

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es desarrollar el conocimiento de la estructura de las proteínas y determinar el peso molecular de proteínas desconocidas mediante **ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS**

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Marcador de Proteínas estándar A	Congelador
Proteína 1 desconocida B	Congelador
Proteína 2 desconocida C	Congelador
Proteína 3 desconocida D	Congelador
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Temperatura ambiente
Hojas de Protein InstaStain	Temperatura 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 (80 ml).
- Metanol (150 ml).
- Glicerol (15 ml).

3. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son una clase muy diversificada de biomoléculas. Las diferencias en sus propiedades químicas, tales como la carga, grupos funcionales, forma, tamaño y solubilidad, les permitan realizar muchas funciones biológicas. Estas funciones incluyen la catálisis enzimática, la regulación metabólica, la unión y el transporte de moléculas pequeñas, la regulación génica, la defensa inmunológica y la estructura celular. La determinación del peso molecular de una proteína es de importancia fundamental para su caracterización bioquímica.

La electroforesis en gel de SDS se usa comúnmente para obtener estimaciones de peso molecular fiables para polipéptidos desnaturalizados. Otras técnicas para la determinación de pesos moleculares muy precisos incluyen ultracentrifugación analítica y dispersión de la luz. Sin embargo, estos métodos requieren grandes cantidades de proteínas altamente purificadas y sofisticados equipos de elevado coste.

Una proteína puede tener una carga positiva o negativa neta, dependiendo de su composición de aminoácidos y el pH. En ciertos valores de pH de las soluciones, la molécula puede ser eléctricamente neutra, es decir, negativa y cargas positivas están en equilibrio. En presencia de un campo eléctrico, las proteínas con cargas netas migran hacia los electrodos de carga opuesta.

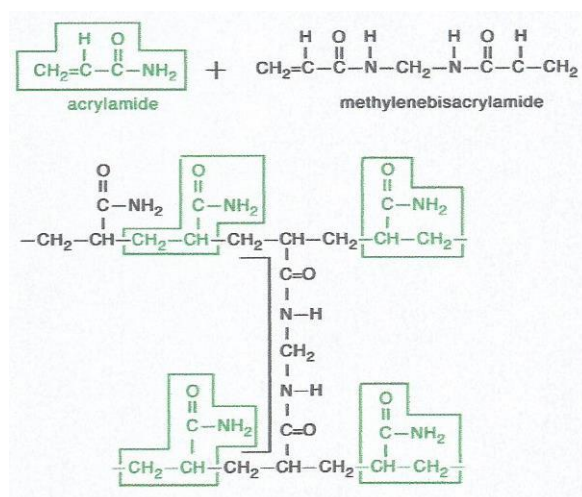
Las proteínas presentan diferentes formas tridimensionales y los patrones de plegado están determinados por sus secuencias de aminoácidos y procesamiento intracelular. La configuración tridimensional precisa de una proteína es crítica para su función. Las formas que pueden tener estas moléculas son esférica, elíptica o en forma de varilla. El peso molecular depende del número y tipo de aminoácidos de la cadena polipeptídica. Las proteínas pueden consistir en un solo polipéptido o varios polipéptidos específicamente asociados unos con otros. Las proteínas que se encuentran en sus formas normales, biológicamente activas se llaman nativas.

Las propiedades físico-químicas de las proteínas afectan a la forma en que migran durante la electroforesis en gel. Los geles utilizados en electroforesis (por ejemplo, agarosa, poliacrilamida) consisten en poros microscópicos de un intervalo de tamaño definido que actúa como un tamiz molecular. Sólo las moléculas con carga neta migrarán a través del gel cuando está en un campo eléctrico. Las moléculas pequeñas pasan a través de los poros más fácilmente que los grandes. Las moléculas que tienen más carga que otros de la misma forma y tamaño migrarán más rápido.

Las moléculas de la misma masa y carga pueden tener diferentes formas. En tales casos, aquellas con forma más compacta (de esfera) migrarán a través del gel más rápidamente que aquellos con una forma alargada, como una varilla. En resumen, la carga, tamaño y forma de una proteína nativa afectan a todas sus tasas de migración electroforética.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se forman mezclando el monómero, la acrilamida, el agente de reticulación, metilenbisacrilamida, y un generador de radicales libres, persulfato de amonio, en tampón acuoso. La polimerización libre de la acrilamida se produce. Los polímeros de acrilamida están unidos entre sí como se muestra en la figura.



El tamaño de poro en los geles de poliacrilamida se controla por la concentración de gel y el grado de reticulación del polímero. La movilidad electroforética de las proteínas se ve afectada por la concentración de gel. Geles porcentuales más altos son más adecuados para la separación de polipéptidos más pequeños. Los geles de poliacrilamida también pueden ser preparados para tener un gradiente de concentraciones de gel. Típicamente, la parte superior del gel (en virtud de los pocillos de muestras) tiene una concentración de 5%, aumentando linealmente hasta el 20% en la parte inferior. Geles de gradiente pueden ser útiles en la separación de mezclas de proteínas que cubren una amplia gama de pesos moleculares. Los geles de concentración homogénea como los utilizados en este experimento son mejores para conseguir una separación de proteínas que se mueven en rangos pequeños en la diferencia de sus pesos moleculares.

Cabe señalar que la acrilamida es una neurotoxina y puede ser absorbida a través de la piel. Sin embargo, en la forma de poliacrilamida polimerizada no es tóxica. El proceso de polimerización es inhibida por el oxígeno. Por consiguiente, los geles de poliacrilamida se prepararon con más frecuencia entre las placas de vidrio separadas por tiras llamadas espaciadores. Como la mezcla de acrilamida líquido se vierte entre las placas, el aire es desplazado y el producto de polimerización se produce más rápidamente.

El Dodecilsulfato de sodio (SDS) es un detergente que consiste en una cadena de hidrocarburo unido a un grupo sulfato altamente cargado negativamente. Las proteínas que contienen varias cadenas de polipéptidos que se asocian sólo por fuerzas no covalentes se pueden disociar por el SDS en cadenas de polipéptidos desnaturalizados.

Durante la electroforesis, las proteínas migran a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad que es inversamente proporcional a su peso molecular. En otras palabras, cuanto menor sea el polipéptido desnaturalizado, más rápido migrará. El peso molecular de un polipéptido desconocido se obtiene mediante la comparación de su posición después de la electroforesis con las posiciones de las proteínas desnaturalizadas estándar. Los pesos moleculares de las proteínas estándar se han determinado previamente. Después de que las proteínas se visualizan por tinción y decoloración, se mide su distancia de migración. El log₁₀ de los pesos moleculares de las proteínas estándar se representa frente su distancia de migración. Tomando el logaritmo R_f permite que los datos se representen gráficamente como una línea recta. El peso molecular de las proteínas desconocidas se calcula fácilmente a partir de la curva estándar.

MUESTRAS DE PROTEÍNAS PARA ESTE EXPERIMENTO

Los marcadores de proteínas estándar (pocillos 1 y 6) son una mezcla de proteínas que dan los siguientes pesos moleculares: 94000; 67000; 38000; 30000; 20000 y 14000 Da. Los valores se han redondeado para mayor comodidad en el análisis gráfico.

Las muestras de proteínas se han desnaturalizado con el detergente aniónico sodio dodecil sulfato (SDS). En las condiciones experimentales, las proteínas tendrán una movilidad en el gel que es inversamente proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares. Las proteínas de pesos moleculares conocidos se separarán por electroforesis en paralelo y se utilizan para estimar los pesos moleculares de las muestras de proteínas desconocidas por análisis gráfico. Todas las muestras de proteína contienen tampón, SDS, β -mercaptoetanol como agente reductor para los enlaces disulfuro, glicerol para crear una densidad mayor que la del tampón y el colorante cargado negativamente azul de bromofenol para hacer el seguimiento de la electroforesis y migrará por delante de las proteínas más pequeñas en estas muestras hacia el electrodo inferior positivo.

Dado que las proteínas están precoloreadas, las bandas individuales serán visibles durante la electroforesis. Después de la electroforesis, las mediciones preliminares se pueden realizar sin necesidad de retirar el gel de la casete de plástico.

Las proteínas precoloreados se pueden hacer más visibles mediante la colocación del gel en solución de tinción. Las proteínas se precipitan por lo general durante el procedimiento de tinción por un proceso llamado fijación. La fijación es necesaria para evitar la difusión de proteínas, lo que provoca bandas borrosas y de intensidad reducida. Los agentes de fijación a menudo incluyen el ácido acético y metanol. **Protein InstaStain® es un nuevo método patentado de tinción disponible exclusivamente en EDVOTEK®.**

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es desarrollar un conocimiento básico de la estructura de las proteínas y determinar el peso molecular de proteínas desconocidas mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida-SDS.

4.1 Precauciones

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. La acrilamida no polimerizada es una neurotoxina y debería ser manipulada con mucho cuidado en una cabina adecuada.

7. La acrilamida polimerizada, como pueden ser los geles preparados, son seguros pero deben ser manipulados con guantes.

4.2 Preparaciones Previas

Las preparaciones previas puede realizarlas el profesor o los estudiantes.

ORGANIZACIÓN DE ESTE KIT

Este kit contiene reactivos para 6 grupos de estudiantes compartiendo 3 geles de poliacrilamida (2 grupos por gel) y lleva suficiente tampón de electroforesis para 3 aparatos de electroforesis vertical.

Los geles de poliacrilamida no están incorporados, usted puede realizar sus propios geles de poliacrilamida, o bien, comprar nuestros geles preparados.

El experimento se divide en 2 partes:

- 1) Separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida.
- 2) Determinación del peso molecular de las proteínas desconocidas.

TIEMPO APROXIMADO PARA LAS PREPARACIONES PREVIAS Y PROCESOS DEL EXPERIMENTO

1. Las preparaciones previas pueden llevar a cabo 20 minutos.
2. Los estudiantes pueden requerir 15 minutos para preparar las muestras y la carga en el gel de poliacrilamida.
3. La electroforesis tiene una duración de 1h o 1.5 h dependiendo del voltaje.

RECONSTITUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS LIOFILIZADAS

Cada microtubo contiene material suficiente para sembrar 6 pocillos del gel.

1. Añadir 130 μ l de agua destilada a todos los microtubos (A a D) y permitir que el material se rehidrate durante varios minutos. Vortex o mezclar vigorosamente.
2. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, llevar a ebullición.
3. Asegurarse que los microtubos están bien tapados, utilizar los microtubos con tapón a rosca y marcarlos. La parte inferior de los microtubos deben ser empujados a través del papel de aluminio y estar inmersos **en agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se debería mantener suspendidos por el papel de aluminio. Se puede también utilizar para ello algún sistema de laboratorio para hacer flotar las muestras.
4. Pida a los estudiantes cargar las muestras en el gel de poliacrilamida, **mientras que las muestras están todavía calientes para evitar la agregación. El volumen de muestra a cargar es de 20 μ l.**
5. Conservar las muestras no utilizadas a -20°C y repetir los pasos 2 y 3 cuando se vuelvan a utilizar.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

Preparar el Tampón de electroforesis 1X, añadir 1 parte del **Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X) concentrado** a 9 partes de agua destilada.

TIEMPO DE LA ELECTROFRESIS

La disponibilidad de su tiempo determinará el voltaje y la longitud que correrán las proteínas. **Se recomiendan 125 voltios durante 60-75 minutos.**

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FIJACIÓN PARA LA TINCIÓN

Solución de fijación:

50 ml metanol; 10 ml ácido acético glacial; 40 ml agua destilada.

5. PRÁCTICA

1) Desnaturalización de las proteínas

Las muestras son proteínas desnaturalizadas que tienden a formar agregados moleculares y partículas insolubles. El calentamiento produce la rotura de los agregados meta-estables de las proteínas desnaturalizadas.

- Si las muestras de proteínas (tubos A a D) no han sido calentados por el profesor, realizar el calentamiento de las muestras.

1. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, llevar a ebullición.

2. Asegurarse que los microtubos están bien tapados, utilizar los microtubos con tapón a rosca y marcarlos. La parte inferior de los microtubos deben ser empujados a través del papel de aluminio y estar inmersos en **agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se deberían mantener suspendidos por el papel de aluminio. Se puede también utilizar para ello algún sistema de laboratorio para hacer flotar las muestras.

3. Proceder con la electroforesis de proteínas.

- Si las proteínas han sido ya calentadas por el profesor, proceder con la electroforesis de las proteínas.

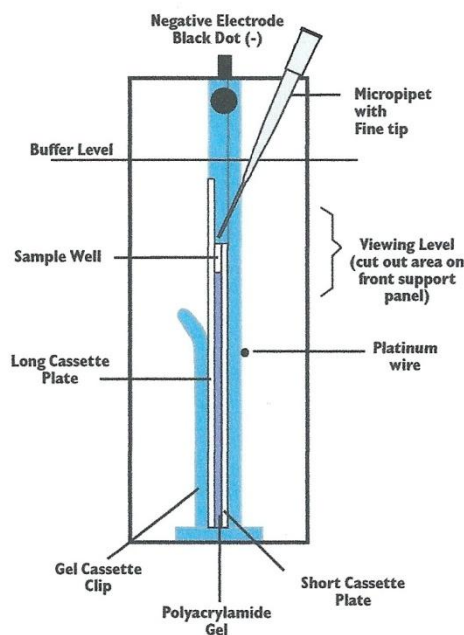
Una vez han sembrado o cargado las muestras para la electroforesis, volver a congelar las muestras de proteínas no utilizadas. Cuando se vuelvan a utilizar para otra electroforesis, se deben repetir los pasos 1 al 3.

2) Electroforesis de las proteínas

A) Preparación del gel de poliacrilamida

1. Abra la bolsa que contiene el casete de gel con unas tijeras. Retire el casete y colóquelo sobre la mesa de trabajo con la parte delantera hacia arriba.
2. Algunas casetes tendrán cinta en la parte inferior de la placa frontal. Quitar toda la cinta para exponer la parte inferior del gel para permitir el contacto eléctrico.
3. Inserte el gel casete en la cámara de electroforesis.

- Quite el peine mediante la colocación de sus pulgares en las marcas y empujando (presionando) hacia arriba, con cuidado y lentamente.



- Coloque el casete de gel en la unidad de electroforesis en la orientación adecuada. Las muestras de proteínas no se separarán en geles que no están orientadas correctamente. Siga las instrucciones que acompañan al aparato específico.
- Añadir el tampón de electroforesis 1X dentro de la cámara. Los pozos de la muestra y la placa posterior de la casete de gel deben ser sumergidas bajo el buffer.
- Enjuague cada pocillo con tampón de electroforesis utilizando una pipeta de transferencia.
- El gel está listo ahora para la práctica de carga y / o muestras de gel. Practiar la carga se puede hacer mediante el microtubo suministrado "Practice Gel Loading Solution".

B) Siembra o carga de las muestras de proteínas

- 2 grupos de estudiantes compartirán un gel.
- Cambiar de punta cada vez que se siembra una muestra de proteína.
- Las proteínas deberían ser sembradas en el siguiente orden:

GRUPO A

Pocillo 1	20 microlitros tubo A	Marcador de proteínas estándar
Pocillo 2	20 microlitros tubo B	Proteína 1 desconocida
Pocillo 3	20 microlitros tubo C	Proteína 2 desconocida
Pocillo 4	20 microlitros tubo D	Proteína 3 desconocida

GRUPO B

Pocillo 6	20 microlitros tubo A	Marcador de proteínas estándar
Pocillo 7	20 microlitros tubo B	Proteína 1 desconocida
Pocillo 8	20 microlitros tubo C	Proteína 2 desconocida
Pocillo 9	20 microlitros tubo D	Proteína 3 desconocida

C) Correr el gel

Configurar la fuente de energía al voltaje deseado y correr el gel. **Se recomiendan 125 voltios durante 60-75 minutos.**

3) Tinción del gel con Protein InstaStain

Los geles de poliacrilamida pueden ser teñidos de una forma muy fácil con las hojas de Protein InstaStain. La tinción es rápida, sensible y los geles están listos para su visualización en 1-3 horas.

Los geles de poliacrilamida son muy finos y frágiles. Tener cuidado al manipular el gel para evitar que se rompa.

1. Añadir aproximadamente 100 ml de Solución de fijación en una pequeña bandeja.

Solución de fijación:

50 ml metanol; 10 ml ácido acético glacial; 40 ml agua destilada.

2. Transferir la placa posterior del casete con el gel en la bandeja de la solución de fijación. Humedecerse los dedos protegidos con guantes con solución fijadora y suavemente empujar el gel de la placa posterior y retire la placa, dejando el gel sumergido en la solución fijadora.

3. Flotar suavemente una hoja de Protein InstaStain con la cara azul en el líquido. Retirar la hoja de Protein InstaStain después de 30 minutos.

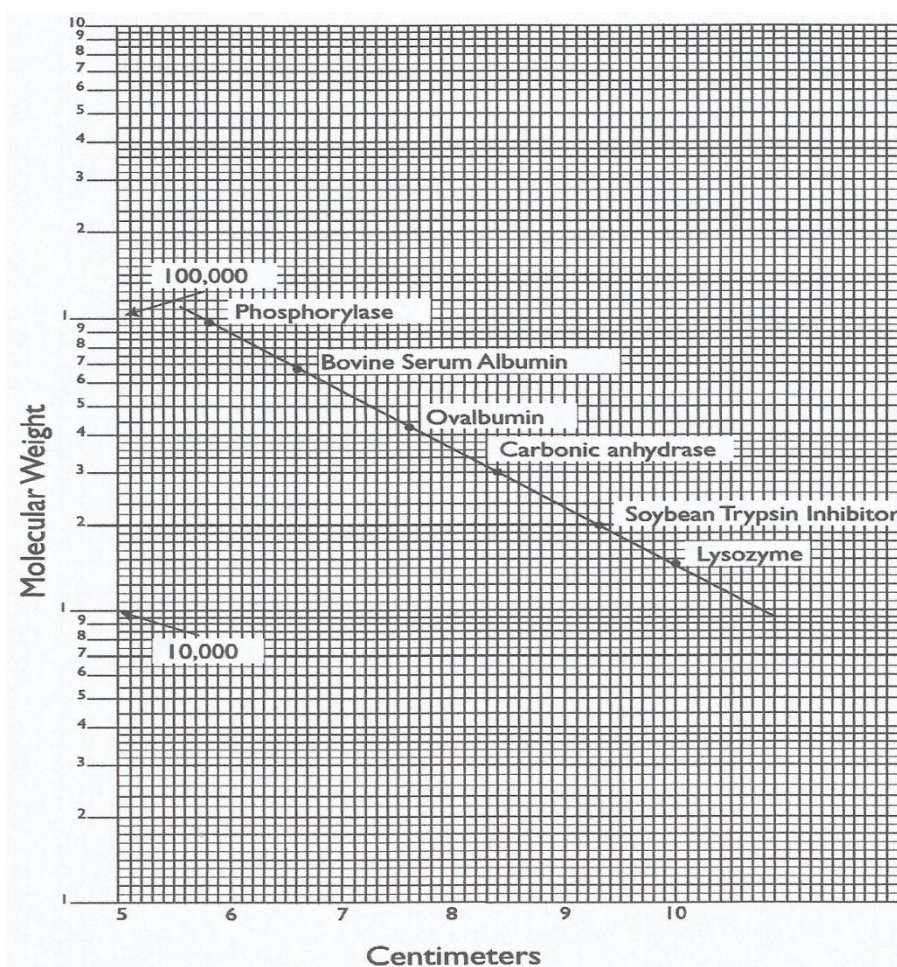
4. Cubrir la bandeja de tinción para prevenir la evaporación.

5. Suavemente agitar en algún dispositivo de laboratorio durante 1-3 horas o toda la noche.

6. Después de la tinción, las bandas de proteínas aparecerán de un color azul medio a oscuro.

El gel se puede desteñir si el "background" es demasiado oscuro mediante varios lavados con solución fijadora nueva.

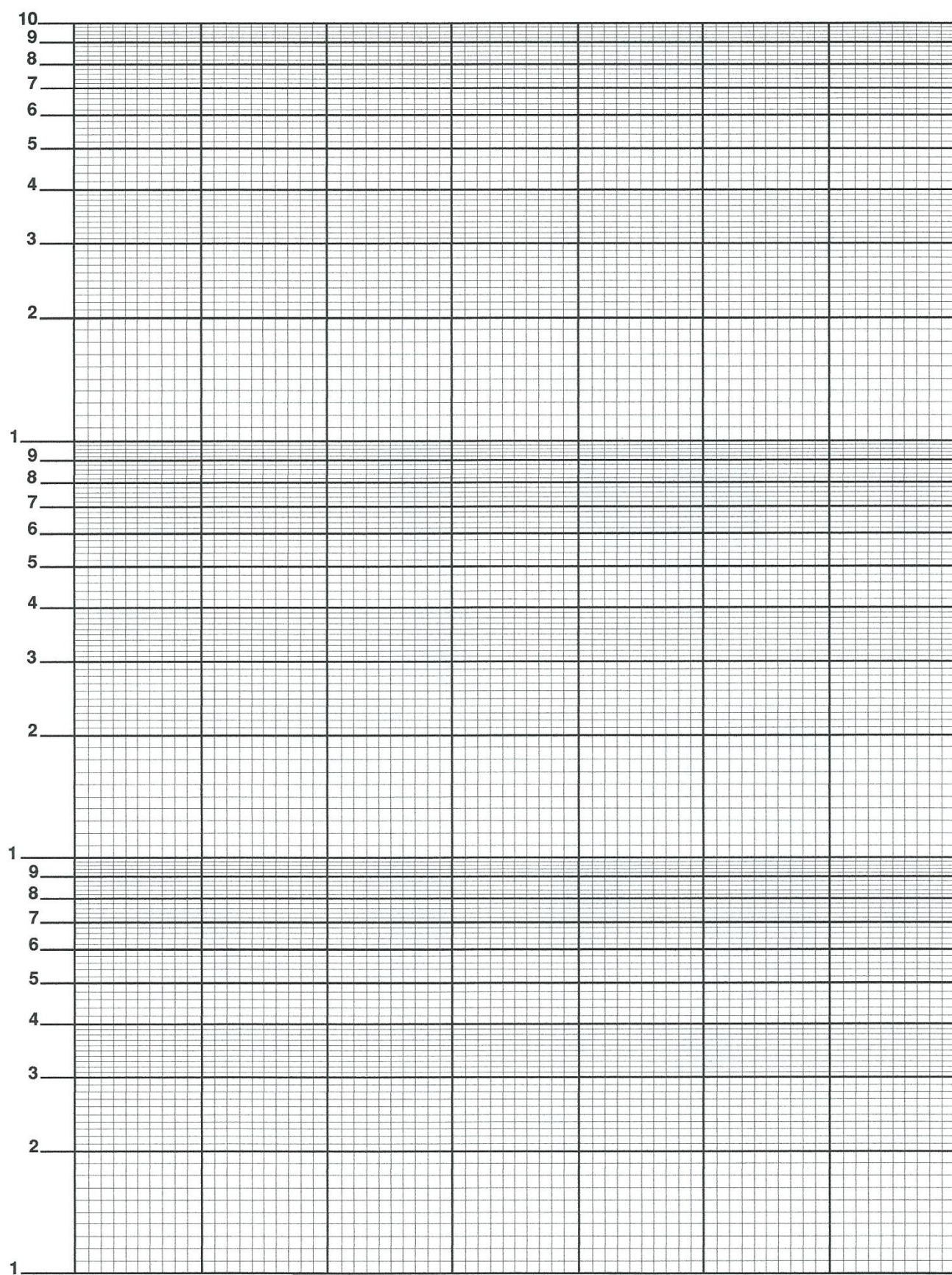
4) Determinación del peso molecular



En este ejemplo los estándares son: 94.000, 67.000; 38.000; 30.000; 20.000; 14.000.

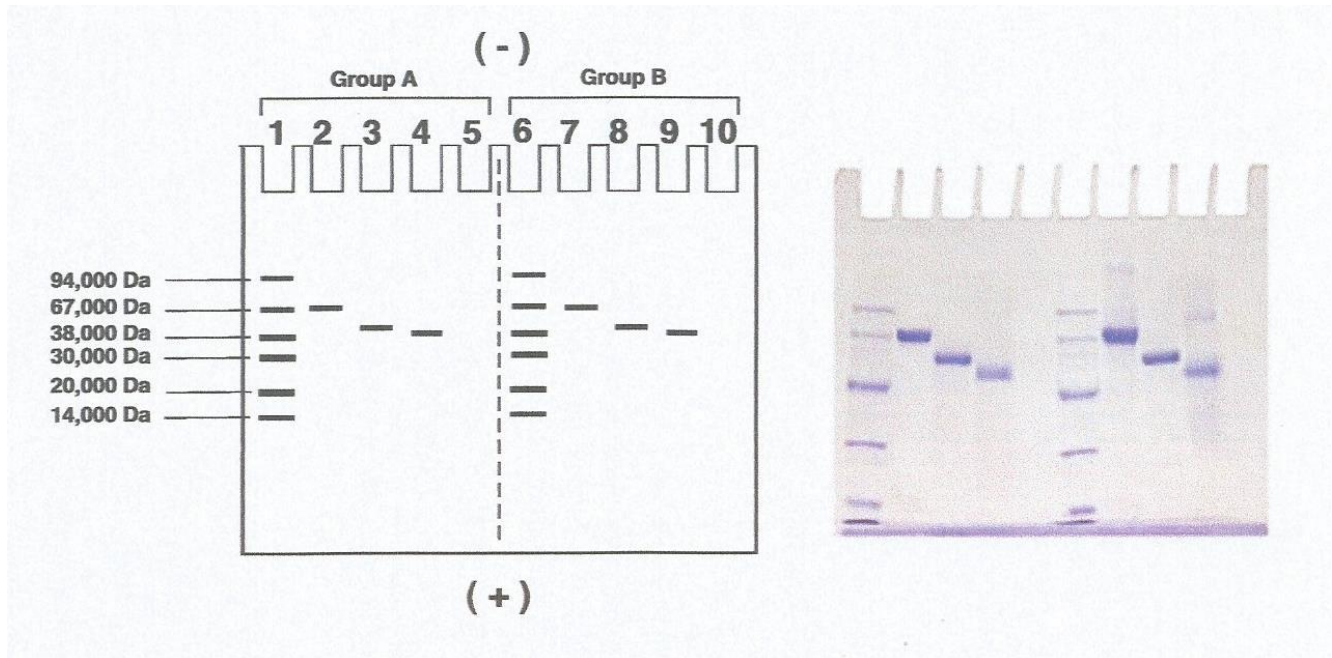
Si las medidas se realizan directamente del gel, omitir los pasos 1 y 2.

1. Tome una hoja transparente, por ejemplo de acetato de celulosa (utilizado con proyectores) y colocarla sobre el gel.
2. Con un rotulador, trazar cuidadosamente los contornos de los pocillos de muestras. A continuación, marcar todas las bandas de proteínas sobre el gel.
3. Medir la distancia de migración, en centímetros (al milímetro más cercano) de cada banda principal en el gel. Ignorar las bandas débiles, todas las mediciones deben ser desde la parte inferior del pocillo a la parte inferior de la banda de proteína.
4. Utilizando papel semilogarítmico, trazar la distancia de migración, o R_f , de cada proteína estándar en el eje x no logarítmico frente a su peso molecular en el eje y logarítmico. Elija sus escalas de manera que los puntos de datos estén bien repartidos. Suponga que el segundo ciclo en el eje y representa 10,000 a 100,000 (ver el ejemplo de arriba).
5. Dibuje la mejor línea recta promedio a través de todos los puntos. Esta línea debe tener más o menos el mismo número de puntos dispersos en cada lado de la línea. A modo de ejemplo, ver la figura. Este método es una aproximación lineal.
6. Usando su gráfico, determinar el peso molecular de las tres proteínas desconocidas. Esto se puede hacer mediante la búsqueda de la R_f (o distancia de migración) de la banda desconocida en el eje x, para ello dibuje una recta vertical hasta que se cruza con la línea de los estándares. Se realiza entonces una línea recta que interseccione con el eje y para que, de esta forma, se pueda determinar el peso molecular aproximado.



5. RESULTADOS

En el esquema de abajo se muestran la relativa posición de las bandas de proteínas, pero no están dibujadas a escala. Se pueden observar bandas menores débilmente teñidas que son pequeños contaminantes.



Pocillo	Muestra	Proteína	Peso Molecular
1 y 6	A	Estándar	Ver figura
2 y 7	B	Proteína 1 desconocida	68.000
3 y 8	C	Proteína 2 desconocida	58.000
4 y 9	D	Proteína 3 desconocida	50.000