

## Optimización e implementación de la técnica de Western Blot cuantitativo utilizando extractos proteicos de maíz

Optimization and Implementation of a Quantitative Western Blot method utilizing maize protein extracts

Luis Alexis Jiménez-Barboza<sup>1</sup>

Fecha de recepción: 24-08-2021

Fecha de aceptación: 29-10-2021

### Resumen

La técnica del Western Blot fue descrita, por primera vez, a finales de los setenta y desde entonces, es una metodología ampliamente utilizada en estudios de biología celular y molecular relacionados a la identificación de proteínas. Esta metodología permite la inmunodetección de proteínas específicas de interés en muestras y extractos proteicos complejos y, además, arroja información sobre la cantidad relativa de esta(s) proteína(s) en distintas muestras. Hasta la fecha, la aplicación de un protocolo optimizado de esta técnica en los laboratorios de la región de Occidente de la Universidad de Costa Rica no ha sido posible. El presente trabajo pretende servir como protocolo de referencia, tanto para la obtención y cuantificación de extractos proteicos totales a partir tejidos de maíz, así como para la implementación de la técnica del Western Blot cuantitativo en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la UCR. Se describe detalladamente desde la obtención y preparación de los extractos proteicos de maíz, hasta la detección de la proteína control  $\alpha$ -tubulina y la cuantificación de la señal detectada en el ensayo inmunológico. Bajo estas condiciones experimentales, el Western Blot resultó ser semicuantitativo para cargas proteicas de 5 a 45  $\mu$ g.

**Palabras clave:** Proteínas; anticuerpos; Western Blot; inmunodetección; tubulina; aislamiento; electroforesis

### Abstract

Western Blot technique was described for the first time at the end of the seventies and since then, it has been widely used in Molecular and Cellular Biology experiments related to protein studies. This method allows not only the immunodetection of proteins in complex and raw protein extracts and samples, but also the relative amount of a specific protein in a sample. Up to date, there has not been any report of the use and implementation of the Western Blot technique in any laboratory from the Occident Region of Universidad de Costa Rica. This article aims to become a methodological reference not only for Western Blot implementation but also for preparation and quantification of maize total protein extracts at the Laboratorio de Biotecnología, Sede de Occidente from Universidad de Costa Rica. It is described in detail, from obtaining and preparing maize protein extracts from fresh tissue, to the detection of control protein  $\alpha$ -tubulin and the quantification of the signal detected in the immunological assay. Under the conditions here established, the Western Blot was semiquantitative for protein loads between 5 and 45  $\mu$ g.

**Keywords:** Proteins; antibodies; Western Blot; immunodetection; tubulin; protein isolation; electrophoresis

**Abreviaturas importantes:** PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida; SDS: Dodecilsulfato sódico; TEMED: Tetrametiletiléndiamina; APS: Persulfato de amonio; DTT: Ditiotriol; TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina.

<sup>1</sup> M.Sc. Biotecnología Luis Alexis Jiménez Barboza. Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente, Costa Rica; luis.jimenezbarboza@ucr.ac.cr.

## I. Introducción

Western Blot es una técnica utilizada para el análisis de proteínas con la cual se puede identificar, separar o cuantificar proteínas específicas a partir de muestras complejas, como macerados y preparaciones acuosas de tejidos celulares de distinto origen con resultados muy precisos (Kurien y Scofield, 2006).

La técnica Western Blot fue descrita por primera vez a finales de los setenta (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Desde entonces, es una metodología ampliamente utilizada en estudios de biología celular y molecular relacionados a la identificación y análisis de proteínas. También, constituye una de las pocas técnicas moleculares cuyos resultados visuales, ya sean cualitativos o cuantitativos, son aceptados en las publicaciones científicas (Kurien y Scofield, 2006). El término Blotting hace referencia a pasar proteínas o ácidos nucleicos a una membrana porosa. Este procedimiento evolucionó a partir del Blot de ADN, utilizado originalmente por Edwin Southern, en 1973, con la técnica molecular llamada Southern Blot (Ford y Southern, 1973).

El método de funcionamiento de la técnica Western Blot se fundamenta en la inmuno-detección de la(s) proteína(s) de interés utilizando anticuerpos específicos capaces de reconocerla(s) e interactuar con ella(s). A pesar de que dicho proceso requiere una mayor manipulación y preparación de la muestra, en comparación con otras técnicas afines, como el ensayo ELISA, el Western Blot posee la capacidad de identificar características propias de la proteína de interés, como la inmunoreactividad de su secuencia así como el tamaño o peso molecular de la proteína detectada, lo cual reduce significativamente la probabilidad de obtener falsos positivos (Shan, 2011).

Para detectar proteínas de baja abundancia en muestras complejas a través de la técnica Western Blot es necesario seguir una serie de pasos. Primero, se debe obtener la muestra o extracto por analizar y determinar su concentración proteica total. Segundo, se separan las proteínas totales de la muestra por electroforesis. Tercero, se transfieren las proteínas separadas a una membrana de fluoruro de polivinilideno o de nitrocelulosa por

electro-transferencia. Cuarto, se detectan la(s) proteína(s) de interés por medio del suministro de anticuerpos específicos, generando una reacción antígeno-anticuerpo. Finalmente, se suministra un anticuerpo secundario que se adhiere al primero y produce una señal colorimétrica que luego es detectada y cuantificada.

El grado de reactividad que poseen los anticuerpos con la proteína de interés es directamente proporcional a la abundancia de esta en la muestra. Debido a eso, el Western Blot puede proporcionar resultados semi-cuantitativos, ya que no solo proporciona información sobre la presencia o ausencia de la proteína de interés, sino que también arroja datos sobre su abundancia relativa en distintas muestras (Mahmood y Yang, 2012). La sensibilidad del Western Blot depende de varios factores, especialmente de la eficiencia en la transferencia proteica desde el gel hasta la membrana, la retención del antígeno durante el proceso de extracción y manipulación de la muestra y del método de detección utilizado para revelar la proteína de interés en la membrana (Kurien y Scofield, 2015).

Todo experimento de Western Blot debe iniciar a partir de una preparación de extractos proteicos de alta calidad y concentración. En el caso de las plantas, sus tejidos no generan altas concentraciones proteicas cuando se utilizan protocolos comunes de aislamiento de proteínas, en comparación con los tejidos animales (Carpentier et al., 2005). Esto se debe a la presencia de estructuras celulares complejas como la pared celular y el alto contenido de compuestos y metabolitos secundarios, entre ellos terpenos, fenoles y pigmentos, los cuales tornan el aislamiento y la purificación de extractos proteicos vegetales una tarea difícil (Carpentier et al., 2005; Correa Navarro, Buriticá Salazar, Rivera Giraldo, Penagos González, y Torres Osorio, 2017; López Quimbayo, 2012; Wang, Vignani, Scali, y Cresti, 2006). De ahí la importancia de generar protocolos de extracción optimizados para el aislamiento de proteínas a partir de tejidos vegetales específicos.

El presente trabajo pretende servir como protocolo de referencia para la obtención y cuantificación de proteínas totales a partir tejidos de maíz; además, busca la optimización de la técnica del Western Blot

cuantitativo y su futura implementación en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica.

## II. Fundamentación metodológica

- Material vegetal:

Para la obtención del material vegetal se utilizaron semillas de maíz morado, *Zea mays*, de la variedad Pujagua, las cuales fueron otorgadas por Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM).

- Obtención de extractos proteicos de maíz:

La extracción de proteínas de maíz a partir del material vegetal fresco fue optimizada con base en trabajos publicados para el aislamiento y extracción de proteínas vegetales (Bernard, Ciceri, y Viotti, 1994; Kärkönen et al., 2014; Lara-Núñez et al., 2017; Varagona, Schmidt, y Raikhel, 1991) nothing is known about nuclear targeting in plants. The Opaque-2 (O2).

La determinación de la concentración proteica total se realizó mediante el ensayo Bio-Rad protein assay (5000006 Protein Assay Dye Reagent Concentrate de Bio-Rad), basado en Bradford (1976). Se utilizó el ensayo estándar para microplaca, según el manual del producto (Bulletin #LIT33 Rev C, USA), con el estándar proteico comercial de albúmina de suero bovino (BSA, 5000007 Protein Standard II de Bio-Rad). Los ensayos fotométricos fueron realizados en un lector de placas Multiskan FC (ThermoFisher Scientific) para microplacas de 96 pozos (EP0030730119 Cell Culture Plates sterile de Eppendorf).

- Electroforesis proteica (SDS-PAGE)

El procedimiento utilizado y optimizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica se basa en el protocolo original desarrollado por Towbin *et al.* (1979). Las modificaciones realizadas durante el proceso de optimización serán descritas en la sección de resultados.

La electroforesis se realizó con el sistema de electroforesis

de proteínas Mini-PROTEAN de Bio-Rad (1653303 Mini-PROTEAN Casting Stand, 1653146 Sample Loading Guide, 1653308 Mini-PROTEAN Short Plates), utilizando geles de poliacrilamida de 0.75 mm (1653354 Mini-Protean 10 well comb. spacer y 1653310 Mini-PROTEAN Spacer Plates with 0.75 mm Integrated Spacers de Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se empleó el 1610375 Kaleidoscope Standards 5 colores de Bio-Rad. Como fuente de poder para la corrida electroforética se aplicó el OmniPAC Midi CS-300V (Clever Scientific). La tinción y generación de los perfiles proteicos en geles de poliacrilamida se realizó mediante Coomassie azul (1610786 Bio-Safe Coomassie Stain de Bio-Rad).

- Blot proteico

El Blot proteico consistió en una transferencia semi-seca utilizando el sistema SD20 Semi-Dry Maxi (Clever Scientific). Para la manipulación de la membrana se empleó el rodillo 84747 Western Blot Roller de ThermoFisher Scientific y pinzas de metal de borde plano. La tinción de la membrana se realizó mediante el reactivo P3504 Ponceau S de SIGMA.

- Ensayos con anticuerpos

Para la detección de la proteína control  $\alpha$ -tubulina, se utilizó como anticuerpo primario el T9026 Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody (SIGMA) producido en ratón. Como anticuerpo secundario, se utilizó el SAB3701131 Anti-Mouse IgG-Peroxidase (SIGMA) producido en cabra y unido a la peroxidasa de rábano (HRP). La detección de la señal proteica se realizó mediante adición del sustrato T0565 TMB de SIGMA para uso en experimentos de Western Blot.

## III. Resultados de la optimización metodológica

- Resultados de las condiciones optimizadas para obtener el material vegetal:

Para la obtención de las plántulas de maíz, las semillas debieron ser parcialmente esterilizadas utilizando una disolución al 50% de cloro comercial y 0.3% de Tween

20 en agua destilada estéril, por 30 minutos, en agitación constante. Una vez cumplido ese tiempo la disolución fue decantada y las semillas fueron lavadas con etanol al 70%, por un minuto, en el mismo contenedor para remover el cloro. Los mejores resultados se obtuvieron al lavar las semillas un mínimo de 10 veces (o hasta que el olor a cloro hubiera desaparecido del contenedor). A partir de este punto, la manipulación de las semillas de maíz se realizó en condiciones asépticas en una capilla de flujo laminar.

La germinación y crecimiento vegetal a partir de las semillas de maíz se llevó a cabo utilizando frascos de vidrio cilíndricos de fondo redondo estériles, de 9 cm de alto y 8.5 cm de diámetro. Para mantener la humedad dentro de los frascos y otorgarles a las plántulas una matriz estable para su crecimiento, en el fondo del contenedor se utilizó un pliegue de papel poroso, tipo servilleta, previamente esterilizado, el cual se humedeció con al menos 3ml de agua destilada estéril. Los mejores resultados para el crecimiento de las plántulas se obtuvieron al introducir 2 semillas de maíz por frasco sobre el papel humedecido. Finalmente, los frascos se taparon holgadamente con papel aluminio, de manera que se permitiera el intercambio gaseoso. Los frascos fueron llevados a un cuarto de crecimiento con luz artificial constante (24 h), a temperatura ambiente, durante 5 días. Fue muy importante revisar las condiciones de hidratación y contaminación del material vegetal durante el tiempo de crecimiento y, por lo general, cada 2 días fue necesario agregar al menos 1.5 ml de agua destilada estéril.

Estas condiciones de crecimiento optimizadas permitieron un desarrollo homogéneo por parte de las plántulas de maíz, así como una distribución adecuada de su sistema radicular. También facilitó la obtención de cada plántula individual al evitar el entrelazamiento fuerte de las raíces individuales de cada individuo.

- Resultados de la optimización metodológica para la obtención de extractos proteicos de maíz:

Los mejores tejidos para la extracción de proteínas de maíz resultaron ser las raíces de las plántulas de 5 a 6 días de crecimiento (aunque también puede ser utilizada

otra parte de la planta para la extracción proteica, como hojas y tallo). Con un bisturí, se cortaron las raíces a aproximadamente 1 cm del meristemo apical radicular y de inmediato fueron agregadas al buffer de extracción en frío (4°C), cuyos componentes están optimizados en este trabajo y se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Buffer de extracción proteica optimizado para macerar tejidos vegetales y disolver la fracción soluble de proteínas totales de la muestra.**

Buffer de extracción	Reactivo utilizado
50 mM Tris-Cl pH 7.5	T1503 Trizma base de SIGMA
100 mM NaCl	S9625 Cloruro de sodio ≥99% de SIGMA
1.5 mM MgCl <sup>2</sup>	M8266 Magnesium chloride anhydrous, ≥98% de SIGMA
10 mM KCl	P9541 Potassium chloride ≥99.0% de SIGMA
5 mM EDTA	EDS Ethylenediaminetetraacetic acid ≥99% (titration) de SIGMA
1% β-Mercapto etanol	M3148 β-Mercaptoethanol ≥99% de SIGMA
1x Inhibidores de proteasas	PPC1010 Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail de SIGMA
0.1% SDS	L3771 Sodium dodecyl sulfate ≥98.5% de SIGMA
20% Glicerol	15514011 UltraPure Glycerol de ThermoFisher Scientific

Fuente: elaboración propia

Los mejores resultados se obtuvieron al introducir, aproximadamente, 100 mg de tejido radicular en 300 µl de buffer de extracción en un tubo de 1.5 ml que contiene una punta de espátula de arena de cuarzo (274739 Sand de SIGMA) y macera el tejido fresco en frío (4°C), utilizando pistilos estériles (BAE199230001-100EA Bel-Art Disposable) por, al menos, 4 minutos. Luego de homogeneizar el extracto proteico se centrifugó a 15000 rpm (21380 g) en una microcentrifuga temperada a 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante (extracto proteico) fue

retirado para la cuantificación proteica total por medio del ensayo estándar para microplaca (5000006 Protein Assay Dye Reagent Concentrate de Bio-Rad), basado en Bradford (1976). Una vez cuantificado, el extracto proteico fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ese método de extracción aquí reportado arroja concentraciones de entre 2 a 3.5 mg/ml de proteína total soluble.

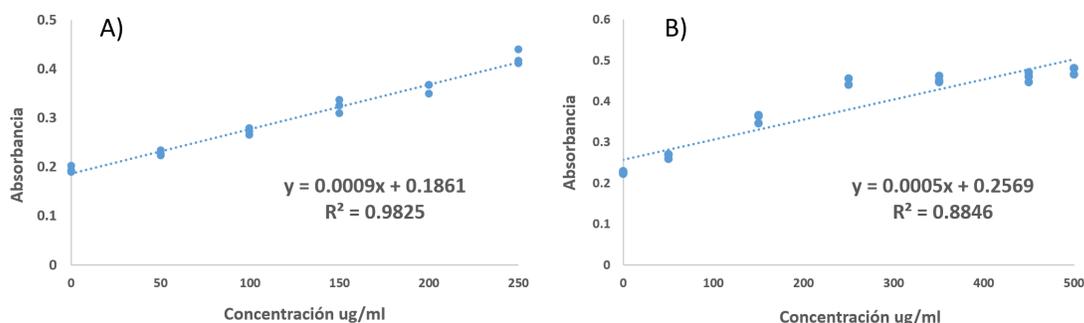
- Resultados de la optimización para cuantificar las proteínas solubles totales:

Durante la cuantificación total de proteínas, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar estándares de albúmina de suero bovino (BSA, 5000007 Protein Standard II de Bio-Rad) con concentraciones de 50,

100, 150, 200 y 250 ug/ml. Es altamente recomendable preparar estos estándares por medio del método de dilución a partir del estándar comercial de BSA. Para dicho fin, se diseñó una plantilla de cálculo para la adición de volúmenes (ver Anexo 1), lo que permitió una reducción en el error de pipeteo y un mejor comportamiento lineal de la absorbancia en el ensayo espectrofotométrico.

El método de cuantificación basado en Bradford (1976) y utilizando el ensayo estándar para microplaca (ver metodología) mediante el método y el buffer de extracción aquí desarrollado (ver Tabla 1), resultó no ser lineal a concentraciones superiores a 250 ug/ml como lo muestra la Figura 1.

**Figura 1. Ensayo espectrofotométrico de los estándares preparados de BSA mediante el ensayo estándar para microplaca utilizando el reactivo 5000006 Protein Assay Dye Reagent Concentrate de Bio-Rad, basado en Bradford (1976). Como se aprecia en A), el ensayo es lineal hasta los 250 ug/ml; mientras que en otro ensayo independiente mostrado en B), hay una pérdida importante de la linealidad en concentraciones superiores a 300 ug/ml mediante el método y el buffer de extracción aquí desarrollado (ver Tabla 1). Se realizaron 3 réplicas por estándar. Fuente: Creación Propia**



Esta pérdida de linealidad en el ensayo espectrofotométrico en extractos proteicos con concentraciones superiores a los 250 ug/ml pudieron ser provocadas por la concentración de SDS en el buffer de extracción, ya que este ensayo es susceptible a desviaciones provocadas por detergentes según el manual del producto (5000006 Protein Assay Dye Reagent Concentrate de Bio-Rad, Bulletin #LIT33 Rev

C, USA). Por lo anterior, se determinó que los extractos proteicos obtenidos mediante el método aquí reportado para la extracción de proteínas vegetales a partir de material fresco, debieron ser diluidos 20 veces previo a su cuantificación. La mínima cantidad de extracto proteico utilizado para preparar la dilución nunca fue menos de 5  $\mu\text{l}$ .

- Resultados de la optimización de la metodología del Western Blot cuantitativo para proteínas de maíz:
- SDS-PAGE

Según la cantidad de proteína requerida para cargar el gel, los extractos proteicos debieron ser solubilizados en buffer de carga, para alcanzar una concentración final de 25 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 5% glicerol; 0.005% azul de bromofenol y 25 mM de DTT. Los mejores resultados se alcanzaron mediante la adición de un buffer de carga concentrado (4x) previamente preparado y almacenado

a -20°C (ver Tabla 2), con todos los componentes antes descritos excepto el DTT, el cual debe ser agregado fresco, justo en el momento de solubilizar los extractos proteicos en el buffer de carga.

Una vez solubilizada la cantidad necesaria de extracto proteico en el buffer de carga, cada muestra debió ser incubada por 10 minutos a 98°C y, después, centrifugada brevemente por 1 minuto. Posterior al periodo de incubación, fue muy importante dejar temperar las muestras a 4°C antes de su manipulación, para así evitar pérdidas de volumen por evaporación.

**Tabla 2. Buffer de carga concentrado (4x) y optimizado para su uso en electroforesis de poliacrilamida. El DTT debe ser agregado fresco, justo en el momento de solubilizar los extractos proteicos.**

Buffer de carga	Reactivo utilizado
100 mM Tris-HCl pH 6.8	T1503 Trizma base de SIGMA
16% SDS	L3771 Sodium dodecyl sulfate ≥98,5% de SIGMA
20% Glicerol	15514011 UltraPure Glycerol de ThermoFisher Scientific
0.02% Azul de bromofenol	B8026 Bromophenol Blue Sodium salt de SIGMA
100mM DTT	D9163 DL-Dithiothreitol (DTT) ≥99% de SIGMA

Fuente: elaboración Propia

Para una mejor preparación de los extractos proteicos en el buffer de carga, se diseñó una plantilla de cálculo adjunta en el Anexo 2, la cual facilitó enormemente el cálculo de los volúmenes necesarios para mantener las concentraciones anteriormente descritas y cargar cuantitativamente las muestras proteicas en el gel.

Una mejor separación de la fracción proteica total se alcanzó al utilizar un sistema discontinuo de electroforesis de poliacrilamida; con el gel concentrador (gel superior) al 5% y el gel separador (gel inferior) al 12%. Es altamente recomendable preparar ambos geles a partir

de disoluciones madre de buffer Tris-HCl (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS para el gel superior y 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS para los geles inferiores). La preparación optimizada para el gel superior e inferior (utilizando estas disoluciones madre de buffer Tris-HCl) se realizó según la Tabla 3 para el sistema Mini-PROTEAN de Bio-Rad para geles de 0.75 mm.

**Tabla 3. Preparación del gel concentrador (superior) al 5% y el gel separador (inferior) al 12% para realizar la electroforesis discontinua de poliacrilamida utilizando el sistema Mini-PROTEAN de Bio-Rad para geles de 0.75mm. Para iniciar la polimerización del gel superior e inferior se requirieron, al menos, 6 µl de TEMED (T9281 Tetramethylethylenediamine de SIGMA) y 40 µl de APS al 10% (A3678 Ammonium persulfate ≥98% de SIGMA). Las cantidades mostradas son suficientes para 2 sistemas discontinuos de geles. Los reactivos utilizados para los buffers son los siguientes: T1503 Trizma base y L3771 Sodium dodecyl sulfate ≥98,5% de SIGMA; y HC2040 SureCast Acrylamide Solution (40%) de ThermoFisher Scientific.**

Componente	Para 4 ml de gel concentrador al 5%	Para 10ml de gel separador al 12%
Buffer Tris-HCl superior concentrado (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS)	1 ml	0 ml
Buffer Tris-HCl inferior concentrado (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS)	0 ml	2.5 ml
Disolución al 40% de acrilamida-bis	0.5 ml	3 ml
Agua destilada	2.5 ml	4.5 ml

Fuente: elaboración Propia

Utilizando el sistema Mini-PROTEAN de Bio-Rad, una correcta separación electroforética de las proteínas se logró al emplear el buffer de corrida adecuado con una concentración de 0.025M Tris (T1503 de SIGMA), 0.18M Glicina (G8898 de SIGMA) y 0.1% SDS (L3771 de SIGMA); y manteniendo el voltaje a 40 V hasta que la coloración del azul de bromofenol alcanzó el gel separador (por aproximadamente 30 min), para luego incrementar el voltaje a 80 V por aproximadamente 50 min. Los voltajes se debieron duplicar cuando se corrían 2 geles simultáneamente en este sistema.

- Transferencia proteica (Blot):

La transferencia proteica utilizando el sistema semi-seco SD20 Semi-Dry Maxi (Clever Scientific) resultó satisfactoria con una corriente de 600 mA por 1 hora; lo que generaba un voltaje de 8-11V. Corrientes de 700 mA, o más, generaban un aumento significativo en la producción de calor durante la transferencia. El sistema se

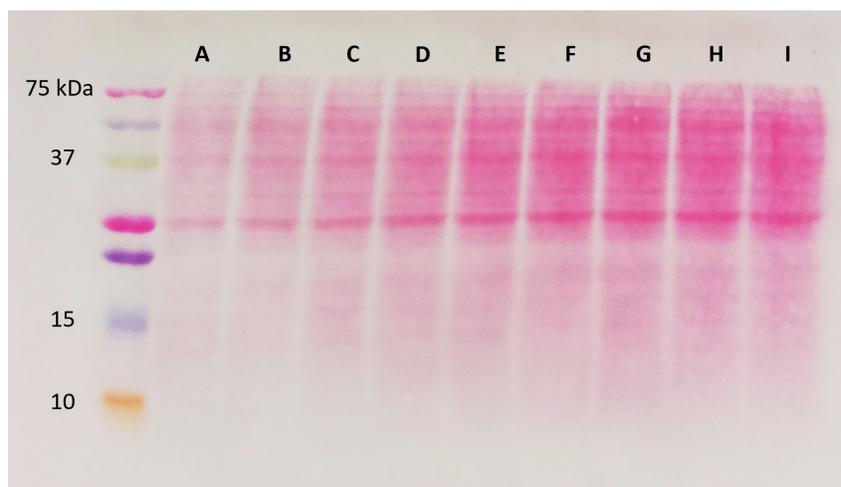
humedeció utilizando buffer de transferencia conteniendo 25 mM Tris, 0.2 M Glicina, 20% Metanol (Towbin et al., 1979) y, en el cual, el gel debió sugerirse por 10 min en agitación constante. El Blot proteico se logró exitosamente utilizando 3 pliegues de papel filtro (1620118 Thin Blot Paper de Bio-Rad) en cada extremo del sándwich de transferencia; de 9x6 y 9x12.5 cm para transferir 1 gel y 2 geles, respectivamente. La membrana de nitrocelulosa incluyó al menos, un área de 9.5x6.5 cm por gel. La membrana utilizada fue GE10600004 Amersham Protran de GE Healthcare Life Science, con un tamaño de poro de 0.2 µm, lo cual permite retener proteínas menores de 20kDa, disminuyendo así las pérdidas de proteínas pequeñas durante la transferencia (Kurien y Scofield, 2015).

El perfil proteico resultante luego de la transferencia fue obtenido mediante una tinción reversible de la membrana, utilizando el reactivo Ponceau S (P3504 de SIGMA) al 0.1% y ácido acético glacial al 2.5% (A6283

de SIGMA). Esta tinción se completó satisfactoriamente después de 15 min en agitación constante (ver Figura 2). Para su uso posterior, la membrana fue desteñida con al

menos 3 lavados subsecuentes con agua destilada, por, aproximadamente, 30 segundos en agitación constante.

**Figura 2. Tinción Ponceau S al 0.1% de la membrana de nitrocelulosa (GE10600004 de GE Healthcare Life Science) luego de la transferencia proteica, utilizando el sistema semilíquido SD20 Semi-Dry Maxi (Clever Scientific). El marcador de peso molecular se muestra a la derecha en el primer carril (1610375 de Bio-Rad). A-I contiene las proteínas solubles totales a partir de extractos proteicos de maíz, A) 15 µg; B) 20 µg; C) 25 µg, D) 30 µg, E) 35 µg, F) 40 µg, G) 45 µg, H) 50 µg, I) 55 µg. Fuente: Elaboración Propia**



El bloqueo de la membrana se realizó mediante el buffer TBS (buffer de disolución salina con Tris; 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), conteniendo, además, 0.1% de Tween 20 (P9416 de SIGMA) y 5% de leche en polvo sin grasa (1706404 Blotting-Grade Blocker de Bio-Rad). Un bloqueo exitoso de la membrana se logró durante 1 hora a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C; ambos en agitación constante. Una vez bloqueada la membrana, se realizó un lavado con buffer TBS conteniendo 0.1% de Tween 20, por 10 min.

- Resultados del tratamiento con anticuerpos:

Para la detección de la proteína control  $\alpha$ -tubulina, el anticuerpo primario (T9026 de SIGMA) fue diluido 1:1000 en buffer de disolución salina (TBS), conteniendo 2.5% de leche en polvo sin grasa. Los mejores resultados se obtuvieron al dejar la membrana en este buffer con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en

agitación constante. Una vez finalizado este proceso, la membrana debió ser lavada 3 veces con buffer TBS conteniendo 0.1% de Tween 20, por 10 min.

La inmunodetección utilizando la peroxidasa de rábano (HRP) se logró mediante un tratamiento con el anticuerpo secundario (SAB3701131 de SIGMA) diluido 1:1000 en buffer de disolución salina (TBS) conteniendo 2.5% de leche en polvo sin grasa. Los mejores resultados se obtuvieron al dejar la membrana en este buffer con el anticuerpo secundario durante 1 hora, a temperatura ambiente, y en agitación constante. Una vez finalizado este proceso, la membrana debió ser lavada 3 veces con buffer TBS conteniendo 0.1% de Tween 20, por 10 min. Previo al ensayo colorimétrico, la membrana debió ser secada cuidadosamente utilizando papel toalla sobre su superficie.

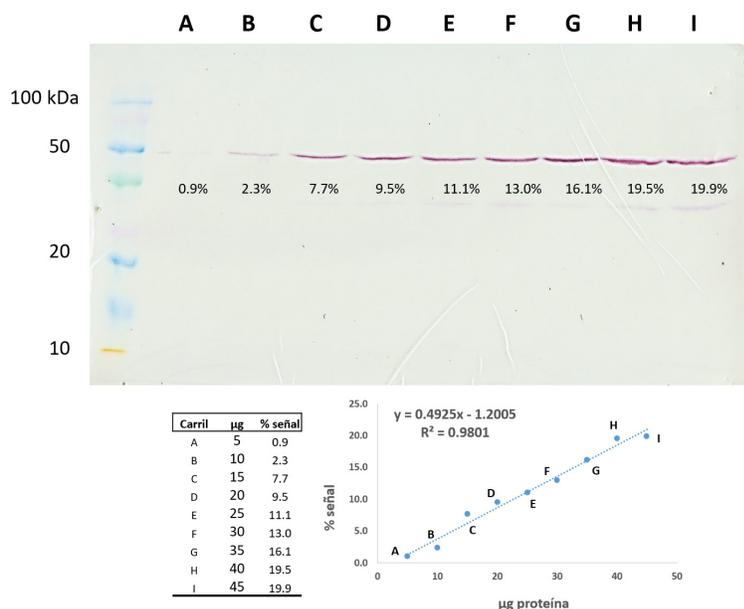
La señal colorimétrica fue alcanzada utilizando, al menos, 1,5 ml del sustrato TMB (To565 de SIGMA) para cada membrana y dejando reposar la reacción durante al menos 1 min. Es recomendable que durante este proceso, la membrana se envuelva en plástico adhesivo para facilitar su manipulación.

Como se muestra en la Figura 3, la detección de la proteína control  $\alpha$ -tubulina fue exitosa en los extractos proteicos de maíz obtenidos mediante esta metodología. La señal pudo ser cuantificada mediante el software ImageJ versión 1.53e.

Todo experimento que involucre la técnica del Western Blot cuantitativo necesita realizar un proceso de normalización de la señal colorimétrica obtenida. Esto utilizando proteínas control cuya señal (o abundancia) debe ser proporcional a la cantidad proteica cargada en el

gel, lo cual es verificado mediante el rango dinámico lineal de la proteína control que relaciona la señal obtenida en el ensayo inmunológico con la carga proteica realizada en la electroforesis (Taylor, Berkelman, Yadav, y Hammond, 2013). Esta normalización permite validar el carácter semicuantitativo de un experimento de Western Blot, cuando se pretende comprar la abundancia relativa de una proteína de interés en distintas muestras o extractos proteicos. Como se puede observar en la Figura 3, el Western Blot es semicuantitativo al utilizar la  $\alpha$ -tubulina para cargas proteicas de 5 a 45 $\mu$ g bajo estas condiciones experimentales. A pesar de que varios autores han propuesto el uso de nuevos controles, la  $\alpha$ -tubulina es una proteína control que se expresa de forma constitutiva y ha sido ampliamente utilizada en estudios tanto de expresión genética como proteica (Huis, Hawkins, y Neutelings, 2010; Moritz, 2017; Mróz, Havey, y Bartoszewski, 2015; Taylor et al., 2013)The Author(s).

**Figura 3. Western Blot cuantitativo de la proteína control  $\alpha$ -tubulina en extractos proteicos solubles de maíz: A) 5  $\mu$ g; B) 10  $\mu$ g; C) 15  $\mu$ g, D) 20  $\mu$ g, E) 25  $\mu$ g, F) 30  $\mu$ g, G) 35  $\mu$ g, H) 40  $\mu$ g, I) 45  $\mu$ g; cada una junto con la intensidad porcentual de la señal obtenida. El análisis densimétrico fue realizado mediante el software ImageJ versión 1.53e y se muestra en la parte inferior. Como anticuerpo primario se utilizó T9o26 de SIGMA (1:1000) y como anticuerpo secundario SAB3701131 de SIGMA (1:1000), conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP). El marcador de peso molecular implementado fue 1610375 de Bio-Rad. Fuente: Elaboración Propia.**



## VI. Conclusiones

El presente trabajo permitió el desarrollo de un protocolo para la obtención y cuantificación de extractos proteicos solubles a partir de tejidos vegetales frescos de maíz. Además, por primera vez en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica, se logró la optimización e implementación del método del Western Blot cuantitativo utilizando el sistema Mini-PROTEAN de Bio-Rad, a partir de extractos proteicos de maíz y utilizando anticuerpos específicos contra la proteína control  $\alpha$ -tubulina que es ampliamente utilizada en estudios con proteínas.

## V. Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo fundamental de la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno y principalmente al colega PhD. Pablo Bolaños Villegas. Además, se agradece el soporte financiero provisto por el Fondo Especial de Estímulo a la Investigación de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, así como el constante apoyo y colaboración de la oficina de Coordinación de Investigación de la Sede de Occidente. Finalmente, se les agradece muy especialmente a los asistentes de investigación que formaron parte de este proyecto, en su gran mayoría de la carrera de Bach. y Lic. en Laboratorista Químico de la Universidad de Costa Rica, que demostraron poseer una gran preparación y manejo profesional de las tareas de investigación asignadas.

## VI. Bibliografía

- Bernard, L., Ciceri, P., y Viotti, A. (1994). Molecular analysis of wild-type and mutant alleles at the Opaque-2 regulatory locus of maize reveals different mutations and types of O<sub>2</sub> products. *Plant Molecular Biology*, 24(6), 949–959. <https://doi.org/10.1007/BF00014448>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., y Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10), 2497–2507. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401222>
- Correa Navarro, Y. M., Buriticá Salazar, L. M., Rivera Giraldo, J. D., Penagos González, J. P., y Torres Osorio, J. I. (2017). Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 65–68. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2756>
- Ford, P., y Southern, E. (1973). Different Sequences for 5S RNA in Kidney Cells and Ovaries of *Xenopus laevis*. *Nature New Biology*, 241(105), 7–12. <https://doi.org/10.1038/newbio241007a0>
- Huis, R., Hawkins, S., y Neutelings, G. (2010). Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biology*, 10(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-71>

- Kärkönen, A., Meisrimler, C.-N., Takahashi, J., Väisänen, E., Laitinen, T., Jiménez Barboza, L. A., ... Lüthje, S. (2014). Isolation of cellular membranes from lignin-producing tissues of Norway spruce and analysis of redox enzymes. *Physiologia Plantarum*, 152(4), 599–616. <https://doi.org/10.1111/ppl.12209>
- Kurien, B. T., y Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Kurien, B. T., y Scofield, R. H. (2015). *Western Blotting*. (B. T. Kurien y R. H. Scofield, Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1312). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7>
- Lara-Núñez, A., García-Ayala, B. B., Garza-Aguilar, S. M., Flores-Sánchez, J., Sánchez-Camargo, V. A., Bravo-Alberto, C. E., ... Vázquez-Ramos, J. M. (2017). Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.018>
- López Quimbayo, L. D. (2012). *Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de Pentacalia nítida y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico acuoso*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11802/LopezQuimbayoLinaDaniela2012.pdf?sequence=1>
- Mahmood, T., y Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Moritz, C. P. (2017). Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics*, 17(20), 1600189. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600189>
- Mróz, T. L., Havey, M. J., y Bartoszewski, G. (2015). Cucumber Possesses a Single Terminal Alternative Oxidase Gene That is Upregulated by Cold Stress and in the Mosaic (MSC) Mitochondrial Mutants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(6), 1893–1906. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0883-9>
- Shan, G. (Ed.). (2011). *Immunoassays in Agricultural Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470909935>
- Taylor, S. C., Berkelman, T., Yadav, G., & Hammond, M. (2013). A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Molecular Biotechnology*, 55(3), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9672-6>
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Varagona, M. J., Schmidt, R. J., y Raikhel, N. V. (1991). Monocot regulatory protein opaque-2 is localized in the nucleus of maize endosperm and transformed tobacco plants. *The Plant Cell*, 3(2), 105–113.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., y Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782–2786. <https://doi.org/10.1002/elps.200500722>

## Anexos

ANEXO 1: Hoja de cálculo para la preparación de estándares proteicos a partir de un estándar comercial por el método de dilución. En este ejemplo, se utiliza el estándar proteico de albúmina de suero bovino (BSA) que tiene una concentración certificada de 1340 µg/ml para preparar 5 estándares (A-E) con un volumen final de 80µl. Cn = Concentración. Las celdas en verde son las modificables por el usuario. Para calcular diferentes volúmenes, cambiar volumen “A preparar” desde el de menor concentración hacia el de mayor concentración. Al preparar los estándares, iniciar con el de mayor concentración al de menor concentración.

BSA (estándar comercial): 1340 µg/ml

Comercial	Estándar A	Estándar B	Estándar C	estándar D	Estándar E
Cn (µg/ml):	Cn (µg/ml):	Cn (µg/ml):	Cn (µg/ml):	Cn (µg/ml):	Cn (µg/ml):
1340	250	200	150	100	50
Estándar	A preparar (µl):				
	240.0	200.0	160.0	120.0	80.0
Comercial	Restante disponible (µl):				
	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
	tomar de comercial (µl)	tomar de A (µl):	tomar de la B (µl):	tomar de la C (µl):	tomar de la D (µl):
	44.8	160.0	120.0	80.0	40.0
	tampón o agua (µl)				
	195.2	40.0	40.0	40.0	40.0

ANEXO 2: Hoja de cálculo para determinar los volúmenes necesarios para cargar cuantitativamente muestras proteicas en el gel y su posterior uso en Western Blot. Las celdas en verde son las modificables por el usuario. La Hoja1 contiene la hoja de cálculo para la carga de proteínas de distintas muestras; la Hoja2 posee una breve descripción relacionada a cada variable calculada en la Hoja1; la Hoja3 contiene la hoja de cálculo para la carga de proteínas de una sola muestra con el fin de determinar el rango dinámico de detección del Western Blot.

Descripción de Wblot	FECHA											Max. µl por pozo:**	25µl
												**Según sistema MiniPROTEAN (BioRad)	
								0.1					
	Prot. totales según ensayo	Carga proteica Gel 1	Extra	Requerido	Muestra	Agua	Molar DTT para 25mM	LB 4x (Buffer de carga)	Volumen Final	Nueva Prot. Conc.	Agregar al Gel 1		
Muestras	µg/µl	µg / well	µg	µg	µl	µl	µl	µl	µl	µg/µl	µl / well		
Muestra 1	2.542	10	4	14	5.51	11.99	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 1	2.542	10	4	14	5.51	11.99	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 1	2.542	10	4	14	5.51	11.99	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 2	2.876	10	4	14	4.87	12.63	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 2	2.876	10	4	14	4.87	12.63	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 2	2.876	10	4	14	4.87	12.63	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 3	2.579	10	4	14	5.43	12.07	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 3	2.579	10	4	14	5.43	12.07	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Muestra 3	2.579	10	4	14	5.43	12.07	8.75	8.75	35.00	0.40	25.00		
Preparación del reactivo DTT					total requerido (µl)			78.75					
DTT Masa Molar:					154.25								
DTT Molar requerido:		mg/ml											
0.1		15.425											
Peso DTT		Agregar agua											
mg		µl											
7		453.81											

