

III.- Materiales y Métodos

III.- Materiales y Métodos.

1.- Material biológico.

1.1.- *Holothuria tubulosa* (Pepino de mar).

Esta especie es un invertebrado marino que pertenece al Phylum Echinodermata, Clase Holothuroidea. Su habitat se encuentra en los fondos arenosos de las zonas costeras, entre 5-30 metros de profundidad. Una característica particular de la Clase Holothuroidea es la ausencia de simetría radial a diferencia de las Clases Asteroidea (estrellas de mar) y Echinoidea (erizos de mar) que pertenecen al mismo Phylum Echinodermata.

Los Holothuroideos no presentan dimorfismo sexual externo en ninguna de sus etapas de desarrollo. La identificación del sexo en estos individuos sólo puede ser efectuada por la inspección directa de la gonada durante la disección del animal. El individuo tiene una única gonada localizada en la parte anterior del celoma, esta constituida por muchos túbulos que se unen en forma de racimo, y se une al lado del mesenterio dorsal y forma un gonoducto que recorre el mesenterio y desemboca en un gonópore situado entre los tentáculos de la cavidad bucal. Estos animales tienen reproducción estacional anual, el período de madurez sexual se inicia desde el mes de Mayo, siendo máximo durante el mes de Julio-Agosto. Cuando se produce el desove de los gametos, las gonadas aumentan su volumen, y luego regresionan (Mengod, 1976). Las gonadas femeninas tienen un color naranja intenso, y las gonadas masculinas son de color blanquecino.

La colecta de especímenes de *Holothuria tubulosa* se realizó en la localidad de Llançà en la Costa Brava (Catalunya) durante finales del mes de Julio y principios del mes de Agosto. Los animales fueron transportados rápidamente al laboratorio en agua de mar a 4°C, como máximo fueron mantenidos durante 24 horas antes de ser sacrificados. La obtención de gónadas se realizó por disección, se practicó una incisión ventral en el eje antero-posterior, y en forma inmediata las gónadas fueron expulsadas por la abertura; seguidamente, las gónadas fueron congeladas a -20°C o recogidas en agua de mar y mantenidas a 4°C en hielo para obtener los gametos.

2.- Obtención de gametos y preparación de extractos.

2.1.- Obtención de núcleos espermáticos.

En general, el método de obtención de núcleos espermáticos consiste en la homogenización de los espermatozoides en un tampón isotónico a pH fisiológico; y seguidamente, se realizan lavados sucesivos por centrifugación a baja fuerza centrífuga y por períodos de tiempo cortos (Chaeveau et al., 1956). Además, la gran compactación de la cromatina espermática permite que el núcleo del espermatozoide maduro sea resistente a la homogenización.

Materiales:

- Tampón Solución-A: Sacarosa 0.25 M, CaCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.2, Cloruro de Benzamidina 10 mM.

Protocolo:

- 1) En una preparación sobre una lamina portaobjetos, se controla que las gonadas maduras contengan espermatozoides maduros (móviles y de buena morfología).
- 2) Las gonadas se trozan en pequeñas secciones con tijeras y se resuspenden en 10 volúmenes de agua de mar estéril por filtración (0.22 µm de poro). Se deja reposar durante 10-15 minutos en hielo (4°C), para permitir la liberación de los espermatozoides.
- 3) Luego, se mantiene en agitación magnética suave durante 3-5 minutos, y la suspensión se filtra sobre gasa doble, para retirar los restos de tejido gonadal.
- 4) Se centrifuga a 2,000g durante 5 minutos a 4°C.
- 5) Se elimina el sobrenadante y el sedimento de espermatozoides fue resuspendido con una pipeta Pasteur en 5 volúmenes de Solución-A con 10 mM de cloruro de benzamidina para inhibir la proteólisis. Se centrifuga a 2,000g durante 5 minutos a 4°C.
- 6) Se repite el lavado de los espermatozoides en Solución A, 2-3 veces.
- 7) Los espermatozoides son resuspendidos en 23 volúmenes de Solución-A, y son homogenizados exhaustivamente con dounce.
- 8) Se centrifuga a 2,000g durante 5 minutos a 4°C.
- 9) Se elimina el sobrenadante y se obtiene un sedimento enriquecido en núcleos espermáticos. Los núcleos fueron resuspendidos en 5 volúmenes de Solución-A, y centrifugados a 2,000g durante 5 minutos a 4°C. Se repite 2-3 veces el lavado.
- 10) Finalmente, el sedimento de núcleos se resuspende con 1 volumen de Solución-A. Cuando la suspensión es homogénea se añade 1 volumen de glicerol para conservarlos a -20°C.

2.2.- Permeabilización de núcleos espermáticos.

La permeabilización de los núcleos consiste en dañar la membrana nuclear para permitir la difusión de compuestos desde el medio de incubación al interior del núcleo espermático. El daño se produce en forma controlada y limitada para no alterar la cromatina espermática. Se usan sustancias químicas, como la lisolecitina (Philpott et al., 1991) o el Tritón X-100 (Rice et al., 1995).

Protocolo:

- 1) Un volumen de núcleos conservados en glicerol son mezclados con tres volúmenes de Solución-A. Se centrifugan a 2,000g durante 5 minutos a 4°C. Se obtiene el sedimento de núcleos y se lava 2-3 veces con Solución-A usando centrifugación como antes. De esta forma se retiran los restos de glicerol.
- 2) El sedimento de núcleos que se obtiene después del último lavado es resuspendido en Solución-A conteniendo 0.5% (v/v) de Tritón X-100. La suspensión se incuba a 4°C (hielo) durante 10 minutos.
- 3) Se centrifuga a 1,500g durante 10 minutos a 4°C.
- 4) Se elimina el sobrenadante y el sedimento de núcleos permeabilizados. Se lava 3 veces en Solución-A, en cada lavado los núcleos son resuspendidos suavemente con pipeteo.
- 5) Finalmente, el sedimento de núcleos es resuspendido en 1 volumen de Solución-A, y luego se añade 2 volúmenes de glicerol para conservarlos a -20°C.
- 6) Se estima la concentración de núcleos por recuento en una cámara de Newbauer.

2.3.- Obtención de Ovocitos.

Los ovocitos de *Holothuria tubulosa* fueron obtenidos de acuerdo a Maruyama (1980).

Protocolo:

- 1) Las gonadas femeninas maduras mantenidas en agua de mar estéril a 4°C, se trozan en pequeñas secciones usando tijeras.
- 2) Se resuspenden en 10 volúmenes de agua de mar estéril, y se mantienen en agitación magnética suave durante 15 minutos a temperatura ambiente (29-32°C).
- 3) La suspensión de ovocitos se filtra en gasa doble para retener los restos de tejido gonadal. La suspensión se deja reposar a 4°C (en hielo) durante 15 minutos. De esta forma, se consigue sedimentar los ovocitos.
- 4) El sobrenadante es decantado y centrifugado a 2,000g durante 5 minutos a 4°C para recuperar el máximo de ovocitos. Estos son reunidos con los obtenidos por sedimentación en reposo, y luego centrifugados a 2,000g durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, y el sedimento se resuspende en 5 volúmenes de agua de mar estéril y se mantiene a 4°C (en hielo).

2.3.1.- Tamaño de los ovocitos.

El tamaño de los ovocitos fue determinado en función de su diámetro, desde que el ovocito por su forma puede ser considerado como una partícula esférica. Los ovocitos obtenidos fueron lavados (2-3 veces) en agua de mar estéril, y luego fueron fijados en paraformaldehído 2% y glutaraldehído 0.2% en agua de mar durante 24 horas a 4°C. Finalizada la fijación, los ovocitos fueron lavados 3 veces en PBS 0.1M y resuspendidos en buffer isotónico ISOTON; la concentración de ovocitos fue ajustada aproximadamente a 1×10^6 ovocitos/ml.

La determinación del diámetro de los ovocitos se realizó en un Analizador de Partículas (Coulter® Multisizer II) usando un diámetro de apertura nominal de 560 μm . La estadística y gráficos de los resultados se realizó con el software Coulter® Multisizer AccuComp® (v 1.15) en los "Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, Barcelona-España".

2.4.- Inducción de la maduración de ovocitos.

Se utiliza el método de Maruyama (1980). Con éste método se induce artificialmente los ovocitos holothuroideos, se usan agentes reductores de puentes de disulfuro. Los ovocitos incubados en agua de mar con estos agentes maduran artificialmente, la maduración es evidenciada por la migración de la vesícula germinal (núcleo) desde su posición central en el ovocito inmaduro hacia la zona del micropilo donde se une y luego se produce la ruptura de la vesícula germinal. La inducción con estos agentes reductores es viable desde que los ovocitos inducidos pueden ser fertilizados *in-vitro*, obteniéndose embriones con capacidad de clivaje y diferenciación (Maruyama, 1980).

Protocolo:

- 1) Un volumen de ovocitos maduros en agua de mar estéril se centrifuga a 2,000g durante 5 minutos.
- 2) Se elimina el sobrenadante, y el sedimento de ovocitos se resuspende suavemente en agua de mar conteniendo 10 mM de DTT (ditiotreitól; Sigma Chemical Co.). Se mantiene en agitación magnética suave durante 45-60 minutos a temperatura ambiente (29-32°C).
- 3) Los ovocitos inducidos a la maduración se lavan 3 veces con agua de mar estéril. Centrifugándose sucesivamente a 2,000g durante 5 minutos a 4°C.

- 4) Finalmente, el sedimento de ovocitos inducidos es congelado a -20°C , para preparar extractos a partir de ellos, antes se añade inhibidores de proteólisis (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatina A, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptina, 1 mM PMSF, 10 mM Cloruro de Benzamidina). Alternativamente, el sedimento de ovocitos inducidos es resuspendido en agua de mar estéril (5 volúmenes) para ser fertilizados *in-vitro*.

Comentarios:

La inducción a la maduración puede ser monitoreada al microscopio de contraste de fase, evaluando la migración de la vesícula germinal desde su posición central hasta su disposición adosada al micropilo, donde se produce su ruptura (GVBD, "germinal vesicle breakdown"). Por otro lado, la incubación de los ovocitos con 10 mM de DTT en agua de mar fue establecido como un método adecuado para inducir la maduración de los ovocitos de *Holothuria tubulosa*, luego de haber evaluado otros agentes reductores de puentes disulfuro (2- β -mercaptoetanol, y L-cisteína) en diferentes concentraciones y tiempos de incubación (ver resultados, 2.3.1)

2.5.- Fertilización y clivaje *in-vitro* de ovocitos maduros.

Los ovocitos inducidos a la maduración con DTT durante 45 minutos fueron fertilizados *in-vitro* en forma monoespermática (Maruyama, 1980).

Protocolo:

- 1) Los ovocitos inducidos a maduración luego de lavar el DTT (ver sección 2.5), se resuspenden en 10-20 volúmenes de agua de mar estéril. Se estima la concentración de ovocitos por recuento directo en un pequeño volumen de la suspensión (por ejemplo, 25 ó 50 μl de la suspensión).
- 2) Por otro lado, una gonada masculina madura es trozada con tijeras sobre una placa de Petri, y se resuspende en 5 ml de agua de mar estéril. Se deja reposar durante 5 minutos, con ocasional pipeteo. Luego, se controla al microscopio que la muestra de espermatozoides tenga una adecuada motilidad y morfología. Se estima la concentración de espermatozoides por recuento en la cámara de Newbauer, usando una dilución adecuada. Para esto una pequeña alícuota se fija en paraformaldehído 0.3% en agua de mar.
- 3) Estimada la concentración de ovocitos y espermatozoides, se realiza la mezcla de gametos, considerando 10-20 espermatozoides/ovocito. Los espermatozoides se añaden a los ovocitos y se mezclan suavemente en agitación magnética. Se deja reposar 15 minutos, y luego la mezcla de gametos se transfiere a un recipiente conteniendo 20-50 volúmenes de agua de mar estéril, y se mantiene con aireación mediante una pequeña bomba de acuario. El burbujeo de aire debe ser suave, lo suficiente para evitar que los ovocitos sedimenten al fondo del recipiente.
- 4) La incubación se realiza a temperatura ambiente ($29-32^{\circ}\text{C}$) durante 5 horas, después de este tiempo se pueden encontrar embriones tempranos (de 2-8 células).
- 5) Los ovocitos fertilizados y cultivados (embriones) son dejados en reposo durante 15 minutos, el sobrenadante es decantado y eliminado. Luego, usando agua de mar estéril, son lavados 2-3 veces por sedimentación en reposo a 4°C durante 15 minutos cada vez, para eliminar los espermatozoides en suspensión.
- 6) Finalmente, los embriones se sedimentan por centrifugación a 2,000g durante 5 minutos. Luego, se le añade un cocktail de inhibidores de proteólisis (ver sección anterior). Se congela a -20°C para preparar extracto a partir de ellos.

Comentarios:

La fertilización y clivaje puede ser monitoreada en diferentes tiempos, por microscopía de contraste de fase, interferencia de luz, o usando Bisbenzamidina en preparaciones para microscopía de fluorescencia.

3.- Preparación de extractos.

3.1.- Extracto de gonada femenina madura.

Protocolo:

- 1) Se mide el volumen de gonadas femeninas, y se añade PMSF y cloruro de benzamidina en solución stock para tener 1mM y 10 mM, respectivamente.
- 2) Las gonadas se homogenizan en una licuadora, luego se terminan de homogenizar con dounce, y finalmente, se sonicán con un microtip durante 5 minutos, siempre los homogenizados se mantienen en hielo.
- 3) Los homogenizados se centrifugan a 12,000g durante 1 hora a 4°C, para retirar los restos de tejido.
- 4) Se obtiene el sobrenadante que será llamado extracto crudo.
- 5) A partir del extracto crudo se prepara un extracto "high-speed". Para ello, el extracto crudo es ultracentrifugado a 150,000g en un rotor SW 41 Ti durante 1 hora a 4°C. Al retirar el tubo de la centrifuga se observa la formación de tres fases; al fondo del tubo, un sedimento de restos celulares y membranas; por encima, una fase acuosa; y sobre ella una fase de lípidos y aceites. Luego, con una pipeta Pasteur se obtiene la fase acuosa que será denominada "high-speed".
- 6) Tanto el extracto crudo como el high-speed fueron liberados de lípidos y lipoproteínas. Para ello, un volumen de extracto crudo o high-speed fue mezclado con un volumen de triclorotrifluoroetano, la mezcla fue agitada y luego dejada en reposo hasta obtener una separación de fases: La fase inferior corresponde a los lípidos y lipoproteínas atrapadas por el solvente orgánico, y la fase superior corresponde a la fase acuosa de la mezcla. Esta fase fue separada en tubos y centrifugada a 12,000g durante 30 minutos a 4°C, para terminar de retirar el solvente orgánico y reclarificar la fase acuosa. Finalmente, en este paso se obtiene extracto crudo o high-speed libre de lípidos y lipoproteínas. Alternativamente, la remoción de lípidos y lipoproteínas fue realizada con una mezcla de cloroformo:éter (3v:1v), esta mezcla de solventes es aparentemente menos efectiva y la extracción se realizó dos veces, procediendo como se indica antes.
- 7) El extracto crudo y el high-speed libres de lípidos y lipoproteínas fueron calentados en baño de agua a 80°C durante 15 minutos; luego, fueron enfriados en hielo, y centrifugados a 12,000g durante 30 minutos a 4°C. De esta forma, se obtuvo los sobrenadantes termoestables del extracto crudo y del high-speed.
- 8) El extracto crudo y el high-speed termoestables fueron tratados con salmina (1g salmina por 1 Litro de termoestable) para absorber agentes aniónicos inespecíficos. La cantidad de salmina añadida al termoestable fue determinada por titulación y evidenciada por electroforesis, y corresponde a la concentración mínima necesaria para depletar estos agentes aniónicos inespecíficos (posiblemente fragmentos de DNA, RNA, nucleótidos, etc.). Los termoestables libres de estos agentes aniónicos inespecíficos fueron denominados como extracto crudo simplificado y high-speed simplificado.

3.2.- Extractos de ovocitos, ovocitos maduros, y embriones tempranos.

Este protocolo de preparación de los extractos es consecuencia de la optimización de protocolos anteriores.

Materiales:

- Tampón de lisis: 10% (v/v) Etilen glicol, 250 mM Sacarosa, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 10 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 1 mM EDTA. Al momento de ser usado se añade el cocktail de inhibidores de proteólisis: 1 mM PMSF, 10 mM Cloruro de Benzamidina, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Pepstatina-A, 1 µg/µl Leupeptina.
- Tampón de diálisis: 20 mM HEPES (pH 8.0), 1 mM EDTA y 10µg/ml PMSF.

Protocolo:

- 1) Un volumen de ovocitos, ovocitos maduros o embriones tempranos se mezclan con un volumen de tampón de lisis. Se homogeniza exhaustivamente con dounce.
- 2) El homogenizado se centrifuga a 12,000g durante 1 hora a 4°C.
- 3) Se obtiene un sedimento de restos celulares que se elimina, y el sobrenadante se reclarifica 2 veces por centrifugación a 12,000g durante 1 hora cada vez, a 4°C.
- 4) El sobrenadante final, se calienta en baño de agua, a 80°C durante 15 minutos, luego se enfría en hielo.
- 5) Se centrifuga a 12,000g durante 1 hora a 4°C.
- 6) El sobrenadante termoestable, se reclarifica dos veces por centrifugación a 12,000g durante 1 hora cada vez, a 4°C. Los sedimentos que precipitan por el calentamiento, se eliminan.
- 7) Finalmente, el sobrenadante termoestable se dializa toda la noche contra el tampón de diálisis. Luego, es guardado en congelación a -20°C.

3.3.- Preparación del "egg-jelly" de ovocitos.

Los ovocitos de *Holothuria tubulosa* son rodeados por una matriz extracelular transparente y gelatinosa denominada "jelly" o "egg-jelly". El egg-jelly tiene componentes y efectos variados en la fisiología del espermatozoide (Garbers et al., 1986; Vacquier, 1986). El egg-jelly puede ser solubilizado con un tratamiento corto con agua de mar ácida a pH 5, y sus componentes son separados por solubilización en etanol al 70% (Vacquier et al., 1979; Matsui et al., 1986).

Protocolo:

- 1) Los ovocitos obtenidos (ver Mat.&Mét.,2.3) fueron lavados con 20 volúmenes de agua de mar estéril.
- 2) Se resuspenden con 3 volúmenes de agua de mar, y luego, se ajusta el pH a 5.0 con HCl 0.1N; en agitación magnética suave. Se mantienen en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Los ovocitos desjellificados se separan centrifugando durante 5 minutos a 2,000g.
- 4) El sobrenadante fue recentrifugado a 27,000g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se ajusta a pH 8.0 con NaOH 0.1N, y se usa como una solución de egg-jelly total; se fracciona con etanol y/o se conserva a -20°C.
- 5) Para fraccionar el egg-jelly con etanol, se procede añadiendo etanol puro a la solución de egg-jelly hasta tener una concentración final de etanol al 70%. La solución se mezcla en vortex, y se deja reposar durante una hora a 4°C.
- 6) La suspensión etanólica del egg-jelly, se centrifuga a 27,000g durante 30 minutos a 4°C.
- 7) Ésta separación origina dos fracciones del egg-jelly. El sobrenadante, es la fracción soluble en etanol o fracción peptídica. El sedimento, es la fracción insoluble en etanol o fracción macromolecular.
- 8) La fracción macromolecular puede ser lavada 1-2 veces con etanol al 70%.
- 9) Las fracciones son secadas al "speed-vac" o liofilizadas para remover el etanol, y resuspendidas en un buffer adecuado para probar sus actividades o conservadas a -20°C.

4.- Fraccionamiento de los extractos.

El fraccionamiento de los extractos fue realizado por diversos métodos cromatográficos, los cuales han sido usados frecuentemente en la purificación de la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* o alguna molécula tipo nucleoplasmina.

El término de cromatografía se aplica a una amplia variedad de técnicas de separación, las cuales se basan en el fraccionamiento de una muestra entre una fase móvil y otra estacionaria. Actualmente, se reconoce que la cromatografía es el método más poderoso de separación y

purificación tanto por su resolución como por su versatilidad, tiene gran resolución comparada con los métodos de centrifugación y ultrafiltración, referidos por su ventaja de permitir el trabajo con grandes cantidades de proteínas o muestras.

Los componentes de una muestra son separados por su movilidad diferencial, la cual se produce a consecuencia de su interacción con la matriz de la columna (fase estacionaria) en una fase móvil (líquida o gas) que es manejada por un flujo, el cual se suele ejercer por presión o gravedad. Una gran ventaja de la cromatografía es su plasticidad, es decir, se puede manejar y modificar muchas condiciones (tipo de matriz, tampones, flujos, etc.) para obtener una resolución óptima.

4.1.- Fraccionamiento del extracto de gonada femenina.

4.1.1.- Cromatografía de hidroxilapatita: elución isocrática.

La hidroxil o hidroxilapatita (HTP) es una forma cristalizada de fosfato de calcio, $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$. Es utilizada ampliamente en el fraccionamiento y purificación de ácidos nucleicos, proteínas, y virus. La HTP separa las macromoléculas por su unión diferencial a su superficie iónica; además, tiene propiedades específicas de afinidad. Su selectividad no depende del tamaño molecular, ni de la densidad de carga o el punto isoeléctrico, esta característica la hacen complementaria con otras técnicas cromatográficas o de separación. Además, tiene poca capacidad de absorción para sustancias de bajo peso molecular (nucleótidos, sales y aminoácidos). La interacción entre los grupos cargados negativamente de la superficie de las proteínas con el Ca^{2+} de la HTP juegan un rol importante en la absorción de las proteínas.

Las proteínas son usualmente absorbidas a HTP en tampones con baja o alta fuerza iónica y baja concentración de fosfato, el pH es neutro. Luego la elución se realiza incrementando la concentración de fosfato en forma de gradiente lineal o por elución isocrática ("step"), mientras el pH permanece constante. Las condiciones de unión y elución de las proteínas se consiguen en forma empírica. La desventaja de este método cromatográfico es su performance a flujo muy lento debido a las partículas muy finas que contiene la HTP.

Materiales:

- Bomba peristáltica, modelo Pump P-1 (Pharmacia Biotech.)
- Detector, modelo 2238 UVICORD SII (LKB), con filtros removibles de 226 y 280 nm.
- Registrador, modelo 2210 Recorder 1-channel (LKB).
- Colector de fracciones, Modelo FC 204 (Gilson).
- Celda de concentración, modelo celda de ultrafiltración 8200 (Amicon Inc., MA, USA).
- Membrana PL de MWCO 5,000 Da, celulosa regenerada de baja unión (Millipore).
- "speed-vac", modelo "speed-vac"® Plus SC110A (Savant).
- Resina: Hidroxilapatita, Grado-DNA. Bio-Gel® HTP-Gel (Bio-Rad Lab., CA, USA).
- Tampón de equilibrio: 10 mM Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de muestra: 10 mM Na_2HPO_4 , 1M NaCl; pH 7.0
- Tampón de elución 50 mM: 50mM Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de elución 100 mM: 100mM Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de elución 200 mM: 200mM Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de elución 300 mM: 300mM Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de elución 500 mM: 500mM Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de elución 1M: 1M Na_2HPO_4 , 2M NaCl; pH 7.0

Protocolo:

- 1) La muestra de partida a fraccionar fue un extracto termoestable libre de lípidos y lipoproteínas obtenido de gonada femenina (ver Mat & Mét, 3.1).
- 2) La muestra de partida se dializa toda la noche en agitación magnética a 4°C, frente al tampón de muestra. De esta forma, se cambia de tampón a la muestra y se equilibra para ser aplicada a la columna.
- 3) Se usa una columna empaquetada con 50 ml aprox. de resina HTP, la cual es preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego, la columna es equilibrada overnight con tampón de equilibrio a flujo de 20 ml/hora.
- 4) Se aplica la muestra en la columna con un flujo de 60 ml/hora y las fracciones se colectan cada 9 minutos. El desarrollo de la columna se sigue a través de su cromatograma.
- 5) Se lava la columna con tampón de equilibrio hasta que la señal de absorción es basal.
- 6) Se inicia la elución de las proteínas retenidas en la columna con el tampón de elución 50 mM, se produce un pico y se continúa lavando con este tampón hasta que se recupera la línea base.
- 7) Seguidamente y en forma sucesiva, se aplican los tampones de elución 100mM, 200mM, 300mM, 500mM y 1M. Para cada tampón se procede como en 6).
- 8) Las fracciones obtenidas (picos) fueron concentrados por ultrafiltración (MWCO 5,000 Da) hasta 3-5 ml. Luego, se dializa overnight en agitación magnética a 4°C contra agua.
- 9) Las fracciones se terminan de concentrar en "speed-vac" hasta 0.5-1 ml. Se determina la concentración de proteínas por Bradford. Luego, se identifican los patrones electroforéticos de las fracciones en geles SDS-PAGE 15%.

Comentarios:

El dióxido de carbono se une a la HTP, lo cual puede producir la formación de costra en la superficie de la columna. Esto provoca una gran compactación de la matriz y una severa disminución del flujo de la columna. Se recomienda retirar un centímetro o la matriz afectada por este fenómeno y reemplazarla con matriz fresca. Además, se debe desgasear los tampones al momento de ser usados.

4.1.2.- Cromatografía de hidroxiapatita: elución en gradiente.

Este tipo de cromatografía fue utilizado como un paso de repurificación de la fracción 50 mM obtenida en HTP-isocrática.

Materiales:

- Tampón de equilibrio: 10mM Na₂HPO₄, 2M NaCl; pH 7.0
- Tampón de muestra: 10mM Na₂HPO₄, 1M NaCl; pH 7.0
- Tampón de inicio del gradiente: igual al tampón de equilibrio.
- Tampón de final de gradiente: 100 mM Na₂HPO₄, 2M NaCl; pH 7.0

Protocolo:

- 1) La muestra de partida fue una fracción 50 mM obtenida en columna de HTP-isocrático. La muestra fue dializada durante 12 horas contra un volumen suficiente de tampón de muestra en agitación magnética a 4°C.
- 2) Una columna de 10 ml de resina HTP es lavada overnight con tampón de equilibrio con flujo de 10 ml/hora.
- 3) Se aplica la muestra con flujo de 25 ml/hora, y se colectan fracciones cada 5 minutos. Después de aplicar la muestra la columna es lavada con tampón de equilibrio hasta que el cromatograma recupere la línea base.
- 4) Se aplica el gradiente por el sistema de vasos comunicantes, el gradiente continuo se forma de menor (tampón inicio de gradiente) a mayor concentración de fosfato de Na (tampón final de gradiente). La concentraciones molares del gradiente se realizan midiendo la reflexión de algunos tubos, y estos valores

- son referidos en base a una curva standard (reflexión vs. concentración molar de fosfato de Na).
- 5) En base al cromatograma se seleccionan y reúnen los tubos de la elución para formar picos o fracciones. Estas son concentradas por ultrafiltración, y luego, dializadas overnight frente a agua destilada en agitación magnética a 4°C.
 - 6) Terminada la diálisis, las fracciones se concentran en "speed-vac" hasta volúmenes de 0.5-1 ml. Se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford, y se guardan a -20°C.
 - 7) Una alícuota de cada fracción sirve para identificar el patrón electroforético en geles de SDS-PAGE 15%.

4.1.3.- Cromatografía de intercambio aniónico.

Este tipo de cromatografía se involucra en el amplio grupo de cromatografía de intercambio iónico, donde la separación o purificación de las proteínas se realiza teniendo como base la carga de sus componentes. En la práctica, quizás sea la cromatografía más popular, y el método explota el carácter anfotérico de las proteínas; es decir, la carga neta de una proteína es positiva en un tampón de pH bajo, mientras que será negativa en un tampón con pH alto. Así, la distribución de cargas sobre la superficie de las proteínas y su carga neta están involucradas en la interacción con la matriz de la columna. Si la matriz, tiene grupos funcionales de unión con carga positiva, la matriz es referida como un intercambiador aniónico, y los contraiones en la fase móvil son aniones. En este mismo sentido, un intercambiador catiónico es una matriz con grupos funcionales de unión con carga negativa, y los contraiones móviles son cationes. Las proteínas unidas a una matriz son eluidas por incremento de la fuerza iónica del tampón (los iones de la sal -contraiones-, en mayor concentración desplazan el equilibrio a su favor al competir con las proteínas absorbidas en la matriz). Así, la elución es una función específica de la concentración de sal. Alternativamente, la variación del pH permite la elución de las proteínas retenidas en la matriz; cuando el pH se aproxima al pI de la proteína, su carga tiende a ser neutra y en consecuencia pierde su interacción electrostática con la matriz y eluye. De esta forma, para eluir proteínas de un intercambiador catiónico, el pH se incrementa; mientras que para el caso de un intercambiador aniónico el pH debe disminuir. En consecuencia, las variables de la cromatografía de intercambio iónico (composición del tampón, pH del tampón, y pendiente del gradiente) pueden ser manipuladas como opción a conseguir una optimización de la separación y purificación de las proteínas.

Intercambiador aniónico.-

El grupo funcional o grupo cargado de un intercambiador determina su tipo como: débiles, intermedios y fuertes.

<i>Intercambiador aniónico</i>	<i>Rango de pH</i>	<i>Grupo funcional</i>
Aminoetil (AE-) [intermedio]	2-10	-OCH ₂ CH ₂ NH ⁺ ₃
Dietilaminoetil (DEAE-) [débil]	2-9	-OCH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₂ CH ₃) ₂
Aminoetil Cuaternario (QAE-) [fuerte]	2-10	-OCH ₂ CH ₂ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ -CH ₂ CH(OH)CH ₃

Los grupos cargados de las proteínas que interactúan son principalmente los carboxilo (-COOH → -COO⁻+H⁺) y el amino o amino terciario (-NR₂+H⁺ → -NR₂H⁺). Así, un intercambiador aniónico retiene (une) a las proteínas por su grupo carboxilo desprotonado y repela los grupos amino protonados (lo inverso sucede en un intercambiador catiónico). Fuerza iónica y pH son las variables que pueden modificar esta unión. El intercambiador de amonio terciario DEAE es el más usado para

separar proteínas en el rango de pH de 7-9. El DEAE mantiene una carga positiva constante, la cual suele ser neutralizada por el contra ión Cl^- . Otros aniones son capaces de competir por las cargas positivas del grupo DEAE, incluyendo las proteínas cargadas negativamente.

Como sabemos, la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* es una proteína muy ácida, y en su purificación a partir de extractos de ovocitos y huevos, la cromatografía de intercambio aniónico con DEAE como matriz fue satisfactoriamente aplicada.

Materiales:

- Resina: DEAE-52 (Whatman Scientific Ltd., UK.).
- Tampón de equilibrio: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 ; 1mM EDTA.
- Tampón de gradiente 0 M: igual al tampón de equilibrio.
- Tampón de gradiente 2 M : 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 ; 1mM EDTA ; 2 M NaCl.

Protocolo:

- 1) La muestra de partida fue una fracción de 50 mM obtenida en la columna de HTP-isocrático. La muestra se dializa durante 12 horas frente a tampón de equilibrio, a 4°C en agitación magnética.
- 2) Se empaqueta una columna con 10 ml de resina preparada según el fabricante. La columna se equilibra durante 12 horas a temperatura ambiente con flujo de tampón de 10 ml/hora.
- 3) Se aplica la muestra y luego se lava la columna con tampón de equilibrio, se colectan fracciones en tubos cada 3 minutos. La columna se desarrolla con flujo de 60 ml/hora.
- 4) Cuando se recupera la línea base en el cromatograma, se aplica el gradiente continuo que va de menor a mayor concentración de sal (de 0 a 2 M NaCl). Se usa un sistema de vasos comunicantes con 6 volúmenes (60 ml) de cada tampón de gradiente.
- 5) Se agrupan los tubos para formar fracciones de acuerdo al perfil de elución. Luego se establece la concentración molar de sal por reflexión, estos valores son referidos en base a una curva standard de reflexión vs concentración molar de NaCl.
- 6) Las fracciones se concentran por ultrafiltración; luego, se dializan frente a agua destilada a 4°C durante 12 horas, en agitación magnética. Seguidamente, se terminan de concentrar al "speed-vac" hasta volúmenes de 0.5-1 ml.
- 7) Se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford. Las fracciones se conservan a -20°C, y con una alícuota se realiza una electroforesis en SDS-PAGE 15% para identificar el patrón de proteínas de cada fracción.

4.1.4.- Cromatografía protamina-agarosa.

La resina de protamina-agarosa, consiste en protamina inmovilizada por entrecruzamiento con bromuro de cianógeno a partículas ("beads") de agarosa en concentración de 4% (Sigma Chemical Co., MO, USA). La separación de las proteínas en esta cromatografía se basa en una combinación de los efectos de afinidad e intercambio iónico, para ser más precisos de intercambio aniónico. Se aprovecha la afinidad natural entre protamina y nucleoplasmina, desde que la nucleoplasmina remueve la protamina del núcleo espermático y la reemplaza por histonas, en este hecho debe ocurrir una interacción entre la nucleoplasmina y la protamina, este es el concepto de afinidad que promueve este tipo de cromatografía. Por otro lado, la protamina debe comportarse como un potente intercambiador aniónico desde que es una molécula muy básica, luego la nucleoplasmina por ser una molécula aniónica compite con los contra iones salinos para interaccionar electrostáticamente con la protamina, como ocurre en una cromatografía de intercambio iónico. Este método fue validado con éxito en la purificación de la nucleoplasmina de ovocitos de *Xenopus laevis* (Itoh et al., 1993)

Materiales:

- Resina: Protamina-Agarosa (Sigma Chemical Co., MO, USA).
- Tampón de equilibrio: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 0.15 M NaCl.
- Tampón de elución 0.2 M: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 0.2 M NaCl.
- Tampón de elución 0.4 M: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 0.4 M NaCl.
- Tampón de elución 0.8 M: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 0.8 M NaCl.
- Tampón de elución 1.0 M: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 1.0 M NaCl.
- Tampón de elución 2.0 M: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 2.0 M NaCl.
- Tampón de elución 4.0 M: 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; 4.0 M NaCl.

Protocolo:

- 1) La muestra de partida es una fracción 50 mM obtenida por cromatografía de HTP-isocrático. La muestra es dializada toda la noche frente a tampón de equilibrio a 4°C en agitación magnética.
- 2) La columna (2 ml de resina) es equilibrada toda la noche con tampón de equilibrio a flujo de 10 ml/hora, a temperatura ambiente.
- 3) Se aplica la muestra y se lava la columna con tampón de equilibrio. La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente, con flujo de 25 ml/hora y se colectan fracciones cada 5 minutos.
- 4) Cuando se recupera la línea base, se inicia la elución de las proteínas retenidas, lavando la columna con cada uno de los tampones de elución, se comienza desde el de menor fuerza iónica (0.2 M) y se continúa incrementando la fuerza iónica sucesivamente (0.4 , 0.8 , 1.0 , 2.0 , y 4.0 M).
- 5) Las fracciones son dializadas toda la noche frente ha agua destilada, y luego se concentran en "speed-vac" hasta volúmenes de 0.1-0.5 ml.
- 6) Se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford. Luego, las fracciones son almacenadas a - 20°C. Una alícuota sirve para establecer el patrón electroforético en SDS-PAGE 15%.

4.2.- Fraccionamiento de extractos de ovocito, ovocito maduro y embriones tempranos.

Este fraccionamiento sólo se realizó en cromatografía de hidroxapatita con elución isocrática de las proteínas retenidas. La experiencia de los fraccionamientos de los extractos de gonada femenina y el conocer mejor la bioquímica de los extractos; permitieron optimizar el diseño experimental desde la preparación de los extractos hasta su fraccionamiento.

4.2.1.- Cromatografía de hidroxapatita: elución isocrática.

Materiales:

- Resina: Hidroxapatita grado DNA (HTPGel) (Bio-Rad Lab., CA,USA).
- Tampón de equilibrio: 20 mM HEPES (pH 8.0) , 0.4 M NaCl , 1 mM EDTA , 10 µg/ml PMSF.
- Tampón de elución 50 mM: 50 mM KH₂PO₄ en tampón de equilibrio.
- Tampón de elución 100 mM: 100 mM KH₂PO₄ en tampón de equilibrio.
- Tampón de elución 200 mM: 200 mM KH₂PO₄ en tampón de equilibrio.
- Tampón de elución 300 mM: 300 mM KH₂PO₄ en tampón de equilibrio.
- Tampón de elución 500 mM: 500 mM KH₂PO₄ en tampón de equilibrio.
- Tampón de elución 1 M: 1 M KH₂PO₄ en tampón de equilibrio.
- Tampón de diálisis: 1 mM EDTA , 10 µg/ml PMSF.

Protocolo:

- 1) La muestra de partida (extractos de ovocitos, ovocitos maduros, o embriones tempranos) se dializan frente a tampón de equilibrio toda la noche a 4°C en agitación magnética.
- 2) Se empaqueta una columna con 50 ml HTP, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lava toda la noche con tampón de equilibrio, a flujo de 20 ml/hora.
- 3) Se aplica la muestra, y se lava con tampón de equilibrio hasta recuperar la línea base. La columna se desarrolla temperatura ambiente, con flujo de 60 ml/hora y colectando fracciones cada 9 minutos.
- 4) Las proteínas son eluidas por lavados con los diferentes tampones de elución, se inicia con el tampón 50 mM y se termina en tampón 1M.
- 5) Las fracciones son concentradas por ultrafiltración hasta tener un volumen aproximado de 5 ml; luego, las fracciones son dializadas toda la noche frente a tampón de diálisis a 4°C en agitación.
- 6) Las fracciones se concentran en "speed-vac" hasta volúmenes de 0.5-1 ml. Luego, se dializan contra agua destilada a 4°C en agitación magnética.
- 7) Se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford, y se analizan las proteínas contenidas en cada fracción por electroforesis en SDS-PAGE 15%. Las fracciones son conservadas a -20°C.

5.- Análisis de proteínas.

5.1.- Cuantificación de proteínas: método de Bradford.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó rutinariamente con un "kit" comercial basado en el método espectrofotométrico de Bradford (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Lab., Germany). En resumen, el método se basa en el cambio diferencial de color de un colorante en respuesta a la concentración de proteínas. El colorante utilizado es el azul brillante de Coomassie G250 en solución ácida, y tiene un máximo de absorbancia a 465nm, éste máximo cambia a 595nm cuando se une a la proteína. Alternativamente, el método puede ser utilizado bajo dos procedimientos dependientes de la concentración de proteínas a determinar. El ensayo standard tiene un rango lineal (donde se cumple la Ley de Beer) entre 200-1,400 µg/ml. El procedimiento del microensayo tiene su linealidad para concentraciones de proteínas entre 1µg/ml a ≤ 25 µg/ml.

5.2.- Extracción de las proteínas básicas de los núcleos espermáticos.

Las proteínas del núcleo espermático por su naturaleza básica son extraídas con ácidos (débiles y fuertes). Las histonas pueden ser extraídas con ácido acético al 35% (Subirana et al., 1973), y las proteínas más básicas como las protaminas o protaminas-like pueden ser extraídas con HCl 0.4N (Subirana et al., 1973) o H₂SO₄ 0.4N (Hoffmann & Chalkley, 1978). Algunas de estas proteínas como el caso de la histona H1 y familia muestran solubilidad diferencial en ácido perclórico (PCA) al 5% (Goodwin et al., 1978).

5.2.1.- Extracción con HCl 0.4N

El siguiente protocolo es seguido para obtener el total de las proteínas nucleares básicas de los espermatozoides (Subirana et al., 1973).

Materiales:

- Solución de extracción: HCl 0.4N, a 4°C
- Solución de lavado: HCl 0.1N - Acetona (1 vol.:6 vol.), a 4°C
- Acetona pura, a -20°C
- Microcentrifuga, "speed-vac"

Protocolo:

- 1) Se parte de un sedimento o sedimento de núcleos.
- 2) Los núcleos son resuspendidos en HCl 0.4N usando un vortex o por pipeteo (con precaución de no dejar restos del sedimento en las paredes de la pipeta). Luego, se dejan en agitación durante 1 hora en hielo con agitación esporádica (la extracción durante 12 horas a 4°C, también es viable).
- 3) Centrifugar a alta velocidad (10,000g aprox.) durante 5 minutos.
- 4) Se obtiene el sobrenadante en otro tubo y se mantiene en hielo. El sedimento puede ser reextraído con HCl durante 30 minutos a 1 hora (ver paso 2).
- 5) idem paso 3
- 6) Se obtiene el sobrenadante y se reúne con el primero. El sedimento se descarta.
- 7) Las proteínas del sobrenadante se precipitan añadiendo 6 volúmenes de acetona fría (20°C). El contenido del tubo se mezcla en vortex, y se mantiene 1 hora (o durante 12 horas) a -20°C.
- 8) Luego el tubo se centrifuga como en el paso 3.
- 9) Se elimina el sobrenadante y se obtiene un sedimento de proteínas precipitadas que puede ser secado al vacío. Opcionalmente y en especial cuando se sospecha de acumulación de sales, el sedimento de proteínas antes de ser secado al vacío puede ser lavado con la mezcla HCl 0.1N – acetona pura (1v:6v).
- 10) Para lavar el sedimento de proteínas, añadir HCl-acetona y resuspender el sedimento, dejar en reposo durante 5 minutos en hielo, luego centrifugar, y eliminar el sobrenadante, y seguir lavando el sedimento, 2 ó 3 veces adicionales. Finalmente, se realiza un último lavado en acetona pura a -20°C, y el sedimento conseguido luego del centrifugado es secado al vacío.

5.2.2.- Extracción de la histona H1 y familia.

La separación de la histona H1 y otras proteínas relativas a esta se realiza teniendo como fundamento su solubilidad diferencial en ácido perclórico (PCA) al 5% (Goodwin et al., 1978).

Materiales:

- Solución HCl 0.1N a 4°C
- Solución HCl 0.1N - acetona (1 vol.: 6 vol.) a 4°C
- Ácido perclórico concentrado (PCA al 70%)
- Acetona pura a -20°C
- Ácido tricloroacético al 100%
- Microcentrifuga, "speed-vac"

Protocolo:

- 1) Se parte de un sedimento de proteínas nucleares básicas extraído con HCl 0.4N (ver Mat.& Mét., 5.2.1). Estas proteínas se redisuelven en HCl 0.1N, usar vortex y/o pipeteo, dejar reposar durante 15 minutos el tubo en hielo.
- 2) Añadir PCA hasta conseguir una concentración final en el tubo de PCA al 5%. Agitar en vortex y dejar reposar en hielo durante 15 minutos.
- 3) Centrifugar a 10,000g durante 5 minutos.
- 4) Se obtiene un sobrenadante enriquecido en histona H1 y otras proteínas relacionadas. El sedimento obtenido es enriquecido en histonas del core nucleosómico, este sedimento es lavado 1-3 veces en HCl-acetona, luego en acetona pura y finalmente, se seca al vacío.
- 5) El sobrenadante conteniendo la H1 y familia es precipitado con TCA. Para ello, se añade TCA hasta el 20% de concentración final, se deja reposar durante 15-30 minutos en hielo.
- 6) Centrifugar como en 3.
- 7) Eliminar el sobrenadante, y se obtiene la H1 y familia precipitada. Éste sedimento es lavado 1-3 veces con HCl-acetona, luego es lavado con acetona pura y se seca al vacío.

5.2.3.- Extracción con protamina.

Este método permite extraer las proteínas totales del núcleo espermático, es muy efectivo. El método se basa en incubar los núcleos con una solución de protamina a temperatura de "melting" para permitir el desplazamiento de las proteínas asociadas al DNA por la protamina. La desventaja es que el exceso de protamina es recuperada en el sobrenadante. El método no podría ser aplicado cuando se extrae alguna proteína básica similar a la protamina.

Materiales:

- Solución de extracción: urea 8M, 2- β -mercaptoetanol 20mM, glicerol al 20% (v/v), ácido acético al 5% (v/v), Salmina al 1.5% (p/v).
- Baño de agua termoregulado, vortex

Protocolo:

- 1) El sedimento de núcleos es resuspendido en solución de extracción. Usar vortex y/o pipeteo.
- 2) Incubar en baño de agua a 60°C durante 30 minutos.
- 3) La extracción de las proteínas básicas esta realizada, añadiendo una alícuota de verde de metilo al 1% la suspensión toma un color verde oscuro. La extracción puede ser cargada a un gel ácido para resolver el patrón electroforético. Si existen muchos restos celulares, el tubo de extracción es centrifugado a máximo speed (10,000g) durante 1 minuto antes de ponerse a la electroforesis.

5.2.4.- Extracción con SDS.

Protocolo:

- 1) El sedimento de núcleos es resuspendido directamente en tampón de electroforesis SDS-PAGE 1x.
- 2) El volumen de la extracción es seleccionado pensando que la extracción será resuelta directamente en la electroforesis (20-40 μ l).
- 3) La suspensión se mantiene durante 60 minutos a 4°C, y esporadicamente se mezcla en vortex.
- 4) La extracción se finaliza terminando de reducir, para ello se lleva a baño de agua a 100°C durante 3 minutos.
- 5) Se enfria y se le aplica centrifugación (10,000g) durante 1 minuto para eliminar el material insoluble, luego el sobrenadante se separa en electroforesis SDS-PAGE.

5.3.- Electroforesis de proteínas.

El método de separación electroforética se basa en la migración diferencial de las moléculas en solución a través de un campo eléctrico. Este método es de amplia aplicación en la biología molecular, especialmente en la purificación y caracterización de proteínas y estudios de ácidos nucleicos. En breve, la velocidad de migración o movilidad electroforética de las moléculas en el campo eléctrico depende de su intensidad, del tamaño, forma y carga neta de las moléculas, y también de la fuerza iónica y temperatura del medio en el que se desplazan.

Actualmente, el soporte más frecuentemente utilizado para separar electroforéticamente proteínas, es el gel de poliacrilamida. Estos geles se forman por la polimerización de largas cadenas de monómeros de acrilamida unidas covalentemente en presencia de bisacrilamida que actúa como agente entrecruzador. La polimerización se inicia por la presencia de radicales libres que se forman al reaccionar el persulfato de amonio con el catalizador TEMED.

5.3.1. Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Inicialmente, el sistema fue desarrollado por Laemmli (1970) y modificado por Thomas y Kornberg (1978). En este tipo de electroforesis tanto el soporte (gel) como el buffer de corrida tienen entre otros componentes SDS como agente tensioactivo. Por otro lado, las proteínas se mezclan con un buffer de muestra, uniéndose al detergente aniónico SDS. Finalmente, todas las proteínas desnaturalizadas se encuentran solubilizadas y cargadas negativamente por la unión del SDS, la cantidad de SDS que se asocia a una proteína es aproximadamente proporcional a su tamaño o mejor dicho a su peso molecular. Así, éste método electroforético permite estimar el peso molecular aparente (M_{Wap}) de una proteína en forma relativa al peso molecular y movilidad electroforética de proteínas standards. En general, éste método permite separar una amplia variedad de proteínas ácidas y básicas; sin embargo, son una excepción las proteínas muy básicas del tipo de las protaminas, éstas proteínas forman agregados insolubles y no penetran el gel.

Protocolo:

- 1) Los geles fueron preparados en lámina ("slab") para electroforesis vertical de tipo discontinuo (gel apilador y gel separador). El tamaño del gel fue variable dependiendo de los requerimientos experimentales; habitualmente, se utilizó placas de 13x12.5 ó 13x20 cms (ancho x altura) y espesores de 0.75 ó 1.5 mm.
- 2) Las placas, peines y espaciadores fueron lavados en agua, secados y desengrasados con etanol y luego secados al aire. Las electroforesis se desarrollaron con aparatos y sistemas comerciales (C.B.S. Scientific Company, Inc., CA, USA.).
- 3) Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Gel Apilador o Concentrador (Stacking)

Soluciones	Concentración Final
Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0.8%	5% - 0.13%
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.125 M
SDS 10%	0.1 %
Agua milli-Q	Completar volumen
PSA 10%	0.1 %
TEMED	0.1 %

Gel Separador (Resolving)

Soluciones	Concentración Final
Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0.8%	15 % - 0.4 %
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	0.75 M
SDS 10%	0.1 %
Agua milli-Q	Completar volumen
PSA 10%	0.1 %
TEMED	0.05 %

Tris, trietanolamina; SDS, sodio dodecilsulfato; PSA, persulfato de amonio; TEMED, N,N,N',N'-tretametiletlenodiamida.

Primero, se prepara el gel separador y se vierte entre las placas de vidrio, se deja reposar en posición vertical hasta que polimerice. El oxígeno es un inhibidor de la polimerización, por esta razón se añade suavemente butanol saturado en agua, lo suficiente para cubrir el gel. Cuando el gel polimeriza (15 minutos, aprox.) se vierte el butanol y se lava el gel con agua 2-3 veces durante 20 segundos cada vez. Luego se añade el gel apilador y se inserta el peine para formar los pozos, cuidando que no queden burbujas de aire atrapadas, se deja polimerizar durante 5-10 minutos. Se retira el peine y se lavan los pozos con una jeringa usando tampón de corrida.

- 4) El tampón de electroforesis consiste de: Tris 0.6% (0.05M), Glicina 2.88 % (0.38 M), y SDS 0.1%. Esta solución tiene un pH aproximado de 8.3 y no requiere ser ajustado con HCl. Puede ser preparado como una solución stock 5X y conservado a temperatura ambiente.
- 5) Las muestras son preparadas con el siguiente tampón: Tris 0.0625 M, SDS 2%, Glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%. Se añade Azul de Bromofenol 0.1% para obtener el tampón con un color azul, y ser utilizado como frente de la corrida electroforética. El pH de la solución sin ajustar es aproximadamente de 6.8. Normalmente, la solución se prepara como solución stock 2X, pudiendo ser preparada como stock 5X - 8X, pero la concentración de glicerol tiene que ser cada vez disminuida y a consecuencia se pierde la viscosidad y facilidad del buffer al momento de cargar la muestra en los pozos del gel. El tampón de muestra tiene dos funciones, por un lado desnaturaliza las proteínas, y por otro apantalla las proteínas cargándolas negativamente, en realidad el SDS se une a los dominios hidrofóbicos y forma verdaderas micelas aniónicas. Finalmente, las proteínas se terminan de desnaturalizan en la presencia de β -mercaptoetanol en baño maría a 100°C durante 3 minutos; de está forma las proteínas oligoméricas son desmontadas en subunidades monoméricas.
- 6) Condiciones del desarrollo electroforético: La polaridad de este sistema electroforético es de polo negativo (\ominus , parte superior) a polo positivo (\oplus , parte inferior). A pH 8.3 del tampón de electroforesis la glicina tiene carga neta negativa, y migra rápidamente formando el frente de la electroforesis. La electroforesis puede ser desarrollada a voltaje constante o amperaje constante. Sin embargo, la mejor condición de electroforesis es fijando el voltaje constante, porque de esta forma se controla mejor la

temperatura evitando su incremento, y sobrecalentamiento del gel. Esto último puede ser evitado usando un sistema de recirculación de agua para enfriar el gel o desarrollando la electroforesis a 4°C.

- 7) Efecto apilador del sistema discontinuo. Las proteínas se apilan en el gel apilador permitiendo que toda la muestra ingrese en forma simultánea al gel separador. Este efecto se produce a consecuencia de la diferencia de potencial local entre el tampón de electroforesis (pH 8.3) y el gel apilador (pH 6.8), en esta situación las proteínas que se encuentran delante del frente (interfase) se aceleran y las que son adelantadas por el frente se retrasan, y finalmente la mezcla de proteínas se concentra para ingresar al gel separador donde la diferencia de potencial es anulada, y la movilidad es por la carga neta electronegativa.

5.3.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-ácido acético-urea (AU-PAGE).

Este tipo de electroforesis fue desarrollado por Panyim & Chalkley (1969) para el análisis de las histonas. Se fundamenta en la separación de las proteínas por su carga eléctrica, de tal forma que se pueden separar proteínas de similar tamaño pero de diferente carga eléctrica. Este sistema de electroforesis también permite la separación de proteínas extremadamente básicas, como es el caso de las protaminas. Inicialmente, este tipo de geles se preparaba con PSA como activador y TEMED como catalizador, luego estos fueron reemplazados por la tiourea y agua oxigenada, respectivamente (Hurley, 1977). Esta modificación evita la pre-electroforesis y reduce considerablemente el tiempo de polimerización.

Protocolo:

- 1) Se preparan las placas de vidrio, y otros materiales como antes (ver 5.3.1).
- 2) El gel es preparado con las siguientes soluciones:

Solución	Concentración final
Urea	2.5 M
Tiourea	0.09%
Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.2%	15.0% - 0.1%
Ácido Acético 43%	5.4%
Agua	Hasta completar el volumen
H ₂ O ₂ 30%	0.2 - 0.5%

La urea y tiourea son pesadas al momento de preparar el gel. Las soluciones de acrilamida, acético y peróxido son conservadas a 4°C. El peróxido debe mantenerse en un frasco oscuro o recubierto con papel aluminio para evitar la luz y su descomposición. Cuando se prepara el gel se mezclan todos los componentes, sin el peróxido, en este momento la solución del gel puede ser desgaseada, luego se añade el peróxido y rápidamente se mezcla en forma suave y se vierte entre las placas de vidrio. Se coloca el peine y se espera la polimerización (10-15 minutos) a temperatura ambiente.

- 3) Cuando el gel polimeriza, se retira el peine e inmediatamente, los pozos deben ser lavados exhaustivamente con una pipeta o una jeringa usando agua o tampón de electroforesis. Luego el gel es montado en forma vertical en la cubeta, y se vierte el tampón de corrida.
- 4) El tampón de electroforesis es una solución de ácido acético al 5%. No es necesario ajustar el pH de la solución (debe ser de 3.2 aproximadamente).

- 5) Las muestras son preparadas con el siguiente tampón 2X: 2-mercaptoetanol 20 mM; urea 8M; ácido acético 5%; verde de metilo 1%; glicerol 20%.
- 6) La electroforesis se desarrolla a 20 mA (I constante) y 100-150 voltios. Evitar el sobrecalentamiento. Finalizada la electroforesis, el gel es desmontado teñido, fotografiado y conservado (ver Mat. & Mét. 5.4 y 5.5).

5.3.3.- Electroforesis de geles de poliacrilamida-tritón-urea (TAU-PAGE).

La adición de detergentes no-iónicos a los geles mejora significativamente la separación de las proteínas básicas. El detergente produce una reducción diferencial de sus movilidades electroforéticas (Zweidler & Cohen, 1972). Este efecto es debido a la formación de micelas entre el detergente y los dominios hidrofóbicos de las proteínas; el sistema es tan sensible que puede separar moléculas con pequeñas variaciones en sus regiones hidrofóbicas (Franklin & Zweidler, 1975, 1977). En este tipo de geles la urea actúa como inhibidor de la unión del detergente. Se debe evitar modificaciones químicas de la muestra como por ejemplo las oxidaciones de los residuos de Met, Trp, y Cys. En este mismo sentido, estos geles necesitan una pre-electroforesis y una pre-corrida, para eliminar los agentes oxidantes utilizados en la polimerización del gel.

Protocolo:

- 1) Placas de vidrio y otros materiales se preparan como antes (ver 5.3.1).
- 2) Se prepara el gel usando las siguientes soluciones para obtener un TAU-PAGE con Tritón X-100 6mM y urea 7.5 M:

Soluciones	Concentración final
Urea	7.5 M
Acrilamida 60% - Bisacrilamida 0.4%	12% - 0.08%
Tritón X-100	6 mM
Ácido Acético	5.5 %
Agua milli-Q	Completar volumen
PSA 10%	0.1 %
TEMED	0.5 %

La urea y el tritón X-100 se pesan al momento de preparar el gel. La solución de acrilamida filtrada se conserva temperatura ambiente. El acético es añadido a partir de un stock puro. El TEMED es añadido después de degasear la solución del gel e inmediatamente se vierte entre las placas de vidrio y se coloca el peine. Para disolver la urea la solución puede ser calentada en baño de agua, evitando temperaturas superiores a los 60°C para prevenir la carbamilación de la urea. El tiempo de polimerización es alrededor de 15 minutos.

- 3) Polimerizado el gel, se retira el peine y se lavan exhaustivamente con jeringa o pipeta los pozos formados. Usar el mismo tampón de electroforesis. Luego, se monta el gel en la cubeta de electroforesis. El tampón de corrida es una solución de ácido acético 5%. La electroforesis se desarrolla con polaridad de (+, parte superior) a (-, parte inferior).
- 4) Este tipo de geles requiere una pre-electroforesis. Para ello se cargan los pozos con una solución de: ácido acético 5%, urea 7.5 M, verde de metilo 1%. La pre-electroforesis se realiza a 20 mA (I constante) hasta que el frente de la electroforesis abandone el gel.
- 5) Finalizada la pre-electroforesis, los pozos son lavados con jeringa y el tampón (todo el tampón) se cambia por tampón nuevo. Seguidamente, se realiza la pre-corrida, para ello los pozos son lavados con el tampón

de corrida, y cargados con una solución que contiene: ácido acético 5%, urea 7.5 M, tritón X-100 6mM, cisteamina-HCl 0.5M, verde de metilo 1%. Luego, se pone en marcha la electroforesis dejando que el frente de la electroforesis avance 2.5 cm desde el inicio, y recién se puede cargar las muestras de proteínas, y se continúa con la electroforesis a 20 mA (I constante)

- 6) Las muestras son preparadas con el mismo tampón de muestras que los GPAU. Luego, los geles son manipulados como se comentó anteriormente (ver Mat. & Mét., 5.3.2).

5.3.4.- Electroforesis bidimensional (ELFO-2D).

El sistema de electroforesis bidimensional es un método potente para separar proteínas y péptidos (por ejemplo, productos de digestión enzimática). El método consiste en separar en una primera dimensión los polipéptidos por sus características de carga, hidrofobicidad (AU-PAGE, AU-PAGE) o punto isoeléctrico (IEF-PAGE); para ello se utiliza un sistema de electroforesis en tubo o en lámina y luego se recorta el carril que interesa resolver en la segunda dimensión. Por lo general, la segunda dimensión es una electroforesis SDS-PAGE, con gel discontinuo o en gradiente. Realizar la primera dimensión en SDS-PAGE es infrecuente, debido a que el SDS residual puede alterar la separación en los geles ácidos e IEF-PAGE. A diferencia de las separaciones en los sistemas unidimensionales donde los polipéptidos se resuelven como bandas, en la ELFO-2D los polipéptidos se separan como manchas o "spot".

Protocolo:

- 1) La primera dimensión (ELFO-1D), se realiza en TAU-PAGE (ver Mat. & Mét., 5.3.3). Finalizada la electroforesis, se desmonta el gel (13x20x0.075cm) de las placas de vidrio y se recorta el carril o "lane" seleccionado para ser resuelto en ELFO-2D. El recorte del gel se realiza teniendo como referencia algún carril vecino teñido con "Coomassie-blue".
- 2) La segunda dimensión (ELFO-2D), se realiza en SDS-PAGE (ver Mat. & Mét., 5.3.1). Se prepara un gel en placas de 13x20x0.15cm, con 10 cm de altura de gel separador, y 3 cm de gel apilador, se usa un peine para ELFO-2D.
- 3) El lane recortado para la ELFO-2D, es equilibrado sumergiéndolo en una solución de: acrilamida/bisacrilamida, tris-HCl, SDS, PSA en las mismas concentraciones que el gel apilador SDS-PAGE (ver Mat. & Mét., 5.3.1). A esta solución se le añade ditiotreitól (DTT) para tener una concentración final de 50mM. El equilibrio del gel se realiza durante 45-60 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente.
- 4) El lane equilibrado es depositado con cuidado entre las placas de vidrio sobre el gel apilador. Usar una espátula fina para desplazar el gel. Luego, se recubre con gel apilador, de tal forma que al momento de polimerizar la primera dimensión quede incluida en el gel apilador.
- 5) Se desarrolla la electroforesis SDS en forma habitual con 100-150 V (V constante). Para visualizar el frente de corrida se usan marcadores o se carga directamente tampón de muestra SDS-2X.

5.4.- Tinción de geles.

5.4.1.- Tinción de geles con azul de coomassie.

El colorante Azul de Coomassie R-250 es generalmente el más aceptado para la tinción de los geles. El Coomassie R-250 se une a las proteínas, y la intensidad de la coloración es

relativamente y hasta cierto punto independiente de la concentración y de la naturaleza química de las proteínas; de esta forma, cuando se tiene que cuantificar una proteína es el colorante más recomendado. La solución de tinción del gel tiene entre sus constituyentes metanol y ácido acético, lo cual permite que las proteínas se fijen en el gel y no eluyan durante el proceso de tinción y desteñido del gel; además, el metanol es el solvente adecuado para disolver el Coomassie Blue.

El tiempo de tinción del gel depende de varios factores; entre ellos, el espesor y tamaño del gel, vejez del colorante, coloración en agitación, etc. La tinción se efectúa entre 30 minutos a toda la noche (overnight). Seguidamente a la tinción, el gel debe ser desteñido por difusión del Coomassie que no se ha unido a proteína, a fin de contrastar las bandas de proteínas del fondo del gel.

Materiales:

- Solución de tinción. Azul brillante de Coomassie R-250 (0.25%) contenidos para 1L de solución: 2.50 g azul brillante de Coomassie R-250, 100 ml de ácido acético concentrado, 400 ml de metanol, enrasar a 1L con agua destilada o desionizada. Se recomienda disolver el colorante en un poco de metanol. Filtrar la solución antes de utilizar por primera vez.
- Solución desteñidora. 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético concentrado, enrasar hasta 1L con agua destilada o desionizada.

Protocolo:

- 1) Terminada la electroforesis. Remover el gel y marcar un punto de referencia para identificar los carriles.
- 2) Sumergir el gel en un recipiente que contenga la solución de tinción. El colorante debe ser suficiente para cubrir el gel.
- 3) Dejar el recipiente en agitación suave durante 20-30 minutos. Los geles con espesor < 1mm son muy delicados, la agitación debe ser muy suave o dejarlos sin agitar.
- 4) Retirar la solución de tinción (vertir o aspirar).
- 5) Añadir la solución desteñidora. Dejar el recipiente a temperatura ambiente y en agitación suave. Cambiar la solución desteñidora. Este proceso puede durar desde varias horas hasta toda la noche. El desteñido es satisfactorio cuando el color de fondo es claro y las bandas de las proteínas contrastan adecuadamente del fondo del gel.

Comentarios:

La solución de tinción puede ser filtrada en papel Whatman #1. Frecuentemente, el colorante es reusado y si la tinción no es satisfactoria, el gel puede ser teñido nuevamente con solución fresca. Rutinariamente, 30 minutos son suficientes para teñir el gel, pero tiempos mayores pueden ser necesarios dependiendo del tamaño y espesor del gel, etc.

La solución desteñidora puede ser reusada varias veces, luego de ser reciclada por filtración a través de carbón activo en un filtro Whatman #1. Un criterio para considerar envejecidas la solución de tinción y/o desteñido es el hinchamiento del gel a consecuencia de la hidratación de las soluciones (en realidad, se debe a la evaporación del metanol). La sensibilidad de la tinción con Coomassie R-250 puede variar desde 0.5-5.0 µg/banda en un mini gel de 10 pozos. Desteñido el gel puede ser fotografiado en blanco y negro, se puede mejorar el contraste del gel usando un filtro amarillo.

5.4.2.- Tinción con nitrato de plata.

Cantidades de proteína menores a 0.3 y 1µg (dependiendo de la naturaleza de la proteína) no pueden ser detectadas por tinción con azul de Coomassie. Sin embargo, la tinción de los geles con plata permite detectar concentraciones muy pequeñas de proteínas, del orden de los nanogramos (ng). Existen diversos protocolos para teñir geles con plata, y la detección del método

puede variar entre 2 a 5 η g. La tinción con plata se basa en su unión a distintos grupos químicos de las proteínas, como los grupos sulfidrilo o carboxilo. La detección con plata es exclusivamente cualitativa. No puede ser utilizada para cuantificar proteínas por diversas razones, entre ellas: dependiendo de la naturaleza de la proteína, ésta puede adquirir un color particular (entre marrones y amarillos), o incluso puede teñirse negativamente contrastando del fondo del gel.

La tinción con plata se realizó de acuerdo al método de Blum et al. (1987). Éste método utiliza dos propiedades del tiosulfato: mejora la imagen por el pretratamiento del gel fijado, y evita el color de fondo (background) no específico durante el desarrollo de la técnica. Cuando se quiere producir imágenes reproducibles se debe trabajar con mucho cuidado y exactitud en los tiempos. La técnica puede ser desarrollada en agitación a temperatura ambiente (20-25°C). Se puede usar algún sistema de succión para retirar las soluciones rápidamente del gel.

Protocolo:

- 1) Mantener el gel al menos 1 hora en solución de fijación (50% metanol, 12% ácido acético). Los geles pueden ser mantenidos en esta solución varios días, sin perder la calidad de la tinción. Geles teñidos con azul de Coomassie pueden ser teñidos con plata, el prerequisite de esto es desteñir completamente el gel, luego se inicia todo el procedimiento desde la fijación.
- 2) Lavar el gel en 50% etanol, 3 veces durante 20 minutos cada vez. Los geles de espesor < 1mm, pueden ser lavados los últimos 20 minutos con etanol 30%, para evitar la deformación.
- 3) Sumergir el gel en la solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), exactamente, durante 1 minuto. Si se sobrepasa éste período de tiempo se puede tener una tinción con gran color de fondo.
- 4) Lavar el gel con agua, tres veces durante 20 segundos cada lavado.
- 5) Sumergir el gel durante 20 minutos en solución de nitrato de plata (2 g/L AgNO_3 , 0.75 ml/L de solución stock de formaldehído al 37%). Después de este paso, el gel puede tomar un color amarillento, esto no tiene ningún efecto sobre la sensibilidad o color de fondo de la tinción.
- 6) Lavar el gel dos veces con agua durante 20 segundos cada vez. Este paso remueve el exceso de plata.
- 7) Sumergir el gel en la solución de revelado (60 g/L Na_2CO_3 , 0.5 ml/L de formaldehído al 37%, 4 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), en agitación suave durante 10 minutos. Si la solución de revelado en contacto con el gel se torna marrón, cambiarla inmediatamente por otra fresca (esto ocurre a consecuencia que el tiosulfato libre se ha consumido). Como referencia, una banda que contiene 500 η g de proteína puede ser detectada en aprox. 30 segundos de revelado, y una banda con 50 η g puede tardar cerca de 2 minutos. Si se consigue la detección y contraste adecuado antes de los 10 minutos de revelado, este paso puede pararse. Si el revelado se prolonga sobre los 10 minutos puede aparecer un color de fondo amarillento. La temperatura de revelado puede ser de 18° - 25°C.
- 8) Lavar el gel dos veces con agua durante 2 minutos cada vez. Esto remueve el exceso de tiosulfato que puede descomponerse en la solución de fijación y producir color de fondo.
- 9) Mantener el gel durante 10 minutos en solución de fijación del gel (paso 1).
- 10) Lavar el gel en metanol al 50% al menos durante 20 minutos. Después puede ser conservado a 4°C en metanol al 50%. Si se quiere secar el gel, mantener en agitación a 4°C durante 30 minutos en metanol al 30%, y luego otros 30 minutos en glicerol al 3%.

5.5.- Detección con anticuerpos (western-blot).

La electrotransferencia de proteínas desde un gel a una membrana se conoce como "Western-blotting". Este método combina la capacidad de resolución de la separación electroforética de las proteínas con la especificidad de la identificación inmunológica. Estas características hacen del western-blot un método rápido y altamente sensible. Para conseguir resultados óptimos, las macromoléculas deben ser transferidas eficientemente desde el gel a la membrana. Diferentes tipos de membranas han sido utilizadas como soporte para inmovilizar

proteínas; sin embargo, las ampliamente utilizadas son: membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), nitrocelulosa (NC) y nylon.

La detección de las proteínas inmovilizadas se realiza usando técnicas inmunobioquímicas altamente específicas y sensibles. El reconocimiento específico con una fuerte afinidad de unión entre el antígeno (proteína inmovilizada) y el anticuerpo es la base de la técnica. La proteína blanco es localizada por un anticuerpo policlonal o monoclonal específico. Luego, un anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario debe ser especie-específico, y contiene la marca para producir la imagen visual final.

Materiales:

- Tampón de transferencia: Para preparar 5 L de tampón; 15g Trizma, 15 g glicina, 25 ml SDS 10% (ó 2.5 g SDS), 1 L metanol. Éste tampón puede ser reutilizado 2-3 veces.
- Solución de Bloqueo (BLOTTO): Disolver en 1L de PBS 50 g de leche desnatada en polvo, 1 ml de Tritón X-100, 1 ml azida sódica 10% (ó 1 g/L).
- Reactivos Casolans Super-ECL: Solución de luminol más solución realizadora ("enhancer").
 - Solución de luminol: 200 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6-8.7; 50 mg luminol sódico (Sigma, A4685; Fotosensible), concentración final 1.25 mM ; 62 μ l 30% H₂O₂, concentración final 2.7 mM. Guardar a 4°C, envuelto con papel de aluminio.
 - Solución enhancer: 11 mg ácido phidroxi-cumárico (trans) (Sigma C-9008) en 10 ml DMSO. Guardar envuelto en papel de aluminio a temperatura ambiente.
- Antes de usar mezclar 100 μ l de solución enhancer con 10 ml de solución de luminol.

Protocolo:

- 1) Finalizada la electroforesis se monta el sistema semi-seco para transferir las proteínas del gel a la membrana; para ello se siguen los siguientes pasos:
- 2) Sobre uno de los soportes de transferencia, se coloca un estropajo "scotch-brite" humedecido con tampón de transferencia.
- 3) Se coloca 3 hojas de Whatman 3MM empapadas con tampón de transferencia.
- 4) Se cubre con una membrana de nitrocelulosa (0.45 μ m, NB-86) humedecida en tampón de transferencia.
- 5) Sobre la nitrocelulosa se coloca el gel que previamente fue sumergido en tampón de transferencia para humedecerlo. Tener cuidado que no queden atrapadas burbujas de aire entre la nitrocelulosa y el gel, se pueden retirar usando un tubo limpio como rodillo sobre el gel.
- 6) Seguidamente, se cubre el gel con tres hojas de Whatman 3MM humedecidas con tampón de transferencia.
- 7) Finalmente, se cubre con un estropajo "scotch-brite" también humedecido con el tampón de transferencia. Se pasa un tubo como rodillo para asegurarse de que no queden burbujas de aire en el "sandwich". Se cubre con el soporte de acrílico del equipo de transferencia y se introduce con cuidado de no mover o perturbar los elementos del sandwich.
- 8) El sandwich en la cubeta debe estar cubierto con tampón de transferencia al menos lo suficiente para cubrir el gel y la membrana. Tener cuidado con la polaridad, para transferencias de geles SDS, la migración a la membrana es de cátodo a ánodo. Por lo general, la transferencia se realiza a 80 V (voltaje constante) que es equivalente a 300 mA (amperaje constante), el tiempo de transferencia es de 2-3 horas, con agitación magnética en el cuarto frío (4°C aprox.). La transferencia de ϕ_0 se llevó a cabo a 500mA (intensidad constante) durante 60-90 minutos, dependiendo de la cantidad de proteínas a transferir.
- 9) Se desmonta el sandwich. El gel se tiñe con Coomassie blue, y la membrana con una solución de Rojo de Ponceau S 0.02% en agua durante 5 minutos. Luego se destiñe con agua. Se puede relizar una fotocopia de la membrana teñida para usarla como referencia.
- 10) Se bloquea la membrana con BLOTTO con agitación 1 hora -toda la noche.

- 11) Lavar la membrana con PBS-tween 20 al 0.1%, dos veces durante 5 minutos cada vez.
- 12) Añadir el anticuerpo primario en BLOTTO (algunos anticuerpos se unen específicamente añadidos en PBS-tween 20). Para detectar ϕ_0 , se usó IgG de conejo purificada por cromatografía (Casas *et al.*, 1989), el anticuerpo fue preparado en solución BLOTTO a concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, la incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación rotatoria.
- 13) Se lava la membrana, 3 veces con PBS-tween 20 durante 5 minutos cada vez en agitación.
- 14) Se incuba la membrana con el segundo anticuerpo comercial; se usó un anti-IgG entera (H+L) para conejo, conjugado con peroxidasa (Jackson Servicios Hospitalarios). Se preparó en dilución 1:10000 en PBS-Tween 20. La incubación fue por 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
- 15) Luego, la membrana fue lavada 5 veces en PBS-tween 20 durante 5 minutos cada vez.
- 16) La detección de la proteína fue realizada por quimioluminiscencia. En la cámara oscura (pero con luz) se cubre la membrana con sustrato (reactivo casolans super-ECL), y se incuba por 1 minuto. Retirar la membrana y dejar secar sobre una hoja Whatman 3MM, siempre su posición es cara arriba, cuando esta seca se envuelve con plástico autoadhesivo de cocina ("saran-wrap"), y se expone el film de rayos-x (Curix RP-2, Agfa) durante 1 minuto y se revela inmediatamente, dependiendo de la intensidad de marca se ajusta empíricamente un tiempo adecuado.

Comentarios:

Las membranas luego de la transferencia, y antes de ser bloqueadas pueden ser conservadas durante mucho tiempo a 4°C en PBS suplementado con 1 ml de tritón X-100, y 1 g/L de azida de sodio.

El anticuerpo secundario y el primario pueden ser removidos de la membrana para realizar un segundo marcaje en la misma membrana, usar el siguiente protocolo:

- Sumergir la membrana en tampón (100 mM 2- β -mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM tris-HCl pH 6.7), luego, incubar la membrana a 50°C durante 30 minutos con ocasional agitación (si se requiere mayor astringencia hacer la incubación a 70°C).
- Lavar la membrana dos veces durante 10 minutos cada vez, en TBS-tween o PBS-tween a temperatura ambiente, usar grandes cantidades de tampón.
- Bloquear la membrana en BLOTTO, y continuar con el protocolo de la detección.

5.6.- Análisis de aminoácidos.

Para realizar el análisis composicional de las proteínas se realizaron hidrólisis ácidas. El HCl es ampliamente utilizado para hidrolizar proteínas, en un procedimiento simple que involucra la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos constituyentes con exceso de HCl, luego el exceso de HCl es removido al vacío (Moore and Stein, 1963).

Materiales:

- Tubos de hidrólisis (Pyrex) 13x200 mm
- HCl, 6 N ó 12 N
- Mechero de acetileno, bomba de vacío, rotavapor
- Hielo seco, acetona

Protocolo:

- 1) Una cantidad adecuada de proteína para hidrolizar es de 0.05 - 0.2 mg.
- 2) La proteína liofilizada es resuspendida en HCl 6N (1-2 ml), si esta en solución, se le añade 1 volumen de HCl 12 N, y luego se completa hasta 1-2 ml con HCl 6N.
- 3) La proteína en solución HCl 6N se deposita en el tubo de hidrólisis, luego se congela usando hielo seco y acetona.
- 4) Con la muestra congelada se hace vacío en el tubo, y paulatinamente se va descongelando la muestra

aplicando calor, cuando es evidente que el vacío del tubo es total, se sella el tubo en su constricción.

- 5) Luego, se hidroliza la proteína incubando el tubo a 110°C durante 24 horas.
- 6) Al cabo de la incubación, el tubo es abierto y el HCl residual en exceso es evaporado en un rotavapor a 45°C.
- 7) La hidrólisis puede ser conservada en congelación hasta su análisis, para lo cual se resuspende en un tampón adecuado.

Comentarios:

Los tubos deben de estar totalmente limpios, pueden ser lavados con solución sulfocrómica, luego aclarados con agua destilada en forma exhaustiva para retirar trazas de metales y oxidantes. El sellado al vacío debe realizarse con mucha atención, puesto que el oxígeno es un agente inhibidor de la hidrólisis.

Las hidrólisis fueron analizadas en un autoanalizador Alpha Plus - 2 (Farmacia LKB Biotech.) en el Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, Barcelona-España.

5.7.- Determinación del pI: cromatografía de enfoque isoelectrico.

El cromatoisoelectrico ("chromatofocusing") es un método cromatográfico (Mantle & Noone, 1996) que separa proteínas sobre la base de sus puntos isoelectricos (pI). El método es altamente resolutivo, permite concentrar proteínas, y es muy específico. El método consiste en aplicar una muestra (mezcla) de proteínas a una columna empaquetada con una resina similar al absorbente DEAE (intercambiador aniónico) o con matrices sustituidas con aminos terciarias y cuaternarias (cargada positivamente), la cual previamente es equilibrada a un pH alto; las proteínas con carga similar a la columna son excluidas, y de manera similar a lo que sucede en la cromatografía de intercambio iónico convencional, las proteínas con carga neta opuesta a la columna permanecen retenida en la resina. Estas proteínas son excluidas descendiendo en gradiente el pH de la columna. El gradiente de pH es formado *in-situ* en la columna (es decir, se autogenera) al eluir con un tampón tipo amfolito, el cual combina un alto poder tamponador con una baja fuerza iónica. El amfolito en forma ácida es aplicado con un pH inferior al de la columna, de esta forma, al eluir constantemente la columna con este tampón se va generando el gradiente lineal de pH y la proteínas van eluyendo cuando coincide el pH de la columna con su pI.

Materiales:

- Resina: PBE 94 (Farmacia Biotech.), preparada de acuerdo al fabricante.
- Tampón de Elución: Polybuffer 74 (Farmacia Biotech.), el tampón fue diluido 1vol. en 8 vol. de agua milli-Q, y su pH fue ajustado 4.0 con HCl, luego fue desgasado.
- Tampón de Equilibrio: (start buffer) 0.025 M Imidazol-HCl pH 7.0 , desgasado.

Protocolo:

- 1) La columna empaquetada con PBE 94 (12 ml) fue equilibrada (10 ml/hora) durante toda la noche con tampón de equilibrio (el pH se ajusta 0.4 unidades más sobre el pH deseado).
- 2) La cromatografía se desarrolla con flujo de 40 ml/hora, y se colectan fracciones cad 3 minutos. Antes de aplicar la muestra, controlar que el pH del tampón de equilibrio al entrar y salir de la columna, debe ser igual en ambos casos con un valor de 7.0 .
- 3) Se aplica la muestra pre-equilibrada en "start buffer" por diálisis. Luego, se aplica 3 ml de start buffer para proteger la muestra del pH extremo al iniciar la elución con polybuffer. Nosotros hemos añadido a nuestra muestra BSA (Sigma) e inhibidor de tripsina purificado de soya (Sigma), para identificarlos como

controles internos de la columna. El BSA eluye en diferentes fracciones con pI entre 5.6 a 5.4, y el inhibidor de tripsina eluye con un pI de 4.5.

- 4) Seguidamente, se inicia la elución con el polybuffer pH 4.0; el gradiente de pH es autogenerado durante la elución. Se usaran 10 volúmenes de la columna para eluir.
- 5) El desarrollo de la columna se monitorea con A_{280} nm, y se determina el pH de algunas fracciones para graficar la curva de pH sobre la cual se determinaran los pI de las proteínas eluidas.
- 6) Fracciones seleccionadas en base al perfil de elución fueron precipitadas con TCA hasta el 20% para recuperar las proteínas y eliminar el polybuffer. Luego fueron resueltas en electroforesis SDS-PAGE 15%.

Comentarios:

La cromatografía de enfoque isoeléctrico puede separar moléculas con variación de 0.05 unidades de pH. Se recomienda usar columnas largas y estrechas, y 10 ml de matriz puede absorber hasta 100 mg de proteína.

El incremento de 0.4 unidades de pH del start buffer, y el desgaseado de todos los tampones usados se debe a que el dióxido de carbono atmosférico puede producir una interferencia (plateau) en la región de pH 5.5-6.5.

Es posible realizar el cromatoisoeenfoco en presencia de detergentes no-iónicos como el Tritón X-100 y NP-40; otros detergentes interfieren con la separación y resolución.

6.- Actividad funcional de extractos, fracciones de purificación o proteínas purificadas: incubación de núcleos espermáticos permeabilizados.

La actividad de los huevos de descondensar los núcleos espermáticos de una variedad de especies (erizo de mar, anfibios, almejas, mosca de la fruta) se detecta *in-vitro* al incubar extractos de huevos homogenizados con espermatozoides permeabilizados (Kunkle et al., 1978b; Eng & Metz, 1980; Lohka & Masui, 1983a, b; Ulitzer & Gruenbaum, 1989; Cameron & Poccia, 1994; Longo et al., 1994b). Este tipo de incubaciones es un sistema libre de células que tiene como ventaja, la formación de pronúcleo masculino; y así, puede ser analizado exhaustivamente con métodos bioquímicos. Incubaciones con proteínas purificadas con posible rol en la formación del pronúcleo masculino también proceden de igual forma (Philpott et al., 1991; Philpott & Leno, 1992). El sistema libre de células utilizado en la evaluación de la actividad descondensadora del núcleo espermático, es flexible; en ese sentido, se realizaron incubaciones heterólogas (por ejemplo, extracto de huevo de *Xenopus* con núcleos espermáticos humanos) para sugerir la existencia de moléculas estructural y funcionalmente similares en diversos organismos (Brown et al., 1987; Rice et al., 1986).

6.1.- Evaluación de la actividad descondensadora.

En general, se usó el método descrito por Eng & Metz (1980), con algunas modificaciones. Este método permite realizar la preparación directamente sobre una lámina portaobjeto, evitando la disgregación del núcleo espermático descondensado, el cual puede resultar ser un elemento muy frágil a la manipulación por pipeteo.

Protocolo:

- 1) Láminas portaobjetos fueron siliconizadas para evitar la extensión de las gotas de incubación.
- 2) La incubación se realiza directamente sobre una lámina portaobjetos siliconizada. Se deposita 50-100 μ l de extracto, y luego se añade una alícuota de 1-5 μ l de núcleos espermáticos permeabilizados que

corresponden usualmente a $1-3 \times 10^5$ núcleos.

- 3) Si se desea hacer un seguimiento en el tiempo, se añade el colorante fluorescente (Bisbenzamidina; Sigma Chemical, Co.) $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en solución-A. Se cubre con una laminilla y se observa al microscopio de fluorescencia.
- 4) De lo contrario, se preparan varias gotas con las mismas condiciones y cada en tiempo seleccionado se detiene la descondensación añadiendo $0.5-1 \mu\text{l}$ de paraformaldehído al 37%. Se deja secar la gota al aire, luego se añade bisbenzamidina 0.1% en solución-A, se deja en oscuridad durante 30 minutos. Se lava 2-3 veces con solución-A, para remover el exceso de fluorocromo, retirando el lavado con papel filtro. Se monta para la observación al microscopio de fluorescencia, añadiendo una gota de DABCO (Sigma) para evitar el "quenching" de la fluorescencia.
- 5) Cuando la incubación se realiza con fracciones de purificación o proteínas puras, estas deben estar contenidas en solución-A, el cambio de tampón se realiza por diálisis exhaustiva, y antes de la incubación se suplementan con un sistema de regeneración de energía (ATP 3mM, fosfocreatina 30 mM, y creatina fosfoquinasa $2 \mu\text{g}/\text{ml}$).

6.2.- Evaluación de las proteínas asociadas al DNA durante la descondensación.

Protocolo:

- 1) Las incubaciones se realizan en tubo eppendorf. Primero, se coloca la alícuota de los núcleos permeabilizados de espermatozoides; luego se añade el extracto, y se mezcla en vortex. Las incubaciones que se realizan con fracciones de purificación o proteínas puras, requiere previamente que la solución de proteínas sea dializada exhaustivamente contra agua desionizada y destilada, y luego concentrada adecuadamente; finalmente, para realizar las incubaciones con ellas, se reconstituyen en solución-A 4X ó 10X, y se suplementan con el sistema regenerador de energía (ATP 3 mM, fosfocreatina 30 mM, creatina fosfoquinasa $1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Las incubaciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.
- 2) Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción de descondensación se detiene centrifugando a máximo speed (10,000g) durante 3-5 minutos el tubo, se retira el sobrenadante, y el sedimento de núcleos es lavado una vez con solución-A. Se vuelve a centrifugar y se retira el sobrenadante del lavado, el sedimento de núcleos es sometido a análisis bioquímico.
- 3) Inicialmente, se extraían con HCl las proteínas básicas asociadas al DNA (ver Mat. & Mét., 5.2.1), a partir de los núcleos incubados. Posteriormente, se determinó que este método de extracción era deficiente cuando los núcleos eran incubados con algunos extractos; por esta razón, se cambió al protocolo de extracción por desplazamiento con protamina (ver Mat. & Mét., 5.2.2) o extracción con SDS (ver Mat. & Mét., 5.2.3).
- 4) Las proteínas extraídas de los núcleos espermáticos permeabilizados e incubados con extracto fueron separadas en electroforesis (ver Mat. & Mét., 5.3); usualmente, se desarrollaron AU-PAGE o SDS-PAGE, como sistemas unidimensionales, y los sistemas bidimensionales fueron desarrollados con TAU-PAGE como primera dimensión y SDS-PAGE en la segunda dimensión. En algunos experimentos fueron cuantificadas por densitometría luego de teñir el gel con azul de Coomassie R250; se utilizó un microdensitómetro Joyce-Loebl MK III CS. La densitometría también fue realizada en ocasiones sobre las placas autorradiográficas de los western-blot.
- 5) Los sobrenadantes fueron separados en electroforesis SDS-PAGE. Luego, se realizó western-blot para detectar la presencia de la proteína específica del espermatozoide ϕ_0 e histonas (ver Mat. & Mét., 5.5). Si los sobrenadantes contienen protamina removida durante las incubaciones, el sistema electroforético elegido fue AU-PAGE.

7.- Microscopía.

7.1.- Microscopía de fluorescencia.

Las sesiones de microscopía fueron realizadas en la Unidad de Microscopía Confocal del "Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, Barcelona-España". Se trabajó con un microscopio de fluorescencia Leica DMRB que puede ser operado en modo de epifluorescencia, de reflexión y transmisión (campo claro y contraste de fases). La fluorescencia producida por la Bisbenzamidina (Hoescht) fue detectada usando un filtro UV. Las imágenes fueron fotografiadas con un sistema manual durante 5-10 segundos usando un film Kodak T-Max asa 100. Alternativamente, fueron capturadas con una cámara de video y digitalizadas con extensión TIF usando 8 bites/pixels. El software utilizado fue Metamorph (versión PC); luego, las imágenes fueron preparadas para su presentación usando el software Photo-shop (versión Mac.).

7.2.- Microscopía electrónica de transmisión (MET).

La microscopía electrónica de transmisión (MET) fue realizada en la Unidad de Microscopía Electrónica del "Servei Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, Barcelona-España".

Protocolo:

- 1) **Fijación:** Para estudiar la morfología de los ovocitos de *Holothuria tubulosa*, las muestras fueron fijadas en una mezcla conteniendo 1% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído en agua de mar filtrada. Las muestras fijadas fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento para MET. Luego fueron post-fijadas con 2.5% de paraformaldehído y 0.4 % de glutaraldehído en agua de mar filtrada o en tampón fosfato salino (PBS 0.1M, pH 7.4) durante 1.5-2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 4 lavados con PBS 0.1 M (pH 7.4) de 10 minutos cada uno, y uno adicional durante toda la noche.
- 2) **Post-fijación:** Luego del último lavado, las muestras fueron post-fijadas usando tetraóxido de osmio al 1% preparado en PBS 0.1 M (pH 7.4). La post-fijación se realizó durante 1.5-2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, el material fue lavado 2 veces con PBS 0.1 M (pH 7.4) durante 10 minutos, y luego con un lavado durante toda la noche, seguido de 4 lavados de 10 minutos cada uno.
- 3) **Deshidratación:** Las muestras fueron seguidamente deshidratadas en una batería de acetona con concentraciones crecientes en PBS 0.1 M (pH 7.4), a temperatura ambiente y agitación de acuerdo al siguiente protocolo:

% Acetona	# lavado x duración de cada uno (min.)
30 %	1 x 10 min.
50 %	1 x 10 min.
70 %	2 x 10 min.
90 %	3 x 10 min.
96 %	3 x 20 min.
100 %	4 x 15 min.

- 4) **Inclusión:** Para la inclusión se utilizó Spurr como resina (10 gr de dióxido de vinilciclohexano, VCD o ERL-4206; 6 gr de propilenglicol, diglicidil éter, DER-736; 26 gr de nonenil succínico anhidro; 0.4 gr de dimetilaminoetanol, S1; 0.8 gr de dibutiltaflato). La inclusión se realizó a temperatura ambiente y agitación de acuerdo al siguiente protocolo:

Resina : Acetona	Tiempo de inclusión
------------------	---------------------

1 : 3	4 – 5 horas
2 : 2	Toda la noche
3 : 1	4 – 5 horas o toda la noche
pura	5 horas o varios días
Pura	5 horas

Las muestras incluidas fueron montadas en bloques de silicona con resina pura y la polimerización de la resina se llevó a cabo durante 2-3 días a temperatura de 60-65°C.

- 5) **Cortes:** Los bloques fueron piramidados y cortados en secciones semifinas de 5 μm de espesor usando un ultramicrotomo con cuchilla de vidrio y con 45° de ángulo. Los cortes semifinos fueron montados en láminas portaobjetos y coloreados con azul de toluidina para su análisis por microscopía en campo claro, de ésta forma se determinó la conveniencia de los semifinos para su posterior estudio por microscopía electrónica. Luego, se termino de piramidar los bloques teniendo en cuenta el área de interés de la muestra.
- 6) **Contraste de los cortes:** Los cortes de 5 μm de espesor fueron colocados sobre rejillas de cobre donde fueron contrastados para su observación con citrato de uranilo y citrato de plomo. Una solución acuosa de citrato de uranilo al 2% o acetato de uranilo 5 mM en HCl 5 mM, se deposita sobre la rejilla durante 30 minutos, luego las rejillas fueron lavadas tres veces con agua destilada. Seguidamente, se deposita citrato de plomo durante 10 minutos a temperatura ambiente en atmósfera anhidra, y se lava con agua milli-Q y se escurre sobre papel filtro.
- 7) **Observación:** Las preparaciones fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-301 usando un potencial de aceleración de 80 kv. Las imágenes fueron registradas sobre negativos en placa (Kodak 4489, ESTAR Thick Base), y luego positivados para su análisis detallado. La presentación de las imágenes fue realizada usando el software Photo-Shop (versión Mac), para lo cual los negativos o positivos fueron escaneados.