

PRÁCTICA 1: PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.

• Introducción

Una proteína es poco soluble en H₂O. La precipitación se debe a que se forman partículas por agregación. La agregación se producirá cuando no haya apantallamiento por parte del disolvente. La precipitación por salado se fundamenta en que al añadir una sal, en principio se aumenta la solubilidad de la proteína (efecto salting-in) debido a que los coeficientes de actividad de los grupos ionizables disminuyen; se alcanza así un máximo de solubilidad, seguido de una disminución (efecto salting-out) debida a la competencia por las moléculas de disolvente entre la sal y la proteína (las moléculas de agua no solvatan la proteína, ésta se agrega y por tanto precipita).

Lo que se hace normalmente es poner una fuerza iónica concreta, y así precipitan unas proteínas; éstas se separan por centrifugación, y en la disolución se aumenta la fuerza iónica, con lo que precipitan otras proteínas. Esto se repite de manera sucesiva.

La sal usada normalmente es el (NH₄)₂SO₄ (sulfato amónico); se usa principalmente por su alta solubilidad (s"700 g/l) y porque es barata.

Las inmunoglobulinas son oligoproteínas sintetizadas como respuesta a agentes extraños; actúan generalmente uniéndose a ellos, facilitando así la degradación. Están compuestas por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro.

• Práctica

- Cogemos 1 ml de ST y realizamos una dilución 1+5 hasta un volumen final de 6 ml (1 ml de ST + 5 ml de PBS). El PBS tiene como función el mantener las proteínas en condiciones lo más parecidas posible a las de la sangre. Separamos 1 ml de la dilución en un tubo y lo etiquetamos como ST. Se conserva en hielo a 4°C.
- Los 5 ml restantes se llevan a una concentración de (NH₄)₂SO₄ del 15%; para calcular el volumen de disolución saturada (100% de saturación) que hay que añadir a los 5 ml se aplica:

$$V = \frac{V' (S_2 - S_1)}{1 - S_1}$$

Siendo: V ! volumen que hay que echar de la disolución saturada.

V' ! volumen de la muestra que se tiene.

S₂ ! tanto por uno de la concentración de saturación a la que se quiere llevar

la muestra.

S₁ ! tanto por uno de la concentración inicial de la muestra.

En nuestro caso, V' = 5 ml; S₁ = 0; S₂ = 0.15. Con estos datos, calculamos V, resultando: **V = 0.88 ml.**

Cogemos la micropipeta P-1000, la graduamos a 880 l, pipeteamos y añadimos estos l a los 5 de dilución del ST. Agitamos con cuidado (si no las proteínas pueden desnaturalizarse formando una espuma persistente entre la superficie de la disolución y el aire; esto es debido a que al romperse la estructura de la proteína, ésta

tiende a la conformación de mínima energía posible, con lo que la parte hidrófoba quedará en contacto con el aire y la parte hidrofílica con el agua). Lo ponemos en hielo a 4°C durante 10 minutos y centrifugamos a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación aparece un pequeño precipitado y un sobrenadante; el sobrenadante se decanta en otro tubo, y el precipitado se redissuelve en 6 ml de PBS, etiquetándolo como F1. Se conserva en hielo a 4°C.

- Se mide el volumen de sobrenadante decantado, resultando $V_s = 5.5$ ml. Éste líquido se lleva a una saturación del 40% aplicando la misma fórmula, pero con los datos $V' = 5.5$ ml; $S_1 = 0.15$; $S_2 = 0.40$. Resulta un volumen $V = 2.29$ ml. Con una pipeta de 5 ml medimos 2 ml, y con la P-1000 medimos 0.290 ml; añadimos todo al sobrenadante, agitamos con cuidado y dejamos reposar en hielo durante 10 minutos. A continuación se centrifuga a 4000 rpm y a 4°C durante otros 10 minutos. Aparece gran cantidad de precipitado, y un sobrenadante; decantamos el sobrenadante en otro tubo, y el precipitado se redissuelve en 6 ml de PBS, etiquetándolo como F2 y se conserva en hielo a 4°C.
- Se repite el procedimiento anterior ($V_s = 7$ ml; $S_2 = 0.6$; $S_1 = 0.4$. $V = 3.5$ ml), conservando en hielo el precipitado obtenido (etiquetado como F3) y desechando el sobrenadante.

11-05-1999

PRÁCTICA 2: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS. MÉTODO DE LOWRY.

• Introducción

El objetivo de la práctica es calcular la concentración de proteínas en cada una de las disoluciones de la práctica 1 (ST, F1, F2, F3). El método de Lowry está basado en la reacción entre las proteínas y el reactivo de Folin dando un complejo coloreado. El Cu^{2+} forma en medio alcalino un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas, reduciéndose a Cu^+ ; éste, junto a los residuos de tirosina y triptófano, reaccionan con el reactivo de Folin, dando inicialmente un compuesto inestable que evoluciona a un complejo coloreado.

La práctica consiste en preparar unas muestras de concentración conocida, para medir sus absorbancias y trazar así una recta patrón. Si posteriormente medimos la absorbancia de una disolución problema de concentración desconocida, interpolando en esta recta podremos conocer la concentración de la muestra.

• Práctica

Lo primero que hay que hacer es dibujar la recta patrón. Para ello preparamos 8 diluciones de seroalbúmina bovina (BSA) de concentraciones 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 g/ml (0.5 ml de cada una) a partir de BSA de concentración 1mg/ml. Para ello cogeremos el volumen necesario de BSA y enrasaremos hasta 0.5 ml con PBS. Para calcular el volumen necesario de BSA original aplicamos:

$$C_0 \cdot V_0 = C \cdot V$$

Siendo: V_0 ! Volumen de BSA (1mg/ml) que hay que tomar

C_0 ! Concentración de la muestra de BSA original (1mg/ml)

V ! Volumen que queremos preparar (0.5 ml)

C ! Concentración que queremos en la muestra

Hacemos los cálculos oportunos, quedando:

Concentración (g/ml)	Mililitros de BSA	Mililitros de PBS
-----------------------	-------------------	-------------------

0	0	0.500
25	0.0125	0.4875
50	0.025	0.475
100	0.050	0.450
150	0.075	0.425
200	0.100	0.400
250	0.125	0.375
300	0.150	0.350

Cogemos esas cantidades de BSA y PBS y las ponemos en 8 tubos de ensayo, etiquetando cada tubo con su concentración.

A la vez vamos preparando las diluciones siguientes (se realizan diluciones porque de lo contrario las concentraciones serían muy elevadas, y las absorbancias caerían fuera del rango de la recta patrón):

ST ! 1+150: cogemos 10 l del tubo de ST y los mezclamos con 1.5 ml de PBS; cogemos 0.5 ml de esta dilución en un tubo de ensayo y lo etiquetamos como

ST: 1/150

1+300: cogemos 10 l de ST y lo mezclamos con 3.0 ml de PBS; cogemos 0.5 ml y los ponemos en un tubo de ensayo etiquetado como ST: 1/300

F1 ! 1+4: cogemos 100 l de F1 y les añadimos 400 l de PBS; etiquetamos el tubo como F1: 1/4

1+8: mezclamos 100 l de F1 con 800 l de PBS, y cogemos 0.5 ml de esta dilución, marcando el tubo como F1: 1/8

F2 ! 1+30: mezclamos 100 l de F2 con 3.0 ml de PBS, y cogemos 0.5 ml. El tubo se etiqueta F2: 1/30

1+60: mezclamos 100 l de F2 con 6.0 ml de PBS; cogemos 0.5 ml y etiquetamos como F2: 1/60

F3 ! Procedemos igual que para F2, etiquetando los tubos como F3: 1/30 y F3: 1/60

Una vez procesados todos los tubos (BSA y problemas) hay que añadir a todos los tubos NaOH 1N hasta una concentración de 0.1N. Para calcular el volumen se aplica la misma fórmula anterior, pero teniendo en cuenta que el volumen final (Vf) no es de 0.5 ml, sino que se ve incrementado por el volumen que añadimos de NaOH; por tanto:

$$(0.5 + V_{NaOH}) \cdot 0.1 = V_{NaOH} \cdot 1$$

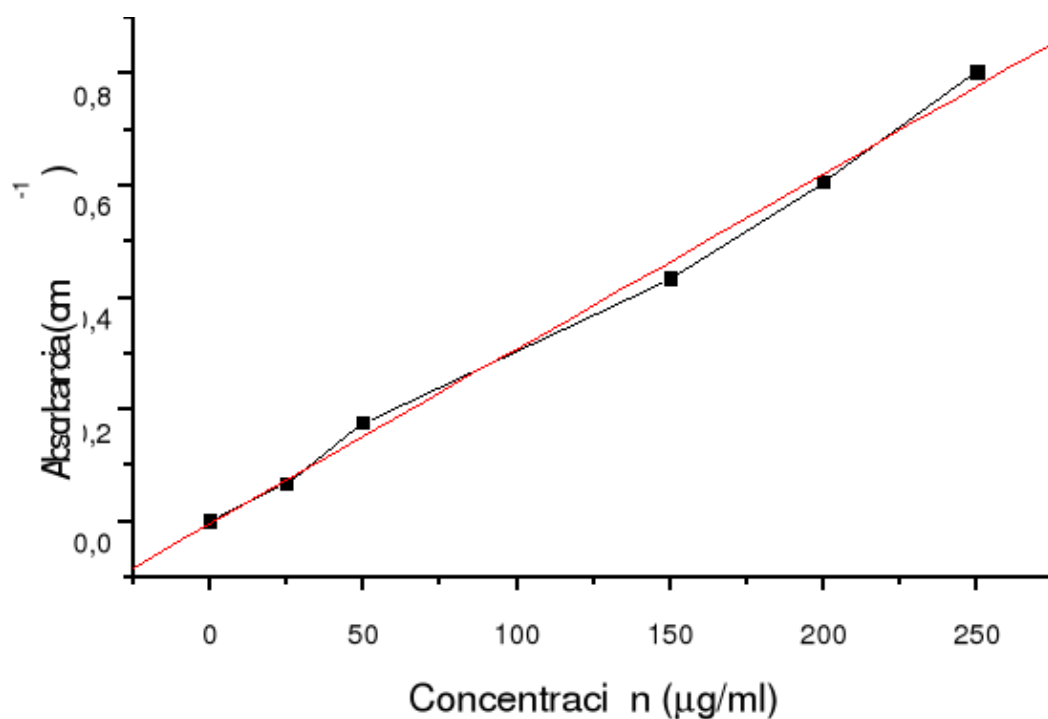
$$V_{NaOH} = 0.055 \text{ ml ! } 55 \text{ l}$$

Con la P-200 medimos 55 l de NaOH y se los añadimos a cada tubo. Una vez añadida la sosa, añadimos 4 ml del reactivo 1 a todos los tubos y dejamos incubar 10 minutos a temperatura ambiente (es importante echar el reactivo 1 a todos los tubos a la vez para que el tiempo de reacción de las proteínas con el reactivo sea en todos los tubos igual).

Tras los 10 minutos se añaden a cada tubo 450 l de reactivo 2, agitando suavemente. Se deja incubar 20 minutos más a temperatura ambiente, y se mide la absorbancia a 750 nm, comenzando por la recta patrón y

fijando el 0 de absorbancia con el blanco(concentración = 0), para la que se obtienen unos datos:

Concentración	Absorbancia
0	0
25	0.067
50	0.176
100	0.387
150	0.434
200	0.607
250	0.804
300	0.756



Con los que se obtiene la gráfica:

Se han desechado los valores de absorbancia de 100 y 300 g/ml, ya que se desviaban mucho de la recta ajustada por mínimos cuadrados.

Una vez ajustada la recta, medimos la absorbancia de los problemas para interpolar su concentración en la recta:

Muestra	Absorbancia (cm ⁻¹)
ST : 1/150	0.271
ST: 1/300	0.157
F1: 1 / 4	0.165
F1: 1/8	0.067
F2: 1/30	0.487
F2: 1/60	0.203
F3: 1/30	0.133

F3: 1/60	0.046
----------	-------

Interpolando en la recta obtenida tendremos:

Muestra	Concentración (g/ml)
ST: 1/150	87.86
ST: 1/300	51.38
F1: 1 / 4	53.94
F1: 1/8	22.57
F2: 1/30	156.98
F2: 1/60	66.10
F3: 1/30	43.69
F3: 1/60	15.85

Pero la concentración obtenida será la que hay en la dilución; para saber cuanto hay en la muestra original habrá que multiplicar por el factor de dilución en cada caso. Además, para cada muestra habrá dos datos de concentraciones, por lo que habrá que tomar la media de ambos:

$$\text{ST ! 1/300: } C = 0.05138 \times 301 = 15.414 \text{ mg}$$

$$1/150: C = 0.08786 \times 151 = 13.26686 \text{ mg}$$

$$\text{Cm} = 14.34043 \text{ mg}$$

$$\text{F1 ! 1 / 4: } C = 0.05394 \times 5 = 0.2657 \text{ mg}$$

$$1 / 8: C = 0.02257 \times 9 = 0.20313 \text{ mg}$$

$$\text{Cm} = 0.236415 \text{ mg}$$

$$\text{F2 ! 1/30: } C = 0.15698 \times 31 = 4.86638 \text{ mg}$$

$$1/60: C = 0.06610 \times 61 = 4.0321 \text{ mg}$$

$$\text{Cm} = 4.44929 \text{ mg}$$

$$\text{F3 ! 1/30: } C = 0.04369 \times 31 = 1.35439 \text{ mg}$$

$$1/60: C = 0.01585 \times 61 = 0.96685 \text{ mg}$$

$$\text{Cm} = 1.16062 \text{ mg}$$

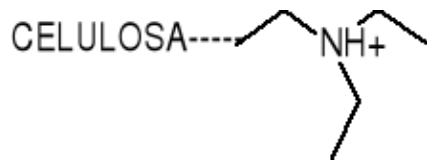
PRÁCTICA 3:CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

• Introducción

La cromatografía de intercambio iónico se fundamenta en que las proteínas tienen una carga neta determinada por las aminoácidos que la componen y por el pH del medio. Si el pH es superior al punto isoelectrico (pI: pH al que la proteína tiene carga neta igual a cero), la proteína estará cargada negativamente, y si el pH es inferior lo estará positivamente. Nosotros podemos elegir el pH de trabajo en la columna, separando así las proteínas:

si usamos un intercambiador (resina) aniónica, en principio llevará unidos grupos cargados positivamente, y al pasar la muestra, las proteínas con carga positiva se unirán a la resina.

En nuestro caso, usaremos una resina catiónica (DEAE " sephacel); esta resina está constituida por una matriz a la que va unido un radical dietil-amino-etil. El N del radical está cargado positivamente, y será donde se unan las proteínas:



Las proteínas que estén cargadas positivamente no se unirán, mientras que las que lo estén negativamente se unirán tanto más fuerte cuanto mayor sea esa carga negativa.

Además, para asegurarnos de que la carga de la proteína que nos interesa es negativa, controlamos el pH del medio con un tampón de pH conocido.

Posteriormente, para separar las proteínas de la resina, pasamos varios tampones con creciente concentración de una sal: el NaCl. Los iones Cl^- compiten por la carga positiva de la resina con la proteína; se separarán primero las proteínas que estén unidas más débilmente a la resina, y al aumentar la fuerza iónica aumentando la concentración de electrolito se separarán las que estén unidas con más fuerza. Además los iones Na^+ también compiten con la resina por la proteína.

• Práctica

En una pipeta Pasteur ponemos un poco de fibra de vidrio, y con ayuda de otra empujamos hasta que forme un pequeño tapón, de manera que la resina no se salga pero el líquido pueda pasar por él. Unimos un trozo de goma en la punta y le colocamos una pinza. Echamos resina y dejamos que repose; cuando el volumen de resina después de reposar sea de aproximadamente 1 ml dejamos de echar resina. Añadimos un poco de tampón inicial (Tris 10mM pH 8.5) para que la resina no se seque, tapamos la parte superior con parafilm y dejamos el montaje preparado para el día siguiente.

12-05-1999

Lavamos la resina con 10 ml de tampón inicial; con esto nos aseguramos de que la resina está en las condiciones que deseamos. A continuación pasamos 5 mg de proteína de la F2 de la práctica 1. Para calcular el volumen que tenemos que tomar usamos los resultados de la práctica 2: sabemos la concentración en mg/ml, luego podemos calcular los mililitros en los que habrá 5 mg.

$$[\text{F2}] = 4.44929 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml} \neq 4.44929 \text{ mg}$$

$$x \text{ ml} \neq 5 \text{ mg}$$

$$x = 1.124 \text{ ml}$$

Cogemos estos ml y los diluimos en 5 volúmenes (5.62 ml) de tampón inicial; esto se hace para disminuir la concentración salina, de manera que la sal no interfiera en la unión proteína-resina. Se pasa la muestra por la columna.

Una vez pasados los (5.62 + 1.124) ml de muestra se lava la columna con 4 ml de tampón inicial; así arrastramos las proteínas que hayan podido quedar ocluidas en la resina. A continuación se pasan 4 ml de tampón Tris 10 mM, pH 8.5; NaCl 50 mM, recogiendo fracciones de 1 ml en tubos eppendorf, y etiquetándolos como , , y . La primera fracción se tira, ya que corresponde al volumen muerto de la columna y no sale el tampón que estamos echando, sino el anterior.

Procedemos de la misma manera con los tampones Tris 10 mM, pH 8.5; NaCl 150 mM (fracciones a), Tris 10 mM, pH 8.5; NaCl 300 mM (a) y Tris 10 mM, pH 8.5; NaCl 500 mM (a). Las fracciones se conservan en la nevera hasta la electroforesis.

PRÁCTICA 4: ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

• Introducción

La electroforesis se basa en que una partícula cargada se moverá más o menos en un campo eléctrico en función de su relación q/m .

El soporte más usado es la acrilamida:

Con ella se mezcla metilenbisacrilamida:

Se usa persulfato amónico, que forma radicales libres que atacan a la poliacrilamida, haciendo que ésta polimerice. Se forma así una red en 3D; en función del tamaño del poro pasarán mejor unas proteínas concretas. A mayor porcentaje de acrilamida, menor tamaño tendrá el poro. El polímero formado será la poliacrilamida:

Esta técnica se conoce como **electroforesis en condiciones nativas**.

Pero nuestra práctica es una **electroforesis en condiciones desnaturalizantes**: a las proteínas se les añade un detergente, el SDS (dodecil sulfato sódico).

Éste se une a las proteínas, de manera que todas quedan cargadas negativamente. Se une aproximadamente una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Así todas las proteínas adquieren la misma relación q/m .

(no se tienen en cuenta las cargas de la proteína porque son despreciables frente al gran número de cargas negativas del SDS). Las proteínas ahora avanzarán más o menos sólo en función de su tamaño.

El SDS lo que hace es desnaturalizar la proteína, rodeándola y formando una micela. En estas condiciones podemos saber el peso molecular de una proteína desconocida, ya que la representación de la distancia recorrida (o Rf) frente al logaritmo del peso molecular es una línea recta. Si usamos unos marcadores de Pm conocido y representamos su Rf en función del logaritmo de su peso molecular, tendremos una recta patrón sobre la que interpolar los datos de los Rf de las muestras.

Además usaremos dos geles: uno de concentración (con el poro muy grande; al poner las muestras en el pocillo, ocupan un cierto volumen. Con este gel, al pasar la corriente todas las muestras se comprimen) y otro de separación, con el poro más pequeño, que es el que realmente separa las proteínas.

• Práctica

• Preparación de los geles

Montamos la cubeta de electroforesis: sobre una de las planchas de metacrilato colocamos la lámina de plástico, y sobre ésta el cristal rectangular. Encima colocamos los separadores, en los extremos del cristal, y sobre ellos el cristal de orejas; ponemos la otra plancha de metacrilato y sujetamos con las pinzas. El gel debe ir entre los dos cristales.

Primero preparamos el gel de separación. Para ello, en un erlenmeyer donde hay ya preparados 5 ml de mezcla acrilamida-bisacrilamida (atención: sustancia neurotóxica y cancerígena de fácil absorción por la piel; trabajar con guantes) añadimos 7.8 ml de agua destilada, 1.9 ml de tampón Tris HCl 3M pH 8.8, 150 μ l de SDS al 10% y el profesor nos añade 150 μ l de persulfato amónico y 15 μ l de TEMED. Se añade con cuidado la mezcla en la cubeta entre los dos cristales hasta que el nivel llegue unos 2 cm por debajo del límite. Con una pipeta Pasteur se le añade H₂O destilada (unos 2 mm de altura para evitar que el gel esté en contacto con el aire, ya que el O₂ dificulta la polimerización por ser un captador de radicales libres). Se conserva una pequeña muestra para ver cuando ha polimerizado, y se esperan 35 minutos a que lo haga.

A continuación preparamos el gel concentrador, mezclando los 0.625 ml de acrilamida-bisacrilamida en un tubo con 3.05 ml de agua destilada, 1.25 ml de tampón Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 50 μ l de SDS y el profesor nos añade 50 μ l de persulfato amónico y 5 μ l de TEMED. Se retira el agua que cubría el gel de separación volcando con cuidado la cubeta y se añade el gel de concentración hasta que el nivel llegue justo al borde superior. Se introduce el peine, cuidando que los pocillos empiecen justo en el límite que alcanzó el gel de concentración y se deja polimerizar hasta el día siguiente guardándolo en la nevera.

- Preparación de la muestra

De las fracciones ST, F1, F2 y F3 hay que cargar en cada pocillo 40 μ g de muestra. A partir de las concentraciones obtenidas con el método de Lowry, podemos calcular el volumen que necesitamos para tener esos 40 μ g:

$$\text{ST} ! C = 14.34043 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml} ! 14.34043 \text{ mg}$$

$$x \text{ ml} ! 0.040 \text{ mg}$$

$$x = 2.8 \text{ } \mu\text{l}$$

Pero la carga mínima en cada pocillo es de 20 μ l, luego habrá que añadir 17.2 μ l de H₂O.

$$\text{F1} ! C = 0.236 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml} ! 0.236 \text{ mg}$$

$$x \text{ ml} ! 0.040 \text{ mg}$$

$$x = 200 \text{ } \mu\text{l}$$

Pero la carga máxima por pocillo es de 40 μ l, luego éste será el volumen que tomaremos.

$$\text{F2} ! C = 4.44929 \text{ mg/ml}$$

$$1 \text{ ml} ! 4.44929 \text{ mg}$$

$$x \text{ ml} ! 0.040 \text{ mg}$$

x = 9 l a los que añadiremos 11 l de H₂O.

F3 ! C = 1.16062 mg/ml

1 ml ! 1.16062 mg

x ml ! 0.040 mg

x = 34.4 l de muestra.

Además vamos a cargar en la electroforesis la tercera fracción de cada uno de los tampones recogidos en la práctica 3 (fracciones ðð, ðð, ð y ð). Cargaremos 40 ðl de cada una.

13-5-1999

A todas las muestras hay que ponerles además tampón de ruptura 5x, de manera que quede 1x (es decir, de manera que quede 1 parte de tampón por cada 5 de muestra); para ello añadimos la cuarta parte del volumen de la muestra (proteína más H₂O si es necesaria) de tampón. En éste hay SDS, un colorante (azul de bromofenol) que indica el frente de la electroforesis, porque es una molécula muy pequeña que pasa con mucha facilidad por los poros, glicerol para dar densidad a la muestra y -mercaptoetanol, que reduce los posibles puentes disulfuro que pueda haber entre las cadenas polipeptídicas, de manera que cada cadena avanzará en función de su tamaño (de no añadir el -mercaptoetanol, las cadenas polipeptídicas que estuviesen unidas por puentes disulfuro aparecerían al revelar el gel como una sola mancha, sin poder distinguir las distintas cadenas que forman la proteína).

Al final tendremos las muestras:

Muestra	l proteína	l H ₂ O	l tampón
ST	2.8	17.2	5
F1	40	-----	10
F2	9	11	5
F3	34.4	-----	8.6
	40	-----	10
	40	-----	10
	40	-----	10
	40	-----	10

Preparamos las muestras en tubos eppendorf, y las llevamos a hervir durante 4 minutos para que el SDS interaccione con la proteína.

A continuación montamos la cubeta para la electroforesis: separamos con cuidado los cristales entre los que está el gel (sin que deslicen uno sobre otro) y los ponemos en la cubeta, con el cristal de orejas hacia atrás, y sujetamos los cristales a la cubeta con las pinzas. Cogemos tampón de electroforesis y llenamos la parte de atrás de la cubeta hasta que el tampón pase un poco del nivel al que van a quedar los pocillos (de manera que al retirar el peine el tampón entre en los pocillos). En la parte delantera ponemos un poco de tampón (hasta que esté en contacto con el gel). Ahora retiramos el peine con cuidado para que no se deshagan los pocillos y cargamos la muestra. Para cargarla se coge todo el volumen de muestra con la P-200, apoyamos la punta de la pipeta en el cristal de orejas justo encima del pocillo deseado y soltamos con cuidado para que no entre en otro pocillo. Se cargan en total 9 pocillos: 8 con las muestras y el último con los marcadores de peso molecular.

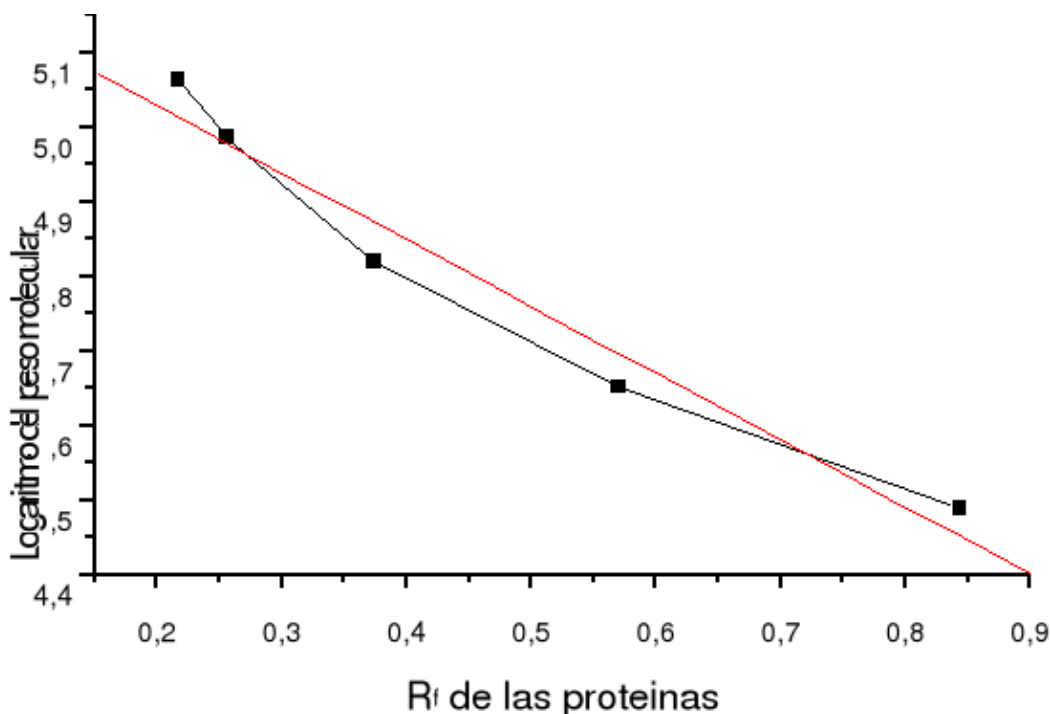
Una vez cargados todos los pocillos, se conecta la cubeta a la corriente, a 50 mA, y se deja correr la electroforesis hasta que el colorante llega casi al final del gel (aproximadamente 1 hora 45 minutos). Se vacía la cubeta volcando con cuidado para eliminar el tampón, y se quitan las pinzas para separar los cristales de la cubeta; ahora, con la ayuda de una espátula se separan los cristales, de manera que el gel quede pegado sólo a uno de ellos. Una vez separados los cristales, se separa el gel cogiéndolo por debajo, donde es mas fuerte, y tirando se separa del cristal procurando que no se rompa. Se introduce en la cubeta de revelado, y se le añade el revelador; tras 20 minutos de revelado se observa que el gel queda totalmente teñido de azul.

14-5-99

Tras revelar el gel, se observan unas líneas más oscuras, que son las marcas hasta donde han llegado las diferentes proteínas. Medimos la distancia hasta el frente, tomando como referencia el inicio del gel separador; esta distancia es de 5.1 cm. Medimos las distancias que han recorrido los marcadores de peso molecular, y representamos el logaritmo de su peso molecular frente a esta distancia:

Proteína	Peso molecular	Logaritmo Mm	Distancia	Rf
Miosina	200000	5.301	0.5	0.098
-Galactosidasa	116250	5.065	1.1	0.216
Fosforilasa-b	97400	4.988	1.3	0.255
BSA	66200	4.821	1.9	0.373
Ovoalbúmina	45000	4.653	2.9	0.569
A.carbónica	31000	4.491	4.3	0.843
Resto	---	---	5.1	1

Obtenemos así la gráfica:



Se ha despreciado el punto correspondiente a la miosina por desviarse demasiado de la recta ajustada.

Ahora en la fotografía del gel medimos las distancias a las que hay manchas de distintas proteínas en cada fracción analizada:

ST ! 0.4, 0.6, 1.6, 2.1, 2.6, 4.4 cm.

F1 ! 2.0, 2.6 cm.

F2 ! 0.3, 2.0, 2.6, 4.4 cm.

F3 ! 0.4, 2.1, 2.6, 4.3 cm.

! 2.1 cm.

! 0.4, 2.3, 4.4 cm.

! 2.0, 2.4, 4.6 cm (muy débiles, sólo apreciables en el gel y no en la fotografía)

! 2.0, 2.4, 4.5 cm (tampoco apreciables en la fotografía)

En la fracción es en la que sale la mayor parte de la inmunoglobulina; las tres manchas corresponden, en orden de mayor a menor distancia recorrida, a la cadena ligera de la inmunoglobulina, a la cadena pesada y la que menos avanza corresponde al complejo total de la inmunoglobulina (aparece algo de complejo debido a que o el γ -mercaptoetanol no ha reducido los puentes disulfuro, o el oxígeno ambiental ha reoxidado a los grupos $-SH$, formando de nuevo los puentes). Si interpolamos los datos de las distancias recorridas en la recta patrón, obtendremos los datos del peso molecular de ambas cadenas y del complejo total. Estos valores resultan ser:

Complejo total ! $R_f = 0.078$; $M_m = 137404$

Cadena ligera ! $R_f = 0.863$; $M_m = 27227$

Cadena pesada ! $R_f = 0.451$; $M_m = 63679$

PRÁCTICA 5: MINIPREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS.

• Introducción

Los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena de ADN, que existen en la bacteria además del cromosoma principal. Éste contiene los genes esenciales para la bacteria, y tiene un tamaño de entre 1 y 4 megabases.

Los plásmidos contienen genes que no son esenciales para la bacteria, pero que contienen potencialidades como por ejemplo la resistencia a ciertos antibióticos. Su tamaño oscila entre 1 y 20 kilobases. Además se pueden transferir de unas bacterias a otras por puentes entre ellas. Se replican de manera independiente, y puede haber una o más copias en cada bacteria. Estos plásmidos multicopia tienen utilidad, por ejemplo, en ingeniería genética; se coge un plásmido, se rompe de manera que quede lineal con una enzima y se une al plásmido de otra bacteria, obteniendo un plásmido recombinante. Así se puede hacer que la bacteria sintetice una proteína que nos interesa.

Para separar el plásmido del cromosoma principal y otras moléculas nos basamos en que las moléculas grandes de ADN, al tratarlas con sosa, se desnaturalizan. Pueden así formar complejos con SDS y K^+ , haciendo que precipiten.

• Practica

Cogemos 1.5 ml en un eppendorf de cultivo de *Escherichia coli* crecidos durante la noche en un medio con ampicilina (seleccionamos así las bacterias que contengan el plásmido que confiere resistencia a este antibiótico, que son las que nos interesan), y a 37°. Centrifugamos durante 1 minuto; precipitan así las bacterias, mientras que en el sobrenadante permanecen los nutrientes y las células muertas. Separamos el sobrenadante con ayuda de la P-1000, cuidando de no pinchar el precipitado.

Resuspendemos el precipitado en 100 μ l de solución I (glucosa 50 mM, AEDT 10 mM, Tris HCl 25 mM pH 8) ayudándonos con el agitator. A continuación añadimos 200 μ l de la solución II (NaOH 0.2 M, SDS al 1%), e invertimos en tubo 3 veces para mezclar bien. De esta manera el cromosoma principal se desnaturaliza, mientras que si no dejamos las bacterias más de 2-3 minutos en esta solución, el ADN plasmídico no lo hace. Ahora añadimos 150 μ l de solución III (5 M ión K⁺, 3 M ión acetato), dejamos en hielo 5 minutos y centrifugamos durante 10 minutos. De esta manera el ADN del cromosoma principal precipita, pudiendo separarlo de la disolución.

Separamos el sobrenadante en un tubo estéril, y le añadimos 0.5 ml de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50/49/1). Agitamos fuertemente durante 1 minuto, y centrifugamos durante 3 más. Aparecen ahora en el tubo 3 fases: una superior acuosa donde están los plásmidos; una interfase donde se encuentran las proteínas, con la parte polar hacia la fase acuosa; y una orgánica en la que están los lípidos. Con la ayuda de una pipeta transferimos la fase acuosa a un tubo nuevo, y le añadimos el doble de volumen de etanol absoluto, aproximadamente 1 ml (de esta manera la constante dieléctrica del medio baja, y además retiramos agua, facilitando la precipitación del ADN). Se pone 5 minutos en hielo, y se centrifuga durante 10; aparece un precipitado blanquecino, muy pequeño. Retiramos el sobrenadante y añadimos 1 ml de etanol al 70% para lavar los restos de la disolución anterior. Volvemos a centrifugar 3 minutos, y retiramos el etanol. Secamos en una estufa a 37° durante unos 25 minutos (hasta que está seco); el precipitado se vuelve casi transparente. Resuspendemos el ADN en 30 μ l de tampón TE, que lleva AEDT (para acomplejar el Mg²⁺ necesario para que actúen las DNAsas; evitamos así la degradación del ADN) y RNasa a una concentración de 50 μ g/ml (así se degrada el ARN a sus nucleótidos de partida, asegurándonos de que la única macromolécula que hay en la disolución es el ADN plasmídico). Se guarda este tubo hasta la electroforesis.

• Electroforesis en geles de agarosa.

Si se calienta una disolución de agarosa y se deja enfriar se forma un gel. En el ADN todas las moléculas tienen la misma relación q/m

, luego se filtran por el tamaño (es similar a la electroforesis anterior). Un plásmido tiene una estructura de ADN superenrollado, luego corre como si fuese más pequeño; lo que se hace normalmente es cortar el ADN para que sea lineal y no sufra superenrollamiento (en esta práctica no lo hacemos por falta de tiempo).

Para visualizar el ADN se añade una molécula que se intercala entre los nucleótidos: el bromuro de etidio:

Esta molécula emite fluorescencia al irradiarla con luz ultravioleta; de esta manera podemos localizar el ADN en el gel.

Para la electroforesis usaremos 10 μ l del plásmido, a los que añadiremos tampón de ruptura 10x para que quede aproximadamente 1x (a los 10 μ l de plásmido le añadimos 1 μ l de tampón). De estos 11 μ l cogeremos 5 para cargarlos en la electroforesis. Al igual que en la electroforesis de proteínas usaremos unos marcadores de peso molecular en la primera columna del gel.

Además usaremos dos colorantes: el azul de bromofenol y el xilencianol, que no corren igual. El gel no se corre totalmente ya que puede haber moléculas muy pequeñas de ADN que corran más que el colorante.

El gel va totalmente sumergido en el tampón de electroforesis, y es un gel del 0.8% (0.8 gr de agarosa en 100 ml de disolución).

Tras realizar la electroforesis se fotografía el gel con luz UV, y se trata de ver el peso molecular aproximado del plásmido. Para ver los marcadores de tamaño elegimos el gel E del protocolo del fabricante, por ser un gel al 0.75%, muy similar al nuestro. Nuestro plásmido queda entre el cuarto y el quinto marcadores, por lo que deducimos que el plásmido aislado tiene un tamaño de entre 2.3 y 4.4 kilobases.

