

PRÁCTICA 2

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS SÉRICAS SOBRE ACETATO DE CELULOSA

1. Introducción teórica

El fenómeno de electroforesis, se basa en el desplazamiento de partículas portadoras de carga a través de un medio líquido, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado.

La aplicación de este fenómeno a la separación de los componentes de una mezcla compleja hace necesaria la existencia de diferentes velocidades de migración, que a su vez dependen del campo eléctrico aplicado. De aquí que se defina el concepto de *movilidad electroforética* (**m**) como la velocidad de migración para un campo eléctrico de gradiente potencial unidad:

$$m = \frac{V}{E}$$

La movilidad es proporcional a la relación Carga/masa. Pudiéndose alterar por otros factores, tales como volumen de la partícula cargada, posibilidad de solvatación, interacciones iónicas, viscosidad del medio Por eso se hace necesario controlar adecuadamente las condiciones experimentales (pH, temperatura, fuerza iónica,...) de forma que si las únicas variables son el tiempo de migración y el gradiente de potencial aplicado, los valores obtenidos para la movilidad pueden ser reproducibles.

De entre los diferentes tipos de electroforesis existentes, la más empleada para separar las proteínas del suero sanguíneo es la electroforesis de zona, con ella se consigue una distribución de los componentes de las zonas perfectamente delimitadas, puesto que las partículas cargadas se desplazan a velocidades constantes a través de un medio soporte.

La utilización de los diferentes soportes modificará las movilidades y, por lo tanto, el tiempo necesario de aplicación del potencial, para poder realizar una separación completa entre los distintos componentes del suero.

Las macromoléculas de proteínas se comportan como partículas coloidales cargadas. Las cargas positivas son portadas por las funciones básicas de restos de lisina, arginina y los aminoácidos N-terminales, mientras que las negativas las proporcionan los grupos carboxílicos de los restos glutámico, aspártico y los aminoácidos C-terminales. La carga total será la que condicione la movilidad electroforética y aquella a su vez está condicionada por el pH del medio, pues es conocido que a pH ácido se inhibe la disociación de los grupos ácidos y con un pH básico se consigue reprimir la disociación de los grupos básicos. Entre estos valores extremos de pH existe el denominado *punto isoeléctrico* (**p.i.**) que es el pH para el cual una proteína en disolución salina presenta una carga global nula, es decir, el mismo número de cargas positivas y negativas.

Si una disolución de proteínas se somete a la acción de un campo eléctrico se producirá una migración cuyo sentido y velocidad dependerá de la carga neta, magnitud y forma de las moléculas. En la zona de pH menor que el **p.i.** las proteínas se comportan como cationes y si el pH del medio es superior al **p.i.** se comportan como aniones.

A partir de pH 8.4 las proteínas séricas migran hacia el ánodo, la albúmina con un p.i. de 4.7 estará cargada más negativamente que la γ -globulina que tiene un p.i. de 7.2, la albúmina recorrerá mayor distancia que la γ -globulina cuando se sitúen en un campo eléctrico. Las fracciones que se obtienen son:

- Albúmina (la más negativa)
- $-\alpha_1$ -globulina
- $-\alpha_2$ -globulina
- $-\beta$ -globulina
- $-\gamma$ -globulina (la menos negativa)

Para identificar la presencia y separación de proteínas hay que realizar un revelado mediante colorantes ácidos (azul de bromofenol, negro amido, rojo Ponceau A, etc...) que se fijan sobre las funciones básicas de las proteínas. El exceso de colorante se arrastra con mezclas acético-agua, metanol-acético-agua.

Existen dos procedimientos para cuantificar las fracciones electroforéticas:

a) Por *densitometría*: se emplea un fotómetro que permite cuantificar el colorante fijado a diferentes distancias del punto de aplicación de las proteínas, y con ello la representación gráfica de la separación y que se conoce como *espectro electroforético*.

b) Por *elución*, cortando el soporte correspondiente a las zonas de separación observadas y eluyendo el colorante fijado en el disolvente adecuado. La medida posterior de la absorbancia de estas disoluciones permite calcular la proporción de las fracciones separadas.

2. Parte experimental

a. Instrumental y productos

1 Gradilla
5 Tubos de ensayo con tapón
2 Cubetas electroforéticas con cables y puentes
2 Pipetas Pasteur
1 Tijeras
1 Aplicador de muestras semi-micro
2 Chupetes
2 Pinzas
2 Cubetas para decolorar
1 Probeta de 100 mL
1 Embudo
1 Pera de goma
2 Vasos de precipitados de 100 mL
2 Vasos de precipitados de 250 mL
2 Pipetas de 5 mL
2 Pipetas de 10 mL
1 Soporte para pipetas
Papel Parafilm
Tiras de acetato de celulosa
Alimentador de corriente
Agitador orbital
Acético glacial 1 L
Metanol 1 L
Solución colorante Negro amido
Suero problema

b. Soluciones de trabajo

Solución colorante

Negro amido	0.5 g
Metanol	45 mL
Agua destilada	45 mL
Ácido acético glacial	10 mL

Solución decolorante

Solución transparentadora

c. Procedimiento experimental

1. Sumergir las tiras de acetato de celulosa durante, al menos 10 minutos, en la solución tampón.
2. Absorber el exceso de tampón de las tiras colocándolas entre 2 hojas de papel de filtro.
3. Colocar las tiras en el puente con la cara mate hacia arriba (la esquina cortada debe quedar abajo a la derecha).
4. Realizar la siembra de la muestra a 1 cm del extremo catódico (compartimento con carga negativa).
5. Conectar la fuente de alimentación a 200 v. durante 60 minutos (una vez pasado el tiempo desconectar el alimentador).
6. Revelado:
 - a) Tinción: colocar las tiras en una bandeja y cubrir con la solución colorante de Negro amido, durante 10 minutos y en agitación continua (Recuperar el colorante a su botella).
 - b) Decoloración: lavar las tiras una vez con 40 mL. de solución decolorante durante 2 minutos.
 - c) Transparentado: lavar 3 veces con 40 mL de solución transparentadora, durante 5 minutos cada lavado y en agitación continua, hasta que el fondo de la tira quede completamente blanco (depositar las soluciones de lavado en un recipiente de residuos).
7. Cuantificación: Colocar las tiras extendidas sobre un portaobjetos y dejar 24h hasta que se transparenten completamente. Para acelerar el proceso de transparentado es conveniente colocarlas bajo la luz del flexo durante unos minutos. Una vez transparentadas leer el proteinograma en el fotodesnsitometro, introduciéndole el valor de proteínas totales obtenido por refractometría para realizar la cuantificación de cada fracción proteica.

Datos, medidas y cálculos