}, obtenidos empleando una técnica clásica como es la inmunoprecipitación y la técnica propuesta como objeto de patente en el presente informe, que los inventores han denominado ProCISA ó "*protein complex immunological separation assay*". Para este ensayo empleamos plaquetas humanas previamente aisladas de la sangre de donantes voluntarios sanos (de acuerdo con la Declaración de Helsinki para el empleo y estudio de muestras procedentes de humanos y la Ley 14/2007 sobre investigación biomédica); estas fueron aisladas del resto de elementos formes de la sangre, mediante centrifugación diferencial. A continuación se resuspendieron en un medio HEPES-buffered saline (HBS): 145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM D-glucose, 1 mM MgSO₄, y está además suplementado con 0.1% BSA y 40 microgramos/mL de apirasa.

Una vez las plaquetas han sido aisladas se mantienen por un tiempo en reposo para permitir su estabilización en un baño a temperatura de 37°C. A continuación las plaquetas humanas son estimuladas mediante el empleo del agonista fisiológico trombina a una concentración de 0.5 U/mL. Esta estimulación genera una activación de los mecanismos de señalización intracelular entre los que se encuentra la fosforilación en residuos de tirosina de la proteína p60^{src}. La p60^{src} se activa por fosforilación aunque dicha activación no resulta significativamente evidente hasta pasados 3 minutos.

En la figura 2 (a) se observa que la inmunoprecipitación convencional (IPc) de lisados de plaquetas estimuladas, arrastra una cantidad significativa de proteínas inespecíficas en comparación con la inmunoprecipitación ProCisa (IPproc). Como se aprecia, con la IPproc, el punto máximo de activación (3') alcanza $89.02 \pm 5.3\%$ de señal de fosforilación con respecto al valor en las plaquetas no estimuladas, mientras que con la IPc no parece haber una diferencia significativa en el grado de fosforilación. Dichas diferencias se podrían explicar por la presencia de otras proteínas que estuviesen produciendo tal interferencia y hubieran sido coimmunoprecipitadas con p60^{src} durante el proceso de separación de la misma.

La figura 2 (b) muestra las mismas membranas incubadas con un anticuerpo que detecta la proteína p60^{src} total, independientemente de su estado de activación. Esta imagen muestra que existe una concentración similar de proteínas en todas las líneas del gel durante la realización de la técnica de western blotting y con ello nos cercioramos de que el incremento en la fosforilación es real y no un artefacto originado por un error en la cantidad de proteína introducida en el gel de poliacrilamida.

De este experimento se obtienen básicamente dos conclusiones. La primera y más evidente es la capacidad superior de la técnica ProCISA, para discriminar entre las proteínas cuya estructura y peso molecular son similares a la p60^{src} en comparación con otras técnicas actualmente empleadas para tal fin. Este hecho resulta evidente si comparamos la diferencia en la anchura e intensidad de las bandas obtenidas con la técnica clásica de inmunoprecipitación (IPc) y el ProCISA (IPproc) de la figura 2. La segunda conclusión es que el tratamiento de las proteínas mediante la técnica ProCISA, no repercute sobre las modificaciones postraduccionales que las proteínas sufren, especialmente la fosforilación, lo cual la hace ideal para realizar este tipo de estudios, entre otras aplicaciones.

Ejemplo 2

Método para la elución y el aislamiento de proteínas contenidas en un gel de electroforesis

En la figura 3, se representan los valores de la cantidad de proteína electroeluida del gel de poliacrilamida durante la aplicación de corriente a distintos tiempos del sistema de la minicubeta de transferencia "MmTC". Esta gráfica representa las medias de los valores obtenidos a partir de 6 experimentos diferentes, permitiéndonos definir el tiempo de duración requerido para que todas las proteínas abandonen el gel y pasen al tampón de electroelución para su posterior aislamiento e identificación. La técnica empleada para la determinación de proteínas de cada una de las muestras examinadas es similar a la técnica de Bradford, consistente en la reacción colorimétrica detectada mediante un lector de placas, que discrimina diferencias en la intensidad de color originadas mediante la reacción del reactivo de tinción con las proteínas de la muestra depositada en cada pocillo de la placa, reflejando pues una mayor intensidad aquellas muestras con mayor contenido proteico. Los valores representados son expresados en % sobre el valor "basal" como refleja el eje de ordenadas. En el eje de abscisas se representan las siguientes condiciones o tratamientos, siendo C el valor de colorimetría obtenido mediante la medición del reactivo proporcionado por la casa comercial por si solo. Este valor C se considera 100% o "basal" y a continuación se mezclan según las intrusiones de la casa comercial, el reactivo colorimétrico con el buffer de electroelución antes de introducir el gel a electroeluir, con lo obtenemos el valor blanco o White (WT). Por último, con las nomenclaturas T_{30'}, T_{60'} y T_{90'}, se denominan las muestras obtenidas de mezclar el reactivo colorimétrico con el buffer de elución tras haber estado aplicando la corriente en la MmTC durante 30, 60 y 90 minutos respectivamente, por lo que los incrementos en los valores de % en el eje de ordenadas de cada una de las muestras representa una mayor cantidad de proteínas electroeluidas del gel mediante el sistema de MmTC.

De la gráfica representada en la figura 3 se concluye que la mayor parte de las proteínas han abandonado el gel durante los primeros 60 minutos de la aplicación de la corriente eléctrica fijada en este caso en 0.8 mA/cm² y empleando un fragmento de gel de 3.75 cm² de área aproximadamente. La aplicación de la electroelución durante tiempos más largos como por ejemplo 90 minutos, tal y como observamos en la gráfica no se traduce en un incremento significativo del contenido proteico observado a los 60 minutos, lo que confirma que dicho tiempo es suficiente cuando empleamos dichas condiciones electroforéticas para extraer casi todas las proteínas contenidas en el gel de acrilamida.

Ejemplo 3

Aislamiento de proteínas pertenecientes a un complejo proteico para su posterior análisis: Aislamiento del canal de calcio de la membrana plasmática TRPC1 en plaquetas humanas

Como modelo de estudio elegimos el complejo formado por los canales de calcio receptores del inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) y el canal de calcio denominado "transient receptor potential channel tipo 1" (TRPC1). Dicho complejo se origina durante el proceso de entrada de calcio al interior celular denominado, entrada capacitativa de calcio (ECC),

estando dicho complejo constituido entre otras proteínas, por el canal de calcio IP_3R , situado en el sistema tubular denso de plaquetas humanas, y el canal de calcio capacitativo TRPC1, que se localiza en la membrana plasmática de dichas células. Se ha observado que la activación de las plaquetas humanas mediante el empleo de un agonista fisiológico, como la trombina a 0.5 U/mL de concentración, resulta en la liberación de calcio de los depósitos intracelulares de calcio. El vaciamiento de los depósitos de calcio estimula la apertura de los canales de calcio de la membrana, como el TRPC1, que permiten la entrada de calcio desde el exterior. Ambos fenómenos, liberación y entrada de calcio, ocasionan un aumento de la concentración de calcio citosólica, que va a permitir la activación de distintas funciones celulares.

Para llevar a cabo el estudio de las modificaciones postraduccionales de una proteína es necesario aislarla de todas aquellas otras con las que la proteína forme complejo. ProCISA resulta eficaz para tal fin ya que como se observa en la figura 4 (comparando las mismas líneas en las figuras 4 A y 4, B) mientras que en todos los tratamientos empleados, (bien dejar las plaquetas en reposo (control) o estimuladas con 0.5 U/mL en donde se origina el complejo IP_3R -TRPC1), se obtiene la banda que representa al IP_3R , tanto en experimentos realizados con la técnica clásica de inmunoprecipitación (IPc) como en aquellos en los que se emplea ProCISA (IPp). Tan solo en aquellas muestras obtenidas mediante la técnica de ProCISA, fuimos capaces de aislar completamente la proteína IP_3R del TRPC1, como se manifiesta por la ausencia de bandas en la imagen 3, B, en las líneas denominadas IPp.

Estos resultados evidencian que ProCISA, a diferencia de la inmunoprecipitación o alguna otra técnica inmunológica similar, es capaz de aislar por completo una proteína perteneciente a un complejo para su posterior estudio.

Por último se puede concluir también, una vez evaluado estos ejemplos que esta técnica es eficaz independientemente del peso molecular de la proteína a estudiar. Dicha técnica puede tener diversas aplicaciones que sin duda irán surgiendo de su empleo rutinario en diferentes laboratorios que realicen investigaciones en diferentes campos científicos.

Breve descripción de las figuras

Para completar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del aparato de electroforesis de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un juego de dibujos e imágenes en donde con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

La figura 1 muestra un esquema explosionado del aparato de electroforesis de la invención, así como un detalle de la minicubeta de transferencia y los elementos que la componen.

La figura 2 Análisis comparativo de la fosforilación en residuos de tirosina de la $p60^{src}$ en plaquetas mediante ProCISA (IPproc) e inmunoprecipitación convencional (IPc) con el anticuerpo anti- $p60^{src}$. Panel a): Western Blot de anti-Phospho-c- $p60^{src}$ (tyr 146). La línea IPc muestra el resultado de la inmunoprecipitación convencional, te línea IPproc los resultados de la inmunoprecipitación con el método ProCISA. Control: plaquetas no estimuladas, resto: plaquetas estimuladas con trombina 0.5 U/ml.

La figura 3 Estudio del porcentaje de proteínas electroeluidas frente al tiempo mediante el sistema de minicubeta de transferencia (MnTC). Esta figura muestra la capacidad de la minicubeta de transferencia de electroeluir las proteínas de un gel de poliacrilamida. La cantidad de proteínas totales electroeluidas en función del tiempo de elución expresadas en % sobre el valor control. Se observa que a los 60 segundos se han eluido todas las proteínas del gel.

La figura 4. Estudio comparativo de la eficacia de aislamiento del canal de calcio receptor del IP_3R mediante el empleo las técnicas de inmunoprecipitación y ProCISA.

La figura 5 Esquema comparativo de las etapas de las técnicas de inmunoprecipitación proteica y ProCISA.

Descripción detallada de un modo de realización de la invención

En la figura 1 se observa el aparato de electroforesis de la invención que permite eluir proteínas contenidas en fragmentos seleccionados de un gel de electroforesis para su posterior análisis e identificación.

El aparato, esquematizado en la Fig. 1, comprende una base soporte (1) que puede ser fabricada en cerámica, fibra de carbono, plástico o cualquier otro elemento apropiado que aisle eléctricamente al aparato impidiendo la posible derivación de corriente a través de dicha base. Esta base alberga el circuito de cables que conectarán los electrodos de cada minicubeta de transferencia "MnTC" con la fuente de energía eléctrica, estando dichos cables dimensionados adecuadamente para el consumo eléctrico del aparato y con los medios de protección necesarios a ese circuito eléctrico.

Dentro de esta base se introduce la cubeta de refrigeración (2) que puede estar fabricada en plástico o en cualquier otro material adecuado para soportar bajas temperaturas ya que su refrigeración es mediante hielo o cualquier otro elemento refrigerante y además siendo adecuada para soportar el ataque de detergentes ya que después de cada uso debe ser lavada dicha cubeta. Las paredes de esta cubeta deben ser lisas que faciliten el lavado y la no proliferación de hongos o algas en el interior de la misma. Esta cubeta (2) contiene hielo o cualquier otro elemento refrigerante,

albergando en su interior las subcubetas (3) que son de características similares a la cubeta (2) pero de un menor tamaño y que contienen agua en su interior que se encuentra refrigerada mediante la transmisión térmica provocada por el elemento refrigerante contenido en la cubeta (2) que se transmite a través de las paredes de las subcubetas (3). El agua contenida en estas subcubetas preferentemente será bidestilada evitando con ello cualquier contaminación por salpicadura de cada minicubeta de transferencia "MmTC". La función de estas subcubetas (3) es proporcionar una temperatura homogénea y continua de aproximadamente 4°C a las minicubetas de transferencia "MmTC", impidiendo el calentamiento de las mismas y la ruptura de proteínas durante la transferencia, debido al calentamiento de los electrodos por estar en contacto con el líquido de transferencia.

En el interior de estas subcubetas (3) se introducen múltiples minicubetas (4) de transferencia o "MmTC" siendo estas minicubetas la parte principal del sistema, estando fabricadas en vidrio que resiste variaciones de temperatura que se dan en la misma entre los 4°C que es la temperatura del agua contenida en las subcubetas (3) y los aproximadamente 40°C que se produce en el interior de las minicubetas. Estas minicubetas contienen el gel que va a sufrir la descarga de proteínas al líquido o tampón de transferencia.

En el detalle de cada una de dichas minicubetas (4) que se observa en la figura 1 se representa los elementos que se disponen en las mismas, así se observan los electrodos (5) que se conectan a la fuente de energía eléctrica y que se encuentran fabricados en una aleación de platino y niobio que proporciona una mayor durabilidad y alta conductividad a los mismos. Estos electrodos deben ocupar la mayor parte posible de las minicubetas (4), para así asegurar que ocupen los electrodos la mayor parte del gel a transferir, asegurando con ello la creación de un campo eléctrico uniforme y que las cargas atraviesen completamente el gel consiguiendo un arrastre y por tanto una descarga homogénea de todas las proteínas embebidas en el gel.

Entre los electrodos (5) se sujetan los sujetadores (6) del gel (9), sujetadores que son fabricados mediante un material inmunológicamente inactivo como puede ser plástico, que permite sujetar al gel (9) y posicionarlo de manera correcta en el interior de las minicubetas (4). Estos sujetadores (6) se completan con los fijadores (7,8), que posicionan todo el conjunto de los electrodos (5) y el gel (9) en el interior de las minicubetas (4) de transferencia. Estos fijadores aseguran que el gel esté transversalmente posicionado con respecto a la dirección de transmisión de la corriente, lo que permite que las proteínas se desplacen transversalmente en el gel y abandonen el mismo.

Es de destacar que la corriente eléctrica que atraviesa los electrodos (5) de cada minicubeta (4) es como máximo 1 mA/cm², lo cual supone que el equipo trabaje con un voltaje de corriente aproximado de entre 3 y 10 V, con lo que no comporta ningún peligro ya que se asemeja a una pila alcalina de uso doméstico, siendo su uso extremadamente sencillo en comparación con los aparatos de aplicación equivalente en el estado de la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Aparato de electroforesis que comprende una base soporte en el interior de la cual se encuentra al menos una cubeta de refrigeración que alberga un elemento refrigerante como el hielo o similar y dentro de la misma al menos una subcubeta que contiene agua **caracterizado** porque comprende al menos una minicubeta (4) de transferencia en el interior de las subcubetas que comprende dos electrodos (5) conectables a la fuente de energía eléctrica, entre los cuales se disponen los sujetadores (6) del gel (9) que aseguran que el gel esté transversalmente posicionado con respecto a la dirección de transmisión de la corriente.

2. Aparato de electroforesis según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la sujeción de los sujetadores se completa mediante fijadores (7, 8) que posicionan el conjunto de electrodos (5), sujetadores (6) y gel (9).

3. Aparato de electroforesis según la reivindicación 1 **caracterizado** porque cada subcubeta alberga al menos dos minicubetas (4) de transferencia.

4. Aparato de electroforesis según las reivindicaciones 1 y 3 **caracterizado** porque las minicubetas soportan variaciones de temperatura que oscilan entre la temperatura del agua refrigerada de las subcubetas y la temperatura producida en su interior por el paso de corriente entre los electrodos de la misma.

5. Aparato de electroforesis según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el material de que está construidas las minicubetas es vidrio.

6. Aparato de electroforesis según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los electrodos se construyen en una aleación de platino y niobio que proporcionan durabilidad y alta conductividad a los mismos.

7. Aparato de electroforesis según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la intensidad de la corriente que atraviesa los electrodos (5) de cada minicubeta (4) es como máximo de 1 mA/cm², lo cual supone que el equipo trabaje con un voltaje de corriente aproximado de entre 3 y 10 V.

8. Método para la elución y el aislamiento de proteínas contenidas en un gel de electroforesis que comprende:

- a) Recortar el fragmento de gel que contiene la banda proteica de interés.
- b) Alojarse el fragmento de gel recortado en el paso a) entre los soportes (6) y ajustar los elementos de sujeción.
- c) Introducir el gel alojado en el paso b) en una minicubeta del aparato de la reivindicación 1.
- d) Rellenar la minicubeta del paso c) con una solución tampón adecuada.
- e) Eluir las proteínas del fragmento de gel mediante el establecimiento de un gradiente voltaico según el funcionamiento del aparato de la reivindicación 1.
- f) Recoger la solución tampón de la minicubeta del paso c) y conservarla adecuadamente para su análisis posterior.

9. Método para la separación inmunológica de proteínas (inmunoprecipitación) que comprende:

- a) Homogeneización o lisado del material biológico,
- b) Desnaturalización del lisado del paso a) con una solución tampón apta para la electroforesis,
- c) Electroforesis en gel del material biológico desnaturalizado en el paso b),
- d) Selección de una banda proteica del gel de electroforesis del paso c),
- e) Elución, recogida y conservación de la banda seleccionada en el paso d) según el método de la reivindicación 8,
- f) mezcla del contenido proteico de la banda seleccionada en el paso d) con anticuerpos específicos,
- g) Recuperación de los anticuerpos y análisis de proteínas asociadas a ellos.

ES 2 337 225 A1

10. Método para la identificación de proteínas de complejos proteicos que comprende:

- a) Homogeneización o lisado del material biológico,
- b) Desnaturalización del lisado del paso a) con una solución tampón apta para la electroforesis,
- c) Electroforesis en gel del material biológico desnaturalizado en el paso b),
- d) Selección de una banda proteica del gel de electroforesis del paso c),
- e) Elución, recogida y conservación de la banda seleccionada en el paso d) según el método de la reivindicación 8,
- f) Inmunoprecipitación según el método de la reivindicación 9,
- g) Electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas asociadas a los anticuerpos del paso f),
- h) Identificación de las proteínas del gel del paso h) mediante la técnica de western blot.

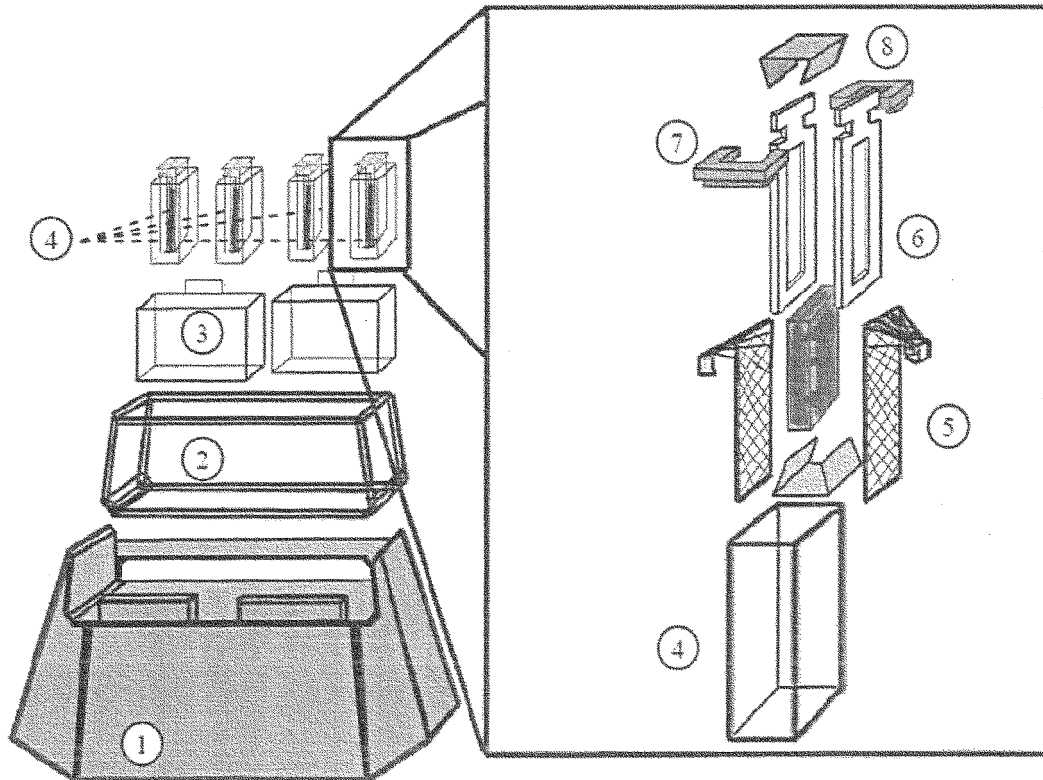


Figura 1

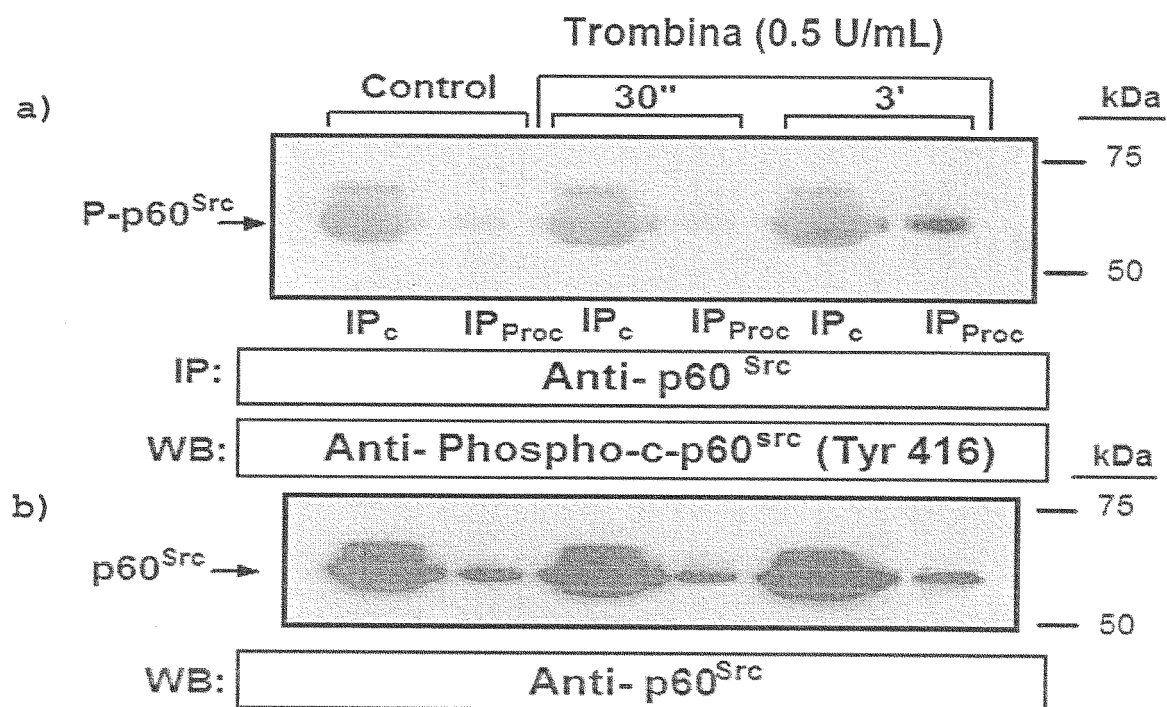


Figura 2

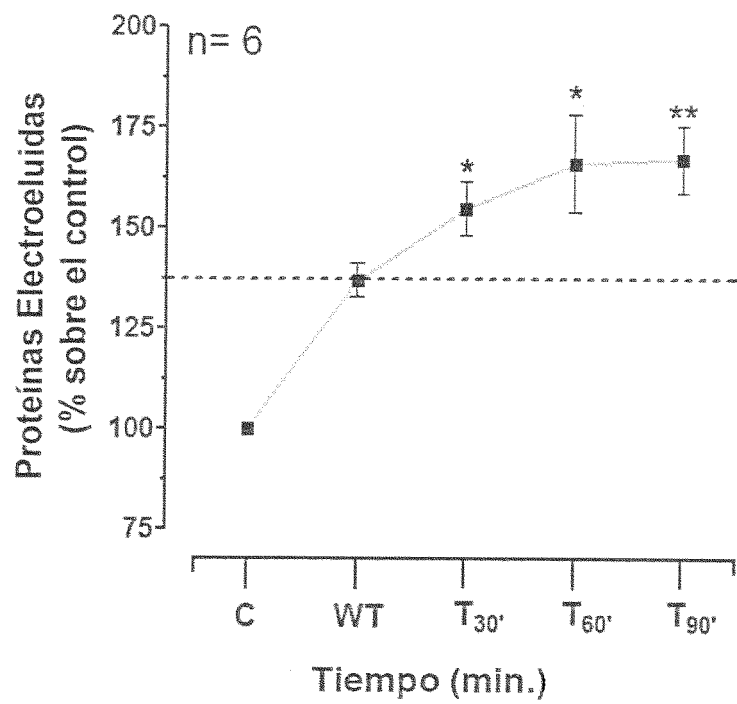


Figura 3

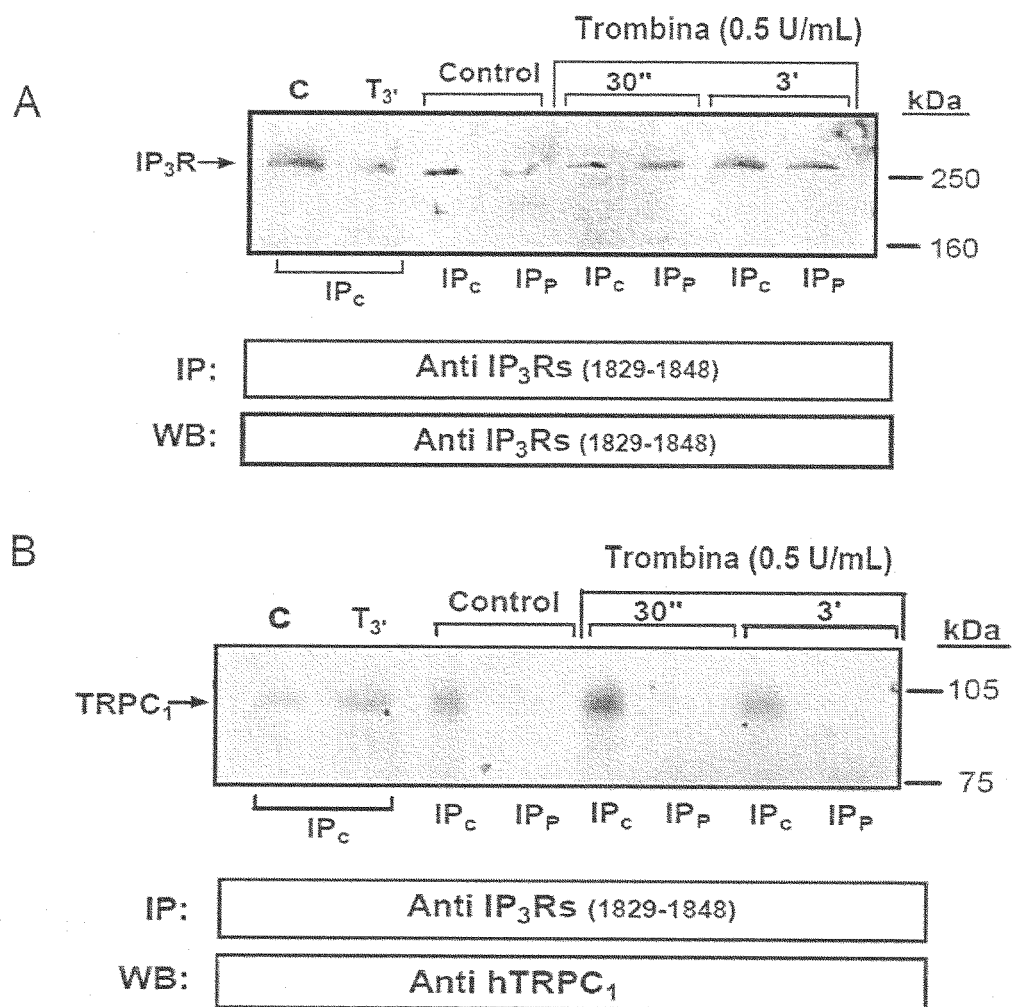


Figura 4

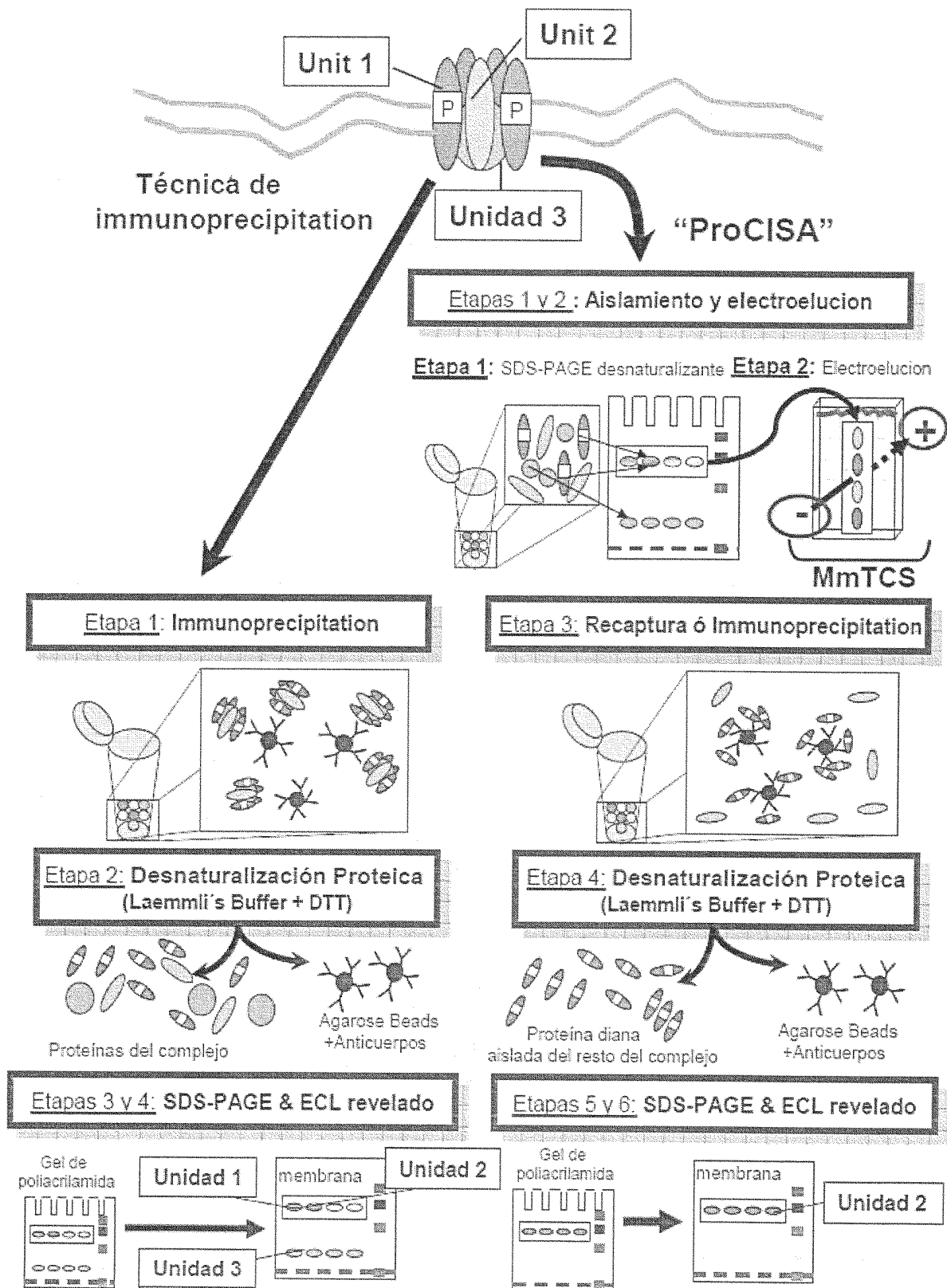


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 337 225

⑫ Nº de solicitud: 200802554

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **04.09.2008**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 27/447** (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	REDONDO, P.C. et al. hTRPC1-associated alfa-actinin, and not hTRPC1 itself, is tyrosine phosphorylated during human platelet activation. Thromb. Hemost. 2007; vol. 5; pp. 2476-2483.	1-10
A	O'FARREL, P.H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. The Journal of Biological Chemistry, mayo 1975, vol. 250, nº 10, pp. 4007-4021.	

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 nº:

Fecha de realización del informe

07.04.2010

Examinador

J. López Nieto

Página

1/1