

EVALUACIÓN DE LA ELECTROFORESIS EN MICROCHIPS PARA LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN LECHE BOVINA

REY BENTOS, Fabiana ^{1*}; PÉREZ, Marvía ¹; ESCOBAR, Daniela ¹
1. Latitud – Fundación LATU. Montevideo, Uruguay. * frey@latitud.org.uy



INTRODUCCIÓN

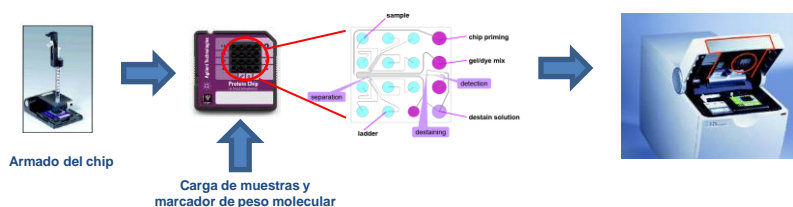
La separación, identificación y cuantificación de las proteínas presentes en la leche y productos lácteos brinda información acerca de las características fisicoquímicas, y puede utilizarse para explicar su influencia en la actividad biológica y sabor, así como para evaluar la autenticidad del producto. La leche bovina contiene 3 – 3.5% de proteínas de los cuales aproximadamente 80 % corresponde a caseínas y 20 % a proteínas del suero. Las caseínas comprenden: α_1 -CN, α_2 -CN, β (+ γ)-CN y κ -CN. Las proteínas del suero en su mayoría son β -lactoglobulina y α -lactalbúmina, y en menor proporción seroalbúmina bovina e inmunoglobulinas. Entre los métodos disponibles para el análisis de proteínas se destaca la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por ser el de mayor uso. Presenta la desventaja de ser muy laborioso, consumir tiempo y reactivos. La tecnología de microchips integra todos los procesos involucrados en la electroforesis en una plataforma de chip única y permite el análisis de varias muestras en pocos minutos (Anema, 2009; Nitsche, 2016; Dupont, 2018).

El objetivo de este trabajo fue el análisis del perfil proteico de muestras de leche cruda bovina mediante electroforesis en microchips y su comparación con SDS-PAGE.

METODOLOGÍA

Electroforesis en microchips

Se realizó utilizando un sistema Agilent 2100 Bioanalyzer y el kit asociado Protein 80 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Se analizaron 22 muestras de leche cruda bovina. Se preparó un mix estándar conteniendo 1 mg/mL de cada una de las siguientes proteínas: α , β y κ – caseína, α – lactoalbúmina, β – lactoglobulina y lactoferrina (Sigma-Aldrich). 3 μ L de muestra o mix estándar se combinaron con 83 μ L de solución de SDS 1,5 mg/mL. Se agregaron 2 μ L de 2-mercaptoetanol y se procedió según las instrucciones del fabricante.



Imágenes tomadas de <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Overview%20Agilent%20Microfluidics.pdf>

SDS-PAGE

La electroforesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970), en condiciones desnaturalizantes, usando un gel separador al 15% de acrilamida. La corrida se realizó a 200 V durante 4 horas.

RESULTADOS

Figura 1. Muestras de leche cruda analizadas con Protein 80 Kit en 2100 Bioanalyzer. A- imágenes en forma de gel B- Imagen correspondiente a las mismas corridas en forma de electroferograma

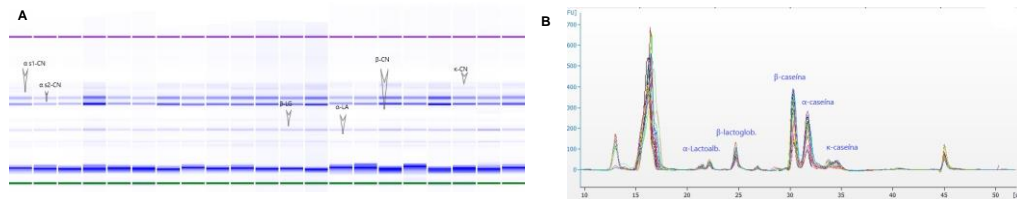
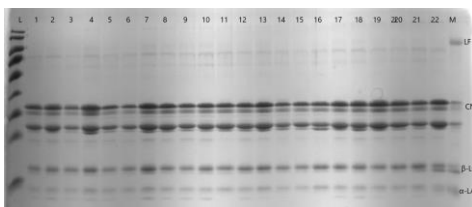


Figura 2. SDS-PAGE. L: marcador PM, M: mix estándar, 1 a 22: leche cruda



CONCLUSIONES

La metodología de electroforesis microfluidica en chips presentada en este trabajo es un método alternativo a la metodología tradicional SDS-PAGE para la separación simultánea de las principales proteínas de la leche. Los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos por SDS-PAGE, con la ventaja de que es una técnica menos laboriosa, las corridas son más rápidas (10 muestras/30 minutos) y la cantidad de reactivos utilizada es mucho menor.

Tabla 1. Pesos moleculares estimados de las principales proteínas de la leche, mediante microchips y SDS-PAGE, comparados con los reportados. ND: no determinado. *: se corrió una sola muestra

Proteína	Peso molecular estimado con microchips (kDa)	Peso molecular estimado por SDS-PAGE (kDa)	Peso molecular reportado (kDa)
α -LA	12,4 \pm 0,19	12,4 \pm 0,11	14,2
β -LG	18,4 \pm 0,18	16,9 \pm 0,20	18,4
α_1 -CN	33,2 \pm 0,36	38,3 \pm 0,39	23,6
α_2 -CN	37,6 \pm 0,29	40,6 \pm 0,26	25,3
β -CN	23,5 \pm 0,27	30,3 \pm 0,50	24,1
κ -CN	45,1 \pm 0,84	25,5 \pm 0,37	19
LF	ND	94*	76 - 93

REFERENCIAS

Anema, S.G. 2009. The use of "lab-on-a-chip" microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. International Dairy Journal 19 pp. 198–204.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 pp. 680–685

Nitsche, R. Milk protein analysis with the Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent Protein 80 kit. Application Note Food Analysis. Agilent Technologies.