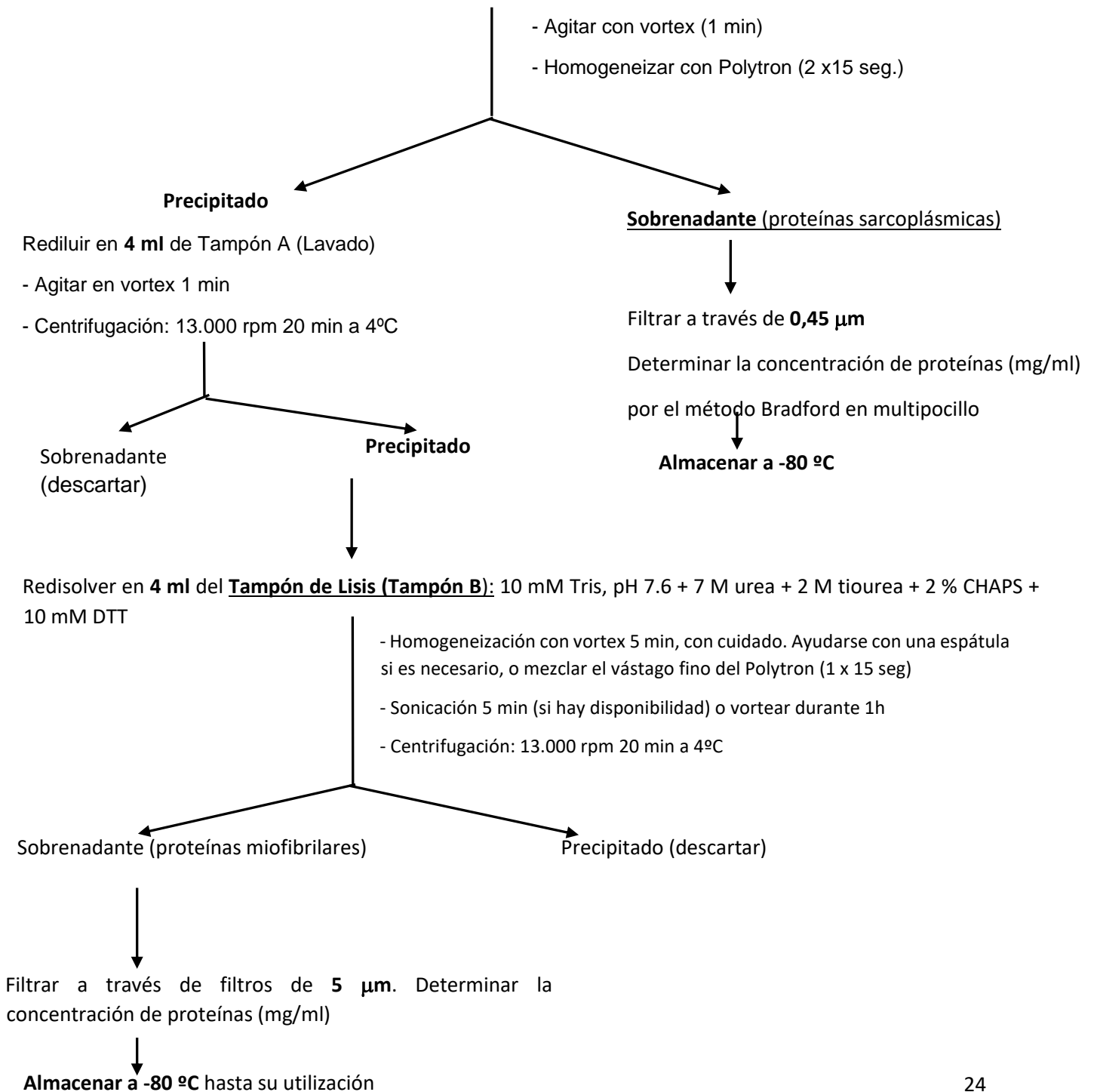


7 ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES.

EXTRACCION DE PROTEÍNAS MUSCULARES

0,5 g de carne congelada (-80 °C): añadir **3,975 ml** del **Tampón A** (10 mM Tris, pH 7.6 + 1 mM EDTA + 0,25 M sacarosa) + 25 µL cocktail inhibidores (P8340 Sigma)



ANEXO 2. PROTOCOLO PREPARACIÓN GELES POLIACRILAMIDA.

PROTOCOLO REALIZACIÓN GELES POLIACRILAMIDA PARA ELECTROFORESIS

1. MONTAJE SOPORTE PREPARACIÓN GELES (1.5mm grosor)

- Orden: (parte interna) vidrio blanco / separador / cristal (parte externa)
- Asegurar que no monte con el separador y apretar tornillos (para que no rompa)
- Poner en el soporte y subir “tornillos” hacia arriba a la vez para sellar parte inferior
- Echar agua para comprobar que no fuga y retirar mientras hago el Resolving

2. PREPARACIÓN DISOLUCIÓN PERSULFATO DE AMONIO (10% - 0.1g/mL)

Persulfato muy sensible a la humedad, bote sellado con parafilm

- Rotular Eppendorf de 1.5 mL
- Pesar en torno a **0.1 g** de persulfato de amonio y apuntar cantidad exacta

$$V \text{ H}_2\text{O} (\mu\text{L}) = 10000 * \text{peso}$$

(Ej: 0.0965 gramos equivalen a 0.965 mL = 965 μL)

3. PREPARACIÓN RESOLVING

solución de acrilamida Tóxica sin polimerizar

- En vaso de 100 mL

Cantidades:	RESOLVING				Total Monomer %
	8%	10%	12%	15%	
Protogel (30%)	5.6 mL	8 mL	9.6 mL	12 mL	
Resolving Buffer (1.5M tris, 0.4% SDS)	6.0 mL	6 mL	6 mL	6 mL	
H₂O	7.3 mL	4.9 mL	3.3 mL	0.9 mL	
Glycerol (50 %)	4.8 mL	4.8 mL	4.8 mL	4.8 mL	
ammonium persulfate (10%)	240 μL	240 μL	240 μL	240 μL	
TEMED	24 μL	24 μL	24 μL	24 μL	

- Mover cada vez que añadido un componente suavemente (burbujas)
- Preparar pipeta para rellenar el molde (vacío y seco) antes de echar persulfato y TEMED
- Llenar con pipeta de 10-1000 μL con cuidado hasta el borde de la pieza móvil que apreta (gris)
- Pipetear **500 μL** de isopropanol y esperar **20 minutos** a que polimerice (asegurarse con el resto que queda en el vaso)
- Vaciar el isopropanol, lavar con agua (pipetear llenando hasta arriba el hueco), vaciar y secar.

4. PREPARACIÓN STACKING

- En vaso de 100 mL

- Cantidades:

	STACKING	Total monomer %
	3%	
Protogel (30%)	0.6 mL	
Stacking Buffer (0.5M tris, 0.4% SDS)	1.5 mL	
H₂O	2.6 mL	
Glycerol (50 %)	1.2 mL	
ammonium persulfate (10%)	60 µL	
TEMED	6 µL	

- Mover cada vez que añado un componente suavemente (burbujas)
- Preparar pipeta para rellenar el molde (vacío y seco) antes de echar persulfato y TEMED
- Llenar con pipeta de 10-1000 µL con cuidado hasta arriba del todo, que rebase
- Poner el peine y las pinzas (parte larga fuera) y esperar **30-40 minutos** a que polimerice (asegurarse con el resto que queda en el vaso)

6 Preparar un trozo largo de papel estirado en la bancada y humedecerlo

7 Quitar los geles del soporte y envolverlos en el papel húmedo (poner 1 y tras un par de vueltas, el otro)

8 Envolver todo (geles y papel) en papel de plata y guardar en nevera rotulado.

ANEXO 3. PROTOCOLO REALIZACIÓN ELECTROFORESIS.

PROTOCOLO REALIZACIÓN ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

1. Realización de geles (**PROTOCOLO REALIZACIÓN GELES POLIACRILAMIDA PARA ELECTROFORESIS**)
2. Rotulo eppendorf de 0,5mL
3. PREPARACIÓN MUESTRAS.
 - **20µL** muestra + **20µL** de sample buffer azul (0.088M de Tris-HCl, 10% glicerol, 2% SDS, 0.2 M OTT, 4.4% agua bidestilada y azul de bromofenol)
 - Vortex
 - meter 4 min a calentar AccuBlock (+**-95°C**)
 - dejar enfriar y al hielo
4. PREPARACIÓN DISOLUCIÓN ELECTROLÍTICA (dilución 1/5)
 - **100mL** de “reservoir buffer 5x” + **400mL** agua bidestilada fresca
 - Tapar con parafilm la boca de la probeta y voltear para mezclar
5. MONTAJE DE LA CUBETA ELECTROLÍTICA
 - llenar la cubeta con la disolución electrolítica preparada hasta el escalón
 - desenvolver los geles y marcar los fondos de los pocillos
 - poner los geles en el soporte (hacia fuera) cogiéndolos con las pinzas (parte larga fuera)
 - llenar el compartimento posterior del gel de disolución electrolítica y esperar 5 min
 - retirar los peines
6. LLENADO DE LOS POCILLOS
 - Diseñar la distribución de las muestras en los pocillos
 - Sacar el estándar del congelador
 - Vortex a muestras y estándar previo pipeteo
 - Inyectar las muestras (cantidades **calculadas en Excel**) y el estándar (**7µL**).
7. Volver a rellenar el compartimento posterior y limpio los bornes
8. Cerrar la cubeta de electroforesis, conectar los cables cada uno con su color. Seleccionar mA y abajo en A y subir (flechas) hasta **50mA**.
9. PREPARACIÓN SOLUCIÓN FIJADORA (Antes de que el frente recorra todo el gel)

- Pesar **12 grs** Ácido tricloroacético (debajo de la campana) en el granatario y en vaso grande (Corrosivo)
- Verter **100mL** de agua bidestilada fresca
- Mezclar con pececillo

10. Cuándo el frente haya recorrido todo el gel, PARAR ELECTROFORESIS.

- Quitar tapa
- Quitar pinzas
- Sacar los 2 geles 1 por 1

11. PONER GELES EN SOLUCIÓN FIJADORA

Poner todos los materiales para limpiar en agua mientras se van desechando

Primer gel sacar se mete con lo blanco al fijador mientras saco el otro entero

- Levantar el cristal con el dedo índice sujetando con la uña del dedo gordo el separador.
- Quitar el stacking (al contenedor amarillo de residuos)
- Hacer **muesca** en el gel en la **esquina** superior derecha
- Separar con la tarjeta el gel del vidrio blanco y dejar en la solución fijadora en tuppers rotulados (2x50ml)
- Dejar en movimiento a **41rpm** mínimo **1 hora** (o de 1 día para otro)
- Recoger tricloroacético en su garrafa de residuo.
- Hacer 2 lavados: -**200mL** agua bidestilada
 - **15 minutos** movimiento **41rpm**

12. PREPARACIÓN TINCIÓN (BLUE SILVER) (V=400mL)

siempre agitando suave con pececillo

guardado en tarro (debajo de mi bancada)

1) Ác. Ortofosfórico 10% (p/v)

Riqueza 85%

Densidad 1.71 g/ml

- disolver **34.4ml** o **58.8grs** de ác. orto-fosfórico en **300mL** de agua bidestilada fresca.

2) Sulfato de amonio 10% (p/v)

- diluir **50grs** con los 300mL de antes.

- **enrasar a 400mL**

3) Coomassie G-250, 0.12% (p/v)

- pesar **0.6grs** con cuchara grande en plata con cuidado de no manchar

- echar en los 400mL ya preparados **poco a poco**, muy despacio (formación coloides)

13. TINCIÓN DE LOS GELES

- Mezclar **80mL** de Blue Silver + **20mL** de metanol (en la campana)

- Mezclar con pececillo y echar **50mL** a cada gel y dejar teñir mínimo **12 horas** y movimiento **41rpm**
- Hacer 3 lavados (hasta quitar coloración al agua):
 - **200mL** agua bidestilada fresca
 - **15 minutos**
 - **41rpm**

ANEXO 4. PROTOCOLO DE DIGESTIÓN EN GEL.

IN-GEL DIGESTION OF PROTEINS FOR MALDI-TOF ANALYSIS AND NANO ELECTROSPRAY MS

Reagents:

- 1) 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0). Prepare fresh.
- 2) 100% acetonitrile
- 3) Trypsin solution (12.5 µg/ml trypsin diluted in reagent 1). This should be stored at -80 °C in aliquots.
- 4) 50% ACN/50% H₂O with 0.1% Formic Acid

Procedure:

Day 1:

1. Place the gel in a glass plate with a little of pure water.
2. Cut the band with a scalpel and place it in a small glass plate. Cut the band in small pieces in order to better favour digestion. Then take all fragments (two scalpels can be used for better handling) and put them into 0.5 ml Eppendorf tubes (do not touch them with hands!).

NOTE: If gels are stained with compatible silver staining (ProteoSilver™, Sigma), then there is no need to make a previous destaining step.

3. **Equilibration:** Add 50 µL of 50 mM ammonium bicarbonate. Place tubes in a mechanical agitator for ≈ 10 min. Remove the solvent with capillary tips (for not removing the gel particle, just the liquid). Make this twice.

4. **Drying:** Dry pieces by adding 50 µL of 100% acetonitrile. At the end of this step the gel pieces shrink and turn opaque. Make this twice.

5. **Drying 2:** Once the liquid has been removed with the tips, dry the remaining liquid by using dry-vacuum for ≈ 30 min.

6. Thaw **trypsin solution** (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Add 15 μL of this solution to each gel band. Then, in order to cover all the gel with liquid, add ≈ 15 μL of 50 mM ammonium bicarbonate.

7. INCUBATION: 12-16 hours (overnight) at 37°C with smooth shaking.

Day 2:

7. Recover peptides: Add ≈ 25 μL of 50% ACN/50% H_2O with 0.1% Formic Acid to gel piece in order to wash the gel and recuperate peptides. Vortex the Eppendorf tubes for 30 sec, then sonicate for 15 min. Use gel-loading pipette tips to avoid taking gel pieces. After that, remove this supernatant into a clean eppendorf tube (this solution contains the peptides). After this, add to gel pieces another 25 μL of 50% ACN/50% H_2O with 0.1% Formic Acid and repeat the process.

Remove this liquid and combine with the previous peptide solution.

9. **Concentration:** Dry the solution by using a Speed Vac until a final volume of ≈ 5 μL or completely dry. Resuspend in 40 μL of 0.1 % Formic Acid (in water only!). Place the solution in inserts for HPLC vials.

ANEXO 5. RESULTADOS ANÁLISIS MASCOT BANDAS TANDA 1.

banda	acrónimo	nombre prot.	especie	Monoisotopic mass (Mr)	Calc mass	IQ mass	Mascot score	TANDA 1	
								% sec. cubierta	database
1	A0A452DI18	ATP synthase subunit beta	<i>Bos Taurus</i>	62187			123	7	UP9136_B_taurus
	F1MLB8	ATP synthase subunit alpha	<i>Bos Taurus</i>	59653			77	11	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1LN23	Calsequestrin	<i>Bos Taurus</i>	42584	69184	69588	42	3	UP9136_B_taurus
2	DESM_BOVIN	Desmin	<i>Bos Taurus</i>	53499			31	2	SwissProt
	TPM2_BOVIN	Tropomyosin beta chain	<i>Bos Taurus</i>	32817			254	17	SwissProt
3	TPM1_BOVIN	Tropomyosin alpha-1 chain	<i>Bos Taurus</i>	32675	45877	49487	66	7	SwissProt
	A0A3Q1LMG1	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Bos Taurus</i>	39508			66	10	UP9136_B_taurus
4	TPM1_BOVIN	tropomyosin alpha-1 chain	<i>Bos Taurus</i>	32675			64	8	SwissProt
	LDHA_BOSMU	L-lactate dehydrogenase A chain	<i>Bos Taurus</i>	36662	40558	42666	45	17	SwissProt
5	ADT1_BOVIN	ADP/ATP translocase 1	<i>Bos Taurus</i>	32946	36600	37775	76	4	SwissProt
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	<i>Bos Taurus</i>	40804			72	10	UP9136_B_taurus
6	A6QP89	MVBPC1 protein	<i>Bos Taurus</i>	133896			89	3	UP9136_B_taurus
	Q0VCY0	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	<i>Bos Taurus</i>	109220	113264	109306	41	1	UP9136_B_taurus
7	Q0VCY0	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	<i>Bos Taurus</i>	109220			154	4	UP9136_B_taurus
	F1MRC2	Myosin-2	<i>Bos Taurus</i>	223194	88522	87602	138	2	UP9136_B_taurus
8	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	<i>Bos Taurus</i>	40804			76	5	UP9136_B_taurus
	TCO2_BOVIN	Transcobalamin-2	<i>Bos Taurus</i>	47928	36600	37943	41	1	SwissProt
9	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	<i>Bos Taurus</i>	42962			157	13	SwissProt
	Q3T149	Heat shock protein beta-1	<i>Bos Taurus</i>	20919	36600	28455	88	16	UP9136_B_taurus
10	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	<i>Bos Taurus</i>	42962	19362	20780	79	6	UP9136_B_taurus
							120	9	SwissProt

banda	acrónimo	nombre prot.	especie	Monoisotopic mass (Mr)	Calc mass	IQ mass	Mascot score	TANDA 1	
								% sec. cubierta	database
SIN IDENTIFICAR									
12	A0A3Q1LMG1	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Bos Taurus</i>	39508	46688	45747	86	14	UP9136_B_taurus
13	E1BDJ9	Myozenin-1	<i>Bos Taurus</i>	36276			68	13	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	<i>Bos Taurus</i>	40804	44110	43112	46	4	UP9136_B_taurus
14	G3P_BOVIN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Bos Taurus</i>	35845	38270	38101	155	22	SwissProt
	A0A3Q1LKJ5	Myosin heavy chain 8	<i>Bos Taurus</i>	217314			117	2	UP9136_B_taurus
15	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	<i>Bos Taurus</i>	43541	41086	41783	105	4	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, slow skeletal muscle	<i>Bos Taurus</i>	40804			48	3	UP9136_B_taurus
16	ADT1_BOVIN	ADP/ATP translocase 1	<i>Bos Taurus</i>	32946	33203	33176	77	4	SwissProt
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	<i>Bos Taurus</i>	40804			41	4	UP9136_B_taurus
17	ADT1_BOVIN	ADP/ATP translocase 1	<i>Bos Taurus</i>	32946	33203	33672	112	4	SwissProt
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	<i>Bos Taurus</i>	40804			66	4	UP9136_B_taurus
18	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	<i>Bos Taurus</i>	42962	27605	27540	84	9	SwissProt
	A0JNJ5	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	<i>Bos Taurus</i>	20919			69	12	UP9136_B_taurus
banda	acrónimo	nombre prot.	especie	Monoisotopic mass (Mr)	Calc mass	IQ mass	Mascot score	% sec. cubierta	database
TANDA 1									

ANEXO 6. RESULTADOS ANÁLISIS MASCOT BANDAS TANDA 2.

banda	acrónimo	nombre prot.	especie	Monoisotopic mass (Mr)	Calc mass	Mascot score	TANDA 2	
							% sec. cubierta	database
1	TPM1_BOVIN	Tropomyosin alpha-1 chain	Bos Taurus	32675	40630	97	8	SwissProt
	A0A3Q1LMG1	Fructose-bisphosphate aldolase	Bos Taurus	39508		76	10	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	Bos Taurus	40804	38987	45	16	UP9136_B_taurus
2	A0A3Q1LPQ6	Tropomyosin alpha-1 chain	Bos Taurus	38503		44	3	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	Bos Taurus	40804	37410	49	16	UP9136_B_taurus
3	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541		36	4	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1LMG1	Fructose-bisphosphate aldolase	Bos Taurus	39508		97	10	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1LQX6	Tropomyosin alpha-1 chain	Bos Taurus	49093	40630	50	6	UP9136_B_taurus
4	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541		31	4	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1LPQ6	Tropomyosin alpha-1 chain	Bos Taurus	38503	38454	73	11	UP9136_B_taurus
5	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	Bos Taurus	40804		32	5	UP9136_B_taurus
	SIN IDENTIFICAR							
6	SIN IDENTIFICAR							
7	G3P_BOVIN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Bos Taurus	35845	33975	40	18	SwissProt
	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541	30433	41	4	UP9136_B_taurus
8	G3P_CANLF	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Bos Taurus	35838		90	8	SwissProt
	F1MDC0	RBR-type E3 ubiquitin transferase	Bos Taurus	121973	33975	50	1	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541		37	4	UP9136_B_taurus
10	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	Bos Taurus	42962		85	9	SwissProt
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	Bos Taurus	40804	30433	59	10	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541		58	4	UP9136_B_taurus
11	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	Bos Taurus	42962	27638	67	9	SwissProt
	F1N2F2	Phosphoglycerate mutase	Bos Taurus	28681		54	5	UP9136_B_taurus
12	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	Bos Taurus	42962	27638	151	13	SwissProt
	A0A3Q1M2X5	Alpha-actinin-3	Bos Taurus	101746		689	30	UP9136_B_taurus
16	ACTN2_BOVIN	Alpha-actinin-2	Bos Taurus	103713	106460	661	23	SwissProt
	A0A3Q1MCM9	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein	Bos Taurus	121264		51	1	UP9136_B_taurus
17	QOVCY0	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Bos Taurus	109220	102155	285	11	UP9136_B_taurus
	F1MJ28	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	Bos Taurus	97218		283	17	UP9136_B_taurus
	SIN IDENTIFICAR							
21	A0A140T897	Albumin	Bos Taurus	69278		179	12	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1LM55	Heat shock cognate 71 kDa protein	Bos Taurus	71720	83008	110	7	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1M318	Annexin	Bos Taurus	75621		73	3	UP9136_B_taurus
SIN IDENTIFICAR								
23	KCRM_BOVIN	Creatine kinase M-type	Bos Taurus	42962	95516	30	3	SwissProt
banda	acrónimo	nombre prot.	especie	Monoisotopic mass (Mr)	Calc mass	Mascot score	% sec. cubierta	database
TANDA 2								

ANEXO 7. RESULTADOS ANÁLISIS MASCOT BANDAS TANDA 3.

Nº banda	acrónimo	nombre prot.	especie	Monoisotopic mass (Mr)	IQ mass	Mascot score	TANDA 3	
							% sec. cubierta	database
1	E1BC51	G protein-coupled receptor 176	Bos Taurus	57038	89043	26	3	UP9136_B_taurus
2			SIN IDENTIFICAR					
3	E1BF23	Myomesin 2	Bos Taurus	167960	133774	146	4	UP9136_B_taurus
4	FLMHT1	4-alpha-glucanotransferase	Bos Taurus	173975	126470	37	1	UP9136_B_taurus
	E1BF23	Myomesin 2	Bos Taurus	167960		34	1	UP9136_B_taurus
5	A0A3Q1MC60	Nebulin	Bos Taurus	943219	262484	89	0	UP9136_B_taurus
6			SIN IDENTIFICAR					
7	A0A3Q1LU35	Filamin	Bos Taurus	283104	220807	38	1	UP9136_B_taurus
8	A6QP89	MYBPC1 protein	Bos Taurus	133896	111775	36	4	UP9136_B_taurus
9	A6QP90	MYBPC1 protein	Bos Taurus	133896	112990	114	7	UP9136_B_taurus
10'	A0A3Q1LWS8	Alpha-actinin-2	Bos Taurus	104023	105896	348	14	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1MZX5	Alpha-actinin-3	Bos Taurus	101746		325	18	UP9136_B_taurus
	Q0VCY0	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Bos Taurus	109220		35	1	UP9136_B_taurus
11	A0A3Q1MK67	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	Bos Taurus	93368	82592	30	3	UP9136_B_taurus
12	FLMRC2	Myosin-2	Bos Taurus	223194	73336	65	2	UP9136_B_taurus
	Q0VCY0	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Bos Taurus	109220		38	3	UP9136_B_taurus
13	Q0VCY0	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Bos Taurus	109220	73336	40	3	UP9136_B_taurus
	FLMM07	Myosin-7	Bos Taurus	223100		32	0	UP9136_B_taurus
	DESM_BOVIN	Desmin	Bos Taurus	53499		94	13	SwissProt
14	A0A452DI18	ATP synthase subunit beta	Bos Taurus	62187	55372	47	5	UP9136_B_taurus
	FLMFC4	Phospholipid-transporting ATPase	Bos Taurus	160363		41	1	UP9136_B_taurus
	TPM2_BOVIN	Tropomyosin beta chain	Bos Taurus	32817		35	10	SwissProt
15	ATPA_BOVIN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Bos Taurus	59683	52460	60	5	SwissProt
	A0A452DI18	ATP synthase subunit beta	Bos Taurus	62187		51	5	UP9136_B_taurus
	A0A452DI18	ATP synthase subunit beta	Bos Taurus	62187		159	12	UP9136_B_taurus
16	ATPA_BOVIN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Bos Taurus	59683	53606	49	10	SwissProt
	TPM2_BOVIN	Tropomyosin beta chain	Bos Taurus	32817		48	4	SwissProt