

## Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

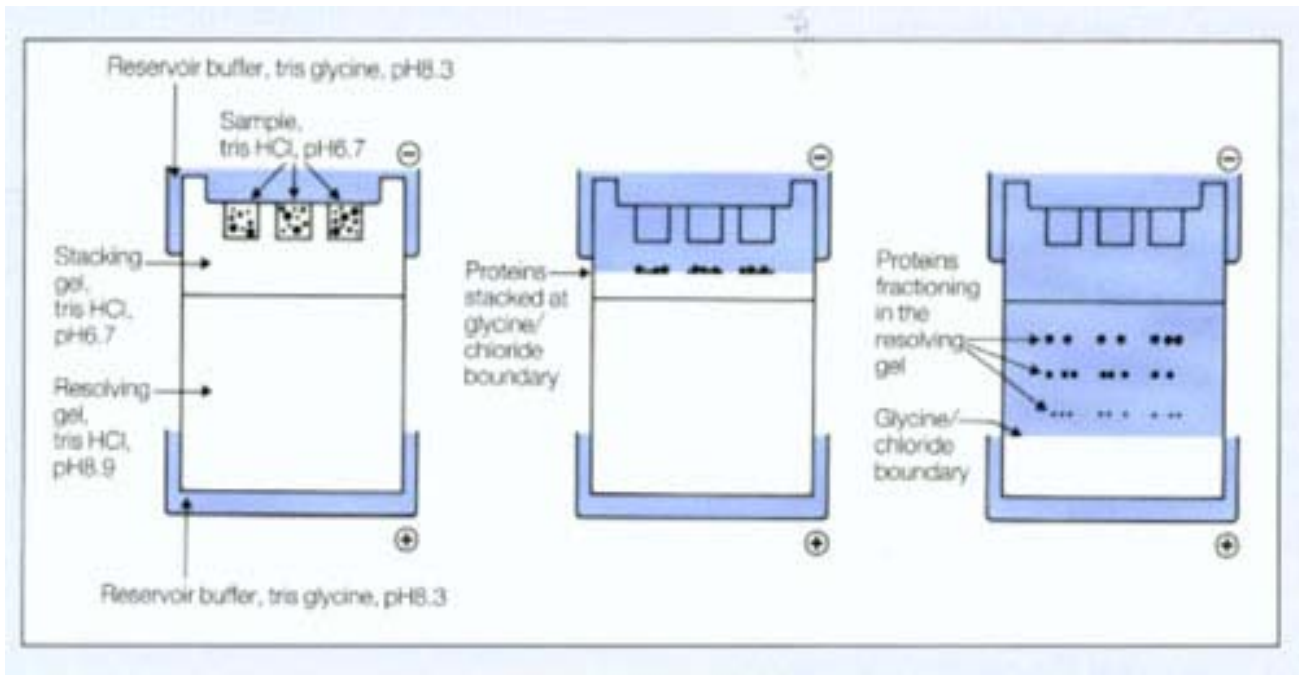
### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida: Introducción y técnica básica

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Empleando geles de sílice o de acetato de celulosa y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta (carga total/masa) entre proteínas. Este método se denomina electroforesis zonal. La matriz de poliacrilamida no es un buen soporte para este método pues la migración de las proteínas en su seno no sólo es proporcional a la carga neta sino también al tamaño y forma de las proteínas. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pHs, temperatura y fuerza iónica.

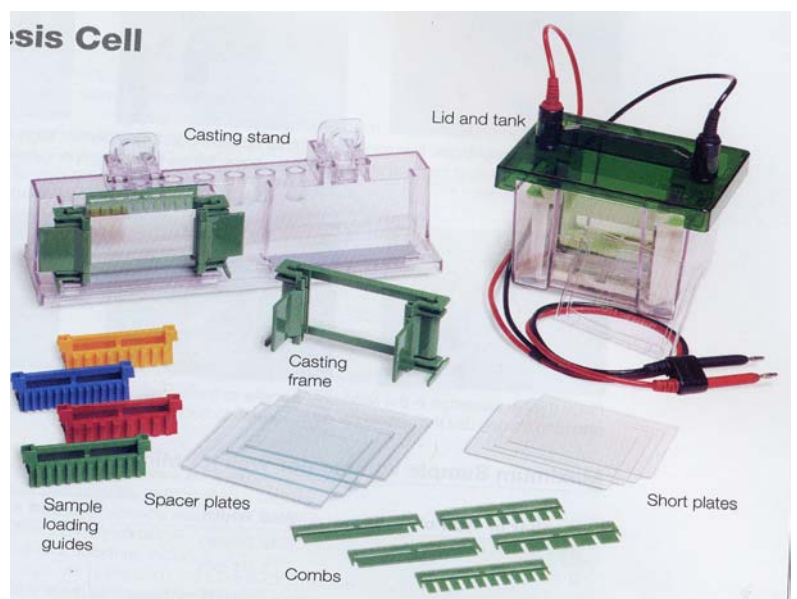
### Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son:

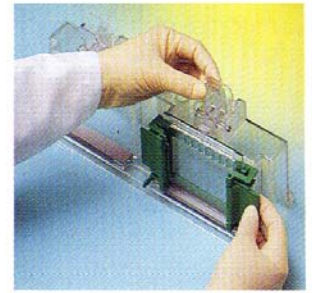
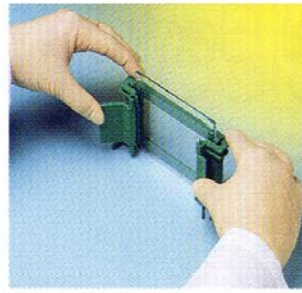
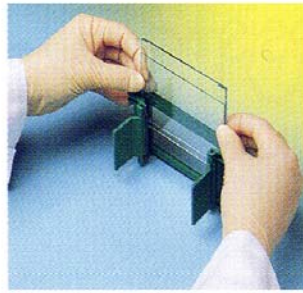
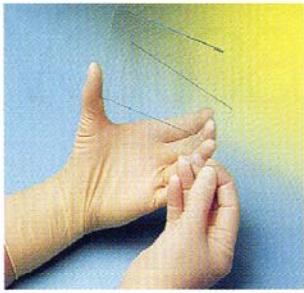
- a) Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ( $S_2O_8^-$ ) que se añade en forma de persulfato amónico. En algunas situaciones, como por ejemplo en el isoelectroenfoque en el que la presencia de persulfato puede interferir con la electroforesis se emplean riboflavina y TEMED.
- b) Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.
- c) La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
- d) La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.
- e) El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.
- f) En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes:
  - 1) una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.
  - 2) una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas tampón (buffer) empleados en estos casos son: tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5).



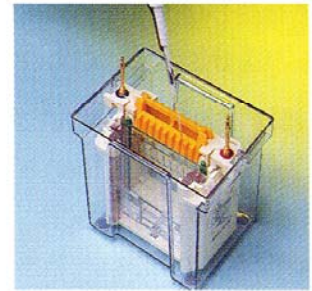
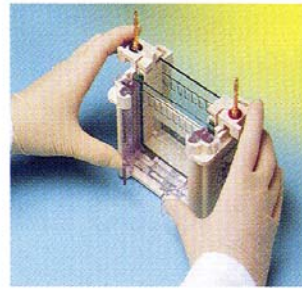
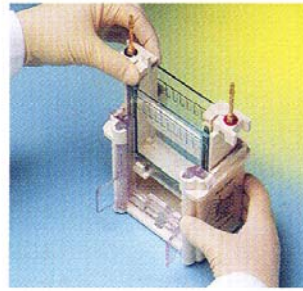
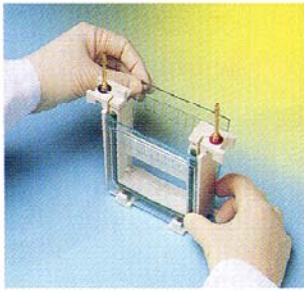
La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón. En el esquema se muestran secuencialmente la situación en (a) al principio de la electroforesis, (b) durante el proceso de apilamiento ('stacking') y (c) durante la separación en el gel resolutive. El primer gel ('stacking') es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el segundo gel que es el que realmente separa las proteínas. Este sistema es especialmente adecuado para analizar muestras diluidas sin perder resolución.

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.





**Easy setup procedure.** Permanently bonded spacers guarantee perfect alignment and leak-free casting. For proper alignment, simply assemble the casting frame and glass plates on any flat surface. The spring-loaded lever in the casting stand creates a tight seal against the rubber gasket.



Place the gel cassettes in the assembly, transfer to the clamping frame (gently hold the gel cassettes in position when inserting into the clamping frame), use the soft-touch cam closures to secure the gel cassettes against the gaskets, and the gels are ready for electrophoresis.

## SDS-PAGE

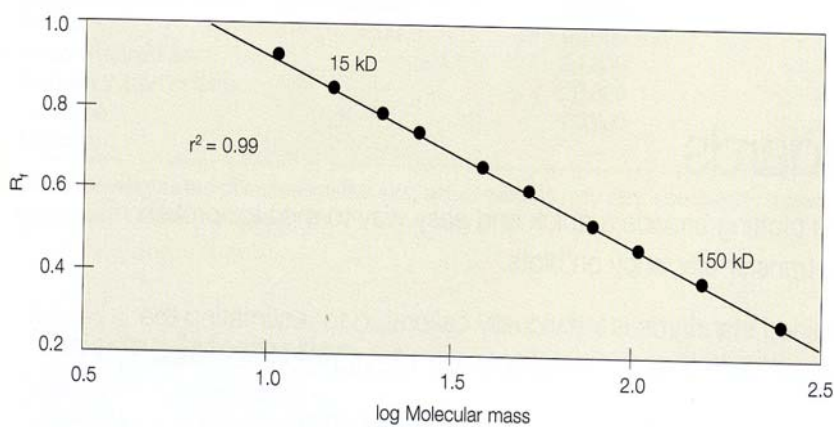
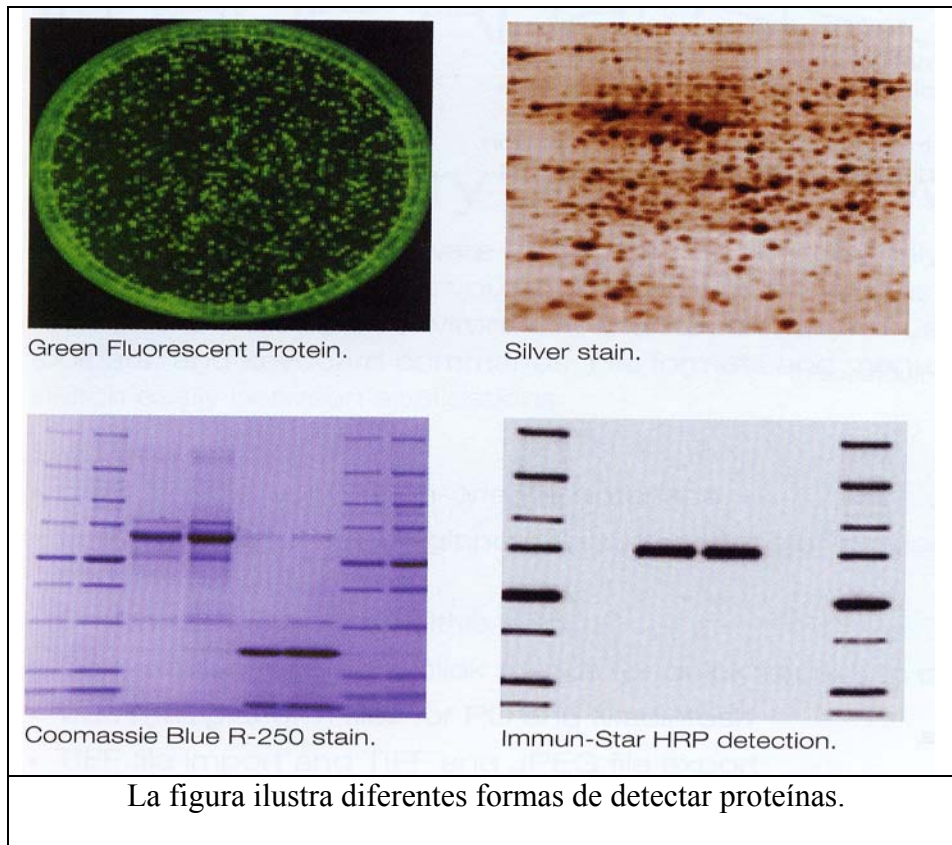
### SDS-PAGE

Es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poli(acrilamida) que se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli (Laemmli (1970), Nature, 277, p. 680). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

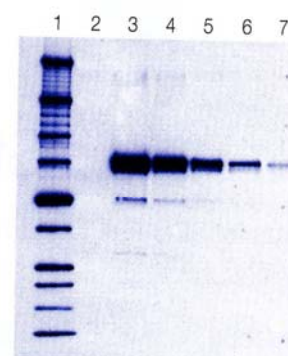
En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por isotacoforesis de la muestra en el primer gel ('stacking'). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS que a su vez tienen menor movilidad que los iones  $\text{Cl}^-$  de los tampones de carga en el gel de apilamiento ('stacking'). Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies han de migrar a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato sólo se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones  $\text{Cl}^-$  si hay una región de 'field strength'. 'Field strength' es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración, El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que  $[\text{Cl}^-] > [\text{proteína-SDS}] > [\text{glicinato}]$ . Como sólo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del  $\text{Cl}^-$  y del glicinato. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su movilidad. A partir de ese momento la interfase entre el glicinato y el  $\text{Cl}^-$  deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazarán a su propia velocidad.

El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una

molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.



**Standard curves generated with Precision Plus Protein standards.** The curves have high  $r^2$  values, enabling accurate and reliable molecular mass determination.



**Simultaneous western blot detection with Precision Plus Protein standards.** Lane 1, standards; lanes 3–7, serial dilutions of transferrin. The blot was incubated with StrepTactin-HRP and anti-transferrin antibody and detected using Immun-Star™ HRP chemiluminescent substrate with film-based detection.

La grafica ilustra la relación lineal entre la distancia recorrida por la proteína en el gel y el logaritmo de su peso molecular.

## **Resultados**

### PREPARACIÓN DEL GEL

Preparar la mezcla del gel de separación (sin el SDS) en un quitasato y degasear durante 15 mins. Mientras, preparar el molde para cada gel y la solución de PSA.

Una vez degaseada la mezcla añadir el SDS correspondiente y mezclar con cuidado de no provocar burbujas.

Marcar en el molde la altura del gel de separación: 2 cm desde el borde superior del cristal pequeño.

Agregar PSA, mezclar, y a continuación añadir TEMED. Mezclar de nuevo y verter en el molde hasta un poco por encima de la marca. El resto de la mezcla ponerla en un tubillo eppendorf como testigo de la polimerización.

Dejar polimerizar al menos 1 hora. Si el gel se va a correr el día siguiente, colocar una capa de overlay buffer y dejar en cámara fría tapado con papel de aluminio.

**Una vez polimerizado el gel de separación,** lavar la superficie del gel con agua destilada y secar las paredes.

Preparar la mezcla de stacking sin SDS en un kitasato y degasearla 15 mins. Añadir el SDS correspondiente, PSA y TEMED (en este orden y mezclando cada vez). Verter en el molde hasta el tope y colocar el peine.

**Preparación de las muestras:** Mezclar con el buffer de carga SB 2x (1:1) y hervir a 95° durante al menos 5 mins, junto con el estándar.

Mientras, quitar el peine del gel con mucho cuidado y lavar los pocillos con buffer de electroforesis con el fin de eliminar las partículas no polimerizadas .

Sacar el molde del portamoldes verde y adosarlo al porta electrodos (éste se ha untado con gel de sellado a lo largo de la gomilla verde), con el cristal pequeño hacia dentro. Colocarlo a su vez en el mortamoldes de electroforesis y todo junto dentro de la cubeta. Marcar los geles como A y B.

Llenar los compartimentos interior (125 ml) e inferior (200 ml) con buffer de electroforesis (garrafa) y cargar las muestras con la punta blanca larga.

Colocar la tapa portaelectrodos y correr la electroforesis a 200 v (constante) 35 mins.

### **INMUNOTRANSFERENCIA**

Mientras corre la electroforesis se preparan los componentes del sándwich: Se sumergen en solución Transfer 6 trozos de papel de filtro grueso del tamaño del gel que se va a transferir, así como un trozo de papel de nitrocelulosa del mismo tamaño.

Sacar el portamolde con el gel del aparato de electroforesis, separar los dos cristales con la espátula verde, generalmente el gel quedará adosado al cristal grande.

Mientras, hacer el sándwich de transferencia en la cubeta correspondiente: colocar tres trozos de papel de filtro. Después de eliminar el stacking del gel, colocar encima el papel de nitrocelulosa y marcar en éste el primer pocillo cortando el borde. Dar la vuelta al cristal del molde y separar con cuidado el gel tirando desde un extremo. Colocar la membrana con el gel sobre los trozos de papel de filtro y encima del gel los otros dos trozos.

Una vez concluida la transferencia, marcar las membranas.

### **REVELADO DEL GEL**

Teñir el gel durante 1 h con sc de trabajo de coomassie en agitación. Descartar esta solución y añadir sc. desteñidora en agitación. Cambiarla con frecuencia hasta que el gel no tenga fondo azul. Esta solución se puede reciclar pasándola por carbono activo.

Poner el gel en sc. Preservadora 10 mins con agitación y conservarlo en agua.

### **INMUNOBLOTTING**

Incubar el papel de nitrocelulosa con solución de bloqueo durante 20-30 min con agitación.

Diluir el primer anticuerpo en solución de bloqueo. Añadir al papel de nitrocelulosa e incubar toda la noche en un agitador de placas.

Lavar 3 veces 10 min cada vez con solución de lavado.

Diluir el segundo anticuerpo y añadirlo a la membrana. Incubar de 4 a 6 horas.

Lavar 3 veces 10 min cada vez con solución de lavado.

Añadir solución de inmunofijación hasta el desarrollo de las bandas. Parar la reacción con agua.

Leer los resultados.

## REACTIVOS

### **4X Running Gel Buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)**

Buffer para preparar el gel de separación:

36,3 g Tris (FW 121.1)	18,15 g
Añadir 150 ml ddH <sub>2</sub> O	75 mL
Ajustar a pH 8.8 con HCl	idem
ddH <sub>2</sub> O a 200 ml	<u>hasta 100 mL</u>
Almacenar hasta 3 meses a 4°C en la oscuridad.	

### **4X Stacking Gel Buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)**

Buffer para preparar el gel de stacking:

3.0 g. Tris (FW 121.1)  
Añadir 40 ml ddH<sub>2</sub>O  
Ajustar a pH 6.8 con HCl  
ddH<sub>2</sub>O a 50 ml  
Almacenar hasta 3 meses a 4°C en la oscuridad.

### **10% SDS**

10 g. SDS  
ddH<sub>2</sub>O a 100 ml  
Almacenar hasta 6 meses a T<sup>a</sup> ambiente.

### **10% Ammonium Persulfate (Initiator)**

0,05 g ammonium persulfate  
ddH<sub>2</sub>O a 0,5 ml.  
No almacenar, prepararlo en el momento de usar.

### **2X Treatment Buffer (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v Glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% Bromophenol Blue, pH 6.8)**

2.5 ml. 4X Stacking Gel Buffer  
4.0 ml. 10% SDS  
1.0 ml. Glycerol  
2.0 mg. Bromophenol blue  
0.31 g. dithiothreitol (DTT; FW 154.2)  
ddH<sub>2</sub>O a 10.0 ml  
Almacenar en alícuotas de 0.5 ml a -20°C hasta 6 meses.

### **Monomer Solution (30.8%T 2.7%Cbis)**

60 g. Acrilamida (FW 71.08)  
Precaución: La Acrilamida es neurotóxica y debe ser manipulada con cuidado.  
1.6 Bisacrilamida (FW 154.2)  
ddH<sub>2</sub>O a 200 ml

### **Tank Buffer (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3)**

Buffer para los reservorios del ánodo y cátodo:

Tris:	24.22 g.	12,12 g	6,06 g
Glicina:	115.3 g	57,60 g	28,8 g
SDS:	8g.	4,0 g	2,0 g
DdH <sub>2</sub> O:	<b>8 L</b>	<b>4 L</b>	<b>2 L</b>

No es necesario comprobar el pH.

**Transfer Buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin, SDS 0.04%, 20% Methanol)**

Tris	3,03 g	1,65 g
Glicina	14,41 g	7,20 g
SDS 20%	2 ml	1 ml
DdH <sub>2</sub> O hasta	<b>1 L</b>	<b>0.5 L</b>

Ajustar el pH a 8,3

Añadir leche descremada al 5% el día en que se use

Ojo: SDS sólo se añade para transferir proteínas desnaturalizadas

**Buffer de bloqueo (250 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 250 mM PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 0.5 % Tween-20)**

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na	16.0 g	3,0 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	17.8 g	3,6 g
NaCl	4.4 g	0.9 g
Tween-20	2.5 ml	0.5 ml
DdH <sub>2</sub> O hasta	<b>500 ml</b>	<b>100 ml</b>

**Buffer de lavado (0.15 M NaCl, 0.5% Tween-20, Volúmen final 1000 ml.)**

	<u>200 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>1000 ml</u>
NaCl:	1.75 g	4.39 g	8.77 g
Tween-20	1 ml	2.5 ml	5 ml

**TINCIÓN DE GELES**

**Tinción con Coomassie 0.2%**

Preparación de **solución stock**:

Añadir una tableta de Coomassie (Fast Gel Blue R de Pharmacia) a 80 ml de ddw

Agitar 5-10 mins

Añadir 120 ml de metanol y agitar 2-3 mins

Filtrar a través de papel de filtro. Almacenar a T<sup>a</sup> ambiente.

En el momento de usar preparar la **solución de trabajo**:

4 ml ac. Acético

16 ml ddw

20 ml sc. Stock

**Solución de desteñido**



Metanol	30% ml
Ac. Acético	10% ml
Ddw	60% ml

### **Solución preservadora**

Glicerol 5%	0.5 ml
Ac. Acático 10%	1 ml
Ddw 85%	8.5 ml

## **ELECTROFORESIS SDS-PAGE**

### **Gel del 10%**

#### **Gel de separación**

	<u>2 geles</u>	<u>1 gel</u>
Agua redestilada	4.1 ml	2.05 ml
Monómero Acrilam- Bis-Acrilam. 30%- 0.8%	3.3 ml	1.65 ml
Buffer de separación	2.5 ml	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
	<hr/>	<hr/>
	10 ml	5.0 ml
PSA 10%*	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

#### **Gel de STACKING**

Agua redestilada	2.4 ml
Monómero Acrilam- Bis-Acrilam. 30%- 0.8%	0.6 ml
Buffer de stacking	1.0 ml
SDS 10%	0.04 ml
	<hr/>
	4.04 ml
PSA 10%*	25 µl
TEMED	10 µl