



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Inmunotransferencia de geles de proteínas de poliacrilamida tipo *Western Blot*.

Western Blot Immunotransfer of polyacrylamide protein gels.

García Trejo, José J.<sup>1\*</sup> y Ortega, Raquel<sup>1</sup>.

1. Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

\*Correspondencia: Laboratorio 203, Departamento de Biología, Facultad de Química, Edificio F, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria. Tel/Fax: +(52)5556223899 ext 44449 y 44450. [jjgarte@unam.mx](mailto:jjgarte@unam.mx)

### Resumen

Después de la electroforesis en geles de poliacrilamida o PAGE, la inmunotransferencia o inmunoréplica tipo *Western Blot*, es una de las técnicas más poderosas en la bioquímica y la biología molecular modernas, dado que permite identificar y en algunos casos cuantificar a las macromoléculas o proteínas separadas previamente en un gel para estudiarlas de manera independiente y definir sus propiedades y funciones importantes en los seres vivos. Estas funciones las llevan a cabo en la mayoría de los casos las proteínas en todas las especies, en sus diversas formas como lo son enzimas, receptores, transportadores, bombas primarias y secundarias, proteínas estructurales, etc. Es por ello que posterior a la electroforesis de proteínas o PAGE, la inmunotransferencia tipo *Western Blot* es una técnica tan poderosa, ya que no sólo permite analizar los niveles de expresión de las proteínas de interés dentro de las células, sino que también permite definir interacciones con otras proteínas, y en general la relevancia de la función de una proteína dentro de cualquier ser vivo. Por todas estas razones, se revisará en este artículo la inmunotransferencia o inmunoréplica tipo *Western Blot*, posterior a la electroforesis en cuanto a su historia y fundamentos, veremos cómo surgió esta técnica de *Western Blot* posterior a las técnicas análogas con el ADN o el ARN como lo son el *Southern Blot* y el *Northern Blot*, respectivamente, así como los protocolos más comunes y útiles para

### Abstract

After polyacrylamide gel electrophoresis or PAGE, *Western Blot* immunotransfer or immunoreplication is one of the most powerful techniques in modern biochemistry and molecular biology, since it allows the identification and, in some cases, the quantification of macromolecules or proteins, previously separated in a PAGE gel to study them independently and define their important properties and functions in living beings. These functions are carried out mainly by proteins in all living species, in their several forms such as enzymes, receptors, transporters, primary and secondary pumps, structural proteins, etc. That is why, after protein electrophoresis or PAGE, *Western Blot* immunotransfer is such a powerful technique, it does not only allows analyzing the expression levels of the proteins of interest within the cells, but also allows defining interactions with other proteins, and in general the relevance of the function of a protein within any living cell or organism. For all these reasons, this article will review *Western Blot* immunotransfer or immunoreplication after electrophoresis. We will review its history and foundations, and we will see how this *Western Blot* technique emerged after analogous blotting techniques with DNA or RNA as the *Southern Blot* and the *Northern Blot*, respectively, as well as the most common and useful *Western Blot* protocols for their efficient use in the laboratory, whether it is basic, biomedical, pharmaceutical, biotechnological

su uso eficiente en el laboratorio ya sea de investigación, biomédico, farmacéutico, biotecnológico o clínico y diagnóstico.

or research, or clinical and diagnostic applications.

**Palabras claves:** Proteína, electroforesis, gel, poliacrilamida, PAGE, Western, Blot, inmunotransferencia, inmunoréplica.

**Keywords:** Protein, electrophoresis, gel, polyacrylamide, PAGE, Western, Blot, immunotransfer, immunoreplication.

## Introducción

### *Historia y fundamentos de las inmunorélicas tipo Western-Blot*

El año anterior, realizamos una descripción de la historia, fundamentos y metodologías más comunes de la técnica de Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés “*Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*”). Este año agradecemos de nuevo la amable invitación de los organizadores para extender la publicación de estas técnicas tan útiles en los laboratorios de investigación, clínico, o industrial, para describir la historia y fundamentos de otra técnica muy poderosa que es complementaria a la electroforesis de proteínas o PAGE. Como se comentó en el artículo anterior, el análisis preciso de muestras biológicas suele complicarse dada la gran heterogeneidad de la composición macromolecular de los diferentes seres vivos y sus células. Por dar un ejemplo, en los organismos vivos unicelulares más sencillos como son las bacterias, que pueden ser o no patógenas, hay de  $\approx 500$  a  $\approx 6000$  diferentes proteínas dentro del proteoma que compone a estos organismos procariontes, mientras que por ejemplo el SARS-CoV-2 contiene 29 proteínas en su proteoma, ya sea proteínas estructurales o funcionales. Sin embargo las pruebas inmunodiagnósticas dependen de la detección de una sola proteína o epítipo entre decenas o miles de proteínas en un mismo sistema biológico. Así que la correcta y precisa detección ya sea cuantitativa o semicuantitativa de las macromoléculas de interés depende de la buena calidad de las técnicas electroforéticas y en este caso inmunológicas, ya sea para el diagnóstico de pacientes o para la determinación de la presencia, o niveles de expresión o de asociación o interacción entre macromoléculas.

Aunque prácticamente nadie lo discute actualmente, todas las técnicas de inmunodetección actuales por ejemplo las pruebas rápidas o incluso las más precisas de antígeno actuales para detección del SARS-CoV-2, se fundamentan en una inmunodetección en una matriz, por lo tanto los antecedentes de estas técnicas provienen directa o

indirectamente de la invención y estandarización de la técnica de inmunotransferencia o inmunoréplica tipo *Western Blot*, la cual es precisamente una inmunodetección en una matriz susceptible de teñirse con un método de revelado de las macromoléculas de interés, en forma de bandas bien definidas. Sin embargo, no sólo las técnicas diagnósticas han sido fundamentales en la ciencia aplicada, sino también en la ciencia básica que ha servido para descubrir todos y cada uno de los procesos moleculares que subyacen no sólo en enfermedades sino en procesos fundamentales en la biología de todos los seres vivos como lo son la duplicación y crecimiento celular, el metabolismo y bionenergética celulares, la diferenciación celular, la motilidad celular, el reconocimiento celular, la quimiotaxis, el procesamiento y transducción de señales, los procesos sensoriales, la fecundación y reproducción celulares y de organismos uni- y pluricelulares, etc, etc. Se han descubierto los eventos moleculares de cada uno de estos procesos gracias a la detección cuantitativa o semicuantitativa por inmunorélicas tipo *Western Blot* de macromoléculas individuales inmersas dentro de toda una constelación de macromoléculas diferentes dentro de cada virus o célula procarionte u organismo eucarionte.

Después de la invención de la técnica de PAGE, las inmunorélicas tipo *Western Blot* es una de las técnicas más poderosas en los laboratorios de investigación, clínicos e industriales, dado que puede detectar a una proteína en específico en el intervalo de picogramos, nanogramos o microgramos, así que revisaremos aquí los fundamentos, y técnicas más comunes para su aplicación en el laboratorio. Históricamente esta técnica se formuló y adquirió su nombre de manera posterior a otras dos técnicas similares para el análisis de ácidos nucleicos, denominadas *Southern Blot* y *Northern Blot*, así que revisaremos primero éstas para entrar de lleno al *Western Blot*.

### *Los antecedentes del Western Blot: Southern Blot y Northern Blot*

La biología molecular ha dado a conocer en el último siglo varios de los mecanismos fundamentales

que sustentan el funcionamiento correcto y anomalías de las células. A pesar de que han transcurrido 94 años desde que se dio inicio a las bases de la biología molecular a partir del trabajo de Frederick Griffith (1), a la par se postulaban novedosas hipótesis como la del “principio transformante”, por lo cual era también necesario avanzar en metodologías que permitieran un análisis científico y minucioso de las moléculas bioquímicas en los procesos celulares. En estos últimos dos siglos, varios de los mecanismos fundamentales que sustentan el funcionamiento de la célula causaron un impacto en las primeras experiencias de biología molecular e ingeniería genética originando numerosos retos que se tuvieron que ajustar para intentar ensamblar información compleja de muchas disciplinas científicas diferentes.

El interés se centró básicamente en el análisis de las biomoléculas de alto peso molecular o biomacromoléculas. Las primeras biomacromoléculas en estudiarse fueron las proteínas. En este marco se diseñó una técnica que permitiera separar de forma controlada a las proteínas: la electroforesis (2-6). Al demostrarse la relevancia biológica del ADN y su carácter polimérico por Avery y cols., así como por Rosalind Franklin (7-9), cuyos datos experimentales fueron tomados por Watson y Crick para resolver la estructura helicoidal del ADN (10), posterior a esto fue necesario desarrollar métodos para conocer la secuencia de sus monómeros. Frederick Sanger fue quien desarrolló los dos métodos que le permitieron a todo laboratorio de investigación en biología la posibilidad de secuenciar biomoléculas. El método de secuenciación de proteínas de Sanger (11,12) ha sido sustituido por el de Edman (13), pero el método de secuenciación de ADN de Sanger con nucleótidos terminales está ampliamente establecido como un estándar (14,15). Gracias a estos métodos, se demostró la correlación entre la secuencia del ADN y la de las proteínas gracias al código genético descifrado por Nirenberg y colaboradores (16-20), y revisado por Guest y Yanofsky (21).

Los descubrimientos de la biología molecular han venido apoyando en diferentes aspectos a la medicina, la biología celular y la biotecnología ya que muchos de los avances no se pueden entender sin las herramientas de análisis, síntesis y modificación de las moléculas de la vida.

Entre los múltiples métodos que son los pilares entre la biología molecular y la investigación moderna se encuentran la electroforesis, la secuenciación, la clonación, la hibridación y más recientemente las inmunotransferencias tipo *Western*

*Blot*. Dentro de éstas, una de las técnicas más importantes es el *Southern blotting*. Esta procedimiento simple y poderoso ha tenido un enorme impacto en el estudio del ADN y es de uso generalizado en muchos laboratorios de investigación. El nombre de esta técnica se debe al inventor de la misma, el biólogo británico Edwin Southern (22). A raíz de la creación de la técnica del *southern*, se pudieron identificar segmentos específicos de ADN con secuencias de interés para definir molecularmente muchas funciones biológicas.

Para realizar el *Southern blot* de forma correcta primeramente hay que extraer y purificar el ADN. Este puede ser de tejido animal, vegetal, etc. Las técnicas de extracción son muy diversas. Existen protocolos de extracción especializados para muchos tipos de tejidos diferentes o tipos celulares. Una vez obtenido el ADN purificado se corta con enzimas de restricción para obtener fragmentos maleables.

El *Northern blot* surge como variación del Southern Blot, y esta última técnica es para separar e hibridar moléculas de ADN. Así como el Southern recibe su nombre de su creador, E. Southern, el *Northern Blot* se denominó así como oposición (norte y sur) al *Southern*. La técnica para separar e hibridar el ARN con el ADN fue diseñada por James Alwine, David Kemp y George Stark, a finales de la década de 1970 (23). Así como se han desarrollado técnicas para detectar y separar secuencias de ARN, como *Northern blot*, de manera similar para identificar proteínas, como veremos en esta revisión, se diseñó la técnica *Western blot*. Además, se han creado otras técnicas híbridas como el *Southwestern* (24,25) o el *Northwestern* (26-28), para agregados de ADN o ARN y proteínas, respectivamente; o el *Eastern blot* para proteínas modificadas post-traduccionalmente (29-32).

El *Northern blot* es una metodología directa ampliamente usada que permite la detección de fragmentos de ARN, sus secuencias precursoras o intermediarias, para evaluar su expresión y determinar su tamaño. El proceso general del *Northern Blot* consiste en extraer ARN total, separarlo por tamaño mediante electroforesis de agarosa y transferir e inmovilizar en una superficie sólida (membrana). La sonda que usualmente es de ADN complementario al ARN de interés, es marcada por métodos radioactivos o no radioactivos, luego se incorpora en la membrana que contiene el ARN inmovilizado y finalmente la hibridación con la secuencia complementaria es detectada. Para la metodología *Northern Blot* se han publicado

diferentes protocolos que varían principalmente en el diseño y marcaje de la sonda, donde comúnmente se utilizan sondas de ADN marcadas con fósforo radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ) (33).

Un par de nuevos protocolos para *Northern blot* no radiactivo denominado LED (LNA-EDC-DIG), fueron reportados más recientemente (34,35), integran tres metodologías desarrolladas separadamente, que modifican a su vez tres aspectos del proceso determinantes de la especificidad y la sensibilidad del *Northern blot*. Tales modificaciones consisten en reemplazar las sondas de oligonucleótidos de ADN, por sondas que contienen ácidos nucleicos bloqueados o no accesibles (Locked Nucleic Acid, LNA). La inmovilización del ARN en la membrana, que normalmente se hace con luz ultravioleta (UV), es reemplazado por el uso de EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropil) carbodiimida) (36,37). Adicionalmente, el uso de radioisótopos ( $^{32}\text{P}$ ), el método más común de marcaje de sondas, es sustituido por el uso de Digoxigenina (DG) o de detección de quimioluminiscencia. Estos nuevos protocolos aumentan la sensibilidad y especificidad en la detección de los fragmentos del ARN por *Northern blot*, por lo que su uso e implementación en los estudios de detección, caracterización y funcionalidad de nuevos ARNs es de gran utilidad (37), dadas su sensibilidad y especificidad para detectar fragmentos normales o con anomalías del ADN o ARN en salud y enfermedad, pero no detectan a sus productos proteicos que son las que realizan la mayoría de las funciones vitales celulares. Esto limitó el alcance de las técnicas de biología molecular clásicas, por lo tanto, dada la gran relevancia de las proteínas fue necesario diseñar una técnica que detectara de forma semicuantitativa o cuantitativa a las responsables de la mayoría de las funciones biológicas vitales en la salud y en la enfermedad: las proteínas. Todo esto en paralelo a la optimización y mejora de las metodologías de *Southern Blot*, *Northern Blot* y actualmente PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR (PCR en Tiempo Real o acoplado a Transcriptasa Reversa), y demás técnicas de ADN recombinantes modernas, el *Western Blot* se mantiene como la técnica por excelencia para determinar la presencia y niveles de expresión de una o varias proteínas de interés de manera muy específica en la salud y en la enfermedad. Por ejemplo, las pruebas de antígeno actuales del SARS-CoV-2 y demás ensayos de rutina o diagnósticos tienen su origen en inmunotransferencias de tipo *Western Blot* por lo cual resumiremos su historia, fundamentos, así como algunas de sus más importantes aplicaciones.

### **Inmunotransferencias o inmunorélicas tipo *Western Blot***

Los geles de poliacrilamida de proteínas como se discutió en el artículo anterior de esta técnica “PAGE” (38), formaron la base para separar de manera eficiente a las proteínas por su peso molecular en geles desnaturizantes o nativos, y así definir las propiedades y funciones biológicas de cada proteína por separado. Sin embargo incluso con las técnicas de separación actuales el límite de detección de las proteínas está en el intervalo de nanogramos a microgramos de proteína (38). Por otro lado, la identidad de cada banda de proteína puede asumirse por el peso molecular dada su correlación con los estándares en el mismo gel donde se separaran las proteínas en cuestión, pero la identidad 100% segura de cada banda sólo se lograba por medio de la secuenciación de las proteínas ya sea por el método de Degradación de Edman (13) o actualmente por espectrometría de masas. Estrictamente hablando, uno no puede asegurar la identidad de una banda teñida en el gel dado que puede haber otras proteínas del mismo peso molecular que co-migren con la de interés en el gel, por lo tanto para experimentos realmente concluyentes no queda otra opción que corroborar la identidad de las bandas de interés. La secuenciación es un método seguro pero actualmente se lleva entre días o semanas dependiendo de la extensión en número de aminoácidos a secuenciar, y en el origen de la electroforesis. Previo al surgimiento de la técnica de *Western Blot*, las secuenciaciones se llevaban semanas o meses para emplear la secuencia de algunos péptidos o proteínas relativamente chicas. Otro factor importante es la facilidad o dificultad con la que las proteína de interés se puedan procesar para su secuenciación. Por ejemplo algunas proteínas están bloqueadas en el extremo amino terminal (N-terminal) y por lo tanto se obstaculiza su secuenciación por Degradación de Edman. Otras proteínas, por ejemplo aquellas muy hidrofóbicas, suelen ser difíciles de proteolizar para generar péptidos identificables por Espectrometría de Masas. En resumen, en años anteriores surgió la necesidad de generar un método más rápido y eficiente para identificar a las proteínas de interés de manera independiente a los métodos de secuenciación de proteínas disponibles.

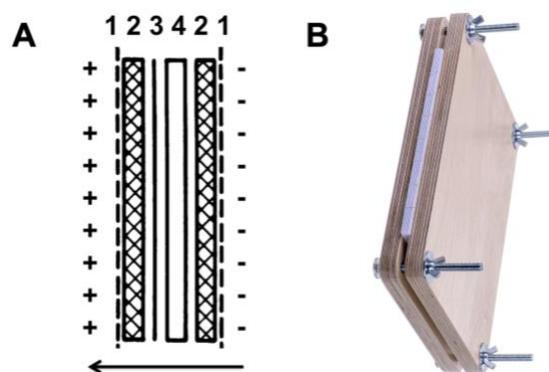
La manipulación de las proteínas posterior a la electroforesis tipo PAGE se dificulta dado que las proteínas quedan inmersas entre la malla de poliacrilamida de los geles, sobre todo una vez que se fijan las proteínas al gel al teñirlos. Así que hubo que idear algún método de transferir las proteínas de los

geles de poliacrilamida una vez separadas hacia alguna matriz más maleable y que permitiera la manipulación más directa de las proteínas para su identificación.

Unos investigadores liderados por Julian Gordon en Suiza (39), se les ocurrió la gran idea de que, a manera semejante a las técnicas ya resumidas de *Southern Blot* o *Northern Blot* que se habían implementado en años anteriores, debería ser posible realizar réplicas, lo más idénticas posible, del corrimiento de los geles de proteínas tipo PAGE al electrotransferirlas a alguna membrana donde se pegaran las proteínas pero quedarán expuestas para incubarlas en diferentes condiciones o tratarlas para su posterior secuenciación si era necesario. Probablemente inspirados en los primeros geles de proteínas que realizaban en papel o membranas de celulosa o almidón (4-6), se describió e implementó una técnica de transferencia (en inglés “*Blotting*”) donde se electroeluyeron las proteínas en un campo eléctrico perpendicular al plano del gel y hacia una membrana de nitrocelulosa firmemente adherida al gel para evitar en lo posible la pérdida de las proteínas (39). Esta técnica permitió obtener una réplica de las bandas de proteína separadas en el gel de poliacrilamida (PAGE), aunque la técnica no es cuantitativa sino semicuantitativa en estos orígenes, se han implementado técnicas nuevas donde se calibra la cantidad de la proteína de interés debidamente purificada, y actualmente se pueden hacer este tipo de inmunoréplicas de tipo cuantitativo (ver más adelante y referencia (40)).

La base de la inmunotransferencia es la transferencia en sí de las proteínas del gel de poliacrilamida hacia la membrana que inicialmente era de nitrocelulosa (39). La eficiente transferencia es crucial y clave para el éxito del *Western Blot*. En teoría se realiza una réplica exacta de las proteínas separadas en el gel hacia la membrana, dado que se comprimen el gel y la membrana entre sí para que no se escapen las proteínas entre el gel y la membrana. Sin embargo, la eficiencia de transferencia no es perfecta dado que cada proteína de acuerdo a su peso molecular y características fisicoquímicas, tienen diferente eficiencia de transferencia. En la figura 1, modificada del trabajo original de Towbin y cols., (39) se muestra que para asegurar la mejor electroelución y transferencia de las proteínas del gel a la membrana, se somete al gel y a la membrana a cierta presión entre sí de tal modo que se aumenta la superficie de contacto entre ambos para que no se pierdan proteínas durante la electroelución. Se establece un campo eléctrico lo más homogéneo posible entre ambos lados del emparedado o

“*sándwich*” que se acomoda con la membrana (1 en figura 1A) y el gel (2 en figura 1B) en estrecho contacto entre sí en el centro del arreglo, presionados en una prensa suave formada por dos soportes de plástico porosos (1 en figura 1A) y en medio de dos filtros o esponjas que le dan soporte y al mismo tiempo evitan el daño al gel o a la membrana durante la inmunotransferencia. Inicialmente este arreglo se ha mantenido desde el artículo original de Towbin y cols., (39) y se realiza en cámaras húmedas llenas de un amortiguador adecuado (ver más adelante). Sin embargo, se ha modificado de tal forma que ahora se realiza también en formato semihúmedo (o semiseco) para ahorrar amortiguador y tiempo de corrida, y donde los soportes y prensa de plástico se cambiaron por planchas o electrodos metálicos (ver adelante).



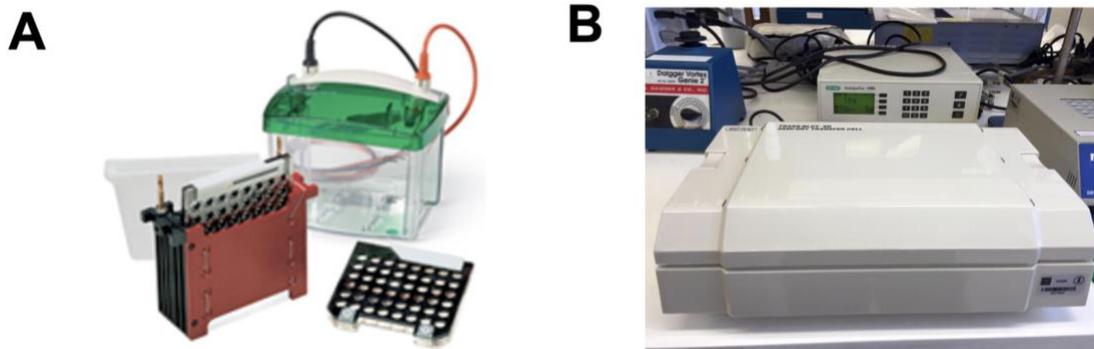
**Figura 1. Arreglo y acomodo de una inmunotransferencia tipo *Western Blot*.** En el panel izquierdo en blanco y negro **A**) se muestra el arreglo del gel PAGE a transferir en estrecho contacto con la membrana a donde se transferirán las proteínas **1** (izquierda y derecha) son soportes porosos de plástico que forman un emparedado donde se acomodan dos filtros o esponjas porosas **2** la membrana **3** y el gel **4**. Se muestra el campo eléctrico que se establece de manera homogénea a lo largo de la superficie de ambos lados del arreglo, de tal manera que las proteínas todas cargadas negativamente por la composición del amortiguador, migrarán del gel a la membrana por electroelución del gel (flecha negra). **B**) el arreglo en **A** se somete a una presión relativamente suave pero suficiente para aumentar al máximo la superficie de contacto entre el gel y la membrana. La imagen es una representación similar al arreglo de prensa de la inmunotransferencia tipo *Western Blot* aunque la presión real es mucho menor.

### **Materiales y reactivos de las inmunotransferencias tipo *Western Blot***

A continuación se describirán los materiales y reactivos, así como el procedimiento para la inmunotransferencia tipo *Western Blot* en su formato húmedo, que es la base y el procedimiento más común de la técnica, y enseguida se resumirá el procedimiento similar para las inmunotransferencias semisecas.

### *Materiales para inmunotransferencia húmeda tipo Western Blot*

1. Fuente de poder para generar el campo eléctrico entre ambos lados del arreglo de la inmunotransferencia.
2. Cámara de transferencia con tanque para llenarla con el amortiguador de transferencia e insertar el arreglo de emparedado con el gel y la membrana.
3. Prensa de plástico con rejilla y soporte para acomodar dentro de ellos la membrana, el gel y las esponjas y un par de papeles filtro.
4. Dos esponjas o fibras para darle soporte y resistencia al ensamble del gel y la membrana.
5. Dos papeles filtro de un tamaño ligeramente mayor al del gel y la membrana para poner a cada lado del emparedado del gel y la membrana.
6. Un enfriador con hielo dentro para minimizar el calentamiento de la cámara durante la corrida de la transferencia.
7. Un agitador magnético para mantener el amortiguador agitado y homogéneo y sacar las burbujas que se formen durante la transferencia.
8. Gel de electroforesis debidamente corrido como se ha propuesto en el artículo anterior de electroforesis (38) con las proteínas separadas y sin teñir y/o fijar.
9. Membrana de nitrocelulosa o de polividenofluoruro (PVDF) cortada al tamaño o ligeramente mayor que el gel y previamente humedecida en metanol y amortiguador de transferencia si se trata de la membrana de PVDF.
10. Cables de corriente de la fuente de poder para conectarla a la toma de corriente y cables de conexión entre la cámara o tanque de transferencia y la fuente de poder debidamente insertados en sus entradas correspondientes.



**Figura 2. Materiales básicos para llevar a cabo una inmunotransferencia húmeda o semihúmeda (o semiseca).** A) Se muestra el tanque con su tapa y los cables (rojo positivo o ánodo, +; negro negativo o cátodo, -), así como el soporte con los electrodos (rojo ánodo, +/negro cátodo -), ensamble y rejillas de plástico (negro/transparente) que forman la prensa donde se inserta el emparedado o “sándwich” del gel y la membrana, así como un enfriador de plástico con hielo adentro para evitar calentamiento de la cámara de transferencia durante la corrida. B) Se muestra una cámara estándar de transferencia cerrada con la fuente de poder atrás y sus cables de conexión a la corriente y entre la cámara y la fuente de poder. Panel A: imagen tomada de: <https://www.bio-rad.com/es-mx/category/wet-tank-blotting-systems?ID=f49905e9-1a24-44df-8161-5021b70113a2>

### *Reactivos y soluciones para las inmunotransferencias tipo Western Blot*

#### Para la transferencia húmeda:

Amortiguador de transferencia (2 L): Metanol grado analítico, 400 mL; Tris de alta pureza para electroforesis, 6g; Glicina de alta pureza para electroforesis, 28.8 g, ajustar pH a 8.5 con NaOH o HCl grado reactivo si es necesario, de lo contrario no

añadir ácido ni base. Almacenar el amortiguador en refrigeración para tenerlo listo para cuando se necesite realizar una inmunotransferencia.

#### Para la transferencia semihúmeda o semiseca:

Amortiguador de transferencia, aunque en los protocolos de las empresas se recomiendan otros amortiguadores, en nuestra experiencia el amortiguador original de Towbin (39) funciona bien

para transferencias de proteínas de <10 kDa a > 55 kDa. Este amortiguador de Towbin se prepara como sigue: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3. Disolver el Tris y la Glicina grados electroforesis en agua bidestilada y agregar 200 ml de metanol grado analítico, se ajusta el volumen a 1 litro (1L) con agua bidestilada. De preferencia se recomienda no ajustar pH a menos que sea necesario, se ajusta con NaOH o HCl.

#### Para la incubación y revelado con anticuerpos:

- Solución PBS (del inglés “Phosphate Buffered Saline”), un litro: NaCl 136mM (8g); KCl, 2.68 mM (0.2g); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (1.44g)
- Solución T-PBS: PBS + 0.1% (v/v) de Tween 20
- Amortiguador de revelado con NBT-BCIP: Nitrobluetetrazolio (NBT) 30 mg y 5-bromo-4-cloro-3-indolilpolifosfato (BCIP), 30 mg en 1 ml de 70% de dimetilformamida (DMF). Si se va a revelar con NBT-BCIP, se necesita el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, AP).

Por otro lado si se va a revelar con quimioluminiscencia se utilizan reactivos comerciales a base de luminol y anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Horse Radish Peroxidase, HRP). Por supuesto, además de los anticuerpos secundarios, se necesita tener listo el anticuerpo primario contra la proteína de interés listo para preparar la dilución indicada para cada anticuerpo.

#### ***Procedimiento para las inmunotransferencias tipo Western Blot***

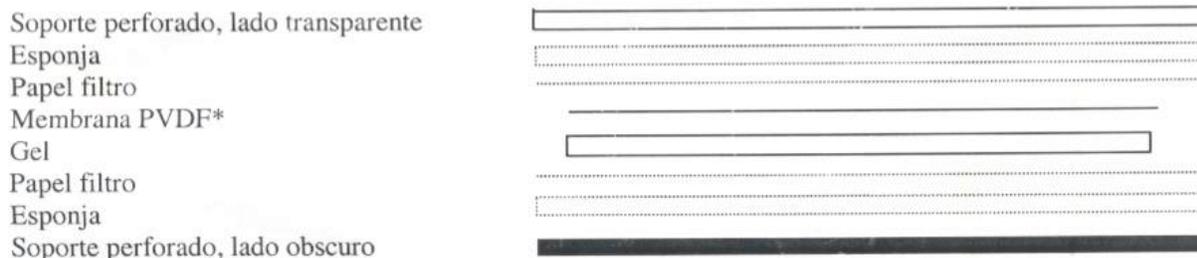
A continuación se describe el método o protocolo de la inmunotransferencia tanto húmeda como semihúmeda o semiseca, para posteriormente realizar el *Western Blot* con anticuerpos primarios y secundarios específicos contra alguna o algunas proteínas de interés, y la detección de los mismos por medio de los dos métodos más comunes, el de fosfatasa alcalina o el de quimioluminiscencia, siendo este último el más usado comúnmente en la actualidad. Todo se hace con guantes par evitar contaminar el gel y la membrana de transferencia con la grasa y las proteínas propias.

#### ***Protocolo o procedimiento de la transferencia húmeda.***

1. Después de correr el gel (PAGE) ya sea nativo o desnaturante, el gel se incuba 15 minutos en amortiguador de la transferencia húmeda descrito arriba. **Punto crítico:** Esto permite que el gel se encoja a su tamaño final previo a correr la inmunotransferencia, dado que la presencia de metanol deshidrata el gel y es importante preincubarlo en el amortiguador de transferencia.
2. Se corta un trozo rectangular de la membrana ya sea de nitrocelulosa o de PVDF, esta última es la más común actualmente, del tamaño del gel o ligeramente (3-5 mm) más grande y si es de PVDF se preincuba en metanol puro grado analítico por 5 minutos y luego se cambia el metanol por amortiguador de transferencia durante otros 5 minutos. **Punto crítico:** Dado que la membrana de PVDF es relativamente hidrofóbica, es necesario bañarla en metanol puro y luego en amortiguador de transferencia conteniendo metanol para poder transferir eficientemente las proteínas del gel a la membrana. Si se trabaja con membranas de nitrocelulosa, estas preincubaciones no son necesarias dado que es una membrana más hidrosfóbica.
3. Se ensambla el emparedado o “sándwich” con el siguiente orden, de manera horizontal y en una superficie plana dentro de un contenedor con el amortiguador de transferencia para mantener tanto el gel, la membrana, los papeles filtro y las esponjas o fibras humedecidas con el mismo amortiguador de transferencia: de abajo hacia arriba se colocan: 1) El lado oscuro del soporte o rejilla de plástico perforada (ver figura 1, 2 y 3); 2) una esponja o fibra. 3) el papel filtro. 4) el gel previamente preincubado en el amortiguador de transferencia. 5) la membrana si es de PVDF preincubada en metanol y en amortiguador de transferencia. **Punto crítico:** de preferencia cortar un pequeño fragmento del gel y de la membrana en la misma esquina para señalar la orientación del gel y la membrana. 6) Otro papel filtro de tamaño mayor al gel y la membrana. 7) Otra esponja o fibra porosa. 8) El lado transparente del soporte o rejilla perforada. El la figura 3 se indica el arreglo de estos componentes del emparedado o “sándwich” de transferencia de forma horizontal. **Punto crítico:** antes de colocar el 2º papel filtro, la esponja o fibra y el lado transparente de la rejilla sobre la membrana, se hace rodar sobre la membrana y el gel un rodillo,

o tubo de ensaye, o cilindro del tamaño aproximado al del gel y la membrana unas 2-3 veces para sacar las burbujas atrapadas entre el gel y la membrana, todo esto manteniendo todos los componentes del emparedado o “sándwich”

húmedos en el amortiguador de transferencia. Esto evita manchas de burbujas de aire que se ven al revelar el *Western Blot* si no se realiza este paso.

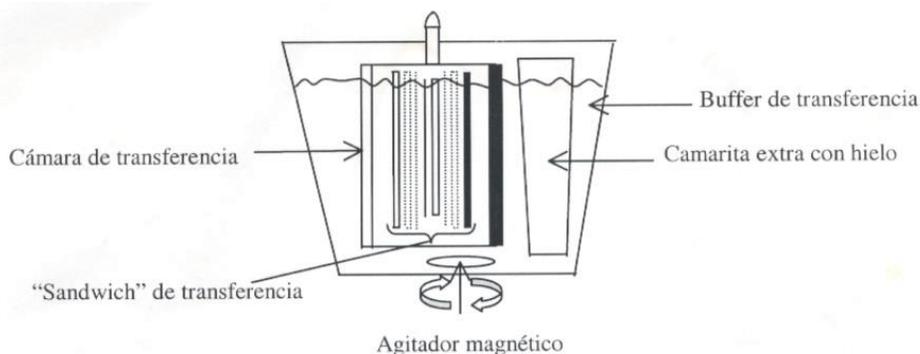


**Figura 3. Arreglo horizontal del emparedado o “sándwich” donde se aprisionan el gel y la membrana para la inmunotransferencia.** Los dos soportes o rejillas negra y blanca contienen una pinza para sellar y presionar suavemente al gel y la membrana. En la versión semiseca o semihúmeda las rejillas se cambian por planchas metálicas que son a su vez los electrodos del cátodo (-) y el ánodo (+).

Una vez formado el emparedado o sándwich con el orden mostrado en la figura 3, se procede a sellar las pinzas de plástico que ejercen presión entre las rejillas negra y blanca y por lo tanto aumentan el contacto entre el gel y la membrana ejerciendo una presión relativamente suave, y tanto las esponjas como los papeles filtro protegen al gel y a la membrana de posibles daños, todo esto se hace evitando que haya deslizamientos entre el gel y la membrana.

Una vez que el emparedado o “sándwich” quedó bien sellado, se inserta dentro de la cámara de transferencia debidamente llenada con el

amortiguador de transferencia, como se indica en la figura 4, conteniendo un enfriador o hielo dentro de una camarita con hielo. **Punto crítico:** el nivel del amortiguador debe llenar hasta arriba y tapar al gel, la membrana y las esponjas. Una vez llenada adecuadamente la cámara de transferencia con el emparedado o “sándwich” se coloca un agitador magnético en el centro de la base inferior de la cámara para posterior agitación durante la corrida de la transferencia. Esto asegura que las burbujas que se formen se eliminen rápidamente y que la temperatura del amortiguador de transferencia sea homogénea dentro de la cámara durante la corrida.



**Figura 4. Arreglo de la cámara de transferencia húmeda.** Se muestra una vista lateral de una cámara de transferencia de minigeles de poli(acrilamida) (PAGE) similar a la de la figura 2. Una vez llenada la cámara con el amortiguador de transferencia hasta arriba del gel y la membrana, se tapa y los electrodos se conectan con la orientación correcta a la fuente de poder. La corrida se mantiene en agitación constante y en frío durante el tiempo de corrida (ver texto para más detalles).

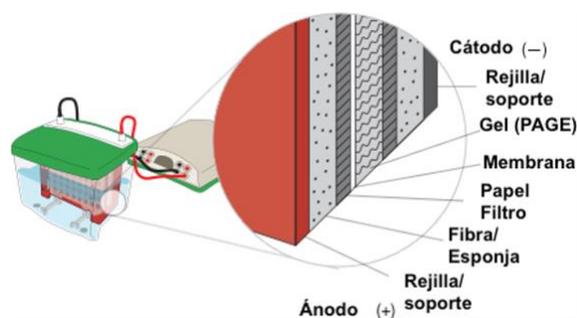
**Punto crítico:** La cámara debe ponerse sobre una plancha con agitación magnética y de preferencia en el refrigerador y/o dentro de un baño maría de agua

con hielo, esto debido a que la corriente es muy alta y esto calienta mucho el amortiguador y la cámara durante la corrida. Una vez bien llenada la cámara

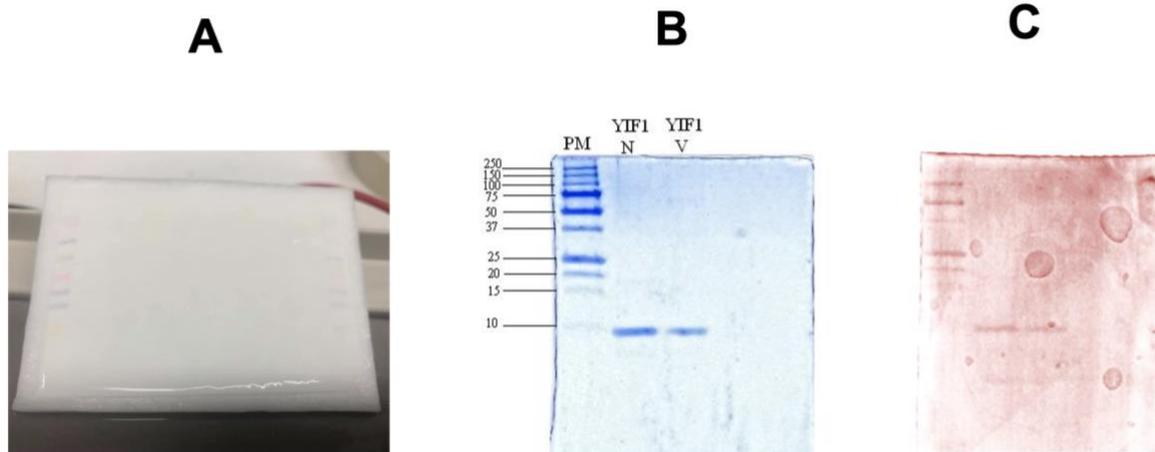
con el emparedado o sándwich, el amortiguador hasta arriba, el enfriador de hielo interno, el agitador y el baño maría externo con agua y hielo, se procede a poner la tapa de la cámara y conectar los electrodos a la fuente de poder. Una vez conectada la cámara a la fuente de poder, se corre la transferencia en frío (4°C) durante 1-2 horas a corriente constante  $\approx 350$  mA ó a voltaje constante  $\approx 100$  V, esto se estandariza con ensayo y error dependiendo de tamaño y eficiencia de transferencia de las proteínas de interés a detectar (figura 5). De preferencia el voltaje se establece usando una fuente de poder con un voltaje máximo de 500V a 1000V. Al terminar la corrida se desensambla la cámara y el emparedado o sándwich de transferencia. Con guantes y pinzas, se separa cuidadosamente el gel de la membrana todo para evitar tocar la membrana con los dedos.

Antes de realizar la incubación con los anticuerpos primario y secundario para detectar las proteínas de interés, es recomendable corroborar que la transferencia haya sido exitosa, y esto se realiza por dos métodos complementarios, por un lado normalmente se utilizan marcadores de peso molecular que son proteínas previamente preteñidas, y que se separan generalmente teñidas con diferentes colores para su identificación (ver figura 6A). Por otro lado se puede teñir el gel después de transferirlo para verificar que se transfirieron la mayoría de las bandas (figura 6 B), y a la la membrana se le tiñe con 1% de rojo de Ponceau en agua, el cual tiñe de

manera reversible a las proteínas y esto sirve para verificar que las proteínas de interés se transfirieron efectivamente. Una vez verificada la correcta transferencia de las proteínas de interés, la membrana se vuelve a lavar y desteñir unas 5 veces con agua bidestilada y esto remueve por completo el rojo de Ponceau para proseguir con la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios respectivos (ver figura 6 B y 6C).



**Figura 5. Arreglo y arranque de la inmunotransferencia tipo Western Blot.** El emparedado o sándwich conteniendo al gel y la membrana debidamente acomodados, se inserta en la cámara y se llena con el amortiguador de transferencia hasta arriba de la parte superior del gel y la membrana. Esta imagen muestra un llenado parcial de la cámara con el amortiguador, por lo tanto no está bien llenada. Para más detalles ver el texto y las figuras 2, 3 y 4. Imagen modificada de: <https://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/western-blotting-transfer-techniques?ID=PQEEOP70KWE7>



**Figura 6. Verificación de la eficiencia de transferencia de las proteínas del gel PAGE hacia la membrana de inmunotransferencia.** A) Posterior a la corrida de la transferencia, se abre el emparedado o sándwich y se verifica con estándares de peso molecular preteñidos que los colores de las bandas se definan adecuadamente en los carriles donde se cargaron los estándares preteñidos. En este caso se cargaron 6 y 3  $\mu$ L de estándares en el primer y último carriles del gel de la transferencia. B) Otro gel SDS-PAGE cargado con estándares de peso molecular y dos muestras de la proteína inhibidora de la  $F_1F_0$ -ATPasa mitocondrial de levadura (YIF<sub>1</sub>) que pesa  $\approx 10$  kDa, se corrió y se transfirió en inmunotransferencia húmeda por la mitad del tiempo estandarizado (1/2 hr a 350 mA, ver texto), se tiñó el gel con azul de Coomassie y se observa que la transferencia fue parcial pues se realizó por la mitad del tiempo estandarizado, se ven tanto los estándares de peso molecular como las proteínas YIF<sub>1</sub> (N= Nueva purificación y V = vieja purificación). C) La membrana de PVDF se tiñó 5min con Rojo de Ponceau, y esto verificó la correcta transferencia parcial de las proteínas de interés (YIF<sub>1</sub>) y de los estándares (ver texto para más detalles).

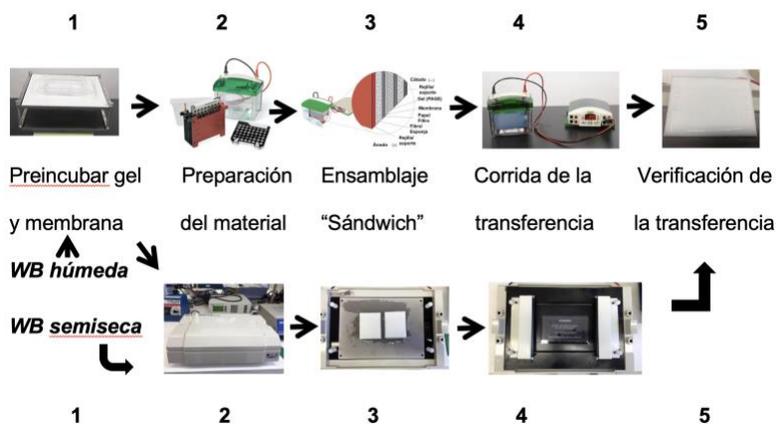
### Diagramas de flujo y procedimiento para la inmunotransferencia tipo Western-Blot

Una vez realizada y verificada, si la transferencia fue parcial se aumenta el tiempo de corrida, o si la transferencia fue excesiva y las proteínas se electroeluyeron del gel y traspasaron a la membrana (lo cual puede ocurrir y se ve por ausencia de las proteínas tanto en el gel como en la membrana), se reduce el tiempo de transferencia hasta que se optimice la misma. La secuencia de eventos para concretar la inmunotransferencia para el *Western Blot* se muestra en el diagrama 1. Con todo optimizado se puede proceder al bloqueo de la membrana y la incubación con anticuerpos primarios y secundarios para su posterior revelado como se muestra en el diagrama 2.

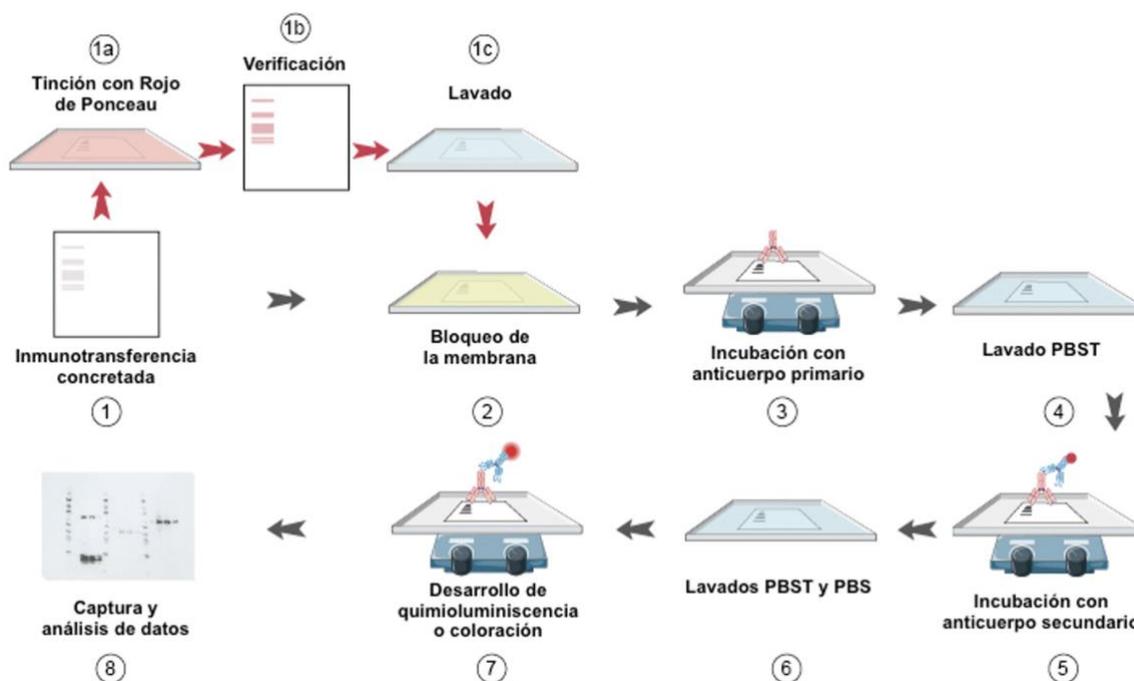
En el bloqueo de la membrana se le incuba con una alta concentración de proteínas inespecíficas en PBST que se pegan a toda la membrana donde no hay proteínas de interés y evitan pegado inespecífico de los anticuerpos y por lo tanto este paso es crucial para disminuir al mínimo el ruido de fondo al revelar el Western Blot. La verificación de la transferencia es opcional, es más necesaria cuando se van a ensayar nuevas transferencias de proteínas que no se han transferido previamente, pero cuando ya se tiene muy estandarizada una transferencia los pasos 1a-1c del Diagrama 2 pueden evitarse para pasar de inmediato al paso 2, que es el bloqueo de la membrana, este puede hacerse incluso con leche en polvo descremada “light” al 5-10%, aunque existen soluciones de bloqueo comerciales preparadas a base de albúmina. El bloqueo puede ser por 3 horas con

leche en PBST al 10% o toda la noche (“O/N”) con leche light al 5%.

La incubación con los anticuerpos primario y secundario se realizan con las diluciones adecuadas, típicamente para anticuerpos primarios monoclonales y secundarios preparados en cabra o conejo se utilizan a diluciones de 1:30000 a 1:120000, para anticuerpos no monoclonales las diluciones o títulos pueden ser más bajos. Lo importante es realizar varios lavados de 5’ con PBST entre el anticuerpo primario y el secundario. Finalmente después de dos lavados de 5’ con PBST y dos más con PBS, se procede a añadir los reactivos de revelado que puede ser colorimétrico (NBT/DCPIP) o quimioluminiscente, en el primer caso el anticuerpo secundario debe estar acoplado a fosfatasa alcalina, y en el segundo a peroxidasa de rábano. El revelado se puede fotodocumentar con alta resolución para su posterior análisis ya sea no cuantitativo o cuantitativo por técnicas de WB acopladas a los mejores programas para medir por densitometría la intensidad de las bandas. Con esto se concluye la sección de la metodología y los procedimientos más comunes para las inmunotransferencias tipo *Western Blot*. Sólo falta recomendar que en las transferencias semisecas el voltaje no debe sobrepasar los 25V (usualmente de 15-20 V), y corren en aproximadamente 15 minutos, esto las hace más eficientes en ahorrar amortiguador, reactivos y tiempo de corrida. Ambas versiones deben estarse monitoreando para evitar accidentes con el voltaje.



**Diagrama 1. Secuencia de eventos para realizar inmunotransferencias húmeda o semiseca tipo Western Blot.** Las figuras de arriba muestran las inmunotransferencia *húmeda* y las imágenes de abajo las transferencia *semiseca*. Los puntos 1 y 2 se pueden hacer simultáneamente. En ambos procedimientos se siguen los 5 pasos, el 1 y 2 se pueden hacer simultáneamente. En la transferencia semiseca sólo se humedece el “sándwich” y los electrodos son la base y la tapa que funcionan como planchas para ejercer presión entre el gel y la membrana.



**Diagrama 2. Procedimiento para llevar a cabo el Western Blot después de la inmunotransferencia.** 1) Terminando la transferencia se separa la membrana del gel. Opcional (flechas rojas →): 1a) La membrana se tiñe con Rojo de Ponceau. 1b) Se verifica la transferencia. 1c) Se destiñe o lava con agua o PBS. No opcional, → 2) Se bloquea la membrana con una solución concentrada de proteínas inespecíficas. 3) Incubación con anticuerpo primario 3h o toda la noche o “Overnight” (“O/N”). 4) 3 Lavados de 5’ con PBST. 5) Incubación con anticuerpo secundario 2h. 6) 2 lavados de 5’ con PBST y 2 lavados de 5’ con PBS. 7) Revelado por color o quimioluminiscencia. 8) Detección y análisis. Imagen modificada de: <https://www.creative-diagnostics.com/Antibody-Incubation-Gel-Visualization.htm>

### Aplicaciones más comunes de las inmunotransferencias tipo Western Blot

Las aplicaciones de las inmunotransferencias tipo *Western Blot*, son muy diversas, pero sobre todo en la investigación básica o aplicada a la clínica, en los estudios de bioquímica, biología molecular y biología celular es la parte central aparte de complementaria a la electroforesis de proteínas (PAGE). El *Western Blot* se utiliza para definir la presencia, cantidad relativa e interacciones, o estados de modificación post-traducciona de las proteínas en muestras sanas o de pacientes de cualquier enfermedad detectable por *Western Blot*. Recordar que por ejemplo todas las pruebas de antígenos contra el SARS-CoV-2 y otras enfermedades se inventaron usando como base el *Western Blot*, particularmente después de que se inventó una técnica más sencilla llamada “*Dot Blot*”, en la cual una pequeña gota de muestra se seca en una membrana de nitrocelulosa y esto se incuba con los anticuerpos primario y secundario para detectar a la proteína de interés (41-43). El *Western Blot* normalmente es una técnica no cuantitativa o semicuantitativa, pero en ocasiones se puede

convertir en una técnica cuantitativa si se cuenta con la proteína de interés aislada con una pureza >95%, en estos casos se pueden hacer titulaciones de las proteínas en cuestión y realizar una curva estándar por densitometría de las bandas de intensidad creciente vs la concentración o cantidad de cada proteína pura. En este caso se puede interpolar la intensidad de la banda de dicha proteína en una muestra a estudiar, y calcular por ajuste lineal e interpolación la cantidad de dicha proteína en una o varias muestras. El prerequisite es que la curva estándar de la proteína pura y las muestras a medir se carguen en el mismo gel y la transferencia sea homogénea. Ejemplos de esta técnica de *Western Blot* cuantitativo se pueden encontrar en nuestra referencia (40). Esto permite calcular cantidades reales de la proteína o estequiometrías de asociación o de expresión entre dos o más proteínas relacionadas entre sí (40). Sólo queda recordar que el *Western Blot* se puede aplicar posterior a cualquier tipo de gel PAGE, es decir a geles desnaturizantes (SDS-PAGE) o nativos (*Blue Native PAGE*, *clear native PAGE*, o cualquier otro gel nativo), ya sea en primera o segunda dimensión como se describieron

en nuestro artículo anterior (38). Buena suerte con sus *Western Blots*.

### Agradecimientos

Se agradece a los organizadores del Taller de Actualización Bioquímica (TAB) 2022 de la Facultad de Medicina de la UNAM por la amable invitación a escribir este artículo relacionado con el Western Blot y para realizar la conferencia en línea asociada a este artículo donde se explicarán mas detalles del *Western Blot*. Se agradece el apoyo de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) de la UNAM y de su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT),

proyecto IN217520, por el apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo. Se agradece el apoyo de la Facultad de Química, de la UNAM, por permitirme desarrollar el trabajo docente, de investigación y de divulgación de la ciencia en el Departamento de Biología, Edificio F2, primer piso, laboratorio de 203 de "Bioenergética". Se agradece también a todas y todos los estudiantes de mi laboratorio 203 de Bioenergética de la Facultad de Química de la UNAM, por su trabajo experimental o bioinformático y que han concluido o están por concluir su tesis y grados de licenciatura o posgrado, así como sus pasadas o futuras publicaciones a nivel nacional o internacional.

### Referencias

- Griffith, F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27, 113-159
- Tiselius, A. (1937) Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem J* 31, 1464-1477
- Tiselius, A. (1937) A new apparatus for the electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* 33, 12
- Smithies, O. (1955) Grouped variations in the occurrence of new protein components in normal human serum. *Nature* 175, 307-308
- Smithies, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* 61, 629-641
- Smithies, O., and Walker, N. F. (1955) Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* 176, 1265-1266
- Avery, O. T., Macleod, C. M., and McCarty, M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* 79, 137-158
- Franklin, R. E., and Gosling, R. G. (1953) Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 172, 156-157
- Franklin, R. E., and Gosling, R. G. (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171, 740-741
- Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738
- Sanger, F., and Thompson, E. O. (1953) The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J* 53, 366-374
- Sanger, F., and Thompson, E. O. (1953) The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 53, 353-366
- Edman, P. (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* 22, 475
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467
- Nirenberg, M. (1965) Protein synthesis and the RNA code. *Harvey Lect* 59, 155-185
- Nirenberg, M., Caskey, T., Marshall, R., Brimacombe, R., Kellogg, D., Doctor, B., Hatfield, D., Levin, J., Rottman, F., Pestka, S., Wilcox, M., and Anderson, F. (1966) The RNA code and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31, 11-24
- Nirenberg, M., Leder, P., Bernfield, M., Brimacombe, R., Trupin, J., Rottman, F., and O'Neal, C. (1965) RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53, 1161-1168
- Nirenberg, M. W. (1963) The genetic code. II. *Sci Am* 208, 80-94
- Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H., Jones, O. W., Martin, R. G., and Barondes, S. H. (1963) Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA. *Fed Proc* 22, 55-61
- Guest, J. R., and Yanofsky, C. (1966) Relative orientation of gene, messenger and polypeptide chain. *Nature* 210, 799-802
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-5354
- Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U. K., and Weintraub, H. (1980) The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acids Res* 8, 1-20
- Siu, F. K., Lee, L. T., and Chow, B. K. (2008) Southwestern blotting in investigating transcriptional regulation. *Nat Protoc* 3, 51-58
- Qian, Z., and Wilusz, J. (1993) Cloning of a cDNA encoding an RNA binding protein by screening expression libraries using a northwestern strategy. *Anal Biochem* 212, 547-554
- Bagga, P. S., and Wilusz, J. (1999) Northwestern screening of expression libraries. *Methods Mol Biol* 118, 245-256
- Zang, S., and Lin, R. J. (2016) Northwestern Blot Analysis: Detecting RNA-Protein Interaction After Gel Separation of Protein Mixture. *Methods Mol Biol* 1421, 111-125
- Bogdanov, M., Sun, J., Kaback, H. R., and Dowhan, W. (1996) A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein. *J Biol Chem* 271, 11615-11618
- Taki, T., Handa, S., and Ishikawa, D. (1994) Blotting of glycolipids and phospholipids from a high-performance thin-layer chromatogram to a polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* 221, 312-316
- Ishikawa, D., and Taki, T. (2000) Thin-layer chromatography blotting using polyvinylidene difluoride membrane (far-

- eastern blotting) and its applications. *Methods Enzymol* 312, 145-157
32. Towbin, H., Schoenberger, C., Ball, R., Braun, D. G., and Rosenfelder, G. (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* 72, 471-479
  33. Varallyay, E., Burgyan, J., and Havelda, Z. (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* 3, 190-196
  34. Valoczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyan, J., Kauppinen, S., and Havelda, Z. (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 32, e175
  35. Kim, S. W., Li, Z., Moore, P. S., Monaghan, A. P., Chang, Y., Nichols, M., and John, B. (2010) A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Res* 38, e98
  36. Damm, K., Bach, S., Muller, K. M., Klug, G., Burenina, O. Y., Kubareva, E. A., Grunweller, A., and Hartmann, R. K. (2015) Improved Northern blot detection of small RNAs using EDC crosslinking and DNA/LNA probes. *Methods Mol Biol* 1296, 41-51
  37. Pall, G. S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L., and Hamilton, A. (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 35, e60
  38. Garcia-Trejo, J. J. (2021) Historia, fundamentos y métodos de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. *Mensaje Bioquímico* 45, 90-108
  39. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354
  40. Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Rios, E., Rodriguez-Zavala, J. S., and Garcia, J. J. (2004) Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *J Bioenerg Biomembr* 36, 257-264
  41. Glenney, J. R., Jr., Glenney, P., and Weber, K. (1983) Mapping the fodrin molecule with monoclonal antibodies. A general approach for rod-like multidomain proteins. *J Mol Biol* 167, 275-293
  42. Littauer, U. Z., Giveon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I., and Ponstingl, H. (1986) Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7162-7166
  43. Jahn, R., Schiebler, W., and Greengard, P. (1984) A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1684-1687.



**DR. JOSÉ J. GARCÍA TREJO**  
**ORCID: 0000-0003-2597-9457**

El Dr. José J. García Trejo es Medalla Gabino Barreda, Licenciado, Maestro y Doctor en Investigación Biomédica Básica por la UNAM, como alumno de los Dres. Marietta Tuena Sangri y Armando Gómez-Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Realizó una estancia posdoctoral y 2 de investigación con el Dr. Roderick A. Capaldi de la Universidad de Oregon, USA, y en el Royal Free Hospital de Londres, UK con el Dr. Jan W. Taanman. Fue repatriado al Instituto Nacional de Cardiología y actualmente es Profesor-Investigador Titular en la

Facultad de Química de la UNAM. Es miembro continuo del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) de candidato a Investigador Nivel I y actualmente Nivel-II. Su campo de investigación es la estructura, función, disfunción, regulación, y evolución del nano-motor que le da la energía vital del ATP a todas las formas de vida: la ATP sintasa. Sus contribuciones más importantes son: 1) Resolución de la fuente de energía para la rotación del nanomotor en la unión de ADP o ATP; 2) Resolución de mecanismos patogénicos y de posibles terapias de las miopatías mitocondriales humanas por mutaciones en el ADN mitocondrial; 3) Contribución al análisis proteómico y genómico de cardiomiopatías humanas asociadas a enfermedades cardiovasculares y metabólicas; 4) Estudios de proteómica mitocondrial en la transformación de células normales a neoplásicas; 5) Primera resolución en 2D y 3D de la estructura dimérica de la ATP sintasa que le da forma a las crestas mitocondriales; 5) descubrimiento de la subunidad  $\zeta$  y resolución de su mecanismo de uñeta-trinquete como nuevo inhibidor natural de la  $F_1F_0$ -ATPasa en *Paracoccus denitrificans* y demás  $\alpha$ -proteobacterias. 6) propuesta de que las subunidades  $\zeta$  y  $\epsilon$  de la ATP sintasa de las  $\alpha$ -proteobacterias se pueden usar como marcadores o rastreadores evolutivos del protoendosimbionte mitocondrial; 6) Propuesta por acoplamiento molecular de un antiviral (Lamivudina o 3TC) con posible doble reuso contra el cáncer y el coronavirus SARS-CoV-2 y la COVID-19. El Dr.

© 2022 Mensaje Bioquímico. Todos los derechos reservados. ISSN-0188-137X

Comité Editorial: González Andrade, M.; Hernández Alcántara, G.; Martínez González, J.J.; Meraz Cruz, N.; Ramírez Silva, L.H. y Vilchis Landeros, M.M.

Publicado por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina; UNAM.

García Trejo ha colaborado con el Dr. Stephan Wilkens y con dos Premios Nobel de Química, el Dr. Kurt Wüthrich y el Dr. John E. Walker, y más recientemente con el Dr. Hiroyuki Noji de la Universidad de Tokio, quien demostró por la rotación del nanomotor ATP sintasa bacteriana por nanotecnología. El Dr. García Trejo recibió la Medalla Dr. José Laguna de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, de la cual es miembro, y el 3er lugar del premio PROFOPi otorgado por el IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial) y la UNAM, por su primera patente ya otorgada y con importantes aplicaciones en biorremediación por descontaminación (desnitrificación) de aguas potables y aguas residuales. El Dr. García Trejo ha publicado 47 artículos internacionales, la mayoría como primer autor o autor correspondiente con >1500 citas en las mejores revistas incluyendo: *Cell Reports*; *P.N.A.S. USA*; *American Journal of Human Genetics (AJHM)*, *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, *Biochemistry (USA)*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes (JOB)*, *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, *Frontiers* etc, siendo revisor de las últimas 5 y de *Nature Communications (USA)*; *FEMS Microbiology*, etc.

El Dr. García Trejo es conferencista invitado a la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil; Universidad de la Plata, Argentina; Universidad de Miami, Florida, USA; Instituto de Biología Molecular e Celular (IBMC), Porto, Portugal; a la Universidad de Tokio, Japón; AnalytiX Conferences, en Fukuoka, Japón y Miami, USA; y las European Bioenergetics Conferences (EBEC, Italia y Hungría).

Autor de un libro internacional, 8 artículos nacionales, 2 artículos de divulgación, tutor principal de 5 tesis doctorales, 3 de maestría y 4 de licenciatura. Realiza una intensa labor docente impartiendo Fisiología Microbiana (licenciatura, QFB, Facultad de Química, UNAM) y Bioquímica (Posgrado en Ciencias Bioquímicas: actualmente imparte Bioenergética y Métodos de Análisis de Proteínas; y previamente Termodinámica de Proteínas y Cinética Enzimática. UNAM). Así mismo, imparte el tema de “Procesos patológicos asociados a la mitocondria” en los Programas de Maestría y Doctorado en Biomedicina y Biotecnología Molecular en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).