

NO. 19

FECHA: Octubre 1986

DATE: October 1986

Bea
CIAT

DOCUMENTO DE TRABAJO

COLECCION HISTORICA

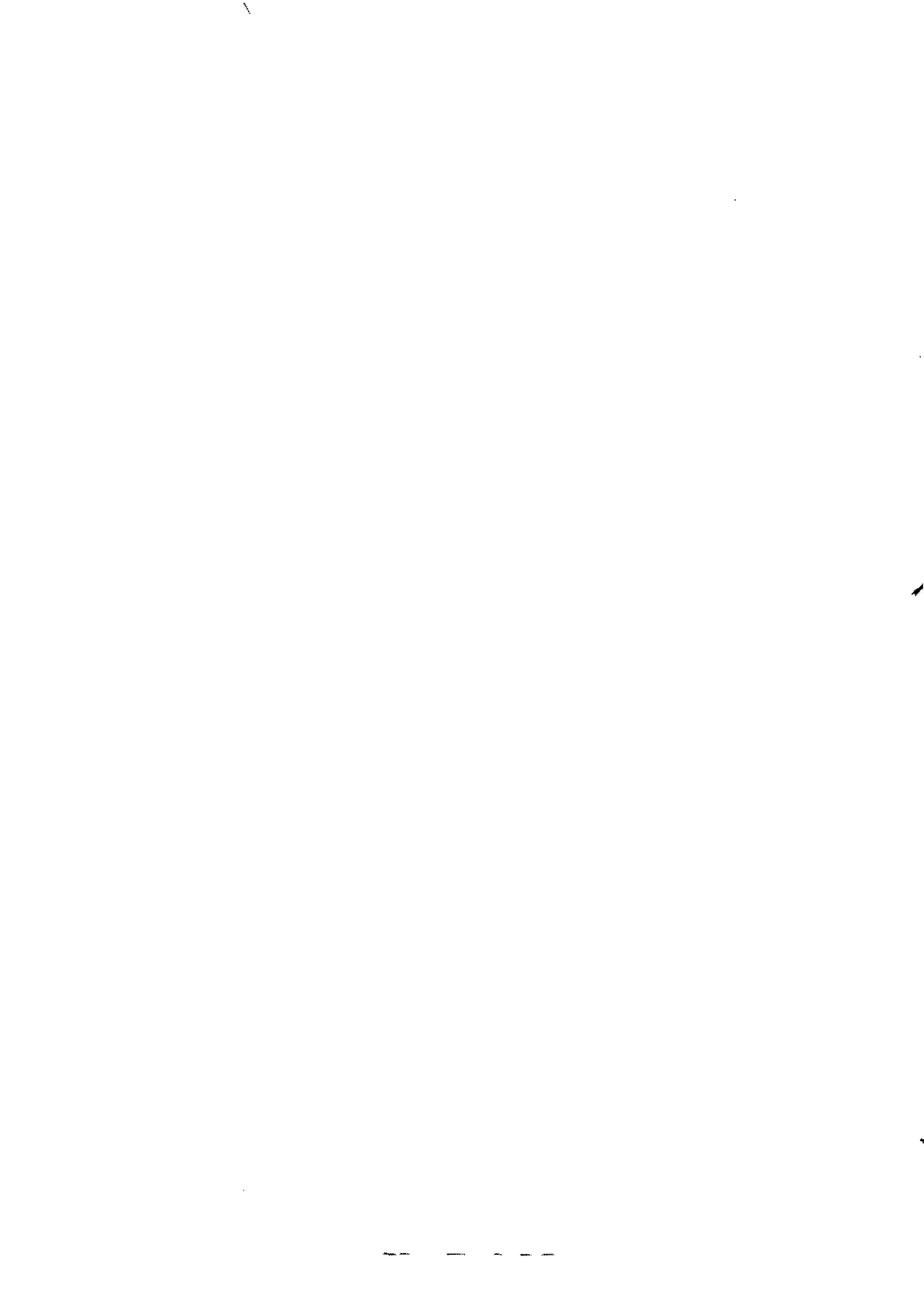
WORKING DOCUMENT

**MANUAL PRACTICO PARA
LA DETECCION ELECTROFORETICA
DE ISOENZIMAS Y OTRAS
PROTEINAS**

CIAT
QP
519
.9
E434
H8

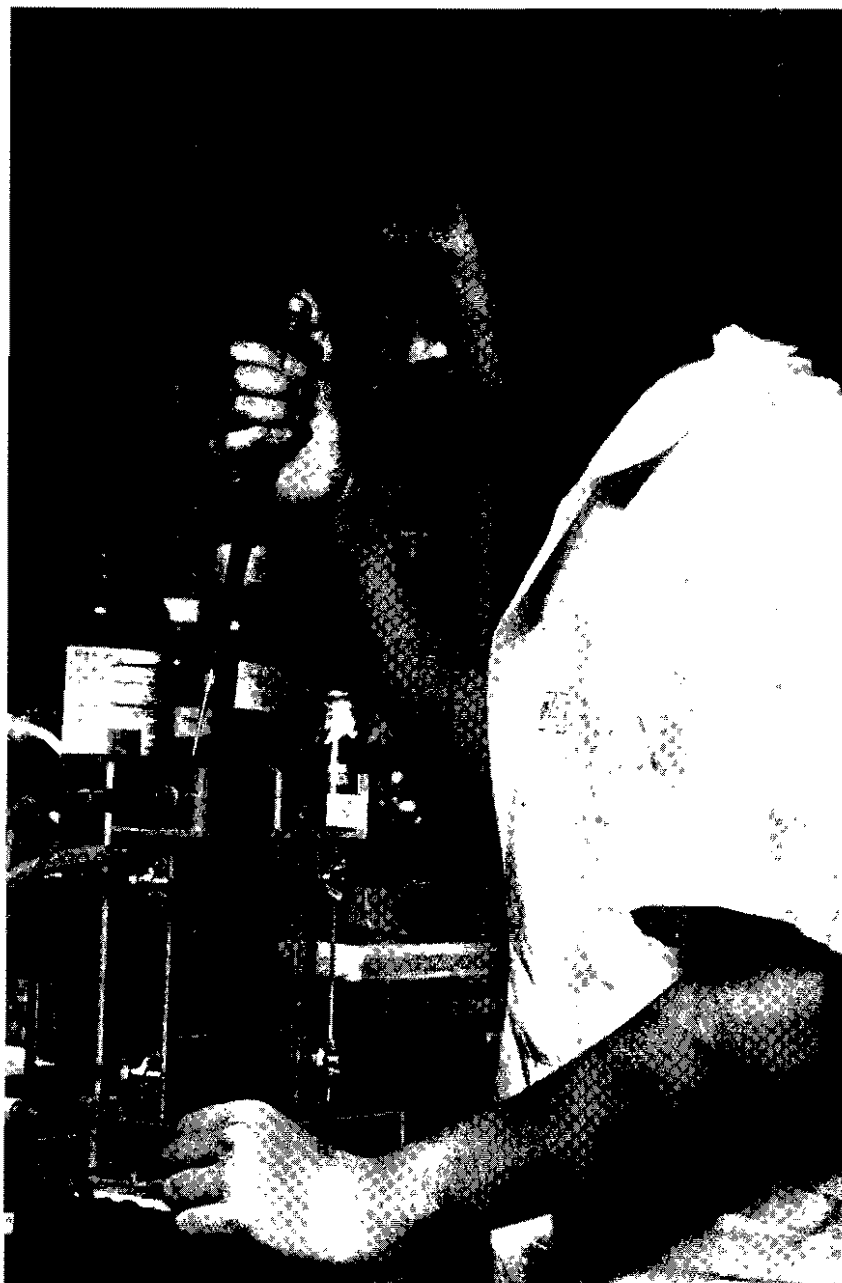
CIAT

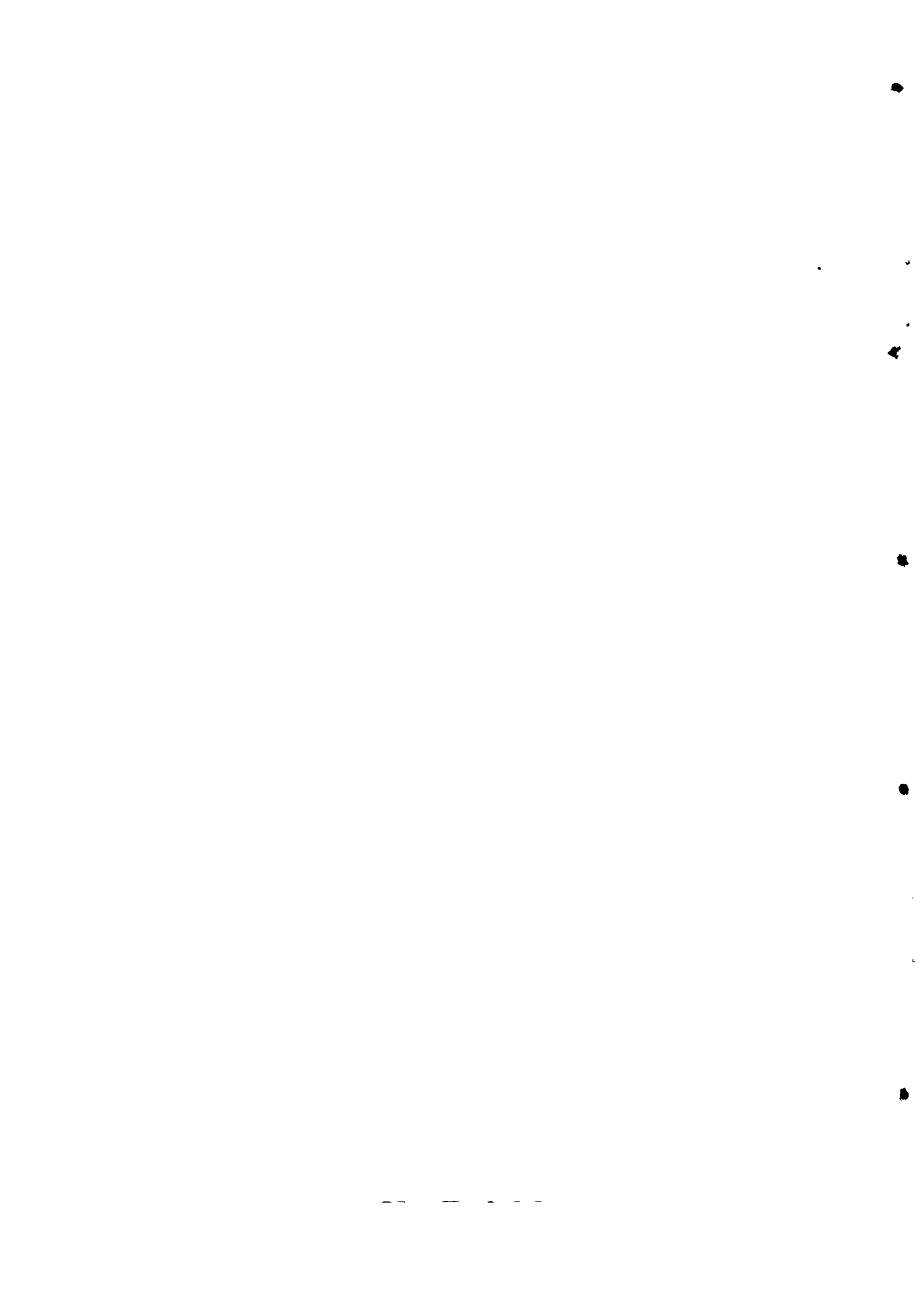
Centro Internacional de Agricultura Tropical



MANUAL PRACTICO PARA LA DETECCION ELECTROFORETICA DE ISOENZIMAS Y OTRAS PROTEINAS

IBL
1984





QP
519
A
D434
H8

**MANUAL PRACTICO PARA LA DETECCION ELECTROFORETICA
DE ISOENZIMAS Y OTRAS PROTEINAS**

A. Hussain, Ph.D.,

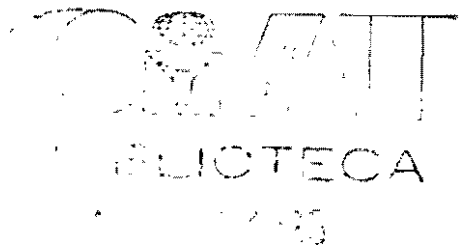
Department of Plant Science,
University of Manitoba, Canada

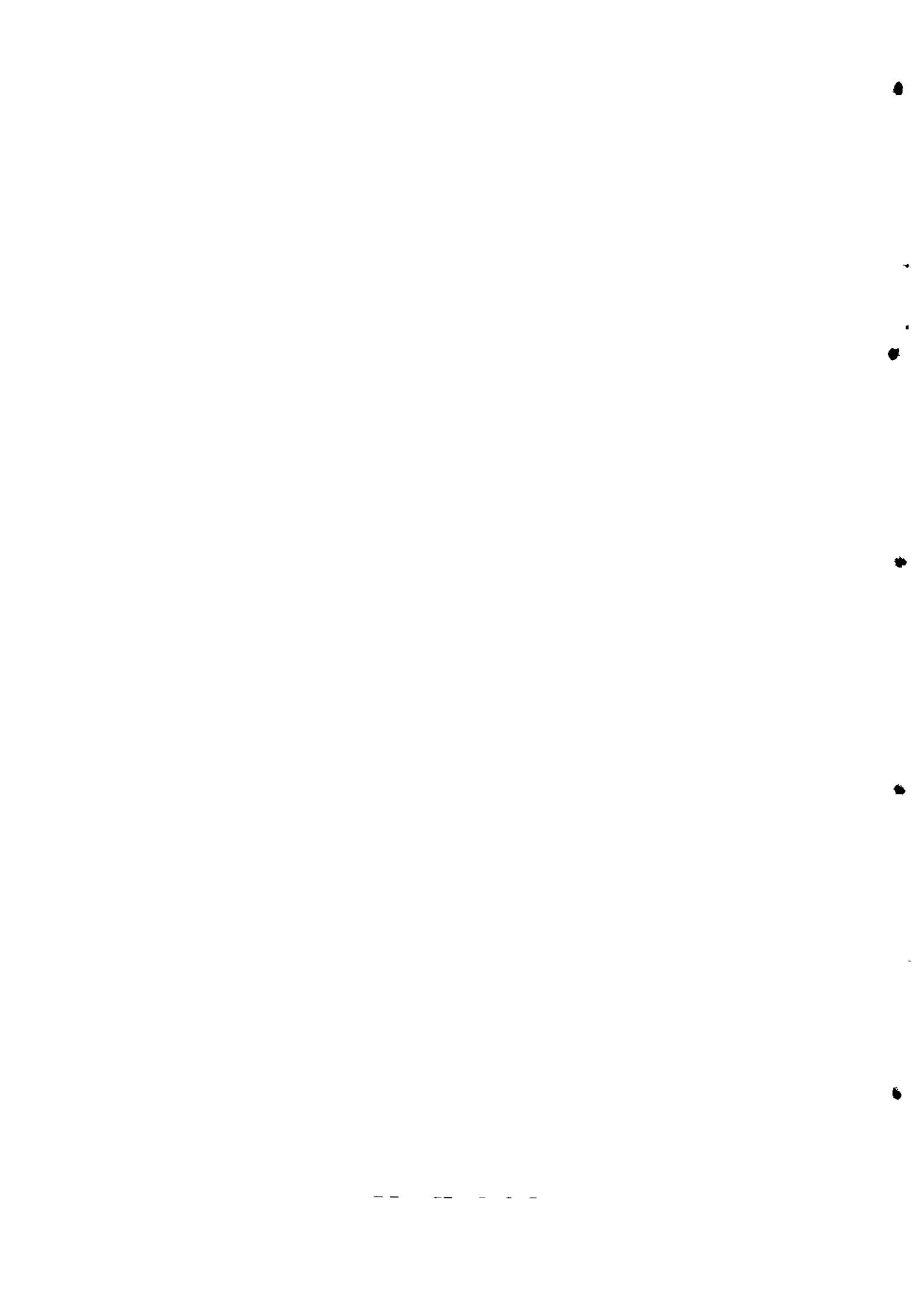
H. Ramírez,

Unidad de Investigación en Biotecnología,
CIAT, Cali-Colombia.

W.M. Roca, Ph.D.,

Unidad de Investigación en Biotecnología
CIAT, Cali-Colombia





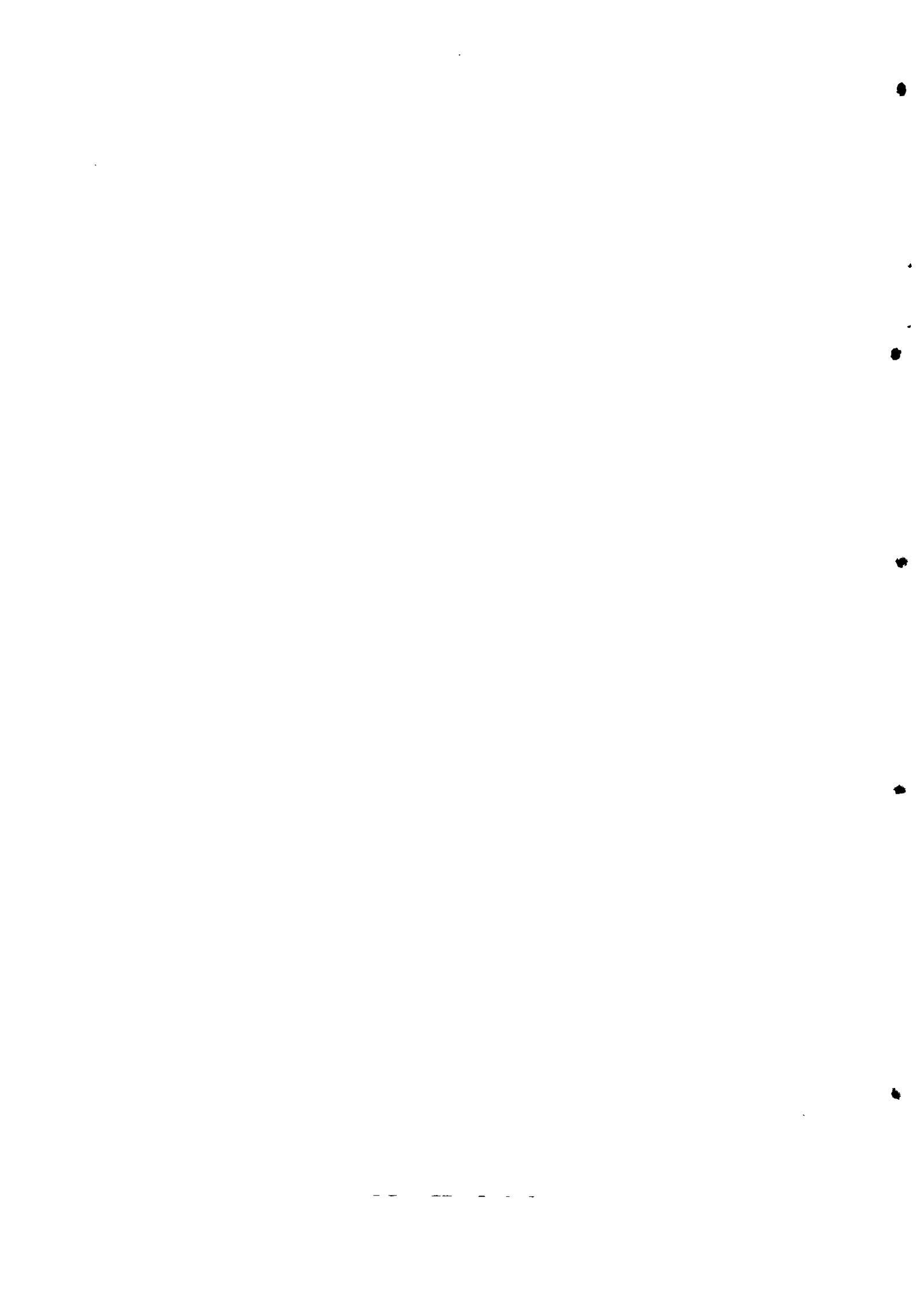
PRESENTACION

Con el apoyo del CIID se adelanta un proyecto de investigación colaborativo entre el CIAT y la Universidad de Manitoba, Canadá, cuyo propósito es desarrollar técnicas electroforéticas para la caracterización genotípica de materiales de yuca (Manihot esculenta), frijol (Phaseolus vulgaris) y varias leguminosas forrajeras (Stylosanthes, Desmodium y Centrosema).

Las técnicas básicas de electroforesis para estos materiales fueron desarrolladas por A. Hussain, y H. Ramírez bajo la dirección de Dr. W. Bushuk, Plant Science Department, Universidad de Manitoba. Posteriormente, el proyecto se trasladó a la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT para la estandarización y aplicación de las técnicas a un rango mayor de germoplasma.

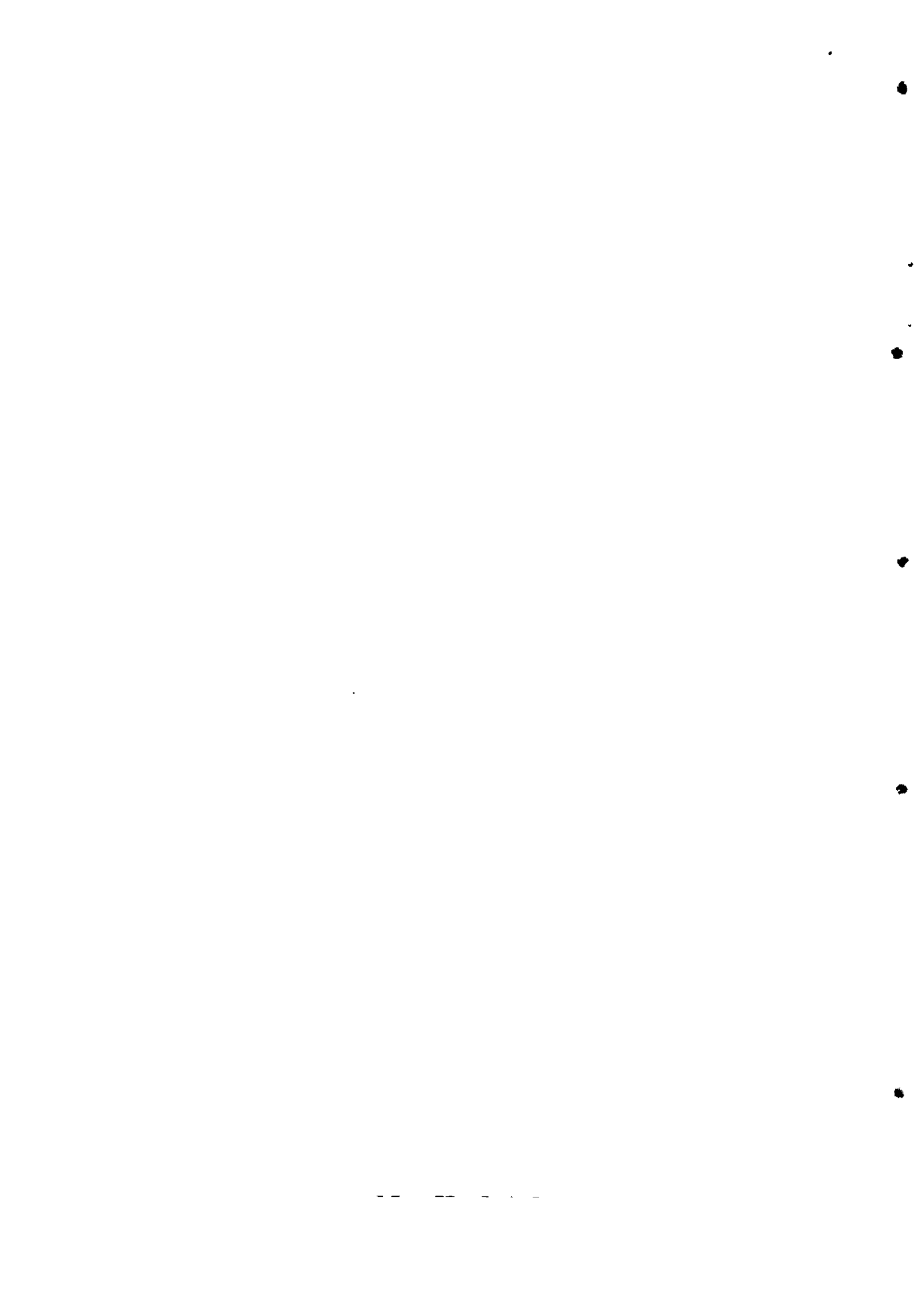
El objetivo principal de este manual es ofrecer, a aquellos que se introducen en el tema, una descripción breve y práctica en Español de las técnicas electroforéticas de mayor utilización. Estas técnicas se basan en los resultados de las investigaciones con yuca, frijol y forrajes, pero los métodos y procedimientos que aquí se presentan pueden ser adaptados también a otros materiales.

D.R. Laing
Director General Adjunto
CIAT



CONTENIDO

	Página
Presentación	
Introducción	1
Electroforesis de Isoenzimas.....	2
Electroforesis con gel de almidón.....	2
Equipo.....	2
Preparación del gel de almidón.....	8
Preparación de las muestras.....	10
Preparación para la electroforesis...	11
Electroforesis.....	11
Coloración.....	12
Enzimas evaluadas mediante electroforesis	13
Procedimientos de coloración.....	14
Electroforesis con gel de poliacrilamida	25
Preparación del gel	25
Composición de la solución del gel...	25
Polimerización del gel.....	26
Electroforesis.....	27
Coloración.....	27
Equipo.....	27
Electroforesis de Proteínas.....	27
Procedimientos de extracción de proteínas	31
Remoción de algunas proteínas indeseables	34
Concentración de proteínas.....	35
Extracción de proteínas de tejido fresco	35
Electroforesis de gel de poliacrilamida básico	36
Soluciones y "buffers".....	36
Preparación del gel.....	38
Electroforesis.....	39
Coloración.....	39
Fotografía.....	40
Coloración de plata para proteínas...	40
Electroforesis de gel de poliacrilamida ácido	42



Reactivos.....	42
Instrumentos.....	43
Preparación de las muestras.....	43
Preparación del gel.....	43
Aplicación de las muestras.....	44
Fotografía y almacenamiento.....	44
Evaluación de los Patrones Electroforéticos.	50
Referencias seleccionadas.....	53
Apendice (Materiales y Equipo para Electroforesis).	



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema para la construcción del molde para el gel.
- Figura 2. Colocación de las muestras en el gel de Almidón.
- Figura 3. Ensamblaje del Equipo para la Electroforesis de Almidón.
- Figura 4. Vista Frontal del Equipo para Electroforesis de Almidón.
- Figura 5. Aparato para cortar rebanadas del gel de Almidón.
- Figura 6. Ensamblaje para Electroforesis con poliacrilamida.
- Figura 7. Preparación del gel.
- Figura 8. Partes del ensamblaje (de la Fig. 6).
- Figura 9. Aparato vertical para el sistema de Electroforesis de poliacrilamida ácida.
- Figura 10. Unidad de Refrigeración anterior para PAGE ácida.
- Figura 11. Unidad de Refrigeración Posterior para PAGE ácida.
- Figura 12. Vista lateral del aparato vertical para el sistema de poliacrilamida ácida.
- Figura 13. "PEINE" para formar ranuras en el gel.
- Figura 14. Evaluación de los patrones Electroforéticos.



INTRODUCCION

En los materiales vivos se sabe que existen diferentes formas moleculares de enzimas que presentan una especificidad idéntica para el substrato (isoenzimas), (Markert y Moller, 1959).

La utilidad de las isoenzimas como marcadores genéticos ya se encuentra bien documentada, y estas variantes genéticamente definidas de las isoenzimas han demostrado su importancia en la evaluación de la variabilidad. La técnica puede ser útil para la caracterización de germoplasma, identificación de genotipos, discriminación de mezclas genéticas, correlación de genotipos con su origen geográfico y con caracteres importantes como calidad, reacción a enfermedades y pestes, adaptación, etc. En el área de la biotecnología, los marcadores isoenzimáticos pueden suministrar la base para diferenciar los híbridos somáticos de los tipos parentales, así como para la detección temprana de la variabilidad generada en cultivo de tejidos.

La separación electroforética de las proteínas depende principalmente de:

- a) la carga eléctrica de las proteínas que se van a separar,
- b) la corriente eléctrica y
- c) el medio de soporte.

Es esencial que el medio contenga una solución ionizada (buffer) para transmitir la corriente a través de estas proteínas. Las soluciones buffer que tienen una baja resistencia iónica, producen baja cantidad de calor y permiten una rápida migración de las proteínas mientras que aquellas que tienen una alta concentración iónica darán una separación más exacta.

La carga en el mol protéico depende del número de grupos de carboxilo y aminos que están cargados. El grupo de carboxilo tiene una carga negativa mientras que los grupos aminos llevan una carga positiva. En su punto isoeléctrico, la carga neta es cero; es decir, el número de grupos de carboxilo y de amino es igual.

Los grupos aminos se ionizan al disminuir el pH y la proteína asume una carga

positiva. Cuando se aumenta el pH, los grupos carboxilo se ionizan y le dan a las proteínas una carga más negativa. La carga neta, a un pH particular, dependerá del número de grupos carboxilos o aminos que son ionizados. Cuanto mayor sea la carga en la proteína, más rápido se desplazará su polo opuesto. La movilidad también depende del tamizaje molecular que se logra a través del medio electroforético.

ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

La metodología que se presente en las siguientes páginas, trata sobre la detección de las isoenzimas en la yuca, el frijol y las leguminosas forrajeras y puede adaptarse fácilmente a otros materiales.

ELECTROFORESIS CON GEL DE ALMIDON

Equipo

Las figuras 1 a 5 presentan la técnica para: la construcción del molde para el gel, la colocación de las muestras en el gel, el armado del equipo para realizar la electroforesis y el equipo para cortar rebanadas del gel antes de la coloración.

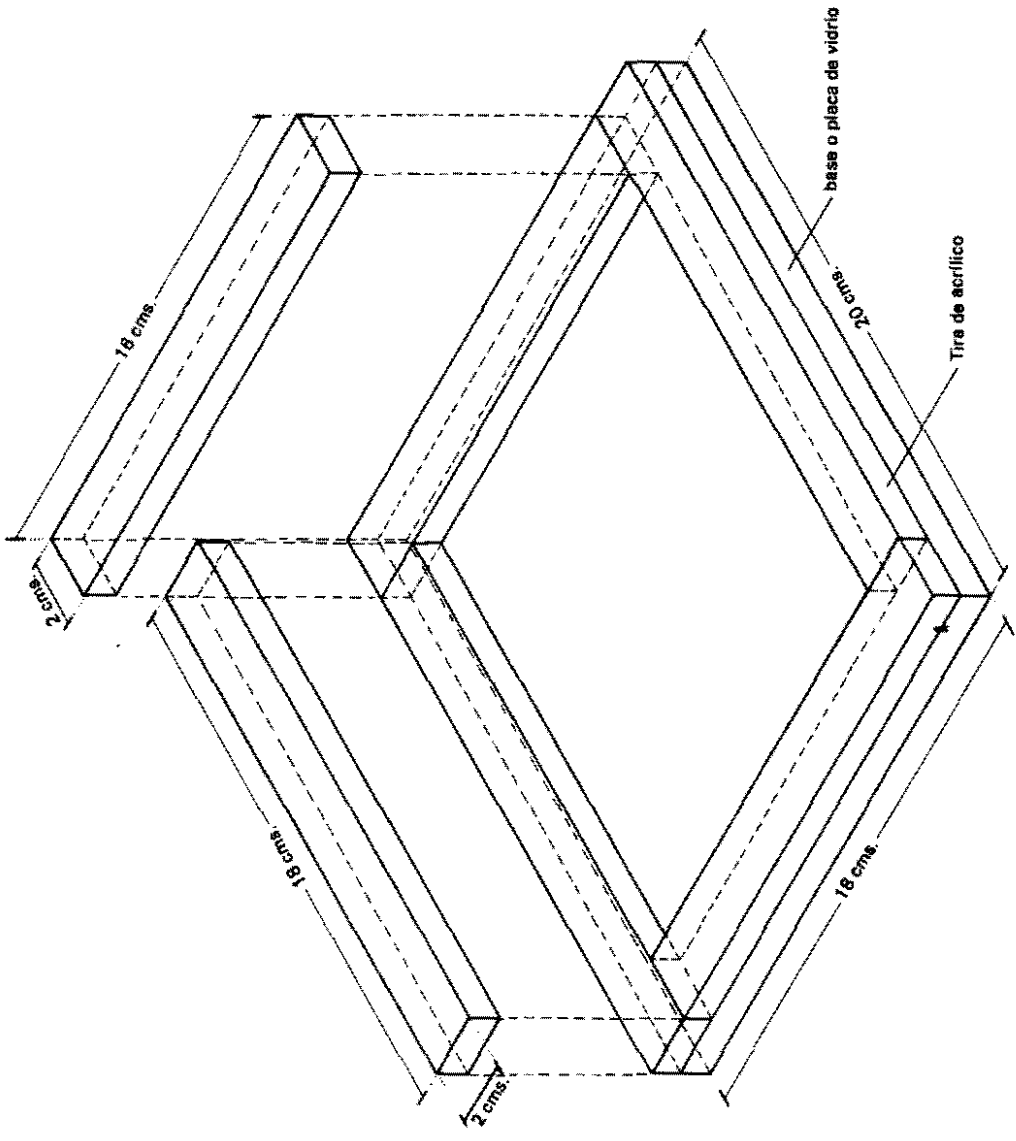


FIG. 1. Esquema para construcción del molde para el gel.

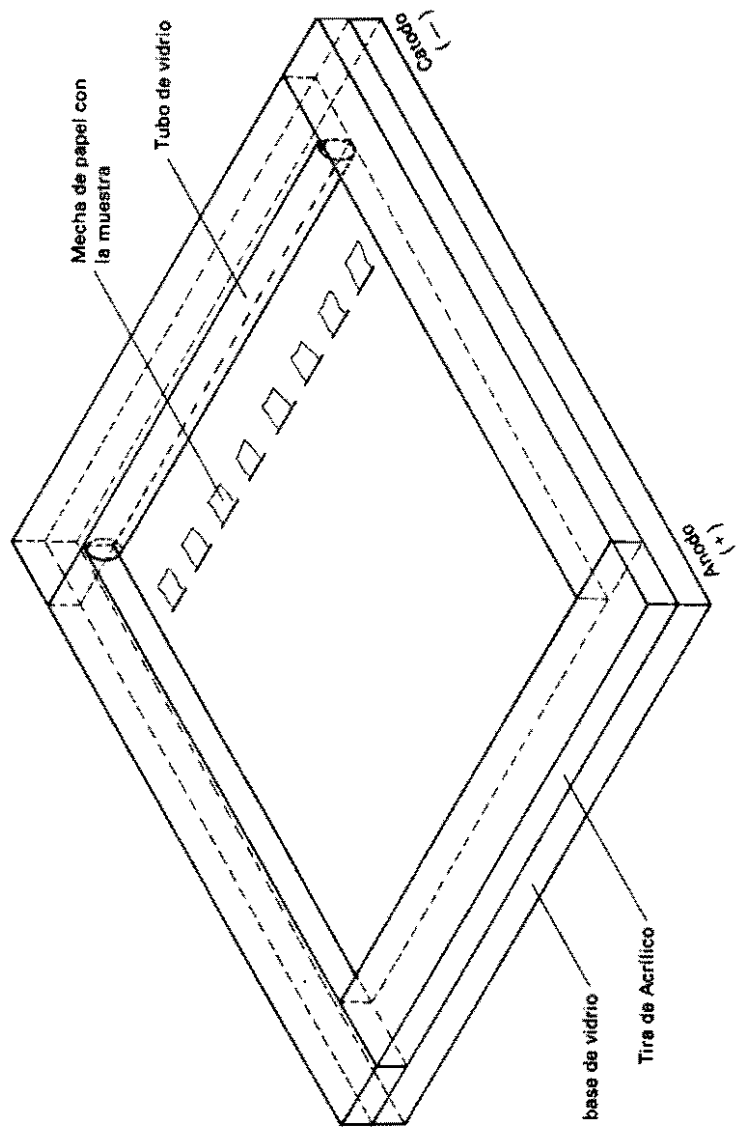


FIG. 2. Colocación de las muestras en el gel de Almidón.

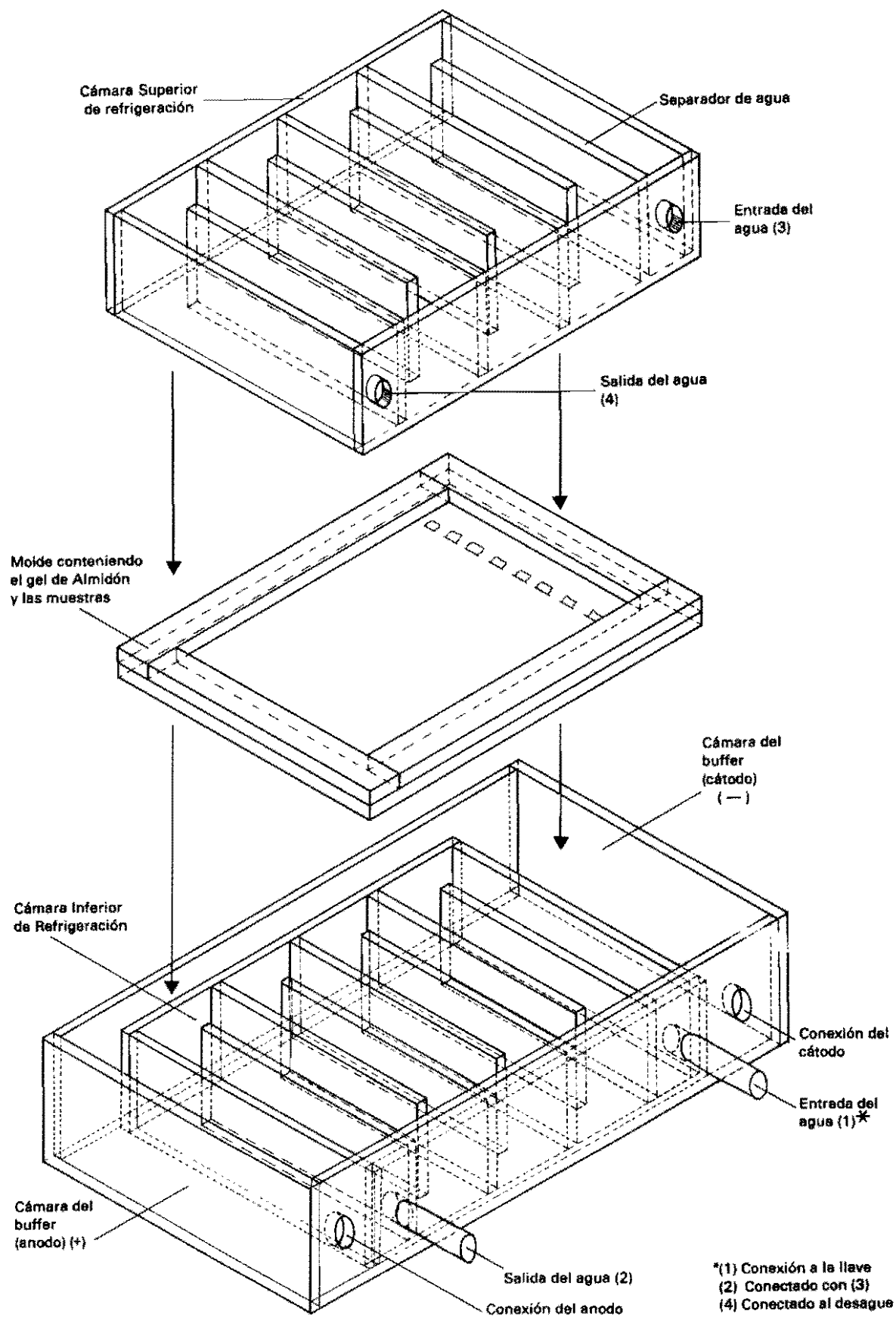


FIG. 3 Ensamblaje del equipo para la electroforesis de Almidón (después de Bushuk y Zillman).

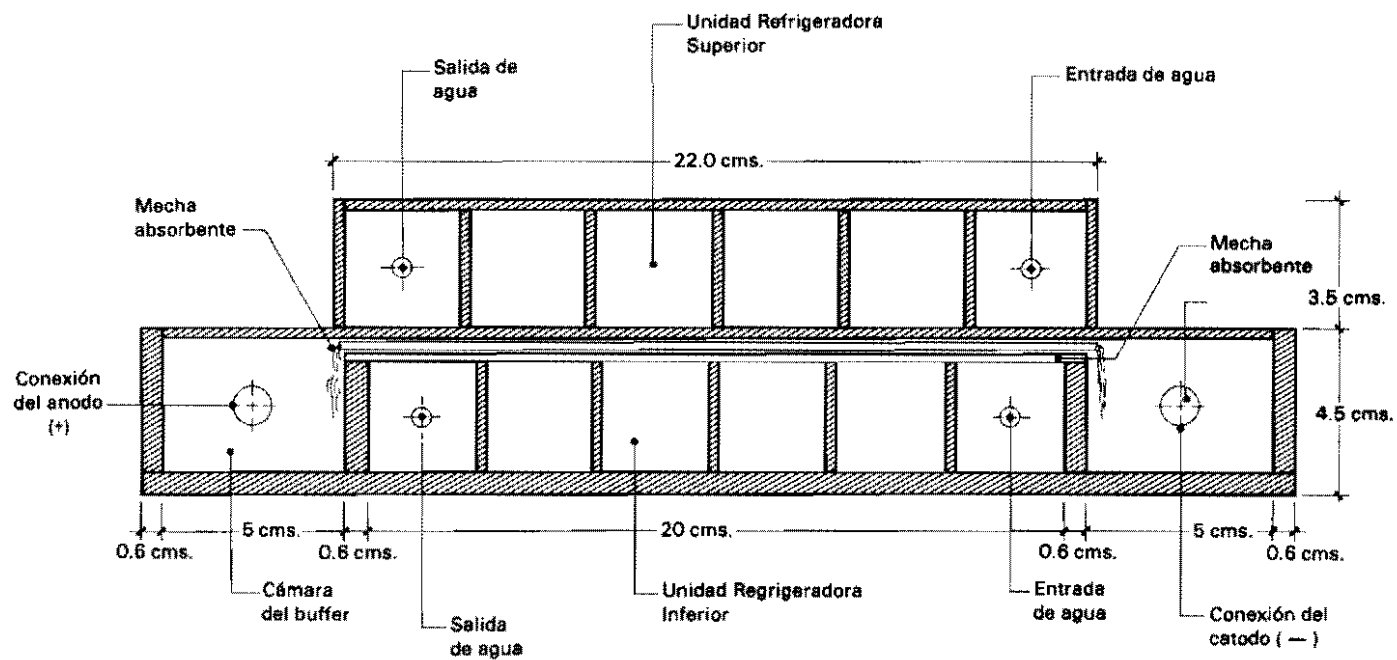


FIG. 4. Vista Frontal del Equipo para Electroforesis de Almidón.

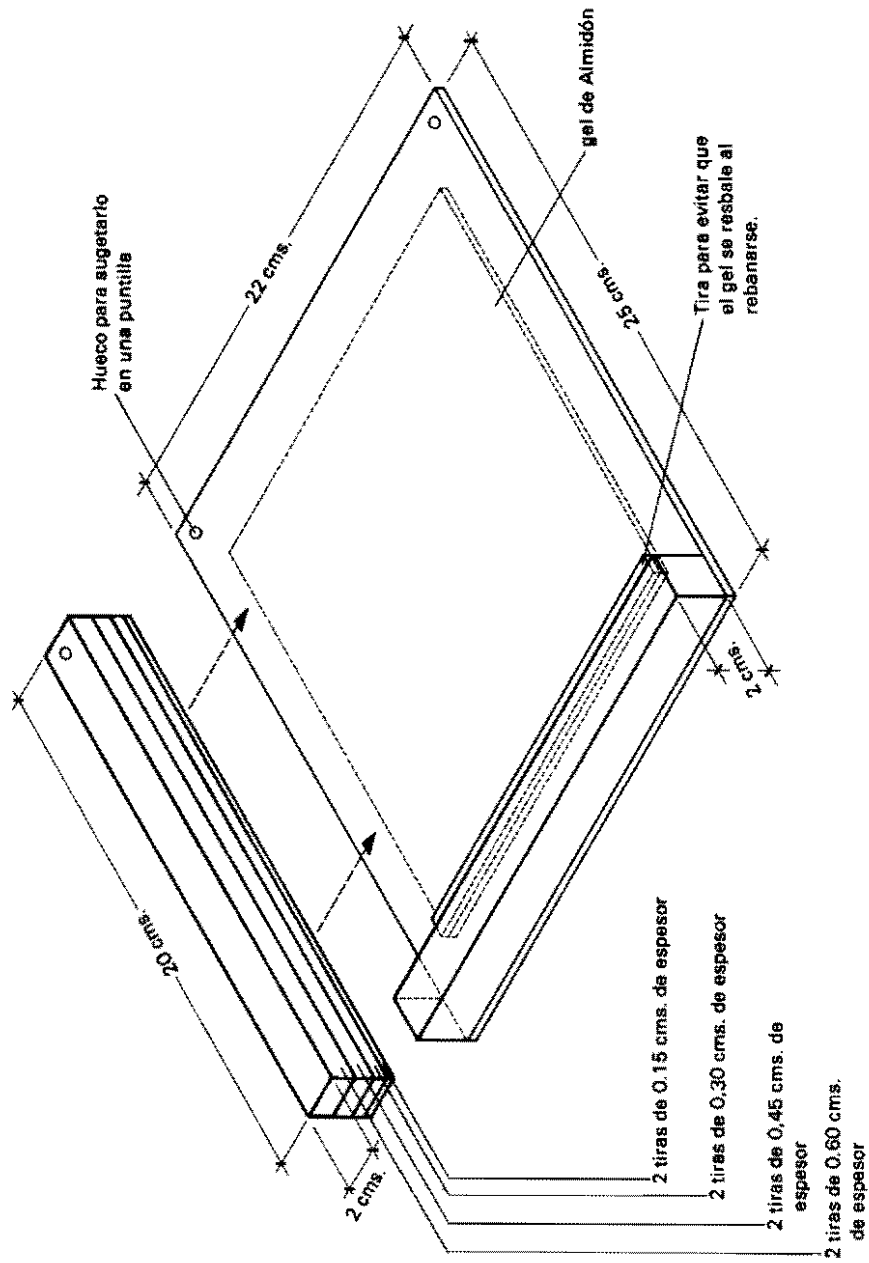


FIG. 5. Aparato para Cortar rebanadas del gel de Almondón.

Preparación del Gel de Almidón

El gel de almidón se prepara utilizando el buffer apropiado (Cuadro 1). Una clase especial de almidón (grado de electroforesis), se utiliza para el estudio de las isoenzimas. Este almidón puede obtenerse de Sigma. La solución de almidón y de buffer se calientan en un mechero moviendo continuamente en un frasco de vacío de 1 Lt. El calentamiento no deberá hacerse por más de 2-3 minutos, hasta que se aclare la turbidez. El almidón cocinado se desgasifica inmediatamente hasta que empiezan a aparecer grandes burbujas. El almidón desgasificado se vierte cuidadosamente al molde de gel. La contaminación particulada o las pequeñas burbujas que se encuentran atrapadas en el gel, se extraen por medio de la pipeta de Pasteur. A temperatura ambiente, por 1-2 horas, se deja asentar el gel. Cuando el gel se ha enfriado se cubre con "Saran Wrap" para evitar la deshidratación y se coloca en la nevera donde puede permanecer de 2-24 horas. Después de este procedimiento, el gel ya se encuentra listo para cargar las muestras.

Cuadro 1. Soluciones de gel para diferentes sistemas buffer

Sistema 1	*Buffer de borato de litio pH 8.1	= 20 ml.
	Buffer de tris citrato pH 8.4	= 200 ml.
	Almidón	= 26 grms.
Sistema 2	Buffer de citrato pH 7.00	= 220 ml.
	Almidón	= 26 grms.
Sistema 3	Buffer de morfolino-citrato pH 6.1	= 20 ml.
	Agua	= 200 ml.
	Almidón	= 26 grms.

*Los buffers de gel aparecen en una lista en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Los buffers utilizados en las cámaras de electrodos y en la preparación de Gel.

<u>Sistema</u>	<u>Buffer de electrodos</u>	<u>Buffer de Gel</u>
1- pH 8.1	Hidróxido de litio 0.03M (1.25g/1) Acido bórico 0.19M (11.75g/1) (El pH ajustado con cualquiera de los anteriores).	Sistema de buffer de electrodo 1= 1 parte. Buffer de tris citrato pH 8.4 9 partes. Tris-citrato Base Trizma 0.05M (6g/1) Acido cítrico 0.008M (1.68g/1)
2- pH 6.7	Fosfato de potasio dibásico 0.167M (29g/1) Acido cítrico 0.027M (5.65g/1) (el pH ajustado con el ácido cítrico a (6.7).	Fosfato de potasio dibásico 0.006M (1.1g/1) Acido cítrico 0.0012M (0.25g/1) (El pH ajustado a 7.0 con el ácido cítrico).
3- pH 6.1	Acido cítrico 0.04M (8.4g/1) (el pH ajustado a 6.1 con N (3-aminopropil) morfolina)	Buffer de electrodo pH 6.1=1 parte Agua = 9 partes.
4- pH 7.8	Acido bórico 0.3M (el pH ajustado a 7.8 con 2N NaOH)	Tris 0.15M (18g/1) Acido cítrico 0.0036M (el pH ajustado con 1 N NaOH)
5- pH 5.7	L-Histidina 0.065M Acido cítrico 0.02M (el pH ajustado con el ácido cítrico a 5.7)	Buffer de electrodo= 1 parte Agua = 5 partes

Preparación de las muestras

Las muestras pueden prepararse por medio de la trituración de los tejidos, en uno de los siguientes buffers de extracción. En el caso de la electroforesis de gel de almidón, la proporción de tejido al buffer varía entre 1:1 ó 1:2 (peso/volumen); para la electroforesis de gel de poliacrilamida se utiliza mayor cantidad de buffer 1:5 - 1:10 (peso/volumen).

Buffer de Extracción

I. pH 7.00 Fosfato de potasio 0.1M

Contiene:

Sucrosa 20%

Polivinil pirrolidona (PVP-40)=5%

Triton x 100= 0.5%

2- Mercaptoetanol=14uM

II. pH 7.4 Tris-malato 0.1M

Contiene:

Glicerol=20%

PVP-40+5%

Triton x 100=0.5%

2-Mercaptoetanol= 14uM

III. pH 8.3 Tris HCl 0.05M

Contiene:

Sucrosa=20%

PVP-40=5%

Triton x 100=0.5%

2- Mercaptoetanol=14 uM

IV. pH 7.4 Ascorbato de sodio 0.05M

Contiene:

Sucrosa= 16%

Preparación para la Electroforesis

La muestra que se ha extraído se absorbe en mechas de 0.5 x 1.0 de papel Whatman No. 3 (10 ul es suficiente para 2-3 mechas). Se corta una ranura a unos 3.0 cms. de distancia de la parte más corta. Las mechas que han absorbido la muestra se secan entre una capa de papel de seda. La ranura en el gel se abre cuidadosamente con los dedos y se insertan las mechas utilizando una pinzas muy finas. Las mechas que contienen la solución colorante (1% de azul de bromofenol), se colocan en los dos extremos de la ranura. Generalmente se colocan las mechas a una distancia de 0.5 cms. Un pedazo pequeño de un bastoncito de vidrio (delgado), que sea igual a la parte corta del molde de gel, se introduce en el extremo corto con el fin de cerrar la ranura y asegurar la continuidad del gel. Después se coloca el gel en la unidad de enfriamiento y se ponen en contacto los electrodos extendiendo pedazos de mecha absorbente, sobre los extremos del gel de almidón que se sumergió en los buffers. Luego se conecta la energía y se pasa agua fría por las unidades de enfriamiento tanto superiores como inferiores. Se debe tener cuidado para que la unidad superior de enfriamiento no entre en contacto con el gel; algunas veces ésto afecta la movilidad de las muestras.

Electroforesis

Se conecta la energía e inicialmente se pasa una corriente baja de 5-10 mA para trasladar las muestras al gel. Después de algunos minutos (5-10 minutos), cuando el colorante de bromofenol haya cruzado la ranura, se retiran las mechas del gel y se coloca una corriente de 30mA- 40mA. Después de la electroforesis, se extrae el gel del molde, se cortan los bordes laterales con un bisturí afilado y la franja catódica (el pedazo corto del gel), también se retira. En la esquina del extremo izquierdo se hace un corte diagonal para identificar la posición de la primera muestra. El gel se coloca en una lámina de corte y luego se pasa un hilo de nylon horizontalmente, a través del gel, para cortar tajadas de 1.5 mm. de espesor. Estas se colocan en bandejas plásticas para una coloración apropiada. Generalmente se descarta la capa superior (tajada) por encima de 6.0 mm, las 4 tajadas restantes se utilizan para una apropiada detección.

Coloración

La actividad enzimática se puede observar al hacer flotar la tajada en los buffers de coloración que contienen el substrato y colorante adecuados. Según el tamaño de la bandeja de coloración, 50 ml debería ser la cantidad suficiente. Generalmente, se incuban las tajadas a 38°C y los gels se fijan en 50% de metanol que contiene 1% de ácido acético. Posteriormente, se toman fotografías de los gels y luego se conservan en pequeñas bolsas de plástico con cierre tipo "Ziplock".

Enzimas evaluadas mediante Electroforesis

1.	ACP	Fosfatasa ácida
2.	AdK	Adenil Kinasa
3.	ADH	Alcohol deshidrogenasa
4.	CAT	Catalasa
5.	DIAP	Diaforasa
6.	EP	Endopeptidasa
7.	EST	Esterasa
8.	FUM	Fumarasa
9.	G1PT	Glucosa-1-fosfato transferasa
10.	G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
11.	GOT	Transaminasa glutámica oxalacética
12.	GDH	Glutamato deshidrogenasa
13.	HK	Hexosa Kinasa
14.	IDH	Isocitrato deshidrogenasa
15.	LDH	Lactato deshidrogenasa
16.	LAP	Leucina aminopeptidasa
17.	MDH	Malato deshidrogenasa
18.	ME	Enzima Málica
19.	MU-Bgal	Metil umbeliferilo- β -d-galactosidasa
20.	MU-est	Metil umbeliferilo esterasa
21.	PEP	Peptidasa
22.	PRX	Peroxidasa
23.	PGI	Fosfoglucoisomerasa
24.	PGM	Fosfoglucomutasa
25.	6PGDH	6-Fosfogluco deshidrogenasa
26.	PROT	Proteínas
27.	SKDH	Deshidrogenasa shikímica
28.	TPI	Triosa fosfato

Procedimientos de Coloración

1. ACP Fosfatasa ácida
- | | |
|---------------------------------------|-------|
| O.1 M Buffer de acetato sódico pH 5.0 | 50 ml |
| Sodio & fosfato ácido naftilo | 50 mg |
| Sal de garnet fast GBC | 50 mg |
- Incube a 38°C durante 1 hora, enjuague con agua y haga la fijación en etanol a 50%.

2. ADK Adelinato Kinasa
- Solución 1:
- | | |
|-------------------------------|--------|
| Buffer pH 7.1 | 5 ml |
| L-D-glucosa | 100 mg |
| Adenosina-5-difosfato | 10 mg |
| Hexosa Kinasa | 9 ul |
| Glucosa 6 fosfodeshidrogenasa | 4 ul |
| NADP | 5 mg |
| MTT | 3 mg |
| MB ó PMS | Traza |
- Solución 2:
- | | |
|-----------------------|---------|
| Buffer pH 7.1 | 50 ml |
| Agarosa (véase placa) | q 70 mg |

Caliente la solución 2 hasta que hierva, déjela enfriar y mézclela con la solución 1. Vierta la mezcla sobre el gel. Deje que se solidifique. Cubra el gel con una cubierta plástica e incube a 37°C durante 1-2 horas. Utilice una botella de lavado para remover la capa de agar del gel y haga la fijación en etanol a 50%.

Buffer 1 M Tris HCL pH 7.1	1 ml
0.1 MgCl ₂	1 ml
Agua	3 ml

3. ADH	Alcohol deshidrogenasa	
	Tris HCL 1 M pH 8.0	5 ml
	H ₂ O	40 ml
	95% etanol	1 ml
	NAD	14 mg
	PMS	traza

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas, enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

4. CAT	Catalasa	
	Ferricianuro de potasio	500 mg
	Cloruro férrico	500 mg
	H ₂ O	50 ml

Vierta 0.01% de H₂O₂ sobre el gel, déjelo durante 10 minutos. Enjuague con agua destilada y luego vierta la mezcla de coloración anterior. Incube durante 5-10 minutos, enjuague con agua y almacene el producto.

Coloración alternativa:

	Yoduro de potasio	100 mg
	Acido acético	10 gotas
	H ₂ O	50 ml

Vierta sobre el gel 0.6% de solución de peróxido de hidrógeno, déjelo durante 1 minuto y enjuague con agua destilada; viértalo sobre la mezcla anterior.

La catalasa tendrá la apariencia de una banda blanca con color de fondo azul; inmediatamente lave con agua y tome una fotografía. Si se enfría el gel antes de la coloración, se obtiene un mejor contraste.

5. DIAP	Diaforasa	
		(anódico + catódico)
	Tris HCL 1M pH 8.5	5 ml
	H ₂ O	45 ml
	NADH	14 mg
	2,6 diclorofenol/indofenol	Traza (punta de la espátula)
	MIT	10 mg

Vierta la solución anterior sobre el gel e incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas, enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

6. EP	Endopeptidasa	
	0.1 M buffer de Tris malato pH 5.5	100 ml
	(Base trizma ácido málico)	
	pH ajustado con 2N NaOH	
	L-N-benzoilo-DL-arginina-B-Natilamida HCL	50 mg
	Sal K negra firme (Fast Black K Salt)	50 mg
	Mg Cl ₂	100 mg

Incube durante 1 hora y haga la fijación en etanol a 50%.

7. EST	Esterasa	
	Fosfato de potasio 0.1 M pH 6.0	75 ml
	a- naftilo acetato ^X	150 mg
	Sal de garnet fast GBC	75 mg

Disuelva el a-naftilo acetato en 2 ml de acetona antes de mezclarlo con los otros ingredientes. Vierta la mezcla sobre el gel e incube durante 1 hora a temperatura ambiente, enjuague con agua y haga la fijación con a 50%.

En los casos en que se van a ensayar las formas a yβ de la esterasa, añada 100 mg de B-naftilo acetato y disminuya la cantidad de L-naftilo acetato a 100 mg en la mezcla anterior.

8. FUM	Fumarasa	
	Fosfato de potasio 0.1 M pH 7.5	40 ml
	Fumarato 0.5 pH 6.5	10 ml
	NAD	20 mg
	Malato deshidrogenasa	100 unidades
	M.T.T.	6 mg
	MB (Azul de Mendola)	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1 hora, enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

9. GIPT	Glucosa-1-fosfato transferasa	
	Tris acetato pH 6.5	50 ml
	Glucosa 1-fosfato	20 mg
	L-D-glucosa	40 mg
	G6PDH	20 unidades
	NADP	8 mg
	MTT	8 mg
	PMS	Trazas

Vierta la mezcla sobre el gel, incube a 37°C durante 1 hora y haga la fijación en etanol a 50%.

10. G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	
	Tris HCl 1 M pH7.1	5.0 ml
	H ₂ O	45.0 ml
	Mgcl ₂ ó Mg (NO ₃) ₂ 0.1 M	0.5 ml
	Glucosa 6 fosfato (sal monosódica)	20 mg
	NADP	6 mg
	MTT	3 mg
	PMS	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1 hora, enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

11. GOT	Transaminasa glutámica oxalacética	
	Tris HCl 1M pH 8.0	5.0 ml
	H ₂ O	45.0 ml
	Acido α-aspártico	100 mg
	Acido α-Ketoglutámico	50 mg
	Piridoxal 5-fosfato	4 mg

Mezcle y justo antes de hacer la coloración añada

Sal BB de azul fast	50 mg
---------------------	-------

Incube en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1-2 horas, enjuague y haga la fijación en una solución que contenga 50% de glicerol y 5% de ácido acético.

12. GDH	Glutamato deshidrogenasa .	
	Tris HCl pH7.1	5 ml
	H ₂ O	45 ml
	Buffer de glutamato 1 M pH 7.00	14 ml
	NAD	20 mg
	MIT	8 mg
	PMS (6 MB)	Trazas

Después de incubar a 37°C durante 1-2 horas, enjuague con agua destilada y haga la fijación en etanol.

13. HK	Hexosa Kinasa	
	Tris HCL 1 M pH 7.1	5 ml
	H ₂ O	40 ml
	Mg Cl ₂ 0.1 M	5 ml
	Adenosina 5-trifosfato	50 mg
	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	4 ul
	NADP	10 mg
	MIT	6 mg
	PMS	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas. Enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

14. IDH	Isocitrato deshidrogenasa	
	Tris HCl pH 7.1	5 ml
	H ₂ O	45 ml
	Mn Cl ₂ 0.1 M	0.5 ml
	Isocitrato sódico	30 mg
	NADP	10 mg
	MIT	8 mg
	PMS ó MB	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas, enjuague y haga la fijación en metanol a 50%.

15. LDH	Lactato deshidrogenasa	
	Tris HCl pH 8.0	5 ml
	H ₂ O	40 ml
	Acido láctico 1 M	2 ml
	NAD	14 mg
	MIT	8 mg
	PMS	Trazas

Incube a 37°C en la oscuridad durante 1-2 horas, enjuague con agua y haga la fijación en etanol a 50%

16. LAP	Leucina amino peptidasa	
	Fosfato de potasio 0.1 M pH 6.0	50 ml
	Sal K negra firme (Fast Black K Salt)	20 mg
	Mg Cl ₂ 0.1 M	5 ml
	L-Leucilo-B-naftilamida	20 mg
	(Antes de la mezcla se disuelve en 2 ml de NN dimetilformadida).	

Añada la solución de leucilo naftilamida antes de colorear el resto de la mezcla. Incube el gel a 37°C durante 1-2 horas, enjuague con agua y haga la fijación en etanol a 50%.

17. ME	Malato deshidrogenasa	
	Tris malato 0.1 M pH 7.2	50 ml
	NAD	20 mg
	MIT	8 mg
	PMS ó MB	Traza
	L-malato	20 mg

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas, enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

18. ME	Enzima málica	
	Tris malato 0.1 M pH 7.2	45 ml
	MgCl ₂ 0.1 M	5 ml
	NADP	10 mg
	MIT	6 mg
	PMS ó MB	Trazas
	L-malato	20 mg

Solución B:

Solución buffer pH 8.0 5 ml

Agarosa (plāca marina) 70 mg

(Haga hervir y almacene a 37°C)

Mezcle las soluciones A y B antes de efectuar la coloración y vierta sobre el gel. Permita que se solidifique. Cubra el gel con una cubierta e incube a 37°C durante 1-2 horas. Remueva el agar del gel mediante el uso de un chorro de agua y haga la fijación en etanol a 50%.

22. PRX Peroxidasa
Acetato sódico-buffer 0.2 M pH 5.0 50 ml
3-Amino-9-etilcarbazole 40 mg
(disuelto en 5 ml de NN dimetil formamida)
H₂O₂ 30% 2 gotas

Incube a temperatura ambiente, enjuague con agua y haga la fijación en etanol a 50%.

23. PGI Fosfogluco isomerasa
Tris HCl 1 M pH 8.0 5 ml
H₂O 40 ml
MgCl₂ ó Mg (NO₃)₂ 0.1 M 1 ml
G6PDH (10 unidades) 8 ul
Fructosa 6 fosfato 10 mg
NADP 6 mg
MIT 6 mg
PMS ó MB Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas. Enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

24. PGM Fosfoglucomutasa
Tris HCl 1M pH 8.0 5 ml
H₂O 45 ml
MgCl₂ ó Mg(NO₃)₂ 0.1 M 6 ml
Glucosa 1 fosfato 100 mg
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 8 ul
(10 unid.)

Glucosa 1.6 difosfato	Traza
NADP	8 mg
MTT	6 mg
PMS	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas. Enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

25. PGDH	Fosfogluconato deshidrogenasa	
	Tris malato 0.1 M pH 7.2	50 ml
	6 ácido fosfogluconico	10 mg
	NADP	8 mg
	MTT	8 mg
	MB	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas. Enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

26. PROT	Proteínas (Rubisco)	
	Azul-negro de naftol	40 mg
	*Solución de lavado	40 ml
	(Filtre la solución anterior antes de hacer la coloración)	
	*Solución de lavado	
	Metanol	50 ml
	Agua	50 ml
	Acido acético	10 ml

Vierta sobre el gel, incube a temperatura ambiente durante 1 hora. Enjuague con la solución de lavado y haga la fijación en la misma solución de lavado.

27. SKDH	Deshidrogenasa shikimica	
	Tris Hcl 1 M pH 8.5	5 ml
	H ₂ O	45 ml
	Acido shikimico	30 mg
	NADP	8 mg
	MTT	6 mg
	PMS ó MB	Trazas

Incube en la oscuridad a 37°C durante 1-2 horas, enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

28.	TPI	Triosa fosfato isomerasa	
		Tris HCl pH 8.0	5 ml
		H ₂ O	45 ml
		NAD	16 mg
		Arsenato sódico	230 mg
		Na-EDTA	20 mg
		Fosfato de Dihidroxiacetona	6 mg
		Gliceraldehido 3 fosfodeshidrogenasa	50 ul
		(50 unid.)	
		MTT	8 mg
		PMS	Traza

Incube en la oscuridad a 35°C durante 1-2 horas. Enjuague y haga la fijación en etanol a 50%.

Abreviaturas

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Mg (NO ₃) ₂	Nitrato de Magnesio
MTT	Azul Tiazolil de Tetrazolio
NAD	B-nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PMS	metosulfato de Fenazina

Cuadro 3. Buffers de Coloración

<u>pH</u>	<u>Isoenzima</u>	<u>Buffer</u>
4.5	MU-B-gal	Citrato sódico 0.1 M. 4.2 g/200 ml, ajuste el pH a 4.5 con 5N NaOH.
5.0	ACP	Acetato sódico 0.1 M. 12 ml de ácido acético/ 200 ml, ajuste el pH a 5.0 con 5N NaOH.
5.0	PRX	Acetato sódico 0.2 M. 24 ml de ácido acético/ 200 ml, ajuste el pH a 5.0 con 5N NaOH.
5.5	EP	Base Trizma 0.2 M. 4.8 g/200 ml. Acido maléico 0.2 M 4.6 g/200 ml. Ajuste el pH a 5.5 con 0.2 M NaOH.
6.0	EST, LAP, MU-est.	Fosfato de Potasio (monobásico) 0.1 M 2.8g/200 ml, ajuste el pH a 6.0 con 5N NaOH
6.5	GIPT	Tris acetato 0.1 M 2.4 g Tris/200 ml, ajuste el pH a 6.5 con ácido acético.
7.1	AdK, G6PDH, GDH, HK, IDH	Tris HCl M 2.4 g Tris/200 ml, ajuste el pH a 7.1 con 6N HCl.
7.2	MDH, ME, 6 PGDH	Tris malato 0.1 M 2.8 g DL-ácido málico/ 200ml. Ajuste el pH a 7.2 con la base Trizma.
7.5	FUM	Fosfato de Potasio (dibásico). 3.4 g/200ml; ajuste el pH a 7.5 con 6N HCl.
8.0	ADH, GOT, LDH, PEP, PGM, TPI	Tris HCl 1M. 24.2 g/200ml, ajuste el pH a 8.0 con 6N HCl.
8.5	DIAP, SKDH	Tris HCl 1 M. 24.2 g/200ml; ajuste el pH a 8.5 con 6N HCl.

ELECTROFORESIS CON GEL DE POLIACRILAMIDA

Preparación del Gel

El gel de poliacrilamida tiene un poder de resolución superior debido a su efecto de tamizaje. El tamaño de los poros es uniforme y puede controlarse. El tamaño del poro es mayor a una menor concentración de la acrilamida en el gel y es menor cuando se aumenta la concentración. Esto no se puede lograr con el gel de almidón ya que los cambios en la concentración del almidón tendrían un efecto en la consistencia del gel. Además, los gels de acrilamida son transparentes y esto facilita, cuando se requiera, la cuantificación de las proteínas en base a la intensidad. La única desventaja del gel de poliacrilamida es que no puede cortarse horizontalmente en 4 ó 5 rebanadas.

Los gels son preparados en moldes comerciales que se pueden obtener de las firmas Bio-rad, LKB ó Pharmacia. Si fuese difícil conseguir las unidades electroforéticas, el gel de acrilamida puede vaciarse entre dos placas de vidrio, separadas con espaciadores de 1.5 mm, y se pegan preferiblemente con cinta pegante que sea resistente al agua. El gel de acrilamida de una concentración de 10% ó 12% u 8% puede vaciarse desde la parte superior con una jeringa sin pistón que se coloca cerca a la parte superior y se introduce cuidadosamente un aparato formador de ranuras (peine), evitando que se formen burbujas de aire.

Composición de la Solución del Gel

a. Solución de poliacrilamida:

Poliacrilamida 99%	22.2 g
Bis-acrilamida	0.6 g

Disuelva en unos 60ml de agua destilada, filtre en un matraz volumétrico de 100 ml y ajuste el volumen final a 100 con agua destilada.

b. Solución buffer:

1.5 M Tris HCl pH 8.8

Disuelva 18.15 g de base Trizma en 60 ó 70 ml de agua destilada, ajuste el pH a 8.8 con 6N HCl, lleve el volumen a 100 ml y vuelva a ajustar el pH a 8.8 utilizando 6N HCl.

c. Solución de Persulfato: 10%

Disuelva 0.5g de persulfato de amonio en 5 ml de agua destilada. Esta solución debe estar recién preparada cada vez que sea necesario utilizarla.

d. TEMED- (Reactivo puro al 99%).

	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>12%</u>
PAA _(a)	18	22.5	27.0
Buffer _(b)	12.5	12.5	12.5
H ₂ O	19.5	15.0	10.5
Total	50.0	50.0	50.0
Desgasificado			
Persulfato _(c)	0.5	0.5	0.5
TEMED _(d)	16 ul	15 ul	15 ul

Polimerización del Gel

La polimerización del gel debe tomar de 10-20 minutos. Si toma más de 20 minutos, deberá aumentarse el volumen del TEMED y si toma menos de 10 minutos deberá reducirse. El tiempo que requiere la polimerización se medirá a partir del momento en que se añade el TEMED.

Después de la polimerización del gel se extrae el peine y se lavan las ranuras con buffer (buffer de electrodos). Posteriormente se procede a verter las muestras en las ranuras en alícuotas de 10 ó 15 ó 20 ul y se conecta la corriente utilizando unidades verticales comerciales de electroforesis.

Si fuese imposible comprar una de estas unidades, se podría hacer una ranura en un recipiente estrecho de plástico que encajase en la parte superior de las placas y las fugas podrían sellarse con plástico líquido ó con cualquier otro material de sellado que sea inerte.

La misma caja puede utilizarse en la parte inferior de la placa pero sin ranura. Antes de bajar las placas de la caja es necesario quitar la cinta de la base de la placa para que el gel esté en contacto con el buffer inferior.

Electroforesis

Durante la electroforesis se puede colocar todo el conjunto en el refrigerador. El suministro de energía puede permanecer en la parte exterior pero puede conectarse a través de alambres que entran a la unidad de refrigeración.

La energía se desconecta después de que termine la electroforesis y se puede sacar la unidad; el gel se puede retirar y colorear en el buffer apropiado.

Coloración

El gel de acrilamida puede requerir una mayor incubación en comparación con el gel de almidón porque la difusión a través de la poliacrilamida puede ser más lenta en contraposición con el gel de almidón. Después de una coloración apropiada, los gels pueden fijarse en una mezcla 5:5:1 de etanol: agua: ácido acético.

Equipo

Las figuras 6 á 8 muestran las técnicas de ensamblaje para electroforesis de poliacrilamida y la preparación del gel.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

La electroforesis de proteínas tiene la ventaja de ser más sencilla que los estudios isoenzimáticos. Estos están caracterizados por el uso de varios sistemas de buffers y un número de colorantes. Además, las bandas protéicas, a diferencia de las isoenzimáticas, podrían no estar influenciadas por los artefactos utilizados en los procedimientos de extracción y por el estado fisiológico del material vegetal. Los análisis electroforéticos de las proteínas estables han demostrado ser muy útiles para la identificación de cultivares.

Los materiales pueden extraerse para: (Figura 8).

1. proteínas totales

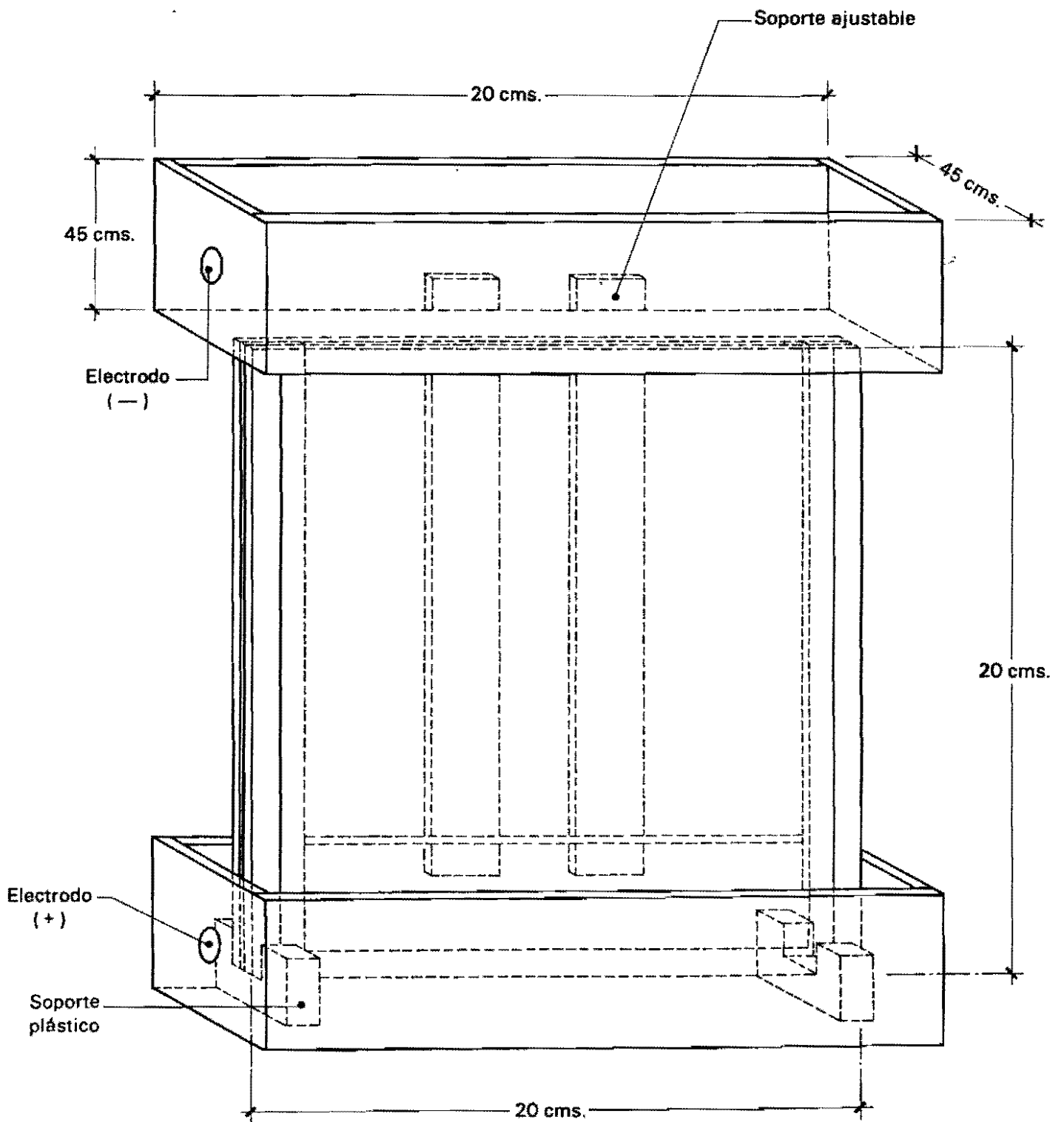


FIG. 6. Ensamblaje para electroforesis con poliacrilamida (debe ser colocada en la nevera para su enfriamiento).

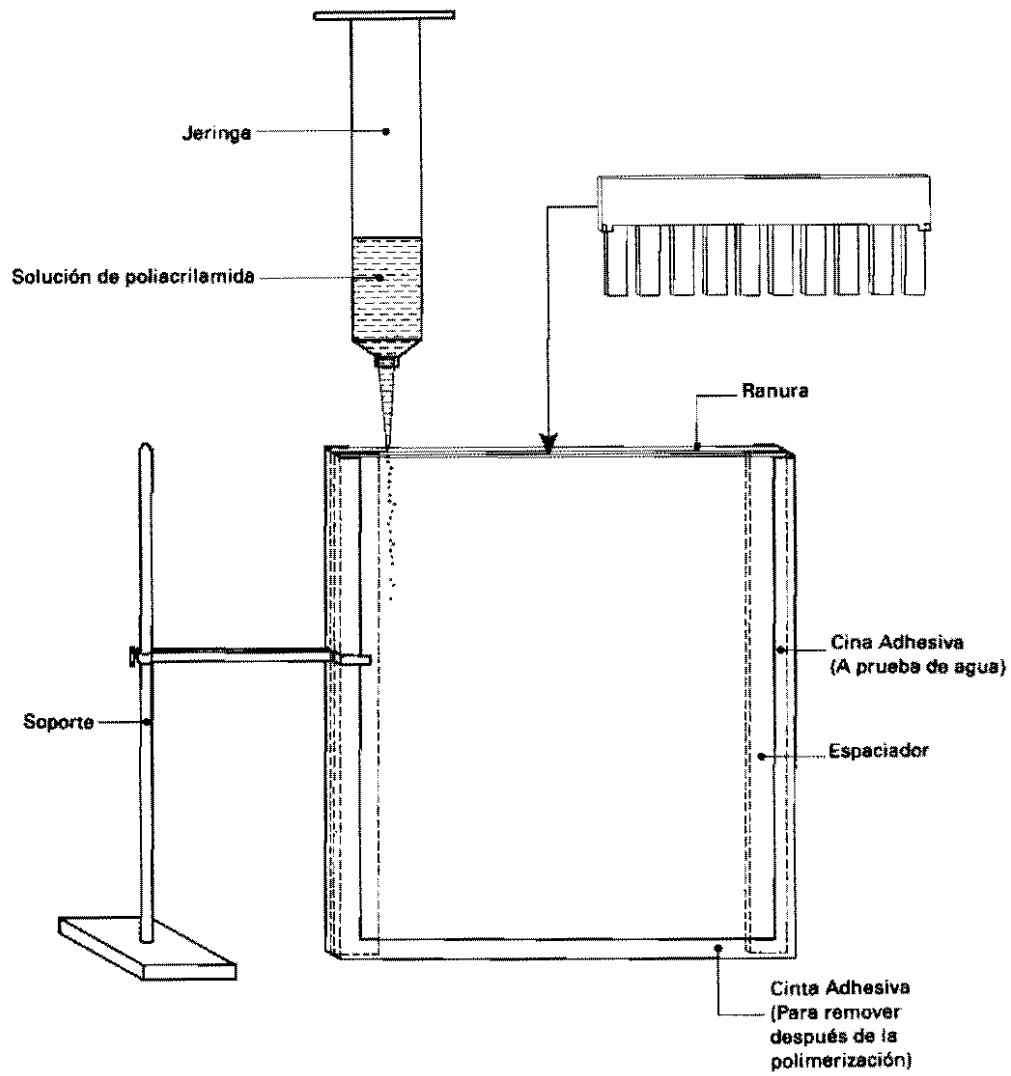
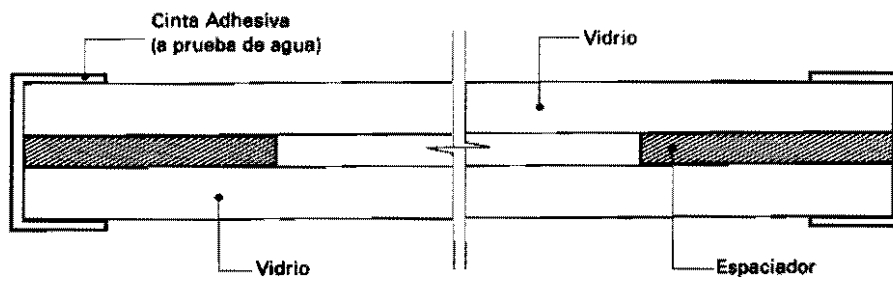
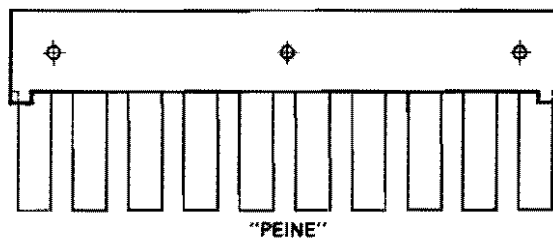
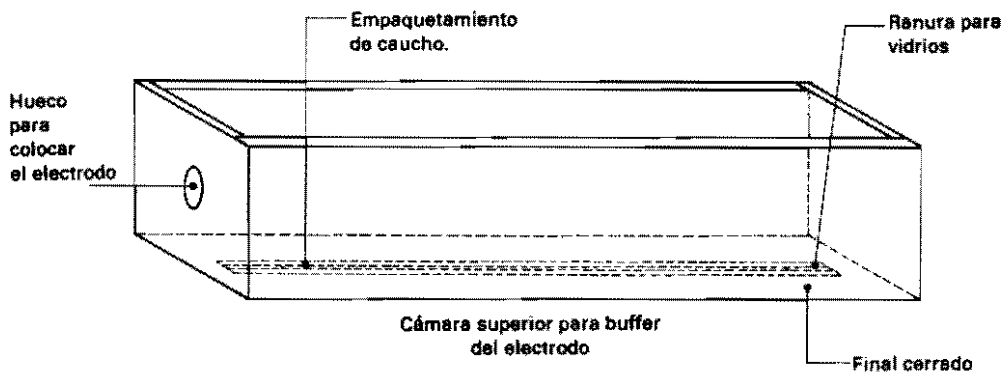


FIG. 7. Preparación del gel.



VISTA AEREA DEL CASSETTE

FIG. 8. Partes del ensamblaje (de la Fig. 6).

2. Proteínas solubles en agua (albúminas)
3. Proteínas solubles en sal (globulinas)
4. Proteínas solubles en alcohol (gliadinas)
5. Proteínas solubles en ácido acético (gluteninas)
6. Proteínas insolubles (proteínas residuales)

PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION DE PROTEINAS

1. Extracción de proteínas totales. Según la cantidad de proteína presente en una muestra particular, una cantidad razonable del material se agita o tritura con 1:10 (peso/volumen) del buffer de extracción (mezcla de 1 & 2):

- | | |
|------------------------------|--------|
| 1. Tris HCl 0.05M pH 8.3 | 1 vol. |
| 2. Buffer de tratamiento SDS | 1 vol. |

Contiene:

Tris HCl 0.5 M pH 6.8	= 12.5 ml
SDS 10%	= 20 ml
Glicerol	= 10 ml
2-mercaptoetanol	= 5 ml
H ₂ O	= 2.5 ml

La mezcla resultante se calienta en agua hirviendo, durante 3 minutos.

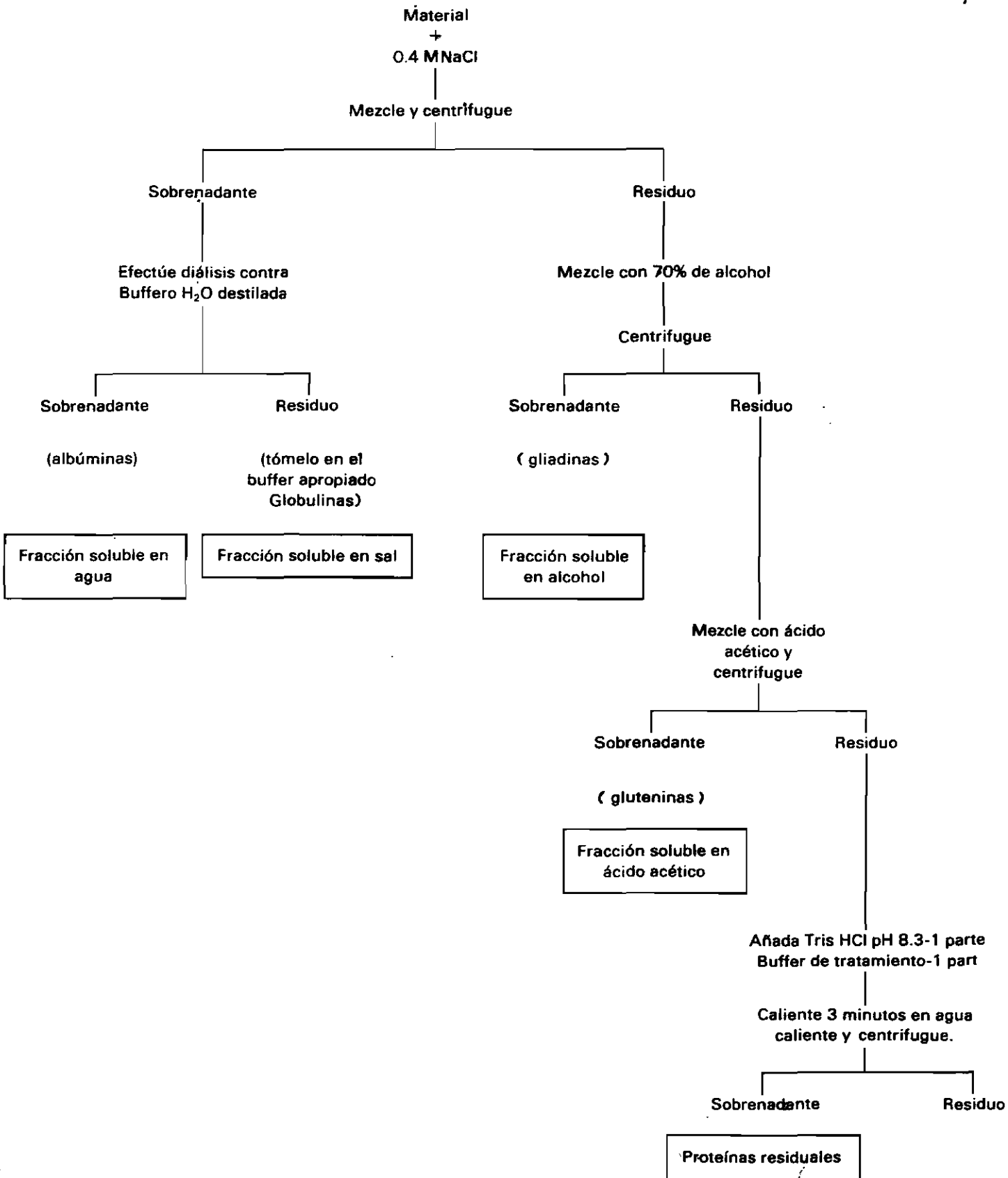
Inmediatamente se enfria la mezcla y se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcla con colorante rastreador (azul de bromofenol) y se carga en alicuotas de gel de 5 ó 10 ul.

2.3. Las proteínas solubles en agua se extraen utilizando una solución de cloruro de sodio al 0.4 M. La mezcla de la muestra y de la solución salina se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante contendrá dos fracciones: i, la soluble en agua y ii, la soluble en sal. Las dos fracciones pueden separarse mediante el dializado del extracto, durante la noche, contra agua destilada o un buffer. Generalmente, el extracto se separa en un precipitado y un líquido transparente. El extracto dializado se transvasa a un tubo de centrifugación y se separa en residuo (fracción soluble en sal) y en sobrenadante transparente (fracción soluble en agua). Estas fracciones pueden separarse mediante el uso de SDS-PAGE. (Electroforesis de gel de poliacrilamida con SDS).

4. La fracción soluble en alcohol puede extraerse colocando en un agitador "Vortex" el residuo que se obtuvo después de la etapa 3, con 70% de alcohol. También se puede obtener esta fracción directamente, agitando la muestra en alcohol (70%) y luego depurándola mediante centrifugación. Esta fracción es útil para el análisis de las proteínas de los cereales.

5. En el caso de la proteína soluble en ácido acético, se sigue el procedimiento de la fracción No. 4. Después de efectuar un lavado secuencial con una solución de cloruro de sodio y alcohol (70%), el residuo puede agitarse con 0.1 M de ácido acético para que se obtengan proteínas solubles en ácido acético.

6. Las proteínas residuales se obtienen mediante la utilización del último residuo que queda después de las 2-5 etapas. El residuo puede mezclarse con una solución 1:1 de Tris HCl con pH 8.3 y con el buffer de tratamiento descrito anteriormente. La lechada resultante se calienta en agua hirviendo, durante 3 minutos, se centrifuga y el sobrante contendrá proteínas residuales.



Procedimiento para la extracción de varias fracciones de proteínas para electroforética.

Buffers/soluciones de extracción que pueden utilizarse directamente para extraer proteínas:

1. Agua destilada
2. Etanol al 70%
3. Propanol
4. Acido acético 0.1 M
5. Acido acético 0.1 M 1% 2-mercaptoetanol
6. Buffer de acetato pH 5.8
7. Buffer de fosfato pH 6.8 - 7.3
8. Tris HCl pH 6.8 - 8.3
9. Buffer de fosfato pH 6.8 - 8.3+1% ME
10. Tris HCl pH 6.8 - 8.3+1% ME
11. Sulfato dodecil sódico 1%
12. Sulfato dodecil sódico 5%
13. Urea 8 M
14. Lactato de aluminio pH 3.1
15. Tris borato pH 8.9
16. Tris citrato pH 8.45

REMOCIÓN DE ALGUNAS PROTEÍNAS INDESEABLES

1. El material puede lavarse con agua destilada. El residuo que se separó después de la primera extracción de agua, puede volver a extraerse con un segundo volumen de agua. Este lavado con agua puede contener proteínas que son útiles para propósitos de la electroforesis.
2. Las proteínas sensibles al calor (albúminas), se pueden extraer mediante el calentamiento del extracto protéico en agua hirviendo, durante 3-4 minutos. Inmediatamente se enfría el extracto caliente y se centrifuga. El sobrenadante estará libre de proteínas termolábiles.
3. Algunas proteínas pueden precipitarse al disminuir el pH con buffers acidógenos. Las proteínas como la legúmina y la vicilina se precipitan en condiciones acidógenas. Si se requiere, las proteínas precipitadas pueden volverse a disolver en el buffer original.

4. Una columna corta de resinas de intercambio de iones puede utilizarse para atrapar ciertas proteínas y para extraer las otras.

CONCENTRACION DE PROTEINAS

Si el contenido de proteínas es bajo, las proteínas pueden precipitarse en 20% de ácido tricloroacético 1:1 (v/v). El precipitado que se obtiene después de la centrifugación puede volverse a suspender en un buffer apropiado para realizar análisis adicionales. Esta técnica puede ser útil en la extracción de proteínas de materiales frescos.

EXTRACCION DE PROTEINAS DE TEJIDOS FRESCOS

En los materiales frescos o en los tejidos congelados, las proteínas pueden extraerse con SDS/ME. Ya sea durante la extracción o inmediatamente después de ésta, añada a 100 partes del tejido o extracto, 1 o 2 partes de solución de sulfito.

(Na_2SO_3) sulfito de sodio 20 g.

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) Tiosulfato de sodio 15 g.

Disuelva en agua y ajuste el volumen a 100 ml.

Reactivos (Abreviaturas)

Tris	Tris (hidroximetilo) aminometano
SDS	Sulfato dodecil sódico
BIS	N, N, metileno - bisacrilamida
TEMED	N, N, N, N tetrametilenodiamina
TCA	Acido tricloroacético
ME	2-mercaptoetanol
BPB	Azul de Bromofenol

ELECTROFORESIS DE GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) BASICO

El procedimiento, virtualmente, es el de Laemmli (Nature 227:680, 1970).

El sistema básico puede utilizarse tanto para la electroforesis simple de gel de poliacrilamida (PAGE simple) como para la electroforesis de gel de poliacrilamida con sulfato dodecil sódico (SDS-PAGE). En cada sistema, el gel puede estar compuesto de dos partes: i. el gel concentrador que está encima del gel separador y contiene ranuras para las muestras. Generalmente, este gel tiene una menor concentración de acrilamida (3% o 4% o 5%), que depende de la concentración del gel separador. Un gel concentrador con mayor concentración (5), se recomienda para un gel separador con alta concentración (15%-16%). ii. El gel separador se encuentra debajo del gel concentrador; generalmente a 1.5 cms. alejado de la parte inferior del recipiente. Las proteínas se separan en esta parte específica del gel. Las bandas se pueden acentuar al aumentar la concentración de la acrilamida en el gel; y las bandas pueden separarse adicionalmente al reducir la concentración de la acrilamida. La calidad de la banda mejora al añadir sucrosa al gel, a un nivel de 5-10%.

La preparación del gel es similar a la descrita en la sección de las isoenzimas. Para el gel SDS el procedimiento puede ser el siguiente:

Soluciones y "Buffers"

a) Buffer de gel separador

Tris HCl 1.5 M pH 8.8

Disuelva 18.15 grms. de Tris en agua destilada y ajuste el pH a 8.8 con 6N HCl. Lleve el volumen a 100 ml y ajuste nuevamente el pH a 8.8 con 6N HCl.

b) Solución de acrilamida

Poliacrilamida con pureza de 99.9% 22.2 grms.

BIS 0.6 grms.

Disuelva en suficiente agua destilada y filtre. Ajuste el volumen del filtrado a 100 ml, utilice agua destilada para este propósito.

c) Buffer de gel concentrador (Opcional)

Tris 0.5 M pH 6.8

Disuelva 6.0 grms. de Tris en agua destilada y ajuste el pH a 6.8 utilizando 6N HCl. Posteriormente lleve el volumen a 100 ml y vuelva a ajustar el pH a 6.8 con 6N HCl.

d) Solución de persulfato de amonio (10%)

La solución debe prepararse justo antes de su utilización para que esté fresca. Disuelva 0.5 grms. de persulfato de amonio en 5 ml de agua destilada.

e) TEMED

Esta solución se añade a la mezcla del gel, en forma no diluída.

f) SDS 10%, disuelva 10 grms. de sulfato dodecil sódico en agua y ajuste el volumen final a 100 ml.

g) Buffer de electrodo

(0.025 M Tris, 0.192 M glicina (pH 8.3), (0.1 SDS).

Disuelva 3.03 grms. de Tris, 14.42 grms. de glicina y 1.0 grms. de SDS en agua. Ajuste el pH a 8.3 con Tris o glicina y lleve el volumen final a 1 litro. Para una sola corrida puede ser necesario utilizar 4 L. de buffer. Si es posible, las soluciones se cambiarán cada 2-3 corridas.

h) Solución de coloración (0.25% de Azul de Coomassie)

Disuelva 2.5 grms. de Azul de Coomassie en 1 litro de la siguiente solución:

Metanol 5 partes

Agua 5 partes

Acido acético 1 parte

y filtro con papel Whatmann No. 1.

i) Solución de descoloración

Metanol: ácido acético: agua (6:1:1.3)

Mezcle 300 ml de metanol, 50 ml de ácido acético y 650 ml de agua.

Preparación del Gel

Limpie las cajas de vidrio con la mezcla de alcohol: acetona (1:1 v/v) y arme el casete del gel según las instrucciones que suministra el fabricante. Si es muy costoso comprar las unidades comerciales, en la sección de las isoenzimas se describe una unidad fácil de ensamblar. Mezcle en un frasco al vacío los reactivos en la siguiente secuencia y cantidades.

Ingredientes	Diferentes concentraciones del Gel			
	10%	12%	14%	15%
Agua	29	20	11	6.5
Buffer de gel separador (a)	25	25	25	25
Solución de acrilamida (b)	45	54	63	67.5
Desgasifique				
Solución SDS (f)	1	1	1	1
Persulfato de amonio (d)	1	1	1	1
TEMED (2)	30 ul	28 ul	27 ul	26 ul

Después de desgasificar la solución y de mezclar bien el resto de los ingredientes, transvase la solución del gel mediante el uso de una pipeta de bulbo o de una jeringa sin pistón. Deje espacio en la parte superior para el gel concentrador. Después de verter la mezcla, coloque con cuidado una capa de 1-2 ml de agua destilada encima de la solución del gel. Asegúrese de evitar la mezcla del agua y la solución del gel. El gel deberá polimerizarse dentro de un período de 10-20 minutos; si se polimeriza antes, reduzca la cantidad del TEMED; si se polimeriza después, aumente la concentración del TEMED. Después de que ocurra la polimerización del gel, retire el exceso de agua por medio del drenado de las cajas y seque las superficies de vidrio con papel filtro. Ahora ya está listo el gel separador para el gel concentrador.

Prepare el gel concentrador mezclando los siguientes productos:

Agua	18.2 ml
Buffer del gel concentrador	7.5 ml
Solución de acrilamida	4.0 ml
Desgasifique	
Solución SDS	0.3 ml
Persulfato de amonio	0.3 ml
TEMED	15 ml

Inserte el aparato formador de ranuras (peine) entre las cajas de vidrio y vierta la mezcla anterior. Después de lograr la polimerización del gel, retire el peine y lave los recipientes con la solución buffer apropiada, utilizando una jeringa. Coloque el gel en el aparato. Vierta los buffers en las cámaras superior e inferior de la unidad de electroforesis.

Electroforesis

Vierta las muestras en las ranuras (alvéolos), a través del buffer cuidadosamente y aplique el siguiente voltaje:

- 50 voltios - 15 minutos
- 100 voltios - 30 minutos
- 150 voltios - 30 minutos
- 200 voltios - 30 minutos
- 250 voltios - en paralelo

La temperatura deberá ser moderada dependiendo de la metodología.

Para el gel SDS, se recomienda una temperatura de 15°C. Después que el frente haya llegado a la base del gel, se retira el casete y se separan las cajas de vidrio. En la esquina se hace un corte para indicar la posición de la primera muestra.

Coloración

Transvase el gel a una caja llana de plástico, un poco más grande que el gel. Vierta una cantidad suficiente de la solución colorante (h) y coloque la bandeja en un agitador mecánico (tipo orbital). Deje que el gel se colore

durante la noche. Luego, remueva el exceso de colorante utilizando la solución de descolorización (i). Descolore hasta que el fondo sea transparente.

Fotografía

En este momento se puede fotografiar el gel, colocando una luz desde la parte inferior. Después de la fotografía, los gels se pueden secar o conservar en bolsas de plástico selladas.

Coloración de Plata para Proteínas (Se utiliza con los gels SDS)

Reactivos:

- I. Fijador
12.5% de ácido tricloroacético y 7.5% de ácido sulfosalicílico
- II. Solución de limpieza
Mezcle 10% de etanol con 5% de ácido acético 1:1 (v/v) para que la concentración final de etanol en esta solución, sea de 5% y de 2.5% para el ácido acético.
- III. Oxidante
Disuelva 1.0 grms. de dicromato de potasio en agua, añada 0.2 ml de ácido nítrico concentrado y lleve el volumen final a 1 litro.
- IV. Solución de nitrato de plata
Disuelva 1.02 grms. de nitrato de plata en 500 ml de agua destilada.
- V. Revelador
Disuelva 14.8 grms. de carbonato de sodio en 500 ml de agua. Añada 0.25 de la fórmula comercial justo antes de su utilización.
- VI. Solución de finalización
1% de ácido acético.

Procedimiento:

- i. Fije el gel en la solución I durante 20 minutos. Se prefiere utilizar 30 minutos, 2 veces, con fijador fresco. Si es necesario, el gel puede permanecer en esta solución durante 3 días.
- ii. Drene la solución I y lave el gel 3 veces, en la solución de lavado (II). Cada lavado deberá durar alrededor de 20 minutos.
- iii. Remoje el gel en el oxidante (III) durante 10 minutos.
- iv. Lave el gel en agua desionizada durante 10 minutos, de 2-3 veces.
- v. Remoje en solución de nitrato de plata (IV) durante 15 minutos, en la caja de iluminación y luego 15 minutos sin luz.
- vi. Enjuague rápidamente en agua desionizada durante 2 minutos. Repita el procedimiento para otro lavado que no deberá durar más de 2 minutos.
- vii. Enjuague rápidamente con 100 ml del revelador (V), descártelo y añada un volumen fresco del revelador. Revele el gel en la caja de iluminación hasta que se alcance la intensidad deseada.
- viii. Pare la reacción desechando el revelador y añadiendo 100 ml de la solución de finalización (VI), durante 5 minutos.
- ix. Lave con agua destilada hasta que obtenga un fondo adecuado.

Observaciones:

- a. El enjuague con agua en el paso iv deberá darle un gel transparente. Si el gel todavía permanece amarillo, repita el lavado.
- b. Utilice guantes porque si maneja el gel sin guantes puede dejar huellas que no desaparecerán.
- c. El oxidante debe estar a temperatura ambiente.
- d. Se prefiere utilizar la agitación continua del gel.
- e. El método depende de la caja de iluminación. Esta caja deberá tener suficiente luz blanca.

ELECTROFORESIS DE GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) ACIDO.

Este es otro sistema en el que el medio de soporte y los buffers son acidógenos. La posición de los electrodos en este sistema es a la inversa de la básica, es decir los positivos están cerca al origen y los negativos en la base. Los componentes protéicos se desplazan según su peso molecular y la carga eléctrica.

Reactivos

1. Solución de extracción

Diferentes soluciones de extracción pueden utilizarse para extraer las proteínas. Estas soluciones de extracción aparecen en una lista anterior, bajo el título "Buffers/Soluciones de Extracción". Las soluciones recomendadas para la PAGE ácido son: 1,2,3,4,5,6 y 14.

2. Colorante de extracto de dilución

La solución buffer (4) que contiene 40% de sucrosa y 0.5% de verde de metilo.

3. Solución buffer

Lactato de aluminio pH 3.1

Disuelva 2.5 grms de lactato de aluminio, (Fluka Chemical Corporation 25 Oser Ave., Hanppange, N.Y. 11787, U.S.A), en unos 950 ml de agua destilada. Ajuste el pH a 3.1 con ácido láctico (concentración normal) y enrase a 1 Lt. con agua desionizada.

4. Solución de gel

Si se requiere una concentración del 10%, disuelva 10 grms. de poliacrilamida, 0.5 grms. de N, N, metileno-bis-acrilamida, 0.1% de ácido L-ascórbico y 0.0015% de heptahidrato de sulfato ferroso. La solución deberá prepararse fresca antes de su utilización.

5. Solución catalizadora

Solución al 3% de peróxido de hidrógeno.

6. Solución de colorante azul

Disuelva 1 grm. de azul brillante de Coomassie R-250 en etanol acuoso al 95%.

7. Colorante de gel

Disuelva 8 ml de la solución (6) en 200 ml de solución de descoloración (No. 8). La solución deberá estar recién preparada y luego deberá filtrarse.

8. Solución de descoloración

Acido tricloroacético acuoso al 12% (TCA).

Instrumentos

Aparatos especialmente diseñados se requieren para la preparación del gel ya que la polimerización en este sistema es muy rápida (1-2 minutos). Las unidades disponibles en el comercio pueden no ser las adecuadas para este tipo de gel. Los detalles de este aparato aparecen esbozados en el diagrama 1. (Bushuk, W., y Zillman R.R. 1975).

Preparación de las muestras

Las muestras se extraen mediante el uso de uno de los buffers descritos anteriormente. Las muestras pueden incubarse a 37-38° C durante un mínimo de 2 horas. La lechada se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante transparente se mezcla, en una proporción 1:1 (v/v), con el colorante de extracto de dilución (sol. 2) antes de verterlo en las ranuras (alvéolos).

Preparación del gel

Antes de la preparación del gel es necesario hacer todas las conexiones para la circulación de agua de la base de la cámara de enfriamiento hasta la parte superior. Para la polimerización del gel se añade 0.5 ml del catalizador (solución No. 5), a 100 ml de la solución del gel (solución No. 4). Generalmente, se enfría la solución del gel a 4° C, antes de su utilización. El contenido se agita cuidadosamente y se vierte rápidamente a la cámara inferior del

buffer. El aparato que se mantiene en posición vertical o en un ángulo de 45°, se baja cuidadosamente a la posición horizontal. El aparato formador de ranuras deberá haberse insertado antes de verter la solución de gel.

Cuando se ha terminado la polimerización, se extrae cuidadosamente el aparato formador de ranuras. Los electrodos se insertan en su posición: el rojo (positivo) en la parte superior y el negro (negativo) en la parte superior. Las cámaras superior e inferior se llenan con el buffer (solución No 3).

Aplicación de las Muestras

Las 11 muestras que se prepararon según lo descrito, se vierten en los alvéolos en alicuotas de 5-10 ul, dependiendo de la concentración de las proteínas en el extracto. Después de aplicar las muestras, se conectan los electrodos a los terminales del suministro eléctrico y se enciende la corriente. Los diferentes extractos requieren diferentes ajustes de la corriente, que tienen que determinarse individualmente. Por ejemplo, se requiere una corriente de 40Am para las muestras de trigo, de 30 mA para las muestras de frijol y de 15mA para las muestras de leguminosas de pasturas.

Al terminar el procedimiento, se apaga el suministro de energía, se desconectan los electrodos, se desconecta el suministro de agua y se separan las dos partes del aparato. El gel que se encuentra entre las dos partes del aparato, se pasa a una bandeja llana de plástico y se añade 200 ml de la solución colorante (No. 7).

Durante la noche, se deja que el gel flote en el colorante y luego se descolora con una solución al 12% de TCA hasta que el fondo esté relativamente transparente.

Fotografía y Almacenamiento

Las fotografías se toman de la manera usual, aplicando iluminación desde la parte inferior. Si se requiere, los gels se almacenan en bolsas de plástico selladas.

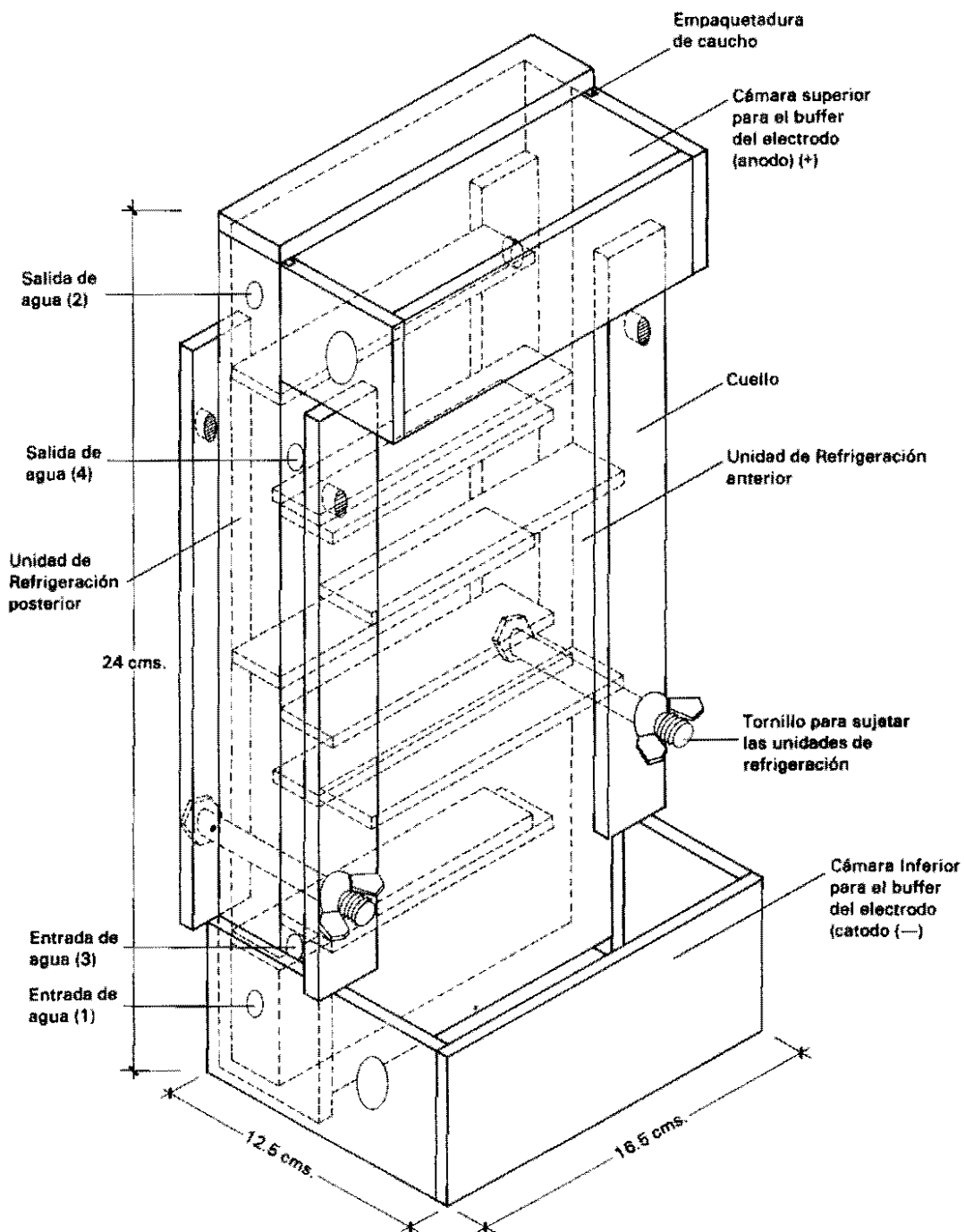


FIG. 9 Aparato Vertical para el sistema de Electroforesis de poliacrilamida ácida (después de Bushuk y Zillman).

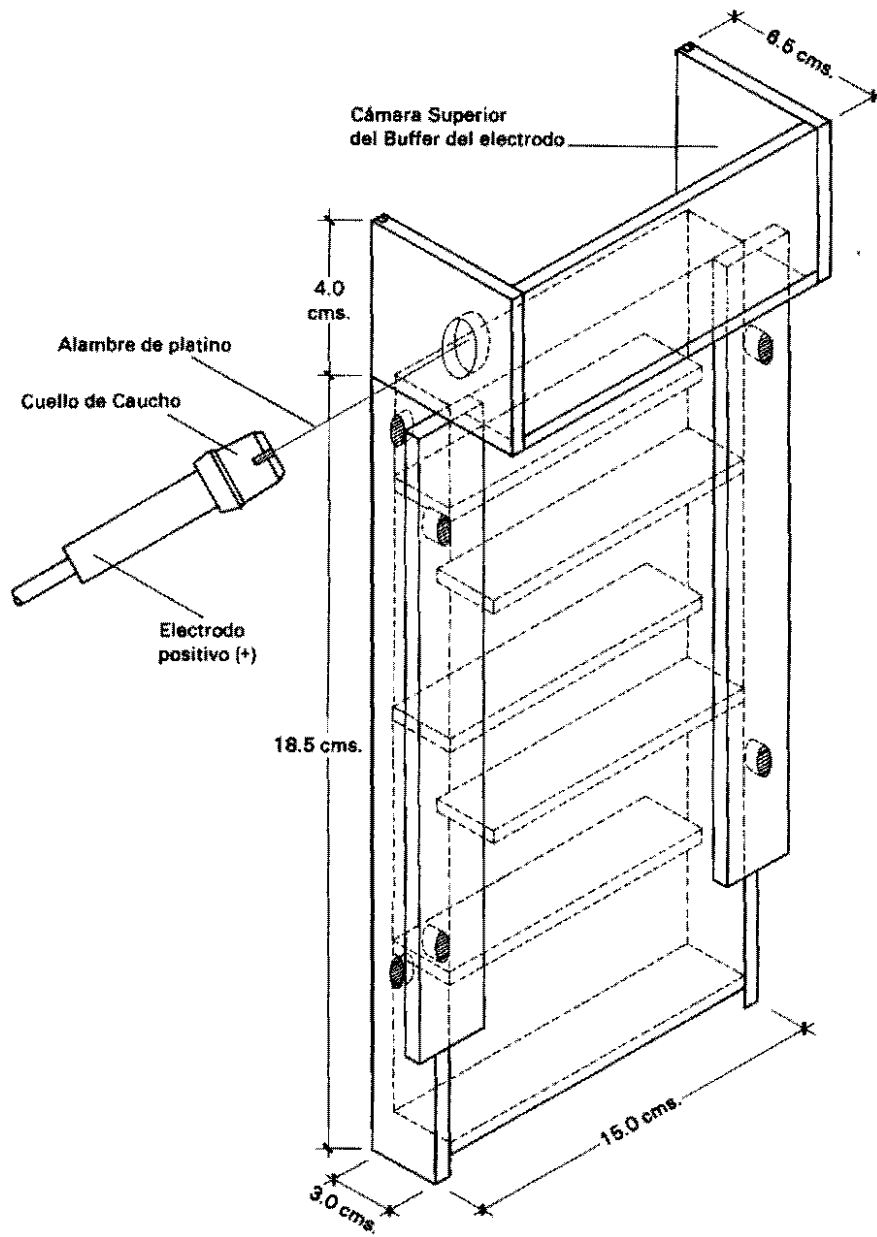


FIG. 10. Unidad de Refrigeración anterior para PAGE acida.

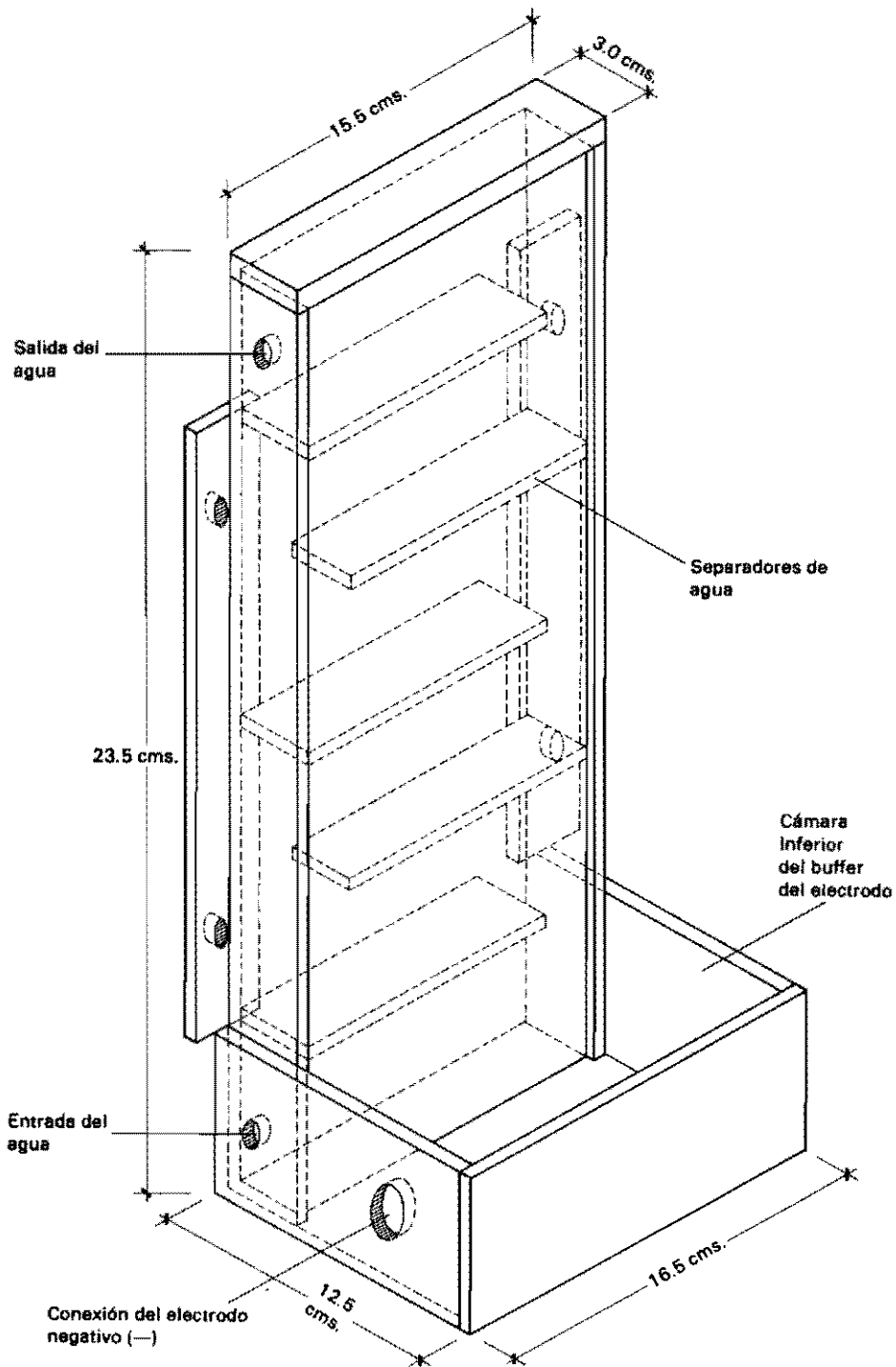


FIG. 11. Unidad de Refrigeración Posterior para PAGE acida.

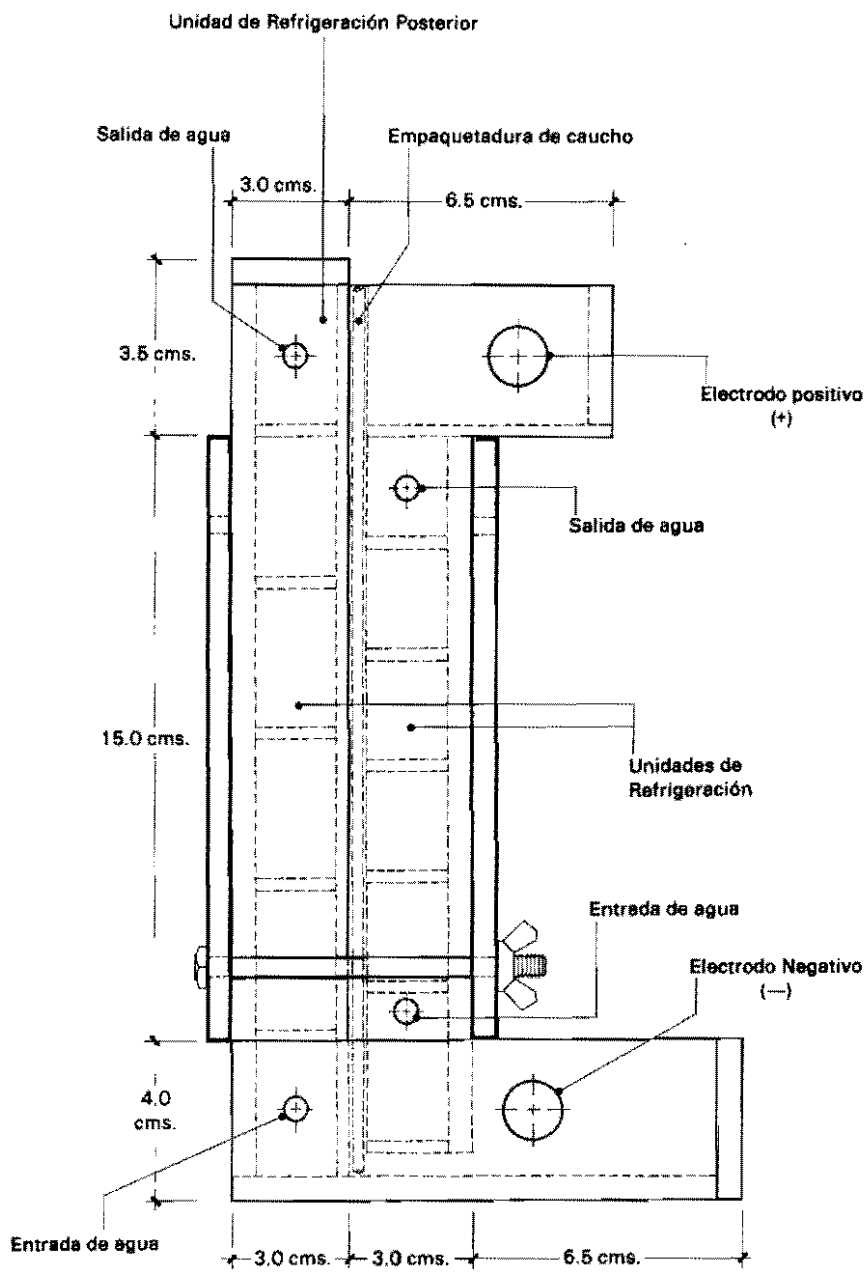


FIG. 12. Vista lateral del aparato vertical para el sistema de poliacrilamida ácida.

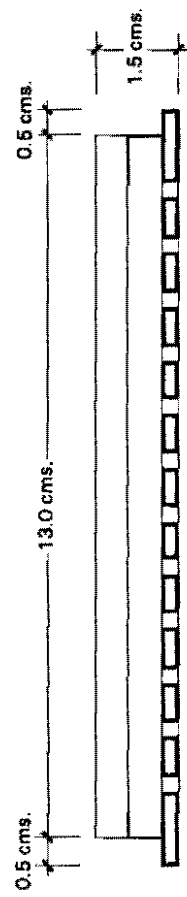
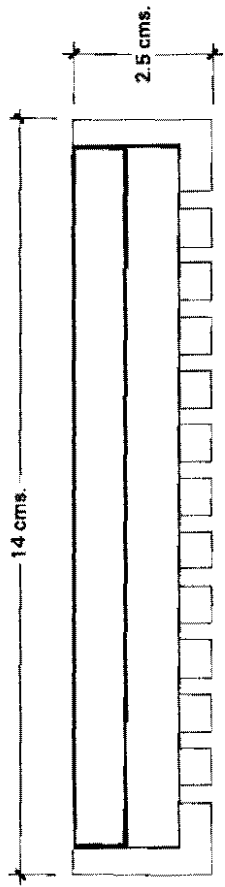


FIG. 13. "PEINE" para formar ranuras en el gel.

Equipo

Las figuras 9 á 13 presentan las técnicas para el ensamblaje del aparato vertical para PAGE ácida y las unidades de refrigeración.

La electroforesis de proteínas tiene la ventaja de que es más sencilla, en comparación con los estudios isoenzimáticos que se caracterizan por la utilización de varios sistemas de buffers y un número de colorantes. Además, las bandas protéicas, a diferencia de las isoenzimáticas pueden no estar influenciadas por los aparatos utilizados en los procedimientos de extracción y por el estado fisiológico de los materiales.

EVALUACION DE LOS PATRONES ELECTROFORETICOS

Hay por lo menos dos formas para evaluar los patrones obtenidos después de procesar muestras por medio de la electroforesis.

1. Comparación con muestras de identidad conocida

A la distancia desde el origen (filo interior de la ranura de la muestra) hasta la parte media de la banda de referencia (más o menos se ubica en la mitad del gel) se le asigna arbitrariamente una movilidad relativa de 50. Esta distancia debe ser la misma (+ 1 mm) en cada uno de los electroforegramas de referencia. Las muestras de referencia se corren usualmente a los lados (izquierdo y derecho) de las muestras desconocidas. Las muestras de referencia se seleccionan después de examinar un número grande de electroforegramas. En cada electroforegrama, la distancia desde el origen al centro de la banda es la distancia de migración de esa banda en particular. La distancia de migración de una banda específica (DMX) dividida por la distancia de migración de la banda de referencia (DMR) en el mismo gel, y multiplicada por 50 resulta en la movilidad relativa (MR) de la banda (Fig. 14).

$$MR = \frac{DMX}{DMR} \times 50$$

De esta manera, las movilidades relativas de todas las bandas en cada patrón

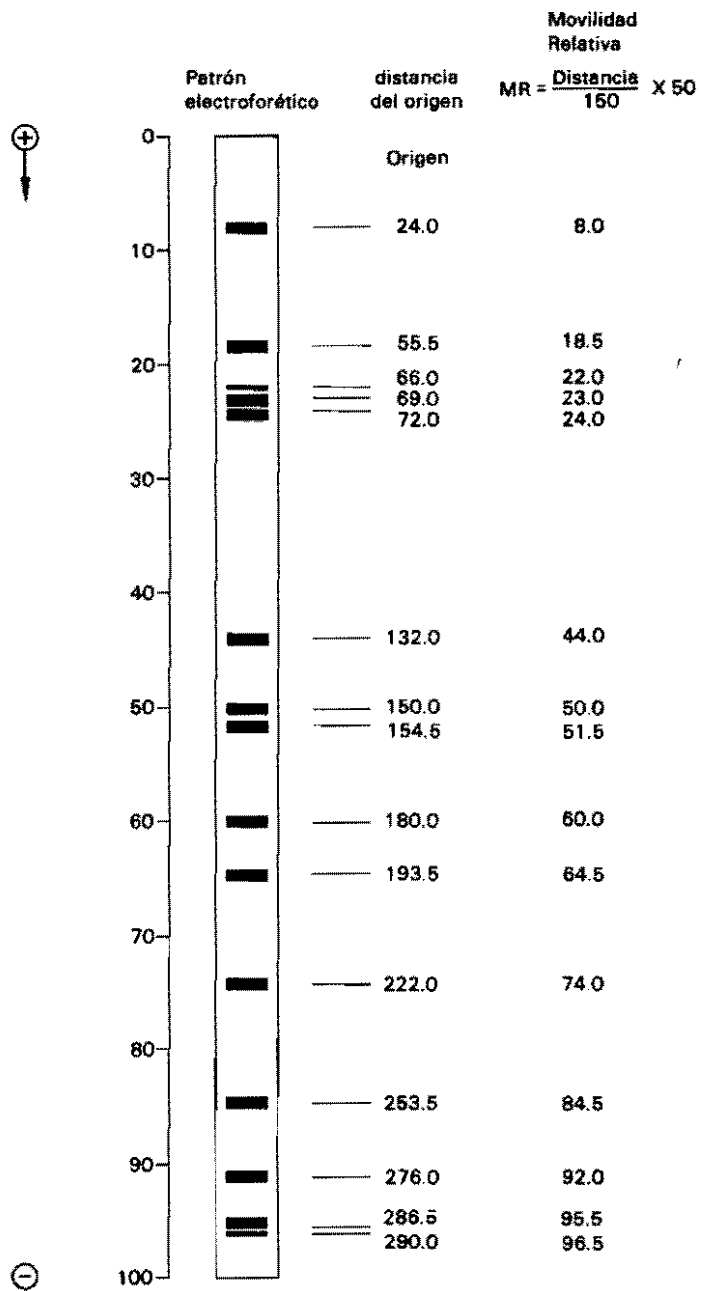


FIG. 14. Evaluación de los patrones Electroforéticos.

electroforético son calculadas y registradas.

2. Medición de la intensidad de las bandas

La intensidad de las bandas puede también ser registrada al lado de su movilidad relativa. Este registro puede depender en la observación visual o puede usarse un densitómetro para determinar la intensidad relativa de las bandas. Si la intensidad se va a registrar visualmente, puede usarse una escala de 1-5 para representar el rango de intensidades, siendo 5 las bandas más intensamente coloreadas y 1 las bandas menos intensas. Se puede hacer una "referencia de intensidades" usando las diferentes bandas obtenidas de fotografías tomadas a electroforegramas.

La información sobre movilidad relativa e intensidad puede ser computarizada. Las muestras desconocidas pueden ser comparadas automáticamente con la información que ya está almacenada en forma computarizada.

P R E C A U C I O N E S

La mayorías de los reactivos son cancerógenos. La poliacrilamida es un neurotóxico. Las personas que usan estos productos deben evitar el contacto colocándose guantes y máscaras para su protección.

AGRADECIMIENTOS

Este manual fué elaborado durante el proyecto apoyado por el CIID. Los autores agradecen su financiación con la cual fué posible la publicación de este folleto.

Igualmente, damos nuestros agradecimientos al Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, por permitir la realización de esta publicación. A la Sra. Luz Amparo Cartagena, por su trabajo mecanográfico.

REFERENCIAS SELECCIONADAS

Almgard, G. & Clapham, D.

1975 Isoenzyme variation distinguishing 18 Avena cultivars grown in Sweden. Swed. J. Agric. Res., 5: 61-67.

Almgard, G & Landegren, V.

1974 Isoenzymatic variation used for the identification of barley cultivars. Z. Pflzücht., 72: 63-73.

Bassiri, A.

1976 Barley cultivar identification by means of isoenzyme electrophoretic patterns. Can. J. Pl. Sci., 56:1-6.

Bassiri, A.

1977 Identification and polymorphism of cultivars and wild ecotypes of safflower based on isoenzyme patterns. Euphytica, 26: 709-719.

Bassiri, A. & Adams, M.W.

1978 Evaluation of common bean cultivar relationships by means of isoenzyme electrophoretic patterns. Euphytica, 27: 707-720.

Bassiri, A & Rouhani, I.

1977 Identification of broad bean cultivars based on isoenzyme patterns. Euphytica 26: 279-286.

Bhatia, C.R., Buiatti, M & Smith, H.H.

1967 Electrophoretic variation in proteins and enzymes of the tumor-forming hybrid Nicotiana glauca x N. langsdorfii and its parent species. Am. J. Bot., 54: 1237-1241.

Bhatia, C.R. & Nilson, J.P.

1969 Isoenzyme changes accompanying germination of wheat seeds. Biochem. Genet., 3: 207-214.

Bonner, J.W., Warner, R.M. & Brewbaker, J.L.

1974 A chemosystematic study of Musa cultivars. HortScience, 9: 325-328.

Brewbaker, J.L.

1966 Enzyme fingerprints for the plant detective. Hawaiian Bot. Soc. Newsletter, V (1): 1-3.

Broue, P. Douglass, J., Grace, J.P. & Marshall, D.R.

1982 Interspecific hybridisation of soybeans and perennial Glycine species indigenous to Australia via embryo culture. Euphytica, 31: 715-724.

Buschbeck, R.

1982 Discrimination among rye varieties and species on the basis of the multiple forms of esterases and buffer-soluble proteins in their caryopsis. Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch. Wiss. DDR Berlin, 198: 91-101.

Bushuk, W. and Zillman, R.R.R.

1978 Wheat cultivar identification. I. Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant Sci. 58: 505-515.

Cardy, B.J. & Kannenberg, L.W.

1982 Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: Applications for cultivar identification. Crop Sci., 22: 1016-1020.

Cardy, B.J., Stuber, C.W. & Goodman, M.M.

1980 Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.). Institute of Statistics Mimeograph Series. No. 1317, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 31 p.

Cherry, J.P., Katterman, F.R.H. & Endrizzi, J.E.

1970 Comparative studies of seed proteins of species of Gossypium by gel electrophoresis. Evolution, 24: 431-447.

Cherry, J.P., Katterman, F.R.H. & Endrizzi, J.E.

1972 Seed esterases, leucine aminopeptidases and catalases of species of the genus Gossypium. Theor. Appl. Genet., 42: 218-226.

Cooke, R.J.

1984 The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. Electrophoresis, 5: 59-72.

Derbyshire, E., Wright, D.J. & Boulter, D.

1976 Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds.
Phytochemistry. 15: 3-24.

Esquinas, J.T.

1977 Alloenzyme variation and relationships in the genus Cucumis.
Dissertation for Ph.D., University of California, Davis.

Fadeeva, T.S., Lutova, L.A. & Agoeva, L.A.

1976 Intrapopulation variation of the peroxide isoenzyme spectrum in
varieties and inbred of radish. Sov. Genet., 11: 1367-1372.

Fedak, G.

1974 Allozymes as aids to Canadian barley cultivar identification.
Euphytica, 23: 166-173.

Fedak, G. & Rajhathy, T.

1972 Esterase isoenzymes in Canadian barley cultivars. Can. J.
Pl. Sci. 52: 507-516.

Frankel, T.N. & Garber, E.D.

1965 Esterases in extracts from germinating seeds of 12 pea varieties.
Bot. Gaz. 126: 221-222.

Gates, P. & Boulter, D.

1979b The use of seed isoenzymes as an aid to the breeding of field beans
(Vicia faba L.). New Phytol., 83: 783-791.

Goodman, M.M. & Stuber, C.W.

1980 Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme
electrophoresis. Ann. Corn and Sorghum Ind. Res. Conf. Proc., 35:
10-31.

Gottlieb, L.D.

1971 Gel electrophoresis: A new approach to the study of evolution.
BioScience, 21: 938-944.

Gottlieb, L.D.

1973a Enzyme differentiation and phylogeny in Clarkia franciscana, C.
rubicunda and C. amoena. Evolution. 27: 205-214.

Gottschalk, W. & Muller, H.P.

1974 Quantitative and qualitative investigations on the seed proteins of mutants and recombinants of Pisum sativum.
Theor. Appl. Genet., 45: 7-20.

Griffin, W.B.

1976 Genetic variability in some New Zealand grown varieties of barley and rye. Mauri Ora, 4: 93-100.

Hart, G.E. & Bhatia, C.R.

1967 Acrylamide gel electrophoresis of soluble leaf proteins and enzymes from Nicotiana species. Can. J. Genet. Cytol., 9: 367-374.

Hayward, J.L. & McAdam, N.J.

1977 Isoenzyme polymorphism as a measure of distinctiveness and satiability in cultivars of Lolium perenne. Z. Pflzücht., 79: 59-68.

Hirano, H.

1977 Varietal affinities in mulberry (Morus spp.) assessed by peroxidase isozymes. Jap. J. Breed., 27: 350-358.

Holden, J.H.W. & Williams, J.T. (Eds.)

1984 Crop genetic resources: Conservation and Evaluation. London, George Allen & Unwin, 296 p.

Hussain, A., Bushuk, W., Ramirez, H., and Roca, W.M.

1986b Identification of Cassava (Manihot esculenta Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. Seed Sci. Technol. (accepted, 02-04-86).

Hussain, A., Bushuk W., Ramirez, H., and Roca, W.M.

1986a Field bean (Phaseolus vulgaris L.). Cultivar identification by electrophoregrams of cotyledons storage proteins. Euphytica 35: (accepted).

Hussain, A., Bushuk, W., Ramirez, H., and Roca W.M.

1987a Identification of cultivars of the forage legume Desmodium ovalifolium Guill et Perr. by their electrophoretic patterns. Can. J. Pl. Sci. (in Press).

Hussain, A., Bushuk, W., Ramirez, H., and Roca W.M.

1987b Identification of cultivars of pasture legumes (Centrosema macrocarpum, C. pubescens and C. sp.n) by acid gel electrophoresis of cotyledon storage proteins. *Euphytica* (in Press).

Ladizinsky, G. & Hamel, A.

1975 Seed protein electrophoresis of the wild and cultivated species of section Faba of Vicia. *Euphytica*, 24: 785-788.

Larsen, A.L.

1967 Electrophoretic differences in seed protein among varieties of soybean, Glycine max Merrill. *Crops Sci.*, 7: 311-313.

Loy, J.B.

1972 A comparison of stem peroxidases in bush and vine forms of squash (Cucurbita maxima Duch. and C. pepo). *J. Exp. Bot.*, 23: 450-457.

Markert, C.L. (Ed.)

1975 Isozymes: Proceedings of the 3rd international conference, Yale University, 1974. Volumes I-IV, New York, Academic Press.

Markert, C.L. & Muller, F.

1959 Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 45: 753-763.

Markert, C.L. & Whitt, G.S.

1968 Molecular varieties of isozymes. *Experientia*. 24: 977-991.

McCown, B.H., Beck, G.E. & Hall, T.C.

1969 The hardening response of 3 clones of Dianthus and the corresponding complement of peroxidase enzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94: 691-693.

Mejía, L. and McDaniel, R.G.

1986 Electrophoretic characterization of lettuce cultivars *HortScience* 21: 278-280.

Newton, K.J. & Schwartz, D.

1982 Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozymes in maize. *Genetics*, 95: 425-442.

Nielsen, G.

- 1980 Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (Lolium spp.) segregating for four alleles in a PGI- enzyme locus. Hereditas, 92: 49-52.

Przybylska, J., Blixt, S. & Hurich, J.

- 1983 Comparative study of seed protein in the genus Pisum. IV. Electrophoretic analysis of variation in the legumin fraction composition. Genet. Pol., 24: 21-39.

Przybylska, J., Blixt, S., Parzysz, H. & Zimniak-Przybylska, Z.

- 1982 Isozyme variation in the genus Pisum. 1. Electrophoretic patterns of several enzyme systems. Genet. Pol., 23: 103-121.

Przybylska, J., Zimniak-Przybylska, Z. & Dabrowska, T.

- 1973 Isoenzyme patterns in several cultivated varieties of barley (Hordeum vulgare L.) Genet. Pol., 14: 61-68.

Quiros, C.F.

- 1980 Identification of alfalfa plant by enzyme electrophoresis. Crop Sci., 20: 262-264.

Quiros, C.F. & Kerby, K.

- 1982 Determination by allozymes of natural cross-pollination and hybridization in alfalfa. Z. Pflzücht., 89: 177-186.

Racusen, D. & Foote, M.

- 1966 Peroxidase isozymes in bean leaves by preparative disc electrophoresis. Can. J. Bot., 44: 1633-1638.

Ramirez, H., Hussain, A., Roca, W.M., & Bushuk, W.

- 1986 Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of Cassava (Manihot esculenta Crantz.) varieties. Accepted Euphytica.

Robinson, P.J. and Megarrity, R.J.

- 1975 Characterization of Stylosanthes introductions by using seed protein patterns. Aust. J. Agric. Res. 26: 467-479.

Sapirstein, H.D. and Bushuk, W. 1

1985 Computer aided analysis of relative mobility determination by using three reference hand standardization Cereal Chem. 62: 372-377.

Schmidt-Stohn, G. & Wehling, P.

1983 Genetic control of esterase isoenzymes in rye (Secale cereale L.). Theor. Appl. Genet., 64: 109-115.

Shaw, C.R.

1965 Electrophoretic variations in enzymes. Science. 149: 936-943.

Shaw, C.R.

1969 Isoenzymes: Classification, frequency and significance. Int. Rev. Cytol., 25: 297-332.

Shaw, C.R. & Prasad, R.

1970 Starch gel electrophoresis of enzymes- A compilation of recipes. Biochem. Genet., 4: 297-320.

Sheen, S.J.

1970 Peroxidases in the genus Nicotiana. Theor. Appl. Genet., 40: 18-25.

Simpson, M.J.A., and Withers L.A. (Eds.)

1986 Characterization of Plant Genetic resources using isozyme electrophoresis. A guide to the literature. IBPGR, Rome 102 pp.

Singh, R.S., Jain, S.K. & Qualset, C.O.

1973 Protein electrophoresis as an aid to oat variety identification. Euphytica, 22: 98-105.

Smith, R.L.

1973 The use of isoenzyme "fingerprints" to identify digitgrass varieties. Soil Crop Sci. Proc., 32: 6-9.

Stuber, C.W. & Goodman, M.M.

1981 Compilation of isoenzyme genotypes for 342 inbred lines. Maize Genet. Coop. News Lett., 55: 126.

Stuber, C.W. & Goodman, M.M.

1982 Isozyme (allozyme) genotypes for 406 publicly available inbred lines.
Maize Genet. Coop. News Lett., 56: 127-132.

Tanksley, S.D. & Orton, T.J. (Eds.)

1983 Isozymes in plant genetics and breeding. Parts A and B, Amsterdam,
Elsevier.

Tanksley, S.D. & Rick, C.M.

1980a Genetics of esterases in species of Lycopersicon. Theor. Appl. Gent.
56: 206-219.

Weeden, N.F.

1983 Variation at isozyme loci in Phaseolus vulgaris. Ann. Rep. Bean
Imp. Coop. 26: 102-103.

Weeden, N.F. & Gottlieb, L.D.

1980 Distinguishing allozymes and isozymes of phosphoglucoisomerases
by electrophoretic comparisons of pollen and somatic tissues. Biochem.
Genet., 17: 287-296.

Werner, D.J. & Sink, K.C.

1977 Identification of poinsettia cultivars by electrophoretic analysis
of proteins and peroxidases. J. Hered., 68: 35-40.

Wrigley C.W., Autran J.C. and Bushuk, W.

1982 Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of grain
proteins.

Advances in cereal Science and Technology, 5: 211-259.

Y. Pomeraz (ed.) Amer. Assoc. Cereal Chem. Inc. St. Paul MN.

A P E N D I C E

Materiales y Equipo de Laboratorio más importante para Electroforesis

Tratamiento de la Muestra:

Papel lija
Bisturí o cuchilla de afeitar
Cajas de petri
Papel de filtro Whatman No. 1
Papel de germinación (Kimpak)
Incubadora para germinación.

Homogenización de Muestras:

Morteros de porcelana
Homogenizador
Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml.
Centrífuga refrigerada
Tubos Pirex de 15 ml. para centrífuga.
Gradilla para tubos de centrífuga.
Tubos de ensayo de 10, 15 y 20 ml.
Gradillas para tubos

Otros:

Espátulas pequeñas y grandes
Beakers de 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mls.
Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 100 ml.
Propipeta de caucho. (Dispensador).
Goteros de caucho.
Pipetas de Pasteur
Papel parafilm
Hielera
Bandeja grande.

Almacenamiento de las Muestras:

Viales de 5 y 10 ml.
Nevera con congelador.

Preparación del Gel:

a) Gel de Almidón:

Mechero Bunsen
Guantes de Asbesto
Erlenmeyer para vacío de 500 ml.
Tapones de caucho medianos y grandes .
Vidrios de 22x22 cms.
Reglas de Plexiglas de 18x2x0,6 cms.
Reglas de Plexiglas de 16x2x0,6 cms.
Cinta Tesa
Tijeras
Plástico para cubrir los geles (Saran Wrap)
Bomba de vacío de 30 Lbs. de presión.
Reglas de Plexiglas de:
16x02,x0,6 cms (2)
16x0,2x0,3 cms (2)
16x02,x0,15 cms (2)
Hilo de Nylon
Un cuchillo pequeño
Papel de filtro Whatman No. 3
Una pinza pequeña
Cubetas para tinción de 20x15x6 cms.

b) Gel de poliacrilamida:

Pipetas graduadas de 5 y 10 mls.
Beakers de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml.
Erlenmeyer para vacío de 250 mls.
Tapón de caucho mediano.
Bomba de vacío.
Probetas de 25, 100, 500 y 1000 mls.

Erlenmeyers de 125, 250, 500 y 1000 mls.

Microjeringa de 50 microlitros.

Jeringa de plástico desechable con aguja de:

10 y 20 ml.

Vidrios de 18,3 x 20 cms.

Vidrios de 16 x 20 cms.

Regla graduada

marcador

Celda de electroforesis (Vertical u horizontal)

a) Comercial: Bio-Rad (Protean II)

LKB (LKB-2001)

Farmacia (GE-2/4 LS).

b) Hecha en casa: Construída con Plexiglas

Corrida de la Electroforesis:

- Fuente de poder de 500 voltios/200 mA.

Bio-Rad modelo 500.

- Fuente de poder de 3000 voltios/150 mA.

Pharmacia ECPS 3000/150.

Celda vertical de electroforesis:

Bio-Rad (Protean II)

Bio-Rad (Modelo 220)

LKB (LKB 2001)

Farmacia (GE-2/4 LS)

Celda vertical de electroforesis para geles ácidos hecha de Plexiglas.

Celda horizontal de electroforesis

(Pharmacia FBE 3000)

Electrodos de platino.

Conexiones eléctricas.

Circulador de agua a temperatura constante.

Mangueras de plástico.

Tinción de los geles para proteínas totales y para Isoenzimas.:

Cubetas de plástico de 20x15x6 cms.
Cubetas de acero inoxidable de 20x15x6 cms.
Incubadora.
Guantes desechables.
Agitador magnético.
Magnetos pequeños, medianos y grandes.
Agitador rotatorio de cubetas.
Caja con luz fluorescente.

Preparación de soluciones:

Balanza analítica.
Pesa sales de plástico pequeños y medianos
Peachímetro
Buffer standard para peachímetro
de pH 4.0 y pH. 7.0.

Agitador magnético
Magnetos: pequeños, medianos y grandes.

Frascos para almacenar las soluciones claros y oscuros de:
50, 100, 250, 500 y 1000 ml.

Pipetas graduadas de: 1, 5 y 10 ml.
Pipeta Pasteur.
Gotero de plástico
Propipeta (Dispensador).
Espátula pequeñas, mediana y grande.

Beakers de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
Erlenmeyers de 125, 250, 500 y 1000 ml.
Frasco lavador de plástico.
Recipiente para agua destilada de 10 Lts.

Fotografía:

Cámara Pentax de 35 mm.

Film Kodak blanco y negro (35 mm.).

Caja con luz fluorescente.

