

## ELECTROFORESIS VERTICAL DE PROTEÍNAS

6 grupos de estudiantes

### 1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es desarrollar una comprensión de la estructura de las proteínas y determinar el peso molecular de proteínas desconocidas, preteñidas, mediante **ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA**.

### 2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Marcador de Proteínas estándar A	Congelador
Proteína desconocida preteñida #1	Congelador
Proteína desconocida preteñida #2	Congelador
Proteína desconocida preteñida #3	Congelador
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Tª ambiente
Tinción de proteínas FlashBlue –polvo-	Tª ambiente
Solución de carga para practicar	Tª ambiente
Pipetas de transferencia	Tª ambiente

## 2.1 Material requerido y no suministrado

- Aparato de electroforesis vertical para proteínas.
- Fuente de energía para la electroforesis.
- 3 geles de poliacrilamidas-SDS 12%.
- Placa calefactora
- Micropipetas automáticas y puntas.
- Vasos de precipitados.
- Microtubos.
- Agua destilada
- Papel de aluminio.
- Transiluminador de luz blanca.
- Vinagre blanco -ácido acético glacial-.
- Ethanol (>95%).
- Vaso de precipitados de 750 ml – 1 Lt
- Regla.
- Tijeras.
- Espátulas.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son una clase muy diversificada de biomoléculas. Las diferencias en sus propiedades químicas, como la carga, la forma, el tamaño y la solubilidad, les permiten realizar muchas funciones biológicas. Estas funciones incluyen la catálisis enzimática, la regulación metabólica, la unión y el transporte de moléculas pequeñas, la regulación genética, la defensa inmunológica y la estructura celular.

La determinación del peso molecular de una proteína es de una fundamental importancia para su caracterización bioquímica. Si es conocida la composición de la secuencia de aminoácidos, entonces puede ser calculado el peso molecular de forma exacta. Este hecho, asume que la proteína no contiene ningún grupo químico (hemo, zinc, enlaces covalentes, carbohidratos, etc) y que la cantidad de estos grupos, si están presente, también es conocida.

La electroforesis en gel de SDS, es una herramienta utilizada comúnmente para obtener estimaciones moleculares aproximadas de los polipéptidos desnaturalizados. Otras técnicas para la determinación precisa de los pesos moleculares incluyen la ultracentrifugación analítica y la dispersión de luz. Cabe destacar que, estos métodos, requieren grandes cantidades de proteínas altamente purificadas además de equipos costosos y sofisticados.

Una proteína puede tener una carga neta negativa o positiva, dependiendo de la composición de los aminoácidos que la componen y del pH. En soluciones a ciertos valores de pH, la molécula de proteína puede ser eléctricamente neutra, compensándose las cargas negativas con las cargas positivas. En este caso, la proteína es isoeléctrica. En presencia de un campo eléctrico, las proteínas con cargas netas migrarían hacia los electrodos con cargas opuestas.

Las proteínas presentan muchas formas tridimensionales y patrones de plegamiento diferentes, que están determinados por su secuencia de aminoácidos y su procesamiento intracelular. La configuración tridimensional precisa de una proteína es fundamental para su función. Las proteínas tienen formas esféricas, elípticas o en forma de varilla. El peso molecular es una función de la cantidad y el tipo de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Las proteínas pueden constar de un solo polipéptido o de varios polipéptidos asociados específicamente entre sí. Las proteínas que se encuentran en sus formas normales y biológicamente activas se denominan nativas.

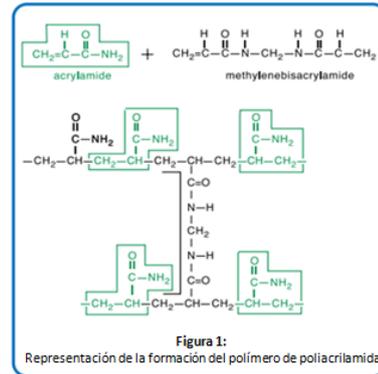
Las propiedades de las proteínas afectan la forma en que migran en gel durante la electroforesis. Los geles utilizados en la electroforesis (por ejemplo, la poli(acrilamida)) consisten en poros microscópicos de un rango de tamaño definido que actúan como un tamiz molecular. Solo las moléculas con carga neta migrarán a través del gel cuando esté en un campo eléctrico. Las moléculas pequeñas pasan a través de los poros con mayor facilidad que las grandes. Las moléculas que tienen más carga que otras de la misma forma y tamaño migrarán más rápido. Las moléculas de la misma masa y carga pueden tener formas diferentes. En este caso, las que tienen una forma más compacta, como una esfera, migrarán a través del gel más rápidamente que las que tienen una forma alargada, como una varilla. En resumen, la densidad de carga y la carga, el tamaño y la forma de una proteína

nativa afectan a sus tasas de migración electroforética. La electroforesis de proteínas nativas es útil en el análisis clínico e inmunológico de fluidos biológicos complejos, como el suero pero no es confiable para la estimación de los pesos moleculares de estas proteínas.

### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se forman mezclando el monómero acrilamida, el agente de reticulación, metilbisacrilamida; y un generador de radicales libres, el persulfato de amonio en un tampón acuoso. Se produce la polimerización de los radicales libres de la acrilamida. En varios puntos, los polímeros de acrilamida se unen entre sí mediante la metilbisacrilamida (Figura 1).

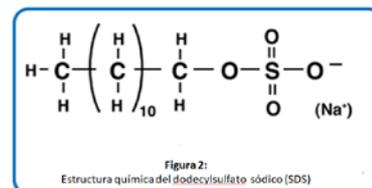
El tamaño del poro de los geles de poliacrilamida está controlado por su concentración en el gel y la cantidad del agente de reticulación (polimerizante) metilbisacrilamida. La movilidad electroforética de las proteínas está afectada por la concentración del gel. Una elevada de concentración de acrilamida presente en un gel se utiliza cuando resulta de interés la separación de proteínas de bajo peso molecular presentes en una muestra (polipéptidos pequeños).



Por otra parte, los geles de poliacrilamida también puede prepararse de forma que exista un gradiente de concentración de acrilamida a lo largo del gel. Generalmente, la parte superior del gel (lugar en el que se encuentran los pocillos de carga de la muestra) tiene una concentración de acrilamida del 5% y esta aumenta gradualmente hacia la zona inferior del gel hasta alcanzar un porcentaje de acrilamida del 20%. Los geles en gradiente de concentración de acrilamida, se utilizan para la separación de mezclas de proteínas cuyos pesos moleculares cubren un extenso rango. Los geles de concentración homogénea, que son los que se utilizan en el desarrollo de este kit experimental, son mejores para lograr separaciones de proteínas que ocupan rangos estrechos de pesos moleculares.

Cabe señalar que la acrilamida es una neurotoxina y puede absorberse a través de la piel. Sin embargo, en forma de poliacrilamida polimerizada no es tóxica. El proceso de polimerización se inhibe en presencia de oxígeno. Por lo tanto, los geles de poliacrilamida se preparan generalmente entre dos placas de vidrio separadas por tiras llamadas espaciadores. A medida que la mezcla de polimerización de acrilamida líquida se vierte entre las placas, se desplaza el aire y la polimerización avanza más rápidamente.

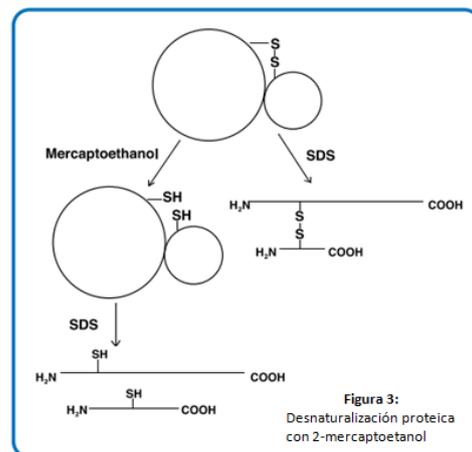
El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que consiste en una cadena de hidrocarburo unida a un grupo sulfato con carga altamente negativa, como se muestra en la Figura 2.



El SDS se une fuertemente a la mayoría de las

proteínas y hace que se desplieguen en una cadena aleatoria con forma de varilla. En este proceso no se rompen los enlaces covalentes. Por lo tanto, la composición y secuencia de aminoácidos permanece igual. Dado que su forma tridimensional específica se elimina, la proteína ya no posee actividad biológica. Las proteínas que han perdido sus patrones de plegamiento específicos y su actividad biológica, pero que mantienen intactas sus cadenas polipeptídicas, se denominan desnaturalizadas.

Las proteínas que contienen varias cadenas polipeptídicas que están asociadas únicamente por fuerzas no covalentes se disocian por acción del SDS en cadenas polipeptídicas separadas y desnaturalizadas. Las proteínas pueden contener enlaces cruzados covalentes conocidos como enlaces disulfuro. Estos enlaces se forman entre dos residuos de aminoácidos de cisteína que pueden estar ubicados en la misma cadena polipeptídica o en cadenas polipeptídicas diferentes. Las concentraciones altas de agentes reductores, como el  $\beta$ -mercaptoetanol, pueden romper los enlaces disulfuro. Esto permite que el SDS disocie y desnaturalice completamente la proteína. Las proteínas que conservan sus enlaces disulfuro se unen a menos moléculas de SDS, lo que causa una migración anómala. La Figura 3 ilustra estas ideas con una proteína que contiene dos cadenas polipeptídicas de diferente tamaño que están unidas por un enlace disulfuro. Las cadenas también están asociadas por fuerzas no covalentes. Los círculos representan la estructura nativa.



Ciertas proteínas de membrana forman complejos con el SDS pero estos no contienen la relación adecuada de detergente, dando lugar a velocidades de migración anómalas. Asimismo, las proteínas con un elevado nivel de glicosilación tienen un comportamiento de migración anómalo, particularmente si los residuos de carbohidratos contienen grupos con carga. Cabe señalar que el SDS no interactúa con polisacáridos ni ácidos nucleicos.

En la mayoría de los casos, el SDS se une a las proteínas en una proporción constante de 1,4 gramos de SDS por gramo de proteína. En promedio, el número de moléculas de SDS unidas es la mitad del número de residuos de aminoácidos en el polipéptido. La carga negativa debida al SDS es mucho mayor que las cargas negativas y positivas de los residuos de aminoácidos. La gran cantidad de SDS unido, enmascara de manera eficiente las cargas intrínsecas en la proteína. En consecuencia, las proteínas desnaturalizadas con SDS son netamente negativas y, dado que la unión del detergente es proporcional a la masa de la proteína, la relación carga/masa de la proteína es constante. Además, las formas de las proteínas desnaturalizadas con SDS son las mismas (similares a bastoncillos). El tamaño de las cadenas similares a bastoncillos es la única diferencia física importante entre las proteínas desnaturalizadas con SDS. Cuanto mayor sea el peso molecular de la proteína, más larga será la cadena en forma de varilla. Los poros del gel distinguen estas diferencias de tamaño.

Durante la electroforesis en SDS, la proteína migra a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad inversamente proporcional a su peso molecular. En otras palabras, cuanto más pequeña es la proteína, más rápido migra. El peso molecular de la "proteína desconocida" se obtiene comparando su posición después de la electroforesis con las posiciones de las proteínas estándar desnaturalizadas con SDS, sometidas en paralelo a la electroforesis utilizando el mismo gel. Los pesos moleculares de las proteínas estándar se han determinado previamente. Después de visualizar las proteínas mediante tinción, se mide su distancia de migración. El logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas estándar se representa gráficamente en función de su distancia de migración. Tomando el  $\log_{10}$  o el  $R_f$  se pueden representar gráficamente algunos de los datos como una línea recta. A continuación, se calcula el peso molecular de una proteína desconocida a partir de la curva estándar.

#### ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS EN UNA MUESTRA:

Los marcadores estándar de proteínas (Figura 4, pocillos 1 y 6), son una mezcla de proteínas que tienen los siguientes pesos moleculares una vez desnaturalizadas: 94000; 67000; 38000; 30000; 20000; y 14000 Daltons. Los valores desnaturalizados se han redondeado para facilitar el análisis gráfico.

Las muestras de proteínas han sido desnaturalizadas con el detergente aniónico duodecilsulfato sódico (SDS). En las condiciones experimentales, las proteínas tendrán una movilidad en el gel que es inversamente proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares. Las proteínas de pesos moleculares conocidos se separarán en la electroforesis en paralelo y se utilizarán para estimar los pesos moleculares de las proteínas que contienen las muestras de estudio por medio del análisis del gráfico.

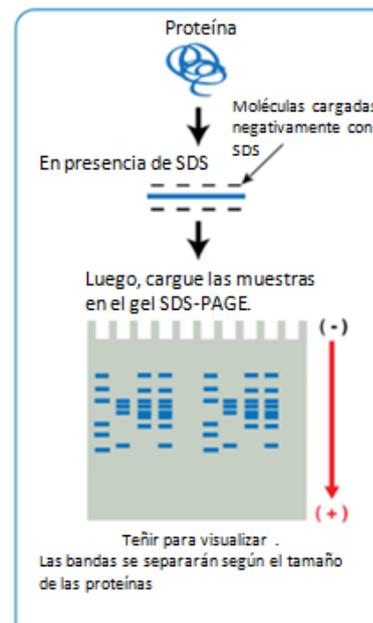


Figura 4: Descripción general de la SDS-PAGE

Todas las muestras de proteínas contienen el tampón de electroforesis, SDS, 2-mercaptoetanol (como agente reductor de los enlaces disulfuro, glicerol para conseguir que la muestra tenga una densidad superior y no quede flotando en el tampón de electroforesis, y el marcador con el que se visualiza el avance de la muestra a lo largo del gel, azul de bromofenol.

El azul de bromofenol migrará delante de las proteínas más pequeñas de estas muestras, hacia el electrodo inferior positivo.

Los pesos moleculares estimados, obtenidos mediante el uso de los geles de poliacrilamida en SDS, corresponden al de proteínas desnaturalizadas.

Dado que las proteínas a menudo constan de múltiples subunidades de cadenas polipeptídicas, se obtendrá el peso molecular de las subunidades. El peso molecular de las proteínas en su estado nativo proporcionará los pesos moleculares para que se pueda determinar el número de subunidades.

Las muestras de proteínas proporcionadas se han purificado hasta alcanzar una pureza de aproximadamente el 80-90% mediante procedimientos de fraccionamiento con sales y cromatografía en columna. Pueden aparecer en el gel algunas bandas menores que pudieran estar relacionadas con la agregación de proteínas o bien con la contaminación de la muestra.

Dado que las proteínas están preteñidas, las bandas individuales serán visibles durante la electroforesis. Después de la electroforesis, se pueden realizar mediciones preliminares sin retirar el gel del casete de plástico. Las proteínas preteñidas se pueden hacer más visibles colocando el gel en la solución de tinción (Figura 4). Las proteínas suelen precipitarse durante el procedimiento de tinción mediante un proceso llamado fijación. La fijación es necesaria para evitar la difusión de proteínas, que provoca bandas borrosas y una intensidad reducida, impidiendo una correcta observación.

## OBJETIVO EXPERIMENTAL:

El objetivo de este experimento es desarrollar una comprensión de la estructura de las proteínas y determinar el peso molecular de proteínas preteñidas desconocidas mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS desnaturalizante (SDS-PAGE).

## SEGURIDAD EN EL LABORATORIO:

Antes de comenzar el experimento, los alumnos deben estar seguros de haber leído y comprendido completamente las instrucciones siguientes. En caso de cualquier duda, preguntar al profesor antes de iniciar la práctica.

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.
6. La acrilamida es una neurotoxina y un carcinógeno conocidos. Debe manipularse con extrema precaución. La acrilamida líquida, utilizada en la fabricación de geles SDS-PAGE, solo debe manipularse en una campana extractora de humos químicos y con guantes y gafas protectoras. **La acrilamida polimerizada, incluidos los geles de acrilamida prefabricados, es segura**, pero debe manipularse con guantes y ser precavidos en todo momento.

## LIBRETA DE LABORATORIO:

Los científicos documentan todo lo que sucede durante un experimento, incluyendo las condiciones experimentales, pensamientos y observaciones mientras se lleva a cabo el experimento y, por supuesto, los datos obtenidos en el mismo. En el desarrollo de esta práctica, también utilizaréis una libreta de laboratorio o similar.

### Antes de realizar el experimento:

- A)** Leer detenidamente la introducción y el protocolo de la práctica. Utiliza esta información para formarte una hipótesis experimental.
- B)** Predecir los resultados del experimento.

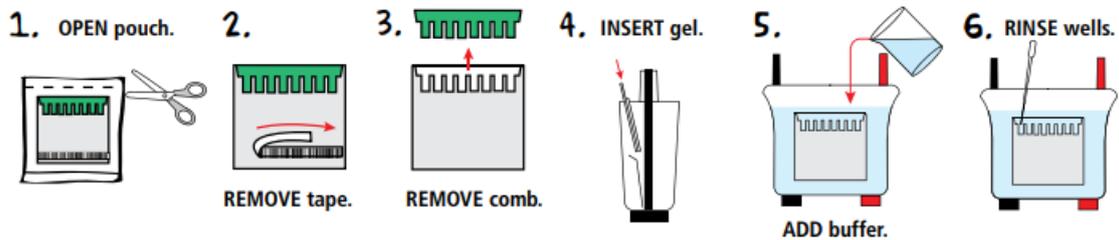
### Durante el experimento:

- A)** Anotar las observaciones.

### Después del experimento:

- A) Interpretar los resultados => ¿Los datos obtenidos, apoyan o contradicen la hipótesis de trabajo?
- B) Si repitieras el experimento, ¿cambiarías alguna cosa del protocolo? => Revisa la hipótesis y adáptala a estos cambios.

## MÓDULO I-A: PREPARACIÓN DEL GEL PREFABRICADO DE POLIACRILAMIDA PARA LA ELECTROFORESIS



### Preparación del gel de poliacrilamida y la cubeta de electroforesis

**NOTA:** Aunque los geles de poliacrilamida y los pocillos de carga de proteínas pudieran variar según el diseño experimental, el procedimiento siempre es el mismo.

1) Cortar la bolsa que contiene el gel. Retirar el casete y colocarlo sobre la mesa con la placa frontal más corta hacia arriba.

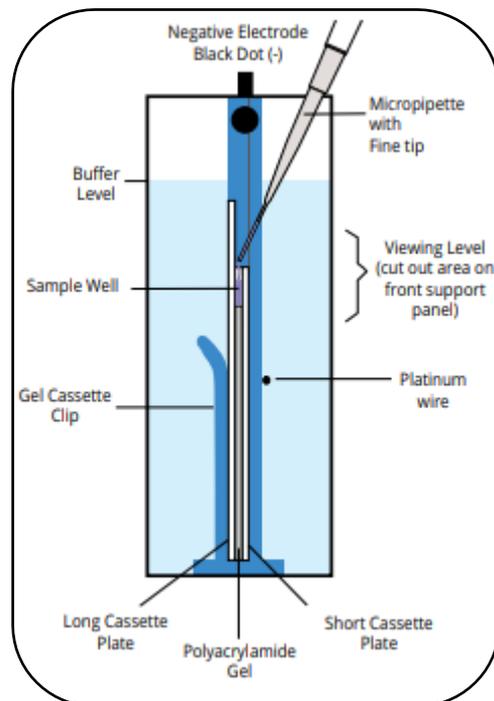
2) Los geles pueden tener una pegatina o cinta adhesiva en la parte inferior de la placa frontal. Retire la cinta, si está presente, para exponer la parte inferior del gel.

3) Retirar con cuidado el peine tirando suavemente hacia arriba. Tire del peine hacia arriba para evitar dañar los pocillos del gel.

4) Insertar el gel en la cámara de electroforesis. Orientar el gel según las instrucciones del fabricante de la cámara de electroforesis.

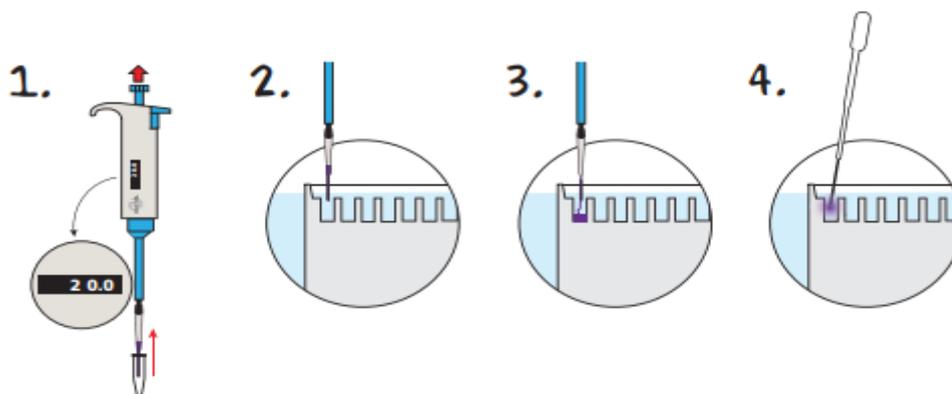
5) Una vez diluido, añadir el tampón de electroforesis a la cámara. El tampón debe cubrir la parte superior de la placa más corta.

6) Enjuague cada pocillo añadiendo la solución tampón de electroforesis en ellos, utilizando una pipeta de transferencia. Con la pipeta de transferencia, restaure con cuidado los pocillos que se hayan podido desviar durante la extracción o el enjuague del peine.



**EL GEL ESTÁ PREPARADO PARA PRACTICAR LA CARGA DEL GEL**

## MÓDULO I-B: PRÁCTICA DE LA CARGA DEL GEL DE ELECTROFORESIS



**NOTA:** Utilizar con cuidado una pipeta con punta fina para evitar dañar el gel y pueda dar lugar a la pérdida de las muestras de proteína.

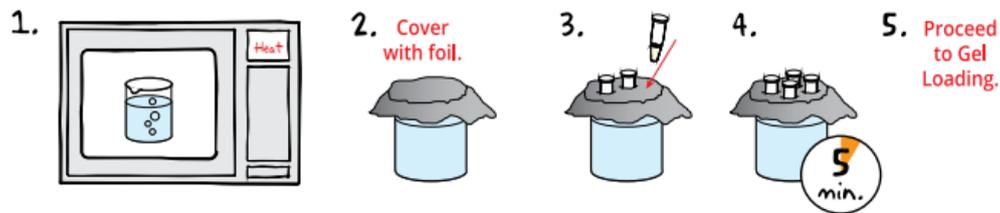
1) Colocar una punta nueva en la micropipeta. Retire 20 ul de la solución de práctica de la carga del gel.

2) Colocar la parte inferior de la punta de la pipeta debajo de la superficie del tampón, directamente sobre un pocillo de muestra. La punta debe formar un ángulo que apunte hacia el pocillo. La punta debe estar parcialmente contra la placa posterior del casete de gel, pero la abertura de la punta debe estar sobre el pocillo de muestra. Evitar el atasco de la punta de la pipeta entre las placas del casete de gel.

3) Expulsar lentamente toda la muestra presionando firmemente el émbolo de la pipeta automática. No suelte el émbolo antes de expulsar toda la muestra. La liberación prematura del émbolo provocará que el tampón se mezcle con la muestra en la punta de la micropipeta. **Soltar el émbolo de la pipeta después de que se haya suministrado la muestra y la punta de la pipeta esté fuera del tampón.**

4) Retirar con cuidado la solución de carga de gel de práctica de los pocillos de muestra. Llene una pipeta de transferencia con solución tampón y vierta un chorro en los pocillos de muestra. Esto desplazará la solución de carga de gel de práctica, que se diluirá en la solución tampón y no interferirá con el experimento. **La solución de carga de gel de práctica debe retirarse de los pocillos de muestra antes de cargar la muestra.**

## MÓDULO II: REALIZACIÓN DE LA SDS-PAGE CON MUESTRAS DE PROTEÍNAS



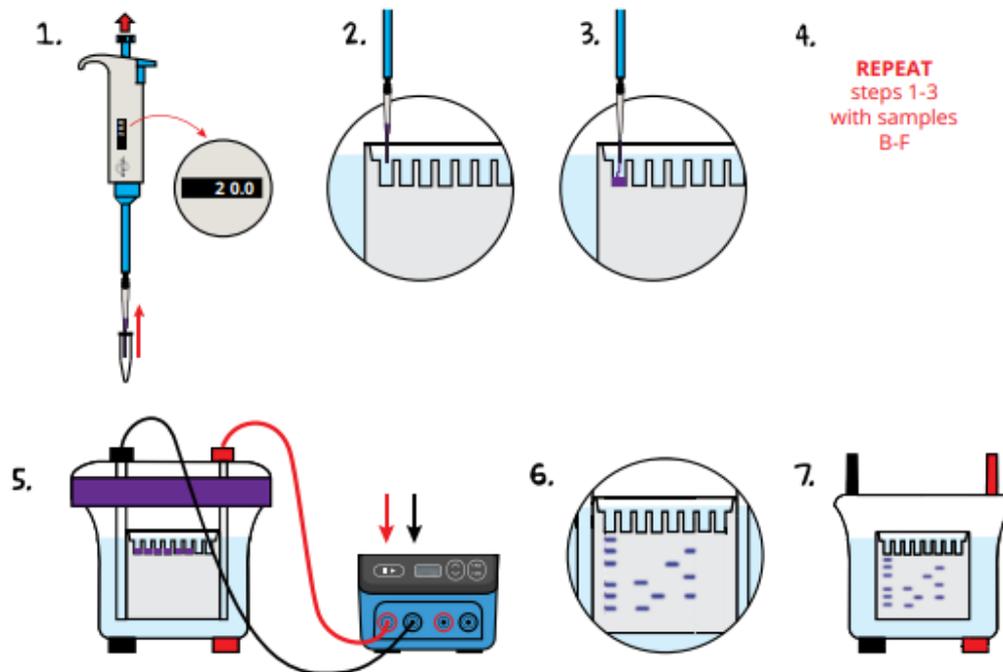
### A) DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

**Proceda a cargar el gel si las muestras de proteína se han calentado previamente.**

- 1) Utilizar una placa calefactora o microondas para calentar un vaso con agua hasta que hierva.
- 2) Cubrir el vaso con papel aluminio y retirarlo de la fuente de calor con cuidado.
- 3) Tapar bien los tubos de muestra. Pasar los tubos a través del papel de aluminio para suspenderlos en el agua hirviendo.
- 4) Proceder inmediatamente a cargar el gel mientras las muestras estén aún tibias. (Para cargar, las muestras se pueden dividir en alícuotas en tubos individuales de microcentrífuga).

**Precaución, las muestras deben hervirse en tubos de microcentrífuga con tapa de rosca para evitar la pérdida de la muestra.**

## B) CARGA DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS



1) Con una punta nueva de pipeta, coger 20 µl del marcador estándar (Table 1).

2) Colocar la punta de la pipeta debajo del tampón y directamente sobre el pocillo de muestra, apoyándola suavemente contra la placa posterior del casete.

3) Dispensar la muestra presionando el émbolo lentamente.

4) Repita los pasos 1 a 3 con las muestras de proteína (B-E), cambiando la punta entre cada muestra.

5) Una vez cargadas todas las muestras, colocar con cuidado la cubierta sobre los terminales de los electrodos y conectar los cables eléctricos a la fuente de alimentación.

Lane	Tube	Sample
1	A	Standard Protein Markers (Group A)
2	B	Milk whey proteins (Group A)
3	C	Serum proteins (Group A)
4	D	Egg white proteins (Group A)
5	E	Spinach leaf proteins (Group A)
6	A	Standard Protein Markers (Group B)
7	B	Milk whey proteins (Group B)
8	C	Serum proteins (Group B)
9	D	Egg white proteins (Group B)
10	E	Spinach leaf proteins (Group B)

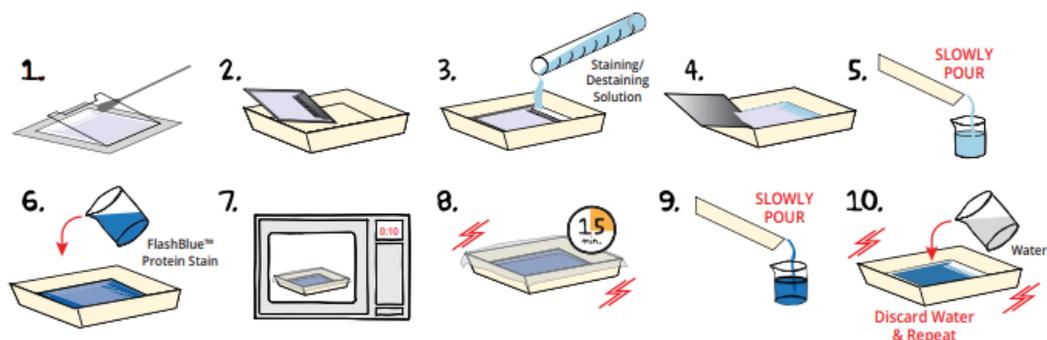
Volts	Recommended Time	
	Minimum	Optimal
100	80 min.	95 min.
125	60 min.	75 min.
150	50 min.	60 min.

6) Ajustar el voltaje de la fuente de alimentación y realizar la electroforesis (consultar la tabla A para conocer las pautas de tiempo y voltaje). Dejar que las proteínas se separen en el gel durante el tiempo recomendado o hasta que el colorante de seguimiento llegue al final del gel.

7) Apagar la fuente de alimentación y retirar la tapa con cuidado.  
**Sacar el gel de la cámara para teñirlo.**

### MÓDULO III: TINCIÓN DEL GEL CON FLASHBLUE

Aunque las muestras de proteínas se proporcionan en un formato preteñido, es posible aumentar la intensidad de las bandas utilizando la tinción de proteínas FlashBlue. La tinción es rápida y sensible. Los grupos de estudiantes que compartieron un gel de poliacrilamida durante la electroforesis también deben teñir este gel juntos.



1) Después de la electroforesis, colocar el casete boca abajo y retirar la placa frontal colocando una espátula fina o un destornillador en el borde lateral. Levantar con cuidado para separarlo de la placa posterior más grande. En la mayoría de los casos, el gel permanecerá en la placa posterior. Si se desprende parcialmente con la placa frontal, dejar caer el gel sobre la placa posterior. Manipular con mucho cuidado, ya que los geles delgados son extremadamente frágiles.

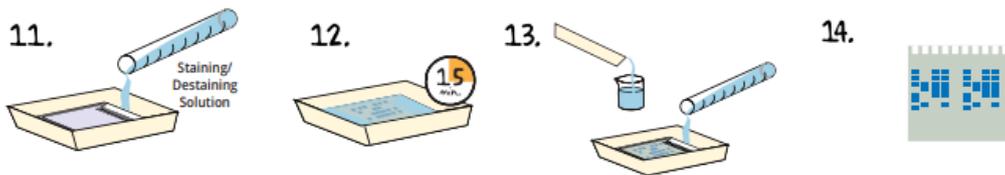
2) Transferir el gel de la placa posterior a una bandeja limpia.

3) Agregar un volumen suficiente (aproximadamente 50-75 ml) de la solución de teñir/desteñir en la bandeja –hasta cubrir el gel y la placa posterior–.

4) Retirar con cuidado la placa posterior de la bandeja, dejando solo el gel en la bandeja que contiene la solución de teñir/desteñir. Las bandas pueden verse más fácilmente una vez que se retira el casete. Observar el gel y tomar una foto o dibujar el patrón de bandas en su cuaderno de laboratorio antes de continuar.

*Nota: Si el gel se adhiere a la placa, quítelo suavemente de la placa usando dos dedos enguantados.*

- 5) Desechar la solución de teñir/desteñir. Vertir lentamente para mantener el gel en el recipiente.
- 6) Agregar 30 ml de la solución de tinción de proteína Flashblue preparada.
- 7) (Opcional) Cubrir el recipiente con film transparente y ponerlo en el microondas durante 10 segundos, para atemperar suavemente la solución.
- 8) Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.
- 9) Desechar la solución de tinción de proteína Flashblue. Vertir lentamente para mantener el gel en el recipiente.
- 10) Lavar el gel llenando parcialmente el recipiente con agua y agitándolo suavemente hacia adelante y hacia atrás varias veces. Desechar el agua usada y repetir con agua fresca.



- 11) Añadir al gel 30 ml de solución de teñir/desteñir.
- 12) Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Examinar el gel.
- 13) Opcionalmente, desechar la solución de teñir/desteñir usada y añadir otros 30 ml adicionales de solución de teñir/desteñir. Incubar durante 15-60 minutos a temperatura ambiente hasta que mejore la apariencia y el contraste de las bandas de proteína.
- 14) Después de la tinción, las bandas de proteínas aparecerán de un color azul medio a oscuro contra un fondo claro. Se puede utilizar una caja de luz blanca para visualizar mejor las bandas de proteínas. Observar y/o fotografiar.

## *ALMACENAMIENTO DEL GEL*

El gel puede dejarse en agua desionizada durante varias horas sin pérdida de sensibilidad ni de intensidad de coloración. Este paso debe realizarse una vez que se obtengan las bandas de proteína teñidas y el fondo deseados. Retire la solución decolorante del paso 12 (o 13) y agregue una cantidad suficiente de agua desionizada para cubrir el gel.

Para un almacenamiento PERMANENTE, el gel se puede secar entre dos hojas de celofán (papel film transparente). Dejar secar el gel al aire durante varios días hasta que quede fino como el papel. Cortar el papel film transparente sobrante que rodea el gel seco. Colocar el gel seco durante la noche entre dos libros pesados para evitar que se doble. Péguelo con cinta adhesiva en una hoja de la libreta de laboratorio.

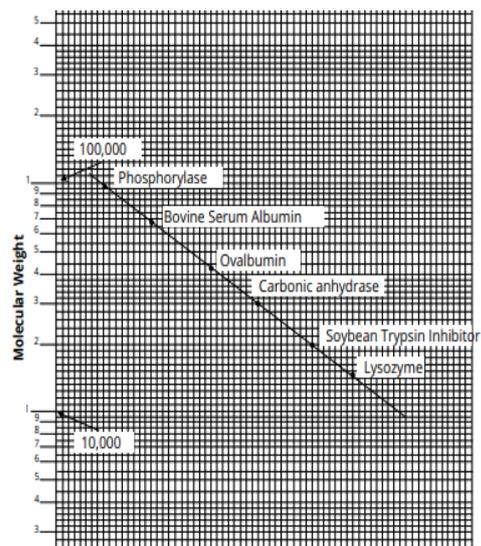
## MÓDULO IV: DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES

1. MEDIR la distancia de migración en centímetros, cercano al milímetro más próximo

	Distancia de migración (cm)	Peso molecular (daltons)
Marcador de Proteína 1 <i>(Fosforilasa)</i>		94000
Marcador de Proteína 2 <i>(Albúmina de Suero Bovino)</i>		67000
Marcador de Proteína 3 <i>(Ovoalbúmina)</i>		38000
Marcador de Proteína 4 <i>(Anhidrasa carbónica)</i>		30000
Marcador de Proteína 5 <i>(Inhibidor de tripsina de soja)</i>		20000
Marcador de Proteína 6 <i>(Lisozima)</i>		14000
MUESTRA 1		
MUESTRA 2		
MUESTRA 3		

2. Utilizando papel milimetrado semilogarítmico, trace la distancia de migración o movilidad relativa ( $R_f$ ) de cada proteína estándar en el eje x (no logarítmico) versus su peso molecular en el eje y (logarítmico). Elija sus escalas de modo que los puntos de datos estén bien distribuidos.

3. Dibuje la mejor línea recta promedio a lo largo de todos los puntos. Esta línea debe tener aproximadamente la misma cantidad de puntos dispersos a cada lado de la línea. Como ejemplo, consulte la figura de la derecha. Este método es una aproximación lineal.

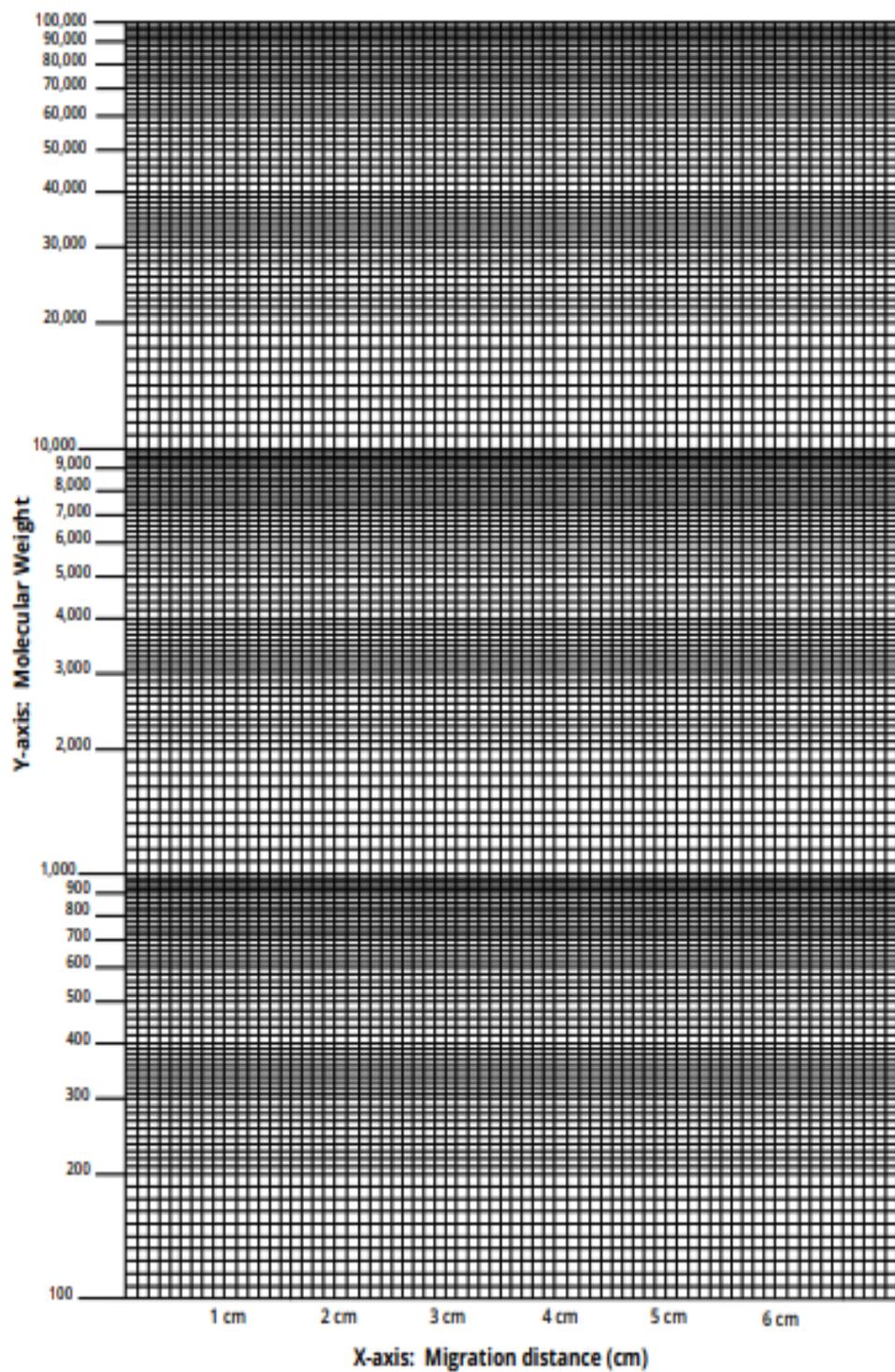


4. Utilizando el gráfico estándar, determine el peso molecular de las tres proteínas desconocidas.

Esto se puede hacer hallando el  $R_f$  (o distancia de migración) de la

proteína desconocida en el eje x y dibujando una línea vertical recta hasta que la línea estándar intersecciona con esta.

**5.** Una línea recta se forma a partir de la intersección con el eje y, donde se puede determinar el peso molecular aproximado.



## PREGUNTAS RELACIONADAS

1) La velocidad de migración de la glutamato deshidrogenasa es muy parecida a la velocidad de migración de la  $\beta$ -amilasa durante la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Sin embargo, el peso molecular de la glutamato deshidrogenasa nativa es de 330 kDa y el de la  $\beta$ -amilasa es de 206 kDa. Razona la respuesta.

2) Algunos genes han sido clonados y secuenciados. La secuencia precisa de los aminoácidos que componen un péptido puede ser determinada a partir de la secuencia de ADN y calcularse su peso molecular. ¿Es posible determinar una estimación razonable del peso molecular nativo de una proteína a partir de la secuencia de sus genes estructurales? ¿Por qué?

3) Las IgG contienen 2 cadenas pequeñas polipeptídicas y 2 cadenas mayores. Se incubó una preparación de IgG con SDS, calentada y luego sometida a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Después de la tinción se observó una banda cercana a la parte superior del gel. Razona la respuesta.

4) La glutamato deshidrogenasa puede tener un peso molecular de  $2 \times 10^6$  in soluciones concentradas. Tras la adición de NADH y glutamato, el peso molecular nativo es de 330000. Explica este fenómeno.

5) Una preparación purificada de anhidrasa carbónica activa se sometió a electroforesis en gel de poliácridamida nativa a pH alcalino. Se observaron tres bandas principales después de la tinción. La misma preparación de proteína se desnaturalizó y se sometió a electroforesis en gel de poliácridamida con SDS. Se observó una banda después de la tinción. Explique estos resultados.

6). Una glicoproteína posee una cadena polipeptídica sencilla y mediante varios métodos analíticos, se ha descubierto que más del 40 % (en peso) de N-acetilglucosamina, manosa y ácido siálico tiene un peso molecular nativo de 75 000. Sin embargo, el análisis por

electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS arrojó un peso molecular de 100 000. Razona la respuesta.

## GUÍA DEL/LA PROFESOR/A

Antes de comenzar este experimento, revise cuidadosamente la lista de componentes y requisitos para asegurarse de que no falta nada y se dispone del equipo necesario.

Este experimento requiere tres geles de poliacrilamida al 12 % que se compartirán entre los 6 grupos de estudiantes. Cada grupo necesita 4 pocillos para cargar la muestra.

PREPARACIÓN	QUÉ HACER	CUÁNDO	TIEMPO
<b>Módulo I: Preparación de los geles de poliacrilamida prefabricados</b>	Preparar el tampón de electroforesis diluido	Hasta un día antes de realizar el experimento	15 min
	Hidratar y alicuotar las muestras de proteína	Hasta un día antes de realizar el experimento y almacenado a -20°C	15 min
<b>Módulo II: Realización de SDS-PAGE con muestras de proteínas</b>	Preparar los baños para la desnaturalización de las proteínas	Hasta un día antes de realizar el experimento	15 min
	Desnaturalizar las proteínas (opcional)	No más de 10 minutos antes de realizar el experimento	10 min
<b>Módulo III: Tinción de geles con el colorante de proteínas FlasBlue</b>	Preparar las soluciones de tinción	En cualquier momento de la realización del experimento	10 min

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNA:

1) Añadir 130 ul de agua destilada o desionizada a cada uno de los tubos (A-D) y dejar que las muestras se hidraten durante varios minutos. Agitar el tubo vigorosamente con un vórtex para homogeneizarlas. Las proteínas resuspendidas pueden conservarse a temperatura ambiente para su uso inmediato o congelarse hasta que se necesiten.

2) Las muestras de proteínas deben calentarse antes de su uso, utilizando los tubos de microcentrífuga con tapa de rosca de 1,5 ml originales. Este paso puede ser realizado por los profesores inmediatamente antes del período de prácticas o puede ser realizado por los estudiantes durante el período de prácticas. Para obtener instrucciones sobre la desnaturalización de las muestras de proteínas, consulte el módulo II.

3) Las muestras se pueden dividir en alícuotas para cada uno de los 6 grupos de estudiantes, o los estudiantes pueden compartir los tubos de muestra rehidratada. Haga que los estudiantes carguen las muestras en el gel de poliacrilamida mientras aún estén tibias para evitar la agregación. El volumen de muestra para cargar por pocillo es de 20 ul.

4) Guarde cualquier alícuota no utilizada de la muestra reconstituida a -20 °C y repita el paso 2 cuando utilice las muestras en un momento posterior.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS:

Preparar el tampón de electroforesis añadiendo y mezclando 1 parte del tampón concentrado Tris-Glicina-SDS 10x a 9 partes de agua destilada.

EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Concentrated Buffer (10x)	+ Distilled Water
MV10	580 mL	58 mL	522 mL
MV20	950 mL	95 mL	855 mL

El volumen aproximado de tampón de electroforesis 1x, requerido para las unidades de electroforesis de proteínas vertical suministrados por EDVOTEK, figuran en la tabla B. El tampón debe cubrir únicamente la parte posterior del casete en el que se encuentra el gel.

TIEMPO Y VOLTAGE DE ELECTROFORESIS:

El voltaje y el tiempo que tardarán las muestras en separarse mediante electroforesis, pueden ser modificados según la disponibilidad de duración de la práctica. Los tiempos recomendados aproximados se enumeran en la Tabla A.

Volts	Recommended Time	
	Minimum	Optimal
100	80 min.	95 min.
125	60 min.	75 min.
150	50 min.	60 min.

Desconectar la fuente de alimentación cuando el colorante de seguimiento azul de bromofenol esté cerca del borde inferior del gel.

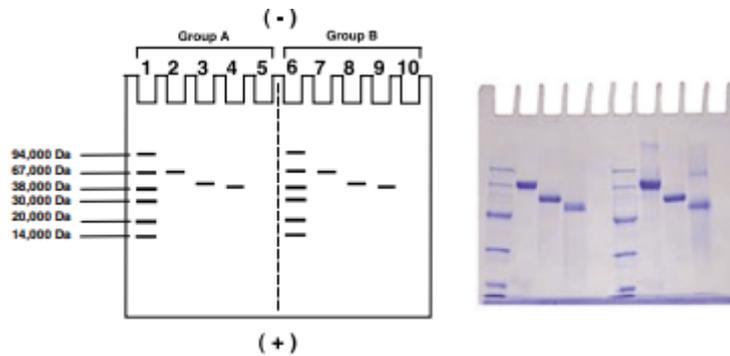
### TINCIÓN DE LOS GELES:

- 1) Prepare una solución de vinagre blanco y etanol combinando 400 ml de vinagre blanco con 200 ml de etanol. Mezcle suavemente. Etiquétela como solución teñido/desteñido
- 2) Añadir 125 ml de la solución de teñido/desteñido a un frasco de 250 ml. Añadir el contenido íntegro de polvo FlashBlue tinción de proteínas y agite suavemente para mezclar y homogeneizar. El polvo residual se puede recuperar del tubo añadiendo 1 ml de la misma solución.
- 3) Guarde ambas soluciones a temperatura ambiente hasta que las necesite.
- 4) Dos grupos de estudiantes compartirán: 30 ml de tinción de proteínas FlashBlue, 10 ml de solución de teñido/desteñido, agua, una bandeja de tinción y film plástico.

**Nota:** El volumen de vinagre blanco puede ser sustituido por ácido acético a una concentración del 5%-8%, pH 2,6. El etanol es un reactivo presente en la mayoría de los laboratorios y disponible a varias concentraciones. Nuestro producto de tinción de proteínas FlashBlue™ ha sido diseñado para trabajar en un extenso rango de viagre blanco. Recomendamos el uso de concentraciones de etanol >95%.

RESULTADOS:

La figura es un esquema idealizado que muestra las posiciones relativas de las bandas de proteínas (no está representado a escala).



Las bandas de coloración tenue obtenidas de algunas muestras son contaminantes menores. No mida estas bandas durante el análisis. El error puede ser del 10 % con este método.

POCILLO	MUESTRA	CONTENIDO	PESO MOLECULAR
1 y 6	A	Marcador de proteínas	Ver figura
2 y 7	B	Muestra de proteínas 1	68000
3 y 8	C	Muestra de proteínas 2	58000
4 y 9	D	Muestra de proteínas 3	50000

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
El gel no funciona correctamente	El gel no se ha preparado correctamente	Comprueba que el tampón es correcto. Hacer uno nuevo
	El tampón no es correcto	Verifica el protocolo del gel. El tampón debe ser compatible con el gel
	Volumen de tampón insuficiente	El tampón debe cubrir completamente los pocillos de muestra durante todo el experimento.
	La orientación del gel no es correcta	Consulte con el fabricante para la configuración adecuada de la cámara de electroforesis.
	La cámara de electroforesis o la fuente de alimentación no funcionan bien	Consultar con el proveedor de la cámara de electroforesis o fuente de alimentación
	No se ha quitado la cinta de la parte inferior del gel prefabricado	Quitar la tapa con cuidado antes de poner el gel a migrar
	Los electrodos no están conectados o la polaridad está invertida	Verifique las conexiones de los electrodos y la fuente de alimentación.
Mala resolución o separación de bandas	Difusión de las muestras antes de empezar a migrar el gel	Minimizar el tiempo desde la carga de las muestras hasta que se empieza la electroforesis
	El gel es antiguo o bien está caducado	Hacer un gel nuevo o comprar nuevos geles prefabricados
	Concentración incorrecta del gel de acrilamida	El kit está diseñado para geles del 12% de acrilamida. Otras concentraciones afectan a los resultados
Las bandas migran con forma de sonrisa, diferentes a una línea recta	Sobrecarga de la muestra de proteínas	El kit está optimizado para evitar sobrecargas. Asegúrese de cargar la cantidad recomendada por el protocolo.
	El tampón utilizado no es el correcto	Revisar el protocolo de fabricación del gel. El tampón debe ser compatible con el gel
	Voltaje incorrecto	Revisar el protocolo y aplicar el voltaje correcto
No se ven bandas en el gel / No se ven las bandas más pequeñas	Las proteínas han migrado fuera del gel	Utilizar el correcto tiempo de migración y voltaje. Parar el gel antes de que la banda de tinción salga del gel.
Las proteínas quedan acumuladas en el pocillo de los geles	Las proteínas forman agregados	Asegurarse de que las proteínas están bien desnaturalizadas. Hervir durante minutos y cargar aún calientes.
Las bandas son borrosas y distorsionadas	El gel se ha sobrecalentado	Reducir el voltaje y comprobar la concentración del tampón. Diluir en caso necesario.
Las bandas son débiles	Las proteínas se ha difundido o desaparecido	Repetir la tinción aumentando el tiempo de teñir/desteñir.
	Se ha cargado en el pocillo muy poca cantidad de proteína	El kit está optimizado para evitar sobrecargas. Asegúrese de cargar la cantidad recomendada por el protocolo.