

PRÀCTICA 2

SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES SÈRIQUES SOBRE ACETAT DE CEL·LULOSA

1. Introducció teòrica

El fenomen d'electroforesi es basa en el desplaçament de partícules portadores de càrrega a través d'un medi líquid, sota la influència d'un camp elèctric aplicat.

L'aplicació d'aquest fenomen a la separació dels components d'una mescla complexa fa necessària l'existència de diferents velocitats de migració que, de volta, depenen del camp elèctric aplicat. D'ací que es defineix el concepte de *mobilitat electroforètica* m com la velocitat de migració per a un camp elèctric de gradient potencial unitat:

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

La mobilitat és proporcional a la relació càrrega/massa podent-se alterar per altres factors tals com volum de la partícula carregada, possibilitat de solvatació, interaccions iòniques, viscositat del medi, etc. Per això es fa necessari controlar adequadament les condicions experimentals (pH, temperatura, força iònica, etc.), de forma que si les úniques variables són el temps de migració i el gradient de potencial aplicat, els valors obtinguts per a la mobilitat poden ser reproduïbles.

D'entre els diferents tipus d'electroforesi existents, la més utilitzada per a separar les proteïnes del sèrum sanguini és l'electroforesi de zona; amb ella s'aconsegueix una distribució dels components de les zones perfectament delimitades, puix que les partícules carregades es desplacen a velocitats constants a través d'un medi suport.

La utilització dels diferents suports modificarà les mobilitats i, per tant, el temps necessari d'aplicació del potencial, per a poder realitzar una separació completa entre els diferents components del sèrum.

Les macromolècules de proteïnes es comporten com partícules col·loïdals carregades. Les càrregues positives són portades per les funcions bàsiques de restos de lisina, arginina i els aminoàcids N-terminals, mentre que les negatives les proporcionen els grups carboxílics dels restos glutàmic, aspàrtic i els aminoàcids C-terminals. La càrrega total serà la que condicione la mobilitat electroforètica i aquella de volta està condicionada pel pH del medi, ja que és conegut que a pH àcid s'inhibeix la dissociació dels grups àcids i amb un pH bàsic s'aconsegueix reprimir la dissociació dels grups bàsics. Entre aquests valors extrems de pH existeix el denominat *punt isoelèctric* (p.i.) que és el pH per al qual una proteïna en dissolució salina presenta una càrrega global nul·la, és dir, el mateix nombre de càrregues positives i negatives.

Si una dissolució de proteïnes es sotmet a l'acció d'un camp elèctric es produirà una migració de la qual sentit i velocitat dependrà de la càrrega neta, magnitud i forma de les molècules. En la zona de pH menor que el p.i. les proteïnes es comporten com cations i si el pH del medi és superior al p.i. es comporten com anions.

A partir de pH 8,4 les proteïnes sèriques migren cap a l'ànode, l'albumina amb un p.i. de 4,7 estarà carregada més negativament que la γ -globulina que té un p.i. de 7,2, l'albumina recorrerà major distància que la γ -globulina quan es situen en un camp elèctric. Les fraccions que s'obtenen són:

- Albumina (la més negativa),
- $-\alpha_1$ -globulina,
- $-\alpha_2$ -globulina,
- $-\beta$ -globulina,
- $-\gamma$ -globulina (la menys negativa).

Per a identificar la presència i separació de proteïnes, cal realitzar un revelat mitjançant colorants àcids (blau de bromfenol, negre amido, roig Poinceau A, etc.) que es fixen sobre els grups funcionals bàsics de les proteïnes. L'excés de colorant s'arrossega amb mescles acètic-aigua, metanol-acètic-aigua, etc.

Existeixen dos procediments per a quantificar les fraccions electroforètiques:

a) Per *densitometria*: s'utilitza un fotòmetre que permet quantificar el colorant fixat a diferents distàncies del punt d'aplicació de les proteïnes, i amb això la representació gràfica de la separació i que es coneix com *espectre electroforètic*.

b) Per *elució*, tallant el suport corresponent a les zones de separació observades i eluint el colorant fixat en el dissolvent adequat. La mida posterior de l'absorbància d'aquestes dissolucions permet calcular la proporció de les fraccions separades.

2. Part experimental

a. Instrumental i reactants

1 Gradeta de tubs d'assaig.
5 Tubs d'assaig amb taps.
2 Cubetes electroforètiques amb cables i ponts.
2 Pipetes Pasteur (comptagotes).
1 Tisoires.
1 Aplicador semimicro de mostres.
2 Pipes per a pipetes Pasteur.
2 Pinces.
2 Cubetes per a descolorar.
1 Probeta de 100 mL.
1 Embut de forma alemanya.
1 Pera de succió.
2 Vasos de precipitats de 100 mL.
2 Vasos de precipitats de 250 mL.
2 Pipetes de 5 mL.
2 Pipetes de 10 mL.
1 Gradeta per a pipetes.
Paper Parafilm
Tires d'acetat de cel·lulosa.
Alimentador de corrent.
Agitador orbital.
Àcid acètic glacial 1L.
Metanol 1L.
Dissolució colorant negre amido.
Sèrum problema.

b. Dissolucions de treball

Dissolució colorant

Negre amido	0,5g,
Metanol	45mL,
Aigua destil·lada	45mL,
Àcid acètic glacial	10mL.

Dissolució descolorant

Dissolució transparentadora

c. Procediment experimental

1. Submergir les tires d'acetat de cel·lulosa durant al menys 10min en la dissolució tampó.
2. Absorbir l'excés de tampó de les tires col·locant-les entre 2 fulls de paper de filtre.
3. Col·locar les tires en el pont amb la cara mate cap a dalt (l'esquina cortada cal quedar baix a la dreta).
4. Realitzar la sembra de la mostra a 1cm de l'extrem catòdic (compartiment amb càrrega negativa).
5. Connectar la font d'alimentació a 200V durant 60min (una vegada passat el temps desconectar l'alimentador).
6. Revelat:ge:
 - a) Tintatge: col·locar les tires en una safata i cobrir amb la dissolució colorant de negre amido durant 10min i en agitació continua (RECUPERAR el colorant a la seva ampolla).
 - b) Descoloració: Rentar les tires una vegada amb 40mL de dissolució descolorant durant 2min.
 - c) Transparentat: Rentar tres vegades amb 40mL de dissolució transparentadora durant 5min cada rentat i en agitació continua, fins que el fons de la tira quede completament blanc (dipositar les dissolucions de rentat en un atuell de RESIDUS).
7. Quantificació: Col·locar les tires esteses sobre un portaobjectes i deixar 24h fins que es transparenten completament. Per accelerar el procés de transparentat és convenient col·locar-les sota la llum del flexo durant uns minuts. Una vegada transparentades llegir el proteinograma en el fotodensímetre, introduint-le el valor de proteïnes totals obtingut per refractometria per a realitzar la quantificació de cada fracció proteica.

Dades, mesures i càlculs