

PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES VERDES Y AZULES

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento los estudiantes aprenderán a purificar parcialmente proteínas fluorescentes verdes y azules. Como actividad opcional, los estudiantes podrán determinar el peso molecular de las proteínas por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida-SDS.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Extracto celular conteniendo proteínas verdes (GFP)	Congelador
Extracto celular conteniendo proteínas azules (BFP)	Congelador
Tampón elución columna (10X)	Congelador
Marcador estándar de proteínas	Congelador
Solución glicerol 50%	Congelador
Matriz seca	Temperatura ambiente
Solución desnaturante de proteínas	Congelador
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Temperatura ambiente
Hojas de Protein InstaStain	Temperatura ambiente
Columnas cromatográficas	Temperatura ambiente

2.1 Material requerido y no suministrado

- Micropipetas automáticas y puntas (5-50 microlitros).
- Balanza.
- Pipetas de 1 ml.
- Microtubos.
- Agua destilada.
- Soporte y pinzas para aguantar las columnas.
- Hielo picado.
- Linterna de luz UV de onda alta.
- Aparato de electroforesis vertical para proteínas (opcional).
- Fuente de energía para la electroforesis (opcional).
- Ácido acético glacial (opcional).
- Metanol (opcional).
- 3 geles de poliacrilamidas* (opcional).

* Los geles de poliacrilamida no están incluidos para la parte de electroforesis de este experimento. El experimento está designado para que 2 grupos de estudiantes compartan un gel.

3. INTRODUCCIÓN

La bioluminiscencia a partir de microorganismos marinos ha sido observada por muchos visitantes en verano a varias playas alrededor del mundo. Esta bioluminiscencia es producida por *Aequorea victoria* o gelatina cristal que es una medusa. Esa luz producida es transducida a verde por la proteína verde fluorescente (GFP) que se encuentra localizada en unas células fotogénicas especiales. Hay varias variantes de proteínas GFP que han sido producidas por ingeniería genética y que hacen muy atractivos los experimentos de laboratorio para estudiantes. Un excelente compañero de la GFP es la proteína azul fluorescente (BFP) que ha sido clonada y bien caracterizada.

Cuando estas proteínas fluorescentes han sido clonadas y expresadas no requieren sustratos, cofactores u otros genes, y al ser expuestas a una luz U.V. emitirán una luz verde o azul brillante, claramente visible en bacterias que han sido transformadas por plásmidos que contienen los genes para *gfp* o *bfp*. Por esa misma propiedad, su purificación es simple ya que está basada en la fluorescencia.

La proteína verde fluorescente tiene 238 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 40.000 daltons. El cromóforo responsable de la emisión de la luz se encuentra en la estructura primaria de la proteína y reside en un tripéptido en las posiciones 65 a 67 (Ser-Tyr-Gly).

La proteína azul fluorescente es una variante derivada de la *bfp*. Tiene una sustitución de un aminoácido en la posición 66 (Tyr a His) y una segunda sustitución en el aminoácido 145 (Tyr a Phe).

La técnica de la cromatografía es muy eficaz para la separación de mezclas de proteínas de diferentes tamaños y formas.

Este experimento se basa en la **cromatografía de filtración en gel**, que separa las moléculas según su tamaño y forma, y se correlaciona con sus pesos moleculares. La filtración en gel se realiza como procedimiento previo a la purificación de las proteínas. El componente básico de esta filtración, es una matriz de perlas microscópicas, situada dentro de una columna de cromatografía y un tampón de elución. La matriz es el material que permitirá la separación de las proteínas. La columna es un tubo con una membrana porosa en la parte inferior, que soporta y retiene la matriz. Esta membrana permite el paso del tampón así como de los solutos disueltos. El tampón de elución es la fase móvil de la cromatografía y fluye a través de la matriz de la columna. Las proteínas de la muestra son transportadas por el flujo del tampón y se separarán gradualmente.

Las columnas se empaquetan con la matriz que debe mantenerse siempre hidratada para evitar fisuras. La matriz consiste en unas perlas microscópicas que contienen poros y canales internos por donde quedan entretenidas las moléculas que entran en las perlas al ser transportadas por el tampón de elución. Las moléculas grandes no pueden entrar en las perlas y fluyen a su alrededor. Así pues, las moléculas grandes eluyen de la columna antes que las moléculas pequeñas.

En esta cromatografía de filtración la forma de las moléculas también influye en el momento de su recorrido entre las perlas de la matriz.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En este experimento, extractos celulares conteniendo proteínas gfp o bfp serán fraccionados por cromatografía utilizando una matriz de tamiz molecular. Los factores que afectan en la separación incluyen el tamaño, forma y residuos de carbohidrato asociados. Las proteínas fluorescentes serán detectadas en las columnas y posteriormente en los tubos test bajo una luz U.V. Para muchas proteínas. Estas columnas pueden ser utilizadas para determinar el aparente peso molecular. Para una exacta estimación de la composición y tamaño de las proteínas se debe realizar un análisis de las fracciones que contiene la proteína de interés mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida.



4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.
5. Extremar las precauciones al utilizar equipos de laboratorios eléctricos.

4.2 Preparaciones Previas

TAMPÓN DE ELUCIÓN DE LA COLUMNA

Mezclar 30 ml del Tampón de elución de la columna 10X (C) con 270 ml de agua destilada. Marcar este tampón como Tampón de elución de la columna 1X.

PREPARACIÓN DEL "SLURRY"

1. Hidratar la matriz en polvo E (Sephadex) en 40 ml tampón de elución de la columna 1X.
2. Dejar en incubación durante 30-60 minutos y ocasionalmente agitar suavemente.
3. Alicuotar 6 ml de suspensión de matriz hidratada para cada uno de los 6 grupos.

PREPARACIÓN EXTRACTOS CELULARES QUE CONTIENEN LAS PROTEÍNAS GFP O BFP.

1. Descongelar los extractos congelados (A y B) a temperatura ambiente e inmediatamente colocarlos en hielo.
2. Marcar 6 tubos "gpf". Alicuotar 220 µl en cada tubo. Colocarlos inmediatamente en hielo.
3. Marcar 6 tubos "bpf". Alicuotar 220 µl en cada tubo. Colocarlos inmediatamente en hielo.

CADA GRUPO REQUIERE PARA LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y PURIFICACIÓN PARCIAL:

1. 1 Columna cromatográfica.
2. 1 Soporte para aguantar la columna con pinzas u otro dispositivo.
3. 8 microtubos test
4. 6 ml de suspensión de matriz hidratada.
4. 40 ml Tampón de elución de la columna 1X.
5. 220 µl extracto "gfp".
6. 220 µl extracto "bfp"
7. 75 µl de Solución de desnaturalización de proteínas (F).
8. 75 µl de Solución de glicerol 50% (G).
9. Micropipeta automática y puntas.
10. Pipetas de 5ml.

5. PRÁCTICA

1) PREPARACIÓN DE LA COLUMNA Y CROMATOGRAFÍA

La carga de la columna y la siguiente elución se realizará a temperatura ambiente. Los tampones de elución y las fracciones recolectadas serán almacenadas en hielo una vez salen de la columna.

1. Montar verticalmente la columna sobre un soporte con anillo o pinzas u otro dispositivo similar de laboratorio para mantenerla verticalmente.
2. Retirar el tapón de la parte superior de la columna y aflojar un poco el de la parte inferior. Llenar la columna 1,5 ml del Tampón de elución 1X.
3. Mezclar la suspensión de matriz hidratada suavemente.
4. Cuidadosamente pipetear o añadir la suspensión de matriz hidratada (6 ml) en la columna dejando que caiga por la pared interior de la columna. Si el flujo se detiene por una bolsa de aire, dejar de añadir la suspensión y golpear firmemente la columna hasta que se elimina el aire y la suspensión continúa fluyendo hacia abajo de la columna.
5. Coloque un vaso vacío debajo de la columna para recoger el tampón de lavado.
6. Retirar el tapón de la parte inferior y permitir que la matriz quede empaquetada en la columna.
7. Lavar la columna ya empaquetada con 5 ml de Tampón de elución 1X. Recoger el tampón en el vaso de precipitado.
8. Colocar el tapón de la parte inferior y asegurarse que no gotea

NO permitir que la columna se seque, si es preciso hidratarla con Tampón de elución 1X.

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES VERDES Y AZULES

RECOLECTAR LAS FRACCIONES DE PROTEÍNAS GFP

1. Marcar la primera serie de 8 microtubos (1-8).
2. Lentamente añadir a la columna 0,20 ml del extracto de GFP. Permitir que el extracto entre completamente en la columna. Quitar el tapón inferior.
3. Eluir la columna con el Tampón de elución 1X. Añadir lentamente el tampón, añadir varias gotas a la vez para evitar diluir las muestras proteicas.
4. Fijarse en las marcas de la pared de los microtubos para recolectar fracciones de 0,5 ml.
5. Guardar las fracciones en hielo inmediatamente después de la recolección.
6. Comprobar todas las fracciones mediante una linterna de luz UV de onda alta para identificar que microtubo contiene las proteínas fluorescentes.
7. **OPCIONAL:** Guardar a -20°C las fracciones que contienen las proteínas GFP para su posterior análisis mediante electroforesis en gel-SDS.

NO PERMITIR QUE LA COLUMNA SE SEQUE.

RECOLECTAR LAS FRACCIONES DE PROTEÍNAS BFP

1. Lavar la columna con 10 ml de Tampón de elución 1X.
2. Marcar una segunda serie de 8 microtubos (9-16). Repetir los pasos de 2 a 5 con 0,2 ml del extracto BFP. Conservar las fracciones de 0,5 ml en hielo inmediatamente después de la recolección.
3. **OPCIONAL:** Guardar a -20°C las fracciones que contienen las proteínas BFP para su posterior análisis mediante electroforesis en gel-SDS.

NO UTILIZAR UNA LINTERNA DE LUZ UV DE ONDA BAJA (UTILIZADA PARA ADN) YA QUE PUEDE CAUSAR QUEMADURAS Y DAÑO A LOS OJOS.

2) ELECTROFORESIS PROTEÍNAS- OPCIONAL

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

Preparar el tampón de electroforesis añadiendo 1 parte de Tris-Glycine-SDS concentrado a 9 partes de agua destilada.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

1. Identificar el microtubo con la mayor cantidad de fluorescencia de la proteína GFP. Transferir 200 μ l en un microtubo y marcar "GFP nativa" y otros 200 μ l en otro microtubo marcado como "GFP desnaturalizada".
2. Identificar el microtubo con la mayor cantidad de fluorescencia de la proteína BFP. Transferir 200 μ l en un microtubo y marcar "BFP nativa" y otros 200 μ l en otro microtubo marcado como "BFP desnaturalizada".

A) PREPARACIÓN PROTEÍNAS NATIVAS (SIN HERVIR)

La proteína en su forma nativa puede mostrar fluorescencia con una linterna de luz UV de onda larga.

3. Añadir 25 μ l de glicerol 50% (G) a cada tubo marcado como "GFP nativa" y "BFP nativa".
4. Mezclar y guardar los tubos para la posterior electroforesis.

B) PREPARACIÓN PROTEÍNAS DESNATURALIZADAS (HERVIR)

Desnaturalizar las proteínas eliminará la fluorescencia.

5. Para desnaturalizar las muestras de proteínas, añadir 25 μ l de solución desnaturalizante de proteínas (F) a cada tubo marcado como "GFP desnaturalizada" y "BFP desnaturalizada". La solución desnaturalizante (F) contiene SDS y 2-mercaptoetanol.
6. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, llevar a ebullición.
7. Asegurarse que los microtubos están bien tapados, utilizar los microtubos con tapón a rosca y marcarlos. La parte inferior de los microtubos deben ser empujados a través del papel de aluminio y estar inmersos en **agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se deberían mantener suspendidos por el papel de aluminio. Se puede también utilizar para ello algún sistema de laboratorio para hacer flotar las muestras.
8. Permitir que los tubos se enfríen a temperatura ambiente durante algunos minutos.
9. Proceder con la electroforesis de proteínas.

C) DESNATURALIZAR LOS MARCADORES ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS

Una vez rehidratados, el microtubo de los marcadores estándar (D) contiene bastante material para cargar 6 pocillos. El microtubo puede ser hervido conjuntamente con los extractos GFP desnaturalizados.

1. Añadir 130 μl de agua destilada al microtubo de los standard de peso molecular de proteínas (D) y permitir que el material se rehidrate durante varios minutos. Vórtex o mezclar vigorosamente.
2. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, llevar a ebullición.
3. Asegurarse que los microtubos están bien tapados, utilizar los microtubos con tapón a rosca y marcarlos. La parte inferior de los microtubos deben ser empujados a través del papel de aluminio y estar inmersos **en agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se debería mantener suspendidos por el papel de aluminio. Se puede también utilizar para ello algún sistema de laboratorio para hacer flotar las muestras.
4. Pida a los estudiantes cargar las muestras en el gel de poliacrilamida, mientras que las muestras están todavía calientes para evitar la agregación. El volumen de muestra a cargar es de 20 μl .
5. Conservar las muestras no utilizadas a -20°C y repetir los pasos 2 y 3 cuando se vuelvan a utilizar.

CARGA O SIEMBRA DE LAS MUESTRAS DE LAS PROTEÍNAS

Cambiar la punta de pipeta para la siembra de cada muestra. 2 grupos de estudiantes pueden compartir un gel.

Las muestras deberían ser cargadas o sembradas de la siguiente manera:

1^{er} grupo de estudiantes:

Pocillo 1	20 μl marcador estándar de proteínas	Hervido 5 minutos
Pocillo 2	20 μl "GFP nativa"	No hervido
Pocillo 3	20 μl "GFP desnaturalizada"	Hervido 5 minutos
Pocillo 4	20 μl "BFP nativa"	No hervido
Pocillo 5	20 μl "BFP desnaturalizada"	Hervido 5 minutos

2^o grupo de estudiantes:

Pocillo 6	20 μl marcador estándar de proteínas	Hervido 5 minutos
Pocillo 7	20 μl "GFP nativa"	No hervido
Pocillo 8	20 μl "GFP desnaturalizada"	Hervido 5 minutos
Pocillo 9	20 μl "BFP nativa"	No hervido
Pocillo 10	20 μl "BFP desnaturalizada"	Hervido 5 minutos

CORRER EL GEL

Configurar la fuente de energía al voltaje deseado y correr el gel. **Se recomiendan 125 voltios durante 60-75 minutos.**

TINCIÓN DEL GEL CON "PROTEIN INSTASTAIN"

Los geles de poliacrilamida pueden ser teñidos de una forma muy fácil con las hojas de Protein Instastain. La tinción es rápida, sensible y los geles están listos para su visualización en 1-3 horas.

Los geles de poliacrilamida son muy finos y frágiles. Tener cuidado al manipular el gel para evitar que se rompa.

1. Añadir aproximadamente 100 ml de Solución de fijación en una pequeña bandeja.

Solución de fijación:

50 ml metanol; 10 ml ácido acético glacial; 40 ml agua destilada.

2. Transferir la placa posterior del casete con el gel en la bandeja de la solución de fijación. Humedecerse los dedos protegidos con guantes con solución fijadora y suavemente empujar el gel de la placa posterior y retire la placa, dejando el gel sumergido en la solución fijadora.

3. Flotar suavemente una hoja de Protein Instastain con la cara azul en el líquido. Retirar la hoja de Protein Instastain después de 30 minutos.

4. Cubrir la bandeja de tinción para prevenir la evaporación.

5. Suavemente agitar en algún dispositivo de laboratorio durante 1-3 horas o toda la noche.

6. Después de la tinción, las bandas de proteínas aparecerán de un color azul medio a oscuro.

El gel se puede desteñir si el "background" es demasiado oscuro mediante varios lavados con solución fijadora nueva.

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

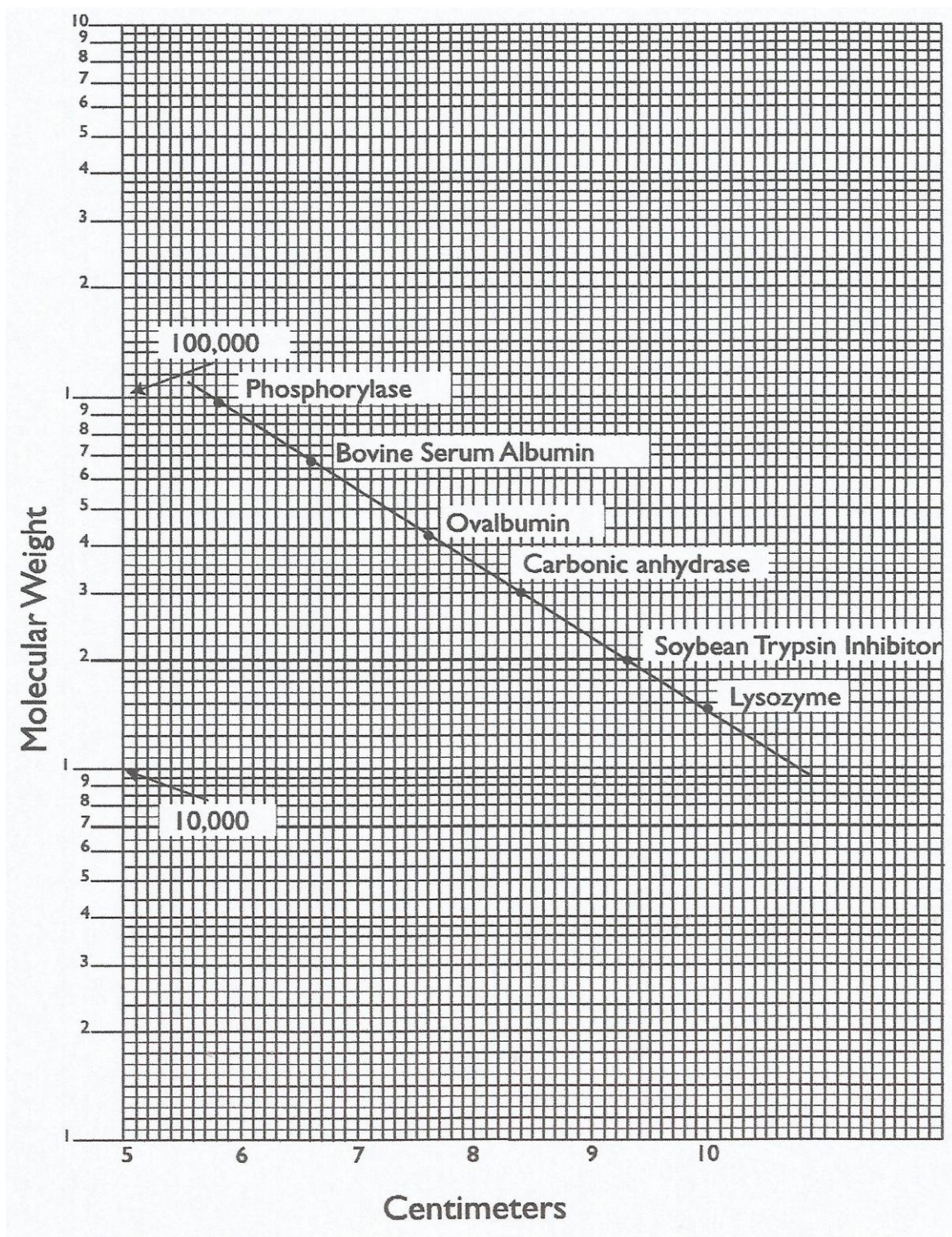


Figura 1

En este ejemplo los estándares son: 94.000; 67.000; 38.000; 30.000; 20.000; 14.000.

Si las medidas se realizan directamente del gel, omitir los pasos 1 y 2.

1. Tome una hoja transparente, por ejemplo de acetato de celulosa (utilizado con proyectores) y colócala sobre el gel.
2. Con un rotulador, trazar cuidadosamente los contornos de los pocillos de muestras. A continuación, marcar todas las bandas de proteínas sobre el gel.
3. Medir la distancia de migración, en centímetros (al milímetro más cercano) de cada banda principal en el gel. Ignorar las bandas débiles, todas las mediciones deben ser desde la parte inferior del pocillo a la parte inferior de la banda de proteína.
4. Utilizando papel semilogarítmico, trazar la distancia de migración (o R_f) de cada proteína estándar en el eje x , no logarítmico, frente a su peso molecular en el eje y , logarítmico. Elija sus escalas de manera que los puntos de datos estén bien repartidos. Suponga que el segundo ciclo en el eje y representa 10,000 a 100,000 (ver el ejemplo de arriba, figura 1).
5. Dibuje la mejor línea recta promedio a través de todos los puntos. Esta línea debe tener más o menos el mismo número de puntos dispersos en cada lado de la línea. A modo de ejemplo, ver la figura 1. Este método es una aproximación lineal.
6. Usando su gráfico, determinar el peso molecular de las tres proteínas desconocidas. Esto se puede hacer mediante la búsqueda de la R_f (o distancia de migración) de la banda desconocida en el eje x , dibuje una recta vertical hasta que se cruza con la línea de los marcadores estándar. Una línea recta se hace entonces a través de la intersección con el eje y de forma que se puede determinar el peso molecular aproximado.

