



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Búsqueda de nuevos marcadores bioquímicos capaces de
detectar carnes de vacuno defectuosas a tiempos
postmortem tempranos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Alegre López, Daniel

Tutor/a: Martínez López, Antonio

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

TÍTULO: BÚSQUEDA DE MARCADORES BIOQUÍMICOS CAPACES DE DETECTAR CARNES DE VACUNO DEFECTUOSAS A TIEMPOS PORTMORTEM TEMPRANOS

RESUMEN.

La carne de vacuno, muy consumida en el mundo, ve afectada su calidad por muchos factores dependientes e independientes del animal, la raza o las condiciones del procesado como son el estrés previo al sacrificio, las temperaturas que alcance, la raza del animal o el agua que beba). Esto hace que haya mucha variabilidad en la calidad final del producto y no sea posible predecir la terniza final de las piezas.

El objetivo de este estudio es buscar marcadores bioquímicos que nos indiquen que una carne es defectuosa desde el punto de vista de la terniza y para lograrlo nos centramos en el perfil proteico de las muestras.

Para lograrlo se han analizado diferentes muestras de carne de bovino a diferentes tiempos tras la muerte del animal para poder ver cómo evoluciona su perfil proteico entre el sacrificio y la 2ª semana. Se analizaron tanto el extracto de proteínas miofibrilares como el de sarcoplásmicas, no obteniendo resultados concluyentes de las segundas. Se utilizaron las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE para separar las diferentes fracciones proteicas y espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida LC-MS/MS junto a un análisis bioinformático con el motor de búsqueda MASCOT para identificar las proteínas y/o fragmentos que pudiera haber en las diferentes muestras. Todos los resultados concluidos provienen de las muestras de proteínas miofibrilares.

Como resultados se aislaron diferentes fragmentos de proteína degradada a causa de la maduración de la carne. Los más repetidos fueron los provenientes de las proteínas “Creatine kinase M-type”, “Troponin T, fast skeletal muscle” y “MYBPC1 protein”. También se identificó la forma intacta de la “Troponin T, fast skeletal muscle”, destacando que fue identificada tanto antes como después de sufrir el proceso degradativo. Estas proteínas son buenas candidatas a ser marcadores bioquímicos capaces de detectar carnes de vacuno defectuosas a tiempos postmortem tempranos.

PALABRAS CLAVE: Estrés pre-sacrificio; terniza; calidad de carne; proteoma bovino; espectrometría de masas.

ALUMNO: Daniel Alegre López, **TUTOR:** Antonio Martínez López,

TUTOR EXTERNO Y DIRECTOR EXPERIMENTAL: Miguel Ángel Sentandreu Vicente

CURSO ACADÉMICO 2021/2022. VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2022.

TITLE: SEARCH FER NEW BIOCHEMICAL MARKERS CAPABLE TO DETECT DEFECTIVE BOVINE MEATS EARLY PORTMORTEM TIMES

ABSTRACT.

Meat, which is widely consumed in the world, is affected in its quality by many factors dependent and independent of the animal, the breed or the processing conditions, such as preslaughter stress, temperatures, the breed of the animal or the water it drinks). This leads to a high variability in the final quality of the product and it is not possible to predict the final tenderness of the pieces.

The aim of this study is to look for biochemical markers that indicate that a meat is defective from the point of view of tenderness, and to achieve this we focused on the protein profile of the samples.

To achieve this, different beef samples were analysed at different times after the death of the animal in order to see how its protein profile evolves between slaughter and the second week. Both myofibrillar and sarcoplasmic protein extracts were analysed, with inconclusive results for the latter. SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis techniques were used to separate the different protein fractions and mass spectrometry coupled to LC-MS/MS liquid chromatography together with a bioinformatics analysis with the MASCOT search engine to identify the proteins and/or fragments that could be present in the different samples. All the finalised results are from the myofibrillar protein samples.

As results, different fragments of degraded protein due to meat maturation were isolated. The most repeated were from the proteins "Creatine kinase M-type", "Troponin T, fast skeletal muscle" and "MYBPC1 protein". The intact form of "Troponin T, fast skeletal muscle" was also identified, notably before and after undergoing the degradation process. These proteins are good candidates as biochemical markers capable of detecting defective beef at early postmortem times.

KEY WORDS: Pre-slaughter stress; tenderness; meat quality; bovine proteome; mass spectrometry.

STUDENT: Daniel Alegre López, **TUTOR:** Antonio Martínez López,

EXTERNAL TUTOR AND EXPERIMENTAL DIRECTOR: Miguel Ángel Sentandreu Vicente

ACADEMIC COURSE 2021/2022. VALENCIA, SEPTEMBER 2022.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSICA), Dr. Miguel Ángel Sentandreu, el haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo experimental en su laboratorio pues me ha encantado conocer y vivir de primera mano lo que es estar en un centro de investigación profesional y creo que he aprendido mucho con ello. Agradecerle la paciencia con la que me ha tratado, todo el tiempo que me ha dedicado y su ayuda en todo lo que me ha hecho falta durante mi estancia en el laboratorio.

Agradecer también a Enrique y Lorea toda la ayuda aportada.

Por último, dar las gracias a mi familia y amigos por su apoyo y por no dejarme rendirme y creer en mí en todo momento.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CALIDAD DE LA CARNE.....	1
1.2 FUNDAMENTO ELECTROFORESIS SDS-PAGE	2
1.3 FUNDAMENTO ANÁLISIS LC-MS/MS.....	2
2 OBJETIVOS.....	4
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
3.1 MUESTRAS UTILIZADAS	5
3.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES DE MUESTRAS DE CARNE.....	5
3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	6
3.4 REALIZACIÓN DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	7
3.5 DIGITALIZACIÓN DE LOS GELES EN IMAGEQUANT Y ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE LAS BANDAS DE INTERÉS.....	10
3.6 RECORTE Y DIGESTIÓN DE LAS BANDAS DE INTERÉS.....	10
3.7 ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE	11
MASAS ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (LC-MS/MS).....	11
3.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS.....	11
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD.....	11
4.2 GELES DE DIFERENTES GRADOS DE POLIMERIZACIÓN	12
4.3 RELACIÓN DE BANDAS RECORTADAS	14
4.4 ANÁLISIS DE LOS RECORTES DE LOS GELES.....	17
5 CONCLUSIONES.....	21
6 BIBLIOGRAFÍA.....	22
6.1 BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	23
7 ANEXOS	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del método de ionización de proteínas por electrospray. Fuente: Dario Mendez-Cuadro. 2019.....	2
Figura 2. Soporte de preparación de los geles para electroforesis mientras polimeriza el "stacking".	8
Figura 3. Gel durante un lavado tras la tinción.	9
Figura 4. Izquierda: muestra proteínas miofibrilares (15 µg) en gel SDS-PAGE 12%. Derecha: muestra proteínas	13
Figura 5. Gel de poliacrilamida al 12%.	13
Figura 6. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 15% miofibrilar en la Tanda 1.	15
Figura 7. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 12% miofibrilar en la Tanda 1.	15
Figura 8. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 10% miofibrilar en la Tanda 2.	16
Figura 9. Gel de poliacrilamida al 12% sarcoplásmico. En rojo las bandas recortadas en la Tanda 2. En negro las bandas recortadas en la Tanda 3.....	16
Figura 10. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 7% miofibrilar en la Tanda 3.	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de muestras iniciales con el tiempo postmortem al que se obtuvieron.	5
Tabla 2. Muestras a analizar durante el resto de procesos.	5
Tabla 3. Composición de la curva patrón de BSA para el método Bradford.	6
Tabla 4. Composición del gel "resolving" para diferentes % finales de acrilamida en el gel.....	8
Tabla 5. Composición del gel "stacking".	8
Tabla 6. Concentraciones proteicas calculadas por el método Bradford.	11
Tabla 7. Cálculo de los volúmenes a inyectar de extractos sarcoplásmicos en los geles de electroforesis.....	12
Tabla 8. Cálculo de los volúmenes a inyectar de extractos miofibrilares en los geles de electroforesis.....	12
Tabla 9. Relación de los diferentes geles obtenidos con los recortes de las diferentes bandas efectuados en cada uno.	14
Tabla 10. Proteínas seleccionadas de interés identificadas por el programa MASCOT de la Tanda 1 de recortes de bandas.	18
Tabla 11. Proteínas seleccionadas de interés identificadas por el programa MASCOT de la Tanda 2 de recortes de bandas.	18
Tabla 12. Proteínas seleccionadas de interés identificadas por el programa MASCOT de la Tanda 3 de recortes de bandas.	19
Tabla 13. Proteínas miofibrilares intactas identificadas.	19
Tabla 14. Péptidos identificados formados por la degradación de las proteínas miofibrilares...	20

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CALIDAD DE LA CARNE

Actualmente, el consumo de carne constituye una parte importante de la dieta, y las exigencias en cuanto a sus características organolépticas por parte del consumidor son elevadas. Son de importancia los atributos de calidad como el sabor, el color, la humedad externa, la jugosidad y la textura (dureza/terneza), destacando ésta última como indicador principal de calidad de una carne.

La textura de la carne determina la intención de compra de un producto cárnico, y se expresa como la dureza/terneza que tiene la carne aunque influyen otros factores como la jugosidad (infiltración de grasa y composición de la misma), la gomosidad, y la fibrosidad.

La dureza de la carne se debe al tejido conectivo (dureza base) y a la estructura miofibrilar (dureza variable) que la componen. La dureza base viene determinada antemortem por la especie animal, el estrés sufrido por el animal, la edad, el tipo de músculo y la alimentación, no variando éstos tras el sacrificio. En cambio, la dureza variable viene determinada por el grado de maduración postmortem, el corte de la carne y el cocinado.

La carne DFD (dark, firm and dry) se desarrolla cuando el glucógeno muscular disminuye antes del sacrificio (condiciones de estrés del animal previo al sacrificio) resultando en un pH muscular alto proveniente de una glicólisis postmortem reducida (Hedrick et al., 1989).

La maduración postmortem de la carne depende de muchos factores como el tiempo, el tipo de músculo, el pH, la oxidación, el desarrollo de microorganismos que influyen directamente sobre la proteólisis tanto de fibras musculares como la actina o la miosina, como de proteínas del citoesqueleto miofibrilar como la desmina o la titina. (Varnam y Sutherland, 1998).

Se han propuesto varios sistemas proteolíticos endógenos del músculo como candidatos principales en la degradación de proteínas postmortem: las catepsinas, el complejo proteasoma, las calpaínas y las caspasas (Huang y Lametsch, 2013). Las calpaínas son el sistema más estudiado y se confirma su implicación en la terneza de la carne cuándo se comparan los patrones proteolíticos postmortem con los generados in vitro en incubaciones con calpaínas y se comprueba que son similares (Koohmaraie y Geesink, 2006).

Sin embargo, todavía no se sabe la implicación real de cada grupo enzimático en el proceso de degradación del músculo o si puede haber más sistemas relacionados. (Ouali et al., 2013). En la actualidad carecemos de marcadores de calidad que permitan determinar tanto la calidad general de una carne como su terneza en concreto.

La búsqueda de estos marcadores tiene interés tanto científico, ya que ayudaría a comprender mejor ese proceso de proteólisis postmortem, como industrial, ya que podría considerarse un marcador de la calidad de la carne, y por tanto muy útil para productores y consumidores de carne.

Deberá ser un péptido que provenga de la digestión de una proteína muscular por alguna de las enzimas catepsina, proteasoma, calpaína o caspasa y que sea estable para poderlo aislar y medir.

1.2 FUNDAMENTO ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Es una técnica ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética. El SDS es un tensoactivo iónico, cargado negativamente, que solubiliza las proteínas provocando su desnaturalización y eliminando las posibles interacciones entre ellas. La carga eléctrica nativa de la proteína es insignificante en comparación con la enorme carga eléctrica que aporta el SDS, de tal forma que todas las proteínas tienen la misma densidad relativa de carga. El ratio carga/masa es igual en todas ellas, pues a mayor masa de la proteína mayor carga eléctrica, por lo que sólo se separarán según su peso molecular. De esta forma, podemos separar cualquier tipo de proteínas, hasta las muy hidrófobas ya que el SDS las solubiliza. El gel participa directamente en el proceso de separación hace un efecto de tamizado molecular, por lo que podemos decir que es un soporte muy restrictivo.

En el "stacking" las proteínas se separan por isotacoforesis. Cuando la muestra llega a la interfase entre el "stacking" y el "resolving", ésta se frena y se empaqueta, pues se enfrenta a un tamaño de poro más pequeño y a un pH y una molaridad mayor. Esto hace que aumente mucho la resolución del gel.

La muestra en el gel de resolución ("resolving") se separa por electroforesis zonal, es decir, según su densidad de carga eléctrica y su tamaño.

1.3 FUNDAMENTO ANÁLISIS LC-MS/MS

La espectrometría de masas es una técnica clave para el estudio de la estructura primaria de las proteínas, siendo la técnica central en el campo del estudio de las proteínas. El fundamento de esta técnica radica en la ionización de las biomoléculas. Una vez ionizadas se calcula su ratio masa-carga (m/z) siguiendo su trayectoria específica en un sistema de vacío. Esto permite hallar la exclusiva huella molecular que genera cada péptido al ser ionizado y la identificación de proteínas según su estructura primaria. Los péptidos (procedentes de las proteínas digeridas con anterioridad) se inyectan en el interior de una columna de HPLC a microescala (LC-MS) conectada directamente con el espectrómetro de masas. Cuando los péptidos llegan al final de la columna, fluyen a través de una aguja. En la punta, el líquido es vaporizado y los péptidos son ionizados por la acción de un fuerte potencial eléctrico. Este proceso se denomina ionización por electrospray (Figura 1).

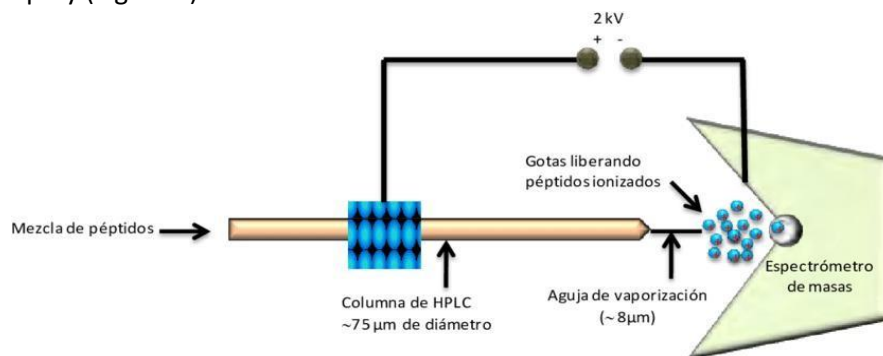


Figura 1. Representación del método de ionización de proteínas por electrospray. Fuente: Dario Mendez-Cuadro. 2019.

Los péptidos ionizados entran en el espectrómetro de masas a través de un capilar de transferencia. Una vez dentro del sistema de vacío, son guiados y manipulados por campos eléctricos. Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, los cuales difieren en cómo determinan el ratio m/z (masa/carga) de los péptidos. Los tipos principales de espectrómetros de masas son: tipo cuadrupolo, tipo TOF (“time of flight” o tiempo de vuelo), tipo trampas iónicas, tipo sector magnético (HRMS), tipo FTICR (resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier) y tipo triple cuadrupolo-trampa lineal (Qtrap).

Cada uno de estos instrumentos genera un espectro de masas, el cual es un registro de la intensidad de la señal del ion en cada valor de la escala m/z (la cual tiene unidades de daltons por carga) (Steen y Mann, 2004).

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es buscar marcadores bioquímicos que nos indiquen que una carne es defectuosa desde el punto de vista de la terniza. Marcadores que ayuden a estandarizar los productos finales de la industria cárnica, prediciendo la terniza final de la carne ya que, actualmente, existe mucha variabilidad en la calidad final del producto aun aplicando un mismo proceso sobre carnes del mismo tipo.

Para cumplir este objetivo desarrollamos lo siguientes objetivos específicos:

- Obtención de geles de electroforesis que mostraran las variaciones en el perfil proteico de una muestra con el tiempo.
- Identificación de las proteínas que se degradan (marcadores a tiempos tempranos postmortem) y de los péptidos formados (marcadores tardíos).

Inicialmente se planteó el siguiente esquema de trabajo base para el cumplimiento de los objetivos específicos:

1. Elección y preparación de muestras.
2. Determinación de la concentración proteica de los extractos musculares (Método Bradford).
3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)
4. Elección y digestión de bandas seleccionadas.
5. Obtención del espectro de masas (LC-MS/MS) de los péptidos obtenidos.
6. Análisis bioinformático (MASCOT).

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS UTILIZADAS

Las muestras iniciales utilizadas en este trabajo son de músculo (*Longissimus thoracis*) de bovino de la raza rubia gallega. Cada una tomada de la misma pieza pero transcurrido diferente tiempo desde el sacrificio del animal. Así tenemos la relación de muestras detallada en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación de muestras iniciales con el tiempo postmortem al que se obtuvieron.

Códigos referencia de muestras	Tiempo transcurrido postmortem
RG20 0h	0 horas
RG20 8h	8 horas
RG20 24h	24 horas
RG20 3d	3 días
RG20 7d	7 días
RG20 14d	14 días

3.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES DE MUESTRAS DE CARNE

Las seis porciones de carne obtenidas a lo largo de las 2 primeras semanas tras el sacrificio (Tabla 1) fueron congeladas a -80°C en forma de pequeños cubos hasta su utilización. Para su análisis se pesan 0,5 gramos de cada muestra y se homogenizan en 5 ml de tampón Tris-HCl (50mM pH 8.0) empleando un Polytron. En este proceso debemos quedarnos con la parte magra de la carne, que posee las fibras musculares, e intentar quitar la grasa. Luego, el homogeneizado es centrifugado a 10.000 G durante 20 minutos a una temperatura de 4°C .

En nuestro caso, en la toma de la muestra RG20 24h nos quedaron restos de grasa por lo que decidimos mantener esa muestra a partir de ahora llamada "RG20 24h con grasa" y realizar otra procurando no coger ninguna porción grasa (a partir de ahora "RG20 24h sin grasa"). Así, las muestras a analizar durante el resto de trabajo fueron 7 (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras a analizar durante el resto de procesos.

Códigos referencia de muestras	Tiempo transcurrido postmortem
RG20 0h	0 horas
RG20 8h	8 horas
RG20 24h con grasa	24 horas
RG20 24h sin grasa	
RG20 3d	3 días
RG20 7d	7 días
RG20 14d	14 días

Después de la centrifugación, el sobrenadante, en el cual se encuentran las proteínas sarcoplásmicas, se filtra mediante filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$. El

fluido es impulsado mediante la presión ejercida por el émbolo de una jeringuilla e incorporado dentro de un tubo nuevo. Posteriormente, se hacen alícuotas de 200µl y se almacenan a -80°C hasta su utilización.

El precipitado obtenido es separado del sobrenadante y redissuelto de nuevo en 5ml de tampón Tris-HCl (50mM pH 8.0). Luego, se vuelve a centrifugar teniendo en cuenta las condiciones empleadas anteriormente.

El precipitado obtenido tras la segunda centrifugación es redissuelto en 5ml de tampón Tris-HCl (50mM pH 8.0) conteniendo urea 6M y tiourea 1M. A continuación, la muestra se vuelve a centrifugar y se recupera el sobrenadante, en el cual se encuentran las proteínas miofibrilares. En este paso, el precipitado es descartado.

El sobrenadante recuperado se filtra empleando lana de vidrio. Para ello, se inserta un pequeño trozo de lana de vidrio por la boca de una pipeta Pasteur y se empuja hacia abajo, hasta el estrechamiento inferior de la pipeta, usando una varilla de vidrio. Entonces se introduce el sobrenadante y a partir del líquido filtrado se toman alícuotas de 200µl para determinar la concentración proteica por el método de Bradford. Estas alícuotas se almacenan a -80°C hasta su utilización.

El protocolo seguido (PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES) se encuentra en el anexo 1.

3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

La cuantificación se lleva a cabo para que todos los puntos de carga del gel al hacer la electroforesis tengan la misma cantidad total de proteínas. Así, las diferencias en la intensidad de las bandas de las diferentes muestras en los geles de electroforesis serán debidas a la cantidad de proteína/péptido que se fije en cada una, y no a las diferencias en las concentraciones de las muestras inyectadas.

La determinación de concentración proteica por el método de Bradford consiste en la cuantificación de la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a la proteína. Esta unión se compara con la de diferentes cantidades de una proteína estándar, la albúmina de suero bovino (BSA). En este caso, hacemos 8 diluciones con concentración de BSA conocida tal y como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de la curva patrón de BSA para el método Bradford.

Prot. []	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
VBSA 1mg/ml (µl)	0	5	10	20	30	40	60	80
VH ₂ O (µl)	100	95	90	80	70	60	40	20

La cuantificación se hace midiendo la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro y representando el valor de absorbancia en función de la concentración de proteína en mg/ml

para obtener una curva patrón de la proteína estándar. Con esta curva se puede interpolar la concentración de proteínas de las diferentes muestras (tanto miofibrilares como sarcoplásmicas) al medir la absorbancia a 595nm. En el laboratorio se utilizó el lector de microplacas CLARIOstar.

Antes de medir la absorbancia se hace una dilución 1/10 (10µl de muestra + 90µl de H₂O) y otra dilución 1/20 (5µl de muestra + 95µl de H₂O) de cada muestra. Se añaden 10µl de cada una de estas dos diluciones de cada muestra por triplicado en los pocillos de la placa y se añaden 200µl del reactivo Bio-Rad diluido 1/5 en cada uno de ellos. Esta solución se pone en oscuridad durante 20 minutos y transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia.

Una vez determinada la concentración proteica en cada uno de los extractos, se calcula los volúmenes de muestra en los que tengamos 15µg y 30µg de proteína, que serán las cantidades que usaremos de cada muestra para inyectar en los geles. La determinación se llevó a cabo tanto para los extractos de proteínas miofibrilares como para los de proteínas sarcoplásmicas.

3.4 REALIZACIÓN DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

El siguiente paso implica la preparación de geles de electroforesis en gel de poliacrilamida a diferentes porcentajes cuya composición aparecen en las Tablas 4 y 5. Como ya he expuesto anteriormente, el primer gel que se realizó fue al 12% de poliacrilamida ya que se ha visto que este porcentaje es idóneo para separar las proteínas/péptidos que se obtienen del fraccionamiento de las proteínas miofibrilares. Como el SDS hace que todas las proteínas adquieran una estructura más o menos lineal con cargas negativas, la movilidad de los péptidos solo dependerá de su masa.

Se diferencian dos zonas en los geles:

-Gel "stacking": está en la zona superior, marcando los pocillos (una altura de unos 2 cm). Sirve para acumular las proteínas en un principio y que todas migren a la vez (aumenta la resolución de la técnica) y por eso solo tiene un 3% de poliacrilamida, para que todas las proteínas migren a través de él con facilidad y poder aglutinarlas.

- Gel "resolving": más largo, de unos 10 cm, está a continuación. Es el principal, sobre el que se trabaja posteriormente, con porcentajes variables de poliacrilamida. En él las proteínas se separan dependiendo de su movilidad que es factor exclusivamente de su masa.

En primer lugar preparamos el gel "resolving" mezclando los componentes de la Tabla 4 en un vaso de precipitado y con una pipeta introducimos el contenido de la mezcla entre las placas de vidrio.

Tabla 4. Composición del gel "resolving" para diferentes % finales de acrilamida en el gel.

	"RESOLVING"			
% acrilamida en el gel	8%	10%	12%	15%
Acrilamida (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

A continuación, añadimos 1 ml de isopropanol para separar la disolución líquida del contacto con el oxígeno, un inhibidor del proceso de polimerización. Una vez ha gelificado el "resolving", se retira el isopropanol por decantación y se añade agua para lavar los restos que quedan del alcohol. Posteriormente retiramos el agua y preparamos el gel "stacking", cuyos componentes se muestran en la Tabla 5. Una vez introducida la mezcla entre las placas de vidrio, colocamos el peine de 10 púas (generará 10 pocillos para inyectar hasta 10 muestras) teniendo cuidado que no se formen burbujas de aire.

Tabla 5. Composición del gel "stacking".

	"STACKING"
% acrilamida en el gel	3%
Acrilamida (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

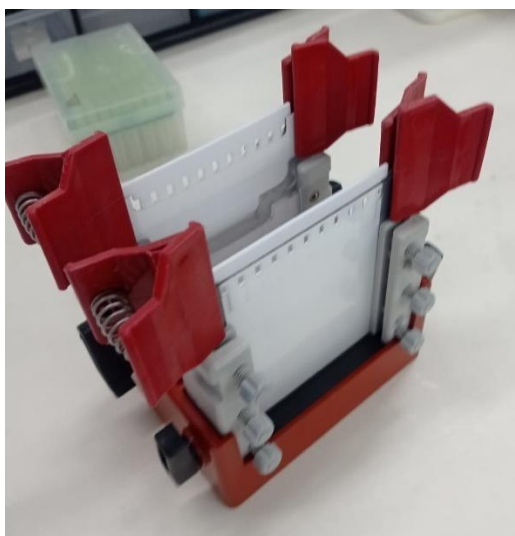


Figura 2. Soporte de preparación de los gels para electroforesis mientras polimeriza el "stacking".

Una vez se han polimerizado los geles, se pueden usar el mismo día o guardarse en frío (y manteniendo la humedad, para que no se sequen) para usarlos en días posteriores. En el laboratorio siempre realizamos los geles en parejas para aprovechar el soporte.

Tras preparar las muestras mezclando cada muestra con el tampón de muestra en relación 1/1 y calentando 4 min a 95°C, montamos la cubeta electrolítica con nuestros geles en el interior. (Grabsky y Burgess, 2011). Se inyectan en los pocillos, previa anotación de su distribución, los volúmenes de muestra calculados tras la determinación proteica por el método Bradford (Tablas 7 y 8). Del patrón, que contiene estándares de proteínas de masa conocida, se inyectan siempre 7µl ya que se conoce previamente su concentración.

Como en nuestro experimento hemos estado manejando 7 muestras además del patrón, utilizamos un peine de 10 carriles dejando los pocillos de los extremos libres.

Tras aplicar una corriente de 50 mA y esperar a que el frente recorra todo el gel hasta la parte inferior del mismo, se para la corriente eléctrica. Se desecha el "stacking" y el gel de resolución se sumerge en una solución fijadora ácida para evitar la difusión de las fracciones proteicas en el gel.

A continuación se realiza la tinción del gel. Tras 2 lavados de 10 min cada uno con agua bidestilada posteriores a la fijación, los geles se introducen en una solución de la tinción Blue Silver con azul de Comassie durante mínimo 12 horas (Candiano, 2004). Tras realizar mínimo 3 lavados con agua bidestilada, ya podemos guardar los geles en un recipiente con agua bidestilada (Figura 3). Tanto la fijación como los lavados y la tinción se realizan en agitación mecánica para favorecer la interacción del gel con el medio y en el caso de la tinción, para evitar que los coloides de pigmento se agreguen manchando el gel.

Por ello, hay que realizar todo el proceso de tinción con cuidado para evitar manchas en el gel que dificulten la visión de las bandas.

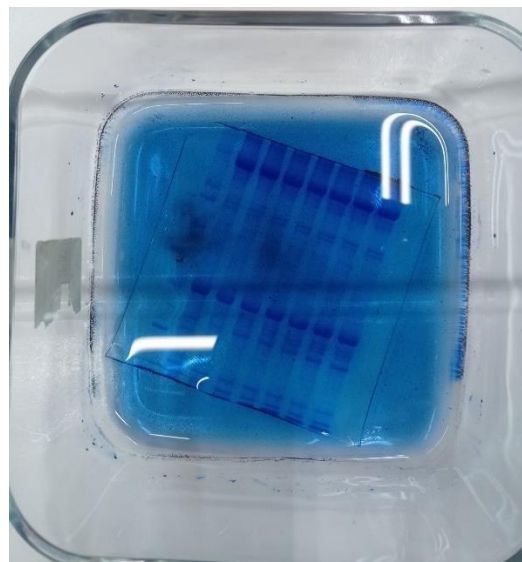


Figura 3. Gel durante un lavado tras la tinción.

Los protocolos seguidos (PROTOCOLO PREPARACIÓN GELES POLIACRILAMIDA y PROTOCOLO REALIZACIÓN ELECTROFORESIS) se encuentran en los anexos 2 y 3 respectivamente.

3.5 DIGITALIZACIÓN DE LOS GELES EN IMAGEQUANT Y ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE LAS BANDAS DE INTERÉS

Digitalizamos los geles para poder tener constancia del resultado tras el desteñido de los geles, ya que con el tiempo en almacenamiento podrían perder calidad y además podemos realizar un análisis objetivo mediante instrumental informático. Para conseguir esta imagen, usamos el programa ImageQuant.

ImageQuant LAS 500 es una cámara CCD refrigerada para imágenes de Western blot quimioluminiscentes, tinciones de ADN y proteínas basadas en azul/UV, e imágenes de luz blanca de manchas y marcadores colorimétricos. En nuestro caso, utilizamos el análisis colorimétrico.

Una vez que tenemos las imágenes de los geles en el ordenador, nombramos y rotulamos bien todos los carriles y pesos de las proteínas estándar y comparamos los geles a simple vista, para detectar bandas que difieran de una muestra a otra, ya sean por ausencia/presencia o por disminución/aumento de la intensidad de la banda. Estas variaciones indicarán un cambio en la concentración del péptido/proteína correspondiente, de una muestra de carne a otra, y por tanto podría servir como marcador para diferenciar y clasificar la terneza de las carnes. Ciertas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad intrínseca de la carne y no a la terneza de la misma y, por eso, además de estos patrones diferenciales de bandas nos fijaremos en que se repitan en diferentes geles de diferente concentración de poliacrilamida para asegurar que se deben al estado de terneza, y no al tipo cárnico.

Cuándo hemos seleccionado todas las bandas de interés, procedemos a su recorte y digestión.

3.6 RECORTE Y DIGESTIÓN DE LAS BANDAS DE INTERÉS

Primero cortamos las bandas de interés y las depositamos cada una en un eppendorf. Siguiendo el protocolo, añadimos a cada muestra 50µl de bicarbonato de amonio 50mM, y agitamos. A continuación, para deshidratar, reemplazamos esa solución por 50µl de acetonitrilo 100 % (al final de este paso, las piezas encogen y se vuelven opacas). Una vez nos hemos asegurado de que hemos quitado todo el líquido le añadimos una solución de tripsina 12.5 µg/ml (hasta cubrir los fragmentos) para digerir el gel en el cual las proteínas/polipéptidos se encuentran embebidos. Lo dejamos así toda la noche en continua agitación.

Al día siguiente, se añaden 25µl de 50 % ACN/50 % H₂O con 0,1 % de TFA a las piezas contenidas en cada eppendorf para lavar el gel y recuperar los péptidos. Luego, se someten a sonicación durante 15 minutos y transcurrido ese tiempo se quita el sobrenadante, que contiene los péptidos, y se introduce en un eppendorf nuevo. Después, se vuelven a añadir 25µl de 50 % ACN/50 % H₂O con 0,1 % de TFA y se repite el proceso. El líquido obtenido se incorpora a la anterior solución peptídica. Posteriormente, desecamos las muestras con una bomba de vacío y ya las redisolvemos finalmente en 40µl de 0.1 % de TFA para guardarlas en viales de inyección.

El protocolo seguido para la digestión de bandas (PROTOCOLO DE DIGESTIÓN EN GEL) se encuentra en el anexo 4.

3.7 ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (LC-MS/MS)

Una vez tenemos todos los péptidos de las bandas recortadas en solución, se procede a su análisis en el espectrómetro de masas para su identificación.

Las muestras, listas para el análisis, se entregaron al laboratorio de química analítica dotado con el equipo necesario para analizar por espectrometría de masas las muestras. Utilizando el espectrómetro acoplado a cromatografía líquida: LC-MS/MS tal y como indica Fuente-García et al. (2020).

3.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS

Una vez generados todos los espectros de masas, se procede a la identificación de los péptidos. Para analizar los espectros MS/MS obtenidos de las muestras de las bandas recortadas, utilizamos el motor de búsqueda del programa MASCOT. Es un programa de análisis bioinformático que utiliza datos de espectrometría de masas para identificar la secuencia de aminoácidos de los péptidos provenientes de proteínas presentes en bases de datos.

En nuestro experimento, para la obtención de las identificaciones de las proteínas hemos utilizado las bases de datos SwissProt y la específica de *Bos Taurus*, *UP9136_B_taurus*.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD

Se analizaron los extractos de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas por separado de las diferentes muestras que aparecen en la Tabla 2. Tal y como aparecen en la tabla 6, se calcularon las concentraciones proteicas de todas las muestras utilizando la ecuaciones de las curvas patrones.

Tabla 6. Concentraciones proteicas calculadas por el método Bradford.

Muestras RG20	0h	8h	24h c/g	24h s/g	3d	7d	14d	
Concentraciones proteicas mg/ml	5,624	5,454	4,873	4,444	4,202	4,160	5,025	Sarcoplásmicas
	3,804	3,610	3,849	4,647	5,686	7,232	6,173	Miofibrilares

Así, se puede calcular el volumen a inyectar en las electroforesis posteriores para inyectar 15 y 30 µg totales de proteína en cada pocillo de los geles (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Cálculo de los volúmenes a inyectar de extractos sarcoplásmicos en los geles de electroforesis.

Sarcoplásmicas	mg/ml Bradford	Sample Buffer 1/2	μL a inyectar (15μg)	μL a inyectar (30μg)
RG20 0h	5,624	2,81	5,3	10,7
RG20 8h	5,454	2,73	5,5	11,0
RG20 24h c/grasa	4,873	2,44	6,2	12,3
RG20 24h s/grasa	4,444	2,22	6,8	13,5
RG20 3d	4,202	2,10	7,1	14,3
RG20 7d	4,160	2,08	7,2	14,4
RG20 24d	5,025	2,51	6,0	11,9

Tabla 8. Cálculo de los volúmenes a inyectar de extractos miofibrilares en los geles de electroforesis.

Miofibrilares	mg/ml Bradford	Sample Buffer 1/2	μL a inyectar (15μg)	μL a inyectar (30μg)
RG20 0h	3,804	1,90	7,9	15,8
RG20 8h	3,610	1,81	8,3	16,6
RG20 24h c/grasa	3,849	1,92	7,8	15,6
RG20 24h s/grasa	4,647	2,32	6,5	12,9
RG20 3d	5,686	2,84	5,3	10,6
RG20 7d	7,232	3,62	4,1	8,3
RG20 24d	6,173	3,09	4,9	9,7

4.2 GELES DE DIFERENTES GRADOS DE POLIMERIZACIÓN

Para un primer análisis de las muestras se utilizaron geles al 12 % de poliacrilamida, el porcentaje estándar para poder tener una idea previa del proteoma de nuestras muestras. Se inyectaron las muestras de los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares (Figura 4) con una carga total de proteínas de cada muestra de 30μg y 15 μg respectivamente. Así en una primera toma de contacto con las técnicas utilizadas se podría comparar el efecto de la diferencia de carga de inyección en los geles resultantes.

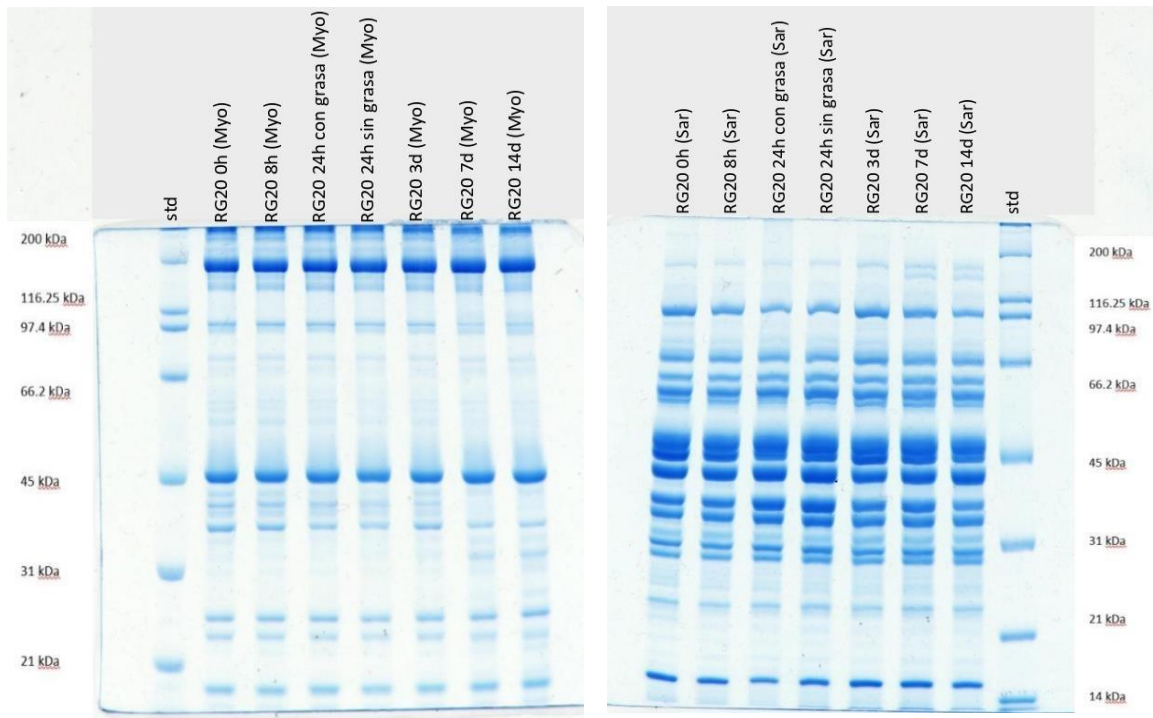


Figura 4. Izquierda: muestra proteínas miofibrilares (15 µg) en gel SDS-PAGE 12%. Derecha: muestra proteínas sarcoplásmicas (30 µg) en gel SDS-PAGE.

En un primer análisis visual de estos geles observamos (Figura 4), como cabía esperar, que el gel inyectado con 30 µg tiene una mayor densidad de color y que hay zonas en las que en que en el gel de 15 µg se pierden las bandas sobre el fondo blanco. También observamos especialmente en el gel de las proteínas miofibrilares cómo hay algunas bandas que aparecen a lo largo de los diferentes carriles (se forman péptidos con el tiempo) y otras que desaparecen (Figura 5).

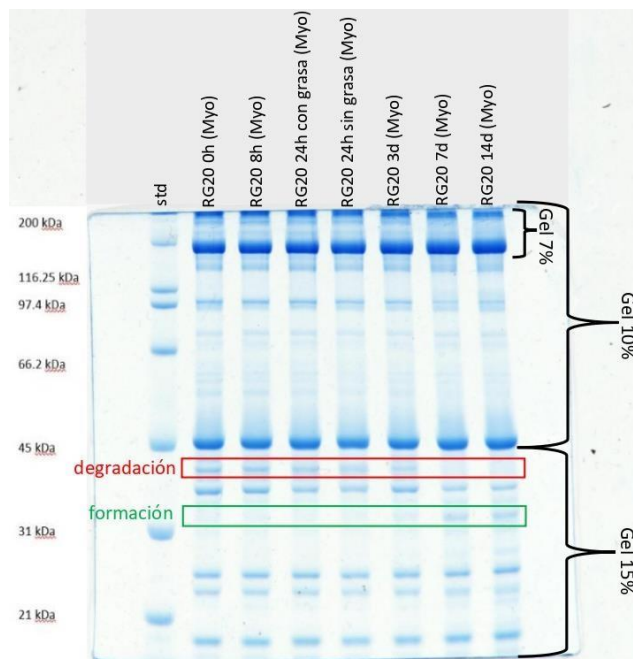


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 12%.

En el primer gel realizado con el extracto de proteínas sarcoplásmicas no se observaron grandes cambios y como las proteínas miofibrilares son las que adquieren una mayor importancia cuándo hablamos de los procesos de degradación que influyen en la maduración y mejora de la ternura de la carne, decidimos intentar ampliar al máximo la resolución de las bandas presentes en los extractos de estas últimas. Por eso, a partir de ese momento el resto de geles que se realizaron fueron todos con las muestras de los extractos de proteína miofibrilar.

Tras los geles del 12% se realizaron geles del 10%, 7% y 15% de poliacrilamida. Se realizaron parejas de la misma composición, inyectándose en uno 15 µg y en el otro 30µg de cada muestra. Con estos nuevos geles se intentaba ampliar las zonas superior e inferior de los carriles tal y como se ha indicado en la Figura 5.

A mayor porcentaje de poliacrilamida, el poro de paso del gel es menor y por tanto los fragmentos más pesados quedan retenidos antes en las zonas superiores del gel, quedando la fracción menos pesada más espaciada. Ocurre lo mismo a la inversa, cuando en el gel del 7% quedan mejor resueltas las bandas correspondientes a pesos moleculares más elevados.

Comparando los carriles correspondientes a las muestras “RG20 24h con grasa” y “RG20 24h sin grasa” (Figura 4) en las imágenes de los diferentes geles realizados (Figuras 4,5, 6, 7, 8, 9 y 10), no apreciamos diferencias entre ellas.

4.3 RELACIÓN DE BANDAS RECORTADAS

De los diferentes geles realizados, en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10 se indican las bandas elegidas tras un análisis visual para recortar y analizar. Algunas de ellas podrían ser candidatas a representar los nuevos marcadores que se buscan en este estudio.

Muchas de estas bandas corresponden al mismo conjunto proteico (son las mismas) ya que al inyectar las mismas muestras en todos los geles, la única variación entre ellos en los distintos geles es su migración en ellos en función del porcentaje de acrilamida.

Los recortes de las bandas y su posterior análisis se realizaron en 3 tandas, quedando reflejada esta relación en la Tabla 9. Vemos que en el gel del 12% de poliacrilamida del extracto de proteínas sarcoplásmicas se han hecho recortes en dos tandas diferentes (en diferente momento). Esto se debe a que las bandas 18, 19 y 20 de la Tanda 2 se perdieron por un fallo en el espectrómetro de masas. Por ello en la Tanda 3 se recortaron las bandas 1 y 2 en sustitución de la 18 de la Tanda 2, la 3 en sustitución de la 19 y la 4 en sustitución de la 20. (Figura 9).

Tabla 9. Relación de los diferentes geles obtenidos con los recortes de las diferentes bandas efectuados en cada uno.

Gel	Tanda en que se analizan	Números de los recortes
15% Miofibrilares	Tanda 1	1 - 11
12% Miofibrilares	Tanda 1	12 - 18
10% Miofibrilares	Tanda 2	1 - 17
12% Sarcoplásmicas	Tanda 2	18 - 23
	Tanda 3	1 - 4
7% Miofibrilares	Tanda 3	5 - 16

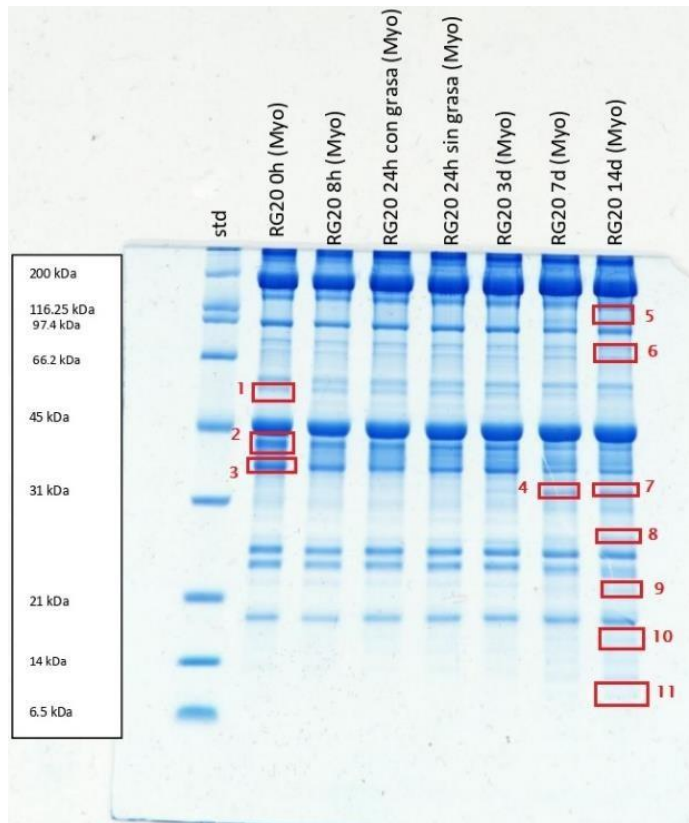


Figura 6. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 15% miofibrilar en la Tanda 1.

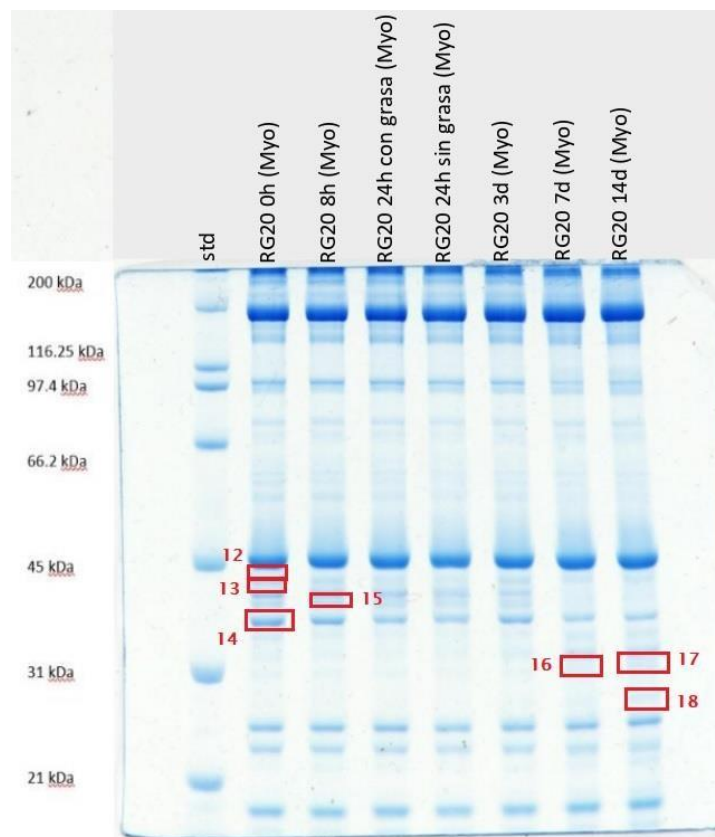


Figura 7. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 12% miofibrilar en la Tanda 1.

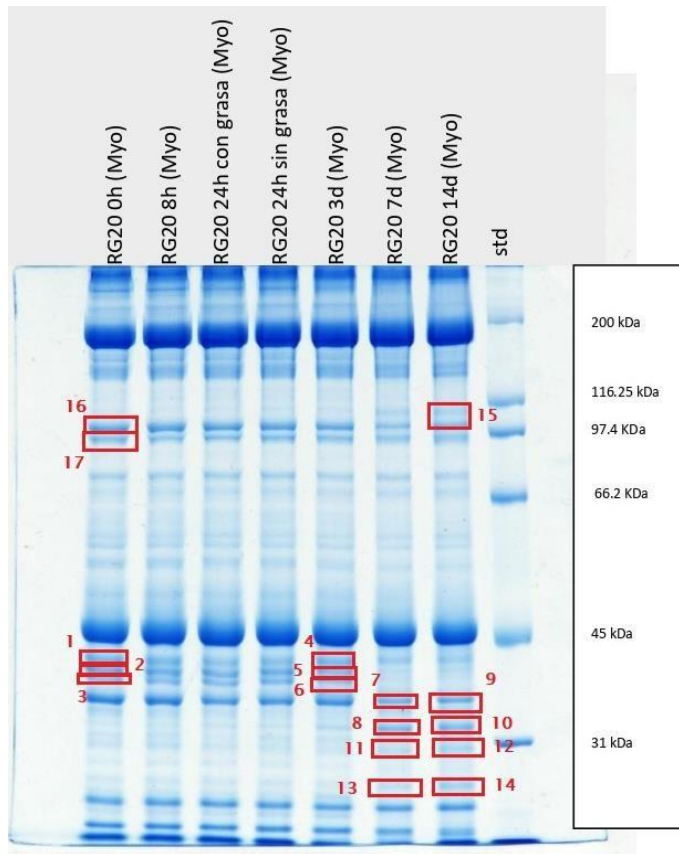


Figura 8. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 10% miofibrilar en la Tanda 2.

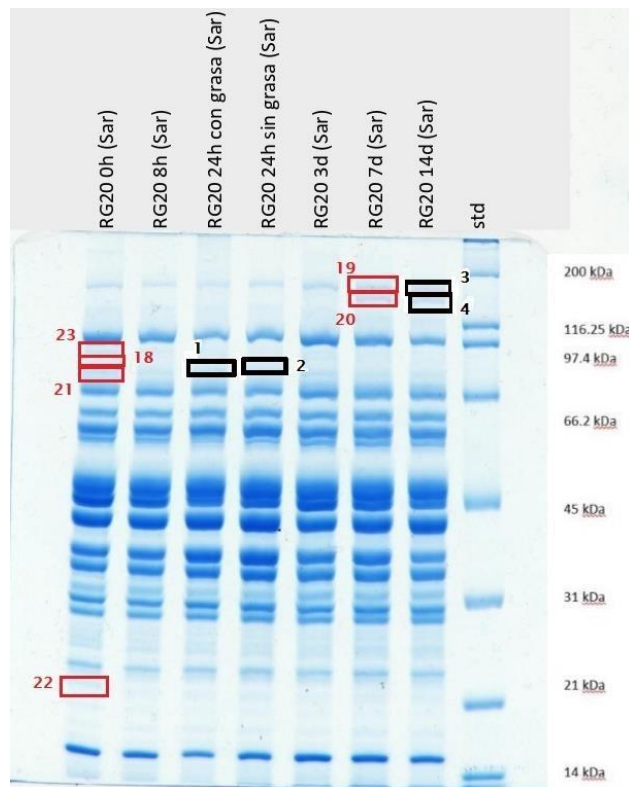


Figura 9. Gel de poliacrilamida al 12% sarcoplásmico. En rojo las bandas recortadas en la Tanda 2. En negro las bandas recortadas en la Tanda 3.

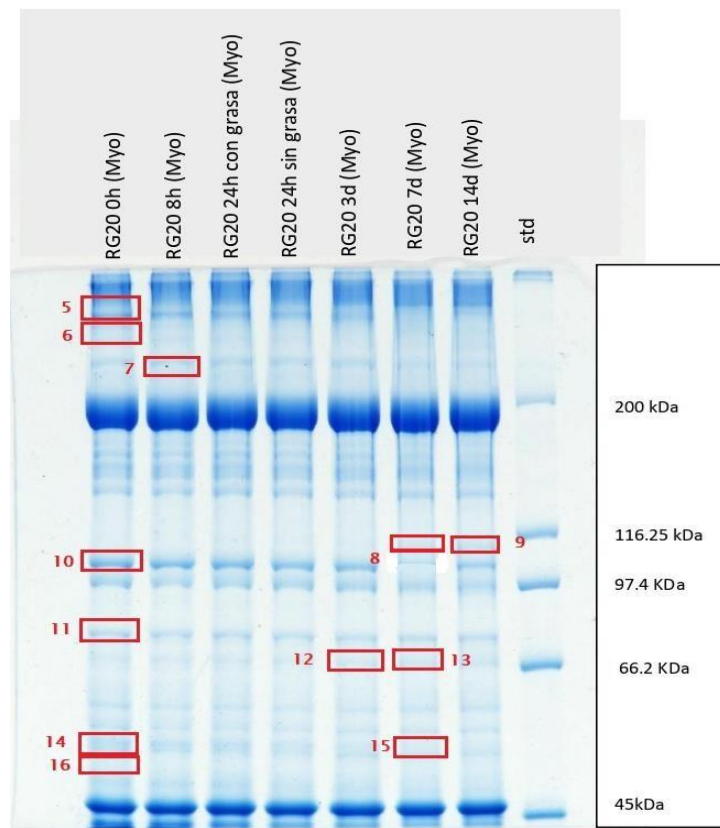


Figura 10. Bandas recortadas del gel de poliacrilamida al 7% miofibrilar en la Tanda 3.

4.4 ANÁLISIS DE LOS RECORTES DE LOS GELES

El programa MASCOT analiza las posibles combinaciones peptídicas que pueden corresponder a los espectros de masas de cada muestra y nos propone la secuencia peptídica que con mayor probabilidad está presente en la muestra. Por ello, todas las proteínas identificadas, algunas de las cuales se nombrarán en las Tablas 10, 11 y 12 y que aparecen en los anexos 5, 6 y 7 en su totalidad, han sido seleccionadas por el programa de análisis MASCOT significativamente.

En las Tablas 10, 11 y 12 aparecen sólo las proteínas que, tras analizar todas las que aparecían en cada banda recortada, hemos considerado que eran de interés. Son o bien fragmentos proteicos o bien proteínas intactas, por lo que son candidatas idóneas a ser indicadores del estado de maduración proteica. Podemos remarcar que de las bandas seleccionadas y recortadas del gel de las proteínas sarcoplásmicas no se obtuvo ninguna identificación de importancia, por lo que todos los resultados reflejados en estas tablas corresponden únicamente a las muestras de las proteínas miofibrilares. También observamos que gran parte de las proteínas identificadas se concentran en bandas de pesos por debajo de 45kDa.

Los fragmentos de una proteína tienen menor peso molecular que las proteínas de las que provienen (proteína identificada por el programa) y por eso consideramos fragmentos aquellas

que tienen una masa monoisotópica superior a la masa de la banda en la que se encuentra y proteínas intactas aquellas con la misma masa monoisotópica y masa real en la banda.

Esto se aprecia claramente, en la Figura 7. En las bandas 13 y 15 de la Tanda 1 hemos aislado y determinado que la “Troponina T, músculo esquelético rápido” está en su forma intacta mientras que en las bandas 16 y 17 de la misma Tanda 1 también aparece la misma proteína pero en este caso se trata de un fragmento de la misma.

Visualmente se aprecia claramente la distancia entre ambas parejas de bandas. Las intactas aparecen en las muestras de tiempos postmortem cortos con pesos mayores (0 y 8 horas) mientras que las fracciones en los tiempos más largos y pesos menores (7 y 14 días).

Tabla 10. Proteínas seleccionadas de interés identificadas por el programa MASCOT de la Tanda 1 de recortes de bandas.

Banda	Nombre proteína	Masa (Mr)	Fragmento / Intacta
4	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Fragmento
5	MYBPC1 protein	133896	Fragmento
6	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	109220	Fragmento
	Myosin-2	223194	Fragmento
7	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Fragmento
	Transcobalamin-2	47928	Fragmento
8	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
9	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
13	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Intacta
15	Myosin heavy chain 8	217314	Fragmento
	Actin, alpha cardiac muscle 1	43541	Fragmento
	Troponin T, slow skeletal muscle	40804	Intacta
16	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Fragmento
17	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Fragmento
18	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento

Tabla 11. Proteínas seleccionadas de interés identificadas por el programa MASCOT de la Tanda 2 de recortes de bandas.

Banda	Nombre proteína	Masa (Mr)	Fragmento / Intacta
2	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Intacta
3	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Intacta
	Actin, alpha cardiac muscle 1	43541	Fragmento
4	Actin, alpha cardiac muscle 1	43541	Fragmento
5	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Intacta
8	Actin, alpha cardiac muscle 1	43541	Fragmento
9	Actin, alpha cardiac muscle 1	43541	Fragmento
10	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
	Troponin T, fast skeletal muscle	40804	Fragmento
	Actin, alpha cardiac muscle 1	43541	Fragmento

11	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
12	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
13	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
14	Creatine kinase M-type	42962	Fragmento
15	MYBPC1 protein	133896	Fragmento
16	Alpha-actinin-3	101746	Intacta
	Alpha-actinin-2	103713	Intacta
	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein	121264	Fragmento

Tabla 12. Proteínas seleccionadas de interés identificadas por el programa MASCOT de la Tanda 3 de recortes de bandas.

Banda	Nombre proteína	Masa (Mr)	Fragmento / Intacta
8	MYBPC1 protein	133896	Fragmento
9	MYBPC1 protein	133896	Fragmento
10	Alpha-actinin-2	104023	Intacta
	Alpha-actinin-3	101746	Intacta
12	Myosin-2	223194	Fragmento
	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	109220	Fragmento
13	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	109220	Fragmento
	Myosin-7	223100	Fragmento
14	Phospholipid-transporting ATPase	160363	Fragmento

En las tablas de los anexos 5, 6 y 7, además de las masas totales de las proteínas identificadas, también quedan reflejados los cálculos que hicimos de las masas de las diferentes bandas. En la Tanda 1, calculamos numéricamente la masa midiendo el frente y la distancia a la que se encuentra la banda, también la calculamos con el programa ImageQuant. En la Tanda 2 sólo se calculó con el programa ImageQuant. En la Tanda 3 sólo se calculó numéricamente.

Estas combinaciones de cálculos en las diferentes tandas las fuimos haciendo para tener más datos con los que comparar las masas teóricas de una proteína y las masas de las fracciones que aparecen en las bandas. Así, además de visualmente, nos apoyamos en estos datos para determinar si las proteínas identificadas en una banda estaban en su forma intacta o como fragmento.

Analizando estos datos observamos que muchas de las proteínas identificadas en las distintas bandas coinciden. Se pueden agrupar en torno a las muestras en las que aparecen, tanto las proteínas que se degradan (Tabla 13) como los péptidos formados (Tabla 14) para obtener una visión más global de los resultados de este trabajo.

Tabla 13. Proteínas miofibrilares intactas identificadas.

Tiempo de la muestra	Proteína	Nº de veces identificada
0 horas	Troponin T, fast skeletal muscle	3
	Alpha-actinin-2	2

	Alpha-actinin-3	2
8 horas	Troponin T, slow skeletal muscle	1
3 días	Troponin T, fast skeletal muscle	1

Tabla 14. Péptidos identificados formados por la degradación de las proteínas miofibrilares.

Tiempo de la muestra	Proteína	Nº de veces identificada
0 horas	Actin, alpha cardiac muscle 1	1
	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein	1
	Phospholipid-transporting ATPase	1
8 horas	Myosin heavy chain 8	1
	Actin, alpha cardiac muscle 1	1
3 días	Actin, alpha cardiac muscle 1	1
7 días	Troponin T, fast skeletal muscle	2
	Actin, alpha cardiac muscle 1	1
	Creatine kinase M-type	2
	MYBPC1 protein	1
	Myosin-2	1
	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	1
14 días	MYBPC1 protein	3
	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	2
	Myosin-2	1
	Myosin-7	1
	Troponin T, fast skeletal muscle	3
	Transcobalamin-2	1
	Creatine kinase M-type	6
	Actin, alpha cardiac muscle 1	2

Las proteínas “Creatine kinase M-type”, “Troponin T, fast skeletal muscle” y “MYBPC1 protein” han sido las identificadas como fragmento un mayor número de veces. Fueron identificadas cuándo la carne tenía ya entre 1 y 2 semanas (tiempos 7 y 14 días). Cabe destacar que la “Troponin T, fast skeletal muscle” también la identificamos intacta en tiempos cortos tras el sacrificio (aunque más veces como fragmento).

Fragmentos de miosina y actina también son identificadas varias veces pero en este caso a lo largo de todas las muestras, no viendo diferencia con relación al tiempo. Son proteínas mayoritarias en estos extractos, con unas bandas muy densas y estables en todas las muestras. Ya se han establecido relaciones entre la degradación de estas proteínas y el desarrollo de la ternera tras el sacrificio (Lametsch et al., 2003).

5 CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se ha concluido lo siguiente:

-Las proteínas sarcoplásmicas de la carne de vacuno de la raza rubia gallega no presentan tantos cambios significativos de degradación durante el proceso de maduración de la carne como si los presentan las proteínas miofibrilares.

-Se descarta la influencia de la presencia o ausencia de grasa en la muestra durante su preparación como factor influyente en el perfil proteico resultante.

-Las proteínas miofibrilares que son degradadas durante la maduración de la carne son: "Creatine kinase M-type", "Troponin T, fast skeletal muscle" y "MYBPC1 protein". Apareciendo indicadores de proteólisis (péptidos provenientes de las mismas) partir de los 7 días tras el sacrificio del animal.

-Se destaca la evolución de la "Troponin T, fast skeletal muscle" como marcador de degradación proteica, apareciendo intacta hasta el primer día tras el sacrificio y degradada a partir del séptimo.

6 BIBLIOGRAFÍA

- CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERI, G.M., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA P., ZARDI L., RIGHETTI, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 25(9):1327-33.
- FUENTE-GARCÍA, C.; SENTANDREU, E.; ALDAI N.; OLIVÁN M.; SENTANDREU MÁ. (2020). Characterization of the Myofibrillar Proteome as a Way to Better Understand Differences in Bovine Meats Having Different Ultimate pH Values. *Proteomics*. 20(12):e2000012.
- GRABSKY, A.; BURGESS, R. (2011). Preparation of protein samples for SDS polyacrylamide gel electrophoresis: Procedures and tips. *inNovations*. 13. 10-12.
- HEDRICK, H. B.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; JUDGE, M.D.;MERKEL, R.A. (1989). *Conversion of muscle to meat and development of meat quality*. Ed. Principles of Meat Science (3rd) pp. 95–122 in: , Kendall/Hunt Publishing Co.
- HUANG, H.; LAMETSCH, R. (2013). Challenges and Applications of Proteomics for Analysis of Changes in Early Postmortem Meat. *Proteomics in Foods*. pp. 103–109.
- KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G.H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*. 74(1): 34-43 pp.
- LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H.J., ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(24):6992-7.
- OUALI, A.; GAGAOUA, Y. B.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; SENTANDREU, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*. 95(4): 854-870 pp.
- STEEN, H.; MANN, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(9):699-711.
- VARNAM, A.; SUTHERLAND, J. (1998). *Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología*. Ed. Acribia. Zaragoza. 438 pp.

6.1 BIBLIOGRAFÍA GENERAL

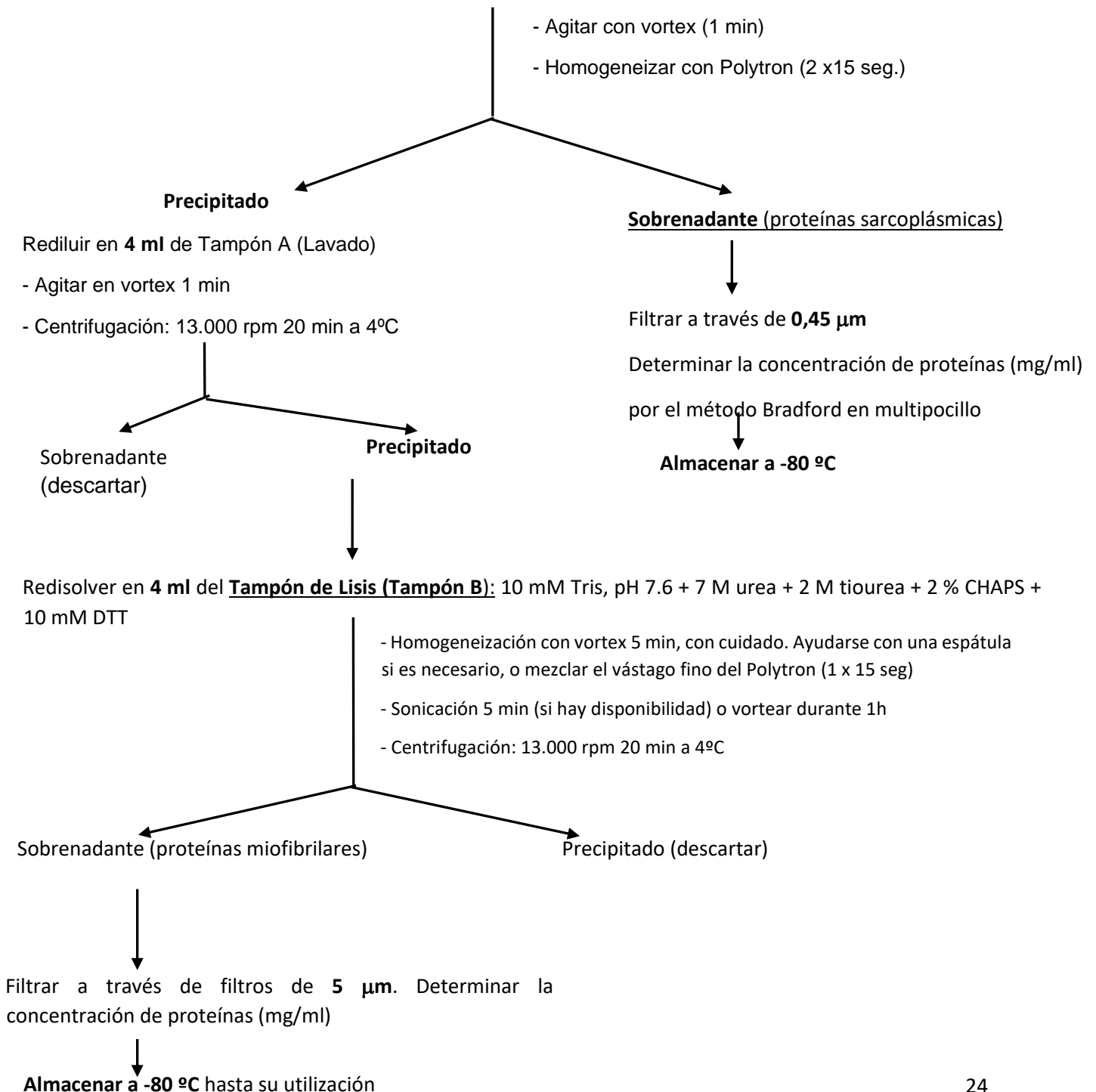
- FADDA, S., SENTANDREU, E., SENTANDREU, M. A. (2018). Peptidomics on Farm Animal Research. In: de Almeida, A., Eckersall, D., Miller, I. (eds) *Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology*. Springer, Cham.
- GARCÍA-SEGURA, J. M.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; MONTERO, F.; OÑADERRA, M.; VIVANCO, F. (1996). *Técnicas instrumentales de Análisis en Bioquímica*. Ed. Síntesis. Madrid. 398 pp.
- SENTANDREU, M. A.; SENTANDREU, E. (2011). Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Science*. 89(3): 280-285 pp.
- WARRISS, P.D. (2000). "Meat science; an introductory text". *CABI Publishing*. Wallingford.

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
	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541		36	4	UP9136_B_taurus
4	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
	A0A3Q1M558	Actin, alpha cardiac muscle 1	Bos Taurus	43541		31	4	UP9136_B_taurus
5	A0A3Q1LPQ6	Tropomyosin alpha-1 chain	Bos Taurus	38503		73	11	UP9136_B_taurus
	A0A3Q1MHL7	Troponin T, fast skeletal muscle	Bos Taurus	40804	38454	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
9	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
	ACTN2_BOVIN	Alpha-actinin-2	Bos Taurus	103713	106460	661	23	SwissProt
17	A0A3Q1MCM9	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein	Bos Taurus	121264		51	1	UP9136_B_taurus
	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
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				22				
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