

# Precipitación selectiva de imidazolato de zinc: aplicación a la detección de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y glicolípidos bacterianos) separadas en geles de poliacrilamida

Eugenio Hardy Rando, ✉ Lila Castellanos-Serra

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.  
AP 6162, CP 10600. Telf.: (53-7) 271 8164; Fax: (53-7) 33 8008; E-mail: lila.castellanos@cigb.edu.cu

## RESUMEN

A principios de la década anterior un grupo de especialistas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba, describió un método nuevo que utiliza sales de zinc e imidazol para la detección de biomoléculas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida. En este método se aplica el principio que se conoce en la literatura como tinción inversa y se basa en la precipitación selectiva de imidazolato de zinc en toda la matriz del gel, excepto en las zonas donde se localizan las bandas de las biomoléculas. Sus principales ventajas son la alta sensibilidad y rapidez de detección bajo condiciones reversibles. El método se ha perfeccionado y aplicado a la microcaracterización eficiente de proteínas y micropurificación de ácidos nucleicos y glicolípidos de bacterias. El principal interés fue preservar la integridad de las biomoléculas, y siempre que fue posible su actividad biológica. Aquí se revisan los antecedentes y principales resultados que han dado lugar al establecimiento, mejor comprensión y generalización del método de detección de biomoléculas basado en la tinción inversa.

**Palabras claves:** ácidos nucleicos, electroforesis, lipopolisacáridos, poliacrilamida, proteínas, tinción negativa

*Biotecnología Aplicada 2002; 19:41-47*

## ABSTRACT

**Selective Precipitation of Zinc Imidazolate: Application to the Detection of Biomolecules (Proteins, Nucleic Acids, and Bacterial Glycolipids) Separated in Polyacrylamide Gels.** At the start of the past decade a group of scientists from the Center for Genetic Engineering and Biotechnology in Havana, Cuba, described a new method that uses zinc (II) and imidazole salts for the detection of proteins separated by electrophoresis in polyacrylamide gels. In this method the principle that is known in the literature as reverse staining is applied, and is based on the selective precipitation of  $ZnIm_2$  all over the gel matrix, except in the zones where the biomolecule bands are located. Its main advantages are high sensitivity and speed of detection under reversible conditions. Since then, the method has been improved and applied to the efficient microcharacterization of proteins, and to the detection and micropurification of nucleic acids and glycolipids from bacteria. The principal interest was to preserve the integrity of the biomolecules and whenever possible, their biological activity. Here, the background and main results that led to the establishment, better understanding and generalization of the reverse staining-based detection method for biomolecules are reviewed.

**Keywords:** electrophoresis, lipopolysaccharides, negative staining, nucleic acids, polyacrylamide, proteins

## Introducción

La electroforesis es una de las técnicas de laboratorio que más se utiliza en la biología para separar y caracterizar estructural y funcionalmente cantidades pequeñas de biomoléculas [1-4]. Numerosos métodos se han desarrollado para visualizar las bandas de biomoléculas en el gel después de su separación, entre ellos se destacan los que se basan en la reducción de sales de plata a plata metálica, los que utilizan la tinción positiva de las biomoléculas y los que aplican el principio de la tinción negativa o inversa [1, 2, 5]. En las Tablas 1 y 2 se relacionan los cuatro grandes grupos de métodos de detección de biomoléculas en geles, sus ventajas, desventajas y los reactivos frecuentemente empleados.

Además de los descritos en las Tablas 1 y 2, existen métodos para la tinción fluorescente de proteínas en geles, que pueden ser más sensibles que el azul de Coomassie, o tan sensibles como la plata. Este otro grupo de métodos se basa en la unión covalente de algunos grupos fluorescentes a ciertos grupos funcionales de las proteínas entre los que se encuentran el isotiocianato de fluorescamina o fluoresceína, MDPF (2-metoxi-2,4-difenil-3 (2H)-furanona), OPA (*o*-ftaldialdehído), isotiocianato de Rodamina B y éster

succinimidico de carboxiltetrametilrodamina [5]. Algunas de estas técnicas han sido utilizadas para marcar las proteínas antes de aplicarlas al gel y poder observar el progreso de la separación durante la electroforesis. Sin embargo, tienen el inconveniente de que cambian la movilidad electroforética de las proteínas marcadas. Además, debido a que muchos de los reactivos fluorescentes reaccionan con los grupos amino de las proteínas, estas técnicas no pueden utilizarse para detectar proteínas que van a ser microanalizadas con posterioridad. Por otro lado, la sensibilidad de las técnicas fluorescentes es una función del número disponible de aminas primarias, por lo que puede existir una variación considerable en la señal de proteína a proteína.

El objetivo de este trabajo es revisar los antecedentes, generalidades y principales resultados del método de tinción inversa con énfasis en aquel que utiliza sales de zinc e imidazol para la detección de proteínas, ácidos nucleicos y glicolípidos bacterianos. Se exponen, además, algunos elementos sobre el mecanismo de tinción de biomoléculas con sales de metales para contribuir a mejorar el entendimiento del mecanismo general de detección con estas sales. La revisión de las

Tabla 1. Métodos de detección de biomoléculas separadas por electroforesis en geles. Las referencias de estos métodos se encuentran descritas en la Tabla 2.

Principio	Ventajas	Inconvenientes
Unión no covalente a grupos fluorescentes + irradiación del gel con luz ultravioleta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Algunas de sus versiones son tan sensibles como la plata</li> <li>- Simplicidad</li> <li>- Rapidez</li> <li>- Reversibilidad</li> <li>- Método de elección para la detección analítica de los ácidos nucleicos</li> <li>- Compatibilidad con posteriores caracterizaciones bioquímicas de proteínas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le produce daños a los ácidos nucleicos y destruye su funcionalidad biológica</li> <li>- La luz ultravioleta genera ozono y una exposición prolongada puede dañar la salud del analista</li> <li>- Se necesita de medidas especiales para destruir los residuos de tinción generados</li> </ul>
Precipitación selectiva de cationes metálicos en la matriz del gel (tinción negativa) o en la zona de las bandas de biomoléculas (tinción positiva)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilidad superior a la de la tinción con colorantes orgánicos</li> <li>- Simplicidad</li> <li>- Rapidez</li> <li>- Reversibilidad</li> <li>- Bajo costo</li> <li>- Compatibilidad con análisis y usos bioquímicos posteriores de las biomoléculas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilidad a los tiempos de incubación en los reactivos de tinción; se necesita de cautela y habilidad en la manipulación de los geles</li> <li>- Pérdida del patrón de tinción cuando se seca el gel</li> <li>- Algunas de sus versiones tienen baja reproducibilidad</li> </ul>
Unión selectiva de colorantes orgánicos a las biomoléculas (tinción positiva)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simplicidad, reproducibilidad alta, y robustez</li> <li>- Compatibilidad con posteriores caracterizaciones bioquímicas (ej., digestión y secuenciación de proteínas)</li> <li>- Método de elección para detectar proteínas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilidad de moderada a baja (0,04-0,5 µg/banda); no es útil en los trabajos de proteómica comparativa</li> <li>- Los métodos más populares en el campo de las proteínas requieren de la precipitación (fijación) de las moléculas en el gel, por lo que los recobrados de elución y electrotransferencia son poco reproducibles; además, son incompatibles con la determinación de la actividad biológica de las proteínas</li> </ul>
Reducción de sales de plata a plata metálica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Métodos de elección para detectar proteínas, ADN, y LPS/LOS con alta sensibilidad en geles de poli(acrilamida) (1-10 ng/banda); algunas de sus versiones son tan sensibles como la autoradiografía de moléculas marcadas con isótopos radiactivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muchos de sus procedimientos son laboriosos, prolongados en el tiempo (12-16 h) y requieren de una meticulosa atención del tiempo de ejecución</li> <li>- Modifica la estructura química y destruye la funcionalidad de las biomoléculas</li> <li>- Impide casi completamente la elución de las biomoléculas</li> <li>- No linealidad del rango dinámico de detección</li> <li>- Marcada insensibilidad con las proteínas cuya proporción de aminoácidos con cadenas laterales iónicas es baja</li> <li>- Tendencia a teñir diferencialmente (basado en las modificaciones postraduccionales y/o la composición de aminoácidos de las proteínas); además, las proteínas muy glicosiladas se pueden teñir con muy baja sensibilidad</li> <li>- Aplicabilidad muy limitada en la cuantificación de expresión de proteínas y en los trabajos de proteómica comparativa</li> <li>- Utiliza reactivos tóxicos</li> <li>- Elevados costos</li> </ul>

Tabla 2. Reactivos que se utilizan para detectar biomoléculas en geles.

Métodos	Proteínas	Ácidos nucleicos	LPS/LOS
Incorporación de grupos fluorescentes + irradiación con luz ultravioleta	1-anilina-8-naftaleno sulfónico (ANS) [6] Bis-ANS-potasio [7] Rojo de Nilo [8-10] Terbio [11] SYPRO (naranja, rojo, tangerina, ruby) [12-17]	Bromuro de etidio [2, 18] Naranja de acridina [19] SYPRO verde (I y II) y SYPRO oro [20] 4'-6-diamidino-2-fenilindol [21]	Bromuro de etidio [22]
Detección con sales de metales	Cloruro de potasio [5, 23, 24] Acetato de sodio [5, 25] Cloruro de cobre [26] Cloruro de zinc [27, 28] Zinc-imidazol [29-33]	Zinc-imidazol [34-36]	Zinc-imidazol [34, 37]
Incorporación de colorantes orgánicos	Azul de Coomassie [5, 38, 39] Eosin Y [40] Azul de Coomassie/carmelita de Bismark R [41, 42]	Azul de metileno [2, 43, 44] Azul brillante de cresilo [45] Azul de Nilo [46] Berberina y Mordiente amarillo 3R [47] Rojo de Nilo [48] Violeta cristal y Metilo de naranja [49]	-----
Reducción de sales de plata a plata metálica	Nitrato de plata [50, 51] Plata amoniacal [52]	Nitrato de plata [53] Plata amoniacal [54]	Peryodato-nitrato de plata [1, 55]

numerosas aplicaciones micropreparativas del método de tinción inversa con sales de zinc e imidazol será objeto de otro trabajo.

### Detección de proteínas separadas en geles de poli(acrilamida)

A fines de los años 80 se publicó [26] por investigadores norteamericanos una estrategia novedosa, en la

que se propuso el uso de sales de metales de transición, hidróxidos y carbonatos, para la detección de proteínas separadas en geles. La idea resultó atractiva desde el punto de vista micropreparativo ya que se teñía el gel y dejaba las moléculas de proteínas como bandas transparentes e incoloras, y potencialmente eliminaba la mayoría de las limitaciones de las tinciones anteriores (Tabla 1). Sin embargo, el estudio de este

método por un grupo de trabajo del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba (CIGB), mostró poca reproducibilidad y baja sensibilidad. Estos inconvenientes, también observados por investigadores de otros centros de investigaciones se tradujeron en un pobre impacto en la literatura internacional, por lo que no lograron situarse al nivel de reconocimiento de las técnicas convencionales de Coomassie y plata ya mencionadas. Dado que el principio de la tinción inversa o negativa es atractivo, el grupo de trabajo se propuso estudiar las razones de la baja sensibilidad y poca reproducibilidad con el propósito de solucionar ambas insuficiencias.

Se debe destacar que el proceso de tinción inversa es muy rápido, requiere menos de 30 min para su completamiento, generalmente unos 20 min, mientras que los métodos fluorescentes de sensibilidad equivalente deben ser ejecutados durante varias horas pues incluyen incubación del gel en la solución de fluoróforo durante la noche. Una ventaja adicional es que la observación de los geles se efectúa a simple vista y el registro de su imagen requiere sólo de un escáner común, mientras que los geles teñidos con fluoróforos sólo pueden visualizarse bajo condiciones especiales de iluminación a una longitud de onda específica y por tanto también requieren de equipos muy costosos para el registro de imágenes.

En las técnicas de tinción con zinc y cobre los productos que tiñen el gel son de naturaleza esencialmente incontrolable, pues dependen de la concentración de diversos aniones que pueden generar sales insolubles con los metales de transición [29, 30]. La idea esencial del grupo de trabajo fue *sustituir todos los componentes aniónicos remanentes en el gel por un compuesto que muestre una afinidad alta por el zinc*. Por tanto, la posible solución pudiera venir de una acertada elección de un compuesto que, teniendo afinidad por el zinc catiónico, pudiera reemplazar completamente a la mezcla de aniones presentes en el gel. El compuesto seleccionado no tendría que competir con la eficiencia de la formación de complejos del zinc con las proteínas. El éxito de la estrategia dependía de una muy cuidadosa selección. Tal compuesto resultó ser el imidazol [30].

A partir de este hallazgo se demostró que: *i)* el nuevo procedimiento de tinción inversa, imidazol-SDS-zinc (Tabla 3) tiene una sensibilidad (Tabla 4) muy superior al procedimiento de tinción negativa con sales de zinc [27] y a la tinción con azul de Coomassie, *ii)* su reproducibilidad es notablemente superior [30, 56], *iii)* es completamente reversible, lo que garantiza que se puedan recuperar con una eficiencia superior al 90% las proteínas una vez detectadas en el gel [57], *iv)* a diferencia de la tinción con plata de alta sensibilidad, que no es atractiva para la elución de proteínas intactas, el nuevo método no introduce ninguna modificación química y por tanto es especialmente útil cuando se requiere combinar alta sensibilidad de detección con una eficiencia elevada de microanálisis [30, 57]. Más recientemente, se desarrolló una nueva aplicación del método zinc-imidazol al campo de la electroforesis en geles de focalización isoelectrica con anfólinas portadoras y con inmobilinas [58, 59]. Esta es la primera publicación de un método de tinción negativa aplicable a geles de focalización isoelectrica.

Tabla 3. Procedimiento de tinción inversa de proteínas separadas en geles.

Paso	Solución	Tiempo de incubación	Comentarios
1. Incubación	Imidazol 0,2 M SDS al 0,1%	10-15 min	Remoción de los compuestos químicos asociados a la electroforesis (e.j., glicina) Recubrimiento uniforme de las proteínas con SDS Acondicionamiento del gel con la concentración adecuada de imidazol a pH básico Precipitación selectiva de ZnIm <sub>2</sub>
2. Tinción	Zn (AcO) <sub>2</sub> 0,2-0,3 M	30-60 s	
3. Lavado	Agua	30-45 s	Parada de la reacción

Tabla 4. Límites de detección de la tinción inversa de proteínas separadas en geles.

Proteína	kD	Sensibilidad (ng/banda)
BSA	68	5
Estreptoquinasa	47	1,6
Ovoalbúmina	43	10
Anhidrasa carbónica	29	5
-	-	6-12*

\*Para fosforilasa B, BSA, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, STI, o lisozima, de acuerdo a los laboratorios Bio-Rad (Boletín EG 1820).

Recientemente la empresa norteamericana Molecular Probes, que se dedica a la generación de nuevos reactivos de detección de biomoléculas, publicó en Internet un estudio comparativo de la sensibilidad de los seis métodos de detección más populares corroborado por el uso, ellos son: azul de Coomassie, azul de Coomassie coloidal, plata ácida, plata básica, zinc-imidazol y SYPRO. En esta evaluación el método de detección desarrollado en Cuba fue ubicado en el primer lugar en cuanto a sensibilidad, lugar compartido con el método fluorescente que utiliza fluoróforos de tipo SYPRO (datos no mostrados). Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5, la tinción inversa genera un gasto que es 64 veces menor que la detección con plata y 568 veces menor que la detección con reactivos fluorogénicos tipo SYPRO Ruby. El precio tan elevado de la detección SYPRO la hace inaccesible a muchos laboratorios, incluso en países desarrollados.

La notable diferencia de costo está determinada porque el método cubano es simple y utiliza dos reactivos muy económicos, a saber: acetato o sulfato de zinc e imidazol, que por demás generalmente están disponibles en los laboratorios bioquímicos. Por el contrario, SYPRO utiliza un reactivo sintético formado por complejos orgánicos de metales tipo rutenio, cuya síntesis es compleja y costosa, y la tinción con plata requiere de 9 reactivos que son los siguientes: nitrato de plata, glutaraldehído, formaldehído, tiosulfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, EDTA, metanol y ácido acético. El impacto económico se hace muy evidente cuando se calcula la influencia en los gastos de operación para un laboratorio de bioquímica o proteómica que realice un número considerable de geles semanales (Tabla 6).

#### Tinción inversa de proteínas no detectadas con azul de Coomassie

Se diseñó un procedimiento de tinción doble de geles teñidos con azul de Coomassie que utiliza como segundo método de detección la tinción inversa con sales de zinc e imidazol [60]. De esta manera, las bandas de proteínas mayoritarias se visualizan como bandas

Tabla 5. Comparación entre los tres métodos más populares de tinción de alta sensibilidad.

Método	Límite de detección	Gasto por gel de 20 x 20 cm	Número de pasos / tiempo total de operación	Volumen de agua de alta calidad*	Aplicación microanalítica
Zinc-imidazol	1-2 ng	0,22 USD	3 pasos / 20-30 min	1 L	Compatible
SYPRO ruby, Molecular Probes	1-2 ng	12,00 USD	7 pasos / 14 h	4 L	Compatible
PlusOne Silver Kit, Amersham Pharmacia	2-4 ng	14,28 USD	8 pasos / 18 h	4 L	Incompatible

\*Los precios de los reactivos están tomados de los catálogos disponibles en Internet, a la tarifa válida de agosto del 2001 para países de Sur América, sin los costos de transportación. No se ha incluido el costo del agua, calidad MilliQ.

Tabla 6. Gasto de detección para un laboratorio analítico tipo.\*

Método	10 geles	50 geles
Zinc-imidazol	2,21 USD	11,05 USD
SYPRO	1 250,00 USD	6 250,00 USD
Plata	142,80 USD	714,00 USD

\*No se incluye el componente salarial, que en este caso es muy importante por la gran diferencia de tiempo de operación.

típicas de color azul, que ahora aparecen superpuestas sobre bandas transparentes de dimensiones mayores. Ello se debe a la mayor sensibilidad de la tinción imidazol-SDS-zinc de 1 a 10 ng/banda, que hace que las zonas de las bandas con menor concentración de proteínas, a partir de los bordes, que no se detectan con azul de Coomassie, sí se detecten por tinción inversa. Por otro lado, las proteínas que no se detectaron con azul de Coomassie en el primer paso de tinción ahora aparecen como bandas negativas que se distinguen con facilidad sobre el fondo blanco del gel.

Esta técnica es útil para caracterizar la complejidad real de las mezclas de proteínas separadas en el gel [57], y para el microanálisis de proteínas poco abundantes [61], ya que muchas proteínas ácidas, o las que contienen una proporción alta de regiones de naturaleza no proteica como son los carbohidratos o lípidos se detectan con muy poca sensibilidad con azul de Coomassie. Es necesario señalar que el patrón de bandas generado en el segundo paso de tinción, a diferencia del obtenido con azul de Coomassie, deja de observarse si el gel se conserva por secado al vacío. En los geles deshidratados, el patrón de tinción inversa reaparece tras rehidratación. La manera de conservar el patrón de bandas detectadas por tinción inversa de manera permanente fue descrito por Ferraras y colaboradores en 1993 [32].

### Detección de ácidos nucleicos y glicolípidos bacterianos (LPS/LOS)

En los últimos años se ha ganado mucha experiencia en el uso de las sales de metales para detectar proteínas en geles, sin modificar su actividad biológica. A pesar de ello, los procedimientos de tinción con sales de metales pesados, de la forma en que se describieron originalmente [26-28], no se habían aplicado con éxito a la detección de otras biomoléculas como los ácidos nucleicos y lipopolisacáridos (LPS).

El grupo de trabajo del CIGB encontró que la asociación de los metales divalentes de transición, en particular el zinc catiónico, a las biomoléculas no es un fenómeno exclusivo de las proteínas, y por tanto pudo ser explotado para establecer métodos nuevos de detección de otras familias de biomoléculas. La Tabla 7 señala los grupos funcionales, presentes en macromoléculas biológicas de interés, que son capaces de for-

Tabla 7. Grupos funcionales que pueden potencialmente participar como ligando en la coordinación con el zinc (II).

Grupo	Biomolécula
R-NH <sub>2</sub>	Proteínas
N (Heterocíclico)	Proteínas, ADN
R-COO <sup>-</sup>	Proteínas, LPS
R-S-H	Proteínas
R-OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ácidos nucleicos
R-OH	LPS, ácidos nucleicos
R-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Complejo proteína-SDS

mar asociaciones con los metales de transición cuando están presentes en otros compuestos. Esta idea dio lugar al establecimiento de los procedimientos de detección de ácidos nucleicos y LPS [22] por tinción inversa o negativa.

### Tinción inversa de ácidos nucleicos

En 1996 se describió el primer procedimiento de detección de ADN de pequeña talla (<1 kpb) en geles de poli(acrilamida) (Tabla 8), con el uso de las sales de zinc e imidazol [35]. Mediante el procedimiento nuevo, el ADN se pudo detectar (Figura) como un patrón de bandas transparentes e incoloras, contrastantes claramente sobre un fondo de color blanco que se formó por la precipitación abundante de imidazolato de zinc (ZnIm<sub>2</sub>). Este procedimiento permitió también la tinción negativa de oligonucleótidos.

El límite de detección de ADN de doble cadena, desde 0,2 hasta 1 kpb, está en el orden de los 6 ng/banda. Esos niveles de detección son comparables a los informados con el uso de bromuro de etidio y luz ultravioleta de 300 nm, y superiores a los obtenidos con azul de metileno [18]. La sensibilidad es alta, de 7-13 ng/banda para oligos de 14-39 mer, ello ha demostrado la compatibilidad del método zinc-imidazol con la detección de ADN de simple cadena. Otros valores del procedimiento nuevo son su rapidez, consume 15 min o menos; simplicidad, solo dos pasos, inocuidad y reversibilidad. Su costo es menor que el del bromuro de etidio, y tiene la ventaja adicional de que las soluciones de zinc e imidazol se pueden almacenar por meses, mientras que la solución de bromuro de etidio es sensible a la luz, se tiene que almacenar en la oscuridad y es efectiva sólo unos pocos días.

Tabla 8. Protocolos de tinción inversa de ácidos nucleicos y LPS/LOS separados en geles.\*

Primer paso	Segundo paso	Tercer paso
ADN y oligonucleótidos: agua, 3 x 15 min	ZnSO <sub>4</sub> 10 mM, 15 min	ImH 0,2 M, 1-3 min
LPS/LOS: 30% acetonitrilo en agua, 3 x 15 min		

\*Los pasos segundo y tercero son iguales para las diferentes biomoléculas.

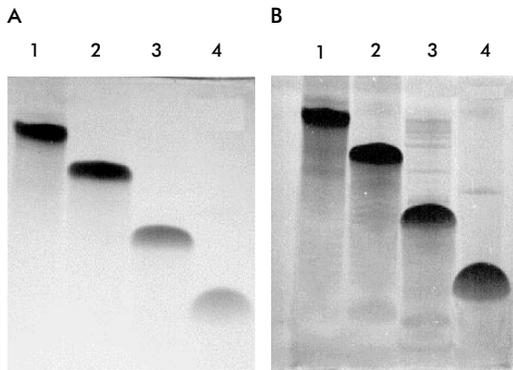


Figura. Visualización de mezclas crudas de oligonucleótidos sintéticos mediante dos métodos de tinción inversa. Los oligos (aproximadamente 130  $\mu$ g) se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, y a continuación se detectaron mediante luz ultravioleta a 254 nm (A) o zinc-imidazol (B). Carril 1, 5'-GGGGATCCACCATGGATTTTCAAGTCCAGATTTT-CAG-3' de 39 mer; carril 2, 5'-GATATTCTAGACTCACACCTTCC-TTGGCCAGG-3' de 31 mer; carril 3, 5'-GGCCAACCTGGGTG-ACAGAAC-3' de 21 mer, carril 4, 5'-CTAGACAACCACGC-3' de 14 mer.

### Tinción inversa de LPS/LOS en geles de poliacrilamida

En 1997 se extendió el uso de las sales de zinc e imidazol a la detección de LPS/LOS en geles de poliacrilamida-SDS. La visualización de glicolípidos bacterianos mediante zinc-imidazol permitió solucionar los principales inconvenientes de la tinción con plata, ya que no requiere de la oxidación con peryodato de los residuos de azúcar de los LPS/LOS, no los fija de forma irreversible en la matriz del gel, no los modifica químicamente y no destruye su funcionalidad [34]. Con anterioridad a 1997 no existían métodos de detección de LPS/LOS compatibles con aplicaciones micropreparativas. De esta forma se abrió una ruta nueva para micropurificar LPS/LOS funcionales, que puedan ser utilizados en análisis posteriores de importancia biológica. Otros atributos del método, en comparación con la plata, son su simplicidad, rapidez y ausencia de toxicidad. Se debe añadir que, mediante experimentos de retardación electroforética en geles de agarosa, el método zinc-imidazol facilitó la caracterización e identificación de péptidos sintéticos y proteínas naturales como la lisozima, que forman complejos con los LPS/LOS de bacterias [56].

### Mecanismo de tinción de biomoléculas con sales de metales

En la literatura se han descrito varios métodos que utilizan cationes metálicos para detectar y analizar proteínas separadas por electroforesis en gel. Las primeras tinciones de ese tipo que se desarrollaron hicieron uso de soluciones concentradas de cloruro de potasio y acetato de sodio para detectar las proteínas bajo condiciones de baja temperatura. Las proteínas se detectaron como bandas positivas de color blanco que probablemente involucraron el ión metálico [5]. En 1987, Lee y colaboradores describieron la tinción negativa de proteínas mediante el uso del  $\text{Cu}^{2+}$ , con una sensibilidad de 10 a 100 ng/banda, que es supe-

rior a la alcanzada con los procedimientos anteriores. La nueva tinción se explicó como la ocurrencia de dos procesos simultáneos: *i)* la formación del complejo insoluble  $\text{Cu}^{2+}$ -Tris-SDS en las regiones del gel libres de proteínas y *ii)* la formación de complejos de cobre y proteínas, con la consecuente inhibición de la precipitación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -Tris-SDS. Un año más tarde, Dzandu y colaboradores demostraron que la tinción negativa de proteínas es un fenómeno más general, válido también con otros metales, entre los que se incluyen el  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Co}^{2+}$ . Los mayores niveles de sensibilidad, 1 a 100 ng/banda, se obtuvieron con el catión  $\text{Zn}^{2+}$ . Estos investigadores discreparon con la explicación anterior propuesta por Lee y colaboradores y expusieron un modelo nuevo de tinción. La tinción positiva de las zonas del gel libres de proteínas se le atribuyó a la precipitación de hidróxidos, carbonatos, y cloruros. El patrón de bandas de proteínas transparentes sobre el fondo opaco se explicó por la repulsión de iones hidróxido, cloruro, o carbonato por el complejo proteína-SDS-metal, lo que conlleva a que se alcancen las condiciones físico-químicas necesarias para inhibir la precipitación del metal.

Las investigaciones anteriores no demostraron el mecanismo físico-químico que explica la tinción de las proteínas en el gel, y se limitaron a describir modelos apoyados en algunos elementos experimentales. Probablemente, ello se debió a que en el proceso de tinción participan muchas especies químicas diferentes cuyas reacciones dependen de varios indicadores como son el pH y la concentración de diferentes aniones que son muy difíciles de controlar después de la corrida electroforética.

Los resultados obtenidos con la aplicación del método de tinción inversa zinc-imidazol y las tres familias de biomoléculas, conllevó a la realización de investigaciones sobre la naturaleza química del precipitado que se forma en el gel, para tratar de establecer el mecanismo físico-químico que es responsable de la detección sensible de biomoléculas con zinc-imidazol [56].

Para analizar la reacción entre el zinc catiónico y el imidazol se varió de forma sistemática la concentración y el orden de adición de los reactivos en solución, en presencia o ausencia de SDS [59]. Se comprobó que las proporciones molares de los reactivos de tinción y la concentración de SDS en el medio de reacción pueden ser críticos para el resultado de la reacción entre el zinc y el imidazol. Con la ayuda del análisis químico elemental y la espectroscopia infrarroja se identificó el precipitado responsable de la tinción del gel, que es el  $\text{ZnIm}_2$  [56]. Ello indicó que los procedimientos llamados originalmente imidazol-zinc [29], imidazol-SDS-zinc [31], y zinc-imidazol [34-36, 56] representan vías diferentes para la precipitación selectiva en el gel de un mismo producto.

En comparación con los métodos anteriores, el  $\text{ZnIm}_2$  tiene la menor constante del producto de solubilidad, 5 órdenes de magnitud menor que la del hidróxido de zinc y 9 órdenes de magnitud menor que la del carbonato de zinc. Ello explica la formación de un patrón adecuado de bandas negativas sobre un fondo teñido positivamente en el gel con el uso de una concentración de zinc tan baja como 10 mM.

Las diferencias de los niveles de sensibilidad de detección se pueden explicar por las afinidades diferentes de las biomoléculas por el zinc catiónico. En la práctica este indicador no es predecible, por lo que se ha requerido de pruebas bajo condiciones experimentales diferentes para alcanzar una sensibilidad alta [34-37, 56].

Como una consecuencia práctica de este conocimiento se pudo inferir el uso de otras vías de precipitación selectiva de  $ZnIm_2$  en el gel para detectar biomoléculas separadas por electroforesis. Dado ello, se desarrolló un procedimiento único de tinción de proteínas, ácidos nucleicos y LPS/LOS en geles [56], el cual se basa en la incubación breve, aproximadamente 3 min del gel en una mezcla de zinc e imidazol a pH ligeramente ácido que inhibe la precipitación de imidazolato de zinc, seguido por la inmersión del gel en un tampón básico como el carbonato de sodio que permite la precipitación de  $ZnIm_2$  y produce un patrón de bandas transparentes e incoloras sobre el fondo blanco. La sensibilidad del procedimiento nuevo es alta, se encuentra en el rango bajo de los nanogramos por banda, y mantiene todas las ventajas de los procedimientos específicos previamente desarrollados para cada tipo de biomolécula.

## Conclusiones

Como resultado de una década de investigación y desarrollo en la detección de biomoléculas en geles de electroforesis, hoy se cuenta con hechos sólidos que permiten las afirmaciones siguientes: *i)* Las sales de zinc e imidazol se pueden utilizar para la detección de ácidos nucleicos, glicolípidos bacterianos, complejos LPS-polipéptidos y de proteínas, incluso aquellas no

detectables con azul de Coomassie. En comparación con otros métodos, este nuevo tipo de detección combina atributos muy deseados tales como una sensibilidad alta, simplicidad, rapidez, reversibilidad, costo bajo y ausencia de toxicidad. La detección de biomoléculas separadas en geles con zinc e imidazol, es 64 veces más económica que la detección con sales de plata y 568 veces más económica que la detección con reactivos fluorogénicos. *ii)* El método zinc-imidazol no destruye la funcionalidad de las biomoléculas, lo que lo convierte en un candidato de elección en estrategias de micropurificación para caracterizaciones bioquímicas o usos posteriores. *iii)* Los procedimientos de tinción de biomoléculas, imidazol-zinc, imidazol-SDS-zinc, y zinc-imidazol representan vías diferentes para la precipitación selectiva en el gel de un mismo producto: imidazolato de zinc. *iv)* El fundamento del modelo que explica la tinción inversa de las biomoléculas se basa en la precipitación selectiva de  $ZnIm_2$  en la matriz de electroforesis. La incubación breve del gel de poliacrilamida en una mezcla de zinc catiónico e imidazol a pH ligeramente ácido, seguido por la inmersión del gel en un tampón básico, es un procedimiento general que permite la tinción inversa no diferencial, con sensibilidad elevada, de ácidos nucleicos, LPS/LOS, y proteínas.

## Agradecimientos

Estamos en deuda con los Lics. E. Pupo, A. Sosa, y R. Cazalvilla; J. A. Silva por su contribución en los protocolos de detección de biomoléculas y con los Drs. J. Fernández-Bertrán y E. Navarro por su contribución en la investigación del mecanismo de tinción inversa.

1. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982;119:115-9.

2. Sealey PG, Southern EM. Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach. Washington DC: IRL Press; 1982.

3. Lesse AJ, Campagnari AA, Bittner WE, Apicella MA. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immun Meth* 1990;126:109-17.

4. Patterson SD. From electrophoretically separated protein to identification: strategies for sequence and mass analysis. *Anal Biochem* 1994;221:1-15.

5. Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D, editors. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. New York: Oxford Univ. Press; 1990. p.1-101.

6. Daban JR, Aragay AM. Rapid fluorescent staining of histones in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1984;138:223-8.

7. Horowitz PM, Bowman S. Ion-enhanced fluorescence staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using Bis (8-*r*-toluidino-1-naphthalenesulfonate). *Anal Biochem* 1987;165:430-4.

8. Daban JR, Bartolomé S, Samso M. Use of the hydrophobic probe Nile red for the fluorescent staining of protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991a;199:169-74.

9. Daban JR, Samso M, Bartolomé S. Use of

Nile red as a fluorescent probe for the study of the hydrophobic properties of protein-sodium dodecyl sulfate complexes in solution. *Anal Biochem* 1991b;199:162-8.

10. Daban JR. Fluorescent labeling of proteins with Nile red and 2-methoxy-2, 4-diphenyl-3 (2H)-furanone: physicochemical basis and application to the rapid staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels and Western blots. *Electrophoresis* 2001;22:874-80.

11. Copeland RA. Reverse fluorescence staining of proteins in polyacrylamide gels using terbium chloride. *Anal Biochem* 1994;220:218-9.

12. Steinberg TH, Haugland RP, Singer VL. Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal Biochem* 1996;239:238-45.

13. Steinberg TH, Jones LJ, Haugland RP, Singer VL. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of proteins. *Anal Biochem* 1996;239:223-37.

14. Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg TH, Kemper C, López MF, Diwu Z, et al. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one and two dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminiscent ruthenium complex. *Electrophoresis* 2000;21:509-21.

15. Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* 2000;21:1123-44.

16. Steinberg TH, Lauber WM, Berggren K, Kemper C, Yue S, Patton WF. Fluorescence

detection of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using environmentally benign, nonfixative saline solution. *Electrophoresis* 2000;21:497-508.

17. Malone JP, Radabaugh MR, Leimgruber RM, Gerstenecker GS. Practical aspects of fluorescent staining for proteomic applications. *Electrophoresis* 2001;22:919-32.

18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor University Press; 1989.

19. Ogden RC, Adams DA. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Meth Enzymol* 1987;52:61-87.

20. Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung CY, Yue S, et al. Characterization of SYPRO gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Anal Biochem* 1999;268:278-88.

21. Mabuchi T, Nishikawa S. Characterization of the selective staining of DNA on gels using two fluorochromes. *Electrophoresis* 2000;21:865-73.

22. Kido N, Ohta M, Kato N. Detection of lipopolysaccharides by ethidium bromide staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1990;172:1145-7.

23. Nelles LP, Bamberg JR. Rapid visualization of protein-dodecyl sulfate complexes in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1976;73:522-31.

24. Hager D, Burgess R. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and rena-

- turation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal Biochem* 1980;109:76-86.
25. Wallace RW, Yu P, Dieckert J. Visualization of protein-SDS complexes in polyacrylamide gels by chilling. *Anal Biochem* 1974;61:86-92.
26. Lee C, Levin A, Branton D. Cooper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1987;166:308-12.
27. Dzandu J, Johnson F, Wise GE. Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis: staining of polypeptides using heavy metal salts. *Anal Biochem* 1988;174:157-61.
28. Adams LD, Weaver KM. Detection and recovery of proteins from gels following zinc chloride staining. *Appl Theor Electrophoresis* 1990;1:279-82.
29. Fernández-Patrón C, Castellanos-Serra L. Protein detection with imidazole and zinc salts. Eight International Conference on Methods on Protein Sequence Analysis (Abstract Booklet); 1990 July 1-6; Kiruna, Sweden.
30. Fernández-Patrón C, Castellanos-Serra L, Rodríguez P. Reverse staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *BioTechniques* 1992;12:564-73.
31. Ortiz ML, Calero M, Fernández-Patrón C, Castellanos-Serra L, Méndez E. Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Lett* 1992;296:300-04.
32. Ferraras M, Gavilanes JG, García-Segura JM. A permanent Zn<sup>2+</sup> reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1993;213:206-12.
33. Fernández-Patrón C. Nuevo sistema de detección de proteínas separadas mediante electroforesis en geles. Aplicación al microanálisis de proteínas [dissertation]. Ciudad de La Habana: Universidad de La Habana; 1995.
34. Hardy E. Detección con zinc-imidazol de biomoléculas en geles: aplicaciones analíticas y micropreparativas [dissertation]. Ciudad de La Habana: Universidad de La Habana; 1998.
35. Hardy E, Pupo E, Casavilla R, Sosa A, Trujillo E, López E, Castellanos-Serra L. Negative staining with zinc-imidazole of gel electrophoresis-separated nucleic acids. *Electrophoresis* 1996;17:1537-41.
36. Hardy E, Pupo E, Silva JA, Silva R, Coizeau E, Castellanos-Serra L. Elution of unmodified oligodeoxynucleotides from zinc-imidazole negatively stained polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1998;264:127-9.
37. Hardy E, Pupo E, Castellanos-Serra L, Reyes J, Fernández-Patrón C. Sensitive reverse staining of bacterial lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using zinc and imidazole salts. *Anal Biochem* 1997;244:28-32.
38. Neuhoff V, Stanam R, Pardowitz I, Arnold N, Ernhardt W, Taube D. Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* 1990;11:101-7.
39. Chen H, Cheng H, Bjerknes M. One-step Coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1993;212:295-6.
40. Lin F, Fan W, Wise GE. Eosin Y staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991;196:279-83.
41. Choi JK, Yoon SH, Hong HY, Choi DK, Yoo GS. A modified blue staining of proteins in polyacrylamide gel with Bismark brown R. *Anal Biochem* 1996;236:82-4.
42. Lloyd MD. Fast staining and destaining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991;241:139.
43. Flores N, Valle F, Bolívar F, Merino E. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. *BioTechniques* 1992;13:203-5.
44. Yashima E, Suehiro N, Miyauchi N, Akashi M. Affinity gel electrophoresis of nucleic acids. Nucleobase-selective separation of DNA and RNA on agarose-poly (9-vinyladenina) conjugated gel. *J Chromat A* 1993;654:151-8.
45. Santillán-Torres JL, Ponce-Noyola P. A novel stain for DNA in agarose gels. *TIBS* 1993;9:40.
46. Adkins S, Burmeister M. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* 1996;240:17-23.
47. Jung DW, Yoo GS, Choi JK. Detection of DNA in agarose gels using berberine and Mordant Yellow 3R. *Anal Biochem* 1999;272:254-6.
48. Yang YI, Hong HY, Lee IS, Bai DG, Yoo GS, Choi JK. Detection of DNA using a visible dye, Nile blue, in electrophoresis gels. *Anal Biochem* 2000;280:322-4.
49. Yang Y, Jung DW, Bai DG, Yoo GS, Choi JK. Counterion-dye staining method for DNA in agarose gels using crystal violet and methyl orange. *Electrophoresis* 2001;22:855-9.
50. Nielsen BL, Brown LR. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1984;141:311-5.
51. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985;6:103-12.
52. Merrill CR, Dunav ML, Goldmann D. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981;110:201-7.
53. Vari F, Bell K. A simplified silver diamine method for the staining of nucleic acids in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1996;17:20-5.
54. Mold DE, Weingart J, Assaraf J, Lubahn DB, Kelmer DN, Shaw BR, et al. Silver staining of histone in Triton-acid-urea gels. *Anal Biochem* 1983;135: 44-7.
55. Fomsgaard A, Freudenberg MA, Galanos C. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharides in polyacrylamide gel. *J Clin Microbiol* 1990;28:2627-31.
56. Fernández-Patrón C, Castellanos-Serra L, Hardy E, Guerra M, Estévez E, Mehl R, et al. Understanding the mechanism of the zinc-ion stains of biomacromolecules in electrophoresis gels: generalization of the reverse staining technique. *Electrophoresis* 1998;19:2398-406.
57. Castellanos-Serra L, Fernández-Patrón C, Hardy E, Santana H, Huerta V. High yield elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels at the low-picomole level. Application to N-terminal sequencing of a scarce protein and to in solution biological activity analysis of on-gel renatured proteins. *J Prot Chem* 1997;16:415-9.
58. Castellanos-Serra L, Vallín A, Proenza W, Le Caer JP, Rossier J. An optimized procedure for detection of proteins on carrier ampholyte isoelectric focusing and immobilized pH gradient gels with imidazole and zinc salts: its application to the identification of isoelectric focusing separated isoforms by in-gel proteolysis and mass spectrometry analysis. *Electrophoresis* 2001;22:1677-85.
59. Castellanos-Serra L, Hardy E, Proenza W, Huerta H, González LJ, Le Caer JP, Moritz R, Simpson R. Reversible negative staining of protein on electrophoresis gels by imidazole-zinc salts: micropreparative applications to proteome analysis by mass spectrometry. In: Kamp RM, Kyriakidis O, Choli-Papadodlulou T, editors. *Proteins and proteome analysis*. Heidelberg: Heidelberg Springer; 1999. p.29-52.
60. Fernández-Patrón C, Hardy E, Sosa A, Seoane J, Castellanos-Serra L. Double staining of Coomassie blue stained gels by imidazole-zinc reverse staining: sensitive detection of Coomassie blue undetected proteins. *Anal Biochem* 1995;24:263-9.
61. Gevaert K, DeMol H, Verschelde JL, Van Danne, J, De Boeck S, Vandekerckhove J. Novel techniques for identification and characterization of proteins loaded on gels in femtomole amounts. *J Prot Chem* 1997;16: 335-42.