

Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia

Dra. Hilda Marilín García Pérez¹

RESUMEN

Mediante la electroforesis es posible separar moléculas biológicas en dependencia fundamentalmente de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. Se dio una visión general de la electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas en condiciones nativas o desnaturalizadas, se incorporaron nuevos conocimientos tomados de la literatura reciente a los conceptos tradicionales de este método, como son la adición de compuestos de restricción de la difusión y que aumentan la estabilidad de los geles. Se ejemplificó el comportamiento anómalo de algunas proteínas en la determinación del peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizadas.

Palabras clave: electroforesis, poliacrilamida, geles.

La electroforesis es un método analítico – semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937. *Raymond y Weintraub* en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como *Davis y Ornstein*. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). En este trabajo se da un bosquejo general de la electroforesis, si se tiene en cuenta el desarrollo desde su surgimiento hasta el presente.

DESARROLLO

1. Fundamentos de la electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una

combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión,

¹ Master en Ciencias Bioquímicas. Investigadora Agregada.

cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.¹

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas.² En el punto isoelectrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.

2. Métodos electroforéticos zonales

Son útiles para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución de tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente. Como soportes han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa, acetato de celulosa, etcétera.

Este método tiene gran poder resolutivo porque se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple (fuente de poder y cubeta vertical u horizontal donde se coloca el soporte y 2 electrodos). Con el desarrollo de la ciencia se han diseñado equipos automatizados de electroforesis como el *PhastSystem*.

2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.³

2.2. Formación del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato.¹ Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato.⁴ Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno,⁵ por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, etc. Las condiciones óptimas de una buena separación, en la práctica se determinan experimentalmente, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se deben obtener los mejores resultados.⁶

*Bambeck*⁷ reporta que durante la polimerización del gel a temperaturas inferiores a 17 °C, la iniciación del control catalítico y el tiempo de elongación de la cadena comienzan a ser diferencialmente controlables.

2.3. Significación de % T y % C

La concentración de acrilamida (% T) representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 mL) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. La concentración de bis-acrilamida (% C) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

La estructura del gel comienza a ser evidente a 4 % T; 0,2-5 % C.⁸ Los factores que gobiernan la talla del poro del gel son complicados, pero en general el tamaño del poro disminuye con el incremento del %T.⁹ Las proporciones en que ambas se encuentran determinan las propiedades físicas del gel como son densidad, elasticidad, resistencia mecánica y el tamaño del poro. En general se recomiendan valores de T de 5 a 15 % y de C de 2 a 4 %.¹⁰ Para separar moléculas por tamaño, es necesario tomar en cuenta la relación entre el poro efectivo del medio y el tamaño de la molécula que se pretende separar. Si el poro del medio es significativamente mayor que la molécula, la separación electroforética será sobre la base de diferencias de carga y el tamizaje molecular será mínimo. Al aplicar muestras biológicas en un gel con gradiente de acrilamida, todas las macromoléculas comienzan su migración a bajo porcentaje y en la medida en que avanzan se encuentran con poros más pequeños que retardan su movimiento. Las moléculas menores comienzan a tener alta fricción cuando los poros son más pequeños, mientras que las grandes comienzan la fricción en los poros de mayor tamaño.

2.4. Tipos de monómeros

La bis-acrilamida es el agente entrecruzador más comúnmente empleado en este tipo de electroforesis. O'Gaal y otros en 1984,¹⁰ plantearon que la bis-acrilamida puede actuar como terminador de la cadena en el proceso de polimerización y concentraciones altas pueden disminuir el tamaño de poro máximo de gel.

Se han reportado otros agentes entrecruzadores como: la N, N'-diallitar tar diamina (DATD) que da un tamaño de poro mayor que el obtenido con bis-acrilamida; la N, NC-bisacrililcistamina

(BAC) cuyo gel resultante se une por los grupos bisulfuro, lo que hace que pueda disolverse en soluciones de reactivos tiólicos y el N,N'-(1,2-dihidroxietileno) bis-acrilamida o DHEBA forma geles de poros altamente hidrofílicos.⁸

2.5. Catalizadores empleados en la formación del gel de poliacrilamida

La polimerización se lleva a cabo con la utilización de sistemas catalíticos redox como por ejemplo:

- Persulfato de amonio (agente oxidante) y TEMED como agente reductor.
- Persulfato de amonio y 3-dimetilamino propionitrilo (DMAPN).
- Peróxido de hidrógeno, sulfato de hierro y ácido ascórbico.

La polimerización no ocurre a bajo pH, ya que requiere radicales de monómeros libres formados por catálisis básica de radicales oxígeno del persulfato.

La fotopolimerización con riboflavina no es inhibida por el oxígeno, sin embargo, en ambos casos el TEMED actúa como agente reductor suave y acelera la polimerización.¹

2.6. Sistemas de tampón que se emplean en la electroforesis en geles de poliacrilamida

La fuerza iónica (m) determina el potencial electrocinético ya que reduce la carga neta de los grupos con cargas efectivas. Se ha determinado que la movilidad de las partículas cargadas es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la fuerza iónica, a baja m se eleva la velocidad de migración y es menor la difusión, de manera que la zona de separación es más ancha y mayor la resolución.¹ Con el aumento de lam, se incrementa el desprendimiento de calor y la evaporación. En la electroforesis, los efectos de absorción de agua, no-homogeneidad del material, intercambio iónico con grupos cargados del soporte y electroendósmosis, pueden influir sobre la movilidad y la calidad de la separación. La electroendósmosis generalmente ocurre porque grupos cargados del soporte se ionizan en

soluciones tampón neutras o ácidas y los contraiones libres hidratados (H_3O^+) migran hacia el cátodo, esto provoca un movimiento relativo del solvente respecto al soporte sólido y que las moléculas no cargadas sean transportadas hacia el cátodo a pesar de no tener grupos ionizados.

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede realizarse en el rango de pH de 2 a 11, sin embargo la desaminación de las proteínas o las reacciones hidrolíticas pueden ser severas a valores de pH inferiores a 3 y superiores de 10. La mayoría de las proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 4 y 7,5, son separadas en geles con pH entre 8 y 9.

La fuerza iónica del sistema tampón debe mantenerse a un nivel adecuado para garantizar la solubilidad de la muestra y suficiente capacidad amortiguadora. Es usual utilizar concentraciones de tampón en un rango entre 0,025 y 0,1 mol/L, pero pueden emplearse concentraciones sobre 0,5 mol/L en sistemas fuertemente ácidos, pues a bajos valores de pH muchos ácidos débiles (que son los más empleados) están débilmente ionizados y es necesaria una alta concentración para obtener la adecuada capacidad amortiguadora.¹

2.6.1. Sistemas de electroforesis. Electroforesis de múltiples zonas (MZE)

El sistema de electroforesis a emplear depende de los objetivos a alcanzar, los más empleados son gel uniforme y tampón homogéneo, y gel y tampón heterogéneo. La principal desventaja del primero, es que la resolución es menor que con los sistemas heterogéneos, porque no hay efecto concentrador en la primera parte de la corrida. En el sistema discontinuo o heterogéneo se varían el poro del gel y los iones del tampón, por lo que se puede concentrar la muestra.¹¹ Cuando no es necesaria una gran resolución, los sistemas homogéneos tienen la ventaja de ser rápidos, sencillos. Las bandas, especialmente de proteínas pequeñas, son más anchas en el sistema homogéneo que en el heterogéneo, efecto que se compensa con la mayor pendiente de este último.¹²

En la actualidad es común que la electroforesis discontinua se realice con 2 tipos de geles, un gel concentrador (de poros grandes) y un gel separador (de poros pequeños).^{13, 14} Esto se fundamenta en

que los constituyentes iónicos de las soluciones tampones utilizadas en ambos geles son iguales, pero el pH de estas y el tampón de corrida empleado en los electrodos es diferente. La separación ocurre en el gel separador, donde la migración está determinada por la carga y el tamaño molecular de las partículas. Encima de este gel se sitúa el gel concentrador, generalmente de una menor altura (1/3 del gel separador), en el que la muestra se concentra en una zona muy estrecha; lo que determina la separación en bandas finas en el gel separador y alto poder de resolución. El proceso general en PAGE-SDS discontinuo consta de 3 etapas: concentración, desconcentración y resolución.

La teoría de MZE fue formulada por Jovin.¹⁵ Al aplicar esta teoría a un sistema con tris-HCl en ambos geles y tris-glicina como tampón de corrida, se observa que las 2 especies iónicas existentes Cl^- (iones conductores) y glicinato (iones rezagados) migran en la misma dirección que las moléculas de la muestra. Al comenzar la electroforesis, los iones Cl^- tienden a moverse rápidamente, separándose del resto de las especies iónicas y dejando tras de sí una zona de baja conductividad. La conductividad específica es inversamente proporcional a la fuerza del campo eléctrico, se forma un gradiente de voltaje en esta región que acelera el movimiento de los iones rezagados, lo que hace que estos migren en seguida detrás de los iones conductores y a la misma velocidad; de esta manera se forma el denominado límite de Kohlraush, entre los iones conductores y los rezagados (entre las regiones de alto y bajo gradiente de voltaje). Las movilidades de los componentes de la muestra son intermedias entre las de los iones conductores y rezagados, por lo que se encontrarán en la región límite, en capas de solo algunos micrones de grosor.¹ Cuando la muestra concentrada llega a la interfase entre el gel concentrador y separador, ocurren cambios en la movilidad de los constituyentes por causa del pH, la fuerza iónica y el efecto de tamizaje del gel. Dependiendo de los componentes individuales de la muestra estos migran en bandas discretas.

La principal ventaja de la teoría de MZE es la flexibilidad con que puede ser aplicada en el fraccionamiento analítico o preparativo.

2.7. Formatos de la PAGE

Existen 3 formas diferentes de realizar electroforesis en geles de poliacrilamida: lámina vertical, varilla cilíndrica y lámina horizontal.

Los geles más finos son más económicos porque emplean menos reactivos y pueden ser eficientemente refrigerados durante la corrida, por lo tanto pueden ser corridos a mayor voltaje, lográndose así una alta resolución en corto tiempo. Los tiempos de tinción y destinción son menores también porque la difusión es muy rápida; sin embargo como el gel es tan fino es más propenso a perturbaciones y problemas en la polimerización.⁸ Se ha planteado que la resolución de las moléculas generalmente aumenta con la disminución del grosor del gel.¹⁶

2.8. Comportamiento de las proteínas en la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS)

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas.⁴

La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de la electroforesis en gel de poliacrilamida es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$. El anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0,4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad.⁸

El Rf es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de

migración⁴ y se define como la distancia desde el inicio del gel separador hasta el centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ión líder.

La concentración apropiada de SDS en el tampón superior, se determina incrementando la cantidad de SDS hasta que no exista variación en el Rf. Se ha demostrado que concentraciones en el rango de 0,02 a 0,025 % de SDS en el tampón superior es suficiente, sin embargo se utiliza 0,03 % para obtener un margen de seguridad.

El complejo SDS-proteína tiene forma de varilla con un diámetro aproximado de 18 Å y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta mercaptoetanol (β ME) o el DTT desnatura las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. Se ha determinado que con 5 min a 95-100 °C es suficiente para la formación de enlaces estables SDS-proteína a una concentración de 1 % de SDS, en presencia de EDTA y condiciones reductoras. El complejo SDS-proteína es estable durante 3 meses a 4 °C. El SDS migra más rápido que el complejo proteína-SDS en un gel restrictivo, por lo que el SDS no es necesario adicionarlo en los geles si este está presente en la muestra y en el tampón superior, lo que da la ventaja de asegurar las condiciones y la eficiencia de polimerización de los geles sin SDS.⁸

La migración de los derivados proteína - SDS hacia el ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ($\log \text{PM}$).¹⁷ La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la talla de esta deviene en el factor determinante de la separación. El SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas y se compara con un patrón. No obstante Bjellqvist¹⁸ ha reportado que diferentes proteínas de igual talla pueden migrar como una banda única.

Bajo iguales condiciones de pH y temperatura, el SDS y las proteínas se concentran en la misma zona, pero como la cantidad de SDS es muy grande comparada con la de proteínas y su concentración en el gel concentrador se puede regular, se forma una zona de concentración amplia caracterizada

fundamentalmente por ser estable con el frente de corrida y que continuamente aumenta durante la electroforesis dependiendo de la cantidad de SDS introducido en el tampón. Se aprecia una progresiva difusión del borde de migración en la medida en que aumenta la concentración de T.⁸ Estos autores demostraron que el ión glicinato no se concentra con el gel concentrador, lo que puede estar provocado por una interacción entre la glicina y el SDS. La concentración de pequeñas proteínas es difícil en estas condiciones, porque se forman complejos de proteínas y detergentes de igual talla y carga que las micelas de SDS solas, por lo que recomienda el empleo de una mínima cantidad de SDS.

Las condiciones pueden ajustarse dependiendo de como se necesite separar las proteínas (en estado completamente desnaturizada, parcialmente desnaturizada o nativa). Las asociaciones covalentes entre las unidades de proteínas pueden mantenerse omitiendo el β ME del tampón de muestras. En ausencia de este agente reductor los puentes bisulfuro intracatenarios e intercatenarios de la muestra de proteínas permanecen intactos; la movilidad electroforética del complejo SDS proteína se altera bajo estas condiciones de disociación y durante la electroforesis la movilidad de los oligómeros SDS proteínas es menor que con los componentes SDS polipéptidos completamente desnaturizados. Las proteínas pueden mostrar una respuesta individual característica a la reducción, lo que se determina al comparar los geles corridos con β ME o sin este. Adicionalmente las proteínas no reducidas, pueden no estar del todo saturadas con SDS por lo que puede variar su relación peso/peso en su interacción con el detergente. Esto hace que las determinaciones de peso molecular con estas características no tengan la misma confiabilidad que el análisis hecho con polipéptidos del todo desnaturizados. Es necesario la existencia de patrones y proteínas conocidas de igual configuración para una comparación válida. EL SDS-PAGE bajo condiciones reducidas y no reducidas es un método muy útil para el análisis de los puentes bisulfuro que contienen las proteínas. Schuhmacher M y otros¹⁹ en estudios con la lisozima de huevo durante la electroforesis demostraron que el β ME y del DTT forman

aductos bisulfuro con las proteínas. Jeannot MA y Zheng J²⁰ reportaron un método de preparación de la muestra en el que se elimina el SDS del gel.

2.9. Determinación de peso molecular de proteínas. Comportamiento anómalo de diferentes proteínas en electroforesis

El peso molecular (PM) de las proteínas puede determinarse en electroforesis al comparar las movilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones (mezclas de proteínas de peso molecular conocido y que se tiñen uniformemente) de varios rangos de peso molecular, se debe aplicar el que abarque el peso molecular esperado para la proteína que se quiere determinar. Estos patrones deben ser tratados de manera similar a la muestra. En general, cuando las proteínas tienen gran cantidad de carbohidratos en su composición o cuando están unidas a complejos de membrana migran de manera aberrante,⁸ por lo que no son recomendadas como marcadores de peso molecular.

Al realizar un ploteo del log PM de la proteína patrón como función del valor de Rf, se obtiene un gráfico ligeramente sigmoideo. El peso molecular desconocido puede estimarse por el análisis de regresión lineal o por interpolación en la curva del log de PM contra Rf.⁴

El ploteo de Ferguson del log de Rf contra el % T del gel separador para varias proteínas patrones chequea el error sistemático del método, para lo que es importante que estas proteínas muestren uniformidad en su densidad de carga, lo que se determina por la intercepción de sus líneas a 0 % T. Se obtiene un ploteo de Ferguson no lineal en el fraccionamiento de pequeñas proteínas a una alta concentración de gel o de proteínas muy grandes que dan valores de Rf muy pequeños.⁸

El coeficiente de retardación (Kr) da una medida de la influencia del tamizaje sobre la movilidad de las biomoléculas, se ha reportado que es función del peso molecular y existe inclusive para moléculas pequeñas. Los valores de Kr podrían minimizarse para todas las proteínas patrones por selección de valores bajos de C. Con el empleo del ploteo de Ferguson se pueden discriminar las diferencias de carga, el peso molecular y las formas de diferentes isómeros,⁸

así como determinar el peso molecular de estos; sin embargo se pueden encontrar dificultades técnicas cuando varios multímeros de proteínas se analizan.

Existen casos de migraciones anómalas de proteínas como por ejemplo la ferritina y apoferritina de bazo de caballo,⁸ en que se recomienda su empleo para calibrar SDS-PAGE solo bajo adecuadas condiciones de desnaturalización (2 % SDS, agente reductor de bisulfato y 5 min a 100 °C ó 5 h a 37 °C), ya que la apoferritina es inusualmente resistente a la desnaturalización y disociación en subunidades. Puede observarse que en un tampón continuo a pH 7 da una banda con peso molecular de 20 000 y en SDS -PAGE con sistema de tampón discontinuo se aprecian 2 bandas de PM 19 889 y 22 200, lo que puede no ser por causa de un aumento de la resolución en la técnica, sino por diferencias en la concentración de SDS, por lo tanto el fenómeno puede ser explicado por diferencias ocasionales en la estimación del peso molecular de los 2 tipos de SDS-PAGE. Cuando estas proteínas se separan por filtración en gel, sus propiedades geométricas e hidrodinámicas hacen que su talla y características superficiales sean diferentes de otras proteínas globulares típicas, por lo que es necesario tener en cuenta su comportamiento característico.

Zhang J y otros,²¹ hacen un interesante análisis del comportamiento anómalo en cuanto a la determinación de peso molecular, de una proteína recombinante inhibidora de la proteína fosfatasa-1 (denominada inhibidor-3), que es extremadamente hidrofílica y estable al calor. Esta proteína tiene un peso molecular aparente de 23 kD en SDS-PAGE, por gel de filtración, un peso molecular relativo de 55 000 y su peso molecular calculado es de 14 kD. Esta característica se ha descrito también para las proteínas inhibidor-1 e inhibidor-2, que actúan sobre la proteína fosfatasa-1.

Para completar el estudio de peso molecular de proteínas, se ha reportado¹⁹ el análisis por espectrometría de masa por ionización en electroatomización (ESI-MS) para proveer de una determinación exacta del peso molecular de proteínas aisladas y no resueltas por SDS-PAGE. A pesar de que existen otros métodos más recientes para la determinación del peso molecular de proteínas, la electroforesis en geles de poliacrilamida no ha perdido su utilidad.

2.10. Estabilidad de los geles de electroforesis

El principal problema que afecta la estabilidad y la resolución en todos los medios de electroforesis es la absorción y desorción. Las características de tamizaje del gel están fundamentalmente dirigidas por el tamaño del poro y cuando el medio absorbe agua, el tamaño medio del poro se incrementa, esto hace que las moléculas puedan migrar más rápido a lo largo del gel y disminuye la resolución. Pero como la absorción de agua no es uniforme en cada porción del gel, casi siempre es mayor en la región central que en los extremos, por lo que las moléculas localizadas en esta migran a través del gel más rápido que las que están en los extremos, lo que deforma y afecta la reproducibilidad de la electroforesis.

Todos los geles de poliacrilamida absorben agua durante el proceso de polimerización y durante la conservación, pero la tendencia se incrementa con el aumento del porcentaje de acrilamida.

En el sistema de electroforesis con tampón y gel heterogéneos, la diferencia de concentración entre los geles concentrador y separador crea un potencial osmótico entre los 2 geles, lo que provoca que el agua pase del gel concentrador (región de bajo % acrilamida) hacia el separador (región de alto % de acrilamida). Este proceso es muy rápido y continúa hasta que se establezca un equilibrio entre ambos geles como resultado de la difusión del agua al gel separador, por lo que el porcentaje de acrilamida no es estable en el gel separador y es necesario emplear los geles en el día de su preparación.

Cuando se mantiene en tampón, el gel absorbe rápidamente agua de este hasta llegar al equilibrio, lo que provoca inestabilidad en este y dificulta su comercialización. Un gel no tiene una calidad aceptable si presenta poros no uniformes como resultado de la difusión de agua entre el gel de alto porcentaje y la atmósfera.¹⁶ Por todo lo anterior se ha planteado la utilización de compuestos que restringen la difusión, los que pueden ser polioles, polisacáridos, alcoholes poliméricos, etc. Estos compuestos se adicionan en la parte del medio de electroforesis en que se quiere inmovilizar el agua, en el caso de la electroforesis en poliacrilamida cuando está sintetizando el gel concentrador, lo que no afecta

el proceso electroforético que se puede seguir según el método convencional. Si se desea prevenir la difusión de agua desde el tampón hasta el gel, es necesario añadir estos compuestos al tampón.

Los compuestos de restricción de la difusión reportados por CM Starr¹⁶ son moléculas no cargadas hidrofílicas que contrarrestan el potencial osmótico entre 2 geles de electroforesis con diferente potencial osmótico o entre el tampón y el gel. Sin embargo como el potencial osmótico depende de la hidrofiliidad de los compuestos y de la concentración molar, la concentración de un compuesto particular de restricción de la difusión dependerá del desbalance de potencial osmótico que se desee contrarrestar; se necesita una menor concentración para un gel uniforme que la necesaria para un gel discontinuo. El polietilenglicol es el agente hidrofílico de restricción de la difusión más empleado en el gel concentrador en electroforesis de poli(acrilamida). El proceso de difusión de agua es dependiente de la temperatura, por lo que la reducción de la difusión en el medio aumenta también la estabilidad térmica de este. La viscosidad del gel puede controlarse con la adición de polímeros, además se le puede añadir agarosa en concentración de 0,2 a 2 % p/v, dependiendo de la cantidad de monómero y agente entrecruzador que contenga el gel.

2.11. Phastsystem

El equipo *PhastSystem* consiste en un sistema de electroforesis computarizado, en el cual se puede ejecutar focalización isoelectrica, electroforesis y revelar estas automatizadamente. Los geles de electroforesis denominados *PhastGel*, empleados en el equipo *PhastSystem*, tanto para sistema nativo como desnaturizado emplean como tampón acetato 0,112 mol/L y tris 0,112 mol/L a pH 6,4 en ambas zonas. Las longitudes de los geles concentrador y separador son de 13 y 32 mm respectivamente y su grosor de 0,45 mm.

El tampón de electrodo se suministra en forma de tiras de 2 tipos, uno para electroforesis nativa y otro para desnaturizada, hechos con reactivos de alta calidad y agarosa de baja electroendósmosis. Estas crean durante la corrida un sistema de tampón discontinuo o continuo según se desee.

En las tiras para SDS-PAGE se emplea tricina 0,2 mol/L, tris 0,2 mol/L, SDS 0,55 % pH 8,1, agarosa 2 %. Esta alta concentración de SDS en las tiras permite eliminar el SDS del gel.

El PAGE-nativo en equipo *PhastSystem* emplea los mismos geles que el desnaturizado, solo cambia el sistema de tampón en las tiras, que es en este caso de L-alanina 0,88 mol/L y tris 0,25 mol/L pH 8,8 en agarosa 2 % (acetato como iones líderes y L alanina como rezagados). Como el pH del gel toma un valor de 8,8, las proteínas con punto isoelectrico menor que 8,3 se cargan negativamente y migran a través de la zona de concentración.⁸

3. Fuentes de error en la electroforesis

La electroforesis es una técnica muy sensible y puede ser afectada por muchos errores experimentales, estos se reflejan a continuación.

3.1. Temperatura durante la polimerización y la corrida del gel

La movilidad de las proteínas varía entre otras causas porque la viscosidad del agua aumenta a bajas temperaturas (la distancia recorrida es aproximadamente 20 % mayor en la región central que es más caliente). Este efecto puede atenuarse con el empleo de un tampón más diluido o manteniendo temperaturas bajas durante el desarrollo de la electroforesis.

En geles vertidos a 25 °C ocurre mayor variabilidad de los Rf si se comparan con los vertidos a bajas temperaturas. La eficiencia de polimerización incrementa comparativamente a 0 °C por lo que sus propiedades físicas son superiores (para SDS-PAGE) a las de geles polimerizados a 25 °C, posiblemente por una disminución del promedio de la longitud de la cadena de estos últimos.⁸

Un promedio de la desviación estándar de los Rf determinados por geles hechos con la misma mezcla de polimerización es de 0,01, mientras que entre geles hechos de diferentes lotes de polimerización, aunque preparados con idéntica cantidad de catalizadores es de 0,13. Esto está dado porque no es igual el porcentaje de conversión de monómero en polímero.

La uniformidad de la temperatura a través del gel mientras ocurre la corrida electroforética generalmente elimina el efecto de la deformación de las bandas en forma de “sonrisa”.²²

3.2. Velocidad de la polimerización. Niveles de catalizador

Una polimerización muy rápida puede deformar las bandas, porque ocurre una contracción no uniforme del gel, en este caso debe reducirse el TEMED y el persulfato de amonio o adicionar ferricianuro de potasio, con el objetivo de hacer más lenta esta.

El empleo de niveles bajos de catalizador provoca que la superficie del gel se torne desigual y tienda a romperse con facilidad, pero el empleo de altas concentraciones provoca que los geles tiendan a cuartearse. Este problema puede solucionarse en geles de altas concentraciones, al poner una capa de alcohol isobutílico en lugar de agua (en geles de bajas concentraciones deben emplearse alcoholes de altas densidades).

3.3. Pureza de los reactivos

El empleo de reactivos de alta calidad y agua desionizada es un prerrequisito para hacer geles reproducibles y de alta resolución, en particular esto es muy importante para la acrilamida, ya que es el constituyente más abundante del gel y sus principales impurezas son ácido acrílico residual (que puede retardar la movilidad electroforética de algunas proteínas), poliacrilamida lineal e iones.⁴

O Gaal y otros¹⁰ plantearon que el ácido acrílico y otras impurezas pueden ser eliminados por diferentes métodos, entre ellos la recristalización de la acrilamida.

En SDS-PAGE la calidad del SDS es importante, porque las proteínas pueden unirse a impurezas como alquil sulfato C₁₀, C₁₄ y C₁₆, y provocar que una simple proteína forme múltiples bandas en el gel. Con SDS puro ocurre una migración anómala en proteínas muy básicas o muy ácidas, en varias glicoproteínas y lipoproteínas por causa de su composición inusual.⁴

3.4. Tiempo de corrida

La determinación del tiempo adecuado de corrida es muy importante, pues corridas muy cortas impiden que las muestras avancen el espacio necesario para su correcta separación, pero también se ha probado que tiempos de corrida cortos minimizan la dispersión de la muestra y el ensanchamiento de la banda.

3.5. Preparación de las muestras

En el caso de la SDS-PAGE es necesario lograr una completa desnaturalización de las proteínas, para evitar la aparición de bandas fantasmas en la electroforesis (bandas dobles por la concentración de β ME o por el tiempo de incubación).¹²

Seichi y Chait²³ reportaron que la alquilación de la cisteína antes de la electroforesis evita la formación accidental de aductos de acrilamida durante la electroforesis.

4. Tinción

Las proteínas coloreadas naturales como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C, pueden ser observadas directamente en los geles, sin embargo la visualización de la mayoría de las proteínas requiere el uso de colorantes.

Los colorantes orgánicos fueron los que se emplearon primero para teñir proteínas en los geles (ejemplo de estos bromofenol azul, azul de Coomassie, etc.).

Una rápida tinción, destinción y fijación son esenciales en el caso de las proteínas pequeñas para evitar su elusión; la omisión del metanol de la solución de tinción es beneficiosa ya que se reduce el tiempo de tinción y disminuye el hinchamiento de los geles.¹²

Existen diferentes tipos de tinción, entre ellos la plata que es muy sensible y tiene la característica de producir generalmente coloraciones carmelita o negro, sin embargo algunas proteínas tienen colores característicos como las lipoproteínas que tienden a colorearse de azul y algunas glicoproteínas que aparecen amarillas, carmelitas o rojas.²⁴ Este efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata. Se han

desarrollado algunos procedimientos de tinción con plata para identificar ciertas proteínas, con el empleo de combinaciones de tinción.

La tinción con Coomassie puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, pero no para la determinación de pureza de proteínas trazas. Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas.

Se ha reportado la tinción de proteínas por otros métodos entre los que se encuentran: eriocromo negro, compuestos fluorogénicos, modificación de los aminoácidos de las proteínas.⁸

5. Conservación de los geles de electroforesis

Notsu K y Shiratori M²⁵ reportaron sumergir el gel después de electroforesis en una solución de sacaridos, azúcares, alcoholes de más de 4 carbonos y polímeros solubles en agua; después se introduce este entre 2 filmes de celofán transparentes y semipermeables colocado en forma de *sandwich* a ambos lados del gel o en uno y en el otro una lámina plástica. De esta forma los componentes acuosos del gel son reemplazados por los de la solución. Esto permite que el gel se seque, sin causar su ruptura, deformación, pérdida de la transparencia y sin necesidad de emplear calor o presión reducida ni ningún aparato especial. No se han reportado variaciones en geles tratados con este método después de 2 años.

Se recomienda el empleo de un poliol como el glicerol como un agente «húmedo» cuya función es además de actuar como un agente de restricción de la difusión, impedir que el gel se seque por la evaporación durante la conservación, lo que evita la ruptura de este.

AGRADECIMIENTOS

A Gretter Armas García por su colaboración en la realización de este trabajo.

SUMMARY

Electrophoresis makes possible to separate biological molecules depending mainly upon their charge under the influence of an electric field. A general and updated outlook on electrophoresis in polyacrylamide gels for proteins is given. Some traditional concepts about this methods such as the addition of compounds limiting diffusion and that increase the gel stability are analyzed. Examples are given about the abnormal behavior of some proteins in the determination of the molecular weight by electrophoresis in polyacrylamide gels under disnaturated conditions.

Keywords: electrophoresis, polyacrylamide, gels.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chávez Planes MA, Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana, 1990.
2. Nochumson S, inventors; FMC Corporation, assignee. Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium. US patent 4,542,200. 1985 Sep 17.
3. Campell MK. Biochemistry. 2 ed. Saunders: College Publishing. 1995.
4. Garfin DE. One dimensional gel electrophoresis. Methods in enzymology. vol 182. Academic Press. 1990.
5. Moi MK, Chan RT, Becker RG, Chalmers KC, inventors; C C IMEX assignee. Horizontal gel electrophoresis casting cassette. US patent 5 938 906. 1999 Aug 17.
6. Hooper HH inventor; Soane Biosciences assignee, Us-crosslinked polymeric media for electrophoresis. US patent 5 885 432. 1999 march 23.
7. Bambeck SG. Electrophoresis separation gel and method for preparing an electrophoresis separation gel. USA patent number. 5 589 104. (1996)
8. García HM. Adaptación de geles de poliácridamida a sistema PhastSystem. [Tesis de Maestría.] Facultad de Biología UH. Diciembre del 2000
9. Alpenfels WF, Engelhorn S, Manis D inventor; Novel Experimental Technology, assignee. Plastic mold for electrophoresis gel. US patent 5,753,095. 1998 May 19.
10. Gaal O, Medgyesi GA, Vereczkey L. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Akademiai Kiado Budapest: John Wiley & Sons. 1984
11. Sheer DG, Yamane DK, Hawke DH, Pau-Miau Yuan. The use of micro preparative electrophoresis of protein/peptide isolations for primary structure determinations. Peptide Research. 1990; 3 (2).
12. Schägger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Analytical Biochemistry 1987; 166, 368-79.
13. Inzana TJ, Apicella MA. Use of a bilayer stacking gel to improve resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides in polyacrylamide gels. Electrophoresis 1999; 20 (3):462-5.
14. Opplitt JJ, inventor. Discontinuous and nonsequential polymeric gel systems for separation of macromolecules. US patent 5 968 332. 1999 Oct 19.
15. Jovin TM. Multiphasic Zone Electrophoresis. I, II, III y IV. Biochemistry 1973; 12 (5):871-96.

16. Starr CM, inventors; Glyko, Inc., assignee. Utilization of additives and defined storage systems to increase the stability and performance of electrophoresis media. US patent 5,660,702. 1997 Aug 26.
17. Rice S, Browning C, Burke J, Nguyen L, inventors; Genetic Biosystems Inc, assignee. Membrane loader for gel electrophoresis. US patent 5 972 188. 1999 Oct 26.
18. Bjellqvist B. inventor; Pharmacia Biotech AB, assignee. Buffer system for electrophoresis and use thereof. US patent. 6 090 252. 2000 July 18.
19. Schuhmacher M, Glocker MO, Wunderlin M and Przybylski M. Direct isolation of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and analysis by electro spray-ionization mass spectrometry. Electrophoresis 1996; 17(5):848-54.
20. Jeannot MA, Zheng J and Li L. Observation of sodium gel-induced protein modifications in dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis and its implications for accurate molecular weight determination of ge-separated proteins by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. J Am M Spectrum 1999;10 (6):512-20.
21. Zhang J, Zhang L, Zhao S, Lee EY. Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. Biochemistry.1998; 37(47):16728-34.
22. Seichi S, Chait BT. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. Anal Chem 1998; 70 (824):5150-8.
23. Guo Y, Li X, Fang Y. The effects of electroendosmosis in agarose electrophoresis. Electrophoresis. 1998; 19 (8-9):1311-3.
24. Da Woon J, Gyoung Hoon T, Jin Wook L, Chan Jin B, Gil Young K, Gyung Soo Y, Jung Kap C. Detection of proteins in poliacrilamida gels using eriochrome black T rhodamina B. Anal. Biochem.1998; 263:118-120.
25. Notsu K. And Shiratori M, inventors; Daiichi Pure Chemicals Co., assignee. Method for drying polyacrylamide gel after electrophoresis, US patent 5 635 046. 1997 june 3.

Recibido: 10 de enero del 2001. Aprobado: 22 de febrero del 2001.

Dra. *Hilda Marilín García Pérez*. Laboratorios BETERÁ. Calle 102 e/ 31 y 31-B. Marianao. Ciudad de La Habana.Correo electrónico: betera@infomed.sld.cu