

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN QUÍMICA

# Caracterización de especies químicas en plancton por electroforesis sobre gel y ablación láser-ICP-MS

---



JUAN RAMÓN BERTOLÍN PARDOS  
Curso 2011-2012



Instituto Universitario de Investigación  
en Ciencias Ambientales  
de Aragón  
Universidad Zaragoza



Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza







Instituto Universitario de Investigación  
en Ciencias Ambientales  
de Aragón  
Universidad Zaragoza



Universidad  
Zaragoza



Dña. M<sup>a</sup> Sierra Jiménez García-Alcalá, Profesora Titular de la Universidad de Zaragoza, y Dña. M<sup>a</sup> Teresa Gómez Cotín, Profesora Titular de la Universidad de Zaragoza, del Departamento de Química Analítica,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria:

**"Caracterización de especies químicas en plancton por electroforesis sobre gel y ablación láser-ICP-MS"**

ha sido realizada por D. Juan Ramón Bertolín Pardos en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección para presentarla como Trabajo Fin de Máster.

Asimismo autorizan la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 3 de septiembre de 2012

M<sup>a</sup> SIERRA JIMÉNEZ GARCÍA-ALCALÁ

M<sup>a</sup> TERESA GÓMEZ COTÍN



*Este trabajo fin de máster ha sido financiado con cargo al proyecto “Especiación multielemental química y funcional en nanopartículas, macromoléculas y biocoloides en medios acuosos pseudo-multifase” (CTQ2009-14237-CO2-01), del Ministerio de Ciencia e Innovación.*



# ÍNDICE

ABSTRACT

ABREVIATURAS

## 1. INTRODUCCIÓN

<b>1.1 Importancia de la metalómica en muestras medioambientales</b>	<b>1-2</b>
<b>1.1.1 PAGE-LA-ICP-MS</b>	<b>2-4</b>
<b>1.2 Determinación de metales asociados a proteínas en plancton</b>	<b>4-6</b>
<b>1.2.1 Determinación de metales en plancton</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2 Determinación de proteínas y metaloenzimas en plancton</b>	<b>6-7</b>

## 2. OBJETIVOS 8

## 3. EXPERIMENTAL

<b>3.1 Instrumentación</b>	
<b>3.1.1 Aparatos y materiales</b>	<b>9-10</b>
<b>3.1.2 Instrumentos</b>	<b>10-11</b>
<b>3.2 Reactivos y disoluciones patrón</b>	<b>12-13</b>
<b>3.3 Muestras</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Procedimientos experimentales</b>	
<b>3.4.1 Determinación del contenido total de metales en plancton</b>	
<b>3.4.1.1 Digestión ácida asistida por microondas de las muestras</b>	<b>13-14</b>
<b>3.4.1.2 Determinación del contenido total de metales en plancton mediante ICP-MS</b>	<b>14-15</b>
<b>3.4.2 Métodos electroforéticos</b>	
<b>3.4.2.1 Preparación de las muestras</b>	<b>15</b>
<b>3.4.2.1.a Métodos de extracción de las proteínas de las muestras</b>	<b>15-16</b>
<b>3.4.2.1.b Métodos de preconcentración por ultrafiltración</b>	<b>16-17</b>

3.4.2.1.c	<i>Métodos de preconcentración por precipitación de las proteínas de los extractos</i>	17
3.4.2.1.d	<i>Determinación del contenido total de proteínas en disolución mediante ensayo Bradford</i>	17-18
3.4.2.2	<i>Métodos de separación</i>	
3.4.2.2.a	<i>Métodos de separación 1D-PAGE</i>	18
3.4.2.3	<i>Tratamiento posterior de los geles</i>	
3.4.2.3.a	<i>Tinción de los geles</i>	18-19
3.4.2.3.b	<i>Determinación de los pesos moleculares de las proteínas</i>	19-20
3.4.3	<i>Determinación de metales asociados a proteínas en muestras de plancton</i>	
3.4.3.1	<i>Determinación del contenido total de metales en extractos proteínicos, sin y con preconcentración, por ICP-MS</i>	20
3.4.3.2	<i>Determinación de metales asociados a proteínas por LA-ICP-MS tras su separación mediante 1D-PAGE</i>	21-22
3.5	<b>Resultados y discusión</b>	
3.5.1	<i>Determinación del contenido total de metales en el material de referencia certificado BCR-414 y en el plancton BIO 7120</i>	22-24
3.5.2	<i>Optimización del método de preparación de muestras previo al proceso electroforético</i>	24
3.5.2.1	<i>Comparación de distintos métodos de extracción y preconcentración y su influencia en la concentración de proteínas extraídas de plancton</i>	24-27
3.5.2.2	<i>Comparación de distintos métodos de extracción y preconcentración y su influencia en la concentración de metales en los extractos de proteínas de plancton</i>	27-32
3.5.3	<i>Optimización del método de separación de proteínas en plancton</i>	32
3.5.3.1	<i>SDS-Tris-Glicina-PAGE</i>	33-34
3.5.3.2	<i>Blue-Native-PAGE</i>	35-37
3.5.4	<i>Estudio de asociaciones metal-proteína mediante LA-ICP-MS tras su separación por 1D-PAGE</i>	37
3.5.4.1	<i>SDS-Tris-Glicina-PAGE</i>	37-39



<b>3.5.4.2 Blue-Native-PAGE</b>	<b>39-41</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>42-43</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>44-49</b>
<b>6. ANEXOS</b>	
<b>6.1 Certificado de análisis del material de referencia certificado BCR-414</b>	
<b>6.2 Electroforesis sobre gel de poliacrilamida en una dimensión (1D-PAGE)</b>	
<b>6.2.1 Realización de un gel de poliacrilamida</b>	
<b>6.2.2 SDS-Tris-Glicina-PAGE</b>	
<b>6.2.3 Blue-Native-PAGE</b>	
<b>6.3 Tinción de los geles</b>	
<b>6.3.1 Tinción con azul de Coomassie</b>	
<b>6.3.2 Tinción con plata</b>	
<b>6.4 Preparación de los geles para su análisis mediante LA-ICP-MS</b>	



## **ABSTRACT**

El plancton juega un papel muy importante en el *ecosistema terrestre*, ya que, además de ser el primer eslabón de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos, es el responsable de generar alrededor del 50% del oxígeno necesario para la vida en la Tierra y del 90% del oxígeno presente en océanos y mares. Además, este oxígeno, se genera en su mayor parte gracias a la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico, actuando el plancton como uno de los principales sumideros de CO<sub>2</sub> del planeta.

El plancton interacciona con metales presentes en el medio, de tal forma que algunos de ellos son imprescindibles para su existencia, ya que actúan como cofactores de enzimas y/o elementos estructurales de diversas proteínas, ejemplo de ello son elementos como el Fe, el Cu, el Zn y el Co, alguno de los cuales actúa como cofactor de metaloenzimas como la anhidrasa carbónica y la fosfatasa alcalina. Por el contrario, estos mismos metales en concentraciones superiores y otros como el Cd, el Hg, el Pb y el As, pueden tener carácter tóxico para estos microorganismos.

Por el importante papel que juega el plancton y a su vez los metales en el desarrollo del mismo, es importante la puesta a punto de una metodología analítica para la caracterización de las proteínas y de los metales asociados a las mismas en muestras de plancton.

En este trabajo se ha realizado la determinación del contenido total de metales en muestras de plancton (*BCR-414* y *BIO 7120*) mediante plasma de acoplamiento inductivo espectrometría de masas (ICP-MS) tras digestión ácida asistida por microondas, así como la caracterización de las proteínas presentes en ambas muestras aplicando métodos electroforéticos y de los metales asociados a las mismas mediante técnicas electroforéticas y ablación láser-ICP-MS (PAGE-LA-ICP-MS). Todo ello habiendo realizado una optimización completa tanto del proceso de preparación de las muestras de plancton, así como de la posterior separación de proteínas y el estudio de asociaciones metal-proteína bajo las técnicas citadas.



## **ABREVIATURAS**

1D-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en una dimensión
2D-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en dos dimensiones
AN-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida nativa anódica
APS	Persulfato de amonio
BN-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida nativa en presencia del colorante azul de Coomassie
DRC	Celda dinámica de reacción
ICP	Plasma de Acoplamiento Inductivo
ICP-MS	Plasma de Acoplamiento Inductivo - Espectrometría de Masas
LA	Ablación láser
LA-ICP-MS	Ablación láser con Plasma de Acoplamiento Inductivo - Espectrometría de Masas
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
MS	Espectrometría de Masas
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PAGE- LA-ICP-MS	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida- Ablación láser con Plasma de Acoplamiento Inductivo – Espectrometría de Masas
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
TC	Tampón de carga
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-VIS	Ultravioleta-Visible



# 1. INTRODUCCIÓN

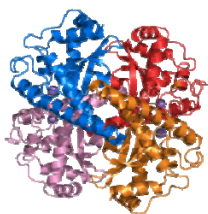
## 1.1 Importancia de la metalómica en muestras medioambientales

*Metaloma* se ha definido como la distribución de un elemento, concentraciones en el equilibrio de los iones metálicos libres, o el contenido libre de un elemento en un compartimento celular, célula u organismo [1]. Posteriormente se amplió a la totalidad de las especies metálicas y metaloides presentes en una célula o tejido [2].

De esta forma, se puede definir la *metalómica* como el estudio de las interacciones y conexiones funcionales de los iones metálicos y sus especies, con los genes, las proteínas y demás biomoléculas presentes en organismos y ecosistemas.

De las distintas metaloespecies presentes en un sistema biológico, una de las más importantes es la formada por metales y proteínas. Este tipo de complejos se denominan *metaloproteínas* y, en ellos, los metales confieren a la proteína una determinada función como puede ser el desarrollo de una actividad catalítica, la implicación de la proteína en una reacción de transferencia de electrones o simplemente son capaces de estabilizar la estructura terciaria o cuaternaria de algunas proteínas.

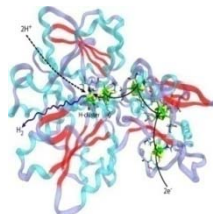
### Ejemplos de metaloproteínas



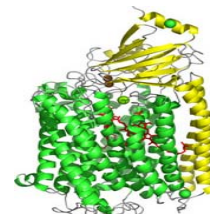
*SOD humana (Mn)*



*Anhidrasa carbónica (Zn)*



*Hidrogenasa (Fe)*



*Citocromo C-Oxidasa (Cu)*

Existen otro tipo de proteínas que únicamente acomplejan metales debido a la existencia de un equilibrio termodinámico en el sistema; en este tipo de proteínas, el metal no cumple una función determinada.

Por lo tanto se puede distinguir entre *metaloproteínas* y *proteínas que enlazan o asocian metales*.

Además de la identificación de metaloproteínas y la caracterización de sus complejos con metales, para lograr entender estos mecanismos es necesaria la caracterización de la fracción de moléculas no proteínicas, que, además de incluir productos metabólicos (procedentes de

reacciones enzimáticas y bioquímicas) que enlazan metales, pueden liberar metales que posteriormente capten las metaloproteínas [3]. Por esto, es cada vez más importante realizar un enfoque sistemático al estudio del contenido metálico, especiación, localización y uso en los organismos y ecosistemas medioambientales.

Las concentraciones a niveles traza de las metaloproteínas y otros metalometabolitos requieren la combinación de técnicas con una alta resolución en la separación, como cromatografía y electroforesis, y técnicas sensibles de detección, como Espectrometría de Masas elemental y molecular. La técnica de separación ha de proporcionar suficiente resolución para evitar la coelución de otras especies del mismo elemento (cuando se usa Plasma de Acoplamiento Inductivo - Espectrometría de Masas (ICP-MS) como técnica de detección) o de especies fácilmente ionizables que eviten la ionización del analito (cuando se usa MS como técnica de detección). El uso de técnicas acopladas hace necesario que las especies sean cinéticamente inertes. Se debe tener en cuenta la estabilidad termodinámica cuando se diseñan las condiciones de extracción y de la fase móvil cromatográfica.

### **1.1.1 PAGE-LA-ICP-MS**

El acoplamiento de un sistema de ablación láser a un ICP-MS (LA-ICP-MS) da lugar a una técnica bastante potente para una determinación rápida y multielemental de muestras sólidas e incluso permite llevar a cabo medidas de relaciones isotópicas. Esta técnica es capaz de detectar y determinar elementos mayoritarios, minoritarios e incluso trazas o ultratrazas de los mismos en las muestras [4].

La gran ventaja del acoplamiento del ICP-MS a la ablación láser, son las buenas propiedades analíticas que el ICP-MS posee, como son la alta sensibilidad, la rapidez, el amplio rango dinámico (más de 9 órdenes de magnitud) y espectros relativamente simples [4].

*Nielsen et al.* [5], fueron los primeros en describir el uso de un sistema de LA-ICP-MS para la determinación de Co en proteínas de suero humano enriquecido previamente con este metal y separadas anteriormente por métodos electroforéticos.

Posteriormente *Marshall et al.* [6] emplearon  $^{31}\text{P}$  para la determinación de  $\beta$ -caseína mediante LA-ICP-MS tras su separación electroforética.

*Becker et al* [7] utilizaron esta técnica para la determinación de P y S en proteínas de suero tras su separación mediante 2D-PAGE y para la determinación de relaciones P/S en proteínas de cerebro humano [8].



En los últimos años se han publicado algunos *reviews* que recopilan los principales estudios relacionados con la determinación de metales asociados a proteínas mediante LA-ICP-MS, tras especiación mediante electroforesis sobre gel [9,10,11,12,13].

Uno de los problemas que presenta esta técnica es la pérdida del enlace metal-proteína en proteínas en las que estas interacciones no son lo suficientemente fuertes. Esta pérdida puede producirse, no sólo durante la separación electroforética, sino también durante los tratamientos previos de la muestra así como en los procesos posteriores a la separación. Por ello es necesario desarrollar estrategias para separar proteínas sin que se produzcan la ruptura de los enlaces metal-proteína.

Existen diferentes trabajos que han estudiado este problema [14,15,16], en ellos se recomiendan electroforesis no desnaturizantes para evitar la pérdida del enlace metal-proteína. Pero no sólo la naturaleza del proceso electroforético puede alterar el enlace metal-proteína; en nuestro grupo de investigación se estudió tanto la naturaleza del proceso electroforético (electroforesis desnaturizante o no) como el tipo de ión de arrastre en la electroforesis, la intensidad aplicada y los procesos de teñido y lavado para distintas proteínas con afinidad metal-proteína diferente (tiroglobulina, SOD y ADH) [17, 18]. En estos estudios se llegó a la misma conclusión que en trabajos expuestos anteriores (trabajar con electroforesis no desnaturizantes) y además mostraron que es más recomendable evitar procedimientos de tinción, ya que éstos pueden alterar la estabilidad de los complejos metal-proteína.

En lo que respecta a parte final de la técnica (LA), ver *Figura 1*, la muestra se coloca en una celda de ablación cerrada herméticamente y sobre ella se hace incidir la radiación del láser. Esta radiación es absorbida por los electrones de la superficie, transfiriéndose rápidamente en forma de energía al resto de electrones de la muestra. Los electrones de mayor energía abandonan la superficie de la muestra difundiendo a capas más profundas de la misma, de esta manera se producen colisiones con los átomos de la muestra ocasionando la fusión y posterior evaporación de la misma, este proceso acaba generando un plasma de la muestra.

Este aerosol generado se conduce hacia el ICP gracias a una corriente de He o Ar, una vez que llega al ICP es vaporizado, atomizado e ionizado.

Estos iones son dirigidos hacia el analizador de masas donde son separados según su relación masa/carga y detectados posteriormente.

En el caso que nos ocupa, PAGE-LA-ICP-MS, el resultado obtenido es un electroferograma en el que se recoge la distribución de un elemento en función de su posición en el gel.

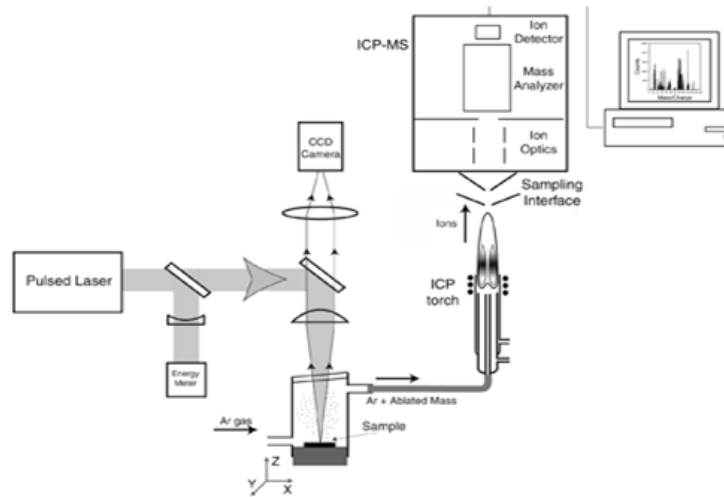


Figura 1. Esquema de un sistema de LA-ICP-MS

### 1.2 Determinación de metales asociados a proteínas en plancton

El plancton es un conjunto de microorganismos, tanto vegetales como animales, que habitan ecosistemas acuáticos.

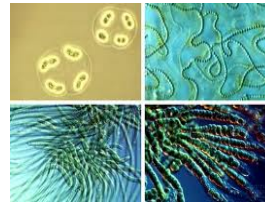
Estos microorganismos suelen clasificarse de una manera sencilla en dos clases: fitoplancton y zooplancton.

El plancton vegetal es el denominado fitoplancton (del griego *phyton = planta*), se trata de un conjunto de microorganismos vegetales que obtienen su alimento vía fotosintética y constituyen el primer eslabón de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos. Debido a la necesidad de luz solar, la mayoría habita a profundidades menores de 50 metros y son los responsables de generar alrededor del 50% del oxígeno necesario para la vida terrestre.

Entre las especies que dan lugar al fitoplancton destacan las diatomeas o cianobacterias.

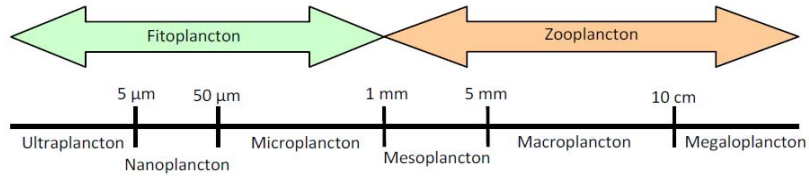


*Diatomeas*



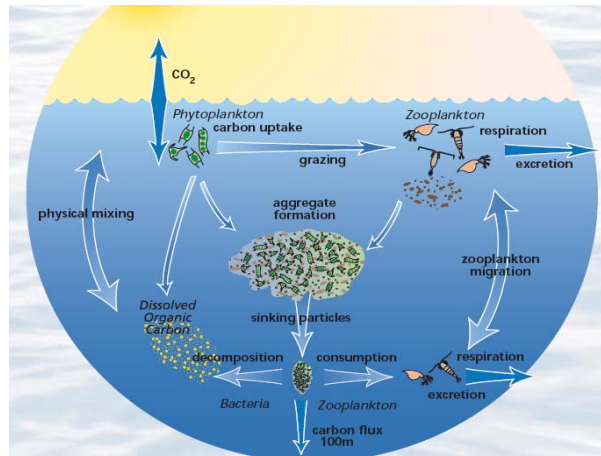
*Cianobacterias*

El zooplancton es el plancton animal, se trata de microorganismos animales muy diferentes entre sí como ctenóforos, cnidarias, fases larvarias de moluscos, crustáceos, etc.



**Figura esquemática de los tipos de plancton relacionándolos con su tamaño**

Como ya se ha citado anteriormente el fitoplancton es de vital importancia, ya que es responsable de generar alrededor del 50 % del oxígeno necesario para la vida terrestre, el 90% del oxígeno presente en mares y océanos y, además, este oxígeno se genera en gran medida a través de la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico, por lo que se trata de uno de los principales sumideros de CO<sub>2</sub> del planeta.



**Fijación del CO<sub>2</sub> en los ecosistemas marinos**

Otra de las características del fitoplancton es que se trata del primer eslabón de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos, se encuentra presente en océanos, mares, estanques, ríos, lagos y su abundancia local varía en sentido horizontal, vertical y estacionalmente [19].

Para el desarrollo del plancton es necesaria abundante luz solar, nutrientes tales como nitratos, fosfatos, silicatos y algunos metales como el Fe [20], Cu, Zn, Co, etc. Estos metales son de vital importancia ya que en algunos casos actúan como cofactores en las estructuras de distintas metaloenzimas como la anhidrasa carbónica, la fosfatasa alcalina, etc.

Por su parte, estos mismos metales en concentraciones superiores u otros metales como el Cd [21], Hg, Pb, As [22], etc, pueden tener carácter tóxico para estos microorganismos [20].

En los ecosistemas acuáticos se produce un equilibrio de los contenidos entre los metales presentes en disolución y los metales que pasan a formar parte del metaloma del plancton, de tal

forma que, un estudio de los metales asociados al plancton puede ser representativo de la contaminación presente en el ecosistema en el que habita [20,23,24].

Por todo ello es importante la optimización de un método sencillo para la caracterización de las proteínas y de los metales asociados a las mismas en muestras de plancton.

### **1.2.1 Determinación de metales en plancton**

Para la determinación del contenido total de metales en plancton, pueden usarse distintas técnicas analíticas como pueden ser la Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS) [25,26], la Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Óptico de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) [24] o el Plasma de Acoplamiento Inductivo-Espectrometría de Masas (ICP-MS) [21,22], que es la técnica que se va a utilizar en este trabajo ya que, gracias a su gran sensibilidad y rapidez, es capaz de medir la mayoría de los metales en concentraciones de trazas y ultratrazas rápidamente.

Para la puesta en disolución del plancton o de muestras biológicas marinas, se han descrito distintos métodos, algunos basados en la digestión ácida asistida con microondas usando una mezcla de HF y HNO<sub>3</sub> [26] o una mezcla de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [27] o simplemente HNO<sub>3</sub> [22,28]. Aunque también se han descrito otros en los que no es necesario el microondas [23,29], en nuestro caso se ha recurrido a una digestión ácida asistida por microondas usando una mezcla 4:1 (v/v) de HNO<sub>3</sub> y HCl [28].

### **1.2.2 Determinación de proteínas y metaloenzimas en plancton**

Tiselius introdujo la electroforesis en la década de 1930 como método para la caracterización de sistemas biológicos de interés [30]. Sus ventajas residen en que se trata de una técnica relativamente simple y altamente selectiva, por lo que puede ser aplicable a distintas muestras.

Su principal aplicación se dirige a la caracterización de sistemas biológicos de interés y más concretamente a la selección de bandas específicas de proteínas para su secuenciación e identificación.

En lo que respecta al plancton, existen bastantes estudios de las proteínas presentes en el mismo.

*Moncheva et al.* [31,32], estudiaron la influencia de los cambios estacionales en el crecimiento del fitoplancton, tras la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida en

presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) observaron bandas de proteínas con pesos moleculares aparentes de 14, 29, 40, 48, 60 y 72 kDa, siendo las más intensas las de 14 y 72 kDa en verano mientras que en primavera eran las de 45 y 55 kDa.

Previamente, *Tanoue* [33,34,35,36], recoge dos grupos diferentes de proteínas con pesos moleculares de 45 y 55 kDa mediante electroforesis SDS-PAGE.

*Palenik y Koke* [37] observaron mediante biotilación de proteínas de superficie celular una subunidad de 82 kDa que podría asociarse a una proteína regulada por nitrógeno.

Por otra parte, una de las proteínas más importantes presente en el plancton es la anhidrasa carbónica (CA), enzima que se encuentra presente en gran cantidad de organismos vivos y que tiene como función catalizar la hidratación reversible del CO<sub>2</sub>, por lo que es utilizada por el fitoplancton para adquisición de carbono inorgánico mediante la fotosíntesis (fijación de CO<sub>2</sub>). La anhidrasa carbónica contiene Zn en su estructura. Sin embargo, en las aguas, donde el contenido de Zn es bastante bajo, las diatomeas pueden utilizar Cd como átomo metálico catalítico [38].

Debido a su importancia, la anhidrasa carbónica ha sido una enzima muy estudiada durante los últimos años [39,40,41].

Las cianobacterias constituyen una parte importante del fitoplancton, por lo que el estudio de proteínas presentes en cianobacterias ha sido abordado por numerosos investigadores. *Fillat, Peleato et al.* [42] observaron, por ejemplo, que los niveles de proteínas Fur (reguladoras de la captación de hierro) en la cianobacteria *Anabaena PCC 7120* aumentaban significativamente en respuesta a la pérdida de nitrógeno.

Otra proteína importante es la superóxido dismutasa (SOD), ya que juega un papel fundamental en la eliminación de especies reactivas de oxígeno en las microalgas. Esta enzima ha sido estudiada en muestras de microalgas procedentes de la Antártida mediante PAGE nativa, lo que ha permitido visualizar sus diferentes isoenzimas así como sus actividades relativas [43].

El objetivo final de este trabajo ha sido la caracterización de proteínas y de los metales asociados a las proteínas en plancton mediante LA-ICP-MS previa separación de las proteínas por técnicas electroforéticas. Para ello se han tomado como modelos una muestra de plancton certificado (*BCR-414*) y una muestra de cianobacterias cultivadas en un laboratorio del departamento de Bioquímica (*BIO 7120*). Todo ello implica un desarrollo de metodología adecuada para una extracción eficiente de las proteínas del plancton así como de los metales que pueden estar asociadas a las mismas.

## **2. OBJETIVOS**

Como se ha venido comentando en la introducción, el conocimiento de qué metales están asociados a las proteínas del plancton es muy interesante debido a que éstos juegan un papel muy importante al tener diversas funciones como estabilizar las proteínas y permitir reacciones enzimáticas y de transferencia de electrones, de esta manera, algunos de estos metales se presentan como constituyentes esenciales de dichos microorganismos.

Más concretamente los objetivos de este trabajo han sido:

- Determinación del contenido total de metales en muestras de plancton mediante ICP-MS tras digestión ácida ( $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ ) asistida por microondas.
- Optimización del proceso de preparación de muestra incluyendo el proceso de extracción y preconcentración de proteínas, teniendo en cuenta tanto la máxima extracción de proteínas, como el mantenimiento de los enlaces metal-proteína.
- Determinación del contenido total de metales en las fracciones proteicas de plancton mediante ICP-MS para conocer el grado de extracción de metales potencialmente unidos a proteínas en cada una de las muestras estudiadas.
- Optimización del proceso de separación de las proteínas del plancton basado en el uso de electroforesis en gel de poliacrilamida en una dimensión (1D-PAGE) tratando de mantener el enlace metal-proteína.
- Caracterización de las proteínas presentes en las muestras de plancton y cálculo de sus pesos moleculares.
- Estudio de asociaciones metal-proteína utilizando PAGE-LA-ICP-MS tras la separación de las proteínas de las muestras por los distintos métodos electroforéticos.

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1 INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1.1 Aparatos y materiales

- Horno microondas MARS HP-500 Plus DS (CEM Corporation, Matthews, EE.UU.).
- Estufa ULM 400 (Mettler, Schwabach, Alemania).
- Agitador orbital Rotamax 120 (Heidolph, Schwabach, Alemania).
- Agitador vortex Reax Top (Heidolph, Schwabach, Alemania).
- Agitador magnético con placa calefactora 230 V (Bibby Sterilin Staffordshire, Reino Unido).
- Molino de bolas (Servicio de preparación de rocas y materiales duros, Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Geología, Universidad de Zaragoza).
- Liofilizador (Telstar, Tarrasa, España) (proporcionado por el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza).
- Centrifugadora refrigerada HERAEUS Multifuge X1R (Thermo Scientific, Buckinghamshire, Reino Unido).
- Micropipetas 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 200-1000  $\mu\text{L}$  (Crison, Barcelona, España).
- Filtros de centrifuga Amicon Ultra 0.5 ml, 10 kDa (Millipore Bedford, EE.UU.).
- Papel para cromatografía 3 mm CHR (Whatman, Maidstone, Reino Unido).
- Film resistente a altas temperaturas (Albal, Madrid, España).
- Lámina de cierre extensible Parafilm "M" (Pechiney, Chicago, EE.UU.).
- Tubos *ependorf* de 0,5 y 1,5 mL.
- Tubos tipo *Falcon* de 15 y 50 mL con y sin faldón.
- Vasos de precipitados, botes de plástico y recipientes de plástico de distintos volúmenes.
- Portaobjetos (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania).
- Cinta adhesiva de doble cara (Tesa, Hamburgo, Alemania).
- Cuentagotas de plástico.
- Vidrios de reloj.
- Probetas de distintos volúmenes.
- Espátulas de laboratorio y pinzas de laboratorio.

Todo el material utilizado para albergar muestras y disoluciones que han de ser introducidas en el ICP-MS (tubos *Falcon*) se han sometido a un proceso de limpieza consistente en:

1. Se toman los tubos *Falcon* con sus tapes y se sumergen abiertos en una disolución de  $\text{HNO}_3$  1:10 durante un mínimo de 48 horas.
2. Se sacan los tubos y se limpian con agua milli-Q.
3. Se colocan los tubos en una bandeja y se introducen en la estufa a una temperatura de 70°C.
4. Se espera a que se sequen los tubos y, una vez secos, se cierran y se almacenan para su uso.

### 3.1.2 Instrumentos

- Balanza analítica PL2001-L, precisión  $\pm 0.1$  mg (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza).
- Balanza analítica AG245, precisión  $\pm 0.01$  mg (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza).
- Balanza analítica GH-200, precisión  $\pm 0.1$  mg (AND, Tokio, Japón).
- pHmetro micropH 2001 (Crison, Barcelona, España).
- Espectrofotómetro Diode Array 8452 (Hewlett Packard, Ginebra, Suiza).



*Espectrofotómetro Diode Array 8452, Hewlett Packard*

### Para ICP-MS

- Sistema ICP-MS Perkin Elmer Elan 6000 DRC-e con muestreador automático AS-90/91 (Perkin Elmer, Toronto, Canadá).

Equipado con conos de Ni, y un detector de iones de tipo cuadrupolo. Se utilizaron un nebulizador de flujo cruzado (*GemTip Cross-Flow II Ryton*) y una cámara de nebulización de tipo Scott (*Ryton Scott*) en el modo convencional de introducción de muestra en disolución.

Para el acoplamiento con el sistema de ablación láser, la cámara y el nebulizador del equipo se desconectan y se conecta el sistema de ablación láser con el ICP-MS mediante tubos Tygon S-50-HL Class VI de 3 mm de diámetro interno y 55 cm de longitud.



- Láser de Nd:YAG (213 nm), Up 213 laser system (New Wave Research, Huntington, Reino Unido).



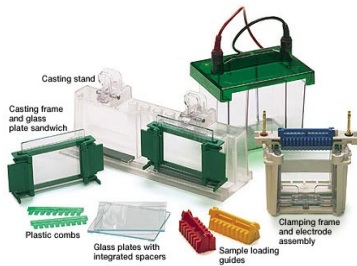
*Sistema de LA-ICP-MS (servicio de Análisis Químico, Universidad de Zaragoza)*



*Muestreador automático AS-90/91, Perkin Elmer*

### **Para electroforesis**

- Sistema de electroforesis Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Fuente de alimentación PowerPac Basic™ Power Supply (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).



*Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad*



*PowerPac Basic™ Power Supply, Bio-Rad*

- Sistema para la realización de geles en gradiente, Model 475 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Secador de geles Model 583 Gel Dryer (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).



*Gradient delivery system Model 475, Bio-Rad*



*Gel Dryer Model 58, Bio-Rad*

### 3.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN

#### *Para electroforesis*

- Disolución patrón para electroforesis desnaturizante de rango de pesos moleculares 6500 – 200000 Da (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Disolución patrón para electroforesis nativa de rango de pesos moleculares 14000 – 500000 Da (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Glicina (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- N-[tris(hidroximetil)metil]glicina ó Tricina (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Tris(hidroximetil)-aminometano ó Tris (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Bis-Tris (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Inhibidor de proteasas, Complete Mini EDTA-free (Roche, Mannheim, Alemania).
- Acrilamida / Bisacrilamida 30%, 29:1, 3,3% C (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Persulfato amónico (APS) (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Glicerol anhidro (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- 2-mercaptoetanol 99% (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza).
- Metanol puro, grado de reactivo (Scharlau, Barcelona, España).
- Etanol 96%, grado de reactivo (Scharlau, Barcelona, España).
- Ácido acético, grado de reactivo (Panreac, Barcelona, España).
- Coomassie® Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Coomassie® Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Inhibidor de tripsina de soja (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Mioglobina de corazón equino (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Superóxido dismutasa de eritrocito bovino (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Nitrógeno gas.

#### *Para ICP-MS*

- HCl 37.8%, grado analítico (J. T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).

- $\text{HNO}_3$  69.7%, grado analítico (J. T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).
- Disolución multielemental ( $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Al;  $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de V;  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de As, Be, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn;  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cd y Se;  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Hg) (J. T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).
- Disolución monoelemental  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Rh (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).

Todas las disoluciones se preparan a partir de los reactivos y patrones citados anteriormente, utilizando agua ultrapura de resistividad  $18 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^2$ , obtenida a partir de agua tratada con el purificador de agua (Millipore, Bedford, EE.UU.).

### 3.3 MUESTRAS

- Material de referencia certificado “BCR-414, Trace elements in plankton”, (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Bélgica). El certificado de análisis se muestra en el Anexo 6.1.
- Muestra de plancton proporcionado por el departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, constituido por cianobacteria *Anabaena sp 7120*, (BIO 7120).



BCR-414



BIO 7120

### 3.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### 3.4.1 Determinación del contenido total de metales en plancton

##### 3.4.1.1 Digestión ácida asistida por microondas de las muestras

Para la determinación del contenido total de metales mediante ICP-MS es necesaria la puesta en disolución tanto de la muestra certificada BCR-414 como del plancton BIO 7120.

Existen distintos métodos para la puesta en disolución de muestras marinas [22,26-28,44-49], en este caso, se ha optado por una digestión ácida ( $\text{HNO}_3$  y HCl) asistida por microondas.

Para la preparación de las muestras se pesan alrededor de 100 mg de las mismas y se les añade 4 mL de HNO<sub>3</sub>, 1 mL de HCl y 1 mL H<sub>2</sub>O milli-Q. El programa de ataque con microondas utilizado se muestra en la *Tabla 1*.

*Tabla 1. Programa de ataque con microondas para la disolución de las muestras de plancton*

Pot (W)	Intensidad (%)	T. Rampa (min)	Presión (psi)	T (°C)	T. Total (min)
800	100	10	800	210	30

Una vez finalizado el ataque, se dejan enfriar los tubos y se vierte el contenido de los mismos en tubos *Falcon* de 50 mL. Se diluye con agua milli-Q hasta un volumen final de 10 mL.

Por último, para evitar la introducción de un exceso de sólido disuelto en el ICP-MS se diluyen los extractos en proporción 1/20.

#### **3.4.1.2 Determinación del contenido total de metales en plancton mediante ICP-MS**

Se preparan 6 muestras: 2 blancos de ataque, 2 réplicas del *BCR-414* y 2 réplicas del *BIO 7120*.

Tras la digestión ácida asistida por microondas explicada en el apartado de *Procedimientos experimentales 3.4.1.1*, se realizan dos diluciones consecutivas de cada uno de los extractos, en la primera de ellas, se llevan los extractos digeridos a 10 mL de volumen final con agua milli-Q y en la segunda se realiza una dilución 1/20 con el objetivo de minimizar la cantidad de sólidos en las disoluciones de las muestras.

La recta se realiza desde 1 µg·L<sup>-1</sup> hasta 1000 µg·L<sup>-1</sup> teniendo en cuenta las concentraciones de los elementos de 100 mg·L<sup>-1</sup>; de 0.25 µg·L<sup>-1</sup> hasta 250 µg·L<sup>-1</sup> para el Se y de 2.5 µg·L<sup>-1</sup> hasta 2500 µg·L<sup>-1</sup> para el V y, a cada una de las disoluciones de la recta de calibrado, se les añade la correspondiente proporción ácida que contienen las muestras (0.23% de HNO<sub>3</sub> y 0.03% HCl), provenientes del ataque ácido y las posteriores diluciones de las muestras.

Los isótopos medidos son <sup>75</sup>As, <sup>111</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>59</sup>Co, <sup>52</sup>Cr, <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>55</sup>Mn, <sup>60</sup>Ni, <sup>62</sup>Ni, <sup>206</sup>Pb, <sup>207</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb, <sup>82</sup>Se, <sup>51</sup>V, <sup>66</sup>Zn, <sup>67</sup>Zn, <sup>68</sup>Zn y <sup>103</sup>Rh.

Como patrón interno para minimizar los efectos de la deriva de la señal se utiliza una disolución de 50 µg·L<sup>-1</sup> de Rh.

Previamente a cualquier determinación en el sistema ICP-MS se optimizan las condiciones de acuerdo a recomendaciones del fabricante: el caudal del gas nebulizador, los óxidos, el voltaje

de las lentes y la puesta a punto diaria del instrumento se optimizan utilizando una disolución de Rh, Mg, Pb, Ba y Ce ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  cada uno); la optimización de las lentes para el análisis multielemental se realiza con el programa "Autolens" y se utiliza una disolución de Be, Co, In y U ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  cada uno).

Las condiciones instrumentales y los parámetros de adquisición de datos del ICP-MS en esta experiencia se muestran en la *Tabla 2*.

*Tabla 2. Condiciones instrumentales y parámetros de adquisición de datos del ICP-MS Perkin Elmer Elan 6000 DRC-e en la determinación de metales del BCR-414 y del BIO 7120 en disolución*

Condiciones instrumentales	
Potencia de RF (w)	1100
Caudal de gas nebulizador (Ar)	0,95 L/min
Caudal de gas plasmógeno (Ar)	14 L/min
Parámetros de adquisición de datos	
Barridos/lectura	20
Lecturas/réplica	1
Réplicas	3
Tiempo de estancia por canal	50 ms
Adquisición de datos	Salto de pico a pico
Detector	Dual
Modo Autolens	Sí

### 3.4.2 Métodos electroforéticos

#### 3.4.2.1 Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para su análisis incluye la utilización de diversos métodos de extracción de las proteínas, además de distintos procesos de preconcentración y purificación de las mismas.

##### 3.4.2.1.a Métodos de extracción de las proteínas de las muestras

En la *Tabla 3* quedan recogidos los distintos métodos de extracción. En todos los métodos de extracción se sigue este proceso:

1. Se toma un eppendorf limpio de 1.5 mL y se le añade un agitador magnético.
2. Se añade 0.7 mL del *tampón de extracción*.
3. Se pesan 0.233 g de muestra.

4. Se mantiene en agitación durante 48-72 horas a 4°C (cámara fría).
5. Una vez finalizado el proceso de extracción se centrifugan las muestras durante 30 minutos a 4°C y 14000 r.p.m.
6. Se recoge el sobrenadante. A este extracto se le puede denominar *extracto directo*.

Tabla 3. Composición de los tampones de extracción utilizados

pH = 7	Tris-HCl (mM)	Inhibidor de proteasas (mg mL <sup>-1</sup> )	PMSF* (mM)	TCEP* (mM)	PVP* (g/L)	SDS* % (p/v)
Método 1	25	5	-	-	-	-
Método 2A	5	-	2	2	1	-
Método 2B	5	-	2	2	1	1
Método 2A'	25	-	2	2	1	-
Método 3	-	5	-	-	-	-

\* PMSF: Fluoruro de fenilmetanosulfonilo actúa como inhibidor de proteasas

TCEP: Tris (2-carboxietil) fosfina, se adiciona como reductor para romper los puentes disulfuro

PVP: Polivinilpirrolidona, cumple la función de adsorbente de polifenoles

SDS: Dodecilsulfato sódico

Los distintos métodos de extracción utilizados han sido descritos en la bibliografía para muestras biológicas:

*Método 1:* método de extracción propuesto para proteínas en material biológico, por ejemplo, del alga roja *Gracilaria cornea* [50] y del pez gato africano *Clarias gariepinus* [51].

*Método 2A:* método propuesto para la extracción de material biológico en muestras vegetales [52, 53].

*Método 2B:* similar al 2A pero con 1% (p/v) de SDS, para comprobar el efecto del SDS en la extracción de proteínas hidrofóbicas.

*Método 2C:* similar al 2A pero con mayor concentración de Tris-HCl, para comprobar el efecto de la concentración de Tris en la extracción de proteínas y de los metales asociados a ellas.

*Método 3:* con agua milli-Q, recomendado para separaciones posteriores de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativa en presencia del colorante azul de Coomassie (BN-PAGE) [54].

#### 3.4.2.1.b Métodos de preconcentración por ultrafiltración

Con el objeto de purificar los extractos y recoger únicamente la fracción proteica, se realiza una ultrafiltración usando para ello filtros *Amicon Ultra* de 0.5 mL y de 10 kDa de tamaño

de poro. De tal forma que, al centrifugar el extracto, únicamente quedaran retenidas aquellas biomoléculas que posean pesos moleculares mayores de 10 kDa. Para la realización de este procedimiento se realizan los siguientes pasos:

1. Se toman 0.4-0.5 mL del extracto directo.
2. Se realiza la ultrafiltración durante 30 minutos a 4°C y 14000 r.p.m.
3. Se da la vuelta al filtro de ultrafiltración sobre un eppendorf limpio y seco.
4. Se centrifuga durante 15 minutos a 4°C y 14000 r.p.m.
5. Se recoge el extracto de la ultrafiltración que contiene la fracción de proteínas de tamaño mayor a 10 kDa.

#### **3.4.2.1.c Métodos de preconcentración por precipitación de las proteínas de los extractos**

Además de la ultrafiltración, otro tipo de preconcentración y a la vez de purificación de los extractos, es la precipitación de los mismos.

En este caso se usa la acetona como agente precipitante [53,55] puesto que algunos autores han comprobado que la pérdida del enlace metal-proteína es menor en el caso de la precipitación con acetona que mediante el uso de otros agentes precipitantes como el ácido tricloroacético [53], además, la acetona no desnaturaliza las proteínas. Este procedimiento consiste en:

1. Se toma el *extracto directo* o el *extracto después de la ultrafiltración* y se le adiciona acetona pura en relación 1:4 (v/v).
2. Se mantiene la mezcla en agitación durante 1 hora en baño de hielo.
3. Se centrifuga a 5000 r.p.m durante 30 minutos a 4°C.
4. Se retira el sobrenadante.
5. Se realiza un lavado con 2 ml de acetona manteniéndolo en agitación durante 30 minutos.
6. Se centrifuga a 5000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C.
7. Se retira el sobrenadante.
8. Se deja secar el sólido a temperatura ambiente.

#### **3.4.2.1.d Determinación del contenido total de proteínas en disolución mediante ensayo Bradford**

Para poder cuantificar la cantidad de proteínas en los *extractos directos* y en las *fracciones de proteínas precipitadas*, se ha utilizado el *Método Bradford* [51,52,56].

Este método está basado en la unión del azul de Coomassie G-250 a residuos de argininas, triptófanos, tirosinas, etc, presentes en las proteínas. Este complejo formado entre estos residuos y el azul de Coomassie G-250 presenta un máximo de absorción a 595 nm, de esta forma, se puede llevar a cabo una cuantificación de las mismas mediante espectrometría de absorción molecular.

El ensayo Bradford se realiza a partir de un kit comercial. Este kit está compuesto por el reactivo Bradford y disoluciones patrón de la proteína albúmina de suero bovino de distintas concentraciones (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg·mL<sup>-1</sup>).

Para realizar el ensayo se toman 100 µL de cada uno de los patrones, así como disoluciones de cada una de las muestras diluidas 6 veces. Una vez preparadas, se les añade 5 mL del reactivo de Bradford, se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procede a su medida mediante un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm.

El rango lineal de este método comprende desde 0.125 – 1 mg·mL<sup>-1</sup>.

### **3.4.2.2 Métodos de separación**

#### **3.4.2.2.a Métodos de separación 1D-PAGE**

Tanto los *extractos directos* como la *fracción de proteínas precipitadas*, se someten a procesos de separación 1D-PAGE.

En trabajos anteriores del grupo se había optimizado el método de separación obteniéndose los mejores resultados para la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE como electroforesis desnaturizante para la caracterización de proteínas en plancton y BN-PAGE como no desnaturizante para el estudio de asociaciones metal-proteína en las muestras de plancton.

Los procedimientos para la preparación de los geles y una explicación más exhaustiva de ambos tipos de electroforesis se incluyen en el *Anexo 6.2*.

### **3.4.2.3 Tratamiento posterior de los geles**

#### **3.4.2.3.a Tinción de los geles**

Para la visualización de las proteínas, se han utilizado dos procedimientos distintos para la tinción de los geles:

*Tinción con azul de Coomassie*: método de tinción sencillo (*Anexo 6.3.1*).



*Tinción con plata*: proceso de tinción más sensible pero más complejo en la forma de operar (Anexo 6.3.2).

### 3.4.2.3.b Determinación de los pesos moleculares de las proteínas

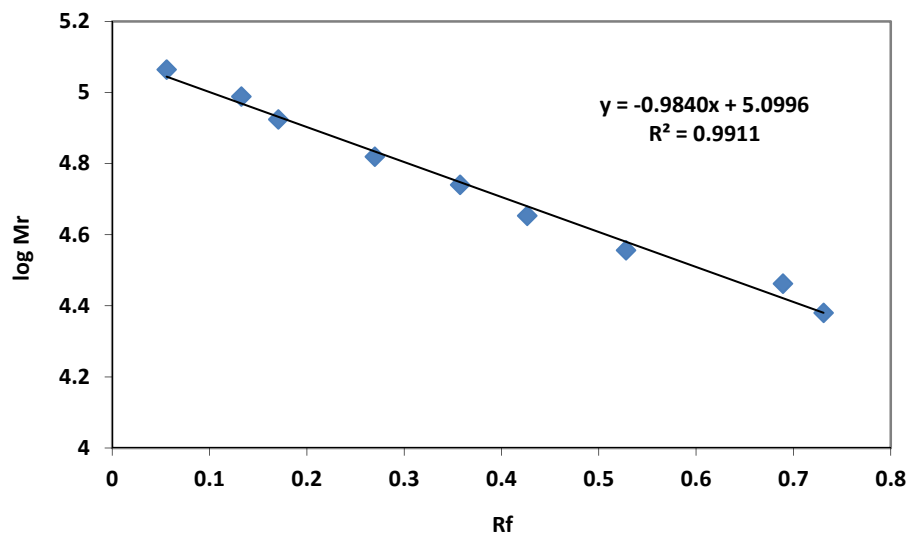
Es posible el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas separadas mediante electroforesis desnaturalizantes como SDS-Tris-Glicina-PAGE.

Para ello, se disponen de unos patrones comerciales, en nuestro caso "*SigmaMarker wide range 6500-200000 Da*" para las electroforesis desnaturalizantes y el "*Kit for molecular weights Wide Range 14000 – 500000 Da*" para las electroforesis nativas. Estos patrones no son más que una mezcla de proteínas de distintos pesos moleculares de distintas concentraciones.

Se introducen los patrones y las muestras en los geles, se realiza la electroforesis y, una vez secos los geles, se calculan los  $R_f$  de cada una de las proteínas del patrón (cociente entre el desplazamiento de la proteína en el gel y el desplazamiento del frente de la electroforesis), de este modo se obtiene un recta de calibrado en la que se representa  $\log M_r$  (log del peso molecular de la proteína) con respecto al  $R_f$ . En esta recta es posible interpolar los valores de  $R_f$  de las proteínas de la muestra obteniendo así el  $\log M_r$  y posteriormente sus pesos moleculares aproximados.

En la *Figura 2* se muestra una recta de calibrado para la interpolación de los pesos moleculares de las proteínas obtenida con la disolución patrón para electroforesis desnaturalizante de rango de pesos moleculares 6500 – 200000 Da (Sigma-Aldrich).

*Figura 2. Recta de calibrado para la interpolación de los pesos moleculares de las proteínas.*



En principio, para las electroforesis no desnaturalizantes no es posible el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas, ya que éstas no avanzan únicamente atendiendo a su peso molecular, sino que también influye su conformación y su carga electrostática, sin embargo, cuando se trabaja con BN-PAGE, si se han conseguido estimar pesos moleculares trabajando con geles en gradiente [15,54,57].

### **3.4.3 Determinación de metales asociados a proteínas en muestras de plancton**

#### **3.4.3.1 Determinación del contenido total de metales en extractos proteínicos, sin y con preconcentración, por ICP-MS**

Se procede a la determinación del contenido elemental en los extractos de proteínas y en las fracciones de proteínas precipitadas obtenidos del plancton tras aplicar los diferentes métodos de extracción y preconcentración, explicados en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.2.1.a, 3.4.2.1.b y 3.4.2.1.c*, mediante ICP-MS. Sólo se determinaron elementos que según la bibliografía pueden estar asociados a proteínas o metaloenzimas en este tipo de muestras [58].

Los isótopos monitorizados fueron:  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{62}\text{Ni}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  y el  $^{103}\text{Rh}$ .

Previamente, se realizó la detección multielemental en los tampones que se emplearon en los distintos métodos de extracción de las proteínas del plancton (*Tabla 3*). Los resultados mostraron que los contenidos de los elementos de interés se encontraban por debajo de los límites de detección en los distintos tampones empleados, por lo que, para facilitar la experiencia, se lleva a cabo la determinación multielemental en los extractos y las fracciones de proteínas precipitadas procedentes del plancton mediante los distintos métodos de extracción empleando la misma recta de calibrado para todos ellos, preparada en agua ultrapura.

Para medir el contenido en metales del extracto, se diluyen los extractos en una proporción 1/10 (v/v) antes de introducirlos en el ICP-MS para no introducir más del 0,1% de sólidos disueltos en el instrumento. Por otro lado, las fracciones de proteínas precipitadas se disuelven en el agua ultrapura para introducir las en el ICP-MS.

Como recta de calibrado, patrón interno, optimización y condiciones instrumentales del ICP-MS se utilizan las mismas que las expuestas en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.1.2*, con la excepción de que a la recta de calibrado no se le añade la correspondiente matriz ácida (0.23%  $\text{HNO}_3$ , 0.03%  $\text{HCl}$ ).

### 3.4.3.2 Determinación de metales asociados a proteínas por LA-ICP-MS tras su separación mediante 1D-PAGE

La detección de los metales asociados a las proteínas presentes en los extractos y en las fracciones de proteínas precipitadas tras su separación mediante los distintos tipos de electroforesis 1D-PAGE se realiza mediante LA-ICP-MS.

La detección de los metales asociados a las proteínas se realiza sobre geles secos no teñidos, pues, la tinción de los geles conlleva pérdidas de enlace metal-proteína, como fue demostrado anteriormente por el grupo de investigación [17].

Por lo tanto, una vez secado el gel sin haber llevado a cabo su tinción se corta cada carril del gel correspondiente a una muestra en dos mitades y se colocan sobre un portaobjetos recubierto de cinta adhesiva de doble cara para mantener la superficie del gel horizontal durante la ablación. Este portaobjetos se introduce en la celda de ablación y se hace incidir el láser con un barrido que recorre todo el gel.

Antes de realizar la medida se realiza una optimización del instrumento que está recogida en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.1.2*.

El material ablacionado se arrastra con una corriente de Ar hasta el ICP-MS. Se usa el  $^{13}\text{C}$  como patrón interno para corregir la deriva de la señal y se registra la intensidad de la señal a lo largo del tiempo.

Los isótopos monitorizados fueron:  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ , y  $^{13}\text{C}$ .

En la *Tabla 4* se recogen los parámetros instrumentales utilizados en la determinación de metales asociados a proteínas mediante LA-ICP-MS.

*Tabla 4. Condiciones instrumentales y parámetros de adquisición de datos del ICP-MS para la detección de metales asociados a proteínas mediante LA-ICP-MS previa separación por PAGE*

Condiciones instrumentales de LA	
Fuente de luz	Ring
Energía del láser	70% (12 J cm <sup>-2</sup> )
Frecuencia	20 Hz
Diámetro del haz del láser	100 μm
Modo de disparo	Continuo (línea)
Longitud de la línea	Barrido de todo el gel (60000 μm)
Caudal de gas portador (Ar)	1 L min <sup>-1</sup>
Velocidad de barrido	60 μm s <sup>-1</sup>
Profundidad del cráter	5 μm

Condiciones instrumentales de ICP-MS	
Potencia de RF	1100 W
Caudal de gas plasmógeno (Ar)	14 L min <sup>-1</sup>
Parámetros de adquisición de datos	
Barridos/lectura	1
Lecturas/réplica	Según longitud de línea del láser
Réplicas	1
Tiempo de estancia por canal	50 ms
Adquisición de datos	Salto de pico a pico
Detector	Dual
Modo Autolens	Sí

Los datos obtenidos para cada uno de los isótopos se exportan a un software para la adquisición y tratamiento de los datos (*Excell*), donde se convierten los valores de tiempo en distancia (teniendo en cuenta la velocidad de barrido a la que tiene lugar la ablación).

Por último, se comparan las señales de metal obtenidas con las bandas de proteínas observadas en los geles teñidos para poder asignar señales de los metales a ciertas proteínas.

Una explicación más exhaustiva de la preparación de los geles para su análisis mediante LA-ICP-MS está recogida en el *Anexo 6.4*.

### **3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.5.1 Determinación del contenido total de metales en el material de referencia certificado BCR-414 y en el plancton BIO 7120**

Se llevó a cabo la determinación de las concentraciones elementales tanto del *BCR-414* como del *BIO 7120* tras la digestión ácida asistida por microondas como se ha explicado en los apartados de *Procedimientos experimentales 3.4.1.1 y 3.4.1.2*.

Se estudiaron cuatro tipos de calibraciones diferentes, calibración simple normal, calibración simple con patrón interno, calibración ponderada y calibración ponderada con patrón interno, obteniendo los mejores resultados tanto de exactitud como de precisión para el cálculo con calibración ponderada con patrón interno.

Los resultados y el error obtenido para la muestra certificada así como el límite de detección (L.D.) y de cuantificación (L.C.) se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Concentración de metales en el BCR-414 y en el BIO 7120 obtenidos mediante ICP-MS con calibración ponderada con patrón interno

	Coef. Corr. R <sup>2</sup>	LD (mg/kg)	LC (mg/kg)	BCR-414		% Error	BIO 7120
				Valor certificado (mg/kg)	Valor obtenido (mg/kg)		Valor obtenido (mg/kg)
75As	0.9999	0.313	1.04	6.82 ± 0.28	6.08 ± 0.36	-10.9	-
111Cd	0.9999	0.018	0.061	0.383 ± 0.014	0.403 ± 0.006	5.1	0.102 ± 0.003
114Cd	0.9999	0.014	0.046	0.383 ± 0.014	0.417 ± 0.003	9.0	0.102 ± 0.003
59Co	0.9981	0.006	0.020	1.43 ± 0.06*	1.59 ± 0.02	10.9	17.5 ± 1.5
52Cr	0.9981	0.121	0.404	23.8 ± 1.2	24.8 ± 3.6	4.2	1.19 ± 0.12
63Cu	0.9992	0.032	0.107	29.5 ± 1.3	29.4 ± 0.5	-0.3	33.7 ± 3.3
65Cu	0.9985	0.031	0.104	29.5 ± 1.3	29.8 ± 0.2	1.0	34.1 ± 3.3
54Fe	0.9990	11.2	37.5	1850 ± 190*	1647 ± 355	-10.9	5384 ± 466
57Fe	0.9994	3.62	12.1	1850 ± 190*	1878 ± 326	1.6	5477 ± 481
55Mn	0.9977	0.267	0.890	299 ± 13	303 ± 0.3	1.5	930 ± 87
60Ni	0.9986	0.044	0.147	18.8 ± 0.8	21.1 ± 0.1	12.4	5.60 ± 0.35
62Ni	0.9998	0.097	0.324	18.8 ± 0.8	19.7 ± 0.1	4.9	5.31 ± 0.33
206Pb	0.9995	0.071	0.236	3.97 ± 0.19	3.38 ± 0.06	-14.8	1.66 ± 0.29
207Pb	0.9993	0.068	0.227	3.97 ± 0.19	3.55 ± 0.08	-10.7	1.73 ± 0.32
208Pb	0.9990	0.051	0.171	3.97 ± 0.19	3.58 ± 0.15	-9.8	1.69 ± 0.34
66Zn	0.9999	0.206	0.688	111.6 ± 2.5	98.1 ± 2.5	-12.1	66.5 ± 8.4
67Zn	0.9999	2.62	8.72	111.6 ± 2.5	83.4 ± 2.5	-25.2	55.7 ± 7.9
68Zn	0.9999	0.200	0.667	111.6 ± 2.5	100.2 ± 3.9	-10.2	68.5 ± 8.0

\* valores indicativos

En color marrón figuran los elementos que son más abundantes en el material de referencia certificado BCR-414 en comparación con el plancton BIO 7120.

En color azul figuran los elementos que son más abundantes en el plancton BIO 7120 con respecto al material de referencia certificado BCR-414.

No figuran los resultados obtenidos para los dos blancos de extracción porque sus resultados fueron despreciables, es decir, la adición de metales o las interferencias debidas a la adición del HNO<sub>3</sub> y del HCl sobre las muestras no son significativas.

Como se puede observar, el material de referencia certificado BCR-414 posee mayor cantidad de la gran mayoría de elementos a excepción del Fe, el Mn, el Cu y el Co.

Cabe destacar también los altos contenidos de Fe y Mn del plancton BIO 7120.

Las rectas de calibrado son buenas, con coeficientes de regresión entre 0.9977 y 0.9999.

Con respecto a los límites de detección decir que son bajos en la mayoría de los isótopos (<0.267 mg·kg<sup>-1</sup>) a excepción de algunos como <sup>54</sup>Fe (11.2 mg·kg<sup>-1</sup>), <sup>57</sup>Fe (3.62 mg·kg<sup>-1</sup>), <sup>75</sup>As (0.313 mg·kg<sup>-1</sup>), <sup>51</sup>V (2.24 mg·kg<sup>-1</sup>), <sup>67</sup>Zn (2.62 mg·kg<sup>-1</sup>), en los que son más altos debido, en gran medida, a la presencia de interferencia espectrales o contaminación: <sup>54</sup>Fe (<sup>37</sup>Cl<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>40</sup>Ar<sup>14</sup>N<sup>+</sup>, ...); <sup>57</sup>Fe

( $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$ ,...);  $^{75}\text{As}$  ( $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ ,...);  $^{51}\text{V}$  ( $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{38}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ ,  $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$ ,...) y  $^{67}\text{Zn}$  ( $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{2+}$ ,  $^{33}\text{S}^{34}\text{S}^+$ , contaminación...).

Los errores cometidos en la determinación de los elementos del material de referencia certificado *BCR-414* son en general bajos (<11%), dependiendo de los isótopos que se utilicen para la cuantificación del elemento, por lo que podemos concluir que el método utilizado para la determinación multielemental en plancton mediante digestión ácida asistida por microondas e ICP-MS es adecuado.

### **3.5.2 Optimización del método de preparación de muestras previo al proceso electroforético**

En estudios iniciales para la extracción de las proteínas del plancton *BCR-414* se comenzó trabajando con un procedimiento de extracción descrito en la bibliografía para la extracción de proteínas en distintas muestras biológicas como algas rojas marinas [59] o muestras de pez gato [51], al método utilizado se le denominó *Método 1* y el tampón de extracción utilizado es Tris-HCl 25 mM pH 7.5 en presencia de inhibidor de proteasas.

En este caso se optó por realizar el proceso de extracción a *temperatura constante de 4°C*, favoreciendo la estabilidad de las proteínas.

Posteriormente se estudió el efecto del tiempo y tipo de agitación, realizando tres experiencias: agitación mecánica durante 24 horas, agitación mecánica durante 48 horas, agitación con ultrasonidos durante 20 segundos, obteniendo los mejores resultados trabajando con *agitación mecánica durante 48 horas*.

Una vez optimizados estos parámetros, a continuación, se compararon distintos métodos de extracción (usando distintos tampones de extracción pero manteniendo la agitación mecánica durante 48 horas a 4°C), de preconcentración y purificación de los extractos atendiendo a su eficiencia en la extracción de proteínas y de los metales asociados a las mismas.

#### **3.5.2.1 Comparación de distintos métodos de extracción y preconcentración y su influencia en la concentración de proteínas extraídas de plancton**

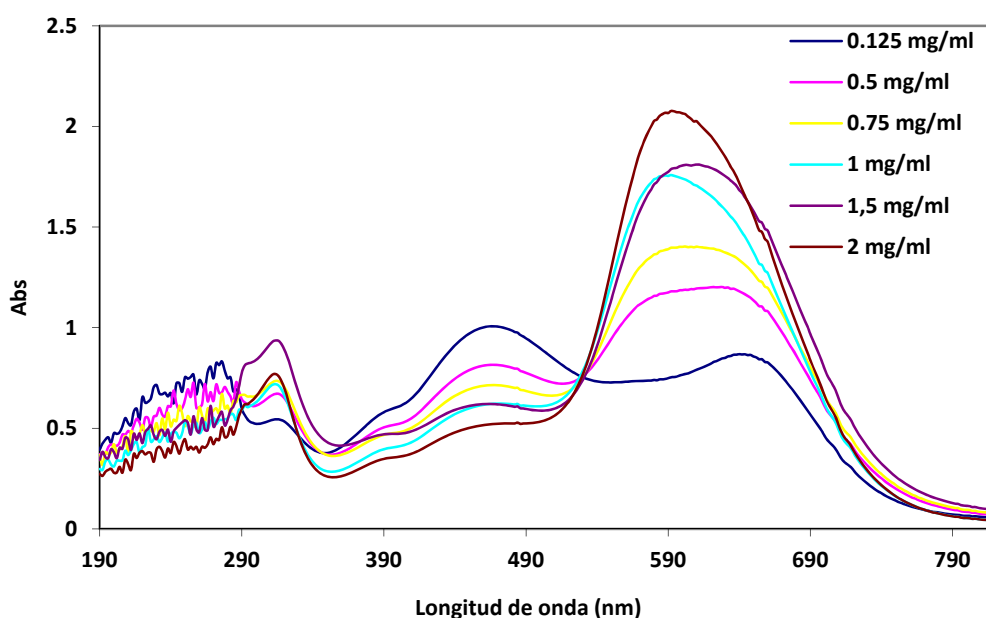
Con el objeto de determinar cuál es el método de extracción de proteínas más eficiente se realizó un *ensayo Bradford* para la determinación del contenido total de proteínas tanto de los *extractos directos* como de las *fracciones de proteínas precipitadas* del plancton *BCR-414*.

Los tampones de extracción utilizados (ver *Tabla 3*) así como los procesos que se han de llevar a cabo se han resumido en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.2.1.a, 3.4.2.1.b, 3.4.2.1.c*.

El procedimiento de medida de las muestras y de la realización de la recta de calibrado está expuesto en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.2.1.d*.

En la *Figura 3* se muestran los espectros de absorción obtenidos para los patrones de albúmina de suero bovino.

*Figura 3. Espectros obtenidos en la medida de los patrones de albúmina de suero bovino para la realización de la recta de calibrado*



La recta de calibrado obtenida fue:  $y = 1.0200x + 0.5783$ ;  $R^2 = 0.9901$

El rango lineal de este método abarca desde  $0.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteínas.

Para comprobar la exactitud del método, se prepararon dos disoluciones de albúmina de concentración conocida, así como una mezcla de albúmina, mioglobina e inhibidor de tripsina.

En la *Tabla 6* se muestran los resultados obtenidos para cada una de las disoluciones de proteínas de concentración conocida.

*Tabla 6. Resultados del contenido en proteínas de las disoluciones de concentración conocida mediante el ensayo Bradford*

	Concentración real (mg·mL <sup>-1</sup> )	Concentración ensayo Bradford (mg·mL <sup>-1</sup> )	Error (%)
<b>Albúmina 1</b>	0.222	0.239	<b>7.4</b>
<b>Albúmina 2</b>	0.894	0.844	<b>-5.5</b>
<b>Mezcla (Alb + Mio + Inh. Trip)</b>	0.498	0.461	<b>-7.5</b>

Los errores cometidos en la determinación del contenido total de proteínas en las distintas disoluciones son menores del 7.5%.

En la *Tabla 7* figuran los resultados obtenidos en la determinación de la cantidad total de proteínas tanto en los extractos directos como en la fracción de proteínas precipitadas.

*Tabla 7. Determinación de la concentración de proteínas mediante ensayo Bradford*

	Extractos directos (mg·g <sup>-1</sup> )	Proteínas precipitadas (mg·g <sup>-1</sup> )
<b>Método 1</b>	<b>15.7 ± 0.1</b>	<b>15.5 ± 0.4</b>
<b>Método 2A</b>	13.9 ± 0.4	-
<b>Método 2B</b>	12.6 ± 0.3	15.2 ± 0.1
<b>Método 2A'</b>	12.4 ± 0.1	12.5 ± 0.3
<b>Método 3</b>	13.2 ± 0.2	11.9 ± 0.3

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que las eficiencias de extracción de los distintos procesos son similares aunque mediante el *Método 1* se obtiene una eficiencia algo mayor.

Para determinar la influencia del Tris en el proceso de extracción, se compara el *Método 2A* (5 mM de Tris), contenido menor de Tris, y el *Método 2A'* (25 mM de Tris) observándose como la extracción mediante el *Método 2A* (13.9 mg·g<sup>-1</sup>) fue algo mayor que con el *Método 2A'* (12.4 mg·g<sup>-1</sup>) confirmando los resultados obtenidos previamente por *Schmidt et al.* [53].

En lo que respecta a la influencia del SDS (1%) en el proceso de extracción, puede observarse como, la presencia de éste en el tampón de extracción (*Método 2B*) (12.6 mg·g<sup>-1</sup>) no lleva asociado un aumento significativo de la capacidad de extracción de proteínas (*Método 2A*) (13.9 mg·g<sup>-1</sup>). La presencia de SDS supone una mayor extracción de proteínas de membrana hidrofóbicas por lo que la fracción de este tipo de proteínas no es significativa en este tipo de muestras de plancton.



Otra de las conclusiones que se pueden extraer de estas experiencias es que la precipitación con acetona no ocasiona una pérdida significativa de proteínas, por lo que puede ser recomendable para preconcentrar y purificar los *extractos directos* o *ultrafiltrados* antes de su introducción en los geles de electroforesis.

### **3.5.2.2 Comparación de distintos métodos de extracción y preconcentración y su influencia en la concentración de metales en los extractos de proteínas de plancton**

Esta experiencia se realizó con el objeto de determinar cuál es el método de extracción que es capaz de extraer mayor cantidad de metales, para ello, se realizaron medidas de los *extractos directos* así como de las *fracciones de proteínas precipitadas* (extraídos por los distintos métodos de extracción descritos en la *Tabla 3*) del *BCR-414* mediante ICP-MS.

Los tampones de extracción utilizados (ver *Tabla 3*) así como los procesos que se han de llevar a cabo se han resumido en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.2.1.a, 3.4.2.1.b, 3.4.2.1.c*.

El procedimiento de medida de las muestras y de la realización de la recta de calibrado está expuesto en el apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.3.1*.

Observando los valores certificados de concentración de los metales que es más probable encontrar unidos a proteínas en este tipo de muestras (Cd, Co, Cu, Pb, Zn) [58], vemos que en el *BCR-414* algunos son bastante bajos ( $0.383 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cd,  $1.43 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Co,  $29.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu,  $3.97 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Pb). Por tanto, es de esperar que los niveles de concentración de posibles metales asociados a proteínas sean todavía inferiores a estas concentraciones totales.

En la *Tabla 8* se recogen los porcentajes de extracción de metales para cada uno de los métodos de extracción utilizados tanto en los extractos directos como en las fracciones de proteínas precipitadas con acetona.

En las *Figuras 4 y 5* se recogen los resultados de los % de extracción de metales expuestos en la *Tabla 8*, pero en forma de gráfico.

*Tabla 8. Porcentaje de extracción de metales, tanto en los extractos directos como en las fracciones de proteínas precipitadas tras los distintos métodos de extracción, obtenidos mediante ICP-MS con calibración ponderada con patrón interno*

BCR-414	EXTRACTOS DIRECTOS						FRACCIONES PROTEÍNAS PRECIPITADAS			
	Valor (mg/kg)	Mét. 1 (%)	Mét. 2A (%)	Mét. 2B (%)	Mét. 2A' (%)	Mét. 3 (%)	Mét. 1 (%)	Mét. 2A (%)	Mét. 2B (%)	Mét. 3 (%)
<b>111Cd</b>	0.383±0.014	34.2	28.7	31.2	32.9	32.7	36.3	25.4	26.1	37.7
<b>114Cd</b>	0.383±0.014	34.1	27.9	30.7	33.8	33.4	37.1	26.6	26.4	37.5
<b>59Co</b>	1.43±0.06	32.0	26.5	26.7	31.0	30.9	28.7	27.0	30.0	32.0
<b>63Cu</b>	29.5±1.3	46.3	42.2	43.0	46.7	46.5	45.1	31.0	33.2	42.4
<b>65Cu</b>	29.5±1.3	45.9	42.0	42.9	46.4	46.1	44.7	30.8	32.8	42.1
<b>55Mn</b>	299±13	6.2	5.5	5.6	6.6	6.2	5.1	4.2	4.4	6.0
<b>60Ni</b>	18.8±0.8	15.8	14.7	15.0	18.1	16.5	17.8	13.1	14.2	17.9
<b>62Ni</b>	18.8±0.8	14.5	14.6	14.2	16.7	15.2	14.8	11.2	12.4	15.0
<b>206Pb</b>	3.97±0.19	2.3	3.2	2.3	2.7	2.1	2.1	1.9	2.1	2.4
<b>207Pb</b>	3.97±0.19	2.4	3.3	2.5	2.8	2.2	2.3	2.1	2.3	2.5
<b>208Pb</b>	3.97±0.19	2.4	3.3	2.4	2.7	2.2	2.3	2.1	2.3	2.4
<b>66Zn</b>	111.6±2.5	23.9	23.3	24.2	24.9	23.5	24.1	24.0	23.7	24.5
<b>67Zn</b>	111.6±2.5	19.8	19.2	20.1	20.5	19.5	19.9	19.8	19.5	20.1
<b>68Zn</b>	111.6±2.5	23.8	23.2	24.2	24.7	23.3	24.1	24.0	23.6	24.3

A la vista de los resultados obtenidos puede concluirse que las eficiencias de extracción para los metales objeto de estudio tras los distintos métodos de extracción son muy similares, y, en general, bastante bajas. Así, si analizamos los resultados obtenidos en el análisis de los extractos directos, puede verse como el <sup>111</sup>Cd posee eficiencias de extracción que oscilan entre el 34.2%-28.7%, el <sup>59</sup>Co entre el 32%-26.5%, el <sup>63</sup>Cu entre el 46.7%-42.2%, el <sup>55</sup>Mn entre el 6.6%-5.5%, el <sup>60</sup>Ni entre el 18.1%-14.7%, el <sup>206</sup>Pb entre el 3.2%-2.1% y el <sup>66</sup>Zn entre el 24.9%-23.3%.

En las Figuras 4 y 5 puede observarse gráficamente dichas similitudes en el porcentaje de extracción de los distintos metales.

Figura 4. Resultados obtenidos como porcentaje de extracción de metales en los extractos directos del BCR-414

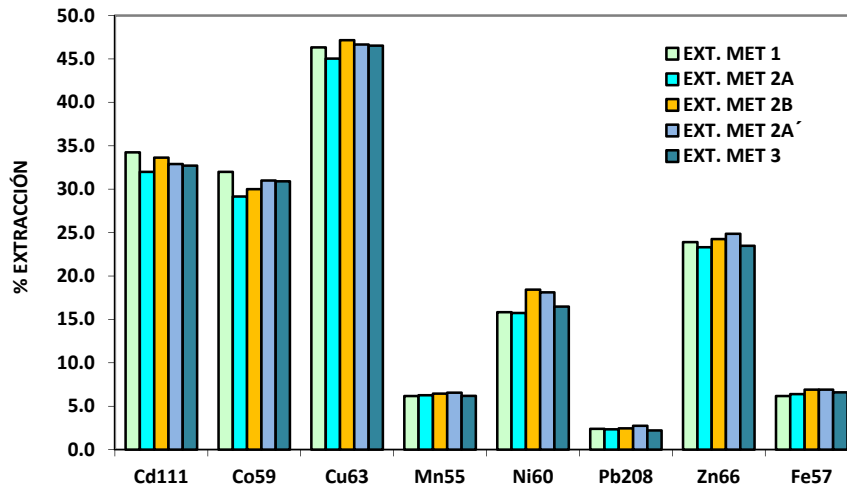
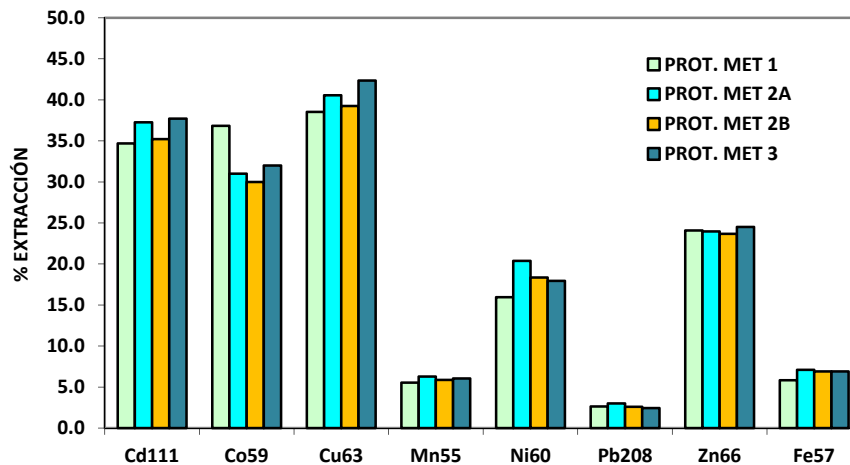


Figura 5. Resultados obtenidos como porcentaje de extracción de metales en las fracciones de proteínas precipitadas con acetona del BCR-414



Se puede observar que, con respecto a la concentración de Tris, cuando el tampón presenta mayor concentración del mismo (*Método 2A'*, 25 mM de Tris), la cantidad de metales extraídos es mayor (*Método 2A*, 5 mM Tris), aunque estas diferencias son menores del 4.5%.

La influencia del SDS en el proceso de extracción es menor, el porcentaje de extracción de metales es algo mayor en el *Método 2B* con el 1% de SDS que en el *Método 2A* que no emplea SDS, aunque estas diferencias son poco significativas, incrementos de extracción menores del 2.5%.

El porcentaje de extracción para *extractos directos* y *fracciones de proteínas precipitadas* es muy similar, lo que indica que todo el metal que se extrae se encuentra unido a las proteínas.

A la vista de las dos comparativas, tanto de la eficiencia de extracción de proteínas como de metales, se propone trabajar con el *Método 1 de extracción* (25 mM Tris + 5 mg·mL<sup>-1</sup> de *inhibidor de proteasas*), con ultrafiltración y precipitación.

Una vez concluido que el *Método 1* es el óptimo para la extracción tanto de proteínas como de metales asociados a las mismas, se realiza la determinación de metales en los extractos directos y en las fracciones de proteínas precipitadas para la muestra de plancton *BIO 7120*.

En la *Tabla 9* figuran los coeficientes de regresión de las rectas obtenidas para cada isótopo, así como las concentraciones obtenidas y los porcentajes de extracción para las dos muestras estudiadas.

*Tabla 9. Resultados obtenidos en los extractos directos y en las fracciones de proteínas precipitadas tanto para el BCR-414 como para el BIO 7120 mediante ICP-MS con calibración ponderada con patrón interno*

Analito	Coef. Corr. R <sup>2</sup>	BCR-414				BIO 7120			
		Extracto directo (mg/kg)	% EXT	Prot. Prec. (mg/kg)	% EXT	Extracto directo (mg/kg)	% EXT	Prot. Prec. (mg/kg)	% EXT
111Cd	0.9989	0.131±0.019	34.2	0.126±0.002	36.3	0.031±0.06	30.4	0.031±0.003	30.4
114Cd	0.9999	0.131±0.025	34.1	0.126±0.003	37.1	0.025±0.002	24.5	0.027±0.002	26.5
59Co	0.9944	0.456±0.069	32.0	0.466±0.007	28.7	7.37±0.30	42.1	7.75±0.59	44.3
63Cu	0.9992	13.7±0.2	46.3	10.9±0.1	46.5	6.99±0.42	20.8	6.34±0.37	18.8
65Cu	0.9996	13.5±0.2	45.9	10.9±0.1	46.1	7.18±0.30	21.1	6.00±0.14	17.6
57Fe	0.9959	114±2	6.2	99.7±1.5	5.8	271±31	4.9	299±15	5.5
55Mn	0.9969	18.4±0.4	6.2	17.2±0.1	5.1	187±9	20.1	198±10	21.3
60Ni	0.9984	2.97±0.04	15.8	2.72±0.03	17.8	1.76±0.11	31.4	1.83±0.13	32.8
62Ni	0.9952	2.73±0.08	14.5	2.32±0.04	14.8	1.68±0.09	37.4	1.75±0.13	33.0
206Pb	0.9980	0.096±0.013	2.3	0.102±0.04	2.1	0.104±0.017	6.3	0.131±0.004	7.9
207Pb	0.9981	0.096±0.019	2.4	0.106±0.03	2.3	0.110±0.018	6.4	0.139±0.004	8.0
208Pb	0.9968	0.094±0.018	2.4	0.110±0.03	2.3	0.109±0.018	6.4	0.134±0.001	7.9
66Zn	0.9999	26.7±0.4	23.9	23.6±0.3	24.1	17.7±0.9	26.6	21.4±0.2	32.1
67Zn	0.9952	22.1±0.4	19.8	20.6±0.2	19.9	14.5±0.8	26.0	17.2±0.3	30.8
68Zn	0.9998	26.6±0.4	23.8	23.8±0.3	24.1	17.9±0.7	26.2	21.6±0.4	31.6

*En color marrón figuran los elementos que son más abundantes en el material de referencia certificado BCR-414 en comparación con el plancton BIO 7120.*

*En color azul figuran los elementos que son más abundantes en el plancton BIO 7120 con respecto al material de referencia certificado BCR-414.*

Como se puede observar, el extracto del material de referencia certificado *BCR-414* posee mayor concentración de la gran mayoría de elementos a excepción del Fe, el Mn, el Pb y el Co aunque cabe destacar, de igual manera que en la determinación de metales totales después de la digestión ácida asistida por microondas, el plancton *BIO 7120* poseía también mayores concentraciones de Fe y Mn.

Otra de las conclusiones que es posible sacar es que la precipitación de las proteínas con acetona no conlleva una pérdida significativa de metales, ya que los % de extracción son similares con y sin precipitación de proteínas. Esto ya se había comprobado en el apartado de *Resultados y discusión 3.5.2.2*. De esta manera se puede concluir que los metales extraídos se encuentran unidos a las proteínas.

En las *Figuras 6 y 7* se recoge una comparativa de los resultados de los porcentajes de extracción de metales tanto en los *extractos directos* como en las *fracciones de proteínas precipitadas* para el *BCR-414* y para el *BIO 7120*.

*Figura 6. Comparativa de los porcentajes de extracción de metales mediante el Método 1 en los extractos directos del BCR-414 y del BIO 7120*

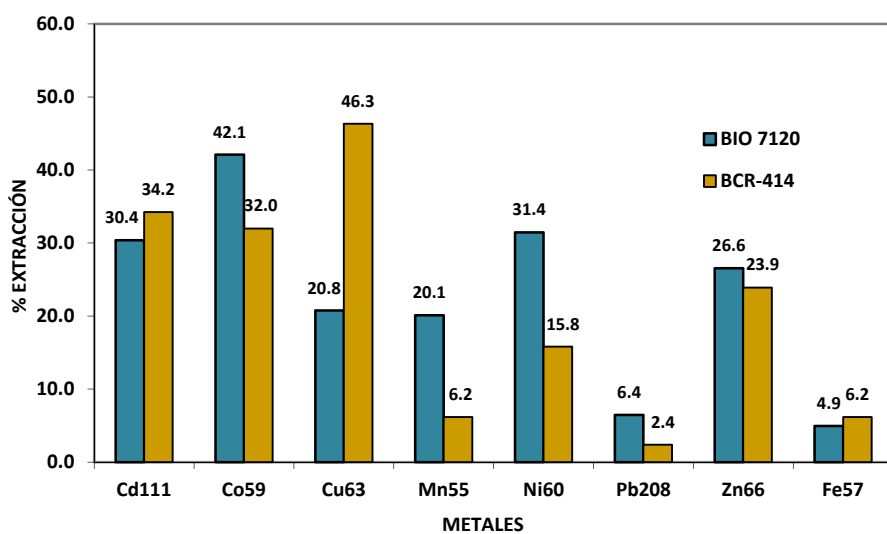
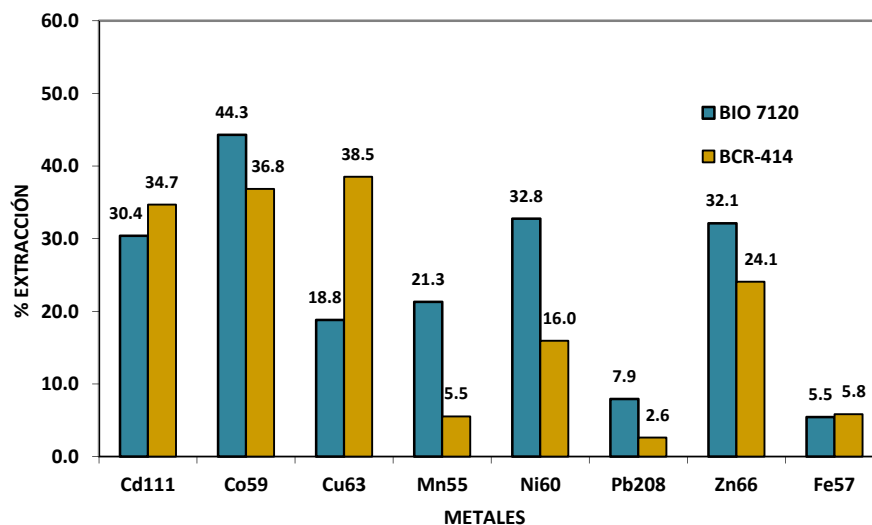


Figura 7. Comparativa de los porcentajes de extracción de metales en las fracciones de proteínas precipitadas del BCR-414 y del BIO 7120



Los resultados obtenidos en los extractos directos y en las fracciones de proteínas precipitadas son bastante similares.

Cabe destacar la mayor capacidad de extracción del *Método 1* del Co, del Ni, del Pb, del Zn, pero sobre todo del Mn en el plancton *BIO 7120*. En cambio, la eficiencia de extracción del Cd y, en especial del Cu, es mayor en el *BCR-414*.

Como se desprende de las tablas y figuras anteriormente expuestas, *las cantidades de metales asociadas a proteínas tras su extracción son especialmente bajas*, lo que puede suponer un problema a la hora de determinar los metales asociados a las distintas proteínas mediante LA-ICP-MS tras su separación por 1D-PAGE.

### 3.5.3 Optimización del método de separación de proteínas en plancton

El método electroforético más utilizado para llevar a cabo la separación de las proteínas en muestras biológicas es la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE. Se trata de una electroforesis desnaturante que permite un cálculo sencillo de los pesos moleculares de las proteínas. En cambio, para el análisis de los geles mediante LA-ICP-MS, es necesario el uso de la electroforesis Blue-Native-PAGE, electroforesis no desnaturante que se realiza en condiciones menos drásticas que la citada anteriormente permitiendo que los enlaces metal-proteína más lábiles se mantengan.

### 3.5.3.1 SDS-Tris-Glicina-PAGE

Se realizó la separación de las proteínas extraídas tanto para el *BCR-414* como para el *BIO 7120* aplicando el método descrito en el Anexo 6.2.2.

Para la extracción se aplicó el Método 1, con ultrafiltración y precipitación, los tres métodos se encuentran descritos en los apartados *Procedimientos Experimentales 3.4.2.1.a, 3.4.2.1.b y 3.4.2.1.c.*

Se optimizó el porcentaje de bis/acrilamida de los gels realizando distintas pruebas y observando en que gel se obtenía una mejor resolución. De tal forma se probaron distintas opciones.

SDS-Tris-Glicina-PAGE, gels con gel concentrador y gel separador:

- % bis/acrilamida 4-10 %
- % bis/acrilamida 4-12 %
- % bis/acrilamida 4-14 %

Se obtuvo mayor resolución para el gel de % **bis/acrilamida 4-10 %**.

Tanto en la *Figura 8* como en la *Tabla 10* se muestran los resultados de las bandas de proteínas obtenidas tras el cálculo de los pesos moleculares para el *BCR-414* y el *BIO 7120* en la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE 4-10% bis/acrilamida tras tinción con azul de Coomassie.

*Figura 8. Determinación de los pesos moleculares de las bandas de proteínas en los extractos tras separación mediante electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE 4-10% bis/acrilamida tras tinción con azul de Coomassie para el a) BCR-414 y el b) BIO 7120*

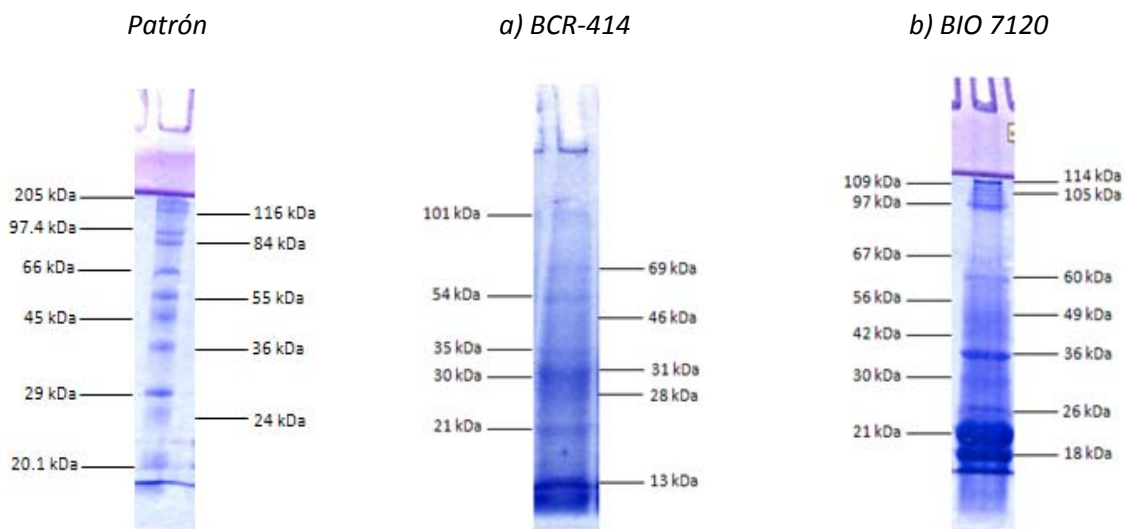


Tabla 10. Pesos moleculares de las proteínas observadas en el BCR-414 y en el BIO 7120

BCR-414	BIO 7120
	114 kDa
	109 kDa
<b>101 kDa</b>	<b>105 kDa</b>
	97 kDa
<b>69 kDa</b>	<b>67 kDa</b>
	60 kDa
<b>54 kDa</b>	<b>56 kDa</b>
<b>46 kDa</b>	<b>49 kDa</b>
	42 kDa
<b>35 kDa</b>	<b>36 kDa</b>
31 kDa	
<b>30 kDa</b>	<b>30 kDa</b>
<b>28 kDa</b>	<b>26 kDa</b>
<b>21 kDa</b>	<b>21 kDa</b>
	18 kDa
13 kDa	

Se observan algunas similitudes entre los resultados obtenidos para el *BCR-414* y el *BIO 7120*, debido a que, probablemente, posean proteínas similares en sus microorganismos.

Además, en ambos casos, el grueso de las proteínas encontrado presenta pesos moleculares de entre 13 y 69 kDa, algo que se corresponde con lo propuesto por otros autores [59,60], que encontraron proteínas de entre 14 y 72 kDa siendo las principales bandas de proteínas obtenidas las de 14, 29, 37, 48, 60 y 72 kDa.

Una de las posibles proteínas observadas es la anhidrasa carbónica. Esta proteína posee un peso molecular aproximado de 30 kDa y cumple una función muy importante durante la fotosíntesis [31,61].



### 3.5.3.2 Blue-Native-PAGE

Como se ha citado en anteriores ocasiones, la electroforesis BN-PAGE es una electroforesis no desnaturizante que utiliza la tricina como ión de arrastre. Este tipo de electroforesis facilita la preservación del enlace metal-proteína ya que se realiza en condiciones menos drásticas, preservando tanto la carga como la conformación de las proteínas.

Se realizó la separación de las proteínas extraídas tanto para el *BCR-414* como para el *BIO 7120* aplicando el método descrito en el *Anexo 6.2.3*.

Para la extracción se aplicó el Método 1, con ultrafiltración y precipitación, los tres métodos se encuentran descritos en los apartados *Procedimientos Experimentales 3.4.2.1.a, 3.4.2.1.b y 3.4.2.1.c*.

Se optimizó el porcentaje de bis/acrilamida de los geles realizando distintas pruebas y observando en que gel se obtenía una mejor resolución. De tal forma se probaron distintas opciones.

Blue-Native-PAGE, geles en gradiente para conseguir mayor resolución en muestras con gran cantidad de proteínas distintas [15,57,62]:

- % bis/acrilamida 4-14 %
- % bis/acrilamida 4-16 %
- **% bis/acrilamida 4-20 %**
- % bis/acrilamida 8-16 %

Se obtuvo mayor resolución para el gel de **% bis/acrilamida 4-20 %**.

Aunque en este tipo de electroforesis las proteínas avanzan atendiendo, no sólo a sus pesos moleculares sino que también influyen su conformación y su carga (ya que no están desnaturizadas), algunos autores han estimado sus pesos moleculares [15,54,57] trabajando en gradiente y utilizando patrones especiales para electroforesis no desnaturizantes.

Tanto en la *Figura 9* como en la *Tabla 11* se muestran los resultados obtenidos para el *BCR-414* y el *BIO 7120* en la electroforesis Blue-Native-PAGE 4-20% bis/acrilamida en gradiente tras tinción con azul de Coomassie.

Figura 9. Determinación de los pesos moleculares de las bandas de proteínas en los extractos tras separación mediante electroforesis Blue-Native -PAGE 4-20% bis/acrilamida en gradiente tras tinción con azul de Coomassie para el a) BCR-414 y el b) BIO 7120

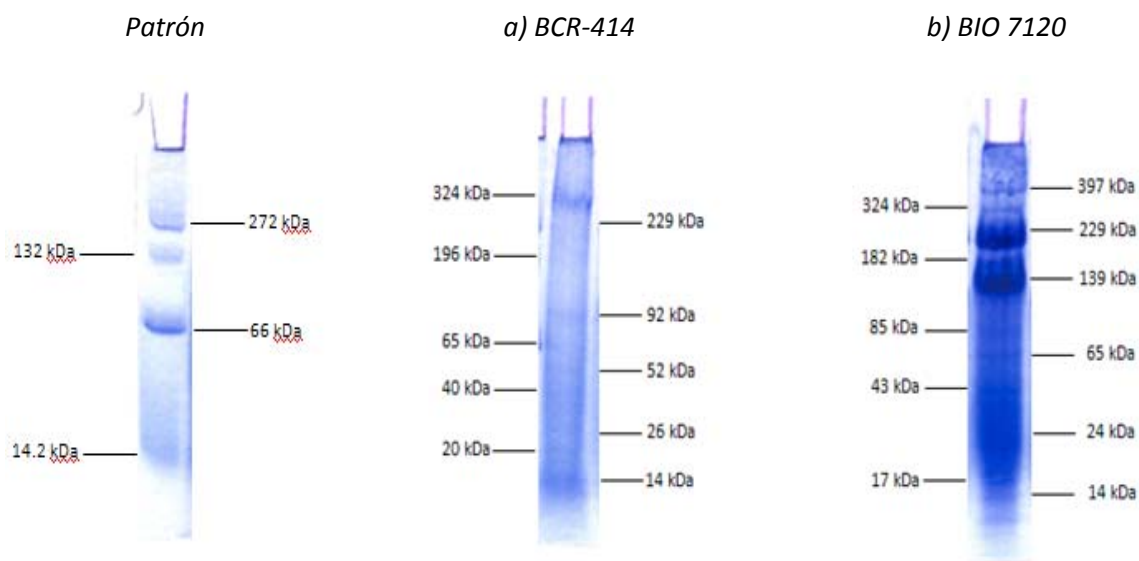


Tabla 11. Pesos moleculares de las proteínas observadas en el BCR-414 y en el BIO 7120

BCR-414	BIO 7120
	397 kDa
<b>324 kDa</b>	<b>324 kDa</b>
<b>229 kDa</b>	<b>229 kDa</b>
196 kDa	
	182 kDa
	139 kDa
<b>92 kDa</b>	
	85 kDa
<b>65 kDa</b>	<b>65 kDa</b>
52 kDa	
	43 kDa
40 kDa	
<b>26 kDa</b>	<b>24 kDa</b>
20 kDa	
	17 kDa
<b>14 kDa</b>	<b>14 kDa</b>

En este caso, los resultados del *BCR-414* y del *BIO 7120* difieren algo más que en la SDS-Tris-Glicina-PAGE, sobre todo porque se obtiene menor resolución en la separación de las proteínas, aún así, pueden observarse ciertas proteínas que poseen similar desplazamiento

electroforético, alguna de ellas, conduce a una señal bastante intensa como pueden ser las proteínas de 324, 229, 65, 40, 26 y 14 kDa.

### **3.5.4 Estudio de las asociaciones metal-proteína mediante LA-ICP-MS tras su separación por 1D-PAGE**

Por último, se procedió al estudio de asociaciones metal-proteína mediante LA-ICP-MS resumido en el *Anexo 6.4*, tras los distintos métodos electroforéticos explicados en el apartado de *Anexos 6.2.2* y *6.2.3*.

#### **3.5.4.1 SDS-Tris-Glicina-PAGE**

Para la extracción de las proteínas, tanto de *BCR-414* como el *BIO 7120*, se utilizó el *Método 1*. A continuación se realizó la ultrafiltración de los *extractos directos* y posteriormente se precipitaron sus *fracciones proteicas*. Después se separaron sus respectivas *fracciones proteicas* mediante electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE 4-10% de bis/acrilamida (*Anexo 6.2.2*) y se llevaron a análisis por LA-ICP-MS.

#### **PLANCTON BCR-414**

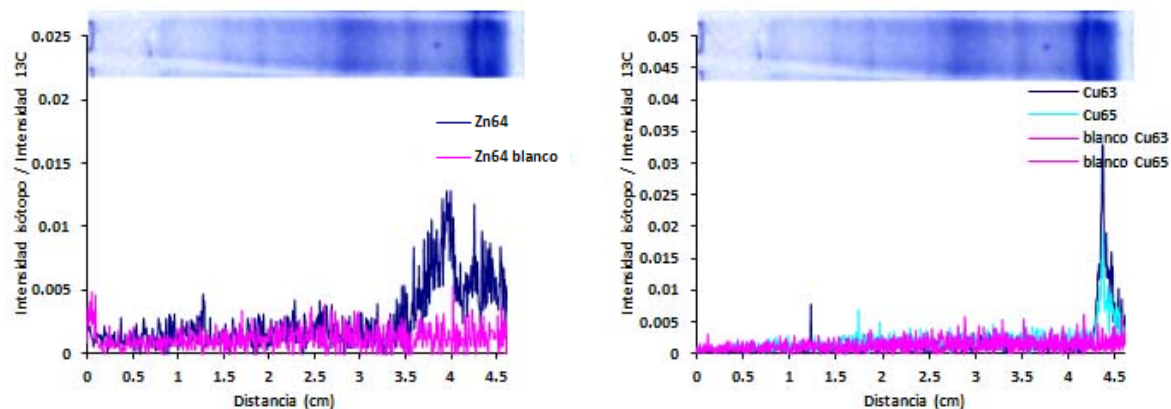
Los resultados obtenidos para el plancton *BCR-414* se muestran en la *Figura 10*.

En el caso del *BCR-414*, sólo se observan señales significativas para Cu y Zn. Como se puede observar, las señales de ambos metales se corresponden con el frente de la electroforesis.

Estos datos corroboran los resultados obtenidos en anteriores estudios realizados por nuestro grupo de investigación con proteínas puras asociados a metales trabajando mediante SDS-Tris-Glicina-PAGE, en estos estudios, se prueba que trabajando con este tipo de electroforesis puede producirse rotura del enlace metal-proteína si éstos no son lo suficientemente fuertes, haciendo que los metales avancen con el frente de la electroforesis [17].

No se obtienen señales significativas para los demás isótopos monitorizados.

Figura 10. Resultados obtenidos mediante LA-ICP-MS previa separación por SDS-Tris-Glicina-PAGE 4-10% de bis/acrilamida para el plancton BCR-414



### PLANCTON BIO 7120

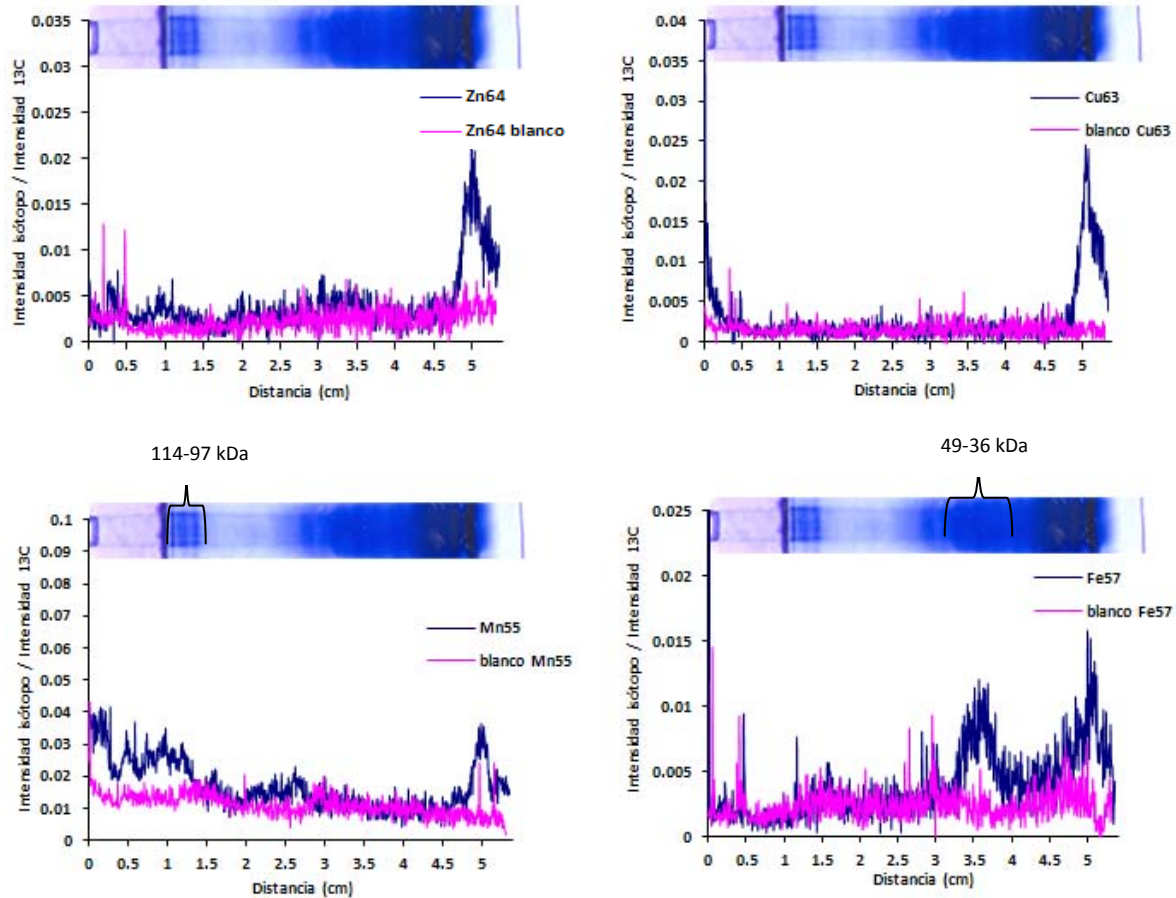
Los resultados obtenidos para el plancton *BIO 7120* se muestran en la *Figura 11*.

En el caso el plancton *BIO 7120*, además de las señales de Cu y Zn en el frente de la electroforesis, se observan también algunas señales de Fe y Mn correspondientes a la banda de 114-97 kDa para el Mn y de 49-36 kDa para el Fe, algo que era de esperar tras los altos contenidos de estos elementos obtenidos en los análisis de *totales* y de los *extractos directos* o de *proteínas precipitadas*.

Sin embargo, las señales más intensas se encuentran en el frente de la electroforesis, pues es posible que estos enlaces metal-proteína no sean lo suficientemente fuertes como para soportar las condiciones desnaturizantes necesarias en la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE.

No se obtuvieron señales significativas para los demás isótopos monitorizados.

Figura 11. Resultados obtenidos mediante LA-ICP-MS previa separación por SDS-Tris-Glicina-PAGE 4-10% de bis/acrilamida para el plancton BIO 7120



### 3.5.4.2 Blue-Native-PAGE

Para la extracción de las proteínas, tanto de *BCR-414* como el *BIO 7120*, se utilizó el *Método 1*. Posteriormente se realizó la ultrafiltración de los *extractos directos* y a continuación se precipitaron sus *fracciones proteicas*. Después se separaron sus respectivas *fracciones proteicas* mediante electroforesis Blue-Native-PAGE 4-20% de bis/acrilamida en gradiente (*Anexo 6.2.3*) y se llevaron a análisis por LA-ICP-MS.

**PLANCTON BCR-414**

Los resultados obtenidos para el plancton *BCR-414* se muestran en la *Figura 12*.

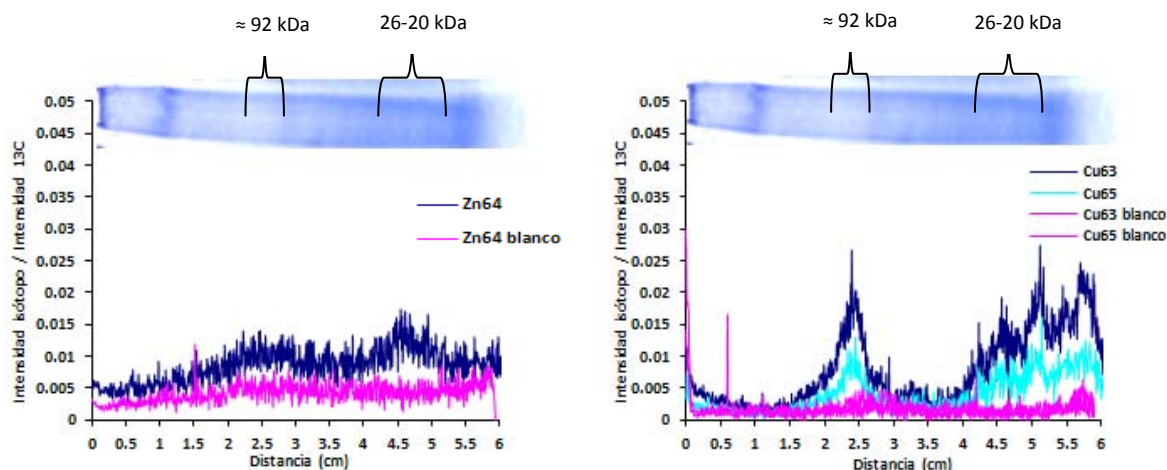
En el caso del *BCR-414* únicamente se obtuvieron señales de Cu y Zn, pero en este caso sí es posible asociarlas a determinadas proteínas.

Tanto para el Cu como para el Zn aparecen señales asociadas a las proteínas con pesos moleculares altos  $\approx 92$  kDa y para las proteínas de menores pesos moleculares 26-20 kDa. Es destacable la alta sensibilidad obtenida para la señal de Cu.

No se obtuvieron señales significativas para los demás isótopos monitorizados.

Por tanto, podemos concluir que la muestra de plancton *BCR-414* tiene Cu y Zn asociados a las bandas de proteínas de peso molecular  $\approx 92$  y de 26-20 kDa.

*Figura 12. Resultados obtenidos mediante LA-ICP-MS previa separación por Blue-Native-PAGE 4-20% de bisacrilamida en gradiente para el plancton BCR-414*

**PLANCTON BIO 7120**

Los resultados obtenidos para el plancton *BIO 7120* se muestran en la *Figura 13*.

Para el plancton *BIO 7120* se observaron señales de Cu, Zn, Fe y Mn.

En el caso del Zn y el Mn las señales aparecen en dos bloques, primeramente asociadas a proteínas de pesos moleculares bastante altos, 100-85 kDa, y posteriormente un señal muy ancha, que abarca proteínas de menores pesos moleculares, 85-24 kDa.

Cabe destacar la alta intensidad de la señal de Mn aunque como puede observarse, la resolución no es muy buena debido a que, al trabajar con BN-PAGE, las proteínas avanzan más despacio y se obtienen peores resoluciones.

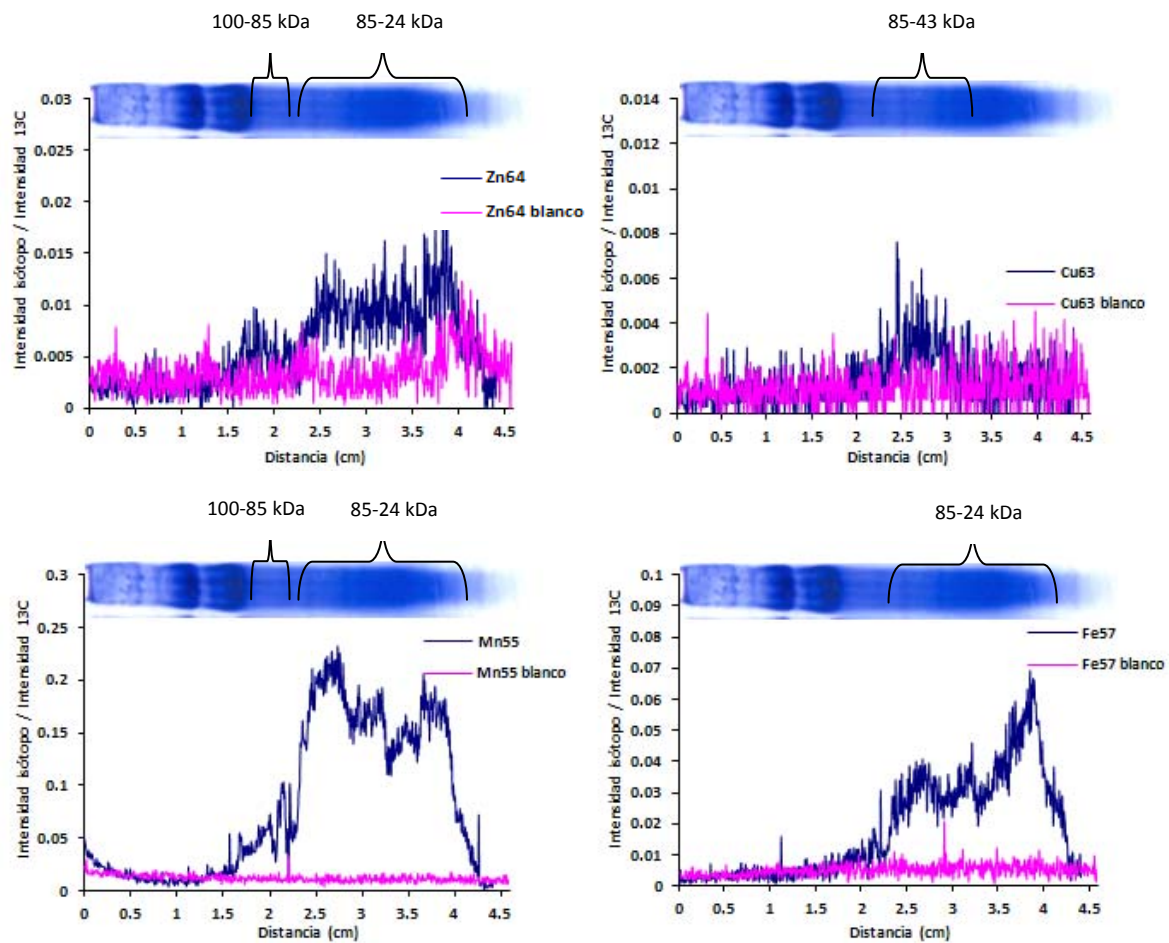
El Cu por su parte aparece asociado a proteínas de pesos moleculares medios, 85-43 kDa, en una señal bastante pequeña, difícil de distinguir del blanco.

Por último el Fe, aparece asociado a proteínas de menores pesos moleculares, 65-24 kDa, resultado similar al obtenido tras la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE.

No se obtienen señales significativas para los demás isótopos monitorizados.

Por tanto, podemos concluir que el plancton *BIO 7120* tiene Zn y Mn asociado a las bandas de proteínas de 100-24 kDa, Cu asociado a proteínas entre 85-43 kDa y Fe asociado a bandas de proteínas entre 65-24 kDa.

Figura 13. Resultados obtenidos mediante LA-ICP-MS previa separación por Blue-Native-PAGE 4-20% de bisacrilamida en gradiente para el plancton *BIO 7120*





## 4. CONCLUSIONES

A continuación, se muestran las conclusiones más importantes a modo de resumen:

- La determinación multielemental en muestras de plancton (*BCR-414* y *BIO 7120*) mediante ICP-MS tras digestión ácida ( $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$ ) asistida por microondas ha proporcionado buenas exactitudes con errores inferiores al 11% para casi todos los isótopos estudiados, además, se obtuvieron buenos coeficientes de correlación con valores de  $R > 0.997$  utilizando calibración ponderada con  $^{103}\text{Rh}$  como patrón interno.
- Se ha optimizado el procedimiento de extracción de las proteínas de una muestra certificada de plancton (*BCR-414*) estudiando la influencia de factores como el tipo de agitación, la concentración de Tris y la presencia de reactivos como SDS, TCEP y PVP, para posteriormente llevar a cabo la separación de las mismas mediante técnicas electroforéticas. Esta optimización se ha basado en la máxima extracción de proteínas, así como en el mantenimiento del enlace metal-proteína. El método de extracción que, en general, proporcionó mejores resultados en cuanto a la extracción tanto de proteínas como de metales fue el que utilizaba un tampón de extracción que contenía Tris 25 mM e inhibidor de proteasas  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  con agitación mecánica durante 48 horas. Se obtuvieron porcentajes de extracción, en general bastante bajos, que van desde el 2% para Pb hasta el 45% para Cu en fracciones de proteínas de plancton cuyos contenido eran de  $15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ .
- Se ha determinado el contenido total de metales en las fracciones proteicas del plancton mediante ICP-MS, obteniendo mayores concentraciones de Cd, Cu, Ni y Zn para el *BCR-414* y de Co, Fe, Mn y Pb para el *BIO 7120*.
- Se ha optimizado el proceso de separación de las proteínas del plancton basado en 1D-PAGE, llegando a la conclusión de que la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE es la técnica más adecuada para la caracterización y separación de las proteínas, mientras que la electroforesis BN-PAGE es la más idónea para el análisis de los geles mediante LA-ICP-MS, ya que al tratarse de una electroforesis no desnaturizante, favorece que el enlace metal-proteína se mantenga.



- Se han caracterizado las proteínas presentes en las muestras y se han calculado sus pesos moleculares, tanto para el *BCR-414* como para el *BIO 7120* mediante electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE ó BN-PAGE, obteniendo en ambos casos resultados similares a los expuestos en la bibliografía para muestras de plancton. Tras la electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE la mayoría de las proteínas, tanto para el plancton *BCR-414* como para el *BIO 7120*, se obtienen entre pesos moleculares de 69 a 13 kDa; mientras que tras la electroforesis BN-PAGE se observan, en ambos casos, señales intensas para los pesos moleculares de 324, 229, 65, 40, 26 y 14 kDa.
- Al separar las fracciones proteicas por SDS-Tris-Glicina-PAGE y llevar a cabo el análisis mediante LA-ICP-MS decir que, en el caso del *BCR-414* sólo se obtuvieron señales de Cu y Zn en el frente de la electroforesis (se rompen los enlaces metal-proteína) y en el caso del *BIO 7120* se obtuvieron señales de Cu, Zn y más intensamente Fe y Mn; las señales de Cu y Zn se observaron también en el frente de la electroforesis, las señales de Mn se obtuvieron en la banda de proteínas correspondiente a 114-97 kDa y en mayor medida en el frente de la electroforesis y las señales de Fe aparecieron en la banda de proteínas de 49-36 kDa y en el frente de la electroforesis. Esto indica que en la electroforesis desnaturizante se sigue observando ruptura de enlace metal-proteína también para esta muestra.
- Tras la separación por BN-PAGE, electroforesis no desnaturizante, y análisis mediante LA-ICP-MS se obtuvo para la muestra *BCR-414*, Cu y Zn asociados a bandas de proteínas con pesos moleculares  $\approx 92$  kDa y 26-20 kDa. Para la muestra *BIO 7120* se obtuvo Zn y Mn asociado a las bandas de proteínas con pesos moleculares de 100-24 kDa, Fe asociado a bandas de entre 65-24 kDa y en menor medida Cu asociado a bandas de proteínas con pesos moleculares de 85-43 kDa.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] L.E. Burridge, J.L. Martin, M.C. Lyons; M. M. LeGresley. "Lethality of microalgae to farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*)". *Aquaculture* 308 (2010) 101-105.
- [2] J.L. Stauber, C.M. Davies. "Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment". *Environmental Review* 8 (2000) 255-301.
- [3] S. Mounicou, J. Szpunar, and R. Lobinski. "Metallomics: the concept and methodology". *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 1119-1138.
- [4] D. Gunther, and B. Hattendorf. "Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry". *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 255-265.
- [5] J.L. Neilsen, A. Abildtrup, J. Christensen, P. Watson, A. Cox, and C.W. McLeod. "Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins". *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 339-345.
- [6] P. Marshall, O. Heudi, S. Bains, H.N. Freeman, F. Abou-Shakra, and K. Reardon. "The determination of protein phosphorylation on electrophoresis gel blots by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry". *Analyst* 127 (2002) 459-461.
- [7] J.S. Becker, S.F. Boulyga, C. Pickhardt, E. Damoc, and M. Przybylski. "Structural identification and quantification of protein phosphorylations after gel electrophoretic separation using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry". *International Journal of Mass Spectrometry* 228 (2003) 985-997.
- [8] J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, and M. Przybylski. "Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19 (2004) 149-152.
- [9] R.L. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson, and R.K. Poole. "Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry". *Electrophoresis* 25 (2004) 2469-2477.
- [10] J.S. Becker, M. Zoriy, J. Dobrowolska, and A. Matusch. "Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22 (2007) 736-744.
- [11] J.S. Becker and N. Jakubowski. "The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences". *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 1969-1983.

- [12] A. Sussulini and J. S. Becker. "Combination of PAGE and LA-ICP-MS as an analytical workflow in metallomics: state of the art, new quantification strategies, advantages and limitations". *Metallomics* 3 (2011) 1271-1279.
- [13] Konz, Ioana; Fernández, Beatriz; Fernández, M. Luisa; Pereiro, Rosario; Sanz-Medel, Alfredo. "Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 2113-2125
- [14] C.C. Chery, L. Moens, R. Cornelis, and F. Vanhaecke, Capabilities and limitations of gel electrophoresis for elemental speciation: A laboratory's experience. *Pure and Applied Chemistry* 78 (2006) 91-103.
- [15] J.S. Becker, S. Mounicou, M.V. Zoriy, and R. Lobinski, Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* 76 (2008) 1183-1188.
- [16] B. Pioselli, C. Munro, A. Raab, C.L. Deitrich, K. Songsrirote, J. Feldmann, and J. Thomas-Oates, Denaturing and non-denaturing microsolution isoelectric focussing to mine the metalloproteome. *Metallomics* 1 (2009) 501-510.
- [17] M.S. Jimenez, L. Rodriguez, M.T. Gomez, and J.R. Castillo. "Metal-protein binding losses in proteomic studies by PAGE-LA-ICP-MS". *Talanta* 81 (2010) 241-247.
- [18] M. S. Jimenez, M. T. Gomez, , L. Rodriguez, L. Martinez, J. R. Castillo. "Some pitfalls in PAGE-LA-ICP-MS for quantitative elemental speciation of dissolved organic matter and metalomics". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (2009) 699-707.
- [19] F. Azam, F. Malfatti. "Microbial structuring of marine systems". *Nature Reviews Microbiology* 5 (2007) 782-791.
- [20] F.M. Morel, A.B. Kustka, Y. Shaked. "The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton". *Limnology and Oceanography* 53 (2008) 400-404.
- [21] M. Lavoie, S. Le Faucheur, C. Fortin, P. Campbell. "Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules". *Aquatic Toxicology* 92 (2009) 65-75.
- [22] S. Foster, D. Thomson, W. Maher. "Uptake and metabolism of arsenate by anoxic cultures of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*". *Marine Chemistry* 108 (2008) 172-183.
- [23] S. Adhikari, L. Ghosh, B.S. Giri, S. Ayyappan. "Distributions of metals in the food web of fishponds of Kolleru Lake, India". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009) 1242-1248.

- [24] S. Özdemir, E. Kilinc, A. Poli, B. Nicolaus, K. Güven. "Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii sub. sp. decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans sub. sp. stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies". Chemical Engineering Journal 152 (2009) 195-206.
- [25] E. Spijkerman, D. Barua, A. Gerloff-Elias, J. Kern, U. Gaedke, S. Heckathorn. "Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium". Extremophiles 11 (2007) 551-562.
- [26] Z. Arslan, J.F. Tyson. "Slurry sampling for determination of lead in marine plankton by electrothermal atomic absorption spectrometry". Microchemical Journal 86 (2007) 227-234.
- [27] G. Vale, S. Pereira, A. Mota, L. Fonseca, J.L. Capelo. "Enzymatic probe sonication as a tool for solid liquid extraction for total selenium determination by electrothermal-atomic absorption spectrometry". Talanta 74 (2007) 198-205.
- [28] S. Baldwin, M. Deaker, W. Maher. "Low-volume microwave digestion of marine biological tissues for the measurement of trace elements". Analyst 119 (1994) 1701-1704.
- [29] S. Ruangsomboon, L. Wongrat. "Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*) and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. garipienus*". Aquatic Toxicology 78 (2006) 15-20.
- [30] A. Tiselius. "Electrophoresis of serum globulin I". Biochemical Journal 31 (1937) 313-317.
- [31] S. Moncheva, S. Gorinstein, G. Shtereva, F. Toledo, P. Arancibia, W.A. Booth, I. Goshev, M. Weisz, and S. Trakhtenberg. "Seasonal variability of phytoplankton at Varna Bay (Black Sea)". Phytochemical Analysis 14 (2003) 245-250.
- [32] S. Moncheva, S. Gorinstein, G. Shtereva, F. Toledo, P. Arancibia-Avila, I. Goshev, and S. Trakhtenberg. "Biomass, protein- and carbohydrate-composition of phytoplankton in Varna Bay, Black Sea". Hydrobiologia 501 (2003) 23-28.
- [33] E. Tanoue. "Occurrence and characterization of particulate proteins in the Pacific-Ocean". Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers 39 (1992) 743-761.
- [34] E. Tanoue. "Detection of dissolved protein molecules in oceanic waters". Marine Chemistry 51 (1995) 239-252.
- [35] E. Tanoue, M. Ishii, and T. Midorikawa. "Discrete dissolved and particulate proteins in oceanic waters". Limnology and Oceanography 41 (1996) 1334-1343.
- [36] E. Tanoue. "Characterization of the particulate protein in Pacific surface waters". Journal of Marine Research 54 (1996) 967-990.

- [37] B. Palenik, and J.A. Koke. "Characterization of a nitrogen-regulated protein identified by cell-surface biotinylation of a marine-phytoplankton". *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995) 3311-3315.
- [38] Y. Xu, L. Feng, P.D. Jeffrey, Y.G. Shi, and F.M.M. Morel, Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* 452 (2008) 56-62.
- [39] H. Park, B. Song, and F.M.M. Morel, Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environmental Microbiology* 9 (2007) 403-413.
- [40] P.J. McGinn, and F.M.M. Morel. "Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey". 6th International Symposium on Inorganic Carbon Utilisation by Aquatic Photosynthetic Organisms, Malaga, SPAIN, 2007, pp. 78-91.
- [41] F. Viparelli, S.M. Monti, G. De Simone, A. Innocenti, A. Scozzafava, Y. Xu, F.M.M. Morel, and C.T. Supuran, Inhibition of the R1 fragment of the cadmium-containing zeta-class carbonic anhydrase from the diatom *Thalassiosira weissflogii* with anions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 4745-4748.
- [42] S. Lopez-Gomollon, J.A. Hernandez, C.P. Wolk, M.L. Peleato, and M.F. Fillat. "Expression of *furA* is modulated by *NtcA* and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp PCC 7120". *Microbiology-Sgm* 153 (2007) 42-50.
- [43] P.J. Janknegt, J.W. Rijstenbil, W.H. van de Poll, T.S. Gechev, and A.G.J. Buma. "A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae". *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 87 (2007) 218-226.
- [44] G. Vale, S. Pereira, A. Mota, L. Fonseca, J.L. Capelo. "Enzymatic probe sonication as a tool for solid liquid extraction for total selenium determination by electrothermal-atomic absorption spectrometry". *Talanta* 74 (2007) 198-205.
- [45] C.T. Martins, C.M.M. Almeida, P.C. Alvito. "Selenium content of raw and cooked marine species consumed in Portugal". *Food Analytical Methods* 4 (2011) 77-83.
- [46] T. Llorente-Mirandés, M.J. Ruiz-Chancho, M. Barbero, R. Rubio, J.F. López-Sánchez. "Measurement of arsenic compounds in litoral zone algae from the western Mediterranean Sea. Occurrence of arsenobetaine". *Chemosphere* 81 (2010) 867-875
- [47] R. Domínguez-González, V. Romarís-Hortas, C. García-Sartal, A. Moreda-Piñeiro, M.C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera. "Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds". *Talanta* 82 (2010) 1668-1673.

- [48] M. Tuzen, B. Verep, A.O. Ogretmen, M. Soyak. "Trace element content in marine algae species from the Black Sea, Turkey". *Environmental Monitoring and Assessment* 151 (2009) 363-368.
- [49] F. Cubadda, A. Raggi, E. Coni. "Element fingerprinting of marine organisms by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384 (2006) 887-892.
- [50] P. Jitaru, G. Cozzi, A. Gambaro, P. Cescon, and C. Barbante. "Simultaneous speciation analysis of glutathione peroxidase, selenoprotein P and selenoalbumin in human serum by tandem anion exchange-affinity HPLC and on-line isotope dilution ICP-quadrupole MS". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 661-669.
- [51] Z. Pedrero, Y. Madrid, C. Camara, E. Schram, J.B. Luten, I. Feldmann, L. Waentig, H. Hayen, and N. Jakubowski. "Screening of selenium containing proteins in the Tris-buffer soluble fraction of African catfish (*Clarias gariepinus*) fillets by laser ablation-ICP-MS after SDS-PAGE and electroblotting onto membranes". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 775-784.
- [52] A.C. Schmidt, S. Steier, and M. Otto. "Evaluation of the arsenic binding capacity of plant proteins under conditions of protein extraction for gel electrophoretic analysis". *Talanta* 77 (2009) 1830-1836.
- [53] A.C. Schmidt, B. Storr, and N.A. Kummer. "Influence of one- and two-dimensional gel electrophoresis procedure on metal-protein bindings examined by electrospray ionization mass spectrometry, inductively coupled plasma mass spectrometry, and ultrafiltration". *Talanta* 85 (2011) 1118-1128.
- [54] Becker, J. Su., Pozebon, D., Matusch, A., Dressler and V.L., Becker, J.S. "Detection of Zn-containing proteins in slug (*Genus Arion*) tissue using laser ablation ICP-MS after separation by gel electrophoresis". *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 66-69.
- [55] A.C. Schmidt, J. Ahlswede, and B. Storr. "Sample preparation strategies for one- and two-dimensional gel electrophoretic separation of plant proteins and the influence on arsenic and zinc bindings". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877 (2009) 3097-3104.
- [56] M.L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, I. Moraleja, B. Canas, and M.M. Gomez-Gomez. "OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins". *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 1281-1290.
- [57] J.S. Becker, H. Sela, J. Dobrowolska, M. Zoriy, J.S. Becker. "Recent applications on isotope ratio measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on biological samples and single particles". *International Journal of Mass Spectrometry* 27 (2008) 1-2 1-7.

- [58] M.E.P. Lima, M.E. Carneiro, A.E. Nascimento, T.B. Grangeiro, M.L. Holanda, R.C.N. Amorim, and N.M.B. Benevides. "Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 6414-6419.
- [59] M.A. Torres, M.P. Barros, S.C.G. Campos, E. Pinto, S. Rajamani, R.T. Sayre, and P. Colepicolo. "Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2008) 1-15.
- [60] "S. Moncheva, S. Gorinstein, G. Shtereva, F. Toledo, P. Arancibia, W.A. Booth, I. Goshev, M. Weisz. "Trakhtenberg, Seasonal variability of phytoplankton at Varna Bay (Black Sea)". *Phytochemical Analysis* 14 (2003) 245-250.
- [61] H. Park, P.J. McGinn, and F.M.M. Morel. Expression of cadmium carbonic anhydrase of diatoms in seawater. *Aquatic Microbial Ecology* 51 (2008) 183-193.
- [62] J.S. Becker, D. Pozebon, V.L. Dressler, and R. Lobinski. "LA-ICP-MS studies of zinc exchange by copper in bovine serum albumin using an isotopic enriched copper tracer". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23 (2008) 1076-1082.
- [63] Laemmli. "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [64] A. Polatajko, M. Azzolini, I. Feldmann, T. Stuezel, and N. Jakubowski. "Laser ablation-ICP-MS assay development for detecting Cd- and Zn-binding proteins in Cd-exposed *Spinacia oleracea* L.". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22 (2007) 878-887.

***ANEXOS***





ANEXO 6.1 CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO BCR-414



EUROPEAN COMMISSION  
JOINT RESEARCH CENTRE  
Institute for Reference Materials and Measurements



**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
**BCR<sup>®</sup> – 414**

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

PLANKTON			
Element	Mass fraction based on dry mass		Number of accepted sets of results <i>p</i>
	Certified value <sup>1)</sup> [mg/kg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [mg/kg]	
As	6.82	0.28	12
Cd	0.383	0.014	9
Cr	23.8	1.2	7
Cu	29.5	1.3	17
Hg	0.276	0.018	7
Mn	299	13	9
Ni	18.8	0.8	8
Pb	3.97	0.19	10
Se	1.75	0.10	8
V	8.10	0.18	4
Zn	111.6	2.5	15

<sup>1)</sup> Unweighted mean value of the means of *p* accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The certified values are traceable to the SI.  
<sup>2)</sup> Half-width of the 95 % confidence intervals.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

12 OCT 2008

The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

**NOTE**

This material has been certified by BCR (Community Bureau of Reference, the former reference materials programme of the European Commission). The certificate has been revised under the responsibility of IRMM.

Brussels, March 1992  
Latest revision: May 2007

Signed: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Hendrik Emons  
Unit for Reference Materials  
EC-JRC-IRMM  
Retieseweg 111  
2440 Geel, Belgium

## Indicative Values

Element	Mass fraction		
	Indicative value <sup>1)</sup>	Uncertainty <sup>2)</sup>	Unit
Co	1.43	0.06	mg/kg
K	7.55	0.17	mg/kg
Fe	1.85	0.19	g/kg
Mo	1.35	0.20	mg/kg
Sc	0.54	0.02	mg/kg
Sr	261	25	mg/kg

<sup>1)</sup> Mean value

<sup>2)</sup> Standard deviation

### DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The sample consists of a powder of freeze-dried plankton in a glass bottle. The bottle contains about 5 g of powder and a small PTFE ball which has been added to facilitate the homogenisation prior to use. Additional information on the preparation, the certified and indicative values is given in the certification report.

### ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

- Cold vapour atomic absorption spectrometry
- Cathodic stripping voltammetry
- Direct current plasma atomic emission spectrometry
- Differential pulse anodic stripping voltammetry
- Differential pulse cathodic stripping voltammetry
- Electrothermal atomic absorption spectrometry
- Electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction
- Flame atomic absorption spectrometry
- Hydride generation atomic absorption spectrometry
- Hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry
- Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry
- Inductively coupled plasma mass spectrometry
- Instrumental neutron activation analysis
- Isotope dilution mass spectrometry
- Mass spectrometry
- Neutron activation analysis with radiochemical separation
- Visible light or UV spectrometry

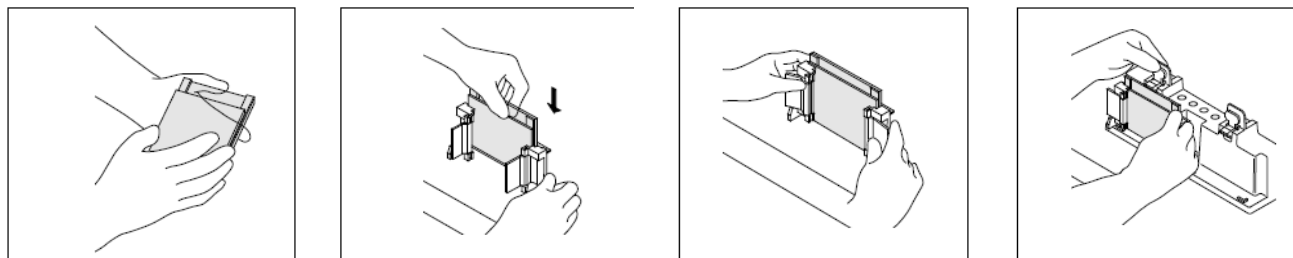
### PARTICIPANTS

- Aristotelian University, Lab. Anal. Chemistry, Thessaloniki (GR)
- Danish Isotope Centre, Copenhagen (DK)
- E.C.N., Energieonderzoek Centrum Nederland, Petten (NL)
- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg (DE)
- Istituto Superiore di Sanità, Roma (IT)
- Instituut voor Nucleaire Wetenschappen, Rijksuniversiteit Gent (BE)
- European Commission, Joint Research Centre, Environment Institute, Ispra (IT)
- Kernforschungsanlage, Jülich (DE)
- Labor für Spurenanalytik, Bonn (DE)
- National Food Administration, Uppsala (SE)
- NLR "Demokritos", Agia Paraskevi Attikis (GR)
- Presidio Multizonale di Prevenzione, Venezia (IT)
- Risø National Laboratory, Roskilde (DK)
- Universidad Complutense, Facultad de Química, Madrid (ES)
- Università di Pavia, Chimica Generale, Pavia (IT)
- Universitaire Instelling Antwerpen, Wilrijk (BE)

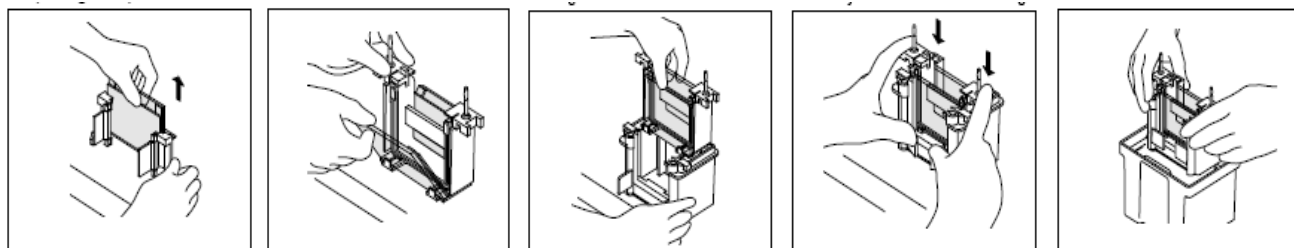
## ANEXO 6.2 ELECTROFORESIS SOBRE GEL DE POLIACRILAMIDA EN UNA DIMENSIÓN (1D-PAGE)

### 6.2.1 Realización de un gel de poliacrilamida

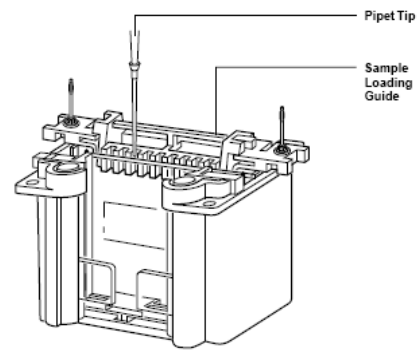
Para la realización de los geles se emplea el kit *Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell* de *BioRad* y se siguen las siguientes instrucciones:



1. Se lavan ambos cristales con agua milli-Q y posteriormente con etanol. Se dejan secar.
2. Se colocan los cristales uno sobre el otro y se sujetan con las pinzas especiales de tal forma que queden sujetos como indica la figura.
3. A su vez, se realiza la mezcla de los reactivos (acrilamida/bisacrilamida, tampón de electroforesis, agua y en algunos casos SDS) en un vaso de precipitados.
4. Se borbotea  $N_2$  gas sobre la mezcla de éstos durante 5-10 minutos para eliminar el  $O_2$  disuelto en la disolución, ya que el  $O_2$  libre puede actuar como trampa de radicales libres paralizando la reacción de polimerización.
5. Se vierte sobre la mezcla las cantidades adecuadas de persulfato amónico (APS), que actúa como iniciador de la reacción de polimerización y de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), que actúa como propagador de la reacción.
6. Se agita la mezcla y con la ayuda de un cuentagotas o un micropipeta se adiciona sobre el hueco dejado por los dos cristales donde se va a llevar a cabo la polimerización.
7. Se añade el "peine" que hará que, una vez polimerizado el gel, queden "pocillos" donde posteriormente podrán introducirse las muestras disueltas en el tampón de carga.
8. Transcurridos alrededor de 30 minutos, ya se dispone del gel perfectamente polimerizado.



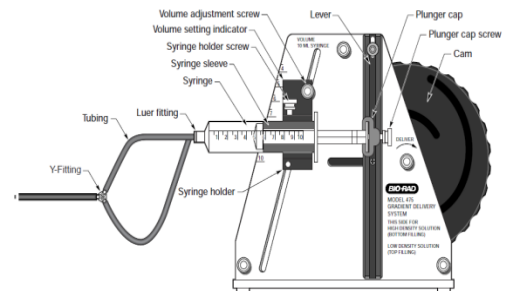
9. Una vez polimerizado el gel, se toman los geles, se retiran de las pinzas y, siguiendo las instrucciones que figuran en la página anterior, se colocan sobre la célula de electroforesis.
10. Una vez colocados los geles en la celda de electroforesis, se añaden los tampones de electroforesis, tanto el catódico como el anódico, se retiran los “peines” y se adicionan las muestras en cada uno de los “pocillos” ayudados de una micropipeta y de la pieza denominada “*sample loading guide*”.
11. Por último, sólo queda conectar la celda de electroforesis a la fuente de corriente eléctrica *PowerPac Basic™ Power Supply de Bio-Rad* y llevar a cabo la electroforesis a voltaje constante (hasta 300 v) o a intensidad constante (hasta 400 mA).



Según el tipo de electroforesis con la que estemos trabajando, se pueden producir variaciones en el procedimiento de realización del gel:

**SDS-PAGE:** se suele dividir en el separador y en el gel concentrador (con un % de bisacrilamida mucho menor) con lo que se consigue una etapa de preconcentración de las muestras y, por tanto, mejorar la resolución y la reproducibilidad de las bandas de las proteínas obtenidas.

**BN-PAGE:** se suele trabajar con geles en gradiente. Para ello se utiliza el sistema de realización de geles en gradiente "Model 475" de Bio-Rad.

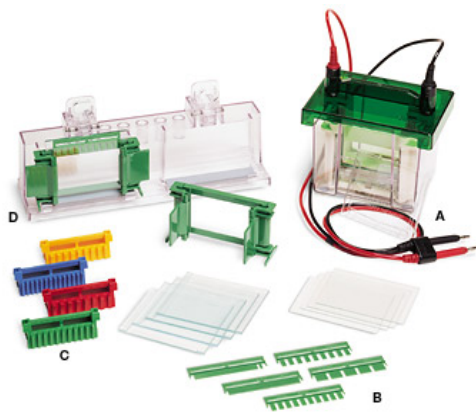


**Model 475 Gradient Delivery System, Bio-Rad**

Tanto la realización de los geles como la optimización del porcentaje de bis/acrilamida en los geles de la electroforesis Blue-Native-PAGE es un proceso bastante laborioso.

El gradiente de concentración de bis/acrilamida de los geles se hace con ayuda de un sistema formador de gradiente (*Model 475 Bio-Rad*). Para ello se preparan dos disoluciones, una con el máximo porcentaje de bis/acrilamida que se desea tener al final del gel, y otra con el

mínimo porcentaje de bis/acrilamida que se desea tener al principio del gel. Estas disoluciones se vierten entre las placas con ayuda del sistema de formación de gradientes para que polimericen. Se llenan dos jeringas con 5 mL de las disoluciones de alta y baja densidad respectivamente. Una vez montado el sistema de realización de los geles y unido a las jeringas se va girando la rueda del sistema formador de gradientes, este giro va modificando la proporción de las disoluciones que se van adicionando entre las dos placas de vidrio donde va a polimerizar el gel, de este modo se forma un gel en gradiente de bis/acrilamida en los geles que va desde el porcentaje de la disolución de alta densidad (en la parte final del gel) hasta el porcentaje de la disolución de baja densidad (en el principio del gel).



- A.- Celda de electroforesis.
- B.- "Peines".
- C.- "Sample loading guide".
- D.- Pieza para la realización de geles.

Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad

### 6.2.2 SDS-TRIS-GLICINA-PAGE

Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante, es decir, las proteínas pierden sus estructuras tridimensionales y toman conformaciones lineales [63].

Para ello, las muestras se someten a un tratamiento térmico de calor (5 minutos a  $\approx 90^{\circ}\text{C}$ ), se les añade SDS, que cumple la misión de desnaturizar y posteriormente recubrir la proteína y el 2-mercaptoetanol que actúa como agente reductor rompiendo los puentes disulfuro quedando las proteínas separadas en cadenas lineales polipeptídicas.

Como característica principal destacar que la caracterización de las proteínas y la determinación de sus pesos moleculares es sencilla, ya que, al tener las proteínas desnaturizadas y cubiertas por SDS, todas ellas poseen la misma relación masa/carga, de esta manera, avanzan a lo largo del gel atendiendo únicamente a su tamaño y no a su conformación ni a su carga espacial.

El punto débil de este tipo de electroforesis es que la adición de algunos reactivos (SDS, 2-mercaptoetanol), el tratamiento previo al que se someten las muestras ( $\approx 90^{\circ}\text{C}$  durante 5-10 minutos) o el ión conductor de la electroforesis (glicina) pueden ocasionar la ruptura de los enlaces o interacciones metal-proteína.

A continuación figuran la *Tabla 1* y la *Tabla 2* en las que se recogen la composición de los tampones, disoluciones y geles utilizados en la realización de la SDS-Tris-Glicina-PAGE.

*Tabla 1. Composición de tampones y disoluciones empleadas en SDS-Tris-Glicina-PAGE*

<b>Tampón del gel separador (4x)</b>	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
<b>Tampón del gel concentrador (4x)</b>	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	25 mM Tris
<b>Tampón de electroforesis</b>	192 mM Glicina
	0,1% (p/v) SDS
	pH 8,3
	50 mM Tris-HCl pH 6,8
	2,4% (p/v) SDS
<b>Tampón de carga</b>	20% (v/v) Glicerol
	5% (v/v) 2-mercaptoetanol
	0,02% (p/v) Azul de bromofenol
<b>SDS 20%</b>	20% (p/v) SDS
<b>APS 10%</b>	10% (p/v) APS

*Tabla 2. Composición tanto del gel concentrador como del gel separador*

	<b>Gel concentrador</b>	<b>Gel separador</b>		
<b>% Bisacrilamida en el gel→</b>	<b>4%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>18%</b>
<b>Tampón GEL x4 (mL)</b>	2.5	2.5	2.5	2.5
<b>Agua milli-Q (mL)</b>	6.04	4.01	3.34	1.34
<b>30% Bisacrilamida (mL)</b>	1.33	3.33	4	6
<b>SDS 20% (μL)</b>	50	50	50	50
<b>APS 10% (μL)</b>	100	100	100	100
<b>TEMED (μL)</b>	5	5	5	5

Este tipo de geles se realizan con gel concentrador, es decir, los geles se realizan en dos fases, una fase del gel que únicamente tiene como misión preconcentrar para mejorar la resolución y la reproducibilidad (gel concentrador) y otra fase del gel en la que se produce la separación de las proteínas (gel separador).

La electroforesis se realiza a intensidad constante de 30 mA.



### 6.2.3 BLUE-NATIVE-PAGE

Esta electroforesis pertenece al grupo de las no desnaturizantes, es decir, las proteínas no pierden su estructura tridimensional o conformación espacial [64].

Este tipo de electroforesis se realiza con el objeto de evitar reactivos, tratamientos de la muestra o iones conductores de la electroforesis que puedan romper los enlaces o interacciones metal-proteína, intentando que las proteínas permanezcan, lo máximo posible, en su estado natural.

El ión conductor de este tipo de electroforesis es la tricina.

El problema que presenta este tipo de electroforesis es la determinación de los pesos moleculares de las proteínas, ya que éstas avanzan en el gel atendiendo a su peso molecular, su conformación y su carga electrostática, por lo que la caracterización de las proteínas por pesos moleculares es bastante complicada.

A continuación figuran la *Tabla 3* y la *Tabla 4* en las que se recogen la composición de los tampones, disoluciones y geles utilizados en la realización de la Blue-Native-PAGE.

*Tabla 3. Composición de tampones y disoluciones empleadas en Blue-Native-PAGE*

<b>Tampón del gel (10x)</b>	500 mM Bis-Tris-HCl pH 7,0
<b>Tampón catódico de electroforesis (con Coomassie)</b>	15 mM Bis-Tris 50 mM Tricina 0,02% (p/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 pH 7,0
<b>Tampón catódico de electroforesis (sin Coomassie)</b>	15 mM Bis-Tris 50 mM Tricina pH 7,0
<b>Tampón anódico de electroforesis</b>	50 mM Bis-Tris pH 7,0
<b>Tampón de carga</b>	50 mM Bis-Tris 20% (v/v) Glicerol 0,35% (p/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 pH 7,0
<b>APS 10%</b>	10% (p/v) APS

Tabla 4. Composición tanto del gel concentrador como del gel separador

% Bisacrilamida en el gel →	Gel separador				
	4%	8%	14%	18%	20%
Tampón GEL x3 (mL)	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33
Agua milli-Q (mL)	5.26	4	2	0.67	-
30% Bisacrilamida (mL)	1.33	2.67	4.66	6	6.67
APS 10% (μL)	80	70	40	35	35
TEMED (μL)	8	7	6	5	5

Los geles no se realizan con gel concentrador, sino que se suelen realizar como un solo gel con gradiente de concentraciones de bisacrilamida usando para ello el sistema de realización de geles en gradiente *Model 475 de Bio-Rad*.

Primeramente, la electroforesis transcurre con el tampón catódico que contiene azul de Coomassie, este tampón se mantiene aproximadamente hasta que el frente de la electroforesis llegue a la mitad del gel separador, momento en el cual se cambia por el tampón catódico que no contiene Coomassie.

La electroforesis debe transcurrir a voltaje constante de 60 mV.

### **ANEXO 6.3. TINCIÓN DE LOS GELES**

Se ha trabajado con dos métodos diferentes para la tinción de los geles.

#### **6.3.1 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE.**

Es la forma más sencilla de llevar a cabo la tinción de las proteínas presentes en los geles, el problema es que presenta algo menos de sensibilidad que el método de tinción con plata.

*Disolución de tinción:* 25% v/v de MeOH, 10% (v/v) de AcOH y 1 g/l de CBBR-250 (*azul de Coomassie*).

*Procedimiento de tinción.*

1. Se sumergen los geles en 100-200 mL de la disolución de tinción.
2. Se deja en agitación durante un mínimo de 2 horas (es recomendable hasta 24 horas).
3. Transcurrida la etapa de tinción se retiran los geles y se sumergen en 100-200 mL de una disolución 25% v/v MeOH manteniéndose en agitación.
4. Se sustituye la disolución de lavado cada cierto tiempo hasta que únicamente se observen teñidas las bandas correspondientes a las proteínas.
5. Ya se dispone del gel para su secado.

#### **6.3.2 TINCIÓN CON PLATA.**

Se trata de un procedimiento de tinción más largo y complicado pero más sensible que el proceso de tinción con *azul de Coomassie*.

*Procedimiento de tinción.*

1. *Fijación.* Se toma el gel y se introduce en 100 mL de una disolución del 30% EtOH y del 10% AcOH durante 30 minutos con agitación.
2. *Incubación.* Se vierten los geles en 100 mL de una disolución del 30% EtOH, del 6.8% (p/v) NaAc y 0.2% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  que se añade justamente antes de añadir los geles sobre la disolución. Se mantiene en agitación un mínimo de 30 minutos.
3. *Lavado.* Se realizan 3 lavados durante 15-20 minutos en agitación con agua desionizada.

4. *Plateado.* Una vez lavados los geles con agua se adicionan sobre una disolución de 100 mL 0.2% (p/v) de  $\text{AgNO}_3$  a la que se le añade 20  $\mu\text{L}$  de formaldehído. Se mantiene en agitación durante 20 minutos.
5. *Procesado.* Se añaden los geles en 100 mL de disolución 2.5% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a la que se le adiciona 10  $\mu\text{L}$  de formaldehído. Se mantiene en agitación hasta el revelado del gel, es decir, hasta que aparecen las bandas de las proteínas.
6. *Lavado.* Se realizan 3 lavados durante 15-20 minutos en agitación con agua desionizada.
7. Ya se dispone del gel para su secado.

#### **ANEXO 6.4. PREPARACIÓN DE LOS GELES PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE LA-ICP-MS.**

Para el análisis de las muestras tanto de la fracción proteica como de los metales asociados a la misma, se sigue un protocolo establecido:

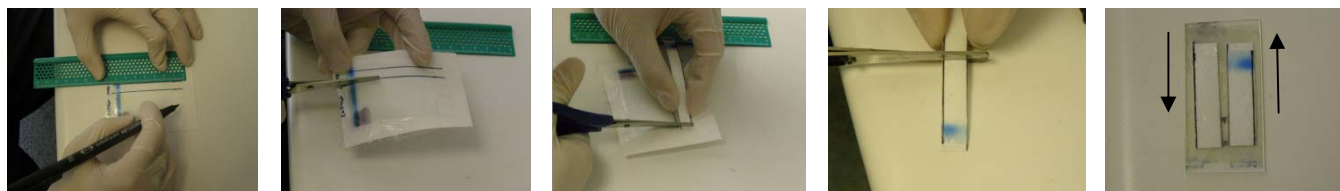
1. Se introducen en el gel 15  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras disueltas en el tampón de carga de la siguiente manera. En la *Tabla 5* se muestra cómo se introducen las muestras en los “pocillos” del gel antes de la realización de la electroforesis.

*Tabla 5. Esquema de la introducción de las muestras en el gel de electroforesis*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Patrón	BCR-414	-	BIO 7120	-	BIO 7120	-	BCR-414	-	Tampón Carga/2

De esta forma, dentro de un mismo gel, se dispone de cada una de las muestras por duplicado.

2. Una vez concluida la electroforesis se divide el gel por la mitad, llevando parte del gel con los carriles del 1-5 a tinción con azul de Coomassie y parte del gel con los carriles del 6-10 a secado directamente.
3. El gel que incluye los carriles 6-10 se analizará mediante LA-ICP-MS, mientras que el gel con los carriles 1-5 servirá para determinar las proteínas presentes en la muestra.
4. Cuando concluye el secado del gel con los carriles 6-10, se delimita sobre el film que cubre el gel cada uno de los carriles que contienen las muestras con rotulador.
5. Se corta cada uno de los carriles que contienen las muestras y, partiéndolos por la mitad, se pegan sobre un portamuestras de vidrio usando para ello cinta fijadora de doble cara.
6. De esta manera ya se dispone de las muestras para su introducción y análisis mediante LA-ICP-MS.
7. En la última fotografía se indica con flechas las direcciones del barrido que va a llevar el láser, comenzando por el fragmento de gel de la izquierda y continuando por el de la derecha.



Fotografías representativas de la preparación del gel para su análisis mediante LA-ICP-MS

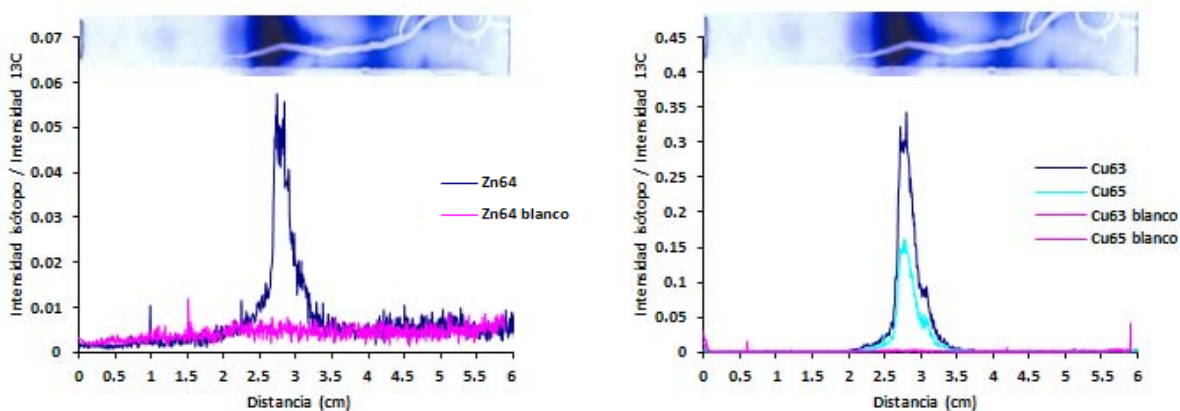
8. Por último sólo queda retirar el film protector que cubre los geles e introducir el portamuestras en la celda de ablación láser.

En algunas ocasiones, para comprobar que todo el proceso se ha realizado correctamente, en uno de los carriles libres se introduce superóxido dismutasa (SOD) en una concentración de 500 ppm. Esta proteína lleva asociada a su estructura molecular Zn y Cu.

Posteriormente este gel se somete al proceso de medida por LA-ICP-MS de acuerdo al apartado de *Procedimientos Experimentales 3.4.3.2*.

En la *Figura 1* se muestra las señales obtenidas para la SOD (500 ppm) mediante LA-ICP-MS tras separación por Blue-Native-PAGE 4-20% en gradiente.

*Figura 1. Resultados obtenidos mediante LA-ICP-MS previa separación por Blue-Native-PAGE 4-20% en gradiente para la proteína SOD*



De esta forma, si se obtienen señales asociadas a esta proteína, del orden de las anteriormente expuestas, se puede concluir que el procedimiento PAGE-LA-ICP-MS ha transcurrido bien y que por tanto los resultados obtenidos para las muestras son fiables.

