



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Manual de procedimientos para la elaboración de un Western Blot

XXVII Verano de la Ciencia

Proyecto

Efecto de la curcumina sobre la expresión de KIM-1 y los cambios morfológicos en riñón de ratones alimentados con dietas altas en grasas y/o fructosa

Andrés Eduardo Alfaro Díaz, María Elena Pérez Piña, Ramsés Maximiliano Ramírez Martínez, Cosette Durán Castillo, Cecilia Gabriela Meléndez Salcido, Rosalba García Ramírez, Victoriano Pérez Vázquez

Proyecto: Efecto de la curcumina sobre la expresión de KIM-1 y los cambios morfológicos en riñón de ratones alimentados con dietas altas en grasas y/o fructosa

Objetivo

Evaluar el efecto de la curcumina sobre la expresión de KIM-1 y los cambios morfológicos en riñón de ratones alimentados con dietas altas en grasas y/o fructosa.

Hipótesis

La curcumina tiene un efecto protector que retrasa el daño renal causado por dietas altas en grasas y/o fructosa.

Justificación

Las dietas altas en grasas y/o fructosa se encuentran asociadas con desordenes metabólicos, tales como dislipidemia, obesidad y diabetes. Estos desordenes metabólicos favorecen la acumulación ectópica de lípidos en el riñón, ocasionando inflamación, lipotoxicidad y estrés oxidativo, lo que a su vez deriva en daño renal. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, alrededor de 537 millones de personas viven con diabetes, por lo que la búsqueda de tratamientos que aminoren o inclusive eliminen las complicaciones causadas por esta enfermedad es de particular interés. Se ha reportado que la curcumina posee una potente actividad antioxidante lo cual puede jugar un rol importante en el tratamiento y/o prevención del daño renal.

Procedimientos para el análisis de los cambios de expresión de proteínas por la técnica de Western Blot

Extracción fenólica de proteínas

Fundamento

El primer paso en el análisis de proteínas es la extracción. Cuando se trata de proteínas provenientes de tejidos es necesario desintegrar la muestra primero, posteriormente realizar la extracción de las proteínas y finalmente precipitarlas.

En 1986, Hurkman y Tanaka desarrollaron la extracción fenólica seguida por precipitación con acetato de amonio en metanol, como una técnica destinada a estudios de proteómica. Aunque sus primeros usos estaban destinados a la purificación de carbohidratos, y posteriormente de ácidos nucleicos, la extracción fenólica es ampliamente utilizada hoy en día para la extracción de proteínas pues representa una forma eficaz de remover componentes no proteicos, polisacáridos, lípidos, compuestos fenólicos y ácidos nucleicos, estos últimos suelen representar un problema al interactuar con las proteínas pues generan una baja resolución en los estudios por electroforesis bidimensional.

El fenol es el alcohol aromático más simple, posee un grupo -OH unido a un anillo aromático. Interacciona con las proteínas principalmente a través de enlaces de hidrógeno provocando su desnaturalización y les permite ser solubles en la fase orgánica.



Reactivos

Tabla 1. Reactivos para extracción fenólica					
Buffer de extracción					
0.7 M		Sacarosa		59.903 g	
0.5 M		Tris		15.138 g	
0.1 M		KCl		1.864 g	
30 mM		HCl		0.6 mL	
50 mM		EDTA		25 mL	
-		β-mercaptoetanol		5 mL	
-		Agua		c. s. para aforar a 250 mL	
Solución stock EDTA pH 8.0		Sample buffer		Solución acetato de amonio 0.1 M en metanol	
EDTA	4.653	Agua desionizada	9.34 mL	Acetato de amonio (0.1 M)	3.854
NaOH	~0.5 g	Tris-HCl	3.28 mL	Metanol	c. s. para aforar a 500 mL
Agua	25 mL	Glicerol	6.57 mL	-	-
-	-	SDS	5.26 mL	-	-
-	-	Aforar a 25 mL		-	-

Procedimiento

1. Homogeneizar 1 g de tejido en 5 mL de buffer de extracción. Transferir en tubos corex e incubar a 4°C en hielo con agitación constante (vortex) por 10 minutos.
2. Añadir 5 mL de fenol saturado en agua e incubar en hielo 10 minutos.
3. Agitar en vortex y centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos.
4. Recuperar la fase fenólica. Reextraer con mismo volumen de buffer de extracción y centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos.
5. Recuperar fase fenólica y precipitar en 5 volúmenes de acetato de amonio 0.5 M en metanol frío a -20°C y dejar toda la noche en reposo.
6. Centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos.
7. Lavar la pastilla 3 veces con metanol (5 mL) y una vez en acetona al 80% a 10000 rpm por 10 minutos.
8. Secar la pastilla por 3 minutos.
9. Resuspender en 300 mL de sample buffer.
10. Almacenar a -80°C para cuantificar proteína.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Fundamento

El método de Lowry es uno de los más utilizados para determinar la concentración de proteínas, aunque hoy en día ya existen métodos con mayor sensibilidad. Se trata de un método sensible, pues detecta hasta 10 µg/cm³ de proteína, y mantiene esta sensibilidad moderadamente constante entre una proteína y otra.

El kit *DC Protein Assay* de Bio-Rad, es un método colorimétrico análogo al de Lowry. Sin embargo, presenta varias ventajas; por ejemplo, la reacción alcanza un 90% de su desarrollo en tan solo 15 minutos y la coloración permanece estable por 1 hora. Este ensayo se basa en la reacción que presenta una solución de proteínas al ser mezcladas con una solución de



tartrato de cobre (sulfato de cobre en el método descrito por Lowry) y reactivo de Folin (una mezcla de tungstato de sodio, molibdato y fosfato).

La reacción colorimétrica se desarrolla en dos pasos, tal como en el método de Lowry, primero la reacción entre las proteínas y el cobre en medio alcalino y posteriormente ocurre la reducción del reactivo de Folin por los grupos aromáticos de la proteína tratada con el cobre, los cuales fueron oxidados en la primera reacción. Como resultado se generan una o más especies reducidas que comparten la característica de tener un color azul, con una absorbencia máxima a 750 nm y una absorbencia mínima a 405 nm. La intensidad del color azul resultante es dependiente de la cantidad de tirosina y triptófano, y en menor medida de cistina, cisteína e histidina, contenida en la muestra de proteína.

Reactivos

Tabla 2. Reactivos para cuantificación de proteínas	
Reactivo A	Solución alcalina de tartrato de cobre
Reactivo B	Reactivo de Folin diluido
Reactivo S	-
BSA	Albúmina de suero bovino

Procedimiento

- Preparación del reactivo de trabajo
Añadir 20 μL de reactivo S a cada mL de reactivo A necesario para el experimento.
Nota: Si las muestras no contienen detergente no agregar reactivo S y proceder a utilizar solo el reactivo A como reactivo de trabajo.
- Preparar diluciones del patrón de proteína (BSA).
- Preparar 5 μL de estándares y muestras en una placa.
- Añadir 25 μL del reactivo de trabajo a cada pocillo.
- Añadir 200 μL de reactivo B a cada pocillo.
Nota: Agitar la placa 5 segundos suavemente.
- Tras 15 minutos leer absorbancia a 750 nm (650-750 nm).
Nota: La absorbencia es estable 1 hora.

Tabla 3. Diluciones del patrón para la cuantificación de proteínas			
Concentración final [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Volumen del patrón [2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Volumen del patrón [10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Volumen de buffer [μL]
0	-	-	5
4	2 μL	-	3
8	4 μL	-	1
12	-	1.2 μL	3.8
18	-	1.8 μL	3.2

Perfil electroforético de proteínas (SDS-PAGE)

Reactivos

Tabla 4. Reactivos para perfil electroforético de proteínas					
Buffer de corrida 10X		Buffer de corrida 1X		APS 10%	
Tris 250 M	30.3 g	Agua	900 mL	APS	0.025 g
Glicina 1.92 M	144 g	Buffer de corrida 10X	100 mL	Agua destilada	250 µL
SDS 1%	10 g	-	-	-	-
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8		Tris-HCl 1.5 M pH 8.8		Acrilamida 30%	
Tris	6 g	Tris	18.171 g	Acrilamida	-
Agua	60 mL	Agua	60 mL	Bisacrilamida	-
Ajustar pH y aforar a 100 mL		Ajustar pH y aforar a 100 mL		Aforar a 300 mL	

Tabla 5. Geles para perfil electroforético de proteínas			
Gel separador al 10%		Gel concentrador al 4%	
Agua desionizada	6.15 mL	Agua desionizada	6.1 mL
Acrilamida 30%	4.95 mL	Acrilamida	1.3 mL
Tris-HCl pH 8.8	3.75 mL	Tris-HCl pH 6.8	2.5 mL
SDS	150 µL	SDS	100 µL
APS	100 µL	APS	75 µL
TEMED	10 µL	TEMED	12.5 µL

Procedimiento

1. Montar los cristales en donde será colocado el gel.
2. Preparar los geles: separador 10% (dejar polimerizar) y concentrador 4% (esperar a que polimerice).
3. Montar cámara de electroforesis: Colocar geles y agregar buffer de corrida.
4. Cargar muestras y marcador de peso molecular.
5. Cerrar cámara y comenzar la corrida a 80 V por 13-15 minutos, las muestras deben haber avanzado hasta el límite del gel concentrador. Transcurrido el tiempo cambiar a 120 V y dejar correr 1 hora 30 minutos.
6. Teñir geles con azul de Coomassie por 2 horas. Desteñir con solución desteñidora toda la noche.

Western Blot

Reactivos

Tabla 6. Reactivos para Western Blot							
Buffer de transferencia (4 L)		TBS 10X		TBS-Tween 1X		Solución de bloqueo	
Tris	23.28 g	Tris	30.2 g	TBS 10X	100 mL	TBS-Tween	20 mL
Glicina	11.72 g	NaCl	89.9 g	Agua	900 mL	Leche descremada en polvo	500 mg
Metanol	200 mL	Ajustar a pH 7.6		Tween 20	1 mL	-	-

Procedimiento

Preparación del “sándwich”

Iniciando con los geles con las proteínas separadas (perfil electroforético), sin teñir:

1. Colocar el casete con el lado gris hacia abajo sobre una superficie limpia.
2. Colocar una almohadilla de fibra previamente humedecida en buffer de transferencia en el lado gris del casete.
3. Colocar tres hojas de papel filtro, previamente humedecidas, sobre la almohadilla de fibra.
4. Colocar el gel de la electroforesis, en el papel filtro teniendo cuidado de eliminar las burbujas de aire.
5. Colocar la membrana de nitrocelulosa pre humedecida sobre el gel.
6. Colocar dos hojas de papel filtro, previamente humedecidas, sobre la membrana de nitrocelulosa.
7. Colocar una almohadilla de fibra previamente humedecida sobre el papel filtro.
8. Cerrar y bloquear el casete.

Transferencia

1. Colocar el casete cerrado y bloqueado en el módulo de electrodos.
2. Agregar la unidad de enfriamiento Bio-Ice congelada y colocarla en el tanque.
3. Llenar el tanque con buffer de transferencia.
4. Transferir proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa, para ello establecer un voltaje de 120 V por una hora.

Bloqueo de membrana

1. Retirar la membrana del sándwich y sumergir en 25 mL de solución de bloqueo durante 1 hora.

Incubación con anticuerpos

1. Desechar la solución de bloqueo.
2. Vertir 10 mL de anticuerpo primario (1:1000) en la membrana y agitar suavemente durante toda la noche a 4°C.
3. Enjuagar la membrana en 25 mL de tampón de lavado por 5 minutos 3 veces y desechar el tampón de lavado.
4. Verter 10 mL de anticuerpo secundario (1:20000) en la membrana y agitar suavemente durante 1 hora.
5. Enjuagar la membrana en 25 mL de tampón de lavado por 5 minutos 3 veces y desechar el tampón de lavado.

Revelado de membrana

1. Revelar la proteína en la membrana por quimioluminiscencia: Agregar 200 μ L de peróxido de hidrógeno y 200 μ L de luminol cubriendo toda la membrana.
2. Esperar 2 minutos y retirar el exceso de reactivo.
3. Exponer 120 segundos a luz UV en el fotodocumentador (Bio-Rad, CA, USA).
4. Cuantificar densidad óptica de cada banda en el software Image Lab (Bio-Rad, México).

Referencias

- DC Protein Assay, Bio-Rad, Ciudad de México. México. <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>
- Faurobert, M., Pelpoir, E., y Chaïb, J. (2007). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. En Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C. y Méchin, V. (Eds.) *Plant Proteomics* (Vol. 335, pp. 9-14). Humana Press.
- Hurkman, W. J., y Tanaka, C. K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiology*, 81(3), 802-806. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Novák, P., & Havlíček, V. (2016). Protein extraction and precipitation. En *Proteomic profiling and analytical chemistry* (pp. 51-62). Elsevier.
- Walker, J. (2010). Protein structure, purification, characterisation, and function analysis. En Wilson, K., & Walker, J. (Eds.). En *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge university press.