

## Capítulo 13

# Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

### *Introducción*

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bis-acrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmuno-electrotransferencia (Capítulo 14). En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

### *Estimación del peso molecular por SDS-PAGE*

Se deduce de lo anterior que esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido (Fig.13.1). Estas determinaciones poseen un margen de error de ~10%. Algunos tipos de proteínas pueden mostrar una migración atípica en esta técnica, por ej. proteínas con puntos isoeléctricos muy extremos (donde la carga intrínseca puede ser lo suficientemente fuerte para influir en la movilidad), o proteínas altamente glicosiladas.

La determinación del PM de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM. No obstante, en ocasiones es útil analizar muestras no reducidas de una proteína, por ejemplo, para evaluar su composición de subunidades. En tal caso, la movilidad electroforética en SDS-PAGE, aunque guarda una cierta relación con el PM, no necesariamente corresponde con su PM exacto, dependiendo de la forma y los pliegues causados por los enlaces disulfuro, que seguirían intactos aún después de la interacción SDS-proteína, en condiciones no-reductoras.

Si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol (u otro reductor como el ditioneitol), los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales. La movilidad electroforética relativa (**R<sub>f</sub>**) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El R<sub>f</sub> se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario). Ejemplo:

Cuadro 13.1: **Determinación del peso molecular de una proteína "incógnita", mediante SDS-PAGE.** Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol, y corridas en un gel al 12% de concentración.

Marcador	PM	Distancia (mm)	R <sub>f</sub> (vs.70 mm)
Albúmina bovina	66.000	6,5	0,092
Ovalbúmina	45.000	13,0	0,186
Gliceraldeh-3-P-DH	36.000	18,0	0,257
Anhidrasa carbónica	29.000	25,0	0,357
Tripsinógeno	24.000	28,5	0,407
Inhibidor de tripsina	20.100	38,0	0,543
α-Lactalbúmina	14.200	50,0	0,714
Banda incógnita	?	44,0	0,623

Al graficar estos datos en papel semilogarítmico ( $x=R_f$ ,  $y=\text{Log PM}$ ) se observa la relación mencionada (Fig.13.1). El PM estimado para la proteína incógnita es de 16.200 daltons, interpolando mediante una regresión lineal en los puntos adecuados.

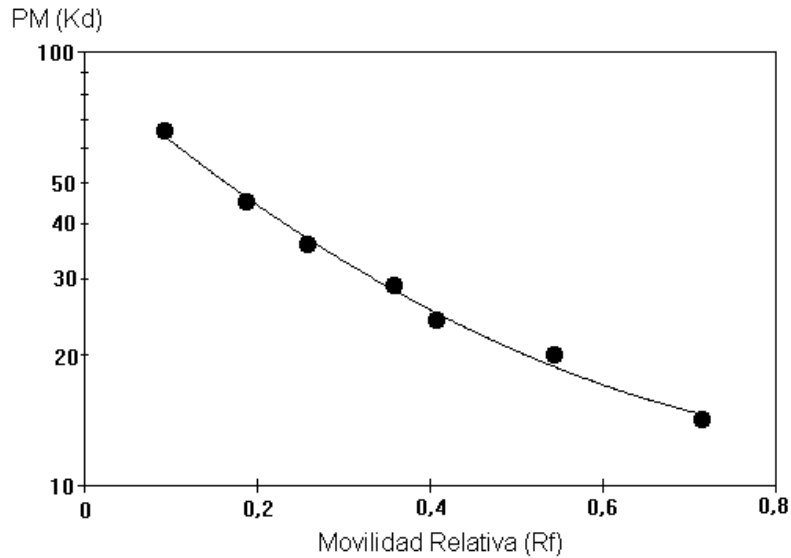


Figura 13.1: **Ejemplo de una curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE.** Los datos corresponden al ejemplo del Cuadro 13.1. Nótese que la línea de regresión con los estándares de PM conocido muestra una ligera curvatura, típica de los geles de concentración homogénea. Para la interpolación de bandas incógnita, en la práctica es más sencillo aplicar una regresión lineal simple a los puntos colineales más cercanos a la muestra. La extrapolación de la curva hacia el eje Y, donde  $R_f=0$ , indica que, teóricamente, las proteínas mayores de 100 Kd no penetran en el gel.

Para ilustrar la utilidad del análisis de una proteína bajo condiciones de reducción o no-reducción, se puede usar como ejemplo la molécula de IgG (Fig.13.2). Al correr una preparación pura de IgG no reducida, se obtendrá una sola banda, en la región de PM ~150-160 Kd. Si se trata la muestra con un reductor como el 2-mercaptoetanol, se observará dos bandas: una de ~50 Kd (la cadena  $\gamma$ ) y otra de ~25 Kd (las cadenas livianas kappa y lambda).

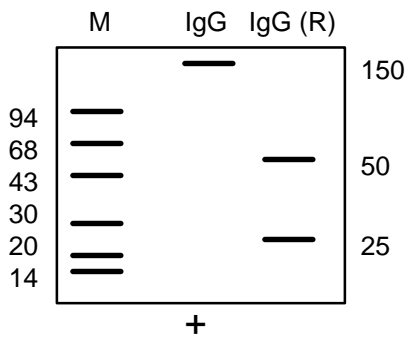


Figura 13.2: **Análisis de la composición de subunidades de una proteína en SDS-PAGE.** Una muestra de IgG purificada (carril central) que no fue tratada con agente reductor, migrará con un PM aparente de 150-160 Kd. La misma se separará en dos bandas, al ser reducida (IgG (R), con PM de 50 y 25 Kd, respectivamente. A la izquierda se representan los marcadores de PM conocido (M).

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético **discontinuo**, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el gel superior o **compactador**) y luego las separan (en el gel inferior o **separador**; Fig.13.3).

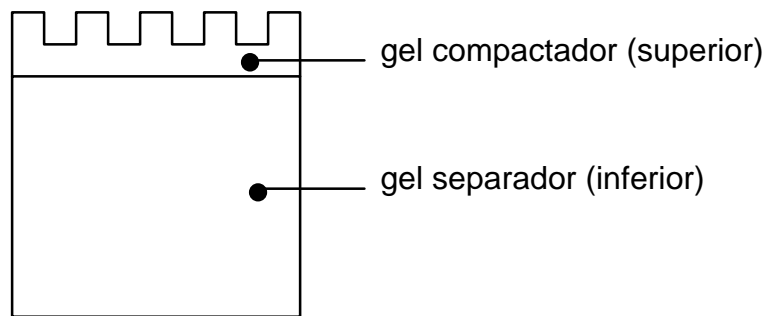


Figura 13.3: **Partes de un gel de SDS-PAGE.** Está compuesto de dos geles de distinta porosidad y pH, que cumplen funciones diferentes, para aumentar el poder de resolución.

En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ej. 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10.000-90.000 daltons.

### ***Geles en gradiente***

Ciertos tipos de muestras poseen componentes con PMs muy variados, que incluyen desde macromoléculas hasta pequeños péptidos. En tales casos, el uso de un gel separador de concentración **homogénea** limita a resolver adecuadamente solo una fracción determinada de los componentes. La alternativa para estos casos es la utilización de geles de concentración heterogénea, en los cuales se prepara un **gradiente** que va desde una concentración baja, al inicio del gel (ej. 5%), aumentando hacia el final (ej. 30%) Estos geles proporcionan la mejor resolución obtenible por SDS-PAGE para mezclas heterogéneas, y su preparación requiere de un aditamento simple para generar gradientes, que puede ser obtenido comercialmente o preparado en el laboratorio (Fig.13.4).

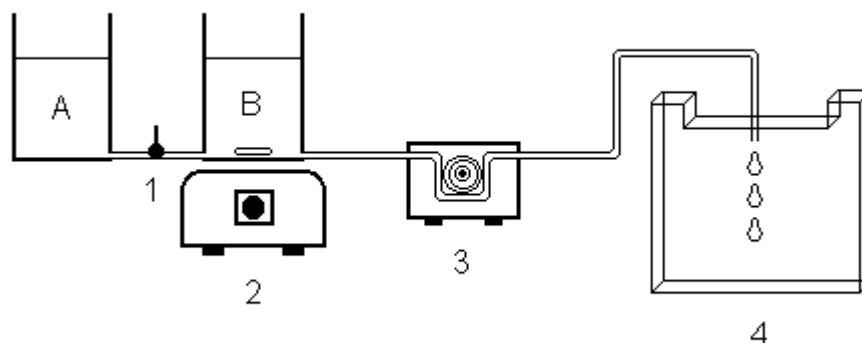


Figura 13.4: **Esquema de la preparación de un gel de poliacrilamida en gradiente.** 1:llave; 2:agitador magnético; 3:bomba peristáltica; 4:molde de vidrio para el gel; A:solución diluída (concentración mínima); B:solución concentrada (concentración máxima).

### ***Preparación de geles para SDS-PAGE (Laemmli, 1970).***

Las cantidades que se describen a continuación<sup>1</sup> sirven para el sistema de mini-geles de Bio-Rad (Mini-Protean II<sup>®</sup>). Las mismas pueden adaptarse para otras cámaras de diversa capacidad, conservando las proporciones.

1.Para la preparación del gel separador o inferior (5 ml, grosor = 0,75 mm), mezclar los siguientes reactivos, según el porcentaje de gel deseado, en un frasco Kitasato de 50 ml:

Componente	Concentración final						
	20%	15%	12%	10%	7,5%	5%	
agua desionizada	367	1167	1683	2000	2367	2783	μl
amortiguador separador	1250	1250	1250	1250	1250	1250	μl
SDS	50	50	50	50	50	50	μl
acrilamida/bisacrilamida	3333	2500	2000	1667	1250	833	μl

<sup>1</sup> **Nota:** la acrilamida es **neurotóxica**. Al pesar el reactivo sólido debe usarse guantes y mascarilla. Limpie cualquier residuo de acrilamida en la balanza y sus alrededores, pues la inhalación es tan nociva como el contacto con la piel. Al preparar geles es necesario usar guantes e igualmente, limpiar cualquier derrame. Los sobrantes de solución de monómeros no deben ser vertidos en el desagüe, es mejor polimerizarlos y descartarlos en forma de gel (ya que el polímero pierde la toxicidad).

2.Preparar el molde para el gel. Hacer una marca a ~1-1,5 cm debajo del nivel del "peine" de muestras. Retirar el peine.

3.Con la mezcla de reactivos a temperatura ambiente, desgasear aplicando vacío<sup>2</sup> por 15 min.

4.Iniciar la polimerización agregando 3 µl de TEMED y 15 µl de persulfato de amonio<sup>3</sup> a la mezcla. Inmediatamente mezclar y verter la solución en los vidrios (molde), hasta la marca hecha en el paso #2, sin atrapar burbujas. De seguido, eliminar la curvatura (menisco) en la superficie, con una delgada capa (1-2 mm) de agua destilada o de isobutanol, depositada muy suavemente sobre la mezcla. Dejar que polimerice el gel (óptimamente en 15-20 min).

5.Una vez que la interfase entre el polímero y el agua se torna visible, esperar 10-15 min adicionales para que se complete la reacción. Luego, decantar el exceso de líquido de la superficie, y colocar el peine para muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas).

6.Mezclar los componentes del gel superior (compactador):

Componente	Cantidad
agua desionizada	1,5 ml
amortiguador superior	630 µl
SDS	33 µl
acrilamida/bisacrilamida	330 µl
TEMED	2 µl
Persulfato de amonio	10 µl

7.Una vez agregados los catalizadores, mezclar y verter de inmediato en el molde, nivelando ahora el peine a su posición horizontal, sin atrapar burbujas. Dejar polimerizar.

8.Quitar el peine deslizándolo suavemente, y lavar los hoyos llenándolos con agua y aspirando luego con una jeringa. Esto elimina residuos de componentes no polimerizados.

9.Preparar las muestras. Estas se pueden analizar en estado **reducido** o **no reducido**, mezclándolas con el respectivo amortiguador de muestras. Si las muestras son sólidas, se pueden disolver directamente en el amortiguador "1x". Si son líquidas, se mezclan partes iguales de muestra y amortiguador "2x". La cantidad de proteína a aplicar depende de la sensibilidad del sistema de detección (ej. µg para tinción de Coomassie, ng para tinción de

<sup>2</sup> asegurarse de que el sistema de vacío cuente con una trampa de seguridad.

<sup>3</sup> las cantidades de persulfato y TEMED pueden variar según cada lote y estado de los reactivos.

plata, etc.) y de la heterogeneidad de la muestra. Para reducir los enlaces disulfuro de las muestras (en el amortiguador reductor), colocarlas en baño de agua a ebullición durante 4-5 min. Para correr muestras no reducidas, se mezclan con amortiguador (sin reductor) y se aplican al gel directamente, sin calentamiento. La concentración de las muestras a usar depende de su heterogeneidad. Las mezclas complejas de proteínas se pueden preparar a ~5-10 mg/ml.

**10.** Cargar las muestras en los hoyos (5-15  $\mu$ l, correspondiendo por ej. a 10-30  $\mu$ g en el caso de mezclas complejas, o 3-10  $\mu$ g en el caso de proteínas purificadas). Para esto, se puede llenar previamente todos los hoyos con amortiguador de cámara, y luego aplicar las muestras "bajo el amortiguador" (dado que son más densas por la glicerina), con una pipeta Hamilton o con una pipeta de puntas descartables para geles (puntas capilares). Es fundamental realizar estos pasos sin que haya contaminaciones cruzadas entre los distintos hoyos. Igualmente, si se utiliza una pipeta Hamilton, hay que lavarla exhaustivamente entre las distintas muestras. Incluir marcadores de PM en uno de los carriles, como referencia.

**11.** Llenar la cámara con el amortiguador de cámara (180 ml en el tanque inferior y 120 ml en el superior). Colocar el gel en la cámara y correr las muestras a 200 v (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel (45-60 min).

**12.** Sacar el gel y sumergirlo en fijador durante 15 min, en un recipiente tapado (para evitar los vapores tóxicos del metanol), con agitación suave. Además de fijar, esta solución lava una buena parte del SDS del gel, el cual interfiere con la tinción.

**13.** Teñir el gel durante 1 hr con azul Coomassie R-250. Eliminar luego el exceso de colorante con varios cambios del decolorador. La decoloración es más rápida si se agrega al recipiente unos trocitos de esponja (tipo espuma de poliuretano) limpios, que actúan adsorbiendo el colorante.

**14.** Registrar los resultados por fotografía, por ejemplo con un sistema de revelado instantáneo (Polaroid<sup>®</sup>). Si se desea guardar el gel, se puede dejar en ácido acético al 7% en cajas o en bolsas de plástico selladas. El gel puede secarse sobre un papel de filtro grueso, o entre trozos de celofán especial. Para esto se sumerge el gel durante la noche en 5% metanol con 3% glicerol, se monta sobre el papel filtro o celofán, con otra hoja de celofán encima, y se coloca en un secador de vacío durante 1-3 hr a 60°C. El secado de geles no está exento de riesgos, ya que pueden ocurrir rupturas que lo arruinen. A mayor concentración del gel, mayor es la dificultad para el secado, y viceversa. Si no se dispone de un secador, se puede emplear un vidrio con peso sobre el celofán para secar a temperatura ambiente, más lentamente. Aún estando secos, los geles pueden deteriorarse al ganar o perder humedad con el tiempo. De ahí la importancia de contar con un sistema de registro fotográfico.

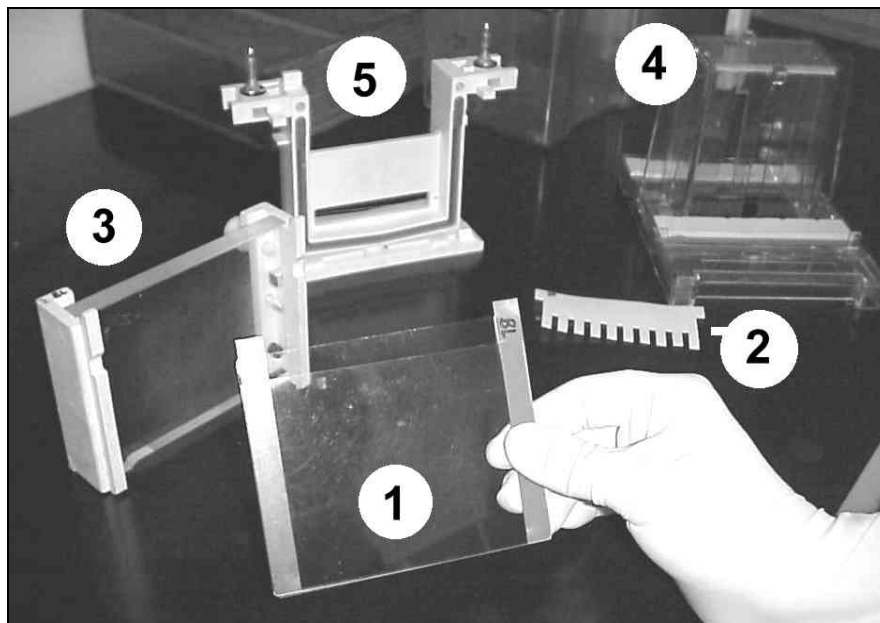


Figura 13.5: **Preparación de un gel de poliacrilamida: partes.** (1) vidrios separados por reglitas de teflón, que determinan el grosor del gel; (2) peine para formar los hoyos para muestras; (3) bloque de plástico para ensamblar los vidrios; (4) base para realizar el chorreo del gel; (5) núcleo de la cámara de electroforesis, con los electrodos.

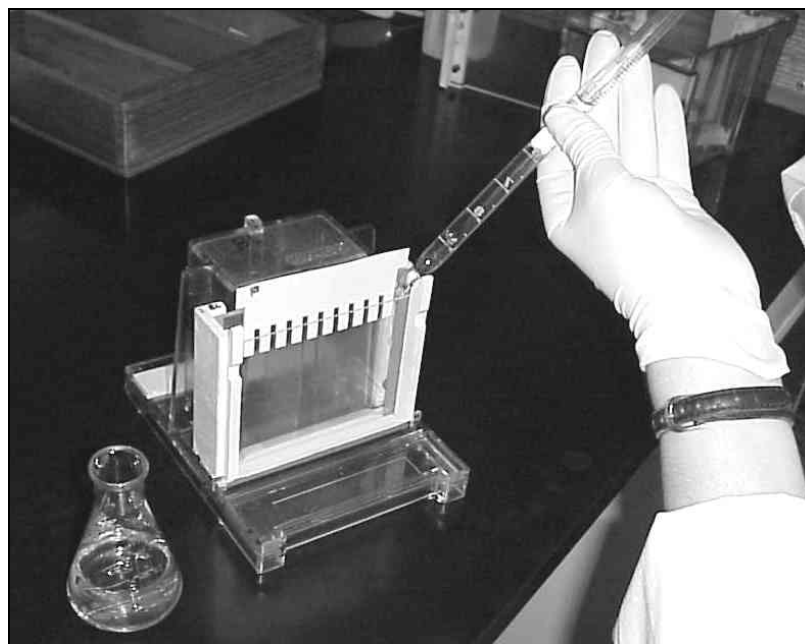


Figura 13.6: **Polimerización del gel.** Una vez ensambladas las piezas del molde, los componentes del gel se mezclan con los catalizadores e inmediatamente se vierten en el espacio entre los vidrios.



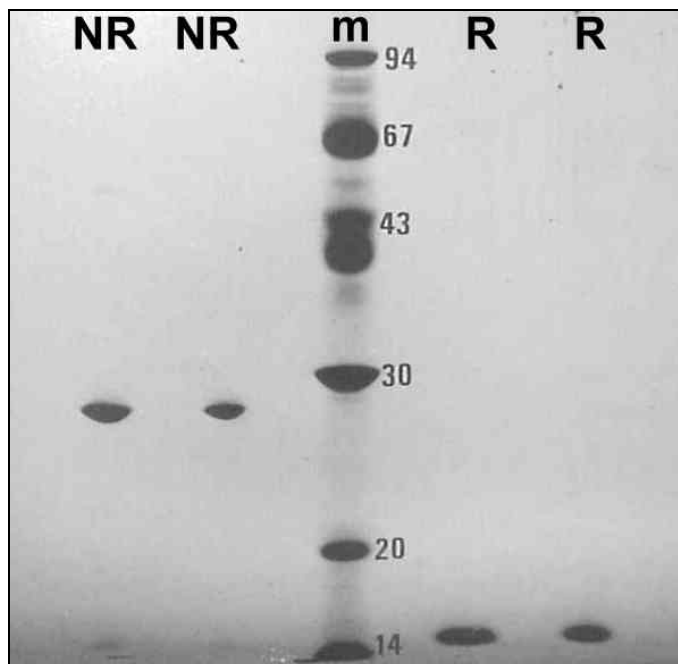


Figura 13.7: **Análisis de la pureza y composición de subunidades de una proteína mediante SDS-PAGE.** Los carriles rotulados NR y R corresponden a muestras de una lectina aislada del veneno de *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, en condiciones no-reducidas y reducidas, respectivamente. El carril central (m) posee marcadores de peso molecular, cuya masa (kDa) se indica a la derecha. Se deduce que esta proteína es un dímero formado por subunidades de aproximadamente 14 kDa (Lomonte *et al.*, 1990).

## Reactivos

### *Solución de monómeros de acrilamida:*

29,2 g acrilamida; 0,8 g bis-acrilamida; disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio, en refrigeración (<1 mes).

### *Amortiguador del gel separador (inferior):*

18,15 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

### *Amortiguador del gel compactador (superior):*

3,0 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

### *Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x):*

12 g Tris; 57,6 g glicina; 4 g SDS; disolver en ~300 ml de agua. El pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 400 ml. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces al momento de utilizar.

*Persulfato de amonio:*

Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico (sellar bien el frasco y mantener en desecador). Una alternativa es preparar alícuotas (ej. 200  $\mu$ l) en viales pequeños y congelarlas.

*Solución de SDS:*

1,0 g duodecilsulfato de sodio; disolver en 10 ml de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.

*Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2x):*

10,0 ml amortiguador del gel superior; 16,0 ml solución de SDS; 50 mg azul de bromofenol; 12,0 ml glicerol; 4,0 ml agua; mantener a temperatura ambiente (<2 meses).

*Amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x):*

El mercaptoetanol es inestable en esta solución, por lo que se prepara una pequeña cantidad del reactivo para una semana. Agregar 0,2 ml de 2-mercaptoetanol a 4,2 ml del amortiguador no reductor. Guardar a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los agentes son 4% SDS y 5% 2-Me. El 2-Me es tóxico y de olor desagradable (usar en campana de extracción).

*Fijador:*

500 ml metanol; 70 ml ácido acético glacial; 430 ml agua; Guardar a temperatura ambiente en recipiente hermético. *Importante:* Evitar el contacto y la inhalación de vapores de metanol.

*Colorante Coomassie Blue R-250:*

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 ml metanol; 46 ml ácido acético; 230 ml agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua. Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Aunque el colorante puede ser reusado varias veces para ciertos fines, la sensibilidad declina (usualmente es del orden de 0,5  $\mu$ g de proteína), por lo que se prefiere usar una pequeña cantidad y descartarla cada vez. Otro tipo de Coomassie, el G-250, puede ser utilizado como colorante para geles, aunque su sensibilidad es menor.

*Decolorador:*

200 ml metanol; 100 ml etanol; 50 ml ácido acético; 650 ml agua; guardar a temperatura ambiente.