

ELECTROFORESIS VERTICAL DE PROTEÍNAS

6 grupos de estudiantes

1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aprender el uso de la **ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA** para comprender la estructura, función y diversidad de proteínas.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Marcador de Proteínas estándar A	Congelador
Proteínas del suero de la Leche B	Congelador
Proteínas Séricas de la Sangre C	Congelador
Proteínas de la clara del Huevo D	Congelador
Proteínas de hojas de Espinacas E	Congelador
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Tª ambiente
Tinción de proteínas FlashBlue	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.
- Balanza.
- Microtubos.
- Agua destilada
- Papel de aluminio.
- Transiluminador de luz blanca.
- Ácido acético glacial.
- Metanol.
- Vasos.
- 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 diferenciación celular en un organismo está determinada por la expresión génica selectiva. En consecuencia, los tipos de proteínas presentes y sus concentraciones varían entre diferentes tejidos. El perfil proteico dentro del mismo tejido también puede variar con el tiempo y por la inducción específica de la transcripción genética generada por hormonas y otras sustancias químicas. La mayoría de las proteínas celulares siguen siendo las mismas entre los distintos tipos de tejidos de los mamíferos. La mayor variación en los tipos de proteínas expresadas entre dos tejidos diferentes es de aproximadamente 100 veces. Sin embargo, la concentración de proteínas comunes a los diferentes tejidos puede variar considerablemente.

La célula eucariota de los mamíferos puede contener de 5000 a 10000 proteínas diferentes y un total de 5×10^9 moléculas de proteína por célula. La longitud media de un gen es de unos 1200 pares de bases y el número de pares de bases en el genoma humano haploide es de 3×10^9 . Teóricamente, se pueden codificar $2,4 \times 10^6$ proteínas diferentes. Sin embargo, en realidad se utiliza menos del 1% del máximo para este fin. Muchas secuencias de ADN en las células eucariotas no codifican proteínas, como los intrones y las secuencias repetitivas, los genes ARNr y ARNt, las unidades reguladoras de la transcripción y los pseudogenes.

En cambio, la bacteria *E. coli* contiene aproximadamente 2000 proteínas diferentes y un total de 3×10^6 moléculas de proteína por célula. El genoma de la bacteria *E. coli* tiene 4×10^6 pares de bases, que teóricamente codifican 3300 proteínas diferentes. En realidad, más del 60% del genoma codifica proteínas. El control de la expresión génica en los procariotas responde a los requerimientos nutricionales inmediatos y a las adaptaciones a los cambios del entorno físico. Estas características son acordes con su corto ciclo de vida y su rápida cinética de crecimiento.

La mayoría de las células de los organismos multicelulares permanecen en un entorno constante y estrictamente regulado. En este caso, el control genético se ocupa principalmente de la diferenciación y el desarrollo, y generalmente es irreversible. Los genes inducibles por reversibilidad sí existen en organismos superiores, como las células hepáticas.

La isomería de secuencias es la principal razón de la gran diversidad estructural y funcional de las proteínas. Un tetrapéptido que tiene cuatro aminoácidos diferentes tiene $4! = 24$ isómeros de secuencia diferente. Un polipéptido pequeño que consta de 20 aminoácidos estándar tiene $20! = 2 \times 10^{18}$ isómeros de secuencias diferentes. Una proteína de tamaño moderado de peso molecular 34000, que consta de sólo 12 de los aminoácidos estándar, tiene 10^{300} isómeros posibles. Las variaciones de secuencia proporcionan un conjunto prácticamente ilimitado de polipéptidos. Una

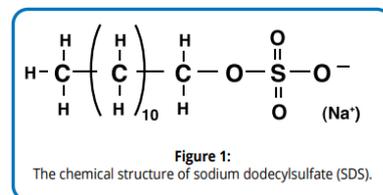
proteína puede tener una carga neta negativa o positiva, dependiendo de su composición de aminoácidos y del pH del medio en el que se encuentra. A determinados valores de pH, la molécula puede ser eléctricamente neutra en general, es decir, las cargas negativas y positivas están equilibradas. En este caso, la proteína es isoelectrónica. En presencia de un campo eléctrico, una proteína con una carga neta migrará hacia el electrodo de carga opuesta.

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 o de varios polipéptidos específicamente asociados entre sí. Las proteínas que se encuentran en sus formas normales y biológicamente activas se denominan nativas.

COMPOSICIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA:

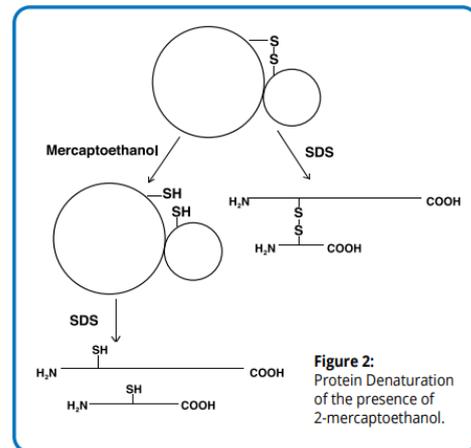
Las propiedades de las proteínas afectan la forma en que migran en gel durante la electroforesis. Los geles utilizados en la electroforesis (por ejemplo, la poliacrilamida) consisten en poros microscópicos de un rango de tamaño definido que actúan como un tamiz molecular. Solo las moléculas con carga 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.

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 1. 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 β -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 2 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.

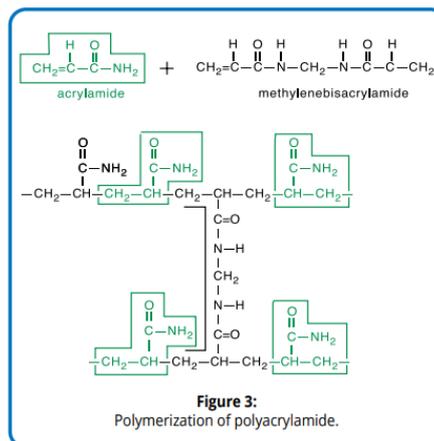


En la mayoría de los casos, el SDS se une a las proteínas en una proporción constante de 1,4 gramos de SDS por gramo de proteína. En promedio, el número de moléculas de SDS unidas es la mitad del número de residuos de aminoácidos en el polipéptido. La carga negativa debida al SDS es mucho mayor que las 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.

La movilidad electroforética de las proteínas también se ve afectada por la concentración del gel. Los geles con un porcentaje más alto son más adecuados

para la separación de proteínas y péptidos más pequeños. Los geles de poliacrilamida se forman mezclando el monómero, acrilamida; el agente de reticulación, metilenediacrilamida; y un generador de radicales libres, el persulfato de amonio en un tampón acuoso (Figura 3). Se produce la polimerización de los radicales libres de la acrilamida. En varios puntos, los polímeros de acrilamida se unen entre sí mediante la metilenediacrilamida.



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.

ESTUDIO DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS:

Los marcadores estándar de proteínas, 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.

Proteínas de la leche

Las principales proteínas de la leche son las caseínas que, junto con los lípidos emulsionados, dan al líquido su color. En la leche, las caseínas forman complejos con el calcio, lo que hace que formen agregados y micelas. La fracción de caseína se puede precipitar a partir de leche desnatada (desgrasada) mediante titulación ácida a pH 4,7. La grasa y las caseínas también se pueden eliminar mediante la adición de sulfato de amonio. El sobrenadante verde amarillento resultante es suero, que contiene el 20% de la proteína total de la leche. La fracción de suero es un derivado filtrado del suero. Contiene pequeñas cantidades de albúmina, transferrina y lactoferrina. Estas proteínas se pueden visualizar como bandas ligeramente satinadas entre los marcadores proteicos 67000 y 94000 daltons. La transferrina se une y transporta el hierro a los diversos tejidos desde el plasma sanguíneo y presumiblemente es una fuente de hierro para los lactantes. En presencia de CO₂, la transferrina se une a 2 átomos de Fe⁺³ por molécula. Como la mayoría de las proteínas excretadas, la transferrina está glicosilada y consiste en una única cadena polipeptídica de aproximadamente 80.000 daltons. Existen al menos 20 variantes diferentes de esta proteína en los seres humanos.

Las inmunoglobulinas constituyen el 10% de las proteínas del suero. Predomina la inmunoglobulina secretora IgA. La configuración básica de las inmunoglobulinas son 2 cadenas polipeptídicas "ligeras" de peso molecular 26000 daltons y 2 cadenas "pesadas" de peso molecular 54000 a 75000 daltons dependiendo de la clase. Juntas, estas cadenas forman una molécula flexible en forma de Y que contiene numerosos enlaces disulfuro intra e intercatenarios. Un enlace disulfuro se produce entre cada par de cadenas ligeras y pesadas. Dos enlaces disulfuro conectan las cadenas pesadas entre sí. La región N-terminal de ambas cadenas tiene una secuencia variable de una molécula a otra. En consecuencia, la fracción de inmunoglobulina del plasma normal y de la leche es heterogénea. Las regiones variables de ambos tipos de cadenas forman el sitio de unión del antígeno; hay dos regiones variables por molécula. Las porciones restantes de las cadenas ligeras y pesadas tienen una secuencia constante (dentro de sus respectivas subclases) de una molécula de inmunoglobulina a otra.

La proteína principal del suero en los rumiantes es β -lactoglobulina. La proteína nativa tiene un peso molecular de 35000 daltons y consta de dos cadenas polipeptídicas idénticas. La proteína aparece como una única banda de peso molecular de 17500 daltons, justo por debajo del marcador de 20000 daltons. La β -lactoglobulina contiene ácido fólico, que es el precursor del tetrahidrofolato, una coenzima importante en la transferencia metabólica de carbono.

La alfa-lactoalbúmina es un polipéptido único que tiene un peso molecular de aproximadamente 15000 daltons. Aparece como una banda tenue cerca del marcador de peso molecular más bajo. Esta proteína del suero forma un complejo uno a uno con la galactosiltransferasa mamaria. La enzima libre (que se produce en muchos otros tejidos) cataliza la transferencia de la unidad de galactosa de la UDP-galactosa a los residuos terminales de N-acetilglucosamina en las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas. Cuando se forma un complejo con la alfa-lactoalbúmina, la especificidad del sustrato de la enzima cambia para aceptar la glucosa como aceptor de galactosilo, lo que da como resultado la producción de lactosa, un azúcar de la leche. La alfa-lactoalbúmina no tiene actividad catalítica por sí misma, pero es un modificador específico de proteínas. El complejo galactosiltransferasa- α -lactoalbúmina se denomina lactosa sintasa.

Proteínas del suero sanguíneo

Se cree que el plasma sanguíneo contiene más de 100 proteínas diferentes. La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS es un método útil para el fraccionamiento y análisis de estas proteínas, en particular en pruebas clínicas. El perfil electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de las proteínas plasmáticas revelará bandas que van desde aproximadamente 200000 a 15000 daltons. La banda más grande (superior) en la muestra de plasma tiene un peso molecular desnaturalizado de 190000 daltons y corresponde a la α 2-macroglobulina. El peso molecular nativo de la proteína es de aproximadamente 800000 daltons. Consiste en dos subunidades diméricas asociadas entre sí a través de fuerzas no covalentes. Sin embargo, las subunidades diméricas constan de dos polipéptidos (19000 daltons) que están asociados por fuerzas no covalentes y enlaces disulfuro. La macroglobulina es un inhibidor de la proteasa y puede estar involucrada en el

control de procesos proteolíticos como la coagulación sanguínea y las cascadas del complemento. La transferrina es una proteína plasmática importante, que comprende el 3% de la proteína total. La transferrina es una banda principal en el perfil electroforético de SDS, que migra con o justo debajo del marcador de peso molecular de 94000 daltons.

La banda principal de las proteínas plasmáticas corresponde a la albúmina, con un peso molecular de aproximadamente 68000 daltons. Se encuentra directamente debajo de la banda de transferrina. La albúmina es la proteína plasmática más abundante y es una de las pocas que no es una glucoproteína. Consta de una sola cadena polipeptídica con 17 enlaces disulfuro intercatenarios. Al igual que en las inmunoglobulinas, los enlaces disulfuro ayudan a que la albúmina se pliegue en tres dominios estructurales, cada uno de los cuales consta de tres subdominios. Estos dominios forman la amplia variedad de sitios de unión de ligandos que se encuentran en la proteína. La albúmina funciona en la unión y el transporte de ácidos grasos, Cu^{+2} , Ni^{+2} , bilirrubina, triptofano, hormonas esteroideas y muchos fármacos como las sulfonamidas, la penicilina y la aspirina. Una función fisiológica importante de la albúmina es la regulación osmótica. La proteína es responsable del 80% de las propiedades osmóticas del plasma, ya que representa más de la mitad de las proteínas plasmáticas en peso, tiene el peso molecular más bajo de las proteínas principales y contiene 18 cargas negativas a pH fisiológico. La carga afecta a la distribución de iones de sodio y cloruro en los fluidos extracelulares y, en consecuencia, a la osmolaridad plasmática. Por debajo de la albúmina, hay varias bandas parcialmente definidas que tienen movilidades entre 67000 y 43000 daltons, según indican los marcadores de peso molecular. La familia de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (principalmente subclases de IgG) migran a esta región además de la α -antitripsina (53000), que es una proteína relativamente abundante que participa en la inhibición proteolítica. Está compuesta por un 12% de carbohidratos en peso. Los niveles anormalmente bajos de antitripsina pueden causar una predisposición al enfisema, ya que las células pulmonares se dañan por proteólisis.

Las haptoglobinas son proteínas multisubunitarias, con pesos moleculares nativos que van desde 100000 a 400000 daltons. Las haptoglobinas consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas diferentes, α y β , que tienen un peso molecular de 9000 y 43000 daltons, respectivamente. Las cadenas polipeptídicas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y la proteína tiene la estequiometría de subunidad $\alpha_2\beta_2$.

Proteínas de la clara de huevo

El perfil electroforético en SDS de las proteínas de la clara de huevo también revela un alto grado de especialización. Las proteínas de la clara de huevo son secretadas por las células del oviducto bajo estimulación hormonal. La mayor parte de la proteína de la clara de huevo es la ovoalbúmina. La proteína consiste en una sola cadena polipeptídica globular con un peso molecular de 45000 daltons. La ovoalbúmina contiene un oligosacárido corto unido covalentemente a un residuo de asparagina. El oligosacárido consiste en N-acetilglucosamina y manosa. La función de la ovoalbúmina consiste en el almacenamiento de aminoácidos para el embrión en desarrollo.

La clara de huevo también contiene globulinas, que están representadas por una banda prominente que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 65000 a 68000 daltons. Se pueden observar bandas muy tenues por encima de la banda de globulina con un peso molecular cercano a los 80000 daltons, correspondiente a la conalbúmina. Esta proteína es el equivalente funcional de la transferrina. La lisozima es un polipéptido único con un peso molecular de aproximadamente 14500 daltons. La clara de huevo contiene cantidades sustanciales de esta proteína, que se puede observar como una banda que migra junto con el marcador de menor peso molecular. Existen varias similitudes funcionales entre la clara de huevo y la proteína de la leche. Ambas contienen proteínas transportadoras de hierro. Tienen grandes cantidades de proteínas "nutricionales" (caseínas en la leche y ovoalbúmina en el huevo) y contienen vigilancia antibacteriana (inmunoglobulinas en la leche y lisozima en el huevo). Estas características satisfacen varios requisitos para las crías en desarrollo.

Proteínas de las plantas

Las proteínas de las hojas de espinaca revelan un patrón complejo de bandas después de la electroforesis, particularmente en el rango de peso molecular más bajo. Muchas de estas proteínas provienen de los numerosos cloroplastos que se encuentran en el tejido foliar de las plantas superiores. Una característica destacada es una banda principal con un peso molecular de aproximadamente 56000 daltons. Esta banda corresponde a la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa. Esta enzima cataliza la adición de CO₂ al bifosfato de la ribulosa fosfopentosa produciendo dos moléculas de fosfotriosa 3-fosfoglicerato. Esta reacción es responsable de la fijación del dióxido de carbono que se da en la fase oscura de los organismos fotosintéticos. La enzima es la proteína más abundante en las plantas y en la biosfera. La enzima es responsable de la incorporación anual de 5×10^{14} kilogramos de dióxido de carbono en el enlace orgánico. La carboxilasa está presente en el estroma de los cloroplastos y contiene múltiples subunidades. El polipéptido de 56000 daltons se denomina L y está codificado por el ADN del cloroplasto. También hay una pequeña subunidad con un peso molecular de 14000 daltons, denominada S, que está codificada en el núcleo. La banda que contiene el polipéptido S co-migra en el gel de SDS con el marcador de peso molecular más pequeño. La estequiometría de la subunidad es L₈S₈, lo que le da un peso molecular nativo de 560000 daltons. Los sitios activos se encuentran en las subunidades L. Se cree que la subunidad S regula la actividad de las enzimas, pero esto no se ha demostrado claramente. El ion magnesio es necesario para la actividad catalítica. La actividad de la carboxilasa está regulada por una enzima cloroplástica que cataliza la adición de dióxido de carbono a residuos específicos de lisina en las subunidades L. La modificación activa la carboxilasa.

En este experimento, las muestras de proteínas se desnaturalizaron mediante incubación con el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida. En las condiciones experimentales, las proteínas tendrán una movilidad en el gel inversamente proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares.

En el mismo gel de electroforesis se incluirán unas proteínas de pesos moleculares conocidos. Las muestras de proteínas contienen tampón, SDS, β -mercaptoetanol como agente reductor de enlaces disulfuro, glicerol para crear una densidad mayor que la del tampón de electroforesis y el colorante de rastreo con carga negativa azul de bromofenol. El colorante de rastreo migrará en estas muestras hacia el electrodo positivo (abajo) por delante de las proteínas de menor peso molecular.

Las estimaciones de peso molecular obtenidas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, corresponden a proteínas desnaturalizadas. Dado que las proteínas suelen estar formadas por múltiples subunidades (cadenas polipeptídicas), el método puede proporcionar pesos moleculares mínimos correspondientes a estas subunidades. La incubación con SDS y β -mercaptoetanol provoca la ruptura de las membranas celulares y la lisis. La clarificación de la muestra se realiza mediante centrifugación y el sobrenadante se utiliza para la electroforesis.

OBJETIVO EXPERIMENTAL:

El objetivo del experimento es utilizar la técnica de la electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida para desarrollar y comprender la estructura de las proteínas, su función y su diversidad.

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. Los geles preparados de acrilamida deben ser manipulados con guantes.

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.

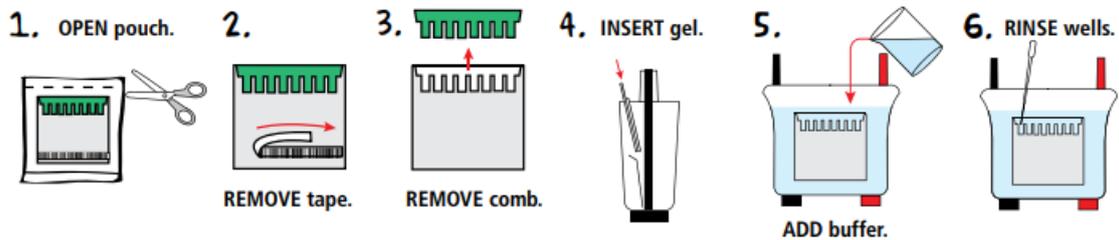
Durante el experimento:

- 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.

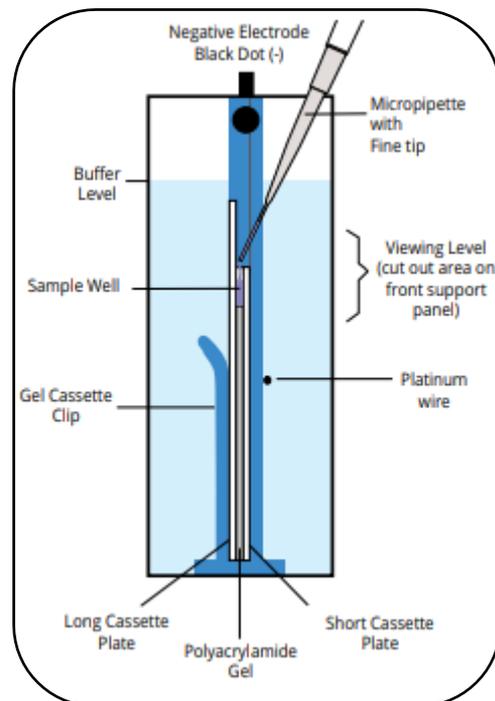
2) Los geles pueden tener una pegatina o cinta adhesiva en la parte inferior de la placa frontal. Retire la cinta, si está presente, para exponer la parte inferior del gel.

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.

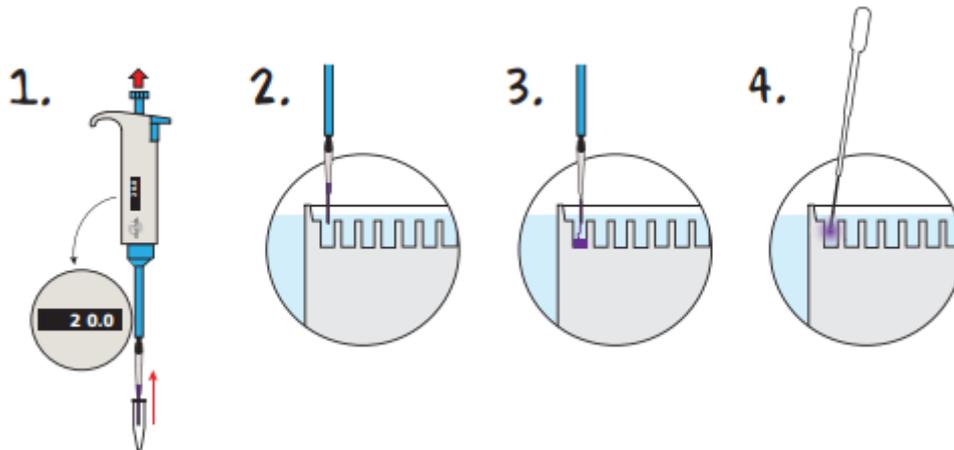
5) Una vez diluido, añadir el tampón de electroforesis a la cámara. El tampón debe cubrir la parte superior de la placa más corta.

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 μ l de la solución de práctica de la carga del gel.

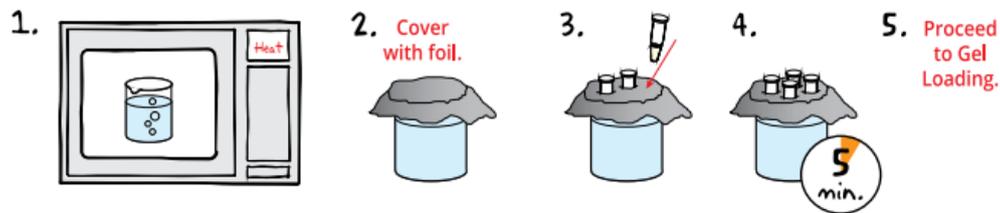
2) Colocar la parte inferior de la punta de la pipeta debajo de la superficie del tampón, directamente sobre un pocillo de muestra. La punta debe formar un ángulo que apunte hacia el pocillo. La punta debe estar parcialmente contra la placa posterior del casete de gel, pero la abertura de la punta debe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



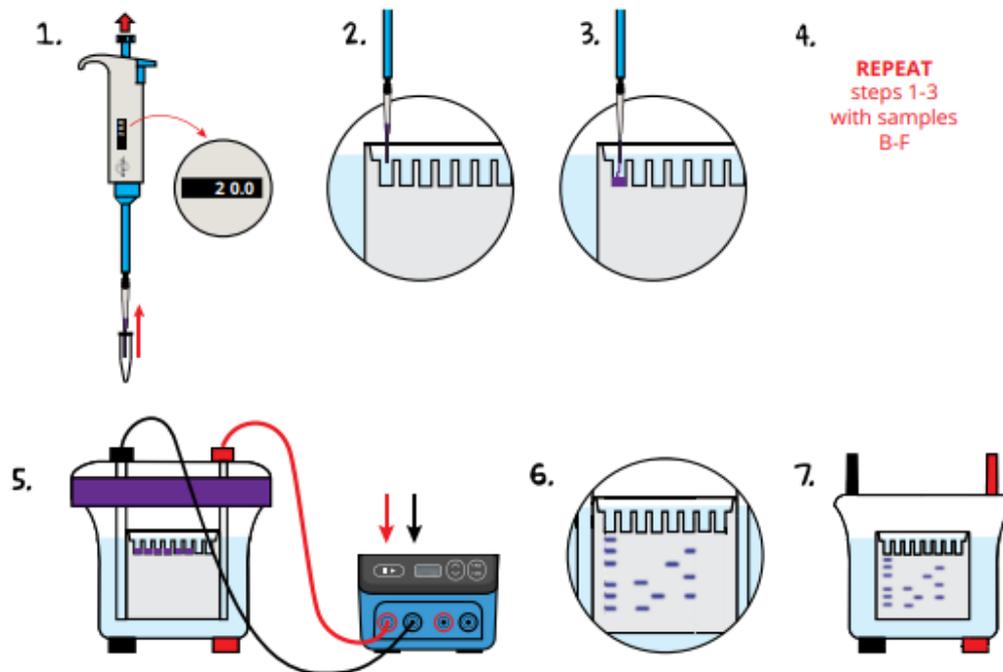
A) DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

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 (A).

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.

6) Ajustar el voltaje de la fuente de alimentación y realizar la electroforesis (consultar la tabla A para conocer las pautas de tiempo

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)

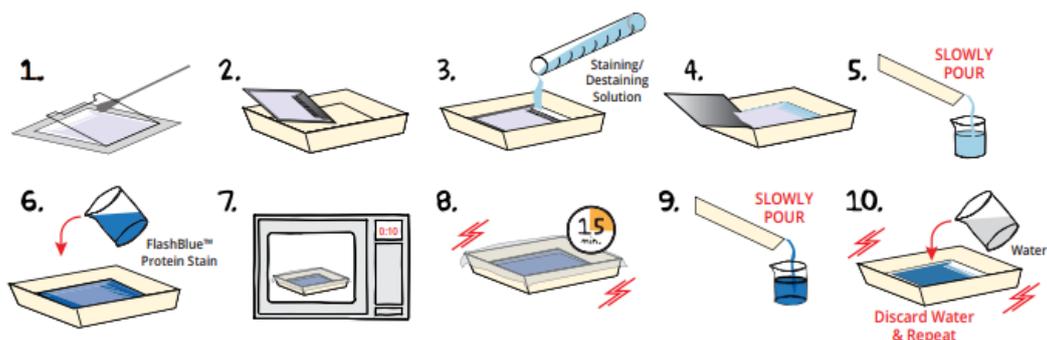
Volts	Recommended Time	
	Minimum	Optimal
100	80 min.	95 min.
125	60 min.	75 min.
150	50 min.	60 min.

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.

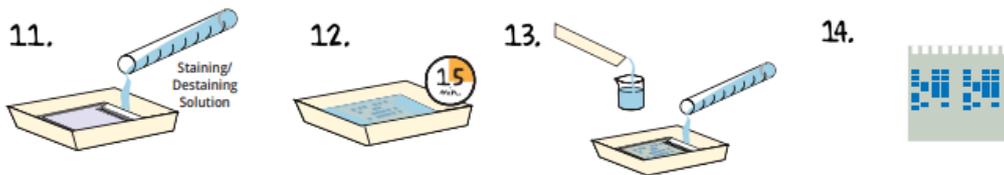
2) Transferir el gel de la placa posterior a una bandeja limpia.

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.

PREGUNTAS RELACIONADAS

1) ¿Se producirían cambios en los perfiles electroforéticos de sds de las proteínas séricas tratadas en ausencia o presencia de altas concentraciones de β -mercaptoetanol? De ser así, ¿mostrarían las proteínas diferencias en las tasas de migración?

2) La cadena de α -haptoglobina muestra polimorfismo genético, ya que el ácido glutámico puede ser reemplazado por lisina. ¿Qué método podría distinguir los polimorfos, SDS o la electroforesis en gel de poliacrilamida nativa?

3) Se sometió un lisado de glóbulos rojos a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La muestra reveló una banda principal con un peso molecular de aproximadamente 17000. ¿Qué proteína crees que es la que aparece en esta banda?

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 5 pocillos para cargar la muestra.

PREPARACIÓN	QUÉ HACER	CUÁNDO	TIEMPO
Módulo I: Preparación de los geles de poliacrilamida prefabricados	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
Módulo II: Realización de SDS-PAGE con muestras de proteínas	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
Módulo III: Tinción de geles con el colorante de proteínas FlasBlue	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-E) 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.

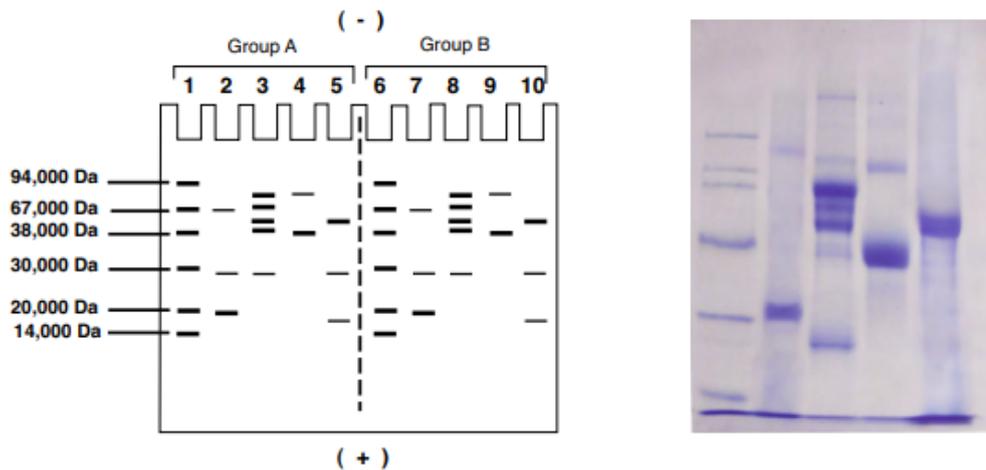
Desconectar la fuente de alimentación cuando el colorante de seguimiento azul de bromofenol esté cerca del borde inferior del gel.

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.

RESULTADOS:



La figura de la izquierda es un esquema idealizado que muestra las posiciones relativas de las bandas de proteínas (no está representado a escala). Los resultados reales arrojarán bandas más amplias de intensidades variables. En el gel se pueden observar bandas débilmente teñidas que pudieran ser debidas a la presencia de contaminantes.

POCILLO	MUESTRA	CONTENIDO
1 y 6	A	Marcador de proteínas
2 y 7	B	Proteínas séricas de la leche
3 y 8	C	Proteínas séricas de la sangre
4 y 9	D	Proteínas de la clara de huevo
5 y 10	E	Proteínas de la hoja de espinaca