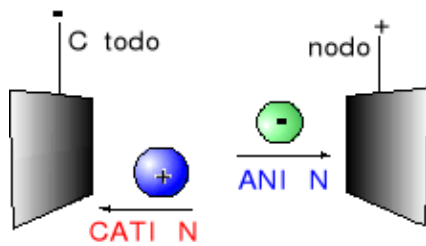


## Electroforesis



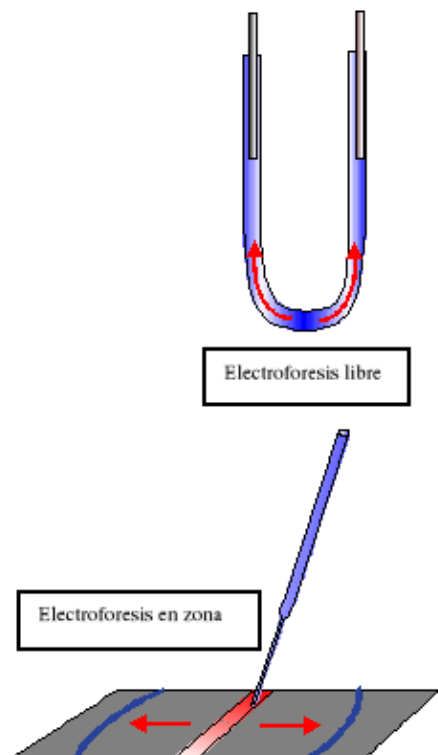
En la técnica de separación anterior hemos utilizado la fuerza centrífuga para que asociada a la diferencia de masa o densidad de las partículas a separar nos las diferencie, ahora vamos a utilizar otra propiedad de las partículas biológicas, la carga.

De hecho la electroforesis se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el diferente comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el **cátodo** y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.

En biología, no se utiliza esta técnica con iones, sino con macromoléculas o incluso con células enteras. Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles.

Al igual que en la centrifugación también hay dos criterios de separación con el mismo concepto:

- **Electroforesis analítica:** orientada a la búsqueda de propiedades de un solo componente.
- **Electroforesis preparativa:** orientada a la separación entre gran cantidad de componentes.



La diferencia con respecto a la centrifugación es la utilización del mismo instrumental en uno y otro criterio.

## Bases de la electroforesis

Sin lugar a dudas, la forma más sencilla de realizar una electroforesis consiste en un tubo en forma de U donde se introduce un electrolito y la muestra además por supuesto, de los dos electrodos. Al conectar el sistema las macromoléculas comenzarán a migrar por el tubo hacia el polo opuesto y así irán diferenciándose según su carga. Uno de los inconvenientes que presenta esta técnica es la fluidez del medio, o sea, la facilidad con la que las partículas difunden, de modo que al cortar la corriente nos encontraríamos con la tendencia natural al equilibrio, con lo que no habríamos logrado nada. A este tipo de electroforesis se la denomina electroforesis **libre**.

El siguiente paso por tanto es el idear un soporte que permita estabilizar las moléculas una vez desconectados los electrodos. De este modo se ideó la electroforesis **en zona**, que tiene como peculiaridad el realizarse en un plano y sobre un medio soporte estabilizante que impida la difusión de las moléculas al acabar, y por supuesto que no presente un impedimento al movimiento de las partículas (normalmente) en su superficie.

Ahora vamos a intentar, al igual que hicimos en la centrifugación, encontrar un modelo matemático simple que nos dé ecuaciones que nos sirvan para definir la partícula. Suponemos por tanto una partícula en una cubeta con dos electrodos, dicha partícula la vamos a considerar ideal (*esférica de radio  $r$ , no hidratada*) pero esta vez, por necesidad debe estar cargada, para que migre a uno de los dos electrodos. Con esto ya podemos completar ecuaciones.

$$F_E = E q = \frac{V}{\delta} q \quad F = 0 \quad E q - 6\pi\eta r v = 0$$

$$F_H = -f \quad v = 6\pi\eta r v$$

$$v = \frac{E q}{6\pi\eta r}$$

De esta forma ya tenemos definida la velocidad de una partícula cargada por unidad de campo eléctrico. Al igual que ocurría en la centrifugación, esta ecuación depende de las condiciones del sistema. Esto hace que definamos la **movilidad electroforética** ( $\mu$ ).

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Al contrario que ocurría con la centrifugación, no es de gran utilidad, ya que si nos damos cuenta ha partido de un supuesto totalmente falso, y es que no se puede pensar que una partícula cargada no se encuentre **hidratada y rodeada de contraiones**. Por esta razón volvemos a introducir un nuevo término físico, el **potencial en la superficie de una esfera cargada** ( $\zeta$ ), que en un principio parece complicarnos las cosas, pero que a la larga será útil como concepto.

$$\zeta = \frac{q}{D r} \quad \mu = \frac{\zeta D}{6\pi\eta}$$

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Con  $\mu$  corregido ya tenemos definida la movilidad electroforética para el modelo libre, pero aún se puede añadir más, si hacemos un esquema de la partícula en disolución, vemos como hay que aplicar nuevos términos.

Una partícula cargada presenta una película de solvatación que modifica el radio y una nube de contraiones de espesor  $d$ . según el modelo de **Devine – Hückel** se define  $K$  (constante D-H).

$$K = \frac{1}{d} = A \sqrt{\frac{I}{DT}}$$

- $A$  = suma de constantes ( $NA$ , la constante de Boltzmann, la carga del electrón).
- $I$  = fuerza iónica del medio.

Si ahora sustituimos en la ecuación de potencial

$$\zeta = \frac{q}{Dr} - \frac{q}{D(r+d)} = \frac{q}{d} \frac{1}{r} - \frac{1}{r+d} = \frac{q}{d} \frac{r+d-d}{r(r+d)} = \frac{q}{Dr} \frac{d}{r+d} = \frac{q}{Dr} \frac{1}{\frac{r}{d}+1}$$

$$\zeta = \frac{q}{Dr} \frac{1}{Kr+1}$$

Según esta ecuación el segundo término es menor que 1, lo que significa que el potencial disminuye si consideramos la nube iónica. Pero nos interesa no, de modo que sustituimos en la movilidad

$$\mu = \frac{q}{Dr} \frac{1}{Kr+1} \frac{D}{6\pi\eta} = \frac{q}{6\pi\eta r} \frac{1}{Kr+1}$$

En esta otra, al igual que lo ocurrido en el potencial en segundo término es menor que 1 y por tanto la capa de contraiones disminuye la movilidad electroforética.

### **Parámetros experimentales que modifican**

- Constante iónica del medio. Si repasamos las ecuaciones:

$$\text{Si } I \quad K = A \sqrt{\frac{I}{DT}} \quad K \quad \text{y por tanto } \mu$$

- Temperatura.

$$\text{Si } T \quad K = A \sqrt{\frac{I}{DT}} \quad K \quad \text{y por tanto } \mu$$

- Electroosmosis, que es un proceso derivado de aplicar un campo eléctrico a un soporte con grupos cargados fijos.

El hecho de no poder desplazarse hace que sea el medio el que realice el movimiento contrario ya que el sistema debe permanecer en equilibrio. Ese movimiento del medio puede favorecer la movilidad electroforética (como en 1) o disminuirla (como en 2).

La movilidad electroforética sólo se puede averiguar empíricamente y mediante electroforesis libre ya que en soporte no se puede calcular el desplazamiento ( $I$ ) que se encuentra en la ecuación de velocidad ya que en papel, por ejemplo las moléculas se desplazan por la superficie y por lo tanto no lo hacen en línea recta, y si

tratamos con un gel el movimiento es en *zigzag*. Por este motivo se diseñaron las *células de Tiselius*, consistentes en una serie de tubos planos o circulares separados por pestañas, de modo que los tres módulos de los que consta pueden moverse unos sobre otros (como se muestra en el dibujo). Esa posibilidad de movimiento es crucial para conseguir la distribución óptima de electrolito y muestra. Una vez llenos todos los tubos. Se aplican los electrodos, produciendo una corriente que hará que la muestra (que sabemos donde se encuentra) migre, llegando a un detector que nos marcará el tiempo que ha tardado en llegar el muestra. Conocemos entonces el tiempo y el espacio recorrido, por tanto podemos calcular .

### Soportes

Debido a la gran difusión existente en la electroforesis libre y al poco uso que se le puede dar (casi exclusivamente para calcular ), se empezaron a desarrollar distintos soportes, que históricamente son:

- **Papel:** que no hay que decir la gran cantidad de inconvenientes que presenta, debido sobre todo a la difusión, a la escasa resistencia a tratamientos bien de colorantes, bien enzimáticos necesarios en muchos experimentos.
  - **Acetatos de celulosa:** éstos presentaban los mismos inconvenientes, aunque eran más resistentes.
- **Geles:** con menor difusión que en papel y más resistentes a los tratamientos.
  - **Geles de almidón:** su gran inconveniente es la imposibilidad de definir el tamaño de poro.
  - **Geles de acrilamida**
    - Permiten gran cantidad de tratamientos.
    - Permiten regular el tamaño de poro.
    - Muy estables.
    - Permite separaciones más rápidas.
    - Casi no presenta endósmosis.
    - Son transparentes, con lo que permiten hacer estudios de densidometría.
    - Para realizar estos geles se parte de cuatro componentes líquidos:

- **Acrilamida**



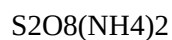
- **Agente entrecruzante: bisacrilamida**



- **TEMED (Tetrametilen, etilen diamina)**



- **APS (Persulfato amónico)**



De esta forma que vemos polimeriza la acrilamida, utilizando el APS como iniciador, el TEMED como catalizador y la bisacrilamida como agente entrecruzante.

El persulfato amónico en disolución se disocia formando dos iones sulfato con un radical libre ( $\text{SO}_4^{\cdot -}$ ), que activa la acrilamida induciéndola a romper el doble enlace ( $\text{C}=\text{C}$ ) para convertirse también en un radical libre, que al encontrarse en otra molécula se une a ella formando un polímero lineal de acrilamida, al encontrarse también en disolución moléculas de bisacrilamida, también entran en el juego, pero doblemente, ya que pueden integrar (como se ve en la figura) dos cadenas de acrilamida. El TEMED, es el catalizador de la reacción, de modo que la polimerización tendría lugar sin su presencia, pero sería extremadamente lenta. Hay que tener en cuenta que el  $\text{O}_2$  inhibe la polimerización de la acrilamida.

Como ya hemos dicho, una de las mayores ventajas que presentan estos geles es la posibilidad de controlar el tamaño del poro, simplemente controlando la concentración de acrilamida. Esta relación queda reflejada en la gráfica, donde se representan tamaños medios de poro y el peso molecular de los péptidos que podrían separarse. La relación entre acrilamida y bisacrilamida depende de la concentración a la que se quiera llegar, y suele ser del orden de 30% de acrilamida y 0,8% de bisacrilamida.

Estos geles se corren en posición vertical, ya que así ocupan menos espacio y pueden resistirlo perfectamente, son delgados, con separadores que rondan el milímetro o el milímetro y medio. El gel se polimeriza entre dos placas de cristal, una de las cuales no es cuadrada sino que presenta la zona de arriba deprimida, y es la que estará pegada a la cubeta, quedando entonces inundada por el electrolito que por tanto entrará en contacto con el gel en la parte de arriba. En la cubeta superior se coloca el polo negativo en forma de un alambre a lo largo de la misma. En la parte de abajo el gel está sumergido en el electrolito, donde se encuentra el polo positivo.

### **Circunstancias que pueden modificar la electroforesis**

- **El pH:** uno de los problemas más frecuentes vienen dados por la naturaleza del propio electrolito, ya que el más habitual es el  $\text{NaCl}$  o el  $\text{Tris-HCl}$ , ambos presentan el ion  $\text{Cl}^-$ , que al verse sometido a un campo eléctrico se convierte en un radical libre, y dos de estas forman cloro molecular, que combinado con el agua forman  $\text{HCl}$ , que se disocia enseguida formando más ion cloruro que continua la reacción, y  $\text{ClOH}$ , que se disocia formando  $\text{ClO}^\cdot$  y protones, que junto a los de la disociación del clorhídrico se dirigen al polo negativo aumentando el pH de la disolución, que aunque está tamponada hay que tener cuidado no dañe la muestra.
- **El Borato:** uno de los tampones que se suelen utilizar es el del borato, que presenta el inconveniente de no ser del todo inerte. El resultado, por tanto de una electroforesis puede ser el de unas **bandas desdobladas** correspondientes a una sola proteína, una pura y una modificada por el borato. La forma de averiguar si en efecto se trata de una modificación o si son dos proteínas se asemeja mucho al que ya vimos en centrifugación, y se trata de recoger una las bandas y volverla a correr, de modo que si se vuelven a obtener dos bandas se tratará de una modificación y si sólo aparece una serán dos proteínas distintas.
- **El calentamiento:** durante el proceso de electroforesis, el gel se va calentando debido al paso de corriente eléctrica. Este proceso puede llegar a desnaturalizar proteínas, de modo que podrían falsear la electroforesis.

### **Tipos de Electroforesis**

Descartando la electroforesis libre debido a su escasísimo uso, exponemos la lista de las técnicas más usadas actualmente, comúnmente con geles de poliacrilamida.

- **En condiciones desnaturalizantes:** Al enfrentarnos a un experimento de separación mediante electroforesis debemos preguntarnos a qué pH vamos a realizarlo, ya que a la vista de la gráfica la carga de las proteínas es función del pH y, además, teniendo en cuenta el modo en que se efectúa (en geles verticales), no permitiendo más que el movimiento en una dirección (no como en papel). Con todo esto nos veríamos en un serio problema para separar proteínas ya que como se muestra en la gráfica sería muy difícil encontrar un pH en el cual todas las proteínas estuvieran cargadas con el mismo signo, ya que si no, algunas proteínas ni siquiera entrarían en el gel, y con la carga suficientemente diferente como para visualizar las

bandas bien definidas. Todo esto hizo que se diseñara **la electroforesis en condiciones desnaturalizantes**, que se basa en añadir compuestos que alteren las condiciones nativas de las proteínas y que se agrupan en el llamado **tampón de carga** que se añade antes de cargar las muestras en el gel y después se incuban a unos 100 °C durante 4 minutos para que tenga su efecto. El tampón de carga consiste en un agente reductor, **Me** ( mercapto etanol) que se encarga de eliminar los puentes disulfuro. El **SDS** (dodecil sulfato sódico) es el detergente derivado del ácido de doce carbonos, se une a las proteínas y las desnaturaliza. Esa unión es constante, 1,4 gramos de SDS por gramo de proteína. Además, el detergente está cargado negativamente, y por lo tanto es el que se ocupa de dar carga a las proteínas. En el tampón también se incluye el **azul de bromofenol**, que se trata de un colorante con carga negativa (por eso se utiliza) y con una movilidad electroforética que equivaldría a pequeños polipéptidos. Su función es la de ir por delante de las proteínas para ir marcando el frente de electroforesis y que podamos visualizar como se va realizando la corrida (recordemos que tanto el gel como las proteínas son transparentes). El **glicerol** lo que hace es aumentar la densidad de la muestra, de modo que al echarla en el pocillo no difunda ni se pase a los pocillos de al lado. Con todo esto nos encontramos con **todas las proteínas cargadas negativamente**, con la relación q/m constante se consigue **que las proteínas se separen por su tamaño**, no por su carga.

- **Separación por tamaño:** este tipo de electroforesis permite separar entonces las proteínas por tamaño, lo que implica que podemos conocer la relación existente entre  $\log P_m$  y el peso molecular de las moléculas, o lo que es lo mismo calcular el  $P_m$  de distintas subunidades de proteínas, ya que recordemos que en condiciones desnaturalizantes se eliminan los conjuntos de monómeros. La relación se consigue poniendo en el gel unos marcadores de  $P_m$ , y una vez corrido el gel medimos (como distancia al pocillo) y representamos la gráfica ( $\log P_m$  /  $d$ ).

Una vez representados los marcadores, medimos  $d$  de las distintas bandas y las hacemos corresponder un valor del  $P_m$  a través del antilogaritmo (como se ve en la gráfica de la página siguiente).

- **Electroforesis Discontinua:** En cualquier técnica de separación, nos encontramos con un problema, que consiste en la base de la separación, y es que dos partículas con diferentes condiciones deben partir del mismo punto y al mismo tiempo para que el proceso no se vea desvirtuado. Enfocando esto a la electroforesis, nos podemos encontrar con un caso donde dos partículas con diferente  $\mu$  formen dos bandas solapadas (como se observa en la figura) debido a la altura del pocillo, que es en muchos casos bastante grande en comparación con  $\lambda$ . El resultado, por tanto, la resolución del gel sería mucho menor y podría estar falseado. Por esta causa se diseñó la **electroforesis discontinua**, con el fin de minimizar las diferencias de distancia en la salida para que la separación nos permita obtener la mayor resolución.

El nombre le viene del propio método, que implica la polimerización de dos geles con diferente concentración de acrilamida y distintas condiciones de pH. El electrolito se compone de una mezcla de Tris-HCl y glicina, siendo el aminoácido la clave, ya que a pH de 8,8 – 8,9 se encuentra cargado al 15% en forma de  $\text{gly}^-$ , de modo que transmite la corriente, al entrar en el gel concentrador, el pH varía a 6,8 (en general dos unidades de pH menos que el gel separador), en esas condiciones toda la glicina está en forma  $\text{gly}^0$ , de modo que un  $\text{gly}^-$  transmite la corriente, disminuyendo la intensidad de corriente ( $I$ ), algo que no es termodinámicamente posible, ya que debe ser constante, con lo que se crea un gradiente de voltaje como se muestra en la figura, el resultado es una disminución de la velocidad de las proteínas conforme se alejan del pocillo, de modo, que las partículas se van reuniendo ayudadas por la baja concentración del gel. La compactación, en una anchura de unos 0,1 mm, es facilitada por la dificultad que encuentran para entrar en el gel de separación, pero una vez dentro la glicina se vuelve a cargar por el nuevo cambio de pH, y a partir de ahí con todo prácticamente entrando a la vez se comienza a separar con idénticas condiciones.

- En una electroforesis podemos aislar un tipo de proteínas, pero veríamos que las muy pequeñas se escaparían y las grandes ni siquiera llegarían a entrar en el gel, pues bien, hay una forma de electroforesis discontinua que permite aislar tanto proteínas grandes como las pequeñas. La base es simple, se trata de formar un gradiente de concentración de acrilamida en el gel separador, con un

formador de gradientes, de modo que la parte más baja del gel presentaría una concentración alrededor del 20% y de un 7% en la parte de arriba. Con esto las proteínas grandes, entrarían en el gel sin muchos problemas y las pequeñas se verían retenidas por el pequeño tamaño de poro del final. Los geles pueden llegar a tener unos 40 cm de alto por 16 – 18 de ancho. Las proteínas pequeñas en los geles normales si no escapan, forman bandas difusas, pero en la separación en gradiente corremos el peligro de una gran difusión ya que durante el gel, la concentración de acrilamida tampoco es muy grande, que facilita la difusión, lo que implica que hay que llegar a un compromiso, como casi siempre.

- **Electroforesis diagonal:** se compone de varias fases, teniendo como objetivo el aislado selectivo de partes de proteínas como los aminoácidos terminales o los implicados en el puente disulfuro. Por orden se compone de:

- *Separación electroforética:* donde se suelen separar péptidos.
- *Modificación selectiva:* donde debes conocer lo que pretendes encontrar.
- *Segunda electroforesis en iguales condiciones que la primera.*

Una de las aplicaciones que se le puede dar, como ya hemos dicho es la de aislar los péptidos terminales de una proteína, por ejemplo el C-terminal. En este caso podríamos digerir la proteína con **tripsina**, que corta a la derecha de aminoácidos básicos (Lys y Arg). Esa muestra digerida se separa mediante electroforesis (discontinua y en condiciones desnaturalizantes), obteniendo una distribución en bandas. A continuación cortamos dos tiras (por supuesto que ambas incluyan las bandas a ser posible por la zona más ancha), una de ellas la utilizamos como control y para visualizar el fundamento de esta electroforesis, pegándola a otro gel de idénticas condiciones que el primero, si dejamos que corra el gel, al revelarlo obtendríamos una diagonal, resultado de la multiplicación de las variaciones de por la doble carrera. Pues bien, si ahora cogemos la otra banda y la modificamos específicamente con una proteína, por ejemplo, y para este caso con **carboxi peptidasa B**, que corta aminoácidos básicos por la izquierda, lo colocamos en la cabecera de otro gel de idénticas condiciones que el primero y lo dejamos correr, al revelarlo no obtendríamos exactamente una diagonal, sino unos péptidos que se desvían de ella, menos aquel que contiene el C-terminal.

Si lo que queremos hacer es aislar los péptidos relacionados en el puente disulfuro, podemos diseñar un experimento parecido. Digerimos la proteína con **pepsina**, de modo que queda rota en pequeños péptidos, dos de los cuales estarán unidos por el puente disulfuro. Introducimos la muestra digerida en el primer gel, efectuando la electroforesis. Seguidamente, y al igual que en la anterior recortamos una tira y la colocamos en un gel que contiene ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ), que a un pH 7 al que mantenemos el gel se encuentra disociado, siendo entonces el carbonato un agente reductor lo suficientemente potente como para romper los puentes disulfuro formando dos radicales  $SO_3^{\cdot -}$  y, por tanto, separando los dos péptidos implicados en el puente disulfuro que aparecerá entonces como dos bandas en un mismo carril.

- **Electroenfoque:** se trata de la separación de péptidos o proteínas en un *gradiente de pH*, separándose por tanto por carga, (pI). La resolución del método permite separar diferencias de pI de 0,02 unidades. Lo bueno de la técnica es que no importa donde pongas la muestra, ya que si la pones por encima de su pI tendrá carga negativa, con lo que migrará hacia el polo positivo hasta que al ir perdiendo carga se detiene en su punto isoeléctrico, y si se coloca por debajo de su pI tendrá carga positiva, con lo que migrará hacia el polo negativo hasta detenerse con carga 0. Lo importante de la técnica es conseguir el gradiente de pH, que se consigue principalmente por dos técnicas comerciales:

- **Anfolitos o Anfolinas:** Se trata de moléculas (TOP SECRET):
  - Altísima capacidad tamponadora.
  - Transmiten la corriente en su pI (sin carga).
  - Son muy solubles.

- Inertes para que no modifiquen las proteínas.
- De bajo Pm.
- No absorben a 280 nm.

Estas moléculas se sintetizan al azar, teniendo la propiedad de generar un gradiente de pH al ponerlos en contacto con un campo eléctrico, ya que como es normal migran hacia su punto isoelectrico, pudiendo transmitir corriente aún con carga 0. El fabricante no tiene más que, una vez fabricados exponerlos a un campo eléctrico y fraccionar la columna, medir el pH de cada fracción y embotellar rangos de pH que saben que va a dar.

Nos encontramos ahora con el problema de una gran a la hora de liberar los electrodos difusión (al igual que en la electroforesis libre). La solución es la misma que la adoptada para la centrifugación, y se trata de acoplar al gradiente de pH uno de densidad en sentido contrario, teniendo en cuenta que **no se separan por densidad, sino por carga**, sólo estabiliza la columna para evitar la difusión de las bandas. Otra de las formas de estabilizarlo es la de convertirlo en gel, añadiendo acrilamida en un porcentaje de menos del 4%, ya que si no, las proteínas tardarían mucho en llegar a enfocarse.

- **Inmovilinas:** Son muy parecidas a lo que hemos descrito. Se trata por tanto de grupos cargados fijos (covalentemente) a cadenas lineales de Acrilamida. La forma de realizar un gradiente de pH con ellas es bien sencilla, no se trata más que de utilizar un fraccionador de gradientes, poniendo la acrilamida de menor pH en la cubeta de salida y la más básica en la secundaria.

Las ventajas de las inmovilinas con respecto de los anfolitos son varias, la principal es que permiten rangos de pH más amplios, ya que los anfolitos básicos son inestables (no aguantan un campo más de 4 ó 5 horas) y los ácidos migran muy lentamente, lo que significa que les cuesta formar el gradiente.

En ambos hay que controlar los rangos a los que se efectúa el electroenfoco, ya que pudiera ocurrir que en un experimento de separación de dos proteínas obtuviéramos un gráfico como el de la derecha, donde queda desaprovechada la mayor parte de la columna, lo que no sería lógico por el elevado precio tanto de los anfolitos como de las inmovilinas. Tendríamos que tener en cuenta la complejidad de la muestra para elegir el rango de pH al que efectuamos el electroenfoco: a mayor complejidad, más rango.

- **Electroforesis bidimensional:** no se trata más que de sumar dos tipos de electroforesis. La capacidad de resolución de la técnica es *mucho mayor si* las dos dimensiones *se fundamentan en principios físico-químicos diferentes*, ya que si no estaríamos hablando de electroforesis diagonal. La más usual consta de dos partes.

- **1ª dimensión:** Separación por carga electroenfoco.

- **2ª dimensión:** Separación por Pm electroforesis desnaturizante.

La resolución de este tipo de geles puede llegar a separar 4.000 proteínas de una muestra compleja, siempre que esté marcada finamente (por ejemplo radiactivamente mediante el metabolismo). Se realiza una separación por electroenfoco, que necesita ser estabilizada, ya que luego va a ser utilizada en la segunda dimensión, pero para ello no se utiliza un gradiente de densidad, sino algo más resistente, un gel de acrilamida, el cual no debe superar el 4% para que los anfolitos que se agregan al tubo no tarden mucho en generar el gradiente de pH. Una vez terminada esta primera fase se saca el gel de acrilamida del interior del tubo o capilar y se le aplican unas condiciones desnaturizantes como SDS y ME. No puede calentarse el gel por razones técnicas, ya que éstos presentan una gran concentración de urea, que a altas temperaturas dañaría las proteínas.

Una vez desnaturizadas las proteínas, aunque no estaban del todo en condiciones nativas, colocamos la tira



encima de un gel rectangular también de acrilamida, sellando la unión con agarosa fundida. Si hemos utilizado un capilar para realizar el electroenfoque, no hace falta utilizar un gel concentrador, ya que las muestras parten de una distancia de menos de 1mm.

A la hora de elegir los rangos de pH, nos encontramos con un problema, consistente en lo ya explicado con los anfólitos, problemas de estabilidad de los extremos. Lo que se recomienda es realizar dos experimentos de electroenfoque, determinando dos técnicas propias.

- **IEF (isoelectroenfoque):** *con anfólitos ácidos (pH 4,5 – 7,5)*, donde las condiciones de corrida son más cortas.
- **NEPHGE (electroforesis en gel en condiciones de no-equilibrio):** *con los anfólitos básicos (pH 7,5 – 9,5)*, donde las condiciones de corrida no pueden superar las 4 horas, ya que si no se degradarían. el nombre no es totalmente cierto, y hace referencia a que en las cuatro horas de corrida, al gel no le ha dado tiempo a crear el gradiente de pH.

Si en lugar de utilizar anfólitos, utilizamos inmovilinas, la cosa se aclara, ya que como ya hemos dicho éstas son más estables, con lo que no haría falta realizar dos geles, y son sencillas de utilizar, ya que se trata de tiras comerciales que se rehidratan formando un gel. El problema que presentan es su limitada capacidad de carga.

Una vez terminada la descripción de los tipos de electroforesis con respecto a las proteínas, he creído conveniente realizar un esquema más visual. Hay que observar como la técnica se va complicando y perfeccionando, siendo en muchos casos suma de las anteriores o incorporando avances logrados, entre los que destaca la electroforesis en condiciones desnaturizantes.

### **Visualización de las proteínas**

Después de una electroforesis, nos vemos en la necesidad de visualizar las bandas en la posición en la que se hallen, ya que tanto las proteínas como los geles de poliacrilamida son transparentes, y lo único que se observa con color durante el proceso es el azul de bromofenol. Pero antes hay que evitar la difusión de las mismas, realizando el proceso de fijado, consistente en un baño de etanol-acético con porcentajes variables dependiendo del tipo de gel, y que lo que consiguen es desnaturizar más todavía las proteínas pudiendo entonces permanecer en su posición durante días, con una difusión mínima.

### **Tinciones**

Una de las formas más comunes para visualizar proteínas son las técnicas de tinción, por supuesto para muestras no radiactivas.

- **Azul de Coomassie:** Con una sensibilidad de 1 g/mm<sup>2</sup>. Tiñe de azul todo el gel y más intensamente las bandas de proteínas. Como es lógico las diferencias de concentración entre las bandas también se marcan, al igual que en la figura, con variaciones en la intensidad del azul. No se sabe a ciencia cierta cual es el mecanismo de adhesión a las proteínas de este colorante, pero se especula que se puede unir al grupo amino. El proceso de tinción consta de una incubación y de varios lavados posteriores, hasta que se vean definidas las manchas.
- **Tinción con sales de plata:** Con una especificidad de 0,1 g/mm<sup>2</sup>. Se utiliza principalmente el nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), y al igual que pasaba con el azul de Coomassie, tampoco se el modo en que reacciona o se une a las proteínas. Se utiliza para muestras muy poco concentradas ya que es más sensible y, además, en geles delgados puede dar lugar a una variada gama de colores, dependientes del tipo de proteína a la que se halla unido, aunque en general muestra un gel marrón amarillento con unas manchas tostadas correspondientes a las proteínas.

### **Marcado radiactivo**

Otra de las opciones que podemos utilizar es la de marcar las proteínas radiactivamente, bien con  $^{35}\text{S}$  o  $^{15}\text{N}$ , ambos núcleos de baja energía, aunque se pueden utilizar otros. Una vez marcado por distintos métodos, normalmente metabólicos, se carga la muestra y se efectúa la electroforesis.

- **Autorradiografía:** El método consiste en la exposición del gel, una vez corrido, a una placa fotográfica, de modo que la radiactividad emitida por los núcleos pesados existentes en las proteínas impresiona la placa, obteniéndose imágenes como la de la figura. Al igual que en las tinciones, la autorradiografía permite estudios de densitometría, sólo que ahora son más precisos, al conocer el fenómeno implicado en el proceso. Para realizar una autorradiografía hay que tratar el gel de una manera especial. En primer lugar, no hace falta fijar las proteínas en el gel a través de un baño de EtOH-AcH, sino eliminando el agua y el aire del gel uniéndolo a una hoja de papel extra puro y de gran calidad (**Whatmann 3MM**) y poniéndolo encima de una placa térmica llamada *secador de geles*. Una vez depositada la hoja de papel con el gel encima, se cubre todo con una goma y se realiza el vacío en el interior, proceso durante el cual se aumenta la temperatura de la placa a unos 60 – 70 °C, con el fin de facilitar el secado. Después de una hora, se retira todo, quedando entonces el gel seco, pegado al papel, evitando entonces cualquier difusión (recordar el gel de inmunoglobulinas de las prácticas de segundo).
- **Fluorografía:** Podemos encontrarnos con que el núcleo radiactivo utilizado tiene muy baja la intensidad de radiación, con lo que nos veríamos obligados a exponer el gel durante varios días o incluso semanas para poder observar algo. La fluorografía, permite ampliar la señal radiactiva basándose en el centelleo líquido, con sólo añadir un **flúor** que amplifique la señal para una mayor sensibilidad. En este caso hay que seguir una serie de requisitos:

- Fijación: al igual que en las tinciones, con EtOH-AcH a la matriz, durante unos 30 minutos.
- Eliminar el agua del gel: para esto se utiliza un solvente orgánico, el **DMSO** (dimetil sulfato sódico). El misterio de eliminar el agua no es más que por que apantalla la radiactividad.
- Añadir el flúor junto al DMSO para asegurarnos de eliminar toda el agua. El flúor utilizado puede ser, por ejemplo el PPO (difenil oxazol).
- Lavar todo.
- Secar y exponer a baja temperatura (-70 °C) igual que una autorradiografía. El hecho de exponer a baja temperatura no responde mas que a la mayor eficacia, pero no se sabe bien porque, de hecho, a menor temperatura, menor proyección de radiactividad.

### Marcado enzimático

En ocasiones nos puede ser útil utilizar reacciones específicas de una enzima para localizarla en un gel, aunque, por supuesto si queremos que reaccione, la electroforesis no ha podido ser en condiciones desnaturalizantes. Otro de los requisitos que deben cumplirse para poder realizar un marcado enzimático es el de encontrar un sustrato adecuado, para que al ponerlo en contacto con la enzima cambien sus propiedades físicas de modo que nos permitan visualizar el cambio. Normalmente se trata de sustancias incoloras que al sufrir la catálisis de la enzima forman un compuesto coloreado y, por tanto, fácilmente localizable, aunque también puede servirnos un simple cambio de color, pero no la pérdida del mismo, salvo que coloreara todo el gel y dejara incolora la proteína.

Uno de los más utilizados es el de las **fosfatasa**s, donde, aprovechando la hidrolización de un oxígeno del fosfato, producimos un sustrato coloreado. Partiendo de *fosfato de naftilo* (que presenta un grupo fosfato) añadido al gel obtenemos un compuesto cargado, un ion *naftólsido*, incoloro, pero que añadiendo una *sal de diazonio* se convierte en un *colorante azoico* visible.

### Transferencia

Podemos encontrarnos con el problema de querer recuperar una banda para poder seguir trabajando con la

proteína, pues bien, hay principalmente dos formas de conseguirlo.

- **Transferencia a papel:** Se trata, por tanto, de hacer que las proteínas del gel pasen a un papel, que puede ser de *nitrocelulosa* o de *nylon*. Hay que tener en cuenta que la transferencia no es lo que se hizo con el secado del gel en el papel Whatmann, ya que en ese caso las proteínas estaban deshidratadas, pero seguían en el interior del gel. La transferencia a papel, evita la difusión, permitiendo mantener las proteínas en el gel durante meses, y permite efectuar tratamientos propios de detección de los que hablaremos más tarde. En proteínas el paso a papel tiene un nombre propio, y es la técnica de **Western Blot**, basada de nuevo en la migración de las proteínas en un campo eléctrico. Para efectuar la electro-transferencia, necesitamos formar una especie de sándwich con el gel, colocando a un lado el papel de nitrocelulosa, y a ambos lados de los dos, tres papeles W-3MM, como pan, colocamos papel Scotch, semejante al estropajo. Por supuesto, el ensamblaje no se realiza partiendo del gel, sino de alguno de los papeles Scotch. Todo en conjunto no suele medir más de 2 ó 3 mm de ancho. Una vez completado el proceso de empaquetamiento del gel, se procede a introducirlo dentro de una cubeta con dos electrodos y un electrolito con tampón tris-glicina, cuidando que el lado del papel de nitrocelulosa quede orientado al polo positivo, para que una vez conectados los electrodos, y al empezar a migrar las proteínas no vayan hacia el lado del papel W-3MM, sino hacia el de nitrocelulosa para que queden retenidas en él.

El resultado es una hoja o membrana de papel con la proteínas retenidas, siendo por tanto muy resistente y abriendo todo un juego de posibilidades de tratamientos *a posteriori*, como son la tinción con **Ponceau S**, o el marcaje con anticuerpos (**ELISA**).

El tinte Ponceau S tiene una sensibilidad similar a la del azul de Coomassie, pero al contrario que éste, presenta la capacidad de teñir reversiblemente las proteínas. Al introducir el papel en el tinte, aparece todo teñido de un rojo más o menos intenso, y a medida que se lava con agua, el tinte va desapareciendo, dejando ver paulatinamente las bandas, y si continuamos lavando volvería a quedar todo blanco.

La técnica de ELISA, no es más que la utilización de anticuerpos contra la proteína deseada y de otros anticuerpos contra los primeros, que además llevan unida una enzima, normalmente catalasa. El primer anticuerpo se utiliza para una primera localización de la proteína, pero de forma no visual, de modo que después de la incubación del gel con el primer anticuerpo, específico de la proteína no vemos nada. En la segunda incubación, con el anticuerpo específico del primer anticuerpo, unido a la enzima, tampoco vemos nada. Es después, cuando ponemos en contacto el papel con el sustrato de la enzima cuando se observa el lugar donde se encuentra la proteína. Las incubaciones se realizan introduciendo el gel en una bolsa hermética y añadiéndole los anticuerpos, de modo que quede todo el papel empapado y sin una gota de aire. Aunque el sistema se parece a la tinción de enzimas, tiene a su favor muchas cuestiones, como la de marcar todo tipo de proteínas, no sólo enzimas, y además permitir electroforesis desnaturalizantes, ya que no es la proteína del gel la que reacciona, sino la enzima unida al segundo anticuerpo.

### Electroelución

Esta técnica se basa de nuevo en la migración de las proteínas hacia el polo positivo una vez mediada la acción del SDS. Se trata de recuperar la proteína inmersa en el gel, y si es posible volver a renaturalizarla, tarea en muchos casos imposible.

Una vez terminada la electroforesis, secas el gel sobre una hoja de papel W-3MM o de nitrocelulosa con el fin de realizar una autorradiografía (proceso ya explicado), pero ahora, antes de poner a exponer el gel le hacemos unas marcas con un rotulador especial que emita electrones para que las marcas queden impresionadas en la placa fotográfica, a fin de luego poder superponer ésta sobre el gel con gran exactitud. *Lo que Carlos hacía en el laboratorio, a falta de un rotu tan chulo era recortar tres figuras diferentes (por ejemplo como las que se muestran en la figura) y las fijaba en el gel, que estaba cubierto con papel de*

*plástico de cocina. Una vez fijados con cinta adhesiva, los impregnaba de una solución de Borhidruro de Sodio, agente muy reductor y que, por tanto, emite electrones, requisito imprescindible para que quede impresionada la placa fotográfica.*

El siguiente paso es el de exponer el gel durante el tiempo que haga falta y obtener la autorradiografía, sobre la cual identificamos la, o las bandas de nuestra proteína y las recortamos, quedando la placa agujereada. Entonces lo que hacemos es superponer la placa sobre el gel, haciendo que las marcas coincidan exactamente, ya que una desviación puede hacer que cojamos otra, o una mezcla de proteínas. Una vez fija la placa sobre el gel en posición exacta, y con un bisturí (pueden ser tijeras, aunque queda más cutre), cortamos el gel y el papel con el molde que nos proporciona el agujero de la placa, tal y como se indica en la figura. Una vez recortado el cuadradito con la banda deseada, tenemos que sacar a la proteína del gel, y para ello nos vamos a servir de lo que propiamente se llama electroelución, que se sirve de una especie de cubeta doble, donde una de ellas es mucho mayor con relación a la otra, con el fin de que la proteína quede atrapada y lo más concentradamente posible en el pocillo de la cubeta menor. El jugueteito se dispone entre dos cubetas llenas de electrolito, que tiene que sumergir los fondos de la cubeta de electroelución (poniendo atención que no entre en contacto con el electrolito del otro recipiente), de tal modo que la cubeta menor quede en el recipiente con el electrodo positivo, al que va a migrar la proteína.

Tapamos los dos pocillos de la cubeta de electroelución con membranas de diálisis, para que permitan que migre el electrolito, pero no dejen salir a la proteína, que de esta forma quedará atrapada en el pocillo pequeño. Cuando ya esté toda la proteína fuera del gel y atrapada, introducimos la punta de una pipeta en el recipiente pequeño (sin entrar en el pocillo donde se encuentra la proteína), y nada más apagar el interruptor que mantenía la corriente pasando a través de las cubetas empezamos a eliminar el agua con la pipeta, justamente hasta que el electrolito sólo cubra el pocillo pequeño, líquido que se retira a continuación incorporándolo a un tubo de ensayo, donde ahora tenemos nuestra proteína pura, aunque desnaturalizada.

A posteriori se puede intentar volver a la proteína a su estado nativo, con un éxito que no supera el 50 o el 60%.

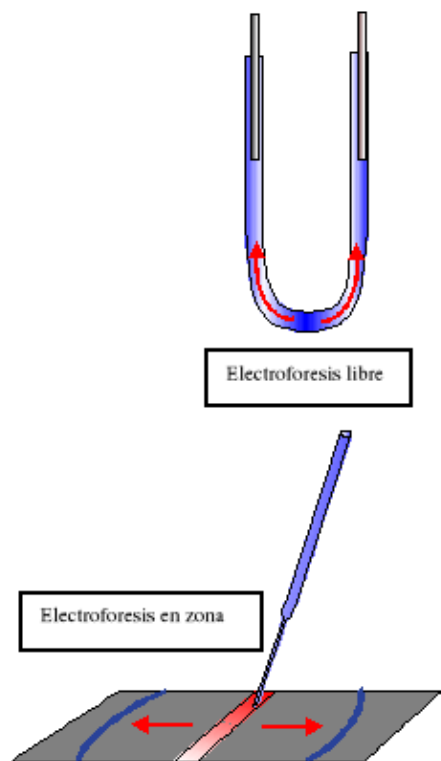
Recordemos que el gradiente de pH va al revés que el de densidad.

Técnicas de Separación

31

51

Electroforesis



r

r

D

0 Å

10 Å

3%

20%

Para 400.000 D

Para 8.000 D

pura

modificada

Dos proteínas

El borato

modifica

$\text{Cl}^-\text{Cl}$

$\text{Cl} + \text{Cl} \rightarrow \text{Cl}_2$

$\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCl} + \text{HOCl}$

$\text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HCl}$

"

$\text{Pm}_1$

$\text{Pm}_2$

$1 \rightarrow 2$

200.000 D

10.000 D

Log Pm

2

1

Marcador

Muestras

200.000 Miosina

70.000

45.000 Actina

30.000

12.000

Azul de bromofenol

Representamos en la gráfica los marcadores

$t_1$

E

Solapamiento

t1

t0

Distribución homogénea

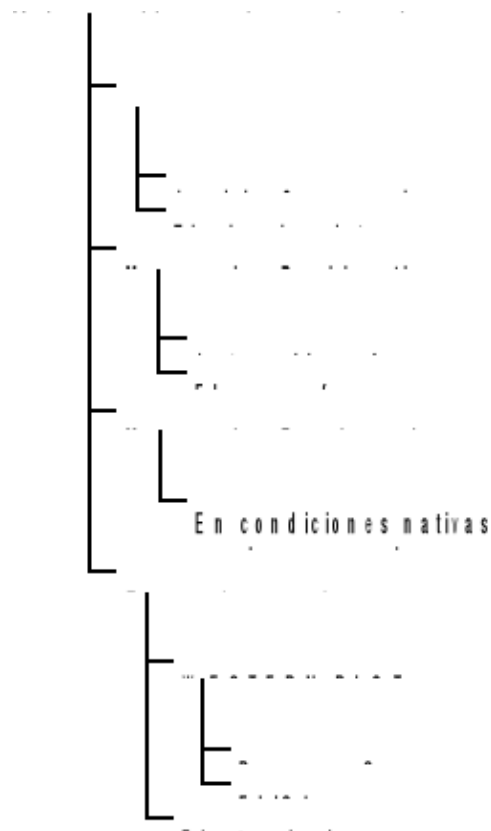
1

2

1 > 2

*El color elegido no es real, y varía según el sustrato*

Al igual que hice con los tipos de electroforesis, he creído conveniente realizar este esquema resumen de las formas en las que se pueden revelar las bandas en la electroforesis de proteínas.



pH

10

3,5

Enfoque en el pI

+

0

"

" pH

+

"

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

pI