

Electroenfoque horizontal en gel de poliacrilamida

Nuria Ruiz Espinosa
Albacete
nre4@alu.ua.es

Abstract

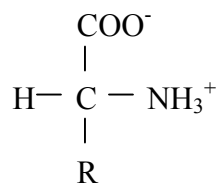
El electroenfoque es un tipo particular de electroforesis en la que compuestos anfóteros se separan según su *punto isoeléctrico*, en un gradiente continuo de pH. Este tipo de electroforesis, nos va a permitir clasificar proteínas desconocidas, en función de su punto isoeléctrico y utilizando, para ello, proteínas patrón.

Introducción:

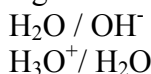
El electroenfoque nos permite separar los compuestos anfóteros (sobre todo, se utiliza para proteínas) según su *punto isoeléctrico*, *pI*, en un gradiente continuo de pH. El punto isoeléctrico de una proteína se define como el pH al cual la carga neta de dicha proteína es nula.[1] A valores de $\text{pH} > \text{pI}$ hay baja concentración de protones en el medio, por lo que, la proteína se desprotona, está cargada negativamente. A valores de $\text{pH} < \text{pI}$ su carga es positiva, ya que, hay muchos protones en el medio, por lo que, está protonada. Siendo la carga de la proteína 0 cuando $\text{pH} = \text{pI}$. En esto es en lo que se basa el electroenfoque [2].

Un *anfólito* se define como una sustancia que participa en un par ácido-base como ácido y en otro par como base [3]. Esto ocurre con el agua y con los aminoácidos:

Aminoácidos:



Agua:



La separación se lleva a cabo en un medio o soporte (gel de agarosa o acrilamida) donde el tamizado molecular no tenga influencia en la separación y que presente un gradiente de pH a lo largo del soporte. La proteína o anfólito a separar se moverá en presencia de una campo eléctrico según su carga neta, hasta alcanzar la zona de pH en la que ésta se anulase (*pI*). Cada proteína se detendría en ese punto particular y quedaría *focalizada* (concentrada) en un estrecha banda. La posición de las sustancias no dependerá del tiempo que dure la electroforesis, lo que supone que en el electroenfoque se llega a una situación de equilibrio (a diferencia de lo que sucede en la electroforesis convencional).[4]

El gel se prepara a partir de una disolución de acrilamida y bisacrilamida a la que se añade una mezcla de anfolitos portadores. El gradiente de pH se establece al mismo tiempo que se lleva a cabo la electroforesis. Los anfolitos portadores son una mezcla de tampones anfóteros que forman un suave gradiente de pH en presencia de un campo eléctrico. Durante el electroenfoco estos tampones se van estacionando a lo largo del soporte o gel de acuerdo con sus pI's correspondientes dando lugar a un gradiente lineal de pH.

Los anfolitos que se usan son derivados de aminas de bajo peso molecular. Se diseñan para dar un gradiente de pH lineal de 3 a 9. Esto se consigue porque son anfolitos con diferentes pK_a. Las sustancias con pK_a bajos son ácidas y suelen estar desprotonadas. Los anfolitos con pK_a altos son básicos y suelen estar protonados [4]:

Procedimiento:

a) Preparación del gel de poli(acrilamida) para electroenfoco

Como catalizadores para polimerizar la acrilamida-bisacrilamida se utilizan persulfato amónico y TEMED, pero eliminamos el uso de FMN. Se añade glicerol para dar densidad. Se añaden en las siguientes proporciones [5]:

Agua ultrapura	5.5 ml
Monómero concentrado (25%T, 3%C)	2.0 ml
Glicerol 25% (w/v)	2.0 ml
Disolución de anfolitos	0.5 ml
Persulfato de amonio 10% (w/v)	50 µl
TEMED	5 µl

El equipo de electroforesis dispone de una película sensible a la luz, una de cuyas caras está tratada, presentando un alto carácter hidrofílico, para que la acrilamida tenga una gran afinidad por ella y la fina capa de gel de acrilamida quede fuertemente adherida a ésta una vez polimerizada.

En la cara no tratada, la hidrofóbica, que queda en la parte de arriba, se colocan un par de gotas de agua y se deposita sobre el cristal.

La película de plástico se coloca junto con el cristal boca abajo en la bandeja de polimerización. Se utiliza una pipeta Pasteur para introducir la disolución con TEMED y persulfato amónico. La acrilamida-bisacrilamida se ha de distribuir uniformemente por todo el soporte, evitando la formación de burbujas de aire.

Se deja polimerizar unos 15 minutos y se retira el cristal y la placa con la acrilamida. A continuación, sobre el gel se coloca el molde para la aplicación de muestras en los pocillos. Se deja secar durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocan sobre la cámara los electrodos de grafito previamente humedecidos con agua destilada o ultrapura y sobre ellos la placa con la acrilamida en contacto con los electrodos. El cristal también se coloca para dar mayor peso. El voltaje se va incrementando gradualmente para evitar el sobrecalentamiento y deshidratación del gel. Se realiza en 3 etapas:

1. A 100 voltios durante 15 minutos.
2. A 200 voltios durante 15 minutos.
3. A 450 voltios durante 60 minutos.

Transcurrido esto, se desconecta el aparato y se desmonta el gel.

b) Tinción y revelado del gel [6]:

Una vez desmontado el gel se coloca en un recipiente adecuado y se procede a:

1. Fijación:

Se sumerge el gel durante 30 minutos en una disolución de TCA 12.5%, 4% ácido sulfosalicílico y 30% metanol. Se lava brevemente con disolución 25% etanol y 7% acético.

2. Tinción:

Sumergir durante 1 a 2 horas en disolución de tinción: 27% etanol; 10% ácido acético; 0.04% azul Coomassie y 0.5% CuSO₄ (elimina cualquier tinción de fondo debido a la presencia de los anfolitos)

3. Revelado:

El revelado se realiza para quitar el exceso de azul Coomassie. La primera disolución de revelado se sumerge durante 30 minutos. Esta disolución consiste en 12% etanol; 7% ácido acético; 0.5% sulfato de cobre (II) disuelto previamente en agua. El etanol y el ácido acético son disolvente polares, que eliminan el exceso de colorante. El ácido acético elimina más cantidad de azul Coomassie porque es más polar que el etanol. El sulfato de cobre (II) se añade para evitar que se tiñan los anfolitos. Se realiza otra segunda disolución de revelado que se sumerge otros 30 minutos. Esta disolución está formada por 25% etanol (el doble de cantidad que en la primera disolución para eliminar más azul Coomassie); 7% ácido acético. Se deja secar al aire.

Resultados:

Una vez que se ha revelado el gel se mide la distancia de algunas de las proteínas patrón a un punto de referencia. Se representa gráficamente el pI de algunas de las proteínas patrón frente a la distancia medida para cada una. Con esta gráfica, lo que se obtiene es una relación entre distancia y punto isoelectrico mediante regresión lineal. Por último, para saber el punto isoelectrico de nuestra proteína problema se mide la distancia al mismo punto de referencia de nuestra muestra problema y con la relación anterior se calcula el punto isoelectrico.

En la tabla 1 se recogen las distancias medidas y los puntos isoelectricos de algunas de las proteínas patrón:

Tabla 1. Proteínas patrón y distancia obtenida para la proteína problema

Proteína	pI	Distancia (cm)
Ficocianina	4.616	4.8
β-lactoglobulina B	5.1	4.6
Anhidrasa carbónica bovina	6	4.3
Lectina de lenteja	8.2	1.6
Hemoglobina C humana	7.5	2.0
Proteína problema		3.0

A partir de esta tabla, se puede llevar a cabo la realización de una gráfica, que recoge la representación del pI frente a la distancia medida, con el fin de obtener el pI de nuestra proteína problema. Esta representación se recoge en la figura 1.

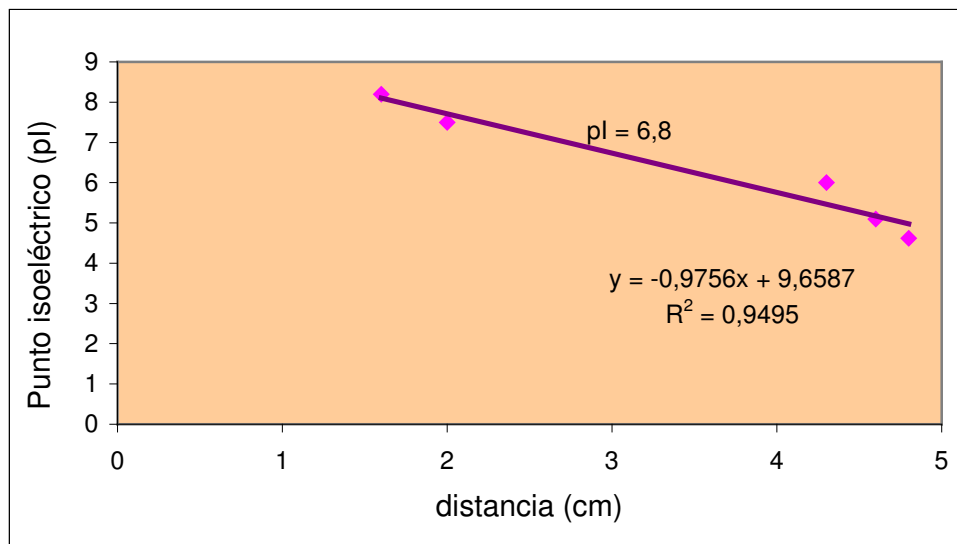


Figura 1. pI proteína problema

Como la distancia medida para nuestra proteína problema es de 3 cm podemos saber que el punto isoeléctrico va a ser de aproximadamente igual a 6.8. Por tanto, a pH (= pI) igual a 6.8 la carga de la proteína problema será 0.

Conclusiones:

Como se ha podido comprobar, con este tipo de electroforesis, llamada electroenfoque, se ha podido determinar el punto isoeléctrico de una proteína desconocida, partiendo de una serie de proteínas patrón. Así, se ha determinado que el punto isoeléctrico de nuestra proteína patrón es igual a 6.8, es decir, a pH igual a 6.8 la carga de nuestra proteína problema será igual a 0.

Bibliografía:

- [1] <http://es.wikipedia.org/wiki/Isoelectroenfoque>
- [2] <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm>
- [3] Roca, P. Oliver, J y Rodríguez, A.M. “Bioquímica. Técnicas y Métodos” Ed. Hélice. 2003. Madrid.
- [4] Freifelder, D. “Técnicas en Bioquímica y Biología Molecular.” Ed. Reverté. 1981
- [5] Wilson, K. y Walker, J. “Principles and Techniques of Practical Biochemistry.” 5º ed. Cambridge University Press. 2000. Cambridge.
- [6] García Segura, J., Gavilanes, J.G., Martínez de] Pozo, A, Montero, F., Oñaderra, M. y Vivanco, F. “Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica.” Síntesis, S.A. 1996. Madrid