

EFECTO DE LAS DIMENSIONES DEL GEL DE ELECTROFORESIS EN LA SEPARACIÓN Y PUREZA DE PROTEÍNAS

Autor: Deidad Brooms Vandama

1. INTRODUCCION (OBJETIVOS)

La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida es una técnica ampliamente empleada para evaluar la pureza de proteínas.

Para esta técnica existen dos formatos de cámara verticales de la marca Bio-Rad los cuales se diferencian en las dimensiones del gel en cuanto a ancho y largo del mismo. Los geles de mayor amplitud, del formato PROTEAN II xi cell de dimensiones 16 x 16 cm (A x L), tienen como ventaja una mayor distancia entre las bandas, beneficioso para estudio y tratamiento de mezclas complejas y cuando se pretende aislar una proteína, sin embargo, tiene un elevado consumo de soluciones y tiempo de corrida. Por otro lado las cámaras mini-PROTEAN Tetra cell, de dimensiones 10 x 8 cm, mantienen la capacidad y eficiencia en la separación proteica con un menor consumo y en un menor tiempo.

Los estudios en donde se compare el efecto del tamaño del gel entre ambos formatos de cámara son escasos. Por tanto, respondiendo a la necesidad de minimizar tiempo de ensayo y costos involucrados en el mismo, factores claves en Control de la Calidad, este trabajo se pretende evaluar si la cámara de menor formato mini-PROTEAN Tetra cell puede sustituir al modelo PROTEAN II sin pérdida de calidad analítica.

- Objetivos:**
- Comparar los resultados de 7 lotes de Interferón Gamma Humano Recombinante en cuanto a resolución de las bandas obtenidas y valor de Pureza.
 - Comparar parámetro de validación como precisión, linealidad y límite de detección.

2. METODOLOGIA

Materiales:



- PROTEAN II xi Cell
- Dimensiones del gel: 16 x 16 cm (A x L)



- Mini-PROTEAN Tetra cell
- Dimensiones del gel: 10 x 8 cm (A x L)



- Densitómetro: GS-800, Bio-Rad



- Software: Quantity One

Métodos:

- Comparación estadística de la Pureza de 7 lotes de IFN γ
- Gel Separador 15%, Gel Concentrador 4%
- Aplicar:
 - ✓ 10 μ g de muestra y MR en cámara mini-PROTEAN Tetra cell
 - ✓ 20 μ g de muestra y MR en cámara PROTEAN II xi cell
 - ✓ Punto de sensibilidad (2%)
 - ✓ PPM
- Tinción con Coomassie
 - Linealidad:
 - Rango: 20, 50, 100, 150, 180 μ g
 - Cámara grande: 4, 10, 20, 30, 36 μ g
 - Cámara chica: 2, 5, 10, 15, 18 μ g
 - Precisión:
 - 6 réplicas de un lote
 - CV entre replicas $\leq$ 1 % en cada gel
 - CV entre ambos geles $\leq$ 3 %
 - Límite de Detección:
 - 2; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 μ g

Comparación de resultados en ambos formatos:

Pureza %				Estadística
Lote	16 x 16 cm	10 x 8 cm	10 x 8 cm	F crítico
Lote 1	99,63	99,34	100	3,5546
Lote 2	99,78	99,84	100	F
Lote 3	99,89	99,62	100	1,715
Lote 4	99,46	99,34	100	p
Lote 5	99,97	99,32	99,59	0,2081
Lote 6	99,95	99,51	99,18	CV total
Lote 7	99,74	99,79	99,41	0,3
Media	99,77	99,54	99,74	
DesvEst	0,1841	0,2191	0,3453	
CV	0,2	0,2	0,3	

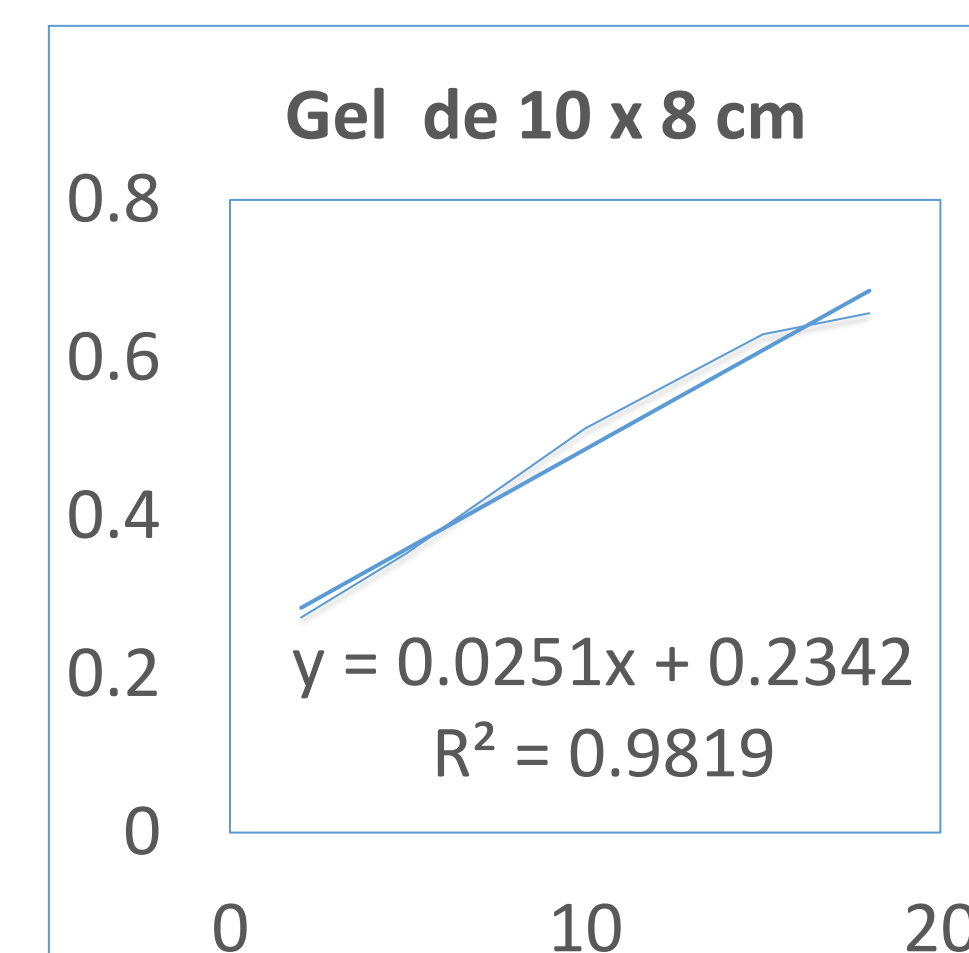
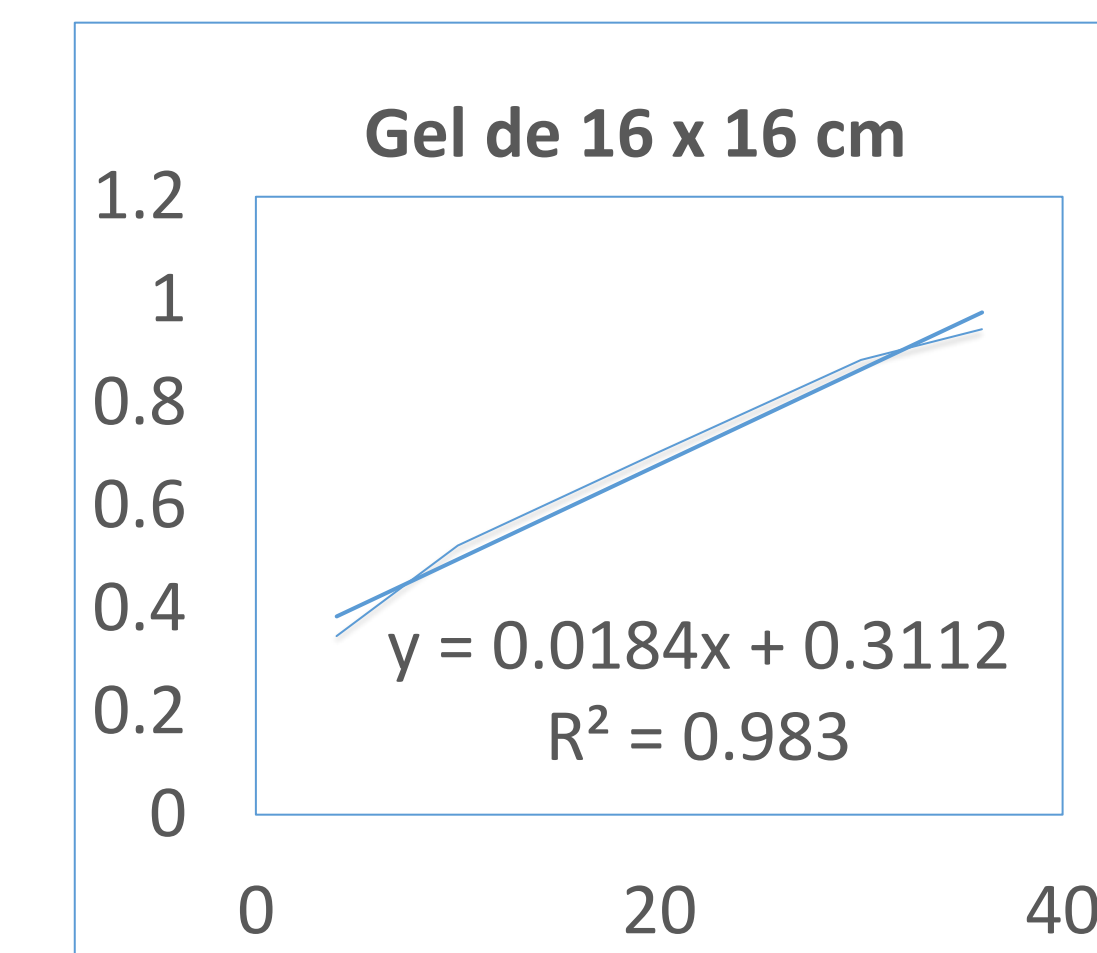
- Se obtienen bandas con resolución comparable entre ambos formato.
- CV < 1% entre los resultados obtenidos.
- F < F crítico, p > 0,05, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

Comparación de Precisión:

Dimensiones	P. 16 x16 cm	P. 10 x 8 cm	Estadística
Réplica 1	99,89	99,81	F crítico
Réplica 2	99,98	99,84	4,9646
Réplica 3	99,94	99,82	F
Réplica 4	99,96	99,82	3,8896
Réplica 5	99,84	99,88	p
Réplica 6	99,84	99,92	0,0769
Media	99,91	99,85	
DesvEst	0,0608	0,0431	CV total
CV	0,06	0,04	0,06

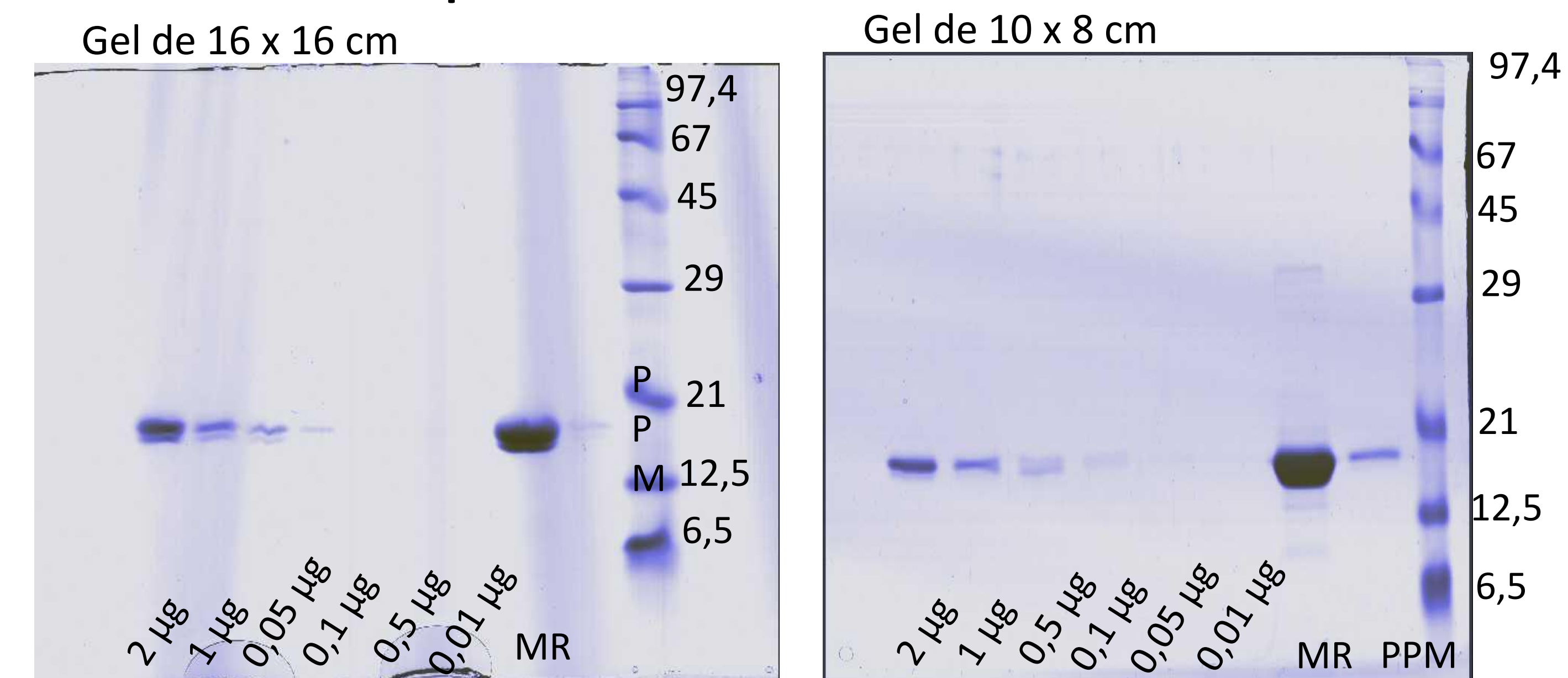
- CV < 1 % entre réplicas.
- CV < 1 % entre geles.
- F < F crítico, p > 0,05, no existen diferencias significativas entre los formatos de gel.
- El Método, en ambos formatos, mantiene correcta Precisión de los resultados

Comparación de Linealidad:



- Ambos R² muestran comportamiento lineal alrededor de la cantidad nominal
- Ambos valores son similares entre sí lo que las dimensiones del gel no influyen en el comportamiento lineal del método.

Comparación del: Límite de Detección:



- El Límite de Detección en ambos formatos fue de 0,1 μ g
- Se demuestra que las dimensiones del gel no afectan la sensibilidad del método.

4. CONCLUSIONES

- El tamaño del gel no influye en la resolución y definición de las bandas obtenidas, tanto para las bandas principales como para las minoritarias, correspondientes a agregaciones y degradaciones.
- En el análisis de los valores de Pureza obtenidos en ambos formatos, no se obtienen diferencias significativas entre los resultados.
- Los formatos de geles evaluados, no influyen en los parámetros de validación evaluados como precisión, linealidad y límite de detección.

Aportes

Con el empleo del formato mini-PROTEAN Tetra cell se ganan ventajas tales como:

- Reducción de volumen de mezcla para preparación del gel en un 66 %:
Gel grande (16 x 16 cm) = 30 mL $\longrightarrow$ Gel pequeño (10 x 8 cm) = 10 mL
- Reducción de volumen de Tampón de Corrida necesario para ambas cámaras en un 66 %:
PROTEAN II xi cell= 3 L $\longrightarrow$ Mini-PROTEAN Tetra cell= 1 L
- Reducción del tiempo de corrida en un 75 %:
PROTEAN II xi cell= 4 h $\longrightarrow$ Mini-PROTEAN Tetra cell= 1 h

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ICH Q2(R2) Guideline on Validation of analytical procedures.
- García Trejo, J.J. y Ortega, R. (2021). Historia, fundamentos y métodos de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. Mensaje bioquímico, 45, 90-108. Recuperado de <http://bq.facmed.unam.mx/tab>.