

## ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS “SDS-PAGE”

### 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula.

Cada molécula se desplaza en el campo eléctrico alcanzando una velocidad constante. En el estado estacionario, la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) se equilibra con la resistencia al avance (fuerza de fricción hidrodinámica) en el medio en que se desplaza.

Se define la movilidad electroforética como la velocidad de desplazamiento por unidad de campo eléctrico. En unas condiciones determinadas de electroforesis, la diferente movilidad de cada molécula define su comportamiento y separación en el espacio. Diferentes moléculas tendrán diferente movilidad electroforética en un medio determinado.

Hay tres tipos de electroforesis:

- De frente móvil.
- Zonal.
- Continua.

Se pueden utilizar diferentes medios de soporte para evitar perturbaciones mecánicas y los efectos de las corrientes de convección en la separación. Como medios de soporte se pueden utilizar papel, acetato de celulosa, geles de almidón, geles de agarosa o geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Controlando la concentración de ambas obtenemos geles de diferente grado de reticulación (diferente diámetro de poro).

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. Para ello se prepara un gel en placa vertical.

En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales. Al incluir bisacrilamida, ésta da lugar a puntos de ramificación en el polímero, lo que

permite formar una matriz tridimensional, dando lugar al gel de poliacrilamida. El tamaño de los huecos o poros que forma la red de retículo del polímero depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento (es decir, de la proporción de bisacrilamida con respecto al total). Así, variando la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas. También se añade un tampón (comúnmente Tris-HCl). Además, se añade un agente iniciador de la polimerización como el persulfato amónico, que al disolverse en agua genera radicales libres que transforman la acrilamida en radical libre y se inicia la polimerización. También se añade al medio TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina) como catalizador porque puede existir en forma de radical libre. Las muestras proteicas se tratan, previamente a su fraccionamiento, con SDS a 100 °C. Como consecuencia de este tratamiento y de la presencia posterior de SDS durante toda la separación (tanto en el tampón de electroforesis como en la composición del gel), las proteínas se mantienen desnaturalizadas. El SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1.4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS y ésta es proporcional al tamaño (nº de aminoácidos).

Esta electroforesis es discontinua pues utiliza dos geles:

- Un gel concentrador con bajo grado de reticulación y pH 6,8 (gel acumulador, concentrador o "stacking gel").
- Un gel separador con grado de reticulación mayor con valores entre 6% y 15%, pudiéndose también utilizar gradientes de concentración de acrilamida (gel separador).

En la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular. Tanto es así que la representación del logaritmo de la masa molecular frente a la distancia migrada obedece a una línea recta para gran número de proteínas. Para que esta dependencia sea correcta, es preciso romper los puentes disulfuro intra- e intercatenarios, para lo cual es frecuente añadir durante la preparación de la muestra un agente reductor, generalmente 2-mercaptoetanol. De este modo, la masa molecular observada corresponde a la de cada subunidad de una proteína, no a la proteína completa.

Para aplicar la muestra al gel, se le suele añadir un agente que la haga más densa, generalmente glicerina o sacarosa. Además, para seguir el avance de la separación, se añade un colorante, como azul de bromofenol, que sirve como referencia ("tracking dye"). Éste tiene una movilidad mayor que la de cualquier macromolécula y, por tanto, si se aplica corriente hasta que el colorante esté a poca distancia del extremo inferior del gel, se tiene la seguridad de que ninguna macromolécula se ha salido del gel por avance excesivo.

## 2.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

**2.1 Montaje del sistema de electroforesis.** Se utilizará un gel plano de 1,5 mm de grosor.

1. Montar el "sandwich" con dos placas de vidrio (uno tiene un rebaje) y los dos "separadores" en vertical entre ellas y a ambos lados.
2. Introducirlo en el soporte formador de geles. Sujetar el conjunto.
3. Se empleará un gel "separador" con un 7,5 % de acrilamida y un gel "acumulador o concentrador" con un 4,8% de acrilamida. Los geles se preparan mezclando, en un vaso de precipitados, los componentes indicados en la tabla (el persulfato y el TEMED inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar) y rápidamente proceder al llenado con la mezcla (las cantidades indicadas dan para dos geles). La solución de acrilamida/bisacrilamida se debe utilizar con guantes y pipetear con pipeta automática.
4. Primero se polimeriza el gel "separador" (ver tabla). Para ello se rellena, con la mezcla todavía líquida, el espacio entre las dos placas hasta unos 2 cm del borde superior del cristal corto, usando una pipeta pasteur. Añadir encima una pequeña cantidad de agua destilada (esto hace que la superficie del gel quede recta). Esperar a que polimerice el gel (entre 30 y 60 min, observar la mezcla sobrante en el vaso). Volcar para retirar el agua destilada. Secar con un papel de filtro.
5. Añadir sobre este gel separador la mezcla (ver tabla) del gel "acumulador" y antes de que polimerice introducir en la parte superior el "peine", que formará en el gel acumulador los pocillos para luego poder aplicar las muestras. Se guarda el gel en la cámara fría hasta el día siguiente.
6. Se preparan un gel separador y un gel acumulador por cada 6 alumnos siendo las proporciones abajo indicadas para dos geles separadores y dos geles acumuladores.

### **Gel separador ( Acrilamida 7,5% ):**

Agua destilada	12 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	6,25 mL
Tris 1 M pH 8,8	6,25 mL
SDS 10%	250 µL
TEMED	18,5 µL
Persulfato amónico (100 mg/ml)	300 µL

### **Gel acumulador o concentrador ( Acrilamida 4,95% ):**

Agua destilada	5,65 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	1,6 mL
Tris 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
TEMED	10 µL
Persulfato amónico (100 mg/ml)	140 µL

## 2.2 Separación de las proteínas por SDS-PAGE

### Preparación de las muestras

Una vez polimerizado el gel concentrador se aplica la muestra.

- La muestra problema de la proteína a analizar está preparada a una concentración de 1 mg/ml.
- Se toman 24  $\mu$ l de la solución con la proteína problema y se añade tampón de ruptura 5X en una relación 4:1 (v:v), 6  $\mu$ l. A continuación, se añade al mismo tubo un volumen de 20  $\mu$ l de tampón de ruptura 1X. Se mezcla la muestra preparada mediante agitación en Vortex.
- Para observar el efecto producido por la aplicación de cantidades crecientes de la proteína problema se preparan tres muestras en tubos independientes. La primera conteniendo 10  $\mu$ l de la muestra preparada previamente (Tubo 1) , la segunda conteniendo 15  $\mu$ l de la muestra preparada previamente (Tubo 2) y la tercera conteniendo 20  $\mu$ l de la muestra preparada previamente (Tubo 3). A la primera muestra (Tubo 1) se añaden 20  $\mu$ l de Tampón de ruptura, a la segunda muestra (Tubo 2) se añaden 15  $\mu$ l de Tampón de ruptura y a la última muestra (Tubo 3) se añaden 10  $\mu$ l de Tampón de Ruptura. Después de añadir estos volúmenes, se debe mezclar en Vortex el contenido de cada tubo.
- Cada una de estas muestras se aplicará en un pocillo.
- En uno de los pocillos añadir 10  $\mu$ L de patrones preteñidos de masa molecular conocido. Esta mezcla ya contiene el tampón de ruptura.
- Las patrones preteñidos (con colorantes) contienen proteínas con diferentes masa molecular aparente.

#### Masa molecular aparente (daltons)

- 250.000 (azul)
  - 150.000 (azul)
  - 100.000 (azul)
  - 75.000 (rojo)
  - 50.000 (azul)
  - 37.000 (azul)
  - 25.000 (rojo)
  - 20.000 (azul)
  - 15.000 (azul)
  - 10.000 (azul)
- Mantener las muestras durante 5 minutos a 100 °C. Centrifugar los tubos a baja velocidad durante un minuto para concentrar toda la muestra en el fondo del tubo.
  - Retirar con cuidado el peine al gel preparado el día anterior. Sacar del formador de geles el “sandwich” de placas de vidrio, separadores y gel y sujetarlo en vertical en la cubeta de electroforesis.
  - Llenar las cámaras superior e inferior de la cubeta de electroforesis que contienen los electrodos con tampón de electroforesis, de modo que entre en contacto con ambos extremos del gel.

- Se aplican las muestras y los patrones de masa molecular en los pocillos del gel, usando micropipetas con puntas finas.
- Se completa cada pocillo con tampón de ruptura 1X preparado diluyendo el tampón de ruptura 5X en tampón de electroforesis.
- Es conveniente anotar el orden de aplicación de las muestras, así como identificar el gel en el que están las muestras que corresponden a cada taquilla.

#### **Desarrollo de la electroforesis**

- Conectar los cables de la cubeta a una fuente de corriente continua (comprobar la polaridad: rojo (+), negro (-)).
- Aplicar 80 V hasta que el frente (visible por la banda azul de bromofenol) entre en el gel separador; después subir a 120 V.
- Cuando el frente se acerque al extremo inferior del gel, desconectar la corriente y sacar el sandwich.
- Separar las placas de vidrio con ayuda de una espátula y sacar el gel (usar guantes para evitar tocar el gel con los dedos) con cuidado de no invertir su orientación.
- Se tiñe el gel de electroforesis mediante su inclusión en solución de tinción que contiene Azul de Coomassie, ácido acético 10%, isopropanol 25% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se pasa el gel a solución de destinción que contiene ácido acético 10% y metanol 20% en agua, destiñendo el gel durante con varios cambios de solución de destinción.

#### **4. TRATAMIENTO Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

- 1.- En una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, ¿qué proteínas presentan mayor movilidad electroforética en el gel separador?
- 2.- ¿Qué efecto ejerce el SDS sobre las proteínas de una muestra preparada para su análisis por SDS-PAGE?
- 3.- ¿Qué sustancia se usa como marcador de frente?
- 4.- ¿Por qué contiene el Buffer de ruptura  $\beta$ -mercaptoetanol?. ¿Y glicerol?.
- 5.- ¿Por qué se utilizan dos geles (concentrador y separador) en la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS?
- 6.- ¿Qué porcentaje de SDS presenta cada uno de los dos geles (concentrador y separador)?. ¿Por qué?.
- 7.- ¿Qué cantidad de proteína problema contiene cada una de las tres muestras aplicadas en el gel de poliacrilamida?.
- 8.- ¿Qué posibles aplicaciones presenta este método?

- 9.- ¿Qué patrón de bandas se obtiene en la muestra de marcadores?
- 10.- Representar las movilidades electroforéticas de los patrones de masa molecular frente al logaritmo de la masa molecular de cada patrón (en papel milimetrado).
- 11.- Calcular la movilidad electroforética de la proteína problema (a partir de la banda que aparece en el gel tras tinción y destinción del mismo).
- 12.- Calcular la masa molecular de la proteína problema.

## 5. MATERIAL Y REACTIVOS

### Materiales

- Fuente de electroforesis.
- Baño de incubación o bloque térmico.
- Cubeta de electroforesis con cristales, peines y separadores.
- Formador de geles
- Pipetas

### Reactivos

- Solución de acrilamida/bisacrilamida: Contiene 30 % acrilamida + 0.8% bisacrilamida preparada en agua destilada.
- Disolución de SDS: 10 % en agua destilada.
- Disolución de persulfato amónico: 100 mg/mL en agua destilada.
- TEMED (solución comercial)
- Tampón del gel separador: Tris 1M; pH = 8,8
- Tampón del gel acumulador: Tris 0,5 M; pH = 6,8
- Tampón de Ruptura 5X que contiene: 2,5 ml de solución de SDS 10%; 0,2 ml de 2-mercaptoetanol; 0,5 ml de azul de bromofenol 0,05%; 0,3 ml de tampón de electroforesis; 1 ml de glicerol y 0,5 ml de Tris 0,5 M pH 6,8.
- Tampón de electroforesis: contiene 14,4 g/l de glicina, 3 g/l de Tris (base) y 10 ml/l de SDS 10%.
- Patrones preteñidos de masa molecular conocida (250.000, 150.000, 100.000, 75.000, 50.000, 37.000, 25.000, 20.000, 15.000 y 10.000 daltons).
- Muestra de proteínas problema (1 mg/ml)
- Disolución de tinción: azul de Coomassie en ácido acético 10%, alcohol isopropílico 25% en agua destilada.
- Disolución de destinción: ácido acético 10%, metanol 20% en agua destilada.