

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EQUIPAMIENTO DISPONIBLE

El término “Proteoma” fue usado por primera vez por Wilkins et al. (1996) para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma en un momento dado. El Proteoma es un elemento altamente dinámico, cuyos componentes varían en un organismo, tejido, célula o compartimento subcelular, como consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas, señales bioquímicas o su estado fisiológico o patológico.

La “Proteómica” se ha definido como la ciencia o conjunto de tecnologías que estudian el proteoma.

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE) es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma. Dicha técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas (“spots”) en un único gel, mostrando un patrón característico.

La separación y visualización de proteínas mediante 2D PAGE pasa por las siguientes etapas:

Preparación de la muestra:

Es el paso más crítico y clave en el éxito del experimento. En él se emplean agentes caotrópicos, surfactantes y agentes reductores. Los agentes caotrópicos como la urea y tiourea, provocan la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que son solubilizados por los agentes surfactantes. Los agentes reductores como el DTT (aunque también se emplean otros reductores alternativos no cargados), completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro.

Separación en la 1ª Dimensión (Isoelectroenfoque):

En primer lugar las proteínas se separan en base a su punto isoeléctrico en gradientes de pH inmovilizados (IPGs).

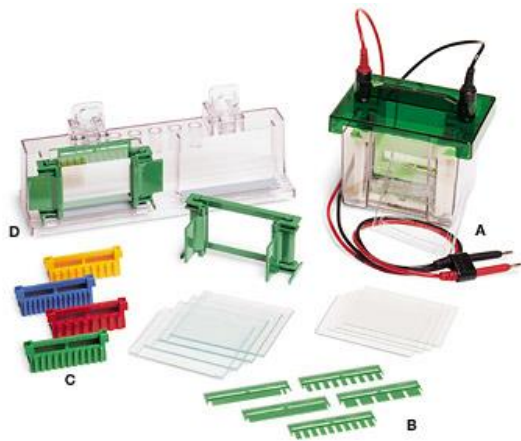


Equipo de Isoelectroenfoque:
Protean IEF cell (Bio-Rad)

Separación en la 2ª Dimensión (SDS-PAGE):

Una vez que las proteínas han sido separadas en función de sus propiedades eléctricas, pasamos a separarlas en función de su tamaño o peso molecular mediante la electroforesis en geles de acrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS).

Estas dos separaciones sucesivas permiten aislar prácticamente todas las proteínas de un proteoma en una matriz bidimensional (“electroforesis bidimensional”).



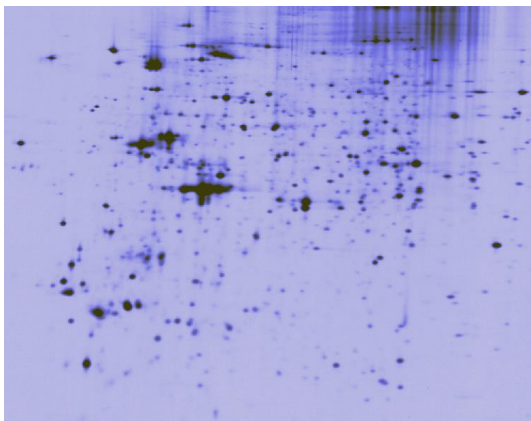
Equipo de Electroforesis Bidimensional:
Mini Protean System (Bio-Rad)



Equipo de Electroforesis Bidimensional:
Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad)

Tinción:

Para visualizar las proteínas en el gel, éstas deben ser teñidas de alguna manera. La elección del método de tinción viene determinado por diferentes factores, como la sensibilidad deseada, rango lineal, facilidad de uso, precio y tipo de equipo de adquisición de imagen disponible. Los métodos más usados son la tinción con Coomassie Blue, la tinción fluorescente con Sypro Ruby y la tinción con Plata, aunque esta última no es del todo compatible con el análisis posterior de las proteínas por espectrometría de masas.



Gel Bidimensional:
Tinción Coomassie Blue

Adquisición y Análisis de Imagen:

La habilidad para adquirir datos en formato digital es uno de los principales factores que hace a los geles bidimensionales ser un práctico medio para recoger información sobre un proteoma.

Antes de que los geles donde hemos separado las proteínas puedan ser analizados con un sistema de evaluación de imágenes, éstos deben ser digitalizados. Los instrumentos de adquisición de imágenes más comúnmente usados son los densitómetros, los escáneres de fluorescencia y los basados en tecnología CCD de alta resolución y sensibilidad.



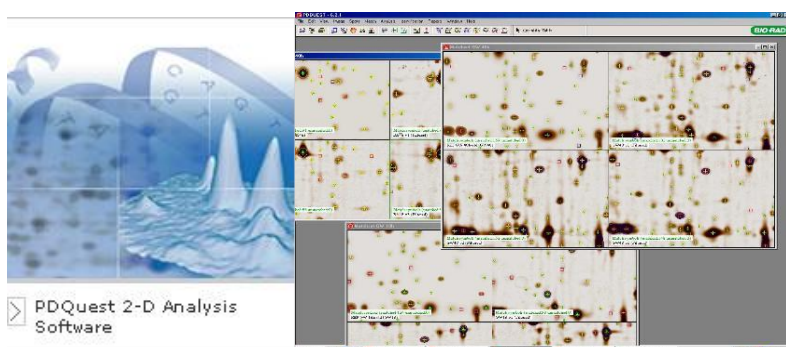
Escáner de Fluorescencia:
FX ProPlus (Bio-Rad)

STAIN-FREE
ENABLED

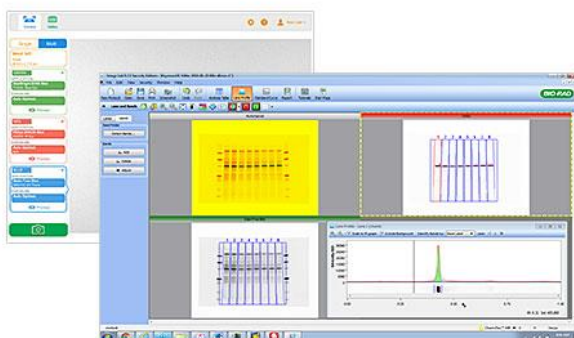


Sistema de adquisición de imágenes fluorescencia y UV
(ChemiDoc MP System, Bio-Rad)

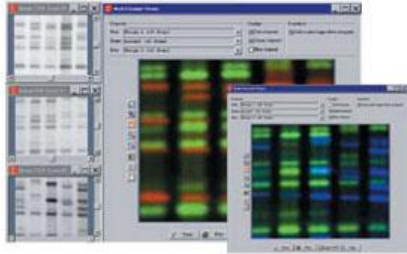
Todos ellos funcionan con softwares de análisis diseñados para detectar y cuantificar “spots” en las imágenes digitales así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés. Los softwares de análisis disponibles en el Servicio son los mostrados a continuación.



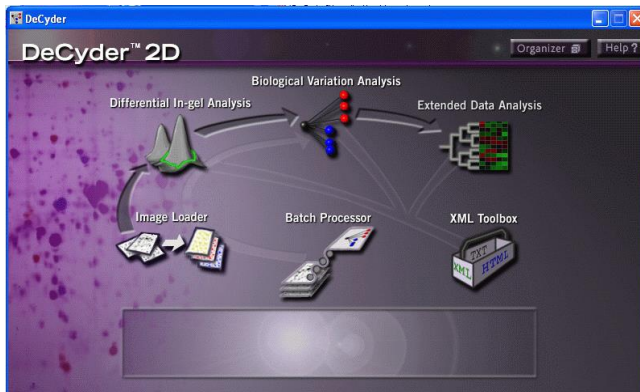
Software de análisis PDQuest 2-D (Bio-Rad)



Software de adquisición y análisis Image Lab
(Bio-Rad)



Software de análisis Quantity One 1-D (Bio-Rad)



Software de análisis DeCyder 2D 6.5
GE Healthcare (GE)