

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)

PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/1/2008

(PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA)

Rev. 1

Fecha de entrada en vigor: Diciembre 2008

REV.	FECHA	EPÍGRAFE/S	CAUSA DEL CAMBIO
<u>Realizado</u> Fdo.: Carmina Gallardo Frontaura Responsable técnico del Laboratorio Nacional y Comunitario de PPA Fecha:		<u>Revisado</u> Fdo.: Miguel Ángel Jiménez Clavero Jefe de Servicio de Coordinación P3 Fecha:	<u>Aprobado</u> Fdo.: Marisa Arias Neira Directora Técnica del CISA Fecha:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 2 de 14

ÍNDICE	
1.	OBJETO
2.	ALCANCE
3.	REFERENCIAS
3.1.	DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN
3.2.	DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE
4.	GENERAL
5.	DESCRIPCIÓN
5.1.	EQUIPOS Y MATERIALES
5.2.	PREPARACIÓN
5.3.	REALIZACIÓN
5.4.	TRATAMIENTO DE RESULTADOS
5.5.	PUNTOS CRÍTICOS
5.6.	MEDIDAS DE SEGURIDAD
5.7.	CONTROL DE CALIDAD
6.	ANEXOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 3 de 14

1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto describir el método de separación de las proteínas del virus de la peste porcina africana (VPPA) mediante separación electroforética desnaturante en geles SDS-PAGE y su posterior inmunotransferencia a membranas de nitrocelulosa con el fin de obtener las tiras de IB utilizadas como técnica de confirmación en el diagnóstico serológico de la peste porcina africana (PPA).

2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación al Ag soluble citoplasmático del VPPA.

3. REFERENCIAS

3.1. DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN

Como referencia básica para la elaboración de este procedimiento se han tomado los criterios establecidos en los siguientes documentos:

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Capítulo 2.8.1. OIE, sexta edición, 2008. [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00035.htm]
2. Ensayos de comparación interlaboratorial organizados por el Laboratorio Comunitario de Referencia.
3. PG/LCV/001 Procedimiento para la elaboración de documentos, Edición 01.
4. Towbin H. Staehelin T. Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4350-4354.
5. Neal Burnette W. (1981). Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio-iodinated protein. A. Anal. Biochem. 112, 195-203.
6. Gershoni J. M. and Palade G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications Anal. Biochem. 131, 1-15.
7. Jhonson T. K., Yuen L., Denell R. E. and Consigli R. (1983). Efficient transfer of proteins from acetic-Urea and isoelectric-focusing gels to nitrocellulose membrane filters with retention of protein antigenicity. Biochemistry, 133, 126-131.
8. Pastor M. J., Laviada M. D., Sánchez-Vizcaíno J. M. and Escribano J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by Immunoblotting assay. Can. J. Vet. Res. 53, 105-107.

PPA revisiones:

1. Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). "African Swine Fever (ASF)". In Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 119-124.
2. Arias, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). "African Swine Fever Eradication: The Spanish model. In Trends in Emerging Viral Infections of Swine". Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 133-139.
3. Arias, M.; Sánchez, C.; González, M.A.; Carrasco, L. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2002). "Peste porcina Africana" In curso digital de enfermedades infecciosas porcinas". [www.sanidadanimal.info] on line, July, 2002/.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 4 de 14

3.2. DOCUMENTOS A UTILIZAR CONJUNTAMENTE

- Procedimiento para la obtención del antígeno soluble citoplasmático del VPPA (PNT/CISA/PPA/AgVPPA/1)
- Procedimiento para la realización de la técnica de IB (OIE) para el diagnóstico serológico de la PPA (PNT/CISA/PPA/IB/1/2008)

4. GENERAL

4.1 Abreviaturas

PPA: Peste porcina africana
VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana.
PAGE: 'polyacrilamide gel electrophoresis'
SDS: sodio-dodecil-sulfato
Ag: Antígeno soluble citoplasmático del VPPA
CP: Control positivo de referencia.
CL: Control limite de referencia.
CN: Control negativo de referencia.
IB: Immunoblotting.

4.2 Principio

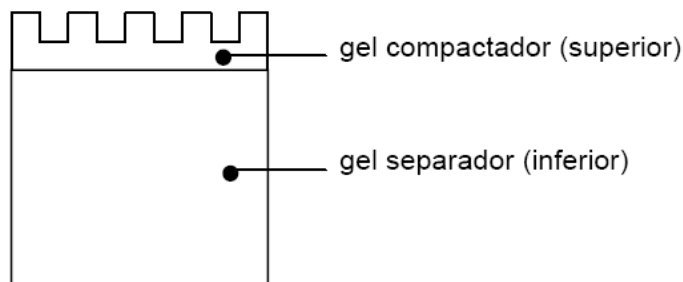
En el virus de la peste porcina africana (VPPA) se han identificado hasta 54 proteínas estructurales con pesos moleculares (PM) comprendidos entre 11 y 243 KDa y más de 100 proteínas de infección en macrófagos infectados por el virus, de las cuales al menos 50 son inmunogénicas e inducen anticuerpos en la infección natural. Algunas de estas proteínas son muy antigénicas, como las proteínas estructurales p72, p54 (25 kda) y p12 implicadas en la unión del virus a la célula, y la p32, implicada en eventos relacionados con la internalización del virus. Aunque estas proteínas no se han relacionado con la inducción de mecanismos inmunitarios que confieran una protección total durante la infección, son de gran utilidad como antígenos para el diagnóstico serológico. El procedimiento que aquí se describe tiene por objeto la **separación mediante electroforesis desnaturizante en geles SDS-PAGE de las proteínas virales del VPPA y su posterior inmunotransferencia a membranas de nitrocelulosa.**

La **electroforesis de proteínas en geles** con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína. Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoelectrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa.

Una **electroforesis desnaturizante** (SDS-PAGE), la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 5 de 14

situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente. El detergente provoca la pérdida de la estructura nativa de las proteínas. Además el SDS se fija a las mismas de modo constante, confiriéndoles carga negativa (en una proporción en la que 1.4 g de SDS se unen a 1 g de proteína). Así, la relación carga/masa se mantiene constante y la separación de los péptidos se produce en función exclusivamente del peso molecular. Esta técnica de **SDS-PAGE** posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el **gel superior o compactador**) y luego las separan (en el **gel inferior o separador**).



Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son:

- Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador.
 - La bis-acrilamida es el agente entrecruzador más comúnmente empleado en este tipo de electroforesis aunque se ha demostrado que puede actuar como terminador de la cadena en el proceso de polimerización y concentraciones altas pueden disminuir el tamaño de poro máximo de gel. Se han descrito otros agentes entrecruzadores como: la N, N'-diallitartar diamina (DATD) que da un tamaño de poro mayor que el obtenido con bis-acrilamida
 - Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato amónico. En algunas situaciones, como por ejemplo en el isoelectroenfoque en el que la presencia de persulfato puede interferir con la electroforesis se emplean ribofavina y TEMED.
- Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.
- La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
- La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.
- El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

Una vez separadas las proteínas del VPPA a intensidad constante, dichas proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia semiseca.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 6 de 14

5. DESCRIPCIÓN

5.1. EQUIPOS Y MATERIALES

MATERIALES NECESARIOS.

- **Sistema de electroforesis vertical:** PROTEAN II xi CELL 20 cm, 1.0 mm spacers (4), 15 well combs (2). BIORAD REF 165-1813.
 - *Accesorios:*
 1. Buffer tank (cubeta) REF. 165-1807
 2. Lid with power cables (tapa con los cables) REF. 165-1808
 3. Central cooling core with gaskets (cubeta de refrigeración interna con la goma blanca) REF 165-1806
 4. Replacement gaskets for central cooling core (2) REF 165-1913
 5. Latch Assembly kit Black (adaptadores negros) REF 100-5430
 6. Casting stand with gaskets (soporte para el montaje de los geles con almohadillas grises) REF 165-1911
 7. Replacement gaskets, for casting stand (2) (almohadillas grises) REF 165-1912
 8. Sandwich clamps 20 cm set (2) REF 165-1902
 9. Spacers 20 cm 1mm set 4 (espaciadores) REF 165-1848
 10. Inner Plates 20 cm cell, 20 x 20 (2) (cristales internos) REF 165-1823
 11. Outer Plates 20 cm cell, 22.23 x 20 cm (2) (cristales externos) REF 165-1824
 12. Notched inner plate 20 cm cell (cristal interno para el montaje de 2 geles) REF 165-1833
 13. Combs 1 mm (peines):
 - a. Blank (preparativo sin pocillo) REF 165-1892
 - b. 2D referente well (con pocillo de referencia) REF 165-1897
- Balanza de precisión
- Botellas de vidrio 100, 250 y 500 ml
- Centrífuga de mesa
- Congelador de -20
- Congelador -70
- Cubetas desechables
- Filtros millipore de 0.45µm
- Fuente de alimentación [Power Pac HC High-current power suplí BIORAD Ref 164-5052]
- Guantes de látex o de nitrilo
- Micropipetas automática monocanal de 10-200µl.
- Micropipeta automática monocanal de 1-10 µl.
- Micropipeta automática monocanal de 10-100 µl.
- Micropipeta automática monocanal de 200-1000 µl
- Micropipeta automática monocanal de 0,5-10µl.
- Nevera de 4°C
- Papel adsorbente.
- Papel de filtro Whatman
- Pipeteador automático Pipetboy acu o equivalente
- Pipetas de vidrio o plástico, estéril, para descargar 1-10ml.
- Puntas de pipetas desechables
- Sistema de transferencia semiseca [Trans-Blot SD Semidry transfer Cell BIORAD Ref 170-3940]
- Termoblock

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 7 de 14

- Tubos eppendorf (o equivalentes) de 0,5ml; 1,5ml y 2ml
- Tubos de plástico estériles de 10 ml y 50 ml.
- Vórtex.

REACTIVOS NECESARIOS.

- Ácido clorhídrico (HCl) [MERCK Ref. 1.00317.1000]
- Ácido acético glacial [MERCK Ref. 1.00063.1000]
- Acetona [PANREAC 21.1007]
- Agua destilada
- Acrilamida [SERVA Ref 10675]
- Azul de bromo-fenol [MERCK Ref. 1.08122.0005]
- β-mercaptoetanol [MERCK Ref. 805740]
- Dodecyl-sulfato-sódico (SDS) [BIORAD Ref. 161-0301]
- Etanol [PANREAC 12.1086.1214]
- Glicina [MERCK Ref 1.04201.1000]
- Glicerol [PANREAC Ref 131339.1212]
- Hidroximetil amino metano (TRIS) [MERCK Ref. 1.08387.2500]
- Metanol [MERCK Ref. 1.06009.1000]
- N, N'-diállitartar diamina (DATD) [BIORAD Ref 161-0620]
- N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED) [BIORAD Ref 161-0800]
- Nitrocelulosa [BIORAD Ref 162-0115]
- Persulfato amónico (PA) [BIORAD Ref 162-0115]
- Rojo Ponceau [SIGMA Ref. P3504]

TAMPONES NECESARIOS

- **ACRILAMIDA 30%**

	VF 1000 ml	VF 500 ml
Acrilamida	280 gr	140 gr
N, N'-diállitartar diamina (DATD)	7,35gr	3,675 gr
H ₂ O (MilliQ) (c.s.p)	600 ml	300 ml

*Calentar a 37° para favorecer la disolución de los reactivos y completar con agua hasta 1000 ml o 500 ml.

*Filtrar por millipore de 0.45µm empleando una bomba de vacío.

Conservación; a 4°C tapado con aluminio.

PRECAUCION!!!: PESAR LA ACRILAMIDA Y DATD CON GUANTES Y MASCARILLA. ¡MANEJAR TODAS LAS SOLUCIONES CON GUANTES!

- **PERSULFATO AMÓNICO (PA) 10 %**

PA	100 mg
H ₂ O (MilliQ)	1ml

Conservación; a -20°C en alícuotas.

- **ROJO PONCEAU:**

25 ml de ácido acético + 475 ml H₂O miliQ (55 v/v)



0.5 gr rojo ponceau (C.Final 0.1%) +500 ml A.Acético 5%

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 8 de 14

Conservación; Temperatura ambiente

- **SDS 10%**

SDS 10 g
H₂O (MilliQ) 80 ml

Una vez disuelto completar con agua hasta 100 ml dejando que se elimine toda la espuma formada en la agitación.

* No hace falta esterilizar

Conservación; Temperatura ambiente

- **TAMPON ELECTROFORESIS TRIS-GLICINA 10X**

Tris (base) 30 g
Glicina 144 g
SDS 20% 50 ml
H₂O (c.s.p) 500 ml

Una vez disuelto completar con agua hasta 1000 ml dejando que se elimine toda la espuma formada en la agitación.

Conservación; Temperatura ambiente

- **TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) PH 7,2**

ClNa 8,0 g
ClK 0,2 g
PO₄H₂K 0,2 g
PO₄HNa₂ 1,15 g
H₂O destilada 1000 ml

Conservación; temperatura ambiente

- **TAMPON MUESTRAS 4X (TR4X)**

Concentración 1X	Concentración 4X
SDS 2%	SDS 8%
Glicerol 10%	Glicerol 40%
Tris-HCl pH 7 80 mM	Trs HCl pH 7 320 mM
Azul de bromophenol 0.01%	Azul de Bromophenol 0.04%
β-mercaptoethanol 5%	β-mercaptoethanol 20%

100 ml de TR-4X ⇒ H₂O (MilliQ) 15 ml
Tris HCl pH 7 32 ml
SDS 8 gr
Glicerol 100% 40 ml
Azul de bromophenol 0,04 %. 0.4 ml
β-mercaptoethanol 5 ml

*Conservación; *Hacer alícuotas y guardar a -20°C*

- **TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 10X (TT10X)**

Tris Base 30.3 gr
Glicina 114 gr
Agua c.s.p 1 litro

Conservación; temperatura ambiente

- **TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 1X**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 9 de 14

TT 10 x	50 ml
Metanol	100 ml
Agua	350 ml

Conservación; temperatura ambiente

• **TRIS - HCl 1.5 M (pH 8,8)**

Tris (base)181,71 g	54,5 g
Agua (c.s.p)1 litro	300 ml

Ajustar pH a 8.5 con HCl

Conservación; Temperatura ambiente

• **TRIS -HCl 1 M (pH 6.8)**

Tris (base) 12,1 g	36,3 g
Agua (c.s.p)100 ml	300 ml

Ajustar pH a 6.8 con ClH

Conservación; Temperatura ambiente

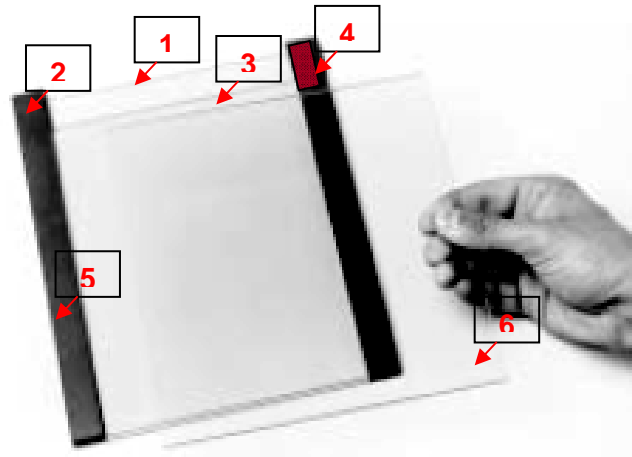
5.2. PREPARACIÓN

NOTA: ANTES DEL INICIO DE LA TÉCNICA ENCENDER EL TERMOBLOK A 100° PARA QUE ALCANCE LA TEMPERATURA ADECUADA

PREPARACIÓN DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS VERTICAL

1. Limpiar bien los cristales con una solución de alcohol y acetona. Los cristales se tienen que colocar según el esquema siguiente.

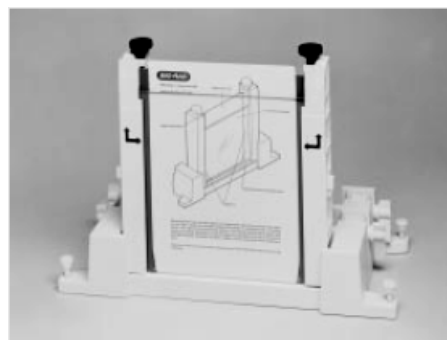
1. Cristal grande
2. Espaciadores
3. Cristal pequeño
4. Almohadillas*
5. Espaciadores*
6. Cristal pequeño*



*sistema de colocación de 2 geles

OPCIONAL: LA PARTE DE ABAJO SE PUEDE SELLAR CON VASELINA

2. Situar los cristales en los “sándwich clamps” (figura de la izquierda) y colocarlos (una vez apretados) en el soporte para el montaje de los geles (figura de la derecha). Comprobar que no se salen añadiendo agua (después secar bien).



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 10 de 14

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

MUESTRA: Ag soluble citoplasmático del VPPA obtenido según se especifica en el PNT/CISA/PPA/AgVPPA

Las cantidades que se indican a continuación se refieren a la cantidad de muestra por gel.

- 500 µl de muestra (Ag VPPA) + 125 µl de TR4X
- Agitar
- Calentar a 100°C durante 2 minutos (desnaturalización).

5.3. REALIZACIÓN

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Las cantidades que se describen a continuación sirven para el sistema de geles de Bio-Rad (Protean II®). Las mismas pueden adaptarse para otras cámaras de diversa capacidad, conservando las proporciones.

1. **Preparación del gel separador 17% (pH. 8,8) de 1 mm de espesor;** una vez montado el molde y comprobado que no se sale, se prepara el gel separador (donde se va a producir la separación de las proteínas en función de su peso molecular) añadiendo los reactivos en el siguiente orden en una botella de vidrio de 200ml

Separadores 1mm	2 geles
H₂O	16, 85 ml
Acrilamida 30%	56, 6 ml
TRIS - HCl 1.5 M pH 8,8	25 ml
SDS 10%	1 ml
Persulfato 10%	500 µl
TEMED	50 µl
VOLÚMEN FINAL	100 ml

- Añadir la solución del gel separador poco a poco entre cada cristal **evitando la formación de burbujas de aire**. El volumen que se añade es entre 30-40 ml dejando espacio suficiente para el gel apelmazador o staking.
- Cubrir el gel con agua (así el gel quedará recto y se polimeriza al no llegar O₂).
- Dejar a T^a ambiente hasta que este completamente polimerizado (entre 1-1.30 horas).
- Retirar el agua y secar con un poco de papel del filtro.

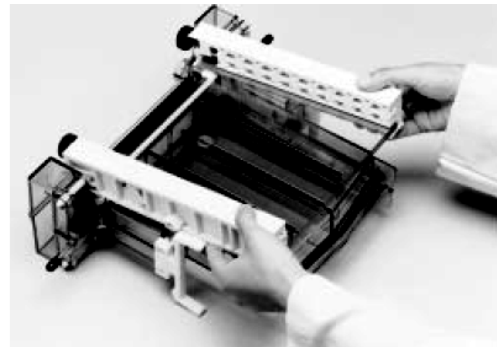
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 11 de 14

2. **Preparación del gel apelmazador (“staking”) pH 6.8;** una vez secada la parte superior del gel separador se prepara el gel apelmazador añadiendo los siguientes reactivos en una botella de vidrio de 50ml.

Apelmazador (staking) 1mm	2 geles
H ₂ O	18,3 ml
Acrilamida 30%	3,9 ml
TRIS - HCl 1.5 M pH 6,8	7,5 ml
SDS 10%	300 µl
Persulfato 10%	150 µl
TEMED	30 µl
VOLÚMEN FINAL	30 ml

- Añadir el gel apelmazador (evitando la formación de burbujas) e inmediatamente poner el peine preparativo (limpiarlo antes con agua y etanol). Observar que al poner el peine no falte gel por los extremos, si es así añadir más mezcla.
- Dejar que el gel polimerice a T^a ambiente (1-1.30h).

3. **Una vez polimerizado el gel apelmazador colocamos el molde en la cubeta de refrigeración (“central cooling core”)** según se indica en la figura. Añadimos tampón de electroforesis 1x por la parte superior de la cubeta de refrigeración hasta cubrir los electrodos y comprobamos que **no se sale por ningún sitio** dejándolo al menos durante 15 minutos. Durante este tiempo se pueden ir preparando las muestras que vamos a cargar según se describe en el apartado 5.2. preparación de las muestras.



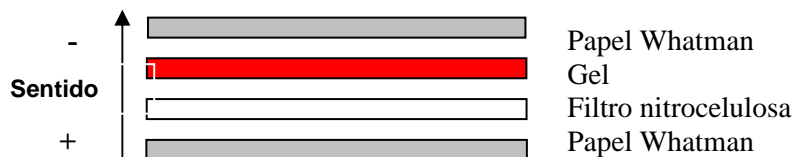
4. Introducimos el gel en la cubeta de electroforesis. Quitar el peine deslizándolo suavemente, y lavar los hoyos llenándolos con agua y aspirando luego con una jeringa. Esto elimina residuos de componentes no polimerizados.
5. Añadir tampón de electroforesis TRIS-Glicina 1X en la parte inferior hasta llegar a la altura de los cristales.
6. Cargar la muestra en el pocillo preparativo.
7. Se conecta a la fuente de alimentación y la electroforesis se realiza a **intensidad constante** (amperaje constante). Para evitar distorsiones de las bandas se debe correr a bajo amperaje. Las condiciones óptimas son de 9mA por gel durante 18 horas (el máximo voltaje que debe alcanzar es de 150 V)

NOTA: abrir el agua del grifo para refrigerar.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 12 de 14

TRANSFERENCIA SEMISECA

- Una vez terminada la electroforesis vertical (SDS-PAGE), sacar los geles quitando el apelmazador y sumergirlos en tampón de transferencia 1x durante 10 minutos junto con el papel whatman y la nitrocelulosa (**SIEMPRE DEBE SER MANEJADA CON GUANTES**).
- Pasado este tiempo se prepara el montaje de un “sándwich” con el gel cuyas bandas se van a transferir y la membrana de nitrocelulosa. Se monta la cubeta de transferencia, teniendo en cuenta que las proteínas migrarán hacia el ánodo (-). Se prepara el sándwich según el siguiente esquema:



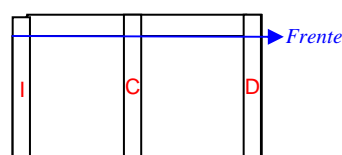
- Conectar a la fuente de alimentación a **voltaje constante**.

Voltios	22 V
Limite	1.2Amperios
Tiempo	30 minutos
- Por último lavar con PBS 1x 10 minutos y dejar secar a T^a ambiente en papel adsorbente.
- La eficiencia de la transferencia se evidencia tiñendo la membrana de nitrocelulosa con una solución de rojo Ponceau 0,5 % y ácido acético 1 %

5.4. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

Después de comprobar mediante el rojo Ponceau que la separación de las proteínas se ha producido de una forma correcta así cómo la eficiencia de la transferencia, el siguiente paso es realizar un control de calidad de cada lote de tiras mediante la técnica de IB descrita en el procedimiento PNT/CISA/PPA/IB/2008. Para ello se siguen los siguientes pasos;

- Marcar el frente de la membrana de nitrocelulosa con cuidado.
- Desechar una tira de 0'5 cm de cada lado de la membrana (en esa zona las proteínas se distorsionan).
- Cortar 3 tiras (izquierda/I, centro/C y derecha/D) de unos 0'3 cm de ancho. Hay que tener en cuenta marcar previamente la zona donde exista alguna burbuja para desecharla (en caso de que se hubieran producido en el gel).



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 13 de 14

- Las tres tiras marcadas como D, C e I se analizan frente al CP mediante la técnica de IB (PNT/CISA/PPA/IB/1/2008) y el lote se considera valido cuando se obtiene el patrón específico del VPPA.

5.5. PUNTOS CRÍTICOS

La electroforesis es una técnica muy sensible y puede verse afectada por muchos errores experimentales. Los principales puntos críticos a tener en cuenta son;

- **Temperatura durante la polimerización y la electroforesis (“efecto sonrisa”);** la movilidad de las proteínas varía entre otras causas porque la viscosidad del agua aumenta a bajas temperaturas (la distancia recorrida es aproximadamente 20 % mayor en la región central que es más caliente). La uniformidad de la temperatura a través del gel mientras ocurre la electroforesis generalmente elimina el efecto de la deformación de las bandas en forma de “sonrisa”.
- **Velocidad de la polimerización → niveles de catalizador;** una polimerización muy rápida puede deformar las bandas, porque ocurre una contracción no uniforme del gel, en este caso debe reducirse el TEMED y el persulfato de amonio o adicionar ferricianuro de potasio, con el objetivo de hacer más lenta esta. El empleo de niveles bajos de catalizador provoca que la superficie del gel se torne desigual y tienda a romperse con facilidad, pero el empleo de altas concentraciones provoca que los geles tiendan a cuartearse. Este problema puede solucionarse en geles de altas concentraciones, al poner una capa de alcohol iso-butílico en lugar de agua (en geles de bajas concentraciones deben emplearse alcoholes de altas densidades).
- **Pureza de los reactivos;** el empleo de reactivos de alta calidad y agua desionizada es un prerrequisito para hacer geles reproducibles y de alta resolución, en particular es muy importante la calidad de la acrilamida y la calidad del SDS
- **Tiempo de electroforesis;** la determinación del tiempo adecuado de electroforesis es muy importante, pues electroforesis muy cortas impiden que las muestras avancen el espacio necesario para su correcta separación, pero también se ha probado que tiempos de electroforesis cortos minimizan la dispersión de la muestra y el ensanchamiento de la banda.
- **Preparación de las muestras;** es necesario lograr una completa desnaturalización de las proteínas, para evitar la aparición de bandas fantasmas en la electroforesis (bandas dobles por la concentración de BME o por el tiempo de incubación).
- **Estabilidad de los geles de electroforesis;** en el sistema de electroforesis con tampón y gel heterogéneos, la diferencia de concentración entre los geles concentrador y separador crea un potencial osmótico entre los 2 geles, lo que provoca que el agua pase del gel concentrador (región de bajo % acrilamida) hacia el separador (región de alto % de acrilamida). Este proceso es muy rápido y continúa hasta que se establezca un equilibrio entre ambos geles como resultado de la difusión del agua al gel separador, por lo que el porcentaje de acrilamida no es estable en el gel separador y es necesario emplear los geles en el día de su preparación.

5.6. MEDIDAS DE SEGURIDAD

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Conservar los reactivos a la temperatura indicada antes de su utilización.
3. La acrilamida es **neurotóxica**. Al pesar el reactivo sólido debe usarse guantes y mascarilla. Limpie cualquier residuo de acrilamida en la balanza y sus alrededores, pues la inhalación es tan nociva como el contacto con la piel. Al preparar geles es necesario usar guantes e igualmente, limpiar cualquier derrame. Los sobrantes de solución de monómeros no deben ser vertidos en el desagüe, es mejor polimerizarlos y descartarlos en forma de gel (ya que el polímero pierde la toxicidad).

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA)	PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA	PNT/CISA/PPA/SDS-PAGE/2008
		Rev. 1
		Hoja 14 de 14

4. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
5. No pipetear los reactivos con la boca.