

CAPÍTULO 4

Electroforesis

Lorenza Costa

Conceptos generales de electroforesis

Se denomina **electroforesis** a la técnica de análisis químico que **permite separar** macromoléculas o fragmentos de macromoléculas **bajo la acción de un campo eléctrico**. La separación de macromoléculas suele ser un paso necesario para lograr el aislamiento de macromoléculas, lo que permite estudiar sus propiedades fisicoquímicas y conocer cuál es su función biológica en un organismo. Las funciones biológicas, están codificadas en el ADN, se traducen al ARN y, en general, se llevan a cabo a través de proteínas que cumplen diferentes funciones en los seres vivos ya sea como enzimas, receptores, transportadores, bombas primarias y secundarias de transporte o proteínas estructurales entre otras (García Trejo y Ortega, 2021). La electroforesis se aplica al estudio de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), por lo tanto, es una herramienta indispensable de trabajo en estudios bioquímicos sobre fisiología de plantas y en métodos de biología molecular.

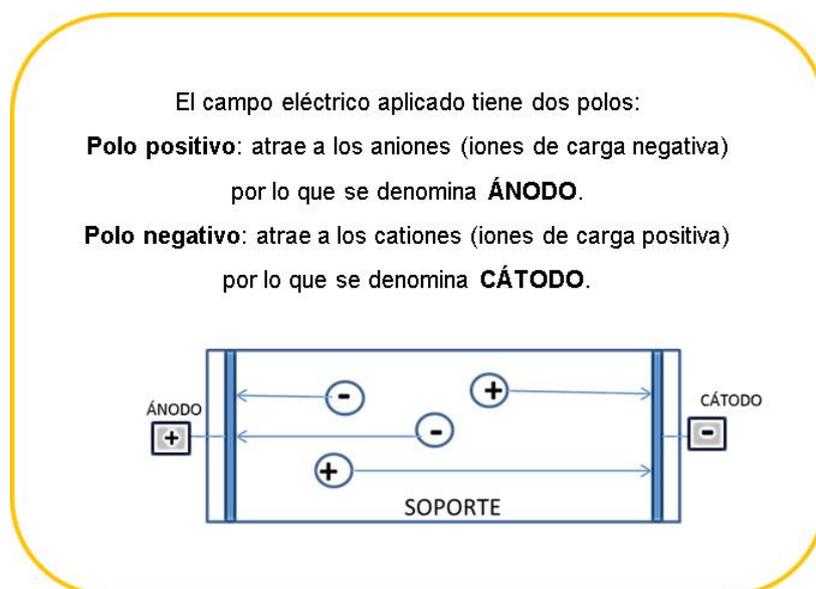


Figura 4.1. Campo eléctrico aplicado.
Esquema que representa el efecto de un campo eléctrico sobre especies cargadas.
Los círculos representan iones de carga positiva (+) o negativa (-)

Electroforesis es una palabra que deriva del griego, *elektro* significa electricidad y *phoros* movimiento. En cuanto al fundamento de la técnica, la electroforesis es un método de análisis en el cual se separan moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La separación electroforética más ampliamente utilizada ocurre en un medio acuoso embebido en un soporte semisólido (gel inmerso en una solución buffer). En los extremos del soporte se ubican los dos polos de carga del campo eléctrico (polo positivo y polo negativo). Al aplicar un campo eléctrico las moléculas que tienen carga (iones moleculares) migrarán hacia el polo de carga opuesta: los cationes se desplazarán en dirección al polo negativo y los aniones hacia el polo positivo (Figura 4.1).

Cuanto mayor sea la intensidad del campo eléctrico aplicado, mayor la velocidad de desplazamiento. Sin embargo, cada ion se desplazará a una velocidad característica que depende de factores propios de cada molécula como la carga, la forma y el peso molecular y, además de la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se desplazan. Los factores mencionados determinan la movilidad iónica de la molécula cuando se desplaza en un medio definido:

$$v_{ion} = \mu_{ion} \times E$$

v: velocidad de migración iónica

μ : movilidad iónica (factores del ion + factores del medio)

E: campo eléctrico aplicado

Existen tres formas básicas de realizar una electroforesis:

- 1- Electroforesis de límite móvil, modalidad que se utiliza para determinar la movilidad electroforética de los iones, no suele ser un método de rutina en laboratorios de análisis químico.
- 2- Electroforesis de zona, la que tiene numerosas aplicaciones en laboratorios de investigación y diagnóstico.
- 3- Electroforesis de estado estacionario, la que se utiliza para caracterizar proteínas, como método de diagnóstico y como etapas intermedias en estudios de muestras complejas.

En este capítulo se describirán las modalidades 2 y 3.

Electroforesis de zona

La **electroforesis de zona** en gel es la más ampliamente utilizada en los laboratorios de diagnóstico e investigación relacionados con el ámbito agronómico y forestal. En una electroforesis de zona **los componentes de una mezcla se separan en bandas estabilizadas sobre un gel**. La muestra ingresa a un gel acumulador o concentrador (*stacking*) que permite concentrar la muestra en un frente de avance antes de ingresar al gel de resolución en el cual se formarán las bandas de avance a velocidad constante para los diferentes analitos (componentes de la muestra). El avance de cada frente de migración continuará a velocidad constante mientras dure la aplicación del campo eléctrico. La Figura 4.2 muestra el equipamiento básico necesario para

realizar una electroforesis de zona y la Figura 4.3 presenta una foto del resultado que se observa al finalizar una electroforesis de proteínas. A medida que se avanza en el capítulo se explica detalladamente cada término utilizado en esta metodología, algunos de los cuales se indican en las figuras mencionadas.

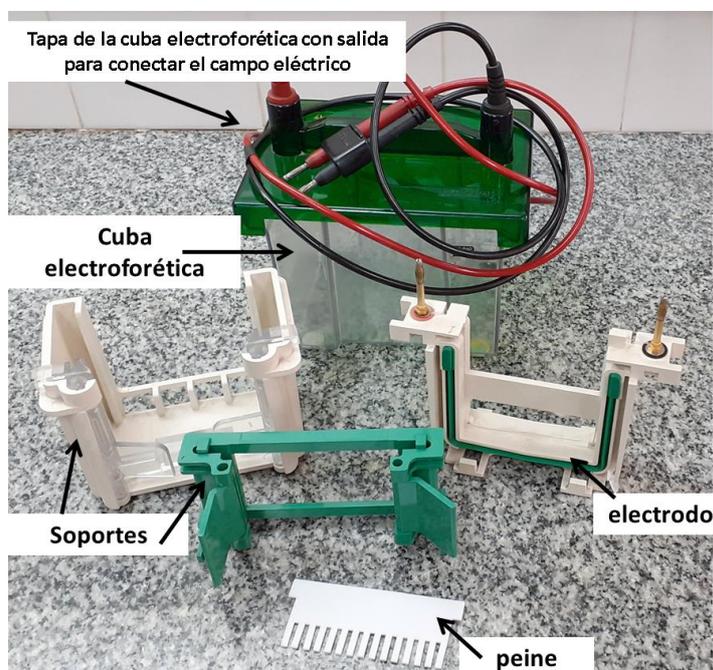


Figura 4.2. Equipo básico para realizar electroforesis

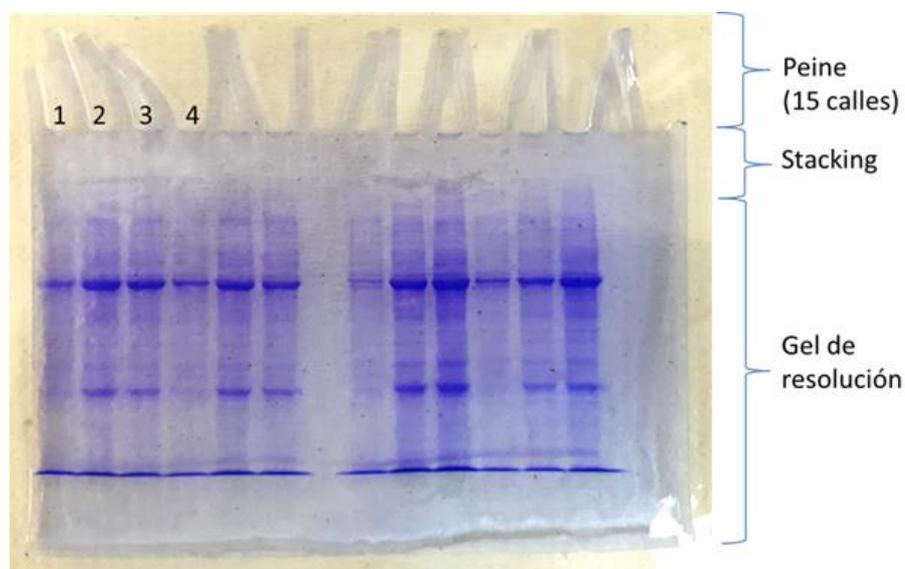


Figura 4.3. Electroforesis de zona.

Resultado de una electroforesis de proteínas en PAGE (gel de poliacrilamida). Se observa en el peine 15 calles donde se indican las 4 primeras (1, 2, 3 y 4). En cada calle se siembra una muestra a analizar. En las calles 7, 14 y 15 no se sembraron muestras. Se señalan las dos partes del gel, gel acumulador o stacking y gel de resolución. Las zonas teñidas de azul fuerte (colorante Azul Brillante de Coomassie) señalan las bandas de migración de proteínas sobre el gel.

En las electroforesis para análisis de proteínas se utilizan geles de poliacrilamida (PAGE, del inglés *PolyacrilAmide Gel Electrophoresis*) mientras que en las electroforesis para análisis de ácidos nucleicos se utilizan geles de agarosa. En ambos casos se arman láminas de geles de 0,75 a 2 mm de espesor, utilizando moldes adecuados para lograrlo. En el caso de proteínas se utilizan geles verticales (Figura 4.4) y en el caso de ácidos nucleicos geles horizontales.



Figura 4.4. Molde para la preparación del gel.

Consta de dos vidrios entre los que se genera un espesor según el separador utilizado, puede ser de 0,75 a 2 mm. Los vidrios se mantienen en forma vertical mediante un soporte adecuado. La parte inferior del molde debe quedar sellado y en el extremo superior se coloca el peine para darle forma a las calles donde se sembrarán las muestras. El molde preparado se carga con líquido que polimerizará con la forma delimitada, obteniendo una lámina fina de gel con las calles en el extremo superior.

Una vez armado el gel, sobre el mismo se colocan las muestras que contienen a los analitos (proteínas o ácidos nucleicos) que se quieren separar. Las muestras se colocan con la ayuda de una jeringa o una micropipeta, lo que permite medir con exactitud el volumen; cada muestra se deposita en una calle en el extremo superior del gel. En general, este procedimiento corresponde a la siembra de las muestras en el gel.

Una vez sembradas las muestras se aplicará el campo eléctrico. Los analitos que poseen carga comenzarán a desplazarse en dirección al polo de carga opuesta. Para el análisis de proteínas el diseño general ubica el cátodo en el extremo superior del gel y el ánodo en el extremo inferior, por lo tanto, es deseable que las proteínas ingresen al gel y lo recorran en dirección al ánodo bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Para lograr este comportamiento, las muestras de proteínas a analizar se preparan en un buffer pH alcalino de modo que la mayoría de las mismas se comporten como aniones, es decir, se desplacen en dirección al ánodo. En el caso de los ácidos nucleicos el diseño es similar, se colocan las muestras en las calles ubicadas en el extremo del gel horizontal cerca del cátodo. Al iniciar la aplicación del campo eléctrico los ácidos nucleicos con sus cargas negativas se desplazarán en dirección al ánodo.

Durante la electroforesis en gel, los analitos se ordenan en bandas que migran a velocidad constante. La idea es interrumpir el campo eléctrico antes de que las bandas alcancen el final del gel. Para lograrlo se agrega a la muestra un analito coloreado, azul de bromofenol, que migrará con mayor velocidad para señalar el frente de la corrida electroforética.

Una vez finalizada la electroforesis, se realiza una etapa de revelado que permitirá observar los analitos separados sobre el gel. Existen diferentes formas de revelado tales como métodos generales de tinción, métodos de tinción por sustrato, y técnicas de inmunodetección luego de transferir los analitos separados en el gel hacia una hoja de nitrocelulosa (esta técnica se explica detalladamente más adelante en este capítulo). El método elegido para revelar dependerá de la pregunta a resolver a través de esta técnica. Se hace referencia aquí al uso de tinciones generales para revelar proteínas y ácidos nucleicos.

En el caso de proteínas la tinción más utilizada para revelar sobre el gel es con el colorante azul brillante de Coomassie. Para el caso de ácidos nucleicos, el revelado más utilizado es la tinción con bromuro de etidio; en este caso se debe trabajar bajo rigurosas normas de seguridad ya que implica la exposición a material radioactivo.

Existen otras tinciones generales para revelar geles, por ejemplo, cuando la cantidad de muestra es muy baja, se recurre a la tinción con nitrato de plata ya que es mucho más sensible que las tinciones mencionadas. Brevemente, en esta tinción, el ion plata (Ag^+) se reduce a plata cero (Ag^0) al reaccionar con grupos funcionales presentes en las proteínas y ácidos nucleicos (tioles, tirosina, aminas). El depósito de plata tiñe de color pardo el lugar donde se encuentran los analitos que han reaccionado. La Figura 4.5 muestra la apariencia de los geles luego de las tinciones mencionadas.

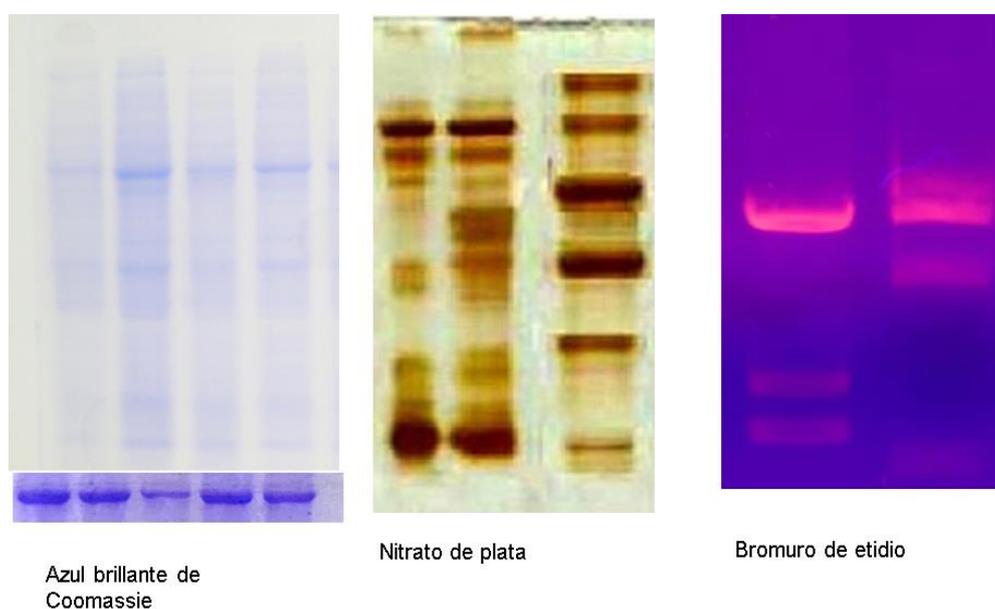


Figura 4.5. Apariencia de los geles una vez finalizada la etapa de revelado

En este capítulo se describen en detalle las electroforesis utilizadas para el estudio de proteínas. Algunos detalles sobre electroforesis para estudios de ácidos nucleicos se desarrollarán en el Capítulo 5 ya que forman parte de las técnicas básicas de biología molecular.

Electroforesis de zona para el análisis de proteínas

Como se ha mencionado, para el estudio de proteínas se utilizan geles de poliacrilamida. Se eligen dichos geles ya que tienen buena resolución, no interactúan con las muestras y son estables frente a cambios de pH, temperatura y fuerza iónica dentro de un amplio rango de valores para estos parámetros. Los geles, en forma de láminas delgadas, se forman fácilmente mediante la polimerización de acrilamida, utilizando como molde el espacio generado entre dos vidrios dejando un espesor que varía entre 0,75 y 2 cm dependiendo del equipo de electroforesis que se va a utilizar.

El gel se forma a partir de acrilamida, monómero que se polimeriza y bisacrilamida, compuesto que genera el entrecruzamiento de los polímeros. Para que ocurra la polimerización se utilizan un iniciador, Persulfato Amónico (APS) y un catalizador, N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED) (Figura 4.6).

La porosidad del gel se puede regular en función del porcentaje de acrilamida y bisacrilamida que se utiliza en la preparación. Cuanto mayor sea el porcentaje de acrilamida más cerrado será el gel, lo que significa que funcionará como un tamiz menos poroso. La porosidad del gel afectará la movilidad de los analitos en función de su tamaño ya que el gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular. Para aumentar el poder de separación del gel se regula el porcentaje de acrilamida utilizado. Si se quiere separar analitos de bajo peso molecular se debe recurrir a geles de mayor porcentaje de acrilamida mientras que si se busca separar analitos de mayor peso molecular se necesitan geles más laxos de menor porcentaje de acrilamida para obtener mayor resolución. Algunas veces, para muestras complejas donde es importante separar tanto analitos de bajo como de alto peso molecular se recurre al armado de un gel con un gradiente de acrilamida.

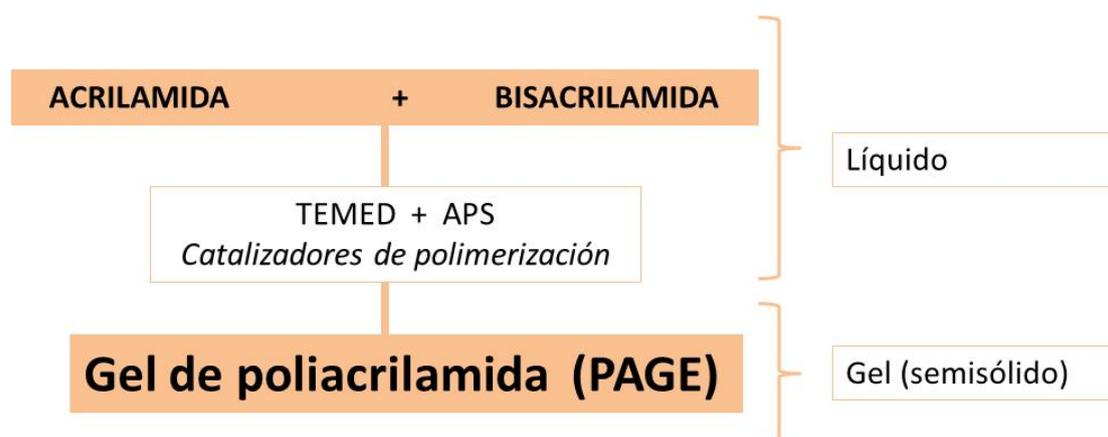


Figura 4.6. Formación de un PAGE.

Esquema de los reactivos necesarios para formar el gel de poliacrilamida (PAGE). Cuando se prepara el gel se debe trabajar con guantes y barbijo ya que la acrilamida sin polimerizar es neurotóxica.

El gel se prepara dentro de un molde formado por dos vidrios con un espesor definido entre ellos tal como se mencionó anteriormente. Se arma en dos fragmentos denominados gel acumulador o *stacking* donde ingresa la muestra para concentrarse en una banda

estrecha y a continuación el gel de resolución, donde se separan las bandas de diferente velocidad electroforética (Figura 4.7).

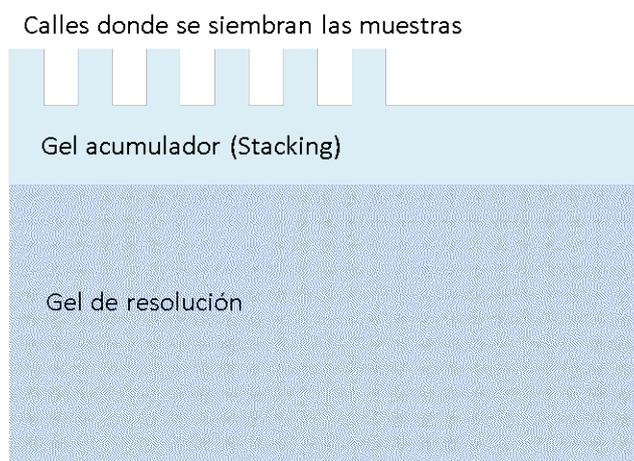


Figura 4.7. Descripción del gel que se usa para realizar una electroforesis de proteínas. Esquema que representa las diferentes partes del gel para la separación de proteínas. En el gel acumulador quedan formadas las calles donde se colocarán las muestras. En general, el gel de stacking tiene un 7 % de acrilamida mientras que el gel de resolución puede ser de 12 a 15 % de acrilamida.

Una vez armado el gel, se acomoda, sin retirar del molde, entre dos compartimentos separados. Cada uno de ellos contiene uno de los electrodos, negativo o positivo, inmersos en buffer de corrida por lo que constituyen el cátodo y el ánodo respectivamente. La conexión eléctrica entre ambos compartimentos se produce a través del gel. Una vez armado este sistema, se colocan las muestras a analizar en el gel y se conecta el campo eléctrico. El campo eléctrico se genera a través de una fuente de poder que se puede programar a voltaje constante o bien a corriente constante. Para las electroforesis se utilizan valores del orden de 100 milivolts. Una vez que la electroforesis ha finalizado, el gel de poliacrilamida se puede revelar para poner en evidencia las bandas de migración separadas. El resultado obtenido se puede digitalizar y guardar. Si es necesario, también es posible purificar las moléculas de interés recuperándolas a partir de la banda de gel donde se ubican.

Recapitulación de los pasos a seguir para realizar una electroforesis de zona para analizar proteínas

Paso 1- Armado del gel

Utilizando un molde sostenido en un soporte adecuado se carga la solución de acrilamida-bisacrilamida correspondiente al gel de resolución y se deja el tiempo suficiente como para que se forme el gel. A continuación, se carga la solución correspondiente al *stacking* e inmediatamente se coloca el peine para que al gelificar queden formadas las calles donde se van a colocar las muestras.

Paso 2- Armado de la cuba de electroforesis con el gel

Una vez que el gel dentro del molde está formado (polimerizado) se lo coloca dentro de la cuba de electroforesis. La cuba tiene dos compartimentos separados, el cátodo y el ánodo, los que se llenan con el mismo buffer de corrida. El contacto entre ambos compartimentos se dará sólo a través del gel.

Paso 3- Siembra de las muestras a analizar y aplicación del campo eléctrico (Figura 4.8).

Las muestras se colocan en las calles del gel con una micropipeta o con una jeringa. Para que las muestras se ubiquen en el fondo de cada calle se les agrega glicerol, de este modo las muestras siempre serán más densas que el buffer de corrida y quedarán depositadas en el fondo de cada calle. Una vez que se sembraron las muestras, se cierra la cuba de electroforesis y se conecta el campo eléctrico a través de una fuente de poder. Se mantiene el campo eléctrico hasta que la molécula coloreada (azul de bromofenol) que se agrega para marcar el frente de corrida llegue cerca del extremo inferior del gel.

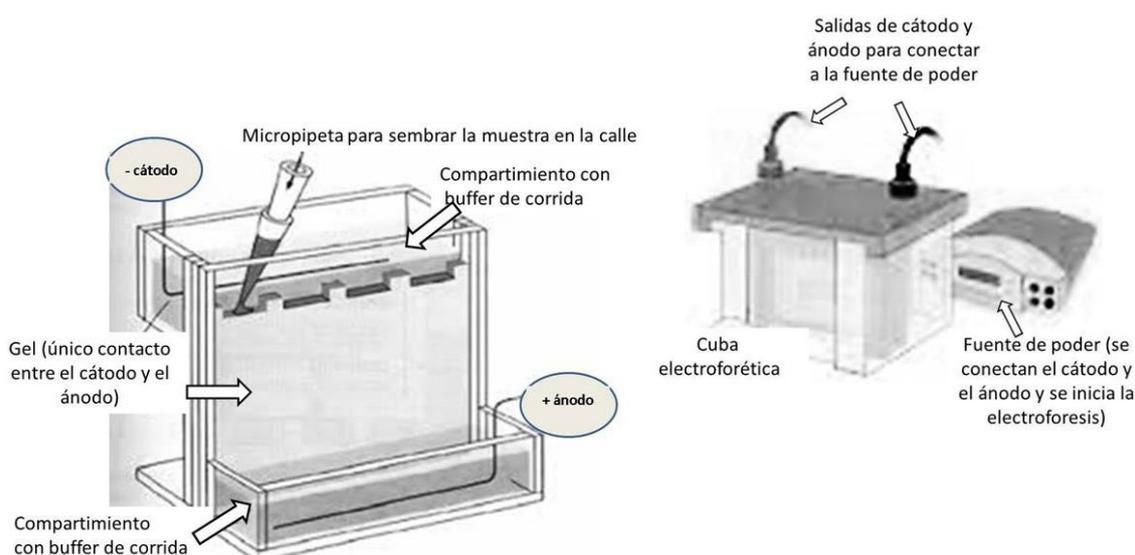


Figura 4.8. Siembra de las muestras a analizar y aplicación del campo eléctrico

Paso 4- Revelado del gel: tinción y decoloración del gel

Finalizada la corrida electroforética, se retira el gel con el molde de la cuba electroforética, se separan cuidadosamente los vidrios que contienen al gel y, con cuidado, se coloca el gel en un recipiente para llevar a cabo el proceso de tinción. Se deja en contacto dentro del recipiente el gel con una solución de colorante azul brillante de Coomassie, en agitación durante varias horas. Se obtendrá una tinción azul completa del gel a partir de la cual comienza la etapa de decoloración, reemplazando la solución de tinción por la solución decolorante, manteniendo la agitación hasta que sólo queden las bandas azules que se tiñeron específicamente.

Electroforesis Nativa y Electroforesis Desnaturalizante

Para el estudio de proteínas se utilizan, con objetivos diferentes, dos modalidades de electroforesis de zona: **electroforesis nativa** y **electroforesis desnaturalizante**. En términos generales no existen grandes diferencias en cuanto al procedimiento y funcionamiento de ambas electroforesis ya que se utilizan los mismos moldes y el mismo equipamiento. La diferencia radica en la preparación previa de las muestras y en las recetas que se utilizan para preparar los geles y el buffer de corrida.

En una **electroforesis nativa**, las proteínas se analizan conservando sus cuatro niveles de estructura, tal como existen en la naturaleza. En este caso cada proteína conserva sus características de tamaño forma y carga y, por lo tanto, su movilidad sobre el gel estará afectada por las características de cada proteína.

Por el contrario, en una **electroforesis desnaturalizante** es necesario hacer un tratamiento previo de las muestras con un agente reductor (2-mercaptoetanol, C_2H_6OS) y un detergente iónico, dodecilsulfato sódico (SDS, $CH_3(CH_2)_{11}OS(=O)_2O-Na^+$) que aportará carga negativa a las cadenas polipeptídicas. El detergente romperá las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas (desnaturaliza a las proteínas) quedando las cadenas polipeptídicas separadas y desplegadas. Algunas proteínas tienen subunidades que se mantienen unidas a través de puentes disulfuro, el agregado de 2-mercaptoetanol permite reducir estos puentes disulfuro y separar las subunidades. Como resultado de este tratamiento, cada proteína dará lugar a las cadenas polipeptídicas que las componen y, a su vez, estas cadenas estarán desplegadas, habrán perdido su forma, y estarán tapizadas por la carga negativa del detergente SDS. Por lo tanto, el efecto final del tratamiento con SDS y 2-mercaptoetanol será que las cadenas polipeptídicas que conforman las proteínas analizadas sólo difieren en su peso molecular ya que han perdido las diferencias en cuanto a forma y carga (Figura 4.9). Se puede concluir que en una electroforesis desnaturalizante las proteínas se analizan como cadenas polipeptídicas que sólo difieren en su tamaño y, por ello, es el estudio indicado para determinar su peso molecular. Comúnmente se nombra este tipo de electroforesis como electroforesis SDS-PAGE. Se recomienda como lectura complementaria Nelson y Cox (2001).

La Figura 4.9 representa una proteína formada por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad tiene una estructura secundaria en la que se pueden reconocer zonas de hoja β plegada y de α hélice y, además, están plegadas sobre sí conformando su estructura terciaria. El tratamiento con SDS y 2-mercaptoetanol conduce a la separación de la proteína en dos subunidades (pérdida de la estructura cuaternaria), las que se observan desplegadas debido a la pérdida de su estructura terciaria y secundaria (se desarmaron las hélices y las hojas plegadas) y, además, cada cadena polipeptídica queda recubierta por pequeñas moléculas del detergente iónico con su carga negativa (-). Este efecto enmascara la carga propia que pueda tener cada cadena polipeptídica.

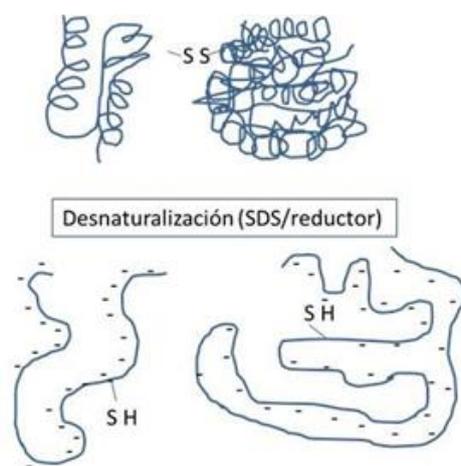


Figura 4.9. Esquema que representa la desnaturalización de una proteína hipotética. Representación del efecto desnaturalizante del SDS y 2-mercaptoetanol sobre una proteína formada por dos subunidades unidas mediante un puente disulfuro (-SS-). El símbolo (-) representa moléculas de SDS recubriendo las cadenas polipeptídicas desplegadas.

Una vez que se ha comprendido el efecto del tratamiento previo sobre la proteína se podrá deducir el comportamiento de esta misma proteína hipotética en una electroforesis nativa y en una electroforesis desnaturalizante (Figura 4.10):

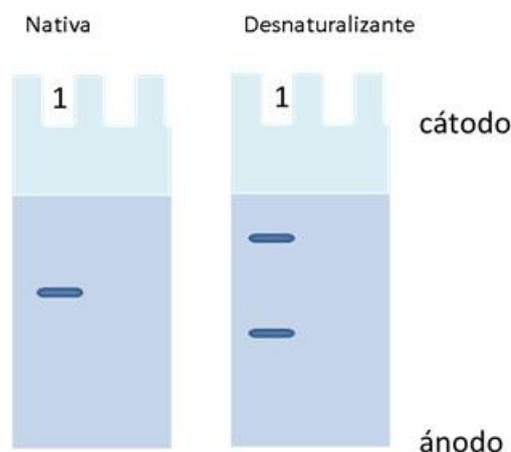


Figura 4.10. Análisis del resultado esperado para la proteína hipotética en una electroforesis nativa y en una desnaturalizante. El esquema representa una electroforesis nativa y una electroforesis desnaturalizante realizada para la proteína hipotética formada por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. El 1 indica el lugar donde se sembró la muestra. El extremo del gel que contiene el peine es el que está en contacto con el cátodo. El extremo inferior del gel es el que está en contacto con el ánodo. La proteína nativa y sus subunidades se comportaron como aniones ya que ingresaron al gel en dirección al ánodo.

En una electroforesis nativa la proteína hipotética dará lugar a una única banda cuya posición dependerá de la forma y la relación carga/masa en la proteína completa. A mayor carga mayor velocidad de migración mientras que a mayor peso molecular menor velocidad de migración. Se define que la velocidad de migración en una electroforesis nativa depende de la relación carga/masa de la proteína.

La misma proteína desnaturalizada da origen a dos cadenas polipeptídicas que presentan formas y cargas similares. La diferencia de velocidad de migración estará dada por el tamaño de cada cadena. La cadena más grande se moverá más lento y la cadena más pequeña migrará más rápido. En la electroforesis desnaturalizante las cadenas se separan según el peso molecular, es decir, en función de $1/\text{masa}$, ya que cuanto mayor sea la masa (el peso molecular) menor será la velocidad de migración. Se puede afirmar entonces que para determinar el peso molecular de una proteína se usará una electroforesis desnaturalizante.

Electroforesis de estado estacionario – Isoelectroenfoque

Un **isoelectroenfoque** es una electroforesis de estado estacionario. En este tipo de electroforesis las bandas migrarán sobre el gel hasta alcanzar una posición definitiva y a partir de ese momento permanecen fijas independientemente del tiempo que se aplique el campo eléctrico. Este comportamiento es diferente respecto a la electroforesis de zona, en la cual las bandas migran a velocidad constante hasta que se interrumpe la aplicación del campo eléctrico.

El isoelectroenfoque es un caso particular en el que la **separación de proteínas** se logra en función de su **punto isoelectroenfoque** bajo la acción de un campo eléctrico. Para comprender cómo funciona este método se necesitan repasar algunas características de las proteínas (Lectura recomendada Nelson y Cox, 2001):

- i- Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos unidos por uniones peptídicas. Los aminoácidos son anfóteros, es decir, poseen carga positiva y negativa en la misma molécula.
- ii- Las proteínas tendrán grupos cargados dependiendo de los aminoácidos que las componen.
- iii- Las cargas de las proteínas dependen del pH en el que se encuentran.
- iv- Cada proteína posee un punto isoelectroenfoque característico que corresponde al pH al cual la proteína tiene carga neta cero.

Como se ha mencionado anteriormente, en esta técnica las proteínas se separan según su punto isoelectroenfoque. Para ello se utiliza un gel de poli(acrilamida) especial, en el que se establece un gradiente de pH. Para generar el gradiente de pH existen diferentes métodos, basados en el uso de anfolitos o bien otros compuestos derivados del monómero acrilamida con grupos amino o carboxílicos capaces de captar o ceder protones. Actualmente los más utilizados son gradientes formados por los derivados de acrilamida, se agregan como sales y mediante la difusión de un ácido y una base desde los extremos opuestos del gel se logra el gradiente de pH inmovilizado. Este método de preparación del gradiente de pH permite mayor reproducibilidad y resolución en comparación al gradiente de pH generado por los anfolitos (Mikkelsen y Cortón, 2011). Actualmente, existen geles comerciales prefabricados con estos gradientes de pH inmovilizados, son altamente reproducibles y sólo se necesita hidratarlos en el momento de utilizarlos.

Para analizar la muestra, se siembra la mezcla de proteínas en un extremo del gel y se aplica el campo eléctrico. Cada proteína comenzará a migrar sobre el gel impulsada por su carga. Al avanzar sobre el gel, la carga de la proteína se va modificando en función del pH de la zona del

gel que va atravesando hasta llegar a la zona de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. En ese punto, la carga neta es cero y la proteína permanecerá inmovilizada. El pH en el cual se inmoviliza cada proteína corresponde a su punto isoeléctrico.

Los principales usos del isoelectroenfoque, son:

- 1- Determinar el punto isoeléctrico de una proteína.
- 2- Separar isoformas de proteínas.
- 3- Realizar el diagnóstico de enfermedades en humanos y en animales, en base a la detección de una isoforma particular de una proteína.
- 4- El isoelectroenfoque es frecuentemente la primera etapa de una Electroforesis Bidimensional (Electroforesis 2D), método que se utiliza para analizar muestras complejas de proteínas en el contexto de estudios proteómicos, tema que excede al objetivo de este libro. Se sugiere la lectura de Huerta-Ocampo y col. (2009) para profundizar estos contenidos.

Electroforesis para proteínas seguida de transferencia e inmunodetección - *Western Blot*

Se conoce como *Western Blot* a la técnica analítica utilizada para el estudio de proteínas que permite la detección de una proteína específica dentro de una muestra biológica. La especificidad del *Western Blot* se logra mediante el uso de anticuerpos que reconocen solamente a la proteína de interés. La unión entre una proteína y el anticuerpo que la reconoce es altamente específica, es la reacción fundamental de todas las respuestas inmunológicas, reacción antígeno-anticuerpo en la cual la proteína de interés es el antígeno.

Para realizar un *Western Blot* se debe comenzar con una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas de la muestra a analizar. En este caso es importante que se reserven calles del gel para sembrar marcadores de peso molecular, un control positivo y un control negativo para el anticuerpo que usaremos luego. Los marcadores de peso molecular serán varias proteínas purificadas y conocidas que permitirán estimar el peso molecular de la proteína de interés; el control positivo debe ser la proteína de interés que permitirá verificar el funcionamiento correcto del anticuerpo y el control negativo será una proteína que no se une al anticuerpo para descartar uniones inespecíficas.

Finalizada la electroforesis, el gel sin revelar se somete a una transferencia (Figura 4.11). El funcionamiento de la transferencia es similar a la electroforesis ya que se transfieren las proteínas cargadas negativamente desde el gel hacia un polo positivo (ánodo) de un campo eléctrico aplicado. Las proteínas separadas en el gel se difunden rápidamente en dirección al ánodo pasando por una hoja de nitrocelulosa donde quedarán adheridas en la misma posición que tenían sobre el gel. El proceso de transferencia se lleva a cabo durante un cierto tiempo que se define según el campo eléctrico aplicado, lo más frecuente suele ser 2 h a 100 mV para geles de 1,5 mm de espesor.

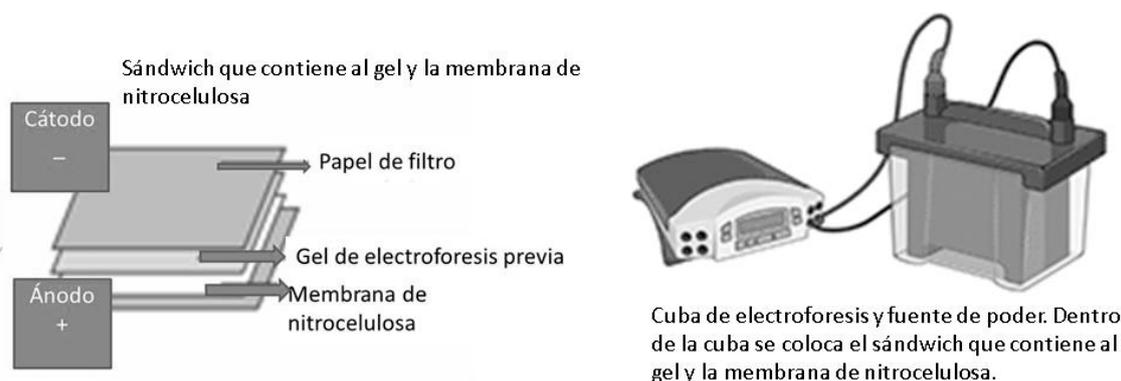


Figura 4.11. Transferencia de proteínas.

Para realizar la transferencia de las proteínas separadas en una electroforesis previa, se arma un sándwich respetando el siguiente orden: papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulosa y papel de filtro. Se acondiciona en el soporte adecuado y se coloca dentro de la cuba electroforética para aplicar el campo eléctrico necesario.

Finalizada la transferencia se realiza el revelado sobre la hoja de nitrocelulosa. El procedimiento de revelado se denomina inmunodetección, en la modalidad más generalizada requiere de dos reacciones inmunológicas consecutivas y consta de los siguientes pasos:

1- Bloqueo de la membrana

Para ello, se pone en contacto la membrana de nitrocelulosa con una solución de leche descremada durante un tiempo y en agitación. Las proteínas de la leche se unen a la membrana cubriendo espacios libres de modo que el anticuerpo no se adhiera en estas zonas.

2- Agregado del anticuerpo específico para reconocer a la proteína de interés.

Se agrega el anticuerpo específico que va a reaccionar con la proteína (reacción inmunológica antígeno-anticuerpo). Esta reacción es la primera reacción inmunológica sobre la membrana y por ello se denomina al anticuerpo específico anticuerpo primario. Se deja aproximadamente 1 h a temperatura ambiente para que se complete la reacción. Luego la membrana se lava para eliminar el anticuerpo que no se une específicamente.

3- Agregado de un segundo anticuerpo conjugado o marcado con una molécula reportera.

Se agrega sobre la membrana un segundo anticuerpo que reconoce específicamente al anticuerpo primario, por ello se denomina anticuerpo secundario. Se deja en contacto durante algunas horas. Nuevamente ocurre una reacción inmunológica por lo que es específica y altamente estable. El anticuerpo secundario queda unido al anticuerpo primario sobre la membrana de nitrocelulosa en los lugares donde se encuentra la proteína de interés. La Figura 4.12 representa un esquema de las reacciones inmunológicas que se necesitan en este tipo de revelado. El anticuerpo secundario debe tener conjugada (unida) una molécula reportera necesaria para el revelado. Finalizada la reacción se lava la membrana.

4- Detección del anticuerpo secundario.

La detección de la proteína de interés se logra gracias a una molécula reportera conjugada. La molécula conjugada puede dar lugar a una detección por fluorescencia, por quimioluminiscencia o por colorimetría.

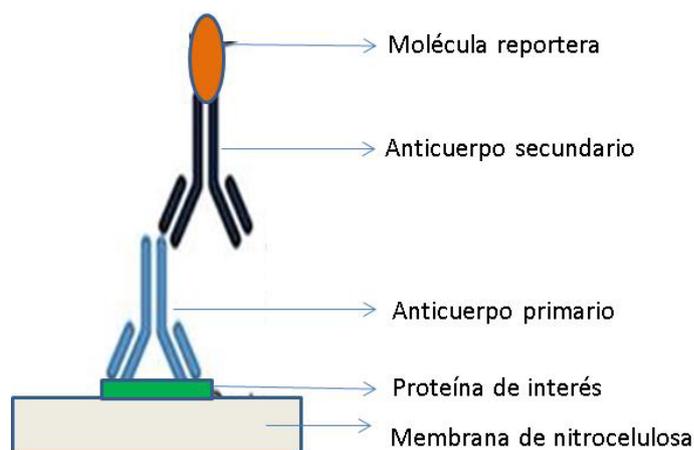


Figura 4.12. Representación de la reacción involucrada en la inmunodetección de un Western Blot

Electroforesis Capilar

Se han desarrollado muchas técnicas electroforéticas para ser realizadas en tubos capilares, entre ellas la más comúnmente utilizada es la electroforesis capilar de zona (ECZ). En términos generales, es una electroforesis pero que se lleva a cabo en columnas capilares. Algunos autores sugieren que se trata de una técnica híbrida entre una electroforesis y una cromatografía líquida de alta resolución (Mikkelsen y Cortón, 2011). La separación de analitos ocurre por la migración diferencial de especies cargadas a través de un medio fluido bajo la acción de un campo eléctrico. Dentro del capilar se encuentra una solución buffer que actúa como conductor de la corriente eléctrica y controla la carga de las sustancias a analizar. Como en toda electroforesis, la velocidad de migración de los analitos dependerá de las características propias (carga, masa y forma), de la intensidad del campo aplicado y de las características del medio en el que se produce el movimiento. Pero, en una electroforesis capilar, el movimiento de las especies se ve afectado por el fenómeno denominado electroósmosis.

La electroósmosis se genera a partir de la carga que posee la cara interna del capilar de sílice; esta carga es negativa y atrae a su superficie iones de carga opuesta generando una atmósfera catiónica en la interfaz entre la pared de sílice y la solución. Al aplicar el campo eléctrico la nube de iones positivos se desplaza en dirección al cátodo generando un flujo electroosmótico que va a influir en la movilidad electroforética de cada analito en particular. El flujo electroosmótico arrastrará a todos los analitos presentes en el medio, pero los cationes suman su propia velocidad y van más rápido. Los aniones restan su propia movilidad ya que se desplazan en dirección opuesta por lo tanto se desplazan más lentos y los analitos neutros se desplazan con la velocidad del flujo electroosmótico por lo que no podrán separarse entre ellos.

Para realizar una electroforesis capilar se requiere de un equipo sencillo formado por una fuente de alto poder para generar el campo eléctrico, ya que se necesitan voltajes elevados (kV),

dos recipientes para contener el buffer, un capilar recubierto con una protección de poliimida y un detector (Figura 4.13).

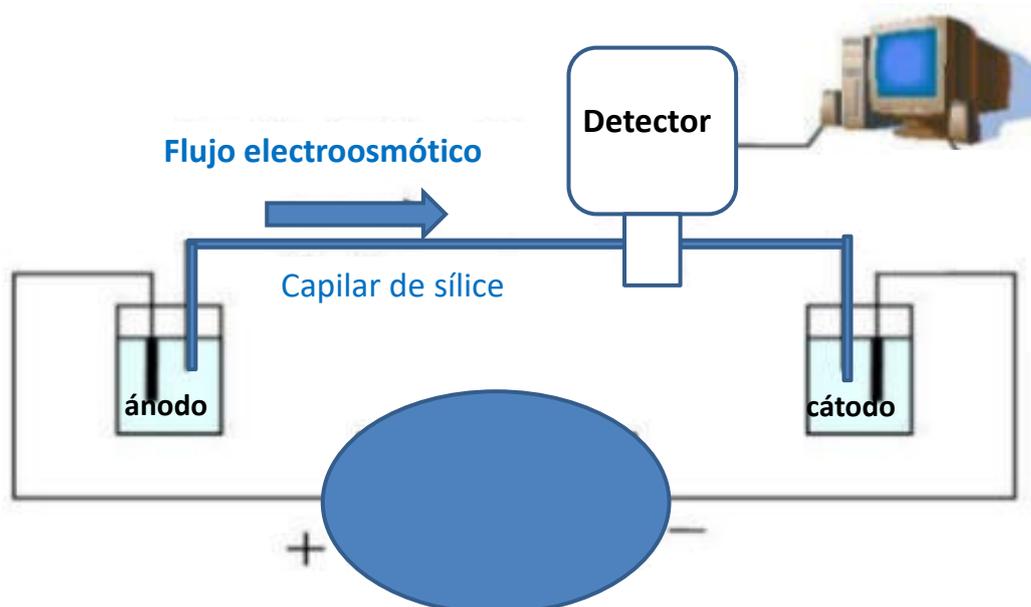


Figura 4.13. Esquema del equipo necesario para ECZ.

Fuente de alto voltaje (entre 10 a 30 kV) y dos compartimentos con el buffer de electroforesis donde están sumergidos los electrodos. Un capilar de 50 a 100 cm de largo cuyos extremos deben estar sumergidos en el ánodo y en el cátodo. Cerca del extremo catódico del capilar se ubica el detector asociado al adquisidor de datos para obtener el registro de la corrida electroforética. Las dimensiones del capilar facilitan la disipación del calor generado por la resistencia eléctrica del electrolito dentro del capilar.

Los volúmenes de muestra a inyectar en el equipo no deben afectar a la eficiencia del método, por lo que se trabaja con volúmenes muy pequeños tales que no ocupen más de un 1-2 % del volumen del capilar. Por este motivo, se requieren etapas de concentración de muestras para que resulte más fácil detectar a los analitos. El equipo trae un sistema de inyección de muestras que generalmente es por inyección hidrodinámica, el recipiente con la muestra (vial) se coloca en el extremo de ingreso al capilar y se aplica presión o bien se coloca en el extremo de salida y se hace vacío. En cuanto a los sistemas de detección, generalmente son medidas de absorbancia en la región ultravioleta-visible o bien por fluorescencia.

Reactivos y procedimiento para preparar en el laboratorio un SDS-PAGE para el análisis de proteínas

El protocolo de trabajo que se propone en este libro se basa en el procedimiento clásico de Laemmli (1970), al que se considera como el procedimiento estándar para esta técnica. La metodología propuesta es para electroforesis SDS-PAGE vertical con geles de 1,5 mm de espesor. Varios reactivos utilizados en las técnicas electroforéticas son tóxicos, cancerígenos, mutagénicos o neurotóxicos además de irritantes y corrosivos. Por este motivo, es muy importante antes de trabajar en el laboratorio con esta técnica, que el usuario se familiarice con la ficha de datos de seguridad correspondiente a cada uno de los compuestos químicos con los que va a trabajar

y que siempre utilice el material de seguridad adecuado: guantes, mascarillas, lentes protectores y campana extractora de gases cuando sea necesario. Otro punto importante a considerar desde el punto de vista de la seguridad en el laboratorio es el adecuado manejo de equipos de alto voltaje. Se debe prestar atención a trabajar siempre aislados de la corriente y manipular el equipo cuando está apagado.

Preparación de los buffer y soluciones necesarias

Buffer muestra 2X: Buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4 % m/v; glicerol 10 % v/v y 2-mercaptoetanol 10 %.

Buffer *stacking*: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Buffer de resolución: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Solución acrilamida/bisacrilamida: 30 % de acrilamida con 1 % de bisacrilamida. Se trabaja con barbijo, guantes y cuidadosamente.

Buffer de corrida 4X: Tris- HCl 0,2 M, glicina 1,5 M, SDS 0,4 %.

Solución de SDS al 20 %

Solución de APS al 10 %

Solución del colorante azul de Coomassie: 1 g de azul brillante Coomassie R250, 500 mL de etanol, 100 mL ácido acético y agua destilada hasta completar 1 L de solución. Esta solución puede reutilizarse varias veces.

Solución decolorante: 200 mL de etanol, 70 mL de ácido acético y agua destilada hasta completar 1 L de solución.

Preparación de las muestras para analizar mediante una electroforesis desnaturizante

A modo de ejemplo se propone trabajar con hojas jóvenes y senescentes de cebada y de maíz para preparar extractos que denominaremos CS y CJ para cebada y MS y MJ para maíz. La selección de hojas senescentes y jóvenes se puede realizar en base a la observación del color de las hojas o bien en base a la posición de la hoja en la planta. Las hojas superiores son las más jóvenes y las hojas inferiores serán las más senescentes.

Para obtener los extractos (muestras con proteínas a analizar) se cortan con un sacabocados 3 discos de hoja de 1 cm de diámetro y se colocan en un mortero de porcelana que se mantiene a baja temperatura (sobre hielo) junto con una mínima cantidad de cuarzo y 1,5 mL de buffer muestra 2X. Se homogeniza y trasvasa a un tubo pequeño con tapa (tubo tipo ependorff), se centrifuga a 10000 g y 4 °C. Se recupera el sobrenadante, se calienta a 100 °C durante 1 min para inactivar proteasas y se agregan 2 µL de azul de bromofenol. Las muestras estarán listas para sembrar en el gel. Es importante realizar la cuantificación de proteínas en el extracto obtenido ya que según cual sea la pregunta a resolver mediante la electroforesis, la cantidad de muestra a sembrar puede definirse por volumen de extracto o por concentración de proteínas en el extracto.

Armado del gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Se necesita armar un gel para realizar la electroforesis. Las recetas que se proponen a continuación corresponden al armado de un gel usando el molde para geles pequeños de 1,5 mm de espesor. Los equipos usados para geles pequeños se suelen denominar mini-protean.

Para armar el gel se debe colocar primero el gel de resolución, el que ocupará aproximadamente 2/3 del total del molde. Se espera el tiempo suficiente para que polimerice por completo el gel de resolución y sobre este se coloca el gel de *stacking* e inmediatamente el peine para moldear las calles. Se espera el tiempo necesario para que polimerice el *stacking* (Figura 4.6).

Gel de resolución 12 % de acrilamida

Para preparar 10 mL del gel se deben mezclar 2,3 mL de buffer de resolución, 4 mL de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 3,44 mL de agua bidestilada y 200 µL de SDS 20 %. Por último, se agrega 10 µL de TEMED y 54 µL de APS 10 %, se mezcla y se carga inmediatamente el molde del gel antes que comience la polimerización. Una vez cargado el gel de resolución, se puede cargar una fina película de butanol sobre el mismo para favorecer la polimerización.

Gel de *stacking*

Para preparar 5 mL del gel se deben mezclar 1,25 mL del buffer de *stacking*, 1 mL de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 2,55 mL de agua bidestilada, 100 µL de SDS 20 % y finalmente 5 µL de TEMED y 50 µL de APS 10 %. Se mezclan rápidamente y se carga en el molde.

Siembra de muestras y corrida electroforética

El gel polimerizado dentro del molde se coloca en la cuba de electroforesis. Se completa el sistema cargando buffer de corrida en el compartimento catódico y anódico. Con este paso, las calles del gel donde se siembran las muestras quedan completas con buffer. En cada calle se siembra un volumen de muestra que no supere la capacidad de la misma, suele ser un volumen máximo de 45 µL. Se observará que la muestra se deposita en el fondo de la calle. En general se coloca en una calle una muestra de referencia que permitirá controlar que el procedimiento fue adecuado durante toda la electroforesis. Lo más común es usar como referencia una mezcla de proteínas conocidas que serán las referencias de pesos moleculares. Finalizada la siembra de las muestras, se cierra el circuito colocando la tapa del equipo y conectándolo a la fuente de alto voltaje. Se programa una corrida a 100 V y se controla el avance de las bandas de migración para determinar el momento final de la electroforesis. Suele ser aproximadamente 2 h para el gel descrito (12 % de acrilamida y 1,5 mm de espesor).

Tinción y decoloración del gel

Finalizada la electroforesis, se interrumpe el campo eléctrico aplicado, se abre la cuba electroforética y se retira cuidadosamente el gel del interior del molde. Se coloca el gel en un recipiente y se lo cubre con la solución colorante. Se deja en contacto durante toda la noche. Finalmente se retira la solución colorante del recipiente y se reemplaza por la solución decolorante. Se mantiene en agitación y se reemplaza varias veces esta solución decolorante hasta que aparecen las bandas azules que corresponden a la tinción específica de las

proteínas. El gel puede escanearse para guardarlo como un archivo. Luego comienza la etapa de análisis de los resultados.

Análisis de los resultados

Una vez obtenido el perfil de proteínas para cada muestra se proponen tres actividades diferentes:

- 1- Análisis comparativo entre las proteínas de hojas jóvenes y senescentes para cada especie, cebada y maíz.
- 2- Análisis comparativo del perfil de proteínas entre maíz (especie de metabolismo C4) y cebada (especie con metabolismo C3).
- 3- Determinar el peso molecular de las bandas más abundantes y en base a datos bibliográficos de pesos moleculares tratar de identificar las subunidades de proteínas vegetales abundantes: RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa), proteínas vegetativas de almacenamiento foliares (VSP), etc.

Para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas en cada muestra se grafica una curva de calibración en base a los pesos moleculares conocidos de la mezcla de proteínas de referencia que se sembró en el gel. La curva de calibración se obtiene al graficar el log de la masa molecular aparente *versus* la distancia recorrida sobre el gel.

Ejemplos de aplicación de los métodos electroforéticos

Análisis de diferentes isoformas de la enzima glutamina sintetasa (GS) en hojas de cebada

Una enzima clave en el metabolismo de nitrógeno en plantas es la enzima glutamina sintetasa que cataliza la incorporación del amonio (nitrógeno inorgánico) como glutamina (aminoácido, nitrógeno orgánico) la que será utilizada para la interconversión de aminoácidos y posterior síntesis de proteínas. Los vegetales presentan varias isoformas de la enzima glutamina sintetasa, que presenta diferente localización dentro del tejido vegetal (cloroplásticas, citosólicas, específicas de tejido vascular) y diferente peso molecular. En hojas jóvenes la isoforma más abundante es GS cloroplástica (GS2), involucrada activamente en la asimilación de nitrógeno inorgánico proveniente de la nutrición mineral, mientras que en etapas de activa degradación de proteínas (senescencia foliar) aparece la isoforma citosólica (GS1) muy activa para reasimilar el amonio producido durante la proteólisis.

Para analizar las diferentes isoformas de la enzima GS en diferentes etapas del cultivo de cebada podemos obtener primero el perfil de proteínas mediante una electroforesis y luego, mediante inmunodetección, revelar las diferentes isoformas sobre el perfil de proteínas obtenido utilizando anticuerpos específicos que reconocen las isoformas GS1 o GS2 como anticuerpos primarios. Relacionado a este ejemplo de aplicación se sugiere la lectura de Avila-Ospina y col. (2015).

Análisis de los cambios en el perfil de proteínas de diferentes forrajes luego de una incubación con líquido ruminal de bovinos

Los forrajes aportan proteína dietaria a los animales. En el caso de rumiantes, un porcentaje de la proteína dietaria será fermentada en el rumen donde habitan microorganismos fermentadores con intensa actividad proteolítica y degradarán la mayor parte de las proteínas transformándolas en péptidos y aminoácidos. Una parte de la proteína dietaria llegará al intestino del animal sin sufrir modificaciones; a esta porción de proteínas se la denomina proteínas no degradables. Se pueden analizar los cambios que produce el líquido ruminal sobre el perfil inicial de proteínas de un forraje para estimar el porcentaje de proteína no degradable que contiene. Esta información se puede sumar para facilitar la formulación de dietas basadas en las proteínas metabolizables y absorbibles para los animales (Slanac y col., 2014). Para ello, se puede realizar una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en la que se compare el perfil de proteínas del forraje inicial con el perfil de proteínas del mismo forraje luego de ser incubado en contacto con líquido ruminal del animal. Se sugiere la lectura de Slanac y col. (2014).

Referencias

- Avila-Ospina, L., Marmagne, A., Talbotec, J., Krupinska, K. y Masclaux-Daubresse, C. (2015). The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 66(7), 2013-2026.
- García Trejo, J.J. y Ortega, R. (2021). Historia, fundamentos y métodos de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. *Mensaje bioquímico*, 45, 90-108. Recuperado de <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Huerta-Ocampo, J.A., Briones-Cerecero, E.P., Mendoza-Hernández, G., De León Rodríguez, A. y Barba de la Rosa, A.P. (2009). Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Science*, 170, 990-998.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Mikkelsen, S. R. y Cortón, E. (2010). Capítulo 11 Isoelectroenfoque. En *Química Bioanalítica* (pp. 263-274). Eudeba.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2001). *Principios de Bioquímica*. Omega.
- Slanac, A.L., Sgroppo, S.C., Kucseva, C.D. y Balbuena, O. (2014). Digestión ruminal. Caracterización electroforética de proteínas de la “paja amarilla” (*Sorghastrum setosum*) incubada en rumen de bovinos. *Revista Veterinaria*, 25(2), 120-125.