

Electroforesis

Conceptos básicos.

Es un proceso de transporte de moléculas cargadas el cual es dirigido por un campo eléctrico aplicado desde el exterior.

Una molécula de carga q en un campo eléctrico E experimenta una fuerza

$$\mathbf{F} = q\mathbf{E}$$

A la fuerza eléctrica se opone una fuerza friccional.

En solución, la fuerza friccional es proporcional a la velocidad, v , de la molécula.

La magnitud de la esta fuerza es fv , (f , coeficiente friccional, refleja el tamaño y forma de la macromolécula).

Bajo dos fuerza opuestas, las moléculas alcanzan rápidamente el estado estacionario, velocidades terminales, con las dos fuerzas iguales

$$qE = fv$$

La movilidad electroforética de la molécula, m , definida como la velocidad al estado estacionario por unidad de campo,

$$m = v/E = q/f,$$

es característica de cada molécula y sus unidades son $\text{cm}^2 / \text{V-sec}$.

La carga como el coeficiente friccional dependen de:

- La composición de las proteínas
- De la naturaleza del solvente
- pH
- Cantidad y tipo de iones en solución
- Presencia de denatürantes, agentes reductores y urea.

Electroforesis en gel.

Es fácil de realizar y se obtienen resultados altamente confiables.

Los geles, estructuralmente son intermedios entre sólidos y líquidos.

De las diferentes matrices, las mas utilizadas son los geles de agarosa y poliacrilamida.

Las características estructurales de ambos geles son muy similares:

- Los polímeros individuales de agarosa y poliacrilamida se combinan en fibras y luego en agregados más grandes.
- Los geles de agarosa se mantienen unidos por enlaces de hidrógeno y los geles de poliacrilamida por enlaces covalentes.
- Ambos tipos de geles existen como distribuciones al azar de material sólido y espacios abiertos, **poros**.

Los poros se definen por la resistencia que el gel imparte al movimiento de partículas cargadas. Esta resistencia varía con el tamaño y forma de las macromoléculas.

Durante la electroforesis las moléculas se mueven entre los poros llenos de buffer. Las regiones densas del gel actúan como barreras para el movimiento.

Geles de agarosa.

- Los poros de la agarosa son más grandes que los geles de poliacrilamida.
- En estos geles se pueden separar proteínas de alto tamaño molecular (500 kDa) y DNA sobre 2000 pares de bases.
- La agarosa es un polímero natural aislado de ciertas algas marinas.
- Los diferentes tipos de agarosa varían en sus propiedades físicas y químicas:
 - Temperatura de gelificación,
 - Fuerza del gel,
 - Porosidad, etc.

Geles de poliacrilamida.

Se forman por la copolimerización de:

Acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y

Entrecruzador bisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$).

Los geles de poliacrilamida se caracterizan por un par de valores,

%T es el porcentaje de monómero incluyendo el entrecruzador,

%C es la proporción de entrecruzador como porcentaje del total de monómero.

El tamaño del poro es función inversa del %T.

Para una concentración de monómero, el tamaño del poro también varía con %C.

La elección del buffer para realizar la electroforesis es fundamental, ya que las proteínas son muy sensibles a la fuerza iónica, pH, especies iónicas, etc.

Electroforesis en condiciones denaturationes

Cuando se incorpora un detergente aniónico al buffer (SDS), la separación electroforética se realiza de acuerdo con el tamaño molecular de las proteínas: se puede usar para determinar el peso molecular de las proteínas.

Las muestras denaturadas, en presencia de SDS y de un agente reductor, adquieren una razón carga/masa uniforme impartida por el SDS (1,4 g SDS/gr de polipéptido).

En estas condiciones las propiedades del detergente prevalecen respecto de las propiedades de la proteína.

- Los polipéptidos cubiertos por SDS toman una forma similar proporcional al tamaño molecular.
- La densidad de carga es independiente del pH (entre 7 y 10).
- La separación en el gel depende del tamaño molecular,
- La separación de polipéptidos en este sistema puede ser usada para estimar su peso molecular.

Varias proteínas no se comportan de la manera descrita.

- Las proteínas que no se denaturan completamente, con puentes disulfuros intactos
- Las glicoproteínas y lipoproteínas
- Proteínas con un alto contenido de lisina y prolina
- Proteínas muy básicas o muy ácidas
- Proteínas muy grandes (cientos de kDa)
- Polipéptidos menores de 12.000 Da

Porque no se produce una saturación completa con el SDS o la razón de carga es anómala respecto del tamaño molecular.

Estimación de la masa molecular

La movilidad electroforética del polipéptido-SDS depende de su masa molecular.

La velocidad de migración del derivado SDS es inversamente proporcional al logaritmo de su masa molecular.

Los polipéptidos-SDS se mueven de una manera predecible, migrando los complejos de mas bajo peso molecular más rápido que aquellos de mas alto PM.

El PM de una proteína se puede estimar a partir de su movilidad relativa en una SDS-PAGE calibrada.

La estimación de la masa molecular está entre las aplicaciones más populares de la electroforesis.

El parámetro más relevante es la movilidad relativa, **Rf**, definido como la razón entre la movilidad de una proteína y la movilidad del frente.

El gráfico del logaritmo de la masa molecular ($\log M$) versus la movilidad relativa (R_f), se ajusta razonablemente bien a una línea recta. La interpolación de los valores de R_f de las proteínas problemas en la curva estándar dará una idea aproximada de su PM.

Isoelectroenfoque

Es un método electroforético para separar moléculas anfotéricas en un gradiente de pH.

La carga neta de una molécula anfotérica depende del pH del medio.

Cuando las proteínas se mueven en un medio en que cambia el pH, su carga neta cambia en respuesta a los cambios de pH.

En un campo eléctrico, una proteína en un gradiente de pH migrará hasta que alcance una posición en el gradiente en la cual la carga neta sea cero.

Para cada proteína existe un pH específico al cual la carga neta es cero. Este pH isoelectrónico, pI , es una propiedad físico-química de cada proteína.

Isoelectro enfoque

Cuando una proteína se coloca en un medio con pH variable y en un campo eléctrico, ésta se moverá hacia el electrodo con carga opuesta.

Durante la migración a través de la gradiente de pH, la proteína capta o pierde protones. Con esto la carga neta y la movilidad disminuirán.

La proteína llegará a un punto en que el pH de la gradiente sea igual a su pl. En ese punto la proteína no tendrá carga y detendrá su movimiento.

De esta manera, las proteínas se condensan en bandas estrechas en la gradiente de pH a su pl individual y característico.

Isoelectro enfoque

Las proteínas alcanzan sus respectivos valores de pI a velocidades diferentes pero permanecen relativamente fijas en esos valores de pH por tiempos relativamente largos.

En la electroforesis convencional las proteínas continúan moviéndose a través del medio hasta que el campo eléctrico se retire.

Las proteínas migran hacia su posición de equilibrio desde cualquier parte del sistema. Así, el punto de aplicación de la muestra es arbitrario.

En efecto, la muestra puede estar distribuida inicialmente a través de todo el sistema de separación.

Es una técnica de alta resolución que puede resolver proteínas que difieren en menos de 0,05 unidades de pH sus valores de pI .

La técnica es rápida y no denaturante y puede ser corrida en forma preparativa como analítica.

La resolución de esta técnica está determinada por la gradiente de pH y el campo eléctrico aplicado.

Las diferencias en pI entre dos proteínas separadas es directamente proporcional a la raíz cuadrada de del pH e inversamente proporcional a la raíz cuadrada del voltaje.

$$\Delta pI \propto [(\text{gradiente de pH} / (\text{voltaje}))^{1/2}.$$

Rangos de pH estrechos y voltajes altos dan una alta resolución (un pequeño ΔpI).

Además del efecto sobre la resolución, campos eléctrico altos también resultan en tiempos de corrida más cortos.

Blotting

Membranas sintéticas unen proteínas y ácidos nucleicos lo suficientemente fuerte como para ser usados para un inmunonsayo en fase sólida.

Las moléculas unidas a la membrana son fácilmente accesibles a anticuerpos o sondas de ácidos nucleicos.

Esto ha llevado al desarrollo de una variedad de procedimientos altamente específicos y sensibles conocidos como **blotting**.

Las proteínas son transferidas desde el gel de la electroforesis a la membrana de soporte de nitrocelulosa, a la cual se unen por fuerzas hidrofóbicas.

Se utiliza la electroforesis para transferir las proteínas desde el gel a la membrana, donde se produce una réplica manteniendo la misma resolución del gel.

Un experimento típico de inmunoblotting consiste en seis pasos interrelacionados:

1. Las proteínas son fraccionadas por electroforesis en geles de poliacrilamida.
2. Las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana donde ellas quedan inmovilizadas como una réplica del patrón de bandas del gel.
3. Los sitios no ocupados por la proteína en la membrana son saturados para evitar la unión inespecífica del anticuerpo.
4. El blot es probado para las proteínas de interés usando anticuerpos específicos.
5. Se usa un anticuerpo secundario, específico para el anticuerpo primario, conjugado con un grupo reportero detectable, como por ejemplo una enzima.
6. La banda de la proteína se visualiza por el grupo reportero.

An ampholyte solution is incorporated into a gel.

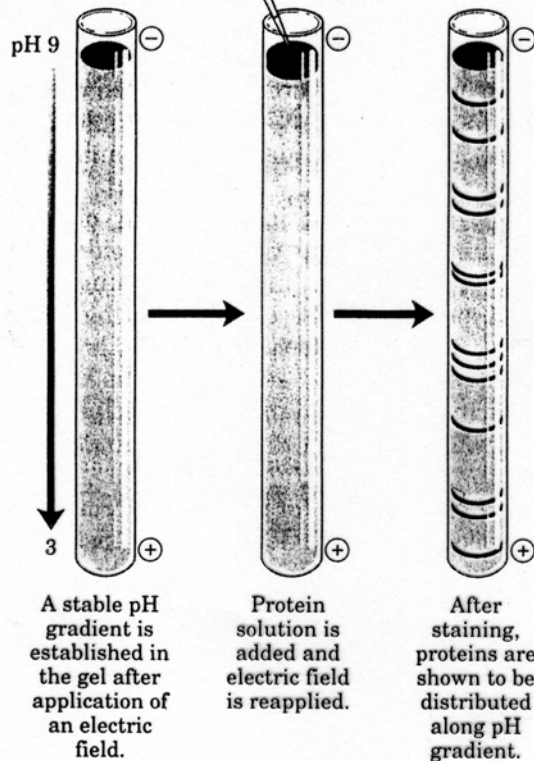


Figure 6-6 Isoelectric focusing. This technique separates proteins according to their isoelectric points. A stable pH gradient is established in the gel by the addition of appropriate ampholytes. A protein mixture is placed in a well on the gel. With an applied electric field, proteins enter the gel and migrate until each reaches a pH equivalent to its pI. Remember that the net charge of a protein is zero when $\text{pH} = \text{pI}$.

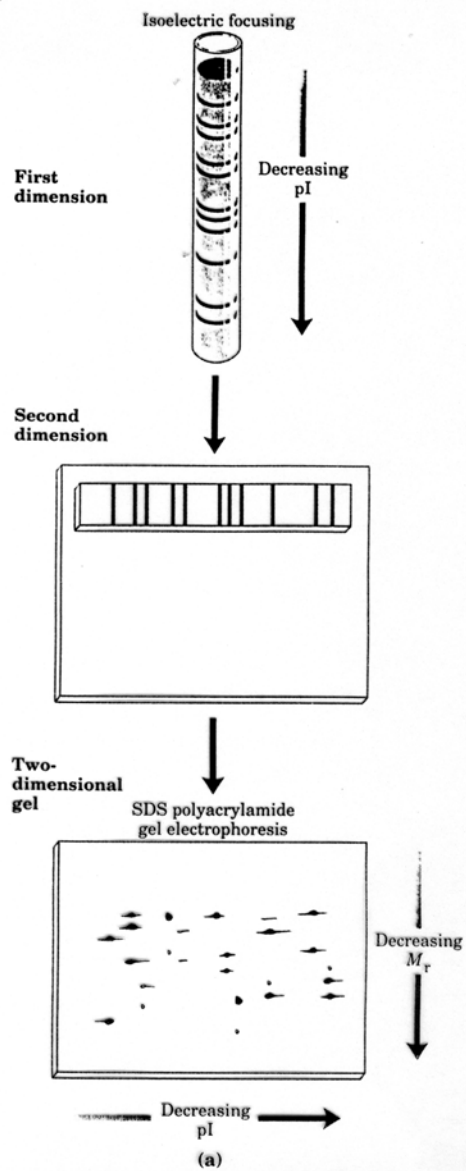
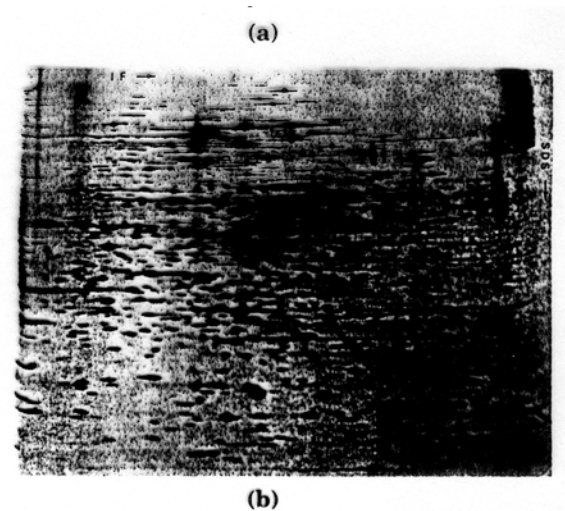
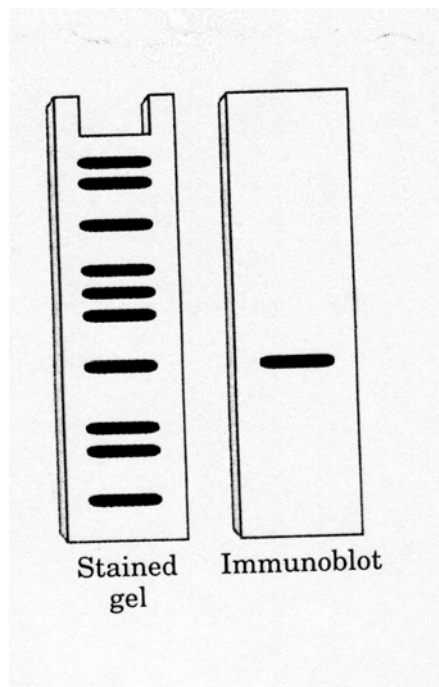
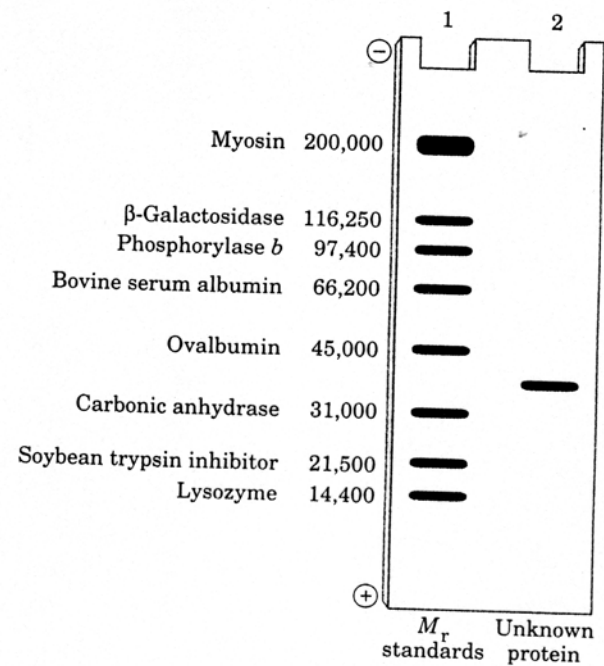


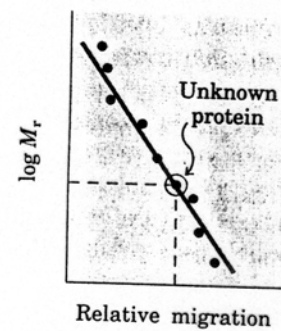
Figure 6-7 Two-dimensional electrophoresis. (a) Proteins are first separated by isoelectric focusing. The gel is then laid horizontally on a second gel, and the proteins are separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In this two-dimensional gel, horizontal separation reflects differences in pI; vertical separation reflects differences in molecular weight. (b) More than 1,000 different proteins from *E. coli* can be resolved using this technique.







(a)



(b)

