



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIOS DE EFICACIA DE DIGESTIONES  
DE PROTEÍNAS CON TRIPSINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN QUÍMICA**

***Silvia García Pertierra***

**Oviedo, Junio, 2024**

## ÍNDICE

1.ANTECEDENTES .....	3
1.1 Objetivos .....	8
1.2 Fundamento teórico de la técnica SDS-PAGE. ....	8
2.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	10
2.1 Reactivos e instrumentación. ....	10
2.2 Protocolo experimental. ....	11
2.2.1 Digestión de las proteínas. ....	11
2.2.2 SDS-PAGE .....	11
2.2.3 Procesado de las imágenes con Image J. ....	14
2.3 Geles empleados en el estudio. ....	14
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	15
3.1 Optimización de la concentración de proteína en los geles. ....	15
3.2 Estudio de la eficacia de la digestión de la albúmina. ....	16
3.3 Estudio de la eficacia de la digestión de la transferrina.....	19
3.4 Estudios de la eficacia de la digestión en muestras de suero.....	21
3.5 Estudio de los fragmentos producidos por la digestión de las proteínas. ....	26
4.CONCLUSIÓN.....	27
5.REFERENCIAS .....	28
6.ANEXOS .....	31

## 1. ANTECEDENTES

La tripsina es un enzima de tipo proteasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas para formar aminoácidos y péptidos de menor tamaño, es un enzima muy específico que escinde el extremo C-terminal de residuos de Lisina (Lys) y Arginina (Arg) [1].

La tripsina tiene una función vital en la digestión de las proteínas en la mayoría de los vertebrados, se genera de manera natural en las células acinares del páncreas de los vertebrados y se segrega desde este hacia el tracto gastrointestinal donde digiere junto con la acción de otros enzimas hidrolíticos como la elastasa y quimiotripsina las proteínas aportadas por la dieta, disminuyendo así su tamaño y favoreciendo su absorción en el intestino [1].

La tripsina pertenece al grupo de las serina proteasas, estas son un grupo muy abundante y funcionalmente diverso de gran importancia en la evolución. Las serina proteasas deben su nombre a la Serina nucleofílica, que es parte de su centro activo. Se clasifican en 13 clanes a su vez divididos en 40 familias. La tripsina pertenece al clan de las PA proteasas (proteasas de nucleófilo mixto y superfamilia A) y es un miembro representativo de este. En este clan se encuentran proteasas como la quimiotripsina que tienen la misma estructura que la tripsina y participan en procesos de digestión, coagulación e inmunidad. Este clan se subdivide en 12 familias, la tripsina pertenece a la S1. La S se refiere a la serina catalítica. Existen dos grupos S1A Y S1B. Los S1B son enzimas intracelulares mientras que los S1A son extracelulares, por tanto, la tripsina pertenece al grupo S1A [1].

En cuanto a su estructura, el plegamiento de la tripsina se caracteriza por una doble estructura de barril-beta, cada barril-beta consta de 6 hojas-beta (Figura 1), un barril beta es una serie de hojas-beta que se enrollan y tuercen generando una estructura cerrada donde la primera cadena de hoja-beta se une a la última mediante enlaces de hidrógeno. Los residuos catalíticos que interfieren en la reacción de hidrólisis se localizan en la interfase entre ambas estructuras; Histidina-57 y Ácido Aspártico-102 se encuentran en el barril N-terminal mientras que la Serina-195 se localiza en el barril C-terminal. La estructura está estabilizada por 6 puentes disulfuro [1]. La tripsina debe su especificidad a la presencia de residuos de Asp en el bolsillo S1 que permite la formación de puentes de hidrógeno con residuos de Arg o Lys pero no con otros residuos [1].

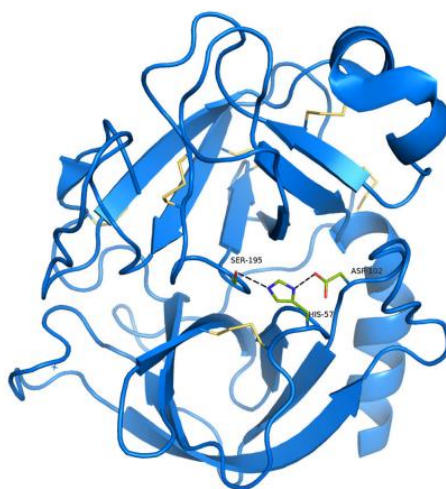


Figura 1 Estructura de la tripsina [1].

El mecanismo de reacción de la tripsina cataliza la hidrólisis del enlace peptídico en dos pasos (Figura 2); En primer lugar, la Ser nucleofílica ataca al grupo carbonilo del sustrato donando un protón a la His catalítica, donde el correspondiente nitrógeno sufre un incremento de electronegatividad debido al puente de hidrógeno formado por la Asp catalítica. Este ataque da lugar a la formación de un intermediario covalente acil-enzima y liberación del fragmento N-terminal del péptido a escindir. En el segundo paso, una molécula de agua es activada por la His y esta ataca al intermediario acil-enzima, este ataque está seguido de la liberación del extremo C-terminal del péptido. Este mecanismo consta de una tríada catalítica formada por tres residuos; Ser 195, His 57 y Asp 102, la Ser actúa como nucleófilo para iniciar la reacción, la His tiene una doble función; en el primer paso actúa como una base para aceptar el hidrógeno del grupo hidroxilo de la Ser catalítica dando lugar a la formación de un intermedio tetraédrico y luego actúa como un ácido donando un protón para la liberación del extremo N-terminal. En el segundo paso, la His también actúa; primero como base activando la molécula de agua y a continuación donando un protón a la Ser actuando como ácido. La función de la Asp es la correcta orientación del residuo de His formando un puente de hidrógeno con este, facilitando así la formación del grupo nucleófilo [1].

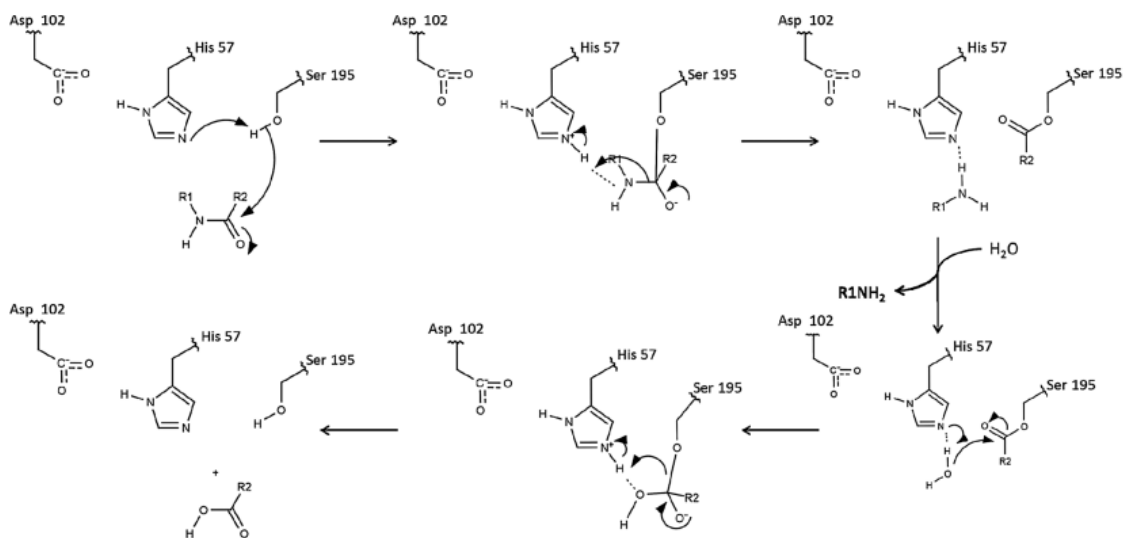


Figura 2 Mecanismo de reacción de la tripsina [1].

Las condiciones óptimas de esta reacción son pH 7.0 y 37°C.

Denominamos proteoma al conjunto de todas las proteínas encontradas en células, tejidos y organismos que resultan de la transcripción y traducción del ADN/ARN, así como sus modificaciones post-traduccionales. Las proteínas son esenciales en todos los procesos bioquímicos y sus anomalías pueden causar enfermedades, por tanto, el conocimiento de las funciones, interacciones, localización, regulación y niveles de proteínas es de vital importancia en la biología. Denominamos proteómica a la rama de la ciencia encargada del estudio sistemático y global de las proteínas presentes en un organismo, tejido o célula, así como de sus estructuras y funciones [2].

Las tecnologías que se emplean en la proteómica permiten la identificación, cuantificación y caracterización de proteínas en una muestra biológica. Tiene aplicaciones en la investigación biomédica, descubrimiento de fármacos y comprensión de enfermedades [2].

Normalmente en el estudio de las proteínas es necesario un paso previo de preparación de la muestra antes del análisis por LC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) que depende del origen de la muestra y el tipo de proteína. A pesar de que se usan distintos procedimientos suele ser necesaria la digestión de la proteína. La hidrólisis del enlace peptídico es llevada a cabo por enzimas proteolíticas y el más común de todos ellos es la tripsina [2], tiene un bajo coste, es muy específico y genera péptidos de cadena corta (0.5-3 kDa) con residuos básicos (Arg y Lys) en el extremo C-terminal que facilita la ionización positiva resultando esto beneficioso para el análisis por espectrometría de masas. El extremo N-terminal facilita la separación por cromatografía líquida y además existen numerosas bases de datos para la identificación de péptidos tripticos [2].

La tripsina es empleada en proteómica para digerir la mezcla de proteínas de interés dando lugar a una mezcla de péptidos, pero también esta digestión es simulada de manera computacional (*in silico*) [1]. Esta digestión *in silico* trata de replicar el trabajo realizado en el laboratorio. En el laboratorio normalmente el procedimiento comienza con la solubilización y desnaturalización de las proteínas por agentes caotrópicos como la urea o guanidina, reducción de los puentes disulfuro empleando DTT (ditiotreitól) y la alquilación de las cisteínas empleando ácido iodoacético. Tras la eliminación de los reactivos la digestión de la tripsina se lleva a cabo a pH neutro en buffer de bicarbonato de amonio o Tris-HCl a 37°C, es común que se deje que ocurra la digestión durante 18 h, se puede detener mediante la adición de ácido fórmico [3]. Los protocolos de digestión pueden cambiar según los laboratorios. La mezcla de péptidos obtenida se analiza mediante LC-MS.

Debido a que la fragmentación de los péptidos es predecible se pueden comparar el espectro de MS con el espectro de la digestión *in silico* identificando así los diferentes péptidos. Sin embargo, esto se basa en que la digestión ha sido óptima, si esto no ha sido el caso no se podrá correlacionar la información del espectro de la base de datos y el espectro realizado en el laboratorio. Por tanto, la ineficacia de la digestión de las proteínas llevará a pérdidas de información como la presencia de modificaciones post-traduccionales y la habilidad de distinguir entre proteínas similares, etc. [3]. Por todo esto es necesario estudiar la eficacia de digestiones de proteínas con tripsina ya que esta varía según la proteína y protocolos empleados.

Para la determinación de la eficacia de digestiones de proteínas con tripsina es necesario un método analítico que permita la separación de los péptidos formados tras la digestión según su tamaño, ya que de esta manera se podrán identificar y cuantificar los productos de la digestión de manera precisa.

En primer lugar, como se ha comentado previamente es común el uso de cromatografía líquida ligada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS). La cromatografía líquida permite la separación de los péptidos mientras que los espectros de masas permiten la identificación de los péptidos mediante la comparación con bases de datos de secuencias de proteínas conocidas, pudiendo así evaluar la eficacia de la digestión.

La cromatografía empleada es de tipo fase inversa [4], es decir se emplea una fase móvil polar comúnmente compuesta por dos fases: una fase A de agua acidulada 0.5% de ácido acético y una fase B de acetonitrilo y una fase estacionaria apolar; generalmente una columna de C-18 [5]. La cromatografía en fase inversa permite la separación de los péptidos según su polaridad, en primer lugar, eluirán aquellos más polares y después los más apolares ya que su interacción con la fase estacionaria será mayor. En proteómica es común el uso de cromatografías líquida de micro o nano-flujo (menores a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) para mejorar los límites de detección [6], en lugar de

HPLC se podría emplear UPLC (cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento) que permite la separación de partículas más pequeñas, en torno a los 2  $\mu\text{m}$  utilizando una alta presión de bombeo para la inserción de la muestra en la columna [6].

Respecto a la espectrometría de masas la ionización tiene lugar mediante el empleo de electrospray [5], el proceso de electrospray empieza con el paso de la muestra a través de un capilar, al mismo tiempo se aplica un alto voltaje a la punta del capilar que provoca la descomposición de la muestra en pequeñas gotas que van reduciendo su tamaño debido a la evaporación del disolvente y repulsión electrostática. Estas gotas continúan descomponiéndose hasta que alcanzan un tamaño en el cual se producen iones en la superficie de las gotas, estos iones se aceleran y enfocan mediante campos eléctricos para generar un haz de iones que una vez sometidos a fuerzas eléctricas y magnéticas en el espectrómetro de masas son separados según su relación masa/carga. Para ello se utilizan analizadores de masas de tipo cuadrupolo, TOF (tiempo de vuelo) u orbitrap [5], [6]. Tras la separación, los iones llegan al detector, que registra la cantidad de iones según su relación  $m/z$ . Esto genera un espectro de masas que representa la distribución de masas de los iones de la muestra.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es un método de alta sensibilidad y especificidad, con una excelente resolución que permite la identificación y cuantificación de los péptidos, sin embargo, es un método costoso y no disponemos de este en nuestro laboratorio.

Otra técnica que permite la separación de moléculas según su tamaño (volumen hidrodinámico) es la cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SEC). Las columnas empleadas en SEC están formadas por polímeros porosos. Cuando la fase móvil pasa a través de la columna, las partículas de menor volumen hidrodinámico deben recorrer un camino más largo en la columna para su elución, ya que su tamaño es menor que el de los poros de la columna, por otro lado, las partículas de mayor tamaño tienen un menor recorrido y eluyen antes [7]. Es común el empleo de una fase móvil de buffer de fosfato.

Una vez separadas las moléculas según su tamaño se acoplan a un detector, que permitirá estimar el tamaño del compuesto, es común el uso de detectores UV que miden la absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente de 220 nm [8], sin embargo, SEC se vuelve más versátil y exacta con el uso de detectores tipo MALS (Multi-angle light scattering) o tipo RI (índice de refracción). MALS mide la proporción de luz dispersada por el analito en múltiples ángulos debido a al empleo de un láser y la dispersión está relacionada con la masa y el tamaño de las partículas en solución. RI determina la concentración debido al cambio en el índice de refracción por la presencia del analito [9].

Sin embargo, esta técnica no es muy adecuada para el estudio de eficacia de digestiones de proteínas con tripsina ya que generalmente se emplea para macromoléculas de gran tamaño, pero su resolución puede disminuir para los péptidos más pequeños ya que la separación es en función de su volumen hidrodinámico y no su masa, además es una técnica costosa [9].

Otra técnica que permite la separación de moléculas según su tamaño es la electroforesis en gel. Esta técnica permite la separación de moléculas cargadas basándose en su diferencia de movilidad cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico. La electroforesis para proteínas se lleva a cabo sobre un soporte inerte generalmente geles de poliacrilamida (PAGE).

Se emplea la poliacrilamida como soporte para la electroforesis debido a su gran resolución y versatilidad. Además, posee ventajas como: ser estable para un amplio rango de pH,

temperatura y fuerza iónica, ser químicamente inerte, y fácil de generar mediante la polimerización de la acrilamida. El gel se coloca entre dos recipientes separados que contienen un tampón de electroforesis y dos electrodos; positivo y negativo que están conectados por el gel [10].

Los grupos amino, carboxilo e imidazol en las proteínas son los que más contribuyen a la carga neta de la proteína, en pHs extremos grupos como el hidroxilo y sulfhídrico también pueden contribuir a la carga neta. La contribución a la carga neta de estos grupos depende de su pKa y el pH del medio. La carga neta depende del punto isoeléctrico y el pH. En la electroforesis en gel de poliacrilamida las proteínas cargadas migran en el campo eléctrico generado según su carga [11].

Existen varios tipos de PAGE, el más simple es PAGE nativa. Las proteínas difieren una de otras en su composición de aminoácidos ácidos o básicos y por esto estas adquieren diferentes cargas a un pH determinado. Esto significa una diferente movilidad en el campo eléctrico. PAGE se puede llevar a cabo a pHs menores o mayores que el punto isoeléctrico de las proteínas a separar; a pHs mayores las proteínas tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo mientras que a pHs menores estas tendrán carga positiva y migrarán hacia el cátodo [11].

En PAGE nativa las proteínas no se encuentran desnaturalizadas y son separadas según su carga, forma y tamaño, este método no es útil por tanto para estudios de eficacia de digestiones de proteínas con tripsina, ya que se necesita una separación exclusivamente en función del tamaño de los péptidos [11].

Existe otro tipo de electroforesis en gel de poliacrilamida en la cual se emplea un agente desnaturalizante; el SDS (dodecil sulfato de sodio). Este es un detergente aniónico desnaturalizante muy fuerte que se une a los bolsillos hidrofóbicos de las proteínas y las desnaturaliza [11]. La carga negativa de la molécula de SDS oculta la carga de la proteína. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas tienen un valor carga/masa constante y cuando migran se separan sólo según su tamaño [10], como tienen carga negativa, migran hacia el ánodo en una velocidad proporcional a su peso molecular. Existen varios sistemas de electroforesis en geles, el más común es el sistema discontinuo de Laemmli. Este sistema se basa en dos tipos de geles; un gel concentrador con un pH de 6.7-6.8 y menor concentración de acrilamida que se forma sobre un gel separador de pH 8.8-8.9 y mayor concentración de acrilamida.

Las proteínas una vez separadas pueden teñirse para ser visualizadas, el método más empleado es el azul de Coomassie. Este método de tinción presenta una sensibilidad de 50 ng de proteína [10].

SDS-PAGE es útil para la evaluación de eficacia de digestiones de proteínas. Empleando marcadores de peso molecular se puede estimar el tamaño de los péptidos formados y obtener el porcentaje de proteína digerido con tripsina comparándolo con un calibrado de la proteína sin digerir [12]. Es una técnica más barata y sencilla.

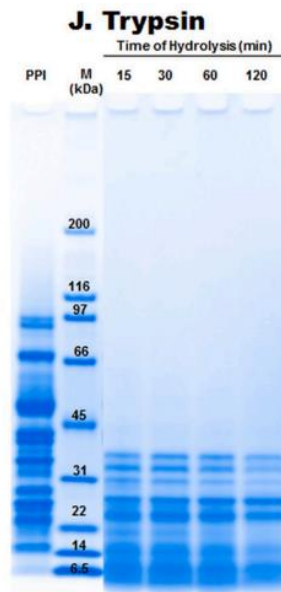


Figura 3 Gel SDS-PAGE de digestión de proteínas con tripsina, se analizan diferentes tiempos de análisis. [12]

### 1.1 Objetivos

En el estudio se empleará la electroforesis en gel de poliacrilamida para la evaluación de la eficacia de digestiones de proteínas con tripsina. El objetivo es el análisis de la eficacia de las digestiones de las proteínas albúmina y transferrina, así como de muestras de suero que contiene mayoritariamente estas proteínas. Se realizará un estudio en el tiempo de las digestiones para determinar su eficacia en función de este (Figura 3). Se empleará el programa Image J para el procesado de las imágenes de los gels.

### 1.2 Fundamento teórico de la técnica SDS-PAGE.

En el método discontinuo de Laemmli [13] se emplean cuatro tampones para la separación de proteínas: (1) Un tampón de TRIS-HCl de pH 8.8 para preparar el gel separador, (2) un tampón de TRIS-HCl de pH 6.8 para preparar el gel concentrador, (3) Un tampón de carga y (4) un tampón de migración.

Se emplean iones “líderes” y “rezagados” (leading and trailing ions) para concentrar las proteínas cuando se aplica un voltaje. En el sistema discontinuo la muestra pasa primero a través del gel concentrador con poros grandes y de menor pH (pH 6.8) que el gel separador (pH 8.8). El gel concentrador contiene cloruros (leading ion) con una movilidad electroforética mayor a la de las proteínas presentes en la muestra. El buffer de migración contiene glicina (trailing ions) con una movilidad electroforética menor que la de las proteínas de la muestra. El pH del buffer del gel concentrador asegura que la movilidad de la glicina es menor que la movilidad de las proteínas de la muestra. El resultado es que los iones de cloruro que migran rápido dejan una zona de baja conductividad entre ellos y las proteínas. La glicina fuerza a las proteínas a permanecer en una zona entre los cloruros y ella misma ya que provee una parada del campo eléctrico de alta intensidad que provoca que las proteínas permanezcan en la zona entre los iones de cloruro y glicina. Cuando las proteínas pasan al gel separador este tiene un poro de menor tamaño, una mayor concentración salina y un mayor pH que el gel concentrador (Figura 4). Estas condiciones permiten a los iones de glicina migrar a través de las proteínas y las proteínas se separan así según su tamaño [14].



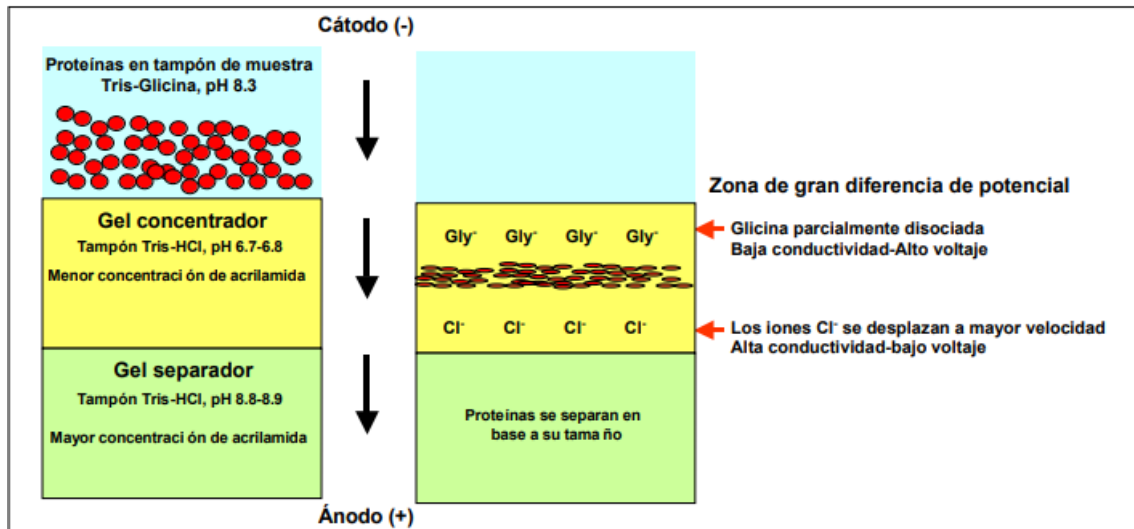


Figura 4 Fundamento del sistema discontinuo de Laemmli [10].

Las proteínas son desnaturizadas y solubilizadas por calor en presencia de SDS (detergente aniónico) y un tiol de bajo peso molecular como ditrioteitol o 2-mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro [14]. La mayoría de las proteínas se unen al SDS en un radio de masa constante de 1.4 g SDS/ g proteína. La cadena hidrocarbonada del SDS rodea a las cadenas polipeptídicas, orientando el ión sulfato con carga negativa hacia el medio acuoso, aportando así una carga neta negativa a las cadenas polipeptídicas, hay una molécula de SDS por cada dos residuos (Figura 5) [15]. El tampón de carga también contiene bromofenol que se emplea como colorante para seguir la electroforesis, así como glicerol que contribuye a que la muestra cargada en el gel sea más densa.

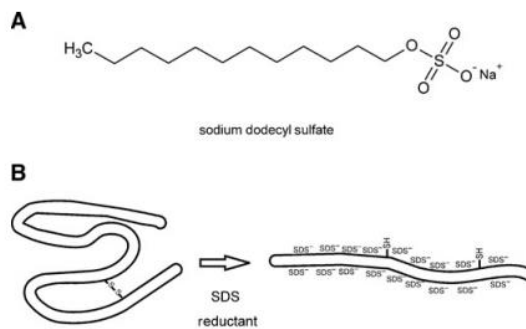


Figura 5 A) Estructura del SDS, B) Desnaturización de la cadena polipeptídica. [13]

Los geles de poli(acrilamida) se forman por la copolimerización de la acrilamida monomérica para formar largas cadenas y cadenas entrecruzadas con el monómero de bisacrilamida (N,N'-metilenobisacrilamida (Figura 6). La reacción de polimerización comienza con la adición de persulfato amónico (APS), la reacción es acelerada por el uso de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlenodienamina) que cataliza la formación de radicales libres del persulfato amónico [14].

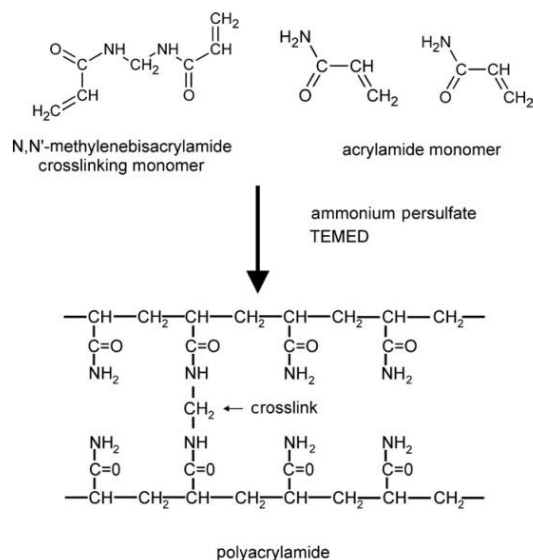


Figura 6 Polimerización de la acrilamida [13].

Cuando el gel se conecta a la corriente, las cargas negativas fluyen desde el cátodo (negro) conectado a la cámara alta del buffer, pasan a través del gel y llegan a la cámara baja del gel conectada al ánodo (rojo) para completar el circuito. Es un sistema aniónico pues las proteínas están cargadas negativamente debido a la desnaturalización con SDS y migran por tanto hacia el ánodo en función exclusivamente de su tamaño [14].

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1 Reactivos e instrumentación.

Reactivos:

- TRIS (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol). Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)
- HCl 37%. Merck (Darmstadt, Alemania)
- Albúmina de huevo de gallina. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- Transferrina humana. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- Suero biológico. Muestra real de suero humano extraída.
- Tripsina. Biowest (Nuaillé, Francia)
- SDS. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- Glicina. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- PSA al 10%. Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletlenodiamina). Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- Azul de Coomassie Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)
- Metanol Scharlab (Barcelona, España)
- Ácido acético. Fisher Scientific (Hampton, NH, EEUU)
- Acrilamida. Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)
- N,N'-Methylene-bisacrylamide. SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Alemania)
- Agua destilada MilliQ. (18.2 MΩ cm) purificada en sistema PURELAB flex 3 system, ELGAVEOLIA (Lone End, Reino Unido)

Instrumentación:

- Vórtex: V050 series, Lbx Instruments (Barcelona, España)

- Termo bloque Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania).
- Placas para geles de poliacrilamida. Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)
- Marcos de fundición para el gel de poliacrilamida. Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)
- Dispositivo de electroforesis: Tanque de electroforesis (Bio-Rad mini-PROTEAN Tetra system) y fuente de corriente eléctrica (Bio-Rad PowerPac) Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)

## 2.2 Protocolo experimental.

### 2.2.1 Digestión de las proteínas.

1. Preparación de tampón de Tris-HCl de pH 8 0.5 M: Se pesan 12,41 g de TRIS (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol) se disuelve en agua y se ajusta el pH a 8 con HCl concentrado empleando un pHmetro y se lleva a un volumen final de 200 mL con agua MilliQ. Este tampón se emplea para que la digestión trípica tenga lugar a un pH óptimo de entre 7,5 y 8,5 que está empíricamente demostrado para garantizar la optimización del agente de división, en este caso la tripsina [16].
2. Preparación de las disoluciones de proteínas a digerir:
  - Albúmina: se pesan 1 mg de albúmina y se llevan a un volumen de 1,5 mL con el tampón de TRIS-HCl 0,5 M y pH 8.
  - Transferrina: se pesan 1 mg de transferrina y se llevan a un volumen de 1,5 mL con el tampón de TRIS-HCl 0,5 M y pH 8.
  - Suero: El suero tiene una concentración promedio de proteínas de entre 6-8 g/dL teniendo en cuenta este dato y para conseguir la misma concentración que en las disoluciones anteriores (1 mg/1,5 mL) se toman 14  $\mu$ L de suero y se llevan a un volumen de 1,5 mL con el tampón de TRIS-HCl 0.5 M y pH 8 [17].

Las disoluciones se agitan brevemente en el vórtex.

3. Preparación de la disolución de tripsina: se toman 40  $\mu$ L de disolución de tripsina de 0,05 g/mL y se llevan a un volumen final de 2 mL con agua MilliQ obteniendo una concentración de tripsina de 1 mg/mL. Agitación en el vórtex.
4. Para la digestión de las proteínas se añade a la disolución de las proteínas el volumen de disolución de tripsina de manera que la relación tripsina: proteína sea de 1:50 (w/w) [18]. Se añaden 20  $\mu$ L de disolución de tripsina a cada disolución de proteína.
5. Los tubos se colocan en un termobloque a 37 °C, para minimizar las reacciones secundarias durante la digestión [16].
6. Se toman 200  $\mu$ L de proteínas digerida a 30 min, 60 min, 105 min y 24 horas y la digestión se para mediante la introducción del tubo que contiene la proteína digerida en un baño de agua a 100°C durante 5 minutos [19].

### 2.2.2 SDS-PAGE

#### 1.Preparación de los tampones empleados.

- Tampón de TRIS-HCl 1,5 M de pH 8,8: Se pesan 36,41 g de TRIS, se añaden 8 mL de SDS al 10%, se añade un poco de agua MilliQ y se ajusta el pH en un pHmetro con HCl concentrado se lleva a un volumen final de 200 mL con agua MilliQ.
- Tampón de TRIS-HCl 0,5 M de pH 6,8: Se pesan 12,41 g de TRIS, se añaden 8 mL de SDS al 10%, se añade un poco de agua MilliQ y se ajusta el pH de la misma manera que con el tampón anterior, también se lleva a un volumen final de 200 mL.
- Tampón de migración: Se pesan 72 g de glicina, 15 g de TRIS, se añaden 50 mL de SDS al 10% y se lleva a un volumen final de 500 mL.

- **Tampón de carga:** Se toman 1,25 ml de tampón de TRIS-HCl 0,5 M de pH 6,8, 0,8 g de SDS, 3,5 g de glicerol, 0,46 g de DTT Y 0.007 g de azul de bromofenol, se llevan a 100 mL de disolución. Este tampón debe conservarse en la nevera.

## 2.Preparación de los geles[20].

Colocación de las placas de los geles en el marco de fundición como se aprecia en la (Figura 7). Las placas han de ser limpiadas con agua destilada y etanol previamente a su colocación.

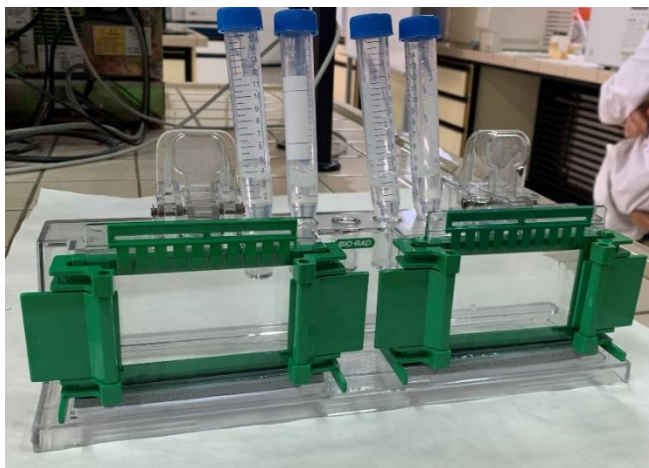


Figura 7 Marcos de fundición del gel con placas colocadas.

Se preparan geles del 12 y 14 % de acrilamida: bisacrilamida mezclando los volúmenes de reactivos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1 Volumen ( $\mu\text{L}$ ) de reactivos necesario para la preparación de un gel.

Volumen de reactivos para un gel ( $\mu\text{L}$ )	Gel de separación			Gel de empaquetamiento
	12%	13%	14%	
H <sub>2</sub> O MilliQ	2565	2315	2065	2239
Lower buffer pH 8,8	1875	1875	1875	-
Upper buffer pH 6,8	-	-	-	900
Acrilamida:Bis 29:1	2000	3250	3500	432
PSA 10%	50	50	50	35
TEMED	15	15	15	10

1. Preparación de la disolución de acrilamida: bisacrilamida 29:1: Se pesan 4,6 g de acrilamida y 0,16 g de bisacrilamida y se llevan a 16 g empleando agua MilliQ. Cantidad preparada para 6 geles. Esta disolución se prepara en cada sesión en la que se preparan geles debido a la degradación de la acrilamida y bisacrilamida.
2. Preparación de la disolución del gel separador mezclando todos los reactivos excepto el APS y TEMED según la Tabla 1.
3. Adición del TEMED Y APS, mezclado por inversión y vertido de la mezcla en el casete del gel dejando hueco para el gel concentrador, adición de isopropanol en la superficie del gel para evitar contaminación en el gel y que quede recto, se deja polimerizar 1 hora.
4. Preparación de la disolución del gel concentrador mezclando todos los reactivos según la Tabla 1 excepto APS y TEMED.
5. Descartar el isopropanol.
6. Adición de APS y TEMED, vertido en el casete del gel y colocación de peine para los pocillos de carga. Se deja polimerizar 15 minutos.

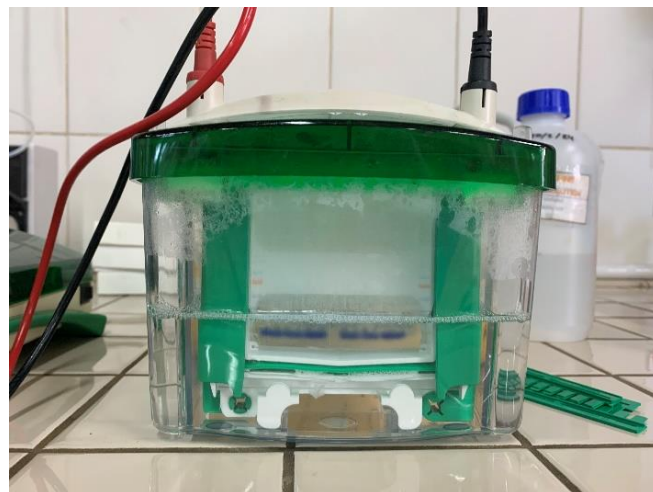
Los geles han de conservarse en la nevera a 4 °C en sus placas envueltos con papel con agua MilliQ.

### 3.Preparación de las muestras:

Las muestras han de desnaturalizarse durante 5 minutos en el termobloque a 99°C. Previamente, se mezclan con el tampón de carga que se encuentra en una concentración 4X, se preparan 50 µL añadiendo 37,5 µL de muestra y 12,5 µL de tampón de carga.

### 4.Montaje del módulo de la electroforesis y carga de muestra (se corren dos geles a la vez).

1. Colocación de dos casetes que contienen el gel en el marco de sujeción de los geles y colocación en el soporte de la cámara de electroforesis.
2. Disolución del tampón de migración: El tampón de migración se encuentra en una concentración de 10X se toman 80 ml y se llevan a un volumen final de 800 mL con agua MilliQ.
3. Vertido de la disolución de tampón de migración entre los dos geles y retirada del peine de los geles.
4. Carga de la muestra: Se cargan 5 µL de escalera de pesos moleculares en dos pocillos y 10 µL de muestra en el resto de los pocillos. Los geles tienen 10 pocillos. Se cargan 3 patrones de calibrado de la proteína sin digerir y las 4 digestiones a diferentes tiempos dejando un pocillo a modo de blanco entre el calibrado y las digestiones.
5. Llenado de la cámara de electroforesis hasta el nivel indicado con la disolución de migración, tapado del tanque, conexión de los cables a la fuente de corriente y aplicación de un voltaje de 150V (Figura 9).
6. Apagado de la fuente eléctrica una vez está la electroforesis completada (1 hora 20 min aproximadamente). El frente azul ha de llegar al final del gel (Figura 8).



*Figura 8 Frente de la electroforesis.*



Figura 9 Dispositivo electroforético.

### 5. Tinción del gel.

1. Preparación de la disolución de tinte con azul de Coomassie: Contiene 1g de azul de Coomassie, 200 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 700 mL de agua MilliQ.
2. Separación del gel de las placas para geles de poliacrilamida y vertido en la disolución de tinte durante una hora.
3. Preparación de la disolución de destintado: Adición de 500 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 400 mL de agua MilliQ.
4. Vertido del gel en disolución de destintado durante 30 minutos.

### 2.2.3 Procesado de las imágenes con Image J.

Image J es una herramienta de procesamiento de imágenes de código abierto ampliamente utilizada en la comunidad científica. Image J es una opción popular para el análisis de geles de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

Se fotografian los geles y se procesan con Image J de dos maneras:

- En primer lugar, midiendo los desplazamientos en el gel de las diferentes bandas, así como de la escalera de pesos moleculares, para ello se emplea la herramienta ROI Manager, que mide la distancia en pulgadas (in). Esto permitirá la identificación de las proteínas a través del cálculo de los pesos moleculares de las diferentes bandas.
- En segundo lugar, para la medida del área de pico de la intensidad de emisión del color de las diferentes bandas con la herramienta Gels, que permitirá la cuantificación de la proteína sin digerir en las digestiones a diferentes tiempos.

### 2.3 Geles empleados en el estudio.

- Optimización de la concentración de proteína cargada en el gel: En primer lugar, se corren dos geles del 12 % de la digestión de la proteína albúmina en diferentes concentraciones.

Para el primer gel de concentración de albúmina diluido se prepara un calibrado de disoluciones patrón de la proteína sin digerir de 10, 20 y 30 mg/L a partir de una disolución stock de 1mg/2 mL tomando 20, 40 y 60  $\mu$ L de la disolución stock y llevándolo a un volumen de 1 mL.

Se preparan las disoluciones de proteína digerida de aproximadamente 25 mg/L a partir de la disolución de proteína digerida inicial a diferentes tiempos tomando 31  $\mu\text{L}$  de la disolución inicial y llevándolas a un volumen de 1 mL.

En segundo gel de mayor concentración de albúmina se prepara un calibrado de concentraciones de proteína sin digerir de 200, 400 y 700 mg/L a partir de una disolución de proteína stock de 1 mg/mL tomando 200, 400 y 700  $\mu\text{L}$  y llevando las disoluciones a un volumen final de 1 mL. Las digestiones de la proteína se cargan sin diluir en una concentración de 666,7 mg/L.

- Para estudiar la eficacia de las digestiones se corren 3 geles del 12%, uno de cada proteína. Para ello se carga en el gel un calibrado de proteína sin digerir de concentraciones 200, 700 y 1000 mg/L preparados a partir de una disolución stock de 1 mg/mL tomando 200, 700 y 1000  $\mu\text{L}$  de disolución stock y llevándolo a un volumen final de 1 mL. Las digestiones se cargan sin diluir a 666,7 mg/L.
- Finalmente, para la evaluación de fragmentos de menor tamaño tras la digestión se corre un gel del 15% que contiene las disoluciones de 700 mg/L de las 3 proteínas sin digerir, así como las digestiones a 24 horas de cada proteína.

### 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1 Optimización de la concentración de proteína en los geles.

Para la optimización de la concentración de proteína que se va a cargar en los geles se corren dos geles del 12% a diferentes concentraciones de las digestiones a diferentes tiempos y patrones de la proteína albúmina. En el primero (Figura 10), se cargan los marcadores de peso molecular en los extremos, patrones de calibrado de 10, 20, 30 mg/L y la proteína digerida a diferentes tiempos en una concentración de 25 mg/L.

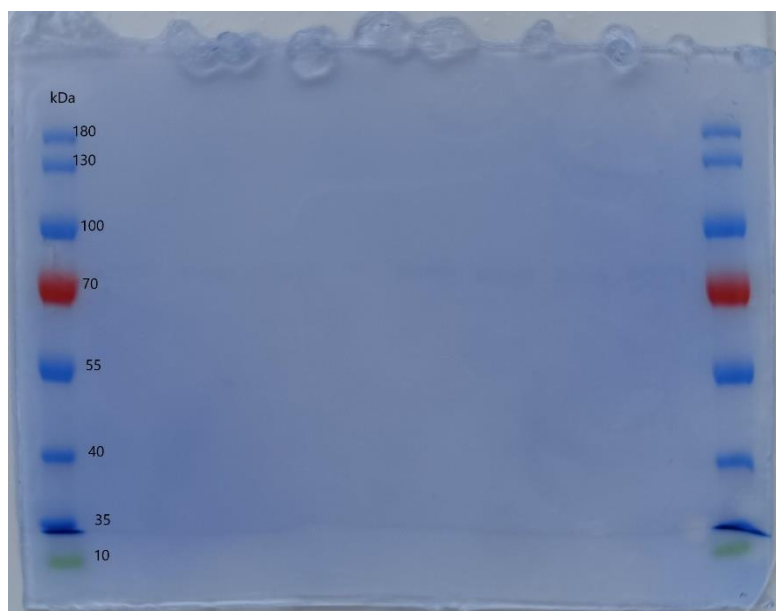
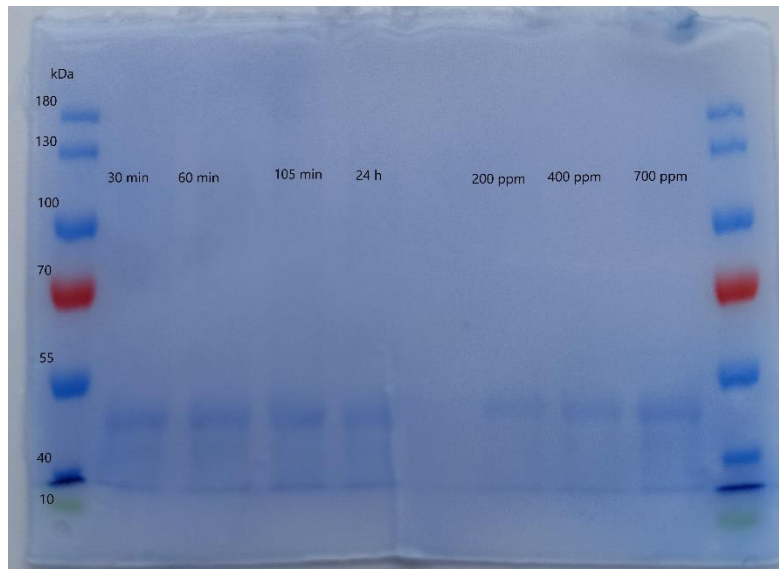


Figura 10 Gel de digestión de albúmina más diluido.

Sin embargo, esta concentración de proteína cargada es insuficiente ya que no se aprecian bandas que permitan el estudio de la eficacia de la digestión de la proteína con tripsina. Por ello, se corre otro gel (Figura 11) en el que se cargan marcadores de peso molecular en los extremos,



patrones de la proteína sin digerir de 200, 400 y 700 mg/L y las proteínas digeridas a diferentes tiempos en concentraciones de 666,7 mg/L.



*Figura 11 Gel de digestión de albúmina más concentrado.*

En el gel de la Figura 11 se aprecian las bandas de las proteínas, por tanto, en el estudio las proteínas digeridas se cargarán en una concentración de 666,7 mg/L, por otro lado, las bandas del calibrado son muy tenues por lo que se utilizará un calibrado de concentraciones más elevadas; 200, 700 y 1000 mg/L.

### 3.2 Estudio de la eficacia de la digestión de la albúmina.

La albúmina ( $M=65$  kDa) es una proteína soluble en agua que se encuentra en altas concentraciones en el plasma sanguíneo y en otros fluidos corporales. Es sintetizada principalmente en el hígado y desempeña una variedad de funciones biológicas importantes en el cuerpo. Algunas de las funciones principales de la albúmina incluyen: el transporte de sustancias, la regulación de la presión osmótica en el torrente sanguíneo, facilitar el metabolismo y eliminación de algunas sustancias como metales [21].

Se carga un gel del 12 % con un calibrado de 200, 700 y 1000 mg/L de proteína sin digerir, así como proteína digerida a 30, 60, 105 minutos y 24 horas en concentración de 666,7 mg/L y marcadores de peso molecular en los extremos (Figura 12).



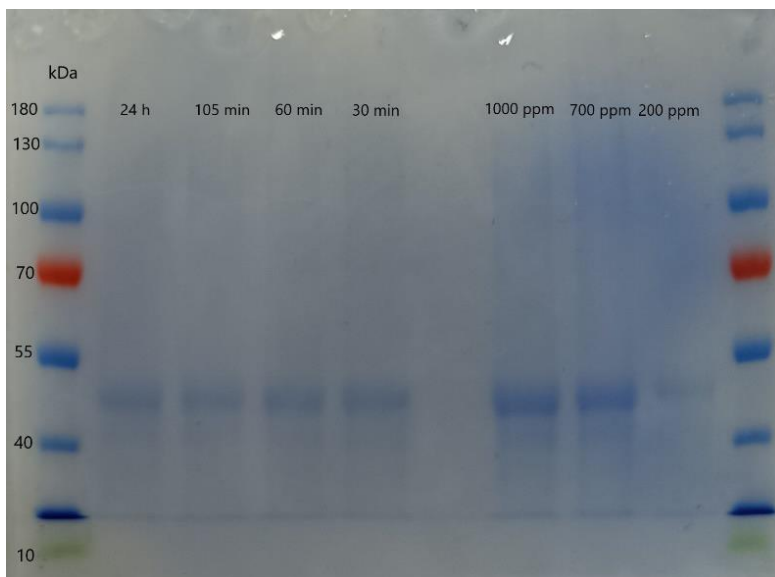


Figura 12 Gel para el estudio de la digestión de la albúmina.

En la Figura 12 se aprecia una disminución de la intensidad del color de la banda correspondiente a la proteína a medida que transcurre el tiempo de la digestión.

La imagen se procesa con el programa Image J para medir las distancias recorridas por los marcadores de peso molecular y las proteínas, en primer lugar, se utilizan las bandas de los marcadores para calcular una recta de calibrado representando  $\log(Mr)$  (siendo  $Mr$  el peso molecular en kDa) frente a  $Rm$  (movilidad relativa, es el cociente entre la distancia recorrida por la proteína de interés en el gel frente a la distancia del frente de solvente) (Tabla 2). El programa Image J mide la distancia en pulgadas. Este calibrado nos permitirá conocer el peso molecular de la banda y comprobar si se trata de la albúmina.

Tabla 2 Datos para la representación del calibrado  $\log(Mr)/Rm$  albúmina.

Mr (kDa)	Distancia (in)	Log (Mr)	Rm
180	70	2,255	0,074
130	170	2,114	0,180
100	310	2,000	0,329
70	458	1,845	0,486
55	631	1,740	0,669
40	795	1,602	0,844
Frente	942		

Se obtiene una recta de calibrado:

$$\log(Mr) = -0,823 * Rm + 2,280$$

Con un  $R^2=0,989$ .

La obtención de una linealidad de 0.99x en SDS-PAGE es compleja debido a que es fácil que existan variaciones en la transferencia de proteínas, problemas de calibración en el software de análisis, problemas en la carga de las proteínas, etc.

Teniendo en cuenta el desplazamiento de la banda se calcula su peso molecular en kDa (Tabla 3).

Tabla 3 Cálculo del peso molecular de la banda en estudio de albúmina.

	Distancia(in)	Rm	Log (Mr)	Mr (kDa)
Albúmina	688	0,73	1,679	47,786

Se obtiene un peso molecular de 47,786 kDa que se corresponde aproximadamente con el de la albúmina empleada, ya que es albúmina de huevo y no albúmina humana, la albúmina de huevo tiene un peso de 45 kDa [22].

Para estudiar la eficacia de la digestión se procesa la imagen con Image J de nuevo, en este caso midiendo la intensidad del color de las bandas, se realiza un calibrado del área de pico de la intensidad de emisión de color de la banda frente a la concentración de los patrones (Tabla 4).

Tabla 4 Datos para el calibrado Área/ Concentración de albúmina (mg/L).

Calibrado de albúmina	
Concentración (mg/L)	Área
0	0
200	8769
700	28721
1000	35999

Se obtiene la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = 36,574 * [\text{Albúmina}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) + 999,570$$

Con un R<sup>2</sup>=0,990.

Se obtiene una linealidad relativamente buena a pesar de emplear pocos patrones. Aunque Image J puede ayudar a cuantificar las bandas de proteínas en el gel, la cuantificación absoluta puede ser difícil debido a la variabilidad en la transferencia de las proteínas al gel, así como en la eficiencia de tinción y sensibilidad del equipo de detección. Los geles pueden poseer un fondo inconsistente y haber fallos en el cargado de las proteínas. Se obtiene empleando esta ecuación las concentraciones de albúmina que ha quedado sin digerir tras las digestiones (Tabla 5).

Tabla 5 Cálculos para la concentración de proteína sin digerir tras cada digestión y % digerido en albúmina.

Muestras	Área	Concentración (mg/L)	% Digerido
30 min	23482	615	8
60 min	20447	532	20
105 min	17571	453	32
24 h	16664	428	36
	Concentración inicial (ppm)	667	

En la Tabla 5 se aprecia un aumento de la concentración de albúmina digerida según transcurre el tiempo, a pesar de que la eficacia máxima de la digestión se obtiene a las 24 horas, a los 105 minutos casi se ha llegado a ese valor máximo. Esta proteína contiene 386 aminoácidos con un porcentaje de Lisina y Arginina de entorno al 6% [23].

Los porcentajes de proteína digerida son bajos debido a que la proteína no se ha desnaturalizado, reducido y alquilado previamente a la digestión, por lo cual estas se encontraban en forma globular dificultando la digestión. Estos pasos son comunes en las digestiones con tripsina empleadas en proteómica, las cuales tendrían una mayor eficacia [18].

### 3.3 Estudio de la eficacia de la digestión de la transferrina.

La transferrina (M= 80kDa) es una proteína en el plasma sanguíneo que transporta el hierro por todo el cuerpo. Su función principal es unir los iones de hierro y llevarlos a las células que los necesitan para funciones vitales como el transporte de oxígeno. La transferrina mantiene el hierro en una forma soluble y no tóxica. Se sintetiza principalmente en el hígado. Los niveles anormales de transferrina pueden indicar problemas de salud como deficiencia de hierro [24].

Se carga un gel del 12 % con un calibrado de 200, 700 y 1000 mg/L de proteína sin digerir, así como proteína digerida a 30, 60, 105 minutos y 24 horas en concentración de 666,7 mg/L y marcadores de peso molecular en los extremos (Figura 13).

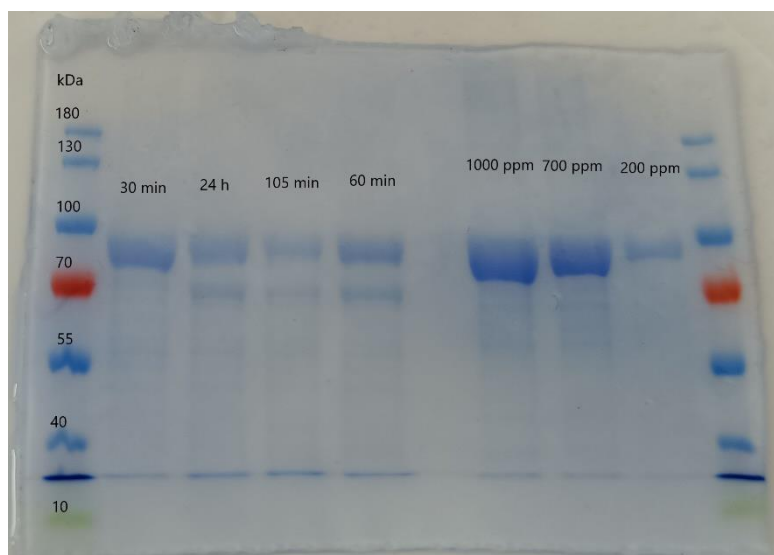


Figura 13 Gel para el estudio de la digestión de la transferrina.

En la Figura 13 se puede apreciar una disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la transferrina a medida que transcurren los tiempos de digestión, también se aprecian la aparición de fragmentos de menor tamaño de 70 kDa, así como fragmentos de entre 35 y 15 kDa, no se puede determinar con exactitud el tamaño de estos debido a que las líneas de los marcadores de peso molecular de 35, 25 y 15 kDa no se separan en geles del 12%.

Para asegurar de que la banda de mayor intensidad es la transferrina se emplea el programa Image J y se representa  $\log(Mr)$  frente a  $Rm$  para los marcadores de peso molecular obteniendo una recta de calibrado (Tabla 6).

Tabla 6 Datos para la representación de  $\log(Mr)/Mr$  para la transferrina.

Mr (kDa)	Distancia (in)	Log (Mr)	Rm
180	208	2,255	0,178
130	274	2,114	0,235
100	522	2,000	0,448
70	639	1,845	0,548
55	853	1,740	0,732
40	1.076	1,602	0,923
Frente	1.166		

Se obtiene la recta de calibrado:

$$\log(Mr) = -0,837 * Rm + 2,353$$

Con un  $R^2=0,974$ .

A partir de la recta de calibrado se obtiene el peso molecular de la proteína de la banda en kDa (Tabla 7). Se obtiene un valor de 72,381 kDa que se aproxima al valor real del peso molecular de la transferrina de entre 70 y 90 kDa [25].

Tabla 7 Cálculo del peso molecular de la banda en estudio de transferrina.

	Distancia	Rm	Log (Mr)	Mr (kDa)
Transferrina	688	0,590	1,860	72,381

Para estudiar la eficacia de la digestión se realiza un calibrado del área de pico de la intensidad de emisión de color de la banda frente a la concentración de los patrones procesando la imagen con Image J (Tabla 8).

Tabla 8 Datos para el calibrado Área/ Concentración de albúmina (mg/L).

Calibrado de transferrina	
Concentración (mg/L)	Área
0	0
200	14701
700	56124
1000	69164

Se obtiene la recta de calibrado:

$$\text{Área} = 71,548 * [\text{Transferrina}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) + 1012,059$$

Con un R<sup>2</sup>=0,988.

Se obtiene empleando esta ecuación las concentraciones de albúmina que ha quedado sin digerir tras las digestiones (Tabla 9).

Tabla 9 Cálculos para la concentración de proteína sin digerir tras cada digestión y % digerido en albúmina.

Muestras	Área	Concentración (mg/L)	% Digerido
30 min	44543	608	9
60 min	36769	500	25
105 min	28570	385	42
24 h	30376	410	38
	Concentración inicial (ppm)	667	

En la Tabla 9 se aprecia también una disminución de la concentración de proteína según transcurre el tiempo. A los 30 minutos apenas ha ocurrido la digestión, el valor máximo de la digestión se obtiene a los 105 minutos por lo que se puede concluir que finaliza a ese tiempo, la concentración de transferrina a las 24 horas es similar.

Se concluye que la eficacia final de la digestión es del 38% es similar pero ligeramente más elevado a la eficacia de la digestión de la albúmina comentada previamente del 36%, la transferrina es una proteína de mayor tamaño con 678 aminoácidos y el mismo porcentaje de arginina y lisina que la albúmina, contiene más puentes disulfuro y su estructura terciaria es más compacta [25]. Por lo que la eficacia de la digestión de ambas proteínas debería ser igual o incluso menor en el caso de la transferrina. Al tratarse de proteínas sin desnaturalizar también habría que tener en cuenta la accesibilidad de los sitios de corte para las enzimas digestivas en la estructura terciaria.

### 3.4 Estudios de la eficacia de la digestión en muestras de suero.

Se carga un gel del 12 % con un calibrado de 200, 700 y 1000 mg/L de suero sin digerir, así como suero digerido a 30, 60, 105 minutos y 24 horas en concentración de 666,7 mg/L y marcadores de peso molecular en los extremos (Figura 14).

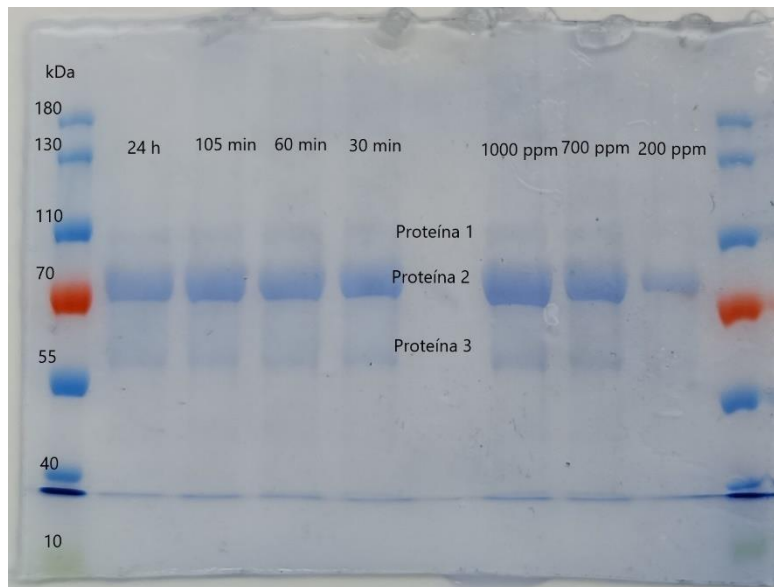


Figura 14 Gel para el estudio de la digestión del suero.

En la Figura 14 se aprecia una disminución de la intensidad de las bandas que contienen la proteína digerida más tenue que en el caso de la albúmina y transferrina, siendo la de menor intensidad la de la proteína digerida a 24h. En cada pocillo se aprecian 3 bandas que se atenúan y se corresponderán con proteínas contenidas en el suero diferentes. Por ello, en este caso es de vital importancia la obtención del peso molecular de estas para su identificación mediante la representación de  $\log(Mr)$  frente a  $Rm$  de la escala de pesos moleculares (Tabla 10). La imagen se procesa con Image J.

Tabla 10 Datos para la representación de  $\log(Mr)/Mr$  para el suero.

Mr (kDa)	Distancia (in)	Log (Mr)	Rm
180	158	2,255	0,183
130	230	2,114	0,267
100	372	2,000	0,432
70	502	1,845	0,582
55	670	1,740	0,777
40	830	1,602	0,963
Frente	862		

Se obtiene la recta de calibrado:

$$\log(Mr) = -0,802 * Rm + 2,355$$

Con un  $R^2=0,982$ .

A partir de la recta de calibrado se obtiene el peso molecular de las proteínas de las bandas en kDa (Tabla 11).

Tabla 11 Cálculo del peso molecular de las bandas en estudio de suero.

	Distancia	Rm	Log (Mr)	Mr (kDa)
Proteína 1	372	0,432	2,008	101,930
Proteína 2	486	0,564	1,902	79,844
Proteína 3	608	0,705	1,789	61,474

El suero contiene numerosas proteínas entre ellas destacan varios tipos de albúmina, de globulinas como la transferrina y fibrinógeno [26].

La albúmina de suero humano tiene un peso molecular de 70 kDa aproximadamente y tiene una concentración muy elevada en el suero de entorno al 50%, por ello, se puede deducir que se trata de la proteína 2 con 79,844 kDa (Tabla 11) ya que es la banda de mayor intensidad en el gel. La proteína 1 a 61,474 kDa (Tabla 11) podría tratarse de una globulina pues presenta una menor concentración en el suero porque la banda correspondiente a esta proteína tiene un color más tenue, además existen globulinas de peso molecular similar. Sin embargo, teniendo en cuenta únicamente los pesos moleculares obtenidos la banda a 61,474 kDa podría corresponder a la albúmina y la banda a 79,844 kDa a la transferrina ya que estos pesos son similares a los propios de estas proteínas mencionados anteriormente. El fibrinógeno tiene un peso molecular mucho mayor de entorno a los 300 kDa, sin embargo, estudios han revelado que tras la desnaturalización con DTT o mercaptoetanol puede romperse en fragmentos de menor tamaño, por tanto, podría ser la proteína 1 con 101,930 kDa (Tabla 11) [26].

Para estudiar la eficacia de la digestión se realiza un calibrado del área de la intensidad de emisión de color de la banda frente a la concentración de los patrones procesando la imagen con Image J para cada proteína (Tablas 12, 14 y 16).

### Proteína 1

Tabla 12 Datos para el calibrado Área/ Concentración de la proteína 1 en suero (mg/L).

Calibrado de proteína 1	
Concentración (ppm)	Área
0	0
200	3524
700	4585
1000	5817

Se obtiene la recta de calibrado:

$$\text{Área} = 4,966 * [\text{Proteína 1}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) + 1122,434$$

Con un R<sup>2</sup>=0,823, es bajo debido a que las bandas son muy tenues y es difícil la medida del área de pico de emisión.

Empleando la recta se calcula la eficacia de la digestión (Tabla 13).

Tabla 13 Cálculos para la concentración de proteína sin digerir tras cada digestión y % digerido en la proteína 1 del suero.

Muestras	Área	Concentración (mg/L)	% Digerido
30 min	4113	602	10
60 min	4302	640	4
105 min	4338	647	3
24 h	3598	498	25
	Concentración inicial (ppm)	667	

En la Tabla 9 se aprecia que a los 30, 60 y 105 minutos apenas ha ocurrido la digestión con eficacias del 10, 4 y 3% y se obtiene el valor máximo de proteína digerida a las 24 h este es del 25%.

### Proteína 2

Se repite el mismo procedimiento que para la proteína 1.

Tabla 14 Datos para el calibrado Área/ Concentración de la proteína 2 en suero (mg/L).

Calibrado de proteína 2	
Concentración (ppm)	Área
0	0
200	19971
700	37485
1000	56804

A partir de los datos de la Tabla 14 se obtiene la recta de calibrado:

$$\text{Área} = 52,214 * [\text{Proteína 2}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) + 3763,414$$

Con un R<sup>2</sup>=0,968 mejor al de la proteína 1 al ser las bandas del gel para esta proteína de un color más intenso.

Se emplea la recta para estudiar la eficacia de la digestión a los diferentes tiempos (Tabla 15).

Tabla 15 Cálculos para la concentración de proteína sin digerir tras cada digestión y % digerido en la proteína 2 del suero.

Muestras	Área	Concentración (mg/L)	% Digerido
30 min	31731	536	20
60 min	32476	550	18
105 min	31888	539	19
24 h	25237	411	38
	Concentración inicial (ppm)	667	



En la Tabla 15 se aprecia al igual que para la Proteína 1 la eficacia máxima de la digestión se obtiene a las 24 horas siendo esta del 38% obteniéndose valores bajos para los 30, 60 y 105 minutos de 20, 18 y 19%.

### Proteína 3

Se repite el mismo procedimiento que para la proteína 1 y 2.

Tabla 16 Datos para el calibrado Área/ Concentración de la proteína 3 en suero (mg/L).

Calibrado de proteína 3	
Concentración (mg/L)	Área
0	0
200	2750
700	12715
1000	17006

A partir de los datos de la Tabla 14 se obtiene la recta de calibrado:

$$\text{Área} = 17,582 * [\text{Proteína 3}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) - 233,753$$

Con un R<sup>2</sup>=0,996 de muy buena linealidad.

Se emplea la recta para estudiar la eficacia de la digestión a los diferentes tiempos (Tabla 17).

Tabla 17 Cálculos para la concentración de proteína sin digerir tras cada digestión y % digerido en la proteína 2 del suero.

Muestras	Área	Concentración (ppm)	% Digerido
30 min	10714	623	7
60 min	10214	594	11
105 min	7346	431	35
24 h	6927	407	39
	Concentración inicial (ppm)	667	

En la Tabla 17 se aprecia que de nuevo la eficacia máxima de la digestión se obtiene a las 24 horas siendo esta de 39%, sin embargo, a los 105 minutos el porcentaje de proteína digerido es de 35,3 % similar a la concentración máxima 35%, el porcentaje de proteína digerido es mínimo a los 30 y 60 minutos siendo de 7 y 11 %.

En las muestras de suero la digestión es por lo general más lenta y su eficacia máxima se alcanza a las 24 horas, se obtienen unos porcentajes de eficacia de digestión final similares a los de las proteínas individuales. La digestión es más lenta debido a la complejidad de las estructuras proteicas en el suero. Las proteínas individuales están presentes en formas más simples y son más fácilmente descompuestas por la tripsina, mientras que, en el suero, las proteínas están en una matriz compleja con conformaciones más complejas e incluso con interacciones entre proteínas, lo que requiere más tiempo para su digestión completa [26].

### 3.5 Estudio de los fragmentos producidos por la digestión de las proteínas.

Como se ha comentado anteriormente las bandas de los marcadores de pesos moleculares entre 35 y 15 kDa no se separan bien en geles del 12%, por tanto, se corre un gel del 15% que contiene la albúmina, transferrina y suero sin digerir a 700 mg/L, así como estas proteínas tras 24 horas de digestión a 666,7 mg/L (Figura 15).

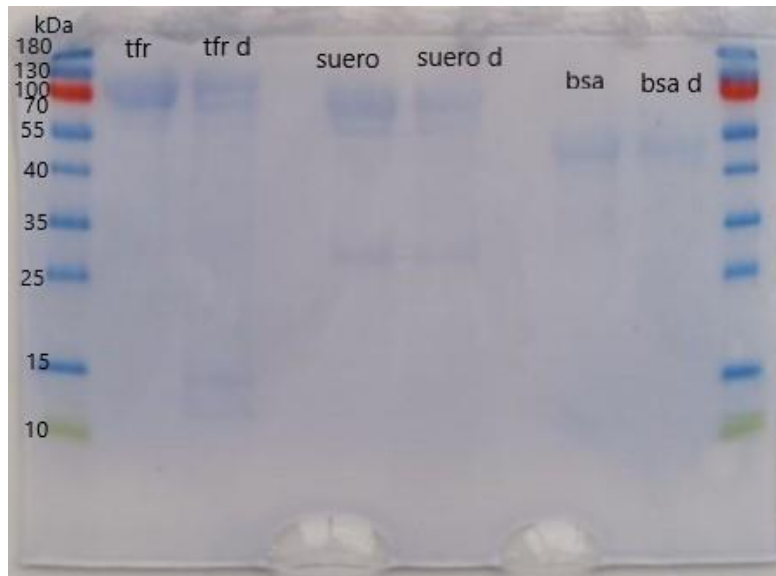


Figura 15 Gel del 15% tfr (transferrina), tfr d (transferrina digerida), suero, suero d (suero digerido), bsa (albúmina), bsa d (albúmina digerida).

En la Figura 15 en el caso del suero y la albúmina solo se aprecia que el color de la banda se vuelve más tenue tras la digestión, en el caso de la transferrina si se aprecian los fragmentos de menor tamaño debido a su mayor peso molecular.

Se mide su peso molecular en kDa representando  $\log(Mr)$  frente a  $Rm$  de la escalera de pesos moleculares para obtener el tamaño de los fragmentos (Tabla 18).

Tabla 18 Datos para la representación de  $\log(Mr)/Mr$  para del del 15%.

Mr (kDa)	Distancia	Log (Mr)	Rm
180	15	2,255	0,053
130	24	2,114	0,085
70	32	1,845	0,113
55	57	1,740	0,201
40	74	1,602	0,261
35	106	1,544	0,373
25	137	1,398	0,482
15	189	1,176	0,666
10	223	1,000	0,785
Frente	284		

Se obtiene la recta:

$$\log(Mr) = -1,507 * Rm + 2,136$$

Con un  $R^2=0,927$ .

A partir de la recta se calculan los pesos moleculares de los fragmentos (Tabla 19).

Tabla 19 Cálculo del peso molecular de las bandas en digestión de transferrina en gel del 15 %.

	Distancia	Rm	log(Mr)	Mr (kDa)
Fragmento 1	35	0,123	1,950	89,133
Fragmento 2	52	0,183	1,860	72,406
Fragmento 3	62	0,218	1,807	64,093
Fragmento 4	185	0,651	1,154	14,267
Fragmento 5	210	0,739	1,022	10,512

Según la Tabla 19 se obtienen fragmentos de 89,133, 72,406 kDa que se corresponden aproximadamente con la transferrina sin digerir ya que esta presenta una masa molecular de entre 80 y 90 kDa también se ven fragmentos de 64,093, 14,267 y 10,512 kDa que se corresponden a los fragmentos formados debido a la ruptura del enlace peptídico durante la digestión.

## 4.CONCLUSIÓN

Empleando la electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha determinado la eficacia de la digestión de las proteínas albúmina y transferrina, así como del suero biológico con tripsina a diferentes tiempos de digestión. Para ello se mide la intensidad de emisión de color de la banda de la proteína sin digerir con el programa Image J y carga en el gel de un calibrado de proteína sin digerir.

Se obtienen porcentajes de eficacia de digestiones de entre el 25% y el 40%. Son porcentajes relativamente bajos; esto es debido a que en el método empleado para llevar a cabo las digestiones no tiene lugar la desnaturalización, reducción y alquilación de las proteínas. Estos procesos facilitan la digestión de las proteínas al deshacer o alterar su estructura tridimensional, permiten romper enlaces específicos como los puentes disulfuro y modificar grupos funcionales para preparar las proteínas para la acción de las enzimas digestivas. Experimentalmente se podría llevar a cabo mediante un tratamiento de las proteínas con 1,4-ditiotreitol (DTT) y urea con calentamiento previo a la digestión.

La eficacia de la digestión de la albúmina alcanza su valor máximo a las 24 horas; siendo esta del 36%, sin embargo, a los 105 minutos la eficacia tiene un valor muy próximo de 32%; por tanto, se puede concluir que la digestión está casi finalizada a los 105 minutos.

En el caso de la transferrina el valor máximo de la eficacia de la digestión se alcanza a los 105 minutos; siendo este del 42%, a las 24 horas la eficacia de la digestión es de 38%, tiene un valor muy similar, la digestión finaliza a los 105 minutos. Esto se atribuye a un error de carga de la proteína en el gel.

La transferrina contiene 678 aminoácidos mientras que la albúmina contiene 386 aminoácidos, pero ambas proteínas tienen un porcentaje similar de residuos de lisina y arginina. Por lo cual la eficacia de la digestión debería ser similar para ambas proteínas. Además, la transferrina tiene mayor porcentaje de puentes disulfuro y es más compacta que la albúmina, por lo que la eficacia de la digestión debería ser incluso menor. Sin embargo, habría que tener en cuenta otros factores como la accesibilidad de la tripsina a los sitios de corte.

En las digestiones con suero se aprecian 3 bandas de proteínas a digerir. El suero contiene fundamentalmente albúmina, globulinas y fibrinógeno. A través del procesado de la imagen del gel con Image J se obtienen los pesos moleculares de estos fragmentos siendo estos de 101,930, 79,844 y 61,474 kDa. Mediante la comparación de estos pesos moleculares con la bibliografía se determina que la banda a 101,930 kDa (Proteína 1) se corresponde a fragmentos de fibrinógeno. El fibrinógeno tiene un peso molecular de 300 kDa, pero en la desnaturalización se rompe. La banda a 79,844 kDa podría corresponder a la albúmina (proteína 2) ya que esta es la proteína de mayor concentración en el suero y su banda es la de mayor intensidad. La banda a 61,474 kDa (Proteína 3) podría ser algún tipo de globulina. Sin embargo, teniendo en cuenta los pesos moleculares únicamente la banda a 61,474 kDa se correspondería con la albúmina y la banda a 79,844 kDa con la transferrina.

Para la proteína 1 del suero, se obtiene un máximo de la eficacia de la digestión del 25% a las 24 horas, a los 30, 60 y 105 minutos apenas ha ocurrido la digestión. Para la proteína 2 el máximo se obtiene a las 24 horas también siendo este del 38% con porcentajes de proteína digerido de aproximadamente el 20% a los 30, 60 y 105 minutos. En la proteína 3 el máximo se alcanza a las 24 horas siendo este del 39%: sin embargo, a los 105 minutos ya ha ocurrido el 35% de la digestión, a los 30 y 60 minutos el porcentaje digerido es del 10%. Como conclusión se aprecia que las digestiones de muestras biológicas como el suero son más lentas que las digestiones de proteínas individuales, esto es debido a la complejidad de la matriz de las muestras de suero, así como estructuras proteicas de mayor complejidad en el suero con interacciones entre proteínas.

Finalmente, en un gel de mayor resolución se cargaron las proteínas sin digerir y digeridas 24 horas para visualizar los fragmentos de la digestión. Sólo se vieron nítidamente los fragmentos en la transferrina debido a su elevado peso molecular y mayor concentración en comparación con la albúmina y proteínas contenidas en el suero. Se calculó su peso molecular siendo este de 89,133 kDa, 72,406 kDa y 64,093 kDa 14,267 kDa y 10,512 kDa siendo los dos primeros correspondientes a la transferrina sin digerir y los tres últimos a la transferrina digerida.

El empleo de SDS-PAGE para los estudios de eficacia de digestiones de proteína con tripsina resultó útil. No se obtienen valores de  $R^2$  de 0.99x que permitan asumir la linealidad absoluta en los calibrados, pero sí se obtienen valores próximos. Esto es debido a que la cuantificación absoluta de las proteínas es compleja debido a diferencias en la eficiencia de tinción, sensibilidad del equipo de detección (en este caso el programa Image J), eficiencias de tinción y variabilidad de transferencia de las proteínas al gel. Es un método de elevada sensibilidad; sin embargo, existen proteínas que no se detectan fácilmente debido a su tamaño, baja concentración o solubilidad en SDS. Además, las condiciones desnaturalizantes empleadas en SDS-PAGE pueden provocar la degradación de proteínas durante el procesamiento.

## 5. REFERENCIAS

En negrita referencias de internet.

- [1] E. Vandermarliere, M. Mueller, and L. Martens, "Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics", *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 32, no. 6., pp. 453–465, 2013, doi: 10.1002/mas.21376.
- [2] L. Tsiatsiani and A. J. R. Heck, "Proteomics beyond trypsin", *FEBS Journal*, vol. 282, no. 14, Blackwell Publishing Ltd, pp. 2612–2626, 2015, doi: 10.1111/febs.13287.

- [3] L. Switzar, M. Giera, and W. M. A. Niessen, "Protein digestion: An overview of the available techniques and recent developments", *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 3, American Chemical Society, pp. 1067–1077, 2013, doi: 10.1021/pr301201x.
- [4] X. Ye et al., "Integrated proteomics sample preparation and fractionation: Method development and applications", *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 120, no. 115667, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115667.
- [5] S. S. Thakur et al., "Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation", *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 10, no. 8, 2011, doi: 10.1074/mcp.M110.003699.
- [6] M. Rauh, "LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 883, pp. 59–67, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.09.030.
- [7] E. R. S. Kunji, M. Harding, P. J. G. Butler, and P. Akamine, "Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography", *Methods*, vol. 46, no. 2, pp. 62–72, 2008, doi: 10.1016/j.ymeth.2008.10.020.
- [8] Y. Liu et al., "A comprehensive evaluation of milk protein molecular weight distribution based on exclusion chromatography dataset", *Food Chemistry*, vol. 436, no.137725, 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.137725.
- [9] D. Some, H. Amartely, A. Tsadok, and M. Lebediker, "Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (Sec-mals)", *Journal of Visualized Experiments*, vol.148, no. E59615, 2019, doi: 10.3791/59615.
- [10] **A.M. Maldonado Alconada, J.V. Jorrín Novo, "Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida.Análisis de hojas de Arabidopsis thaliana", [Online] available: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>**
- [11] N. Sharma, R. Sharma, Y. S. Rajput, B. Mann, R. Singh, and K. Gandhi, "Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution", *International Dairy Journal*, vol. 114, no 104920, 2021, doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104920.
- [12] V. García Arteaga, M. Apéstegui Guardia, I. Muranyi, P. Eisner, and U. Schweiggert-Weisz, "Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 65, no 102449 ,2020, doi: 10.1016/j.ifset.2020.102449.
- [13] V.Laemmli, "Clavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4", *Nature*, vol .227, pp. 680-685, 1970.
- [14] S. R. Gallagher, "SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)", *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, vol. 2012, no. 6, pp 7.3.1-7.3.28, 2012, doi: 10.1002/9780470089941.et0703s06.
- [15] M.L Pérez-Chabela et al "Polyacrilamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins", *Nacameh*, vol. 9, no. 2, pp.77-96, 2015.

- [16] **“Claves para Conseguir Caracterizaciones de péptidos óptimas: Una guía práctica de mapa de péptidos.”,Agilent technologies, 2013.[Online].Available: <https://www.agilent.com/library/selectionguide/Public/5991-2348ES.pdf>**
- [17] Y. Z. Zheng and M. L. DeMarco, “Manipulating trypsin digestion conditions to accelerate proteolysis and simplify digestion workflows in development of protein mass spectrometric assays for the clinical laboratory”, *Clinical Mass Spectrometry*, vol. 6, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1016/j.clinms.2017.10.001.
- [18] **“Agilent Technologies Proteomics Grade Trypsin Catalog #204310 Protocol,” Agilent technologies ,2010. [Online]. Available: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/204310-12\\_Trypsin.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/204310-12_Trypsin.pdf)**
- [19] X. Zhou, T. Wang, A. Wang, and R. Li, “Optima of Trypsin-Catalyzed Hydrolysis and Its Inhibition Determined by SDS-PAGE,” *Advances in Enzyme Research*, vol. 04, no. 01, pp. 1–6, 2016, doi: 10.4236/aer.2016.41001.
- [20] A. Suárez Priede, información personal, 2024.
- [21] J.Hankins,“Función de la albúmina en el equilibrio hídrico ”, *Nursing*, vol. 26, no 10, pp. 42-43, 2008.
- [22] R. K. Murray, V. W. Rodwell, D. Bender, K. M. Botham, P. A. Weil, P. J. Kennelly, *Harper’s Illustrated Biochemistry*, 28th ed. McGraw-Hill Medical, 2009.
- [23] A. D. Nisbet, R. H. Saundry, A. J. G. Moir, L. A. Fothergill, and J. E. Fothergill, “The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin”, *European Journey of Biochemistry*, vol. 115, no. 2, pp. 335–345, 1981, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05243.x.
- [24] **"Transferrina," [Online]. Available: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Transferrina.html>.**
- [25] R. T. A. Macgillivray, E. Mendezt, S. K. Sinha, M. R. Suttont, J. Lineback-Zins, and K. Brew, “The complete amino acid sequence of human serum transferrin (primary structure/protein evolution/contiguous gene duplication/disulfide bonds/iron transport)”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.79, pp. 2504-2508, 1982.
- [26] A. Cabezas Bastos, E. C. Orozco, & Liseth, and C. Loría, “Electroforesis en gel de poliacrilamida para la determinación del peso molecular de proteínas plasmáticas y su importancia.”

## 6. ANEXOS

- Anexo 1: representación del calibrado  $\log(Mr)/R_m$  para los geles de proteínas y suero.

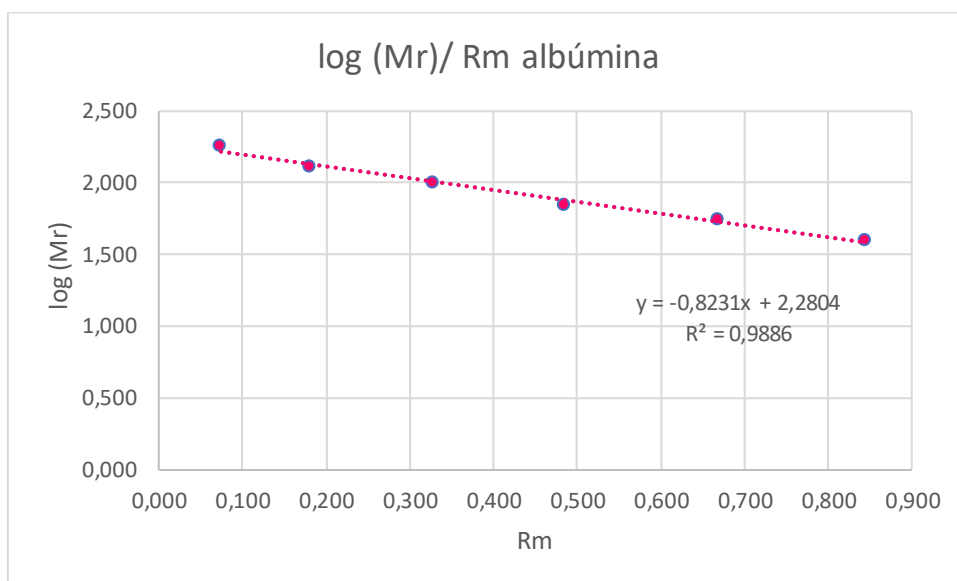


Figura 16 Representación de  $\log(Mr)/R_m$  para la albúmina.

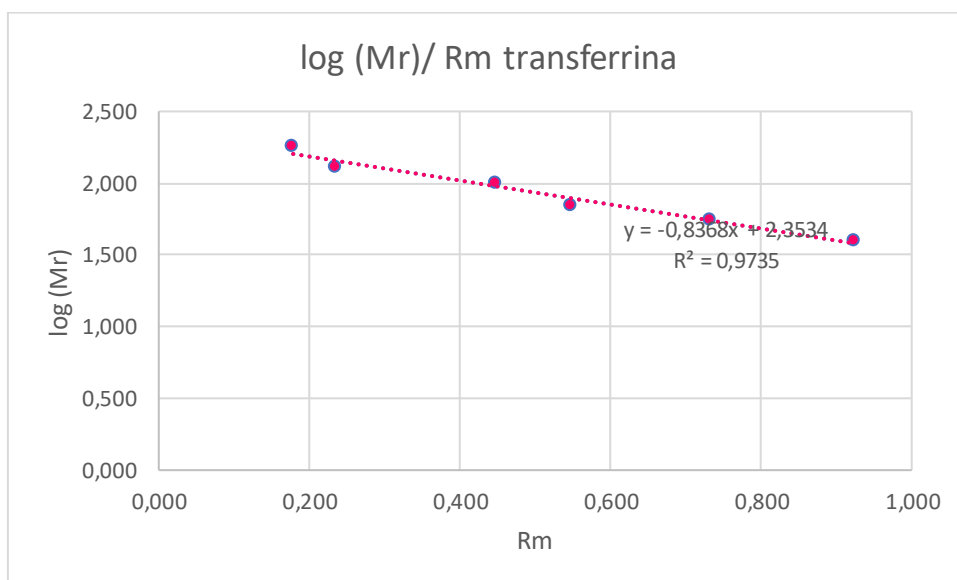


Figura 17 Representación de  $\log(Mr)/R_m$  para la transferrina.

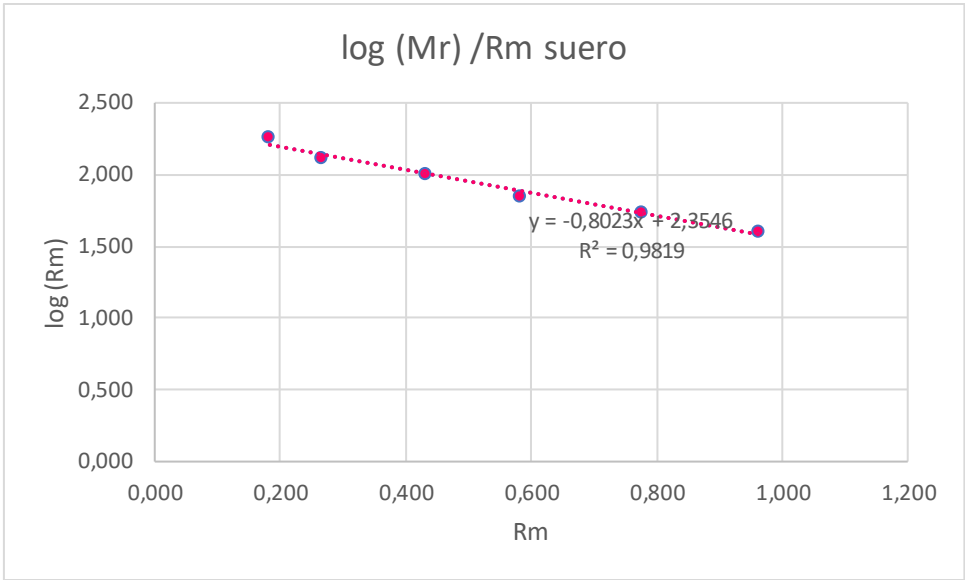


Figura 18 Representación de  $\log (Mr)/Rm$  para el suero.

- Anexo 2: Representación del calibrado Área/ Concentración de las proteínas.

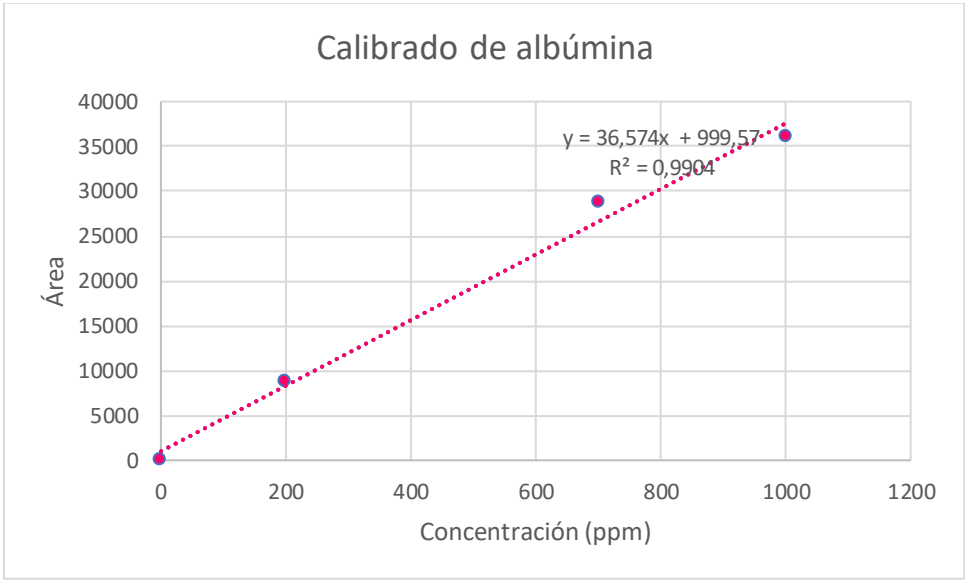


Figura 19 Representación Área/ Concentración de la albúmina.



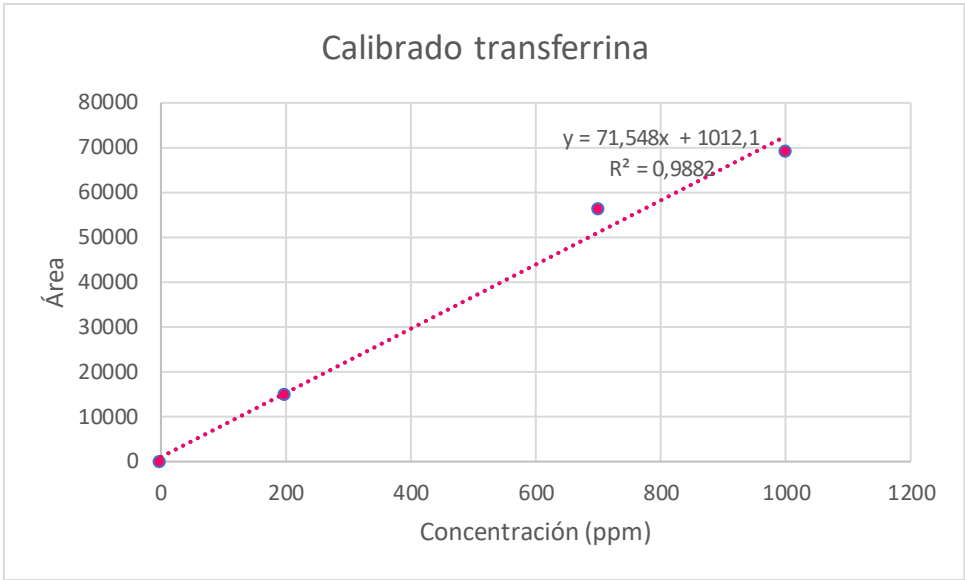


Figura 20 Representación Área/ Concentración de la transferrina.

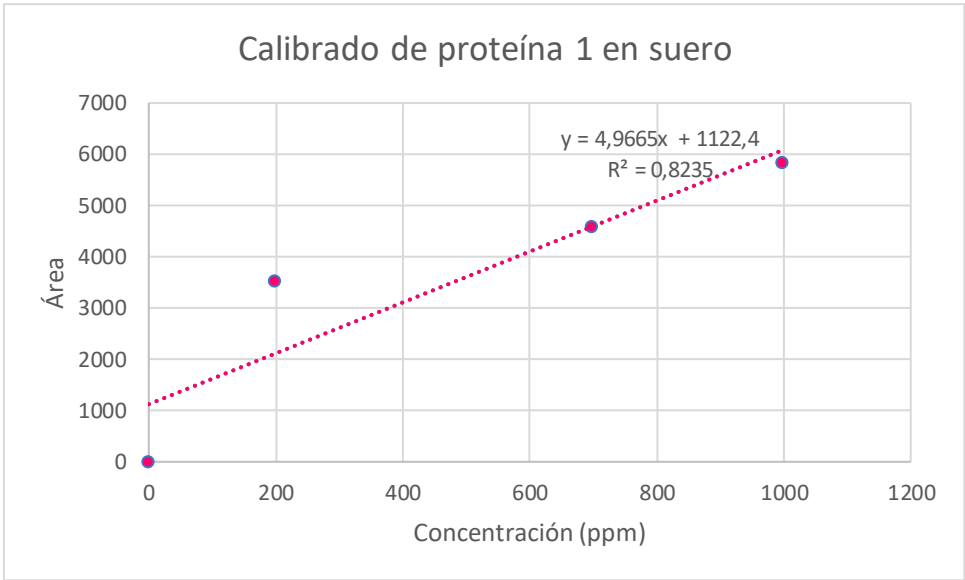


Figura 21 Representación Área/ Concentración de la proteína 1 del suero.

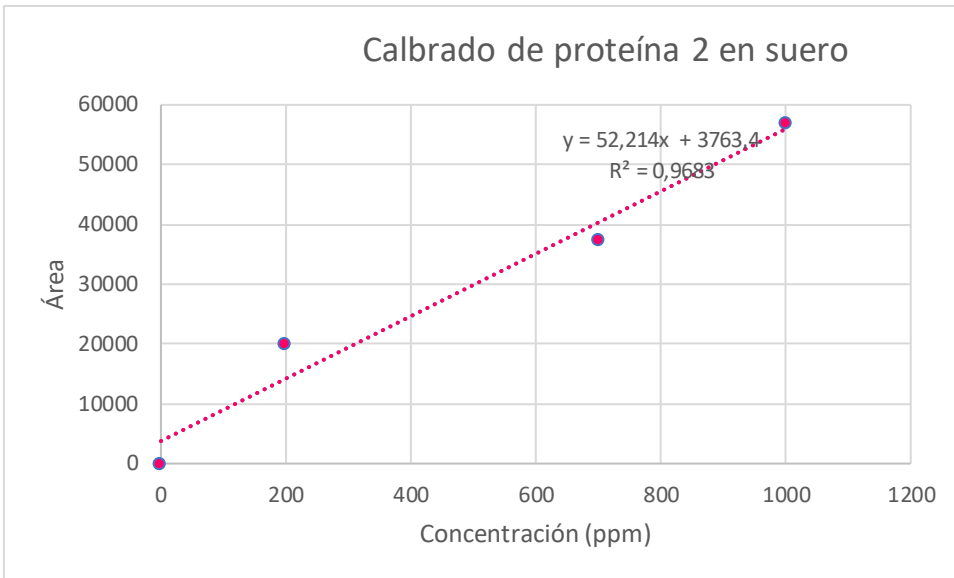


Figura 22 Representación Área/ Concentración de la proteína 2 del suero.

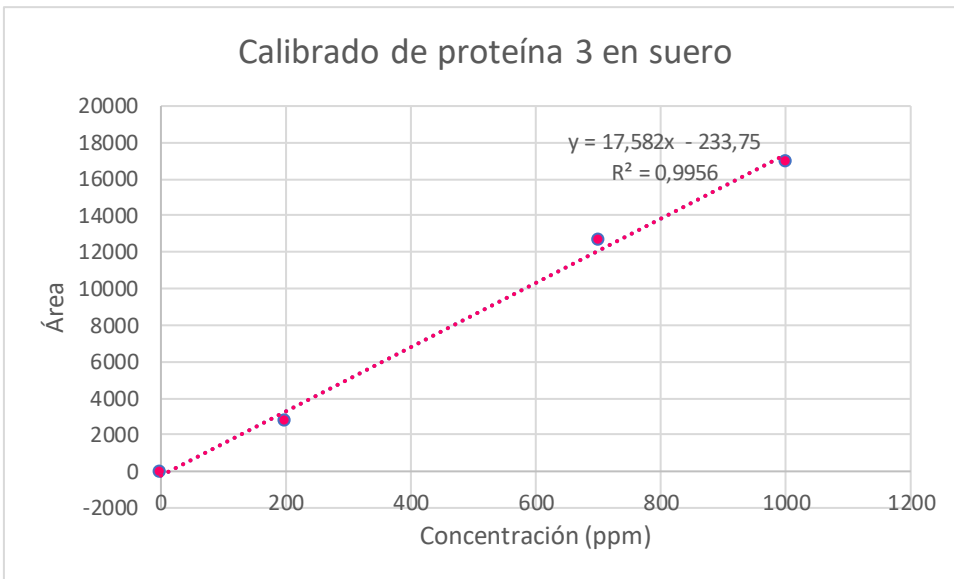


Figura 23 Representación Área/ Concentración de la proteína 3 del suero.

- Anexo 3: Representación del calibrado  $\log(Mr)/R_m$  para el gel del 15%.

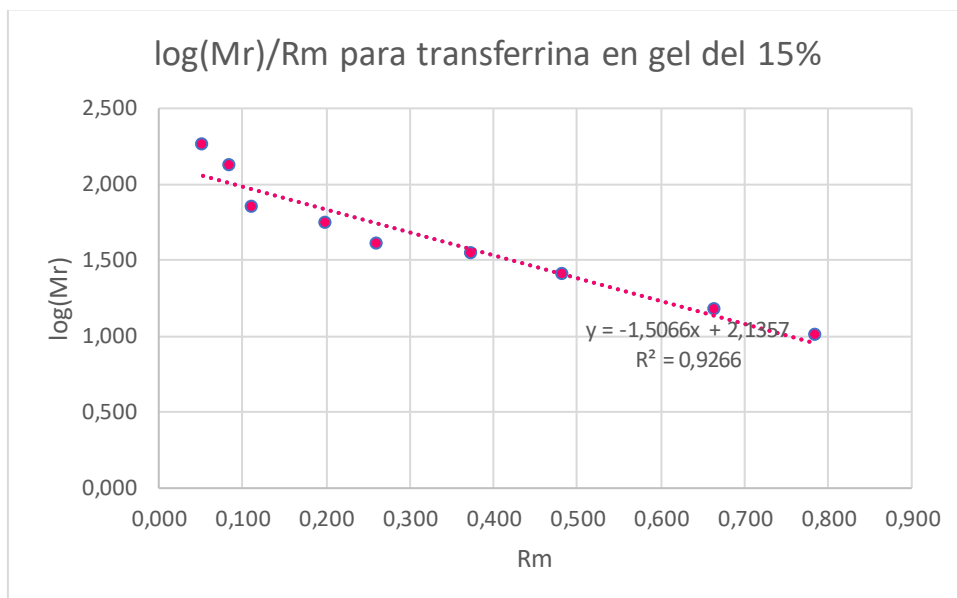


Figura 24 Representación de  $\log(Mr)/R_m$  para el gel del 15%.