

DETERMINACION FENOTIPICA DE LA HAPTOGLOBINA MEDIANTE LA TECNICA ELECTROFORETICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

*Por: María Luisa Bravo A.**

INTRODUCCION

La haptoglobina es una glicoproteína del plasma sanguíneo. A parte del papel fisiológico que desempeña en la especie humana por su polimorfismo constituye un marcador genético de identificación, muy utilizado en genética legal, como en los casos de legitimidad de la paternidad, de cambio involuntario de recién nacidos y en investigación para la confirmación de homocigosidad de gemelos, la consanguinidad, etc. Con raras excepciones, en la población general la haptoglobina presenta 3 patrones fenotípicos (figura Nro.1) que corresponden a los genotipos 1-1, 2-1, y 2-2. La identificación fenotípica se realiza mediante separación individual de sus componentes con base en el tamaño de la molécula y de su carga eléctrica (movilidad electroforética); para ello se usa muy frecuentemente, la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, los cuales son polímeros sintéticos de moléculas de acrilamida, de bajo peso molecular, obtenidos con un alto grado de pureza. La red polimérica se forma con enlaces carbón-carbón con grupos amido libres. Desde el punto de vista químico, son relativamente inertes y presentan pocos grupos iónicos o ninguno; además son termoestables, transparentes, elásticos y resistentes. El tamaño del poro del gel depende de la concentración del monómero lo que permite una amplia variación y ajuste al diámetro deseado. Una concentración de 7% de monómero da un gel con poros de aproximadamente 50 Å de diámetro. Todas estas propiedades del gel de poliacrilamida le confiere gran utilidad para separar proteínas y específicamente para la determinación fenotípica de haptoglobina.

OBJETIVO

Determinar el fenotipo de haptoglobina del suero o plasma en gel de poliacrilamida.

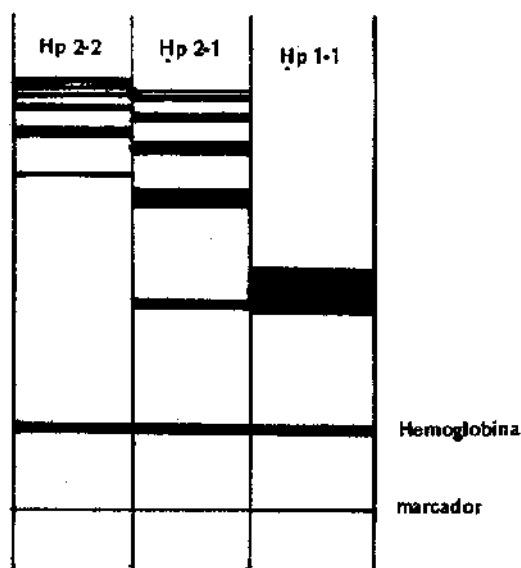


FIGURA No. 1. Diagrama de los patrones fenotípicos comunes de la haptoglobina (hb) revelados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

MATERIALES Y METODOS

1. EQUIPO

Tubos de vidrio 75 mm de longitud y 5 mm de diámetro interno.

Tapones de goma que sirven de base a los tubos.

Jeringa de 20 ml.

Aguja para jeringa.

* Realizado en el Laboratorio de Genética Humana, IVIC, Caracas, Venezuela.
Dirección Actual: Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.

Tubos de ensayo de 13 mm de diámetro.
 Alambre para despegar los geles del tubo.
 Fuente de poder.
 Aparato Electroforético. (ver figura No.2).

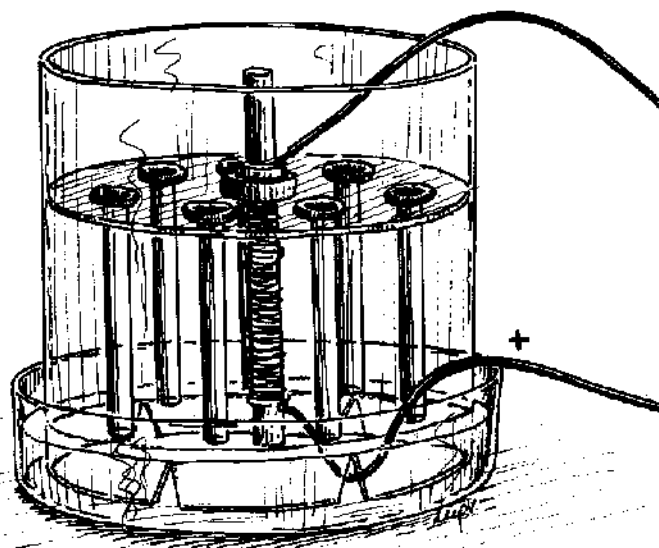


FIGURA No. 2. Aparato electroforético.

2. REACTIVOS

a. Soluciones Primarias

<i>Sol. A</i>		<i>Sol. C</i>	
HCl 1 N	48,00 ml	Acrilamida	28,00 g
Temed	0,23 ml	Bisacrilamida	0,735 g
Tris	36,60 g	H ₂ O csp	100 ml
H ₂ O csp	100 ml		
pH	8,9		

<i>Sol. F.</i>		<i>Sol. No.2</i>	
Sacarosa	40,00 g	Persulfato de amonio	0,25 g
H ₂ O csp	100 ml	H ₂ O csp	100 ml.

Amortiguador de los Vasos Sol. No. 3

Tris	6,00 g	Sol. indicadora	
Glicina	28,80 g	Azul de bromofenol	10,50 g
H ₂ O csp	1.000 ml	H ₂ O	25. ml
pH	8,9		

Sol. Hemoglobina

DO. = 1,20 Hemolizar eritrocitos lavados con NaCl 0,9o/o en igual volumen de CCl₄.

Sol. No. 4 (Revelador para 20 muestras).

O-dianisidina	0,15 g
H ₂ O ₂ al 30o/o	0,075 ml
Acido acético	0,45 ml
Sol. No. 5	75 ml.

b. Solución de trabajo para preparar el gel de poliacrilamida.

Sol. No. 1

1 parte de Sol. A
 2 partes de Sol. C
 1 parte de H₂O
 pH 8,9

c. Muestras:

Se puede utilizar plasma con EDTA, plasma heparinizado o suero fresco o almacenado en condiciones de congelación.

PREPARACION DEL GEL DE SEPARACION

Los tubos deben estar lavados con alcohol, secos y sobre los soportes de goma.

El gel de poliacrilamida está conformado de una parte de la Sol. No.1 y una parte de la Sol. No.2.

Tanto la Sol. No. 1 como la Sol. No.2 deben burbujearse con nitrógeno, durante 3 minutos para eliminar el aire disuelto, luego se mezclan en las proporciones anotadas y con la inyectora se coloca 1,2 ml en cada tubo, lo que debe hacerse con mayor rapidez posible para evitar la polimerización; luego se llena el tubo con 0,2 ml de agua y se deja que gelifique a temperatura ambiente.

3. PREPARACION DE LA MUESTRA

Sol. F	200 µl
Suero o plasma	20 µl
Sol. Hemoglobina	(1, * = 1,2) 5 µl

ELECTROFORESIS

El amortiguador tris-glicina se diluye en la proporción 1:10 y se coloca en la parte superior e inferior del aparato electroforético, de tal suerte que cubra los dos extremos del tubo. Con una pipeta adecuada se colocan 50 ml de la muestra dentro de cada tubo, atravesando el amortiguador del vaso catódico (superior) y se añaden a éste 50 µl de sol. No.3 que sirve de indicador.

Se conecta a la fuente de corriente cerrándose el circuito, con aproximadamente 3 mA por tubo. La corrida se detiene cuando el indicador ha llegado al extremo inferior del tubo.

Con la ayuda de una aguja fina de inyectar se saca el gel, corriéndolo a lo largo del tubo, una vez extraído

se coloca en un tubo de ensayo con 3 ml de la Sol. No.4 y se deja por 20 minutos aproximadamente, hasta que aparezcan las bandas; luego se lavan y se lee el fenotipo, de acuerdo a los patrones mostrados en la figura Nro. 1.

BIBLIOGRAFIA

- Chakraborty, R., Shaw, M., Schull, W.J. (1974). Exclusion of paternity: The current state of the art. *Am. J. Hum. Genet.* 26: 447-488.
- Davis, B.J. (1964) Disc Electrophoresis, part II. Method and application to human serum proteins. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Giblett, E. R. (1969). Genetic Markers in Human Blood. Blackwell, Oxford, pp 63-125.
- Erick, R.L. (1968). The haptoglobin groups in man. *Monographs in human Genetics* 4: 1-77.
- Ornstein, L (1964). Disc Electrophoresis. Background and theory. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 12: 321-349.
- Pastewka, J.W., Reed R.A., Ness A.T., Peacock A.C. (1973). An improved haptoglobin subtyping procedure using polyacrylamide-gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 51: 152-162.