

Práctica 5. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE).

1.- INTRODUCCIÓN

Muchas moléculas importantes en Bioquímica, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables que en disolución se encuentran en forma de especies cargadas eléctricamente (negativa o positivamente). Las moléculas que tengan cargas similares poseerán diferentes relaciones carga/masa (q/m) debido a las inherentes diferencias de peso molecular. Estas diferencias constituyen la base para la migración diferencial de dichas moléculas cargadas, cuando se someten a la acción de un campo eléctrico.

La **electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)** se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas, aunque también puede ser útil para ácidos nucleicos. Se preparan de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas, de manera que produzcan un efecto de tamizado molecular; la separación electroforética depende entonces de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño, por lo que dos proteínas con idéntica densidad de carga, pero de tamaño diferente pueden ser separadas, ya que el soporte dificulta más el avance de la de mayor tamaño.

Estos geles son químicamente inertes frente a las moléculas biológicas, transparentes y estables en un amplio intervalo de valores de pH, temperatura y fuerza iónica; son también resistentes a agentes desnaturizantes (urea, detergentes) y son mecánicamente estables, por lo que pueden ser deshidratados y reducidos a una fina película, lo que facilita su almacenamiento.

- **PAGE en condiciones no desnaturizantes.** La PAGE se desarrolla en condiciones en las que no se altera la conformación nativa de las proteínas, por lo que finalizada la electroforesis, pueden realizarse estudios de funcionalidad de dichas proteínas (actividad enzimática, capacidad de unión de anticuerpos, unión a receptores, etc.). En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma.

- **PAGE en condiciones desnaturizantes.** En presencia de algunos compuestos químicos, las proteínas pierden su estructura nativa; tales compuestos, llamados agentes desnaturizantes, producen el desplegamiento de la proteína que queda sin la organización tridimensional característica de su funcionalidad biológica.

Los agentes desnaturizantes más comunes son:

- La urea que actúa sobre los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura macromolecular.
- Los detergentes que actúan sobre las interacciones hidrofóbicas de las proteínas que son sustituidas por interacciones detergente-proteína. Existen tres tipos principales de detergentes:
 - a) Detergentes no iónicos**, son débilmente desnaturizantes y no alteran la carga de las proteínas a las que se unen, por ejemplo Triton X-100, **b) Detergentes iónicos**, pueden tener carga positiva (catiónicos) que se usan para la separación de proteínas muy ácidas o muy básicas; siendo el más utilizado es el cetiltrimetilamonio (CTAB). Otros poseen carga negativa y un fuerte carácter desnaturizante; el más empleado es el dodecil sulfato sódico (SDS), **c) detergentes anfóteros**, son débilmente desnaturizantes y no afectan a la carga de las proteínas. Algunos, como el 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS) solubilizan muy bien las proteínas de membrana.

En algunas proteínas hay puentes disulfuro entre los residuos de Cys (para formar cistinas) de una misma cadena polipeptídica (puentes intracatenarios) o de diferentes cadenas (puentes intercatenarios) de algunas proteínas con estructura cuaternaria. Estos puentes se pueden romper mediante tratamiento con determinados agentes reductores, como por ejemplo, el β -mercaptoetanol (β -ME) o el ditioneitol (DTT).

• **PAGE-SDS.** Permite el cálculo de parámetros moleculares, pues los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular.

Las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos).

Como ya se ha comentado, la movilidad electroforética en una PAGE es función del tamaño y de la carga por unidad de masa; como ésta es constante para todos los complejos SDS-proteína, esta movilidad es solamente función de la masa molecular, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa.

La SDS-PAGE es la electroforesis más utilizada para el análisis de proteínas debido a:

- La gran mayoría de las proteínas son solubles en SDS.
- Todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto, en el mismo sentido.
- Su densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.
- La separación depende de la masa molecular, que se puede calcular.
- Los complejos SDS-proteína se tiñen fácilmente.

La PAGE-SDS puede realizarse en condiciones reductoras o no reductoras. La proteína con un puente disulfuro intracatenario en presencia de SDS se desnatura parcialmente, manteniendo sin desplegar la zona que abarca el disulfuro. El tratamiento con SDS+DTT rompe el puente disulfuro y permite el despliegue total de la proteína.

Una vez finalizada la PAGE, las proteínas se visualizan con un colorante; el más utilizado es el azul de Coomassie con el que se pueden visualizar 0.1-0.5 μ g de proteína por banda. Otro método de tinción es con sales de plata, que tiene como principal ventaja su elevada sensibilidad (hasta 0.1 ng de proteína por banda), aunque tiene como desventajas que es muy laboriosa y cara, presenta elevado fondo, baja reproducibilidad, algunas proteínas no se tiñen y, sobre todo, no es totalmente específico de proteínas, ya que algunos lipopolisacáridos, ácidos nucleicos y polisacáridos también se tiñen.

Un método de sensibilidad comparable a la tinción con sales de plata, emplea compuestos fluorescentes que se unen específicamente a las proteínas (la unión puede realizarse antes o después de la electroforesis), como el cloruro de dansilo (detecta hasta 10 ng de proteína por banda), la fluorescamina (detecta hasta 3-5 ng de proteína por banda) y el MDPF (2-metoxi-2,4-difenil-3(2H) furanona; detecta hasta 1 ng de proteína por banda).

Una vez teñido el gel de poliacrilamida, la imagen que se obtiene es un conjunto de bandas coloreadas sobre un soporte transparente. Su análisis permite identificar el número mínimo de componentes (bandas) de cada muestra. Cada banda se caracteriza por su movilidad electroforética relativa ("Rf").

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

En las condiciones de la SDS-PAGE, si se representan los valores de logaritmo del peso molecular (logPM) frente a la movilidad electroforética (Rf) de un conjunto de proteínas, se obtiene una relación lineal (figura 1). Normalmente, se utiliza un conjunto de proteínas de peso molecular conocido (marcadores de peso molecular) que se someten a SDS-PAGE en el mismo gel que se analizan las proteínas cuyos peso molecular se desea conocer.

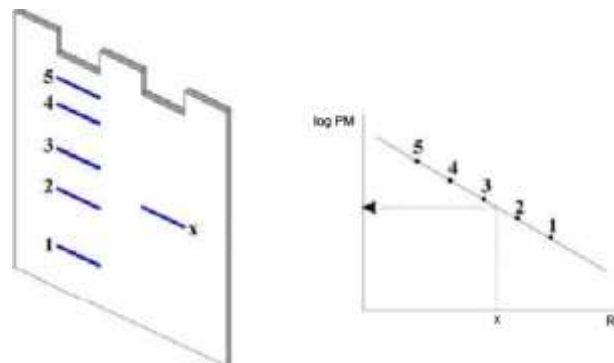


Figura 1. Cálculo de pesos moleculares de proteínas por SDS-PAGE.

En la práctica realizaremos una variante del SDS-PAGE, conocida como electroforesis discontinua, en la cual el gel está formado por 2 secciones de diferente tamaño de poro y con pH distintos. En los sistemas discontinuos el primer gel (gel concentrador) asegura la concentración de todas las proteínas en el frente de migración. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo gel (gel separador). El gel concentrador es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el gel separador que es el que realmente separa las proteínas.

Existen numerosos dispositivos en el mercado para hacer electroforesis en geles de acrilamida. En la imagen se muestra un ejemplo de sistema comercial de la empresa BioRad ampliamente utilizado.

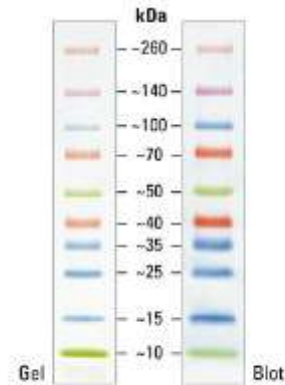


• 2.- OBJETIVOS

- Familiarizarse con la técnica de electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE
- Separación de proteínas en condiciones reductoras y no reductoras
- Determinación del peso molecular de la proteína en estudio
- Presentación y discusión de los resultados en el correspondiente cuaderno de prácticas

• 3.- MATERIALES Y REACTIVOS

- Cubeta con cables de corriente.
- Soporte para la polimerización.
- Soporte para el desarrollo de los geles en la cubeta.
- Soporte para los cristales.
- Cristales de 2 tamaños diferentes.
- Separadores, peine
- Puntas de micropipeta para cargar las muestras en los geles.
- Muestras y patrón de peso molecular.
- Reactivos de electroforesis.
- Tubo de plástico cónico de 50 ml.
- Micropipetas de 20 µl, 200 µl y 1000 µl.



Images are from a 4-12% Tris-glycine gel (SDS-PAGE) and subsequent transfer to membrane.

La acrilamida es un producto químico catalogado como carcinógeno. USAR GUANTES EN TODO MOMENTO.

• 4.- PROTOCOLO A REALIZAR

• 4.1.- Trabajo a realizar durante el primer día.

A continuación se describen las etapas a realizar de manera ordenada:

1. Los cristales deben de limpiarse con agua y jabón, luego con abundante agua destilada. Finalmente se les pasa etanol para acelerar el secado.
2. Colocar los cristales en el soporte e introducir los separadores de 0.75 mm de espesor entre los 2 cristales. Para comprobar que se han montado correctamente llenar el espacio entre los cristales con agua destilada.
3. Hacer una marca con rotulador en el vidrio para saber hasta donde hay que llenar con gel separador. Para ello, colocar el peine y hacer la marca 1 cm por debajo del mismo.
4. En un tubo de plástico cónico añadir:

Gel separador 10 %	1 gel
Agua destilada	2.1 ml
Tampón Tris 1.5M; pH=8.8	1.25 ml
Acilamida:Bis acilamida 30:0.8	1.6 ml
SDS 10%	50 µl

5. Mezclar bien, evitando la formación de burbujas ya que, el oxígeno inhibe la polimerización. Añadir 40 μl de persulfato de amonio (APS) 10% y 5 μl de TEMED. Tener en cuenta que a partir del momento en el cual agreguemos estos dos reactivos, comenzará el proceso de polimerización.
6. Depositar suavemente la solución del gel separador entre los dos cristales con ayuda de una pipeta Pasteur.
7. Inmediatamente añadir agua a la superficie del gel. Hacerlo muy suavemente procurando que la superficie del gel se distorsione lo menos posible.
8. Dejar polimerizar por lo menos 20 min. No mover el gel durante el proceso de polimerización.
9. Para comprobar la polimerización del gel, mirar la solución que quedó en el tubo de plástico cónico. Si ya ha polimerizado el gel separador, quitar el agua de la superficie con papel de filtro.
10. En un tubo de plástico cónico añadir:

Gel concentrador 4 %	1 gel
Agua destilada	1.5 ml
Tris-HCl 0.5 M; pH=6.8	0.625 ml
Acrilamida:Bis acrilamida 30:0.8	0.325 ml
SDS 10%	25 μl

11. Mezclar bien, evitando la formación de burbujas ya que, el oxígeno inhibe la polimerización. Añadir 20 μl de persulfato de amonio (APS) 10% y 4 μl de TEMED. Tener en cuenta que a partir del momento en el cual agreguemos estos dos reactivos, comenzará el proceso de polimerización.
12. Depositar suavemente la solución del gel concentrador entre los dos cristales con ayuda de una pipeta Pasteur.
13. Introducir el peine para formar las calles.
14. Dejar polimerizar 20 min. y sacar el peine suavemente. Rellenar las calles con agua destilada. Guardar a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Preparación de la muestra

1.-Tomar 10 μl de las fracciones de la práctica de cromatografía y ponerlo en un eppendorf, agregarle 2,5 μl del tampón de carga 5X. Preparar la muestra con los dos tampones, una con reductor y otra con no reductor y agitar 1 min. en vórtex.

2.- Preparar la muestra de proteína problema (AcChR) tomando 10 μl de la misma y añadiendo 2,5 μl del tampón de carga 5X.

Tampón para muestras	Reductor	No reductor
	(5X)	(5X)
H ₂ O	-----	5 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	4 ml	4 ml
Glicerol 100 %	10 ml	10 ml
SDS	2 g	2 g
2-Mercaptoetanol	5 ml	-----
Azul de Bromofenol 0.1%	1 ml	1 ml
Volumen final	20 ml	20 ml

• **4.2.- Trabajo a realizar durante el segundo día.**

- Colocar el gel en el soporte que posee los electrodos. Llenar el depósito interior con tampón de electroforesis (60 ml de 5X + 240 ml de agua). Poner el resto del tampón en el depósito inferior. Tampón de electroforesis pH 8.3 (5X), (Volumen 1 L: Tris 15 g; Glicina 72 g; SDS 5 g).
- Cargar las muestras con la ayuda de **una micropipeta** depositando cada muestra en su pocillo correspondiente.

Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5	Calle 6	Calle 7	Calle 8	Calle 9	Calle 10
	Hb B.C.no reductor	Muestra AcChR B.C.No reductor		Patrón peso molecular			Hb B.C. reductor	Muestra (AcChR) B.C. reductor	

- La electroforesis se llevará a cabo a voltaje constante de 200V (45 min. aproximadamente). La electroforesis acaba cuando la línea azul de bromofenol ha llegado a la parte inferior del gel. Cuando la electroforesis se ha completado, desconectar la fuente de alimentación. Quitar la tapa superior.
- Sacar el soporte de desarrollo y descartar el tampón. Sacar los soportes de los geles y aflojar los tornillos. Sacar cuidadosamente los vidrios con el gel. Separar lateralmente uno de los espaciadores sin sacarlo del todo. Forzar con cuidado para separar los cristales y dejar libre el gel.
- Depositar el gel en una cubeta con la solución de tinción correspondiente, calentar en el microondas 15 segundos y dejar en agitación durante 15 min.
- Desteñir con la solución de distinción durante 15 min. y observar los resultados.

Tinción 1 L	
Azul Coomassie	0.5 g
Ácido acético	90 ml
Agua	450 ml
Metanol	450 ml
Destinción 1 L	
Ácido acético	90 ml
Agua	450 ml
Metanol	450 ml

5.- EVALUACIÓN

5.1.- Se pedirá a cada alumno que elabore un informe describiendo los resultados obtenidos tras el trabajo realizado descrito en los epígrafes 4.1.- y 4.2.- de este protocolo.

5.2.- En el mismo informe, se responderá a las siguientes cuestiones:

1. ¿Qué tipo de gel se está usando? ¿Existen otros tipos de soportes para la electroforesis?
2. ¿Cómo se consigue la polimerización del gel?
3. ¿Cómo se controla la velocidad a la que se desarrolla la electroforesis?
4. ¿Por qué no hay que tocar la acrilamida sin polimerizar con las manos?
5. ¿Qué diferencias se observan en los geles entre las muestras tratadas o no con β -mercaptoetanol?
6. Se realizó un gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) de las proteínas X e Y. Estime el PM de cada una de ellas.

Proteínas	PM (kDa)	Migración (mm)
Albumina bovina	67	11
Ovoalbumina	45	23
Anhidrasa carbónica	32	34
Inhibidor de tripsina	21.5	46
Lisozima	14.4	59
Proteína X	¿?	28
Proteína Y	¿?	54

• Distancia que recorre el frente = 6.5 cm

7. Con el fin de purificar una enzima que cataliza la reacción $S \rightarrow P$ se hizo un homogenado con 5 g de hígado de ratón y 25 ml de buffer pH 7. Se filtró y centrifugo a 26000 x g. Con una alícuota del sobrenadante (volumen final 27 ml) se hicieron determinaciones de proteínas y actividad enzimática (tabla 1).

Determinación de proteínas: se aplicó el método de Lowry, el volumen final fue de 1 ml y se usó BSA (2 mg/ml) como patrón.

Tabla 1

Tubo	BSA(μ l)	Muestra(μ l)	A_{500nm}
1	--	--	0.07
2	20	--	0.15
3	40	--	0.25
4	80	--	0.41
5	--	30	0.09
6	--	60	0.30
7	--	90	0.55

Actividad enzimática: La actividad fue de 124 unidades por ml de sobrenadante

Luego se pasaron 20 ml del sobrenadante por una columna de afinidad que tiene S unido covalentemente a Sepharosa. Se lavó con 20 ml de buffer usado en la homogenización y se eluyó con 15 ml de S 5 mM. A continuación se muestran las determinaciones de actividad y proteína de lo eluido de la columna de afinidad. Se colectaron fracciones de 3 ml/tubo.

Tabla 2:

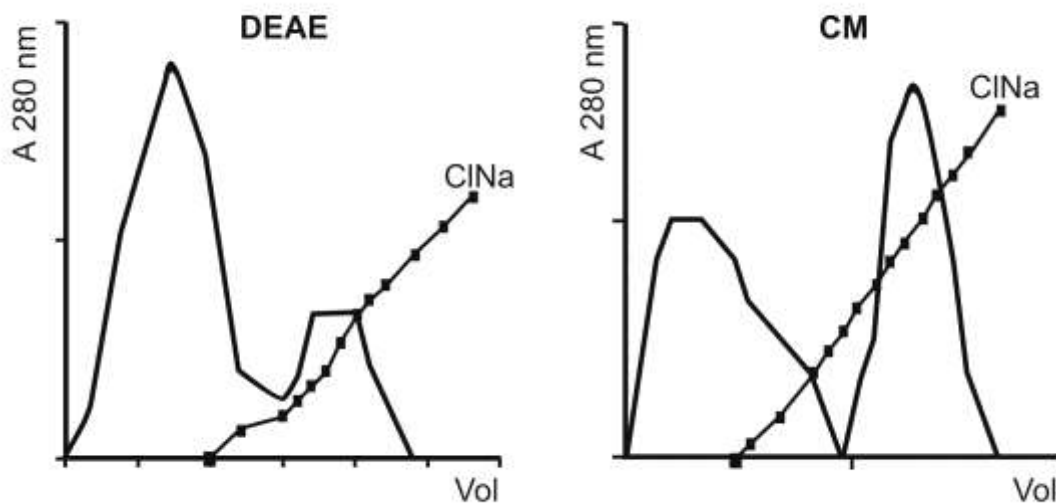
	A ₂₈₀	Unidades de actividad /tubo
1	0.02	0
2	2.8	5.1
3	1	42
4	3.2	18
5	0.4	0.5
6	0.04	0
7	0.02	0
8	0.04	0.5
9	0.38	15
10*	0.98	823
11*	0.52	158
12	0.05	0.4

* Con los tubos 10 y 11 se realizó un pool.

¿Cuántos mg de la enzima hay en 5 g de tejido? ¿Cual es la concentración de proteína en 27 ml?

Parte B

Se tomaron 3 alícuotas del pool. A la primera se la trató con bromuro de cianógeno (BrCN) (El bromuro de cianógeno hidroliza la unión peptídica cuando en el c-terminal hay un aminoácido metionina) y la actividad enzimática no se modificó; la segunda se pasó por una columna de intercambio aniónico a pH 7 (DEAE) y la última por un intercambio catiónico a pH 7 (CM). En los últimos dos casos resultaron los siguientes perfiles de elución:



Finalmente se corrieron en geles SDS-PAGE (en presencia de 2-mercaptoetanol y 5 min. a 100°C) las muestras provenientes de:

Calle A: pool 10 + 11, eluido de la columna de afinidad A

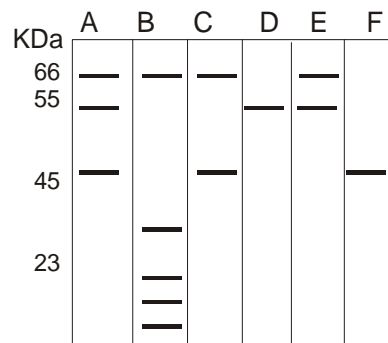
Calle B: muestra tratada con BrCN.

Calle C: proteínas no retenidas en DEAE.

Calle D: retenido en DEAE.

Calle E: no retenido en CM.

Calle F: retenido en CM.



a- ¿Cuál es el PM y el pl de la proteína en estudio?

b- Ordene las proteínas presentes en el pool según su pl.

c- ¿Por qué se ven dos picos proteicos tanto en DEAE como en CM?

d- ¿ Por qué se detectaron 5 proteínas después del tratamiento con BrCN?.

e- Diseñe un protocolo para purificar la enzima.

6.- ENTREGA DEL TRABAJO

Cada alumno debe generar:

Un fichero Word con los resultados que respondan a lo solicitado en el epígrafe 5.-
EVALUACIÓN.

Para nombrar de forma sistemática, se debe seguir el siguiente ejemplo: soy el alumno

Emilio Moreno Serrano, generaré el siguiente fichero:

4_MorenoSerrano_Emilio.doc. Este fichero se entregará (**COMO UN ÚNICO ENVIO**) a través del sistema de **TAREAS** al que el alumno tiene acceso personalizado en la página web de la asignatura.

NO SE ACEPTARÁN ENVIOS POR EMAIL NI FUERA DE PLAZO.