

Electroforesis de Proteínas

Las proteínas son moléculas cuya carga neta depende del contenido de una serie de aminoácidos (fundamentalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina) y del grado de ionización de éstos al pH considerado (figura 7).

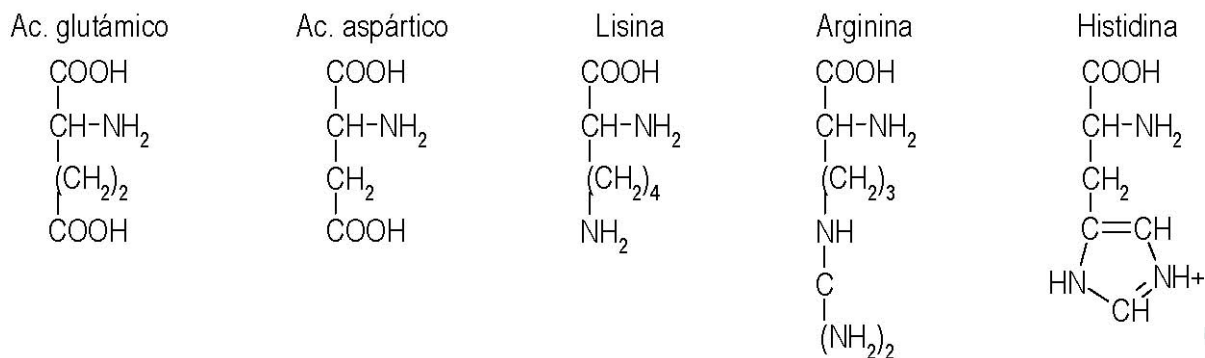


Fig. 7. Principales aminoácidos responsables de la carga neta de una proteína, dependiendo del pH.

En los soportes no restrictivos (en los que el entramado no interfiere en la migración, ya que el tamaño de las proteínas es muy pequeño en comparación con el tamaño de poro del soporte), la separación depende de la densidad de carga de las moléculas y, así, cuanto mayor sea la densidad, mayor será la velocidad de migración en un campo eléctrico hacia el polo que determine su carga neta.

La primera etapa del proceso es la aplicación de la muestra. En papel o acetato de celulosa, esto se puede efectuar de forma puntual (permite el análisis de varias muestras simultáneamente en pequeñas cantidades) o longitudinalmente (permite el estudio de una sola muestra pero en mayor cantidad). La muestra se aplica disuelta en el tampón de electroforesis, del que está impregnado el soporte y que se encuentra en los reservorios de la cubeta, y se deposita en una pequeña zona, lo más estrecha posible, en el centro o en un extremo del soporte (si se conoce cuál va a ser la dirección de desplazamiento de la misma) y de forma perpendicular a la dirección del campo eléctrico. Conviene evitar la proximidad de los bordes del papel, ya que allí el campo eléctrico no es homogéneo y se distorsionan las bandas según avanzan. El volumen que se aplica suele ser inferior a 10 μL y si se necesitan mayores volúmenes porque la muestra se encuentre muy diluida, pueden hacerse aplicaciones sucesivas sobre la misma zona, dejando secar entre aplicación y aplicación. Es necesario humedecer el soporte (papel o acetato de celulosa) para que sea conductor; para ello, se impregna el soporte de tampón de electroforesis por ambos extremos y de forma simultánea para que por capilaridad se desplace hacia la zona de aplicación de la muestra.

En los geles de agarosa, se perfora el gel con ayuda de un troquel o una pipeta de diámetro adecuado y se elimina esa porción por succión. La perforación puede ser cilíndrica o rectangular, dependiendo del número y cantidad de muestra a analizar y la muestra se deposita en el orificio practicado sin que llegue a rebosar. En este caso, el tampón está embebido en el soporte (agarosa).

En todos los casos, la zona de aplicación debe ser lo más estrecha posible, para aumentar la resolución y evitar solapamientos entre bandas que migren en posiciones cercanas.

La electroforesis termina cuando se haya producido la máxima separación de los componentes de la muestra, pero sin sobrepasar los límites del soporte. Para evitar que se sobrepasen estos límites, se utilizan los marcadores electroforéticos que son moléculas coloreadas con una movilidad electroforética superior a cualquier componente de la muestra (poseen elevada carga respecto a su tamaño). Entre los marcadores más utilizados se encuentran la dinitrofenil-lisina (DNP-Lys) y el azul de bromofenol.

Una vez acabada la electroforesis, se procede a la etapa de tinción. El soporte se retira de la cubeta y se sumerge en un recipiente que contiene una disolución de un colorante que se une de manera específica a los componentes de la muestra y que precipita a los componentes separados en la posición en la que se encuentran. Las disoluciones más utilizadas en el caso de proteínas son el Negro Amido al 1% (p/v) en ácido acético y el Azul de Coomassie al 0.1% (p/v) en metanol/agua/ácido acético (9:9:2 v/v/v).

Si la electroforesis se pretende desarrollar a escala preparativa, ha de utilizarse un papel de mayor grosor (175 gr/cm²), en lugar del utilizado en la electroforesis analítica (85-100 gr/cm²; 0.15mm de espesor), lo que permite la aplicación de una mayor cantidad de muestra (50-100 μL).

Inmunolectroforesis.

Es una combinación de una electroforesis en geles de agarosa seguida de una inmunodifusión (figura 8). En la primera parte, se realiza una aplicación puntual de la muestra, por lo que al final las distintas proteínas estarán distribuidas a lo largo del gel según el eje de migración. Acabada la electroforesis, y sin efectuar la tinción, se practica en el gel un canal ("trinchera") paralelo a la dirección de migración con un bisturí de doble hoja (la separación de las hojas determina la anchura de la trinchera) en el que se deposita un antisuero que contenga anticuerpos específicos frente a una o varias de las proteínas separadas en la electroforesis.

Los geles se mantienen así a temperatura ambiente (20-22°C) durante 24-48 horas. Los anticuerpos y las proteínas (que actúan como antígenos) difunden, y si se encuentran en la proporción adecuada, producen complejos antígeno-anticuerpo insolubles que precipitan y aparecen en el gel como bandas elipsoidales.

Estos complejos solamente se producen cuando ambos compuestos se hallan en lo que se conoce como relación de equivalencia y que no son idénticas para todas las proteínas presentes en la muestra; por eso, deben determinarse en experimentos preliminares las cantidades idóneas de antisuero y de la muestra, así como las distancias entre el pocillo de aplicación de la muestra y la trinchera, ya que si las distancias son muy pequeñas, el antígeno (las proteínas) difunde rápidamente y puede no formarse el precipitado, y si la distancia es mayor de la idónea, hay que emplear mayor cantidad de antisuero y la duración del proceso se alarga.

Una vez formadas las bandas de precipitación, el gel puede lavarse para eliminar las proteínas que no hayan inmunoprecipitado y, posteriormente, teñirse como se ha descrito anteriormente. Cada proteína de la muestra produce una banda de precipitación independiente, por lo que es posible identificar el número de constituyentes de la muestra que son reconocidos por los anticuerpos.

La gran especificidad y sensibilidad de las reacciones de precipitación, permite diferenciar sustancias con movilidades electroforéticas idénticas y detectar componentes que se encuentren en concentraciones mínimas (μg).

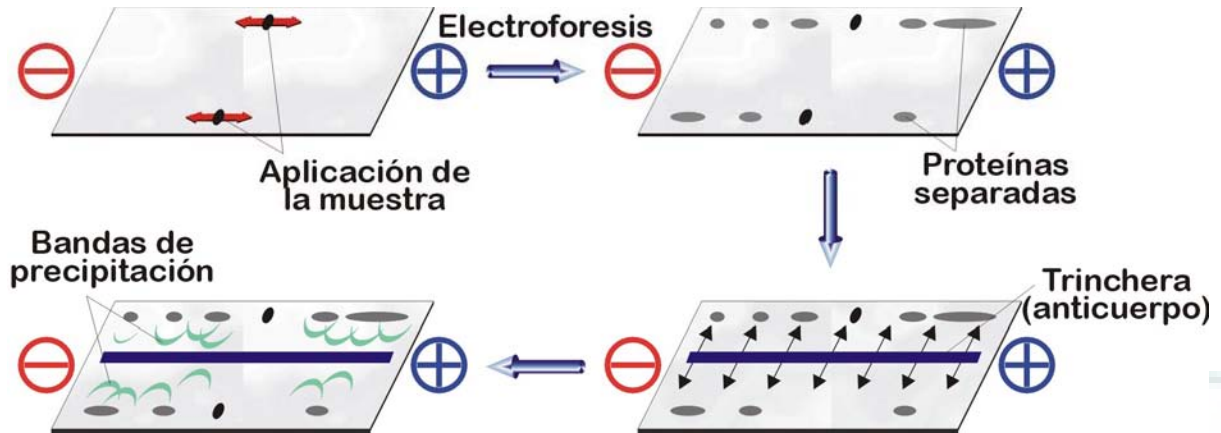


Fig. 8. Fases de una inmunoelectroforesis (IEF).

El número de bandas observado en una IEF debe entenderse como el número mínimo de componentes presentes, es decir, puede haber más componentes que no sean detectados por el antisuero empleado o que no hayan alcanzado la relación de equivalencia antígeno-anticuerpo adecuada.

La IEF es una técnica principalmente cualitativa, que se desarrolla en condiciones nativas y es especialmente apropiada para el análisis de líquidos fisiológicos y extractos celulares. Permite identificar sustancias en mezclas muy complejas y en concentraciones muy bajas. Sin embargo, requiere que dichas sustancias sean inmunogénicas y depende de los anticuerpos utilizados, por lo que es difícil de estandarizar.

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE).

Se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas, aunque también puede ser útil para ácidos nucleicos. Los geles de poliacrilamida son soportes restrictivos del tipo II, por lo que, además de evitar la convección y minimizar la difusión, participan directamente en el proceso de separación.

Se preparan de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas, de manera que produzcan un efecto de tamizado molecular; la separación electroforética depende entonces de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño, por lo que dos proteínas con idéntica densidad de carga, pero de tamaño diferente pueden ser separadas, ya que el soporte dificulta más el avance de la de mayor tamaño.

Son químicamente inertes frente a las moléculas biológicas, transparentes y estables en un amplio intervalo de valores de pH, temperatura y fuerza iónica; son también resistentes a agentes desnaturizantes (urea, detergentes), no presentan efecto EEO y son mecánicamente estables, por lo que pueden ser deshidratados y reducidos a una fina película, lo que facilita su almacenamiento.

- **Preparación del soporte.** El soporte se prepara a partir del monómero de acrilamida (figura 9) que forma largas cadenas lineales, con abundantes grupos polares que las hace solubles en medios acuosos.

Al no estar las cadenas unidas entre sí, formarían un gel sin consistencia mecánica y totalmente inmanejable. Para evitar esto, se utiliza otro monómero, la N,N'-metilen-bisacrilamida que forma parte de dos cadenas que quedan así unidas covalentemente.

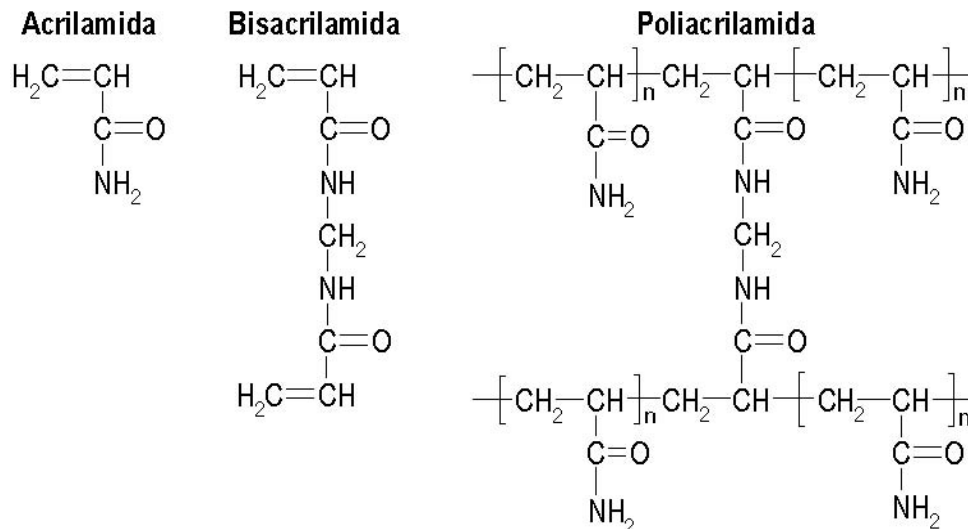


Fig. 9. Estructura de la acrilamida, bisacrilamida y poliacrilamida

En función de la concentración de acrilamida se obtienen entramados más o menos densos, mientras que la cantidad de bisacrilamida condiciona el grado de entrecruzamiento de las cadenas. Ambos componentes determinan, en conjunto, las características físicas del gel resultante: su resistencia mecánica, fragilidad, elasticidad, grado de reticulación (tamaño de poro), etc.

La polimerización de la acrilamida se obtiene por la adición de catalizadores de la polimerización que inician y aceleran el proceso de formación de un gel tridimensional. Normalmente, el proceso se inicia con la adición de persulfato amónico a una disolución acuosa (tampón) de ambos monómeros (acrilamida + bisacrilamida), seguido de la adición de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) que actúa como propagador de la reacción de polimerización a pH básico (el pH ácido retarda la polimerización). Por lo tanto, ajustando las concentraciones de persulfato y TEMED puede controlarse la velocidad de polimerización. Siempre debe evitarse la presencia de oxígeno, pues inhibe la polimerización; por ello, la mezcla de polimerización debe desgasificarse a vacío (lo que impide, además, la formación de burbujas durante la polimerización que distorsionan el gel y alteran el campo eléctrico). La temperatura óptima de polimerización es de 25-30°C y el proceso ocurre en pocos minutos, aunque conviene dejarlo transcurrir más tiempo para que no queden restos de monómeros o de pequeñas cadenas libres.

Los monómeros (ya sea en polvo o en disolución) son neurotóxicos por absorción a través de la piel o por inhalación. Por ello, deben manejarse en una campana extractora con guantes y mascarilla. Una vez realizada la polimerización, la toxicidad se reduce al mínimo, pero es recomendable continuar manipulando el gel con guantes, debido a la posible presencia de radicales libres.

El tamaño de poro de los gels de poli(acrilamida) viene determinado por la concentración total de monómeros. Así, un gel de poli(acrilamida) se define por el reticulado (%T) que es la concentración total de monómeros (acrilamida + bisacrilamida; % p/v) y la dureza (%C) que viene dada por la relación de la cantidad de bisacrilamida al total de monómeros (es un valor bastante constante y, normalmente, inferior al 1%). Incrementando %T el tamaño de poro decrece (los gels con %T inferiores a 2.5-3.0% son casi líquidos y los gels con un %T del 30% presentan un reticulado tan denso que moléculas tan pequeñas como 2000-3000 Da difícilmente pueden atravesarlos). El tamaño medio de poro es 800Å, 50Å y 20Å para valores de 2.5, 7.5 y 30%T respectivamente. En la tabla I se muestran los tamaños aproximados de un conjunto de proteínas y los gels que se suelen utilizar para su análisis.

Tabla I. Tamaño aproximado de algunas proteínas y concentraciones de acrilamida (%T) utilizada en PAGE, en función de los distintos tamaños

Proteína	M (kDa)	Longitud (Å)	Diámetro (Å)
Albúmina	69	150	38
Transferrina	90	190	37
B ₁ lipoproteína	1300	185	185
Inmunoglobulina	160	235	44
Fibrinógeno	400	700	38

Concentración de acrilamida (%T)	kDa
3-5	>100
5-12	20-150
10-15	10-80
>15	<15

Al polimerizar la acrilamida, adquiere la forma del recipiente, por lo que es necesario un molde para preparar el gel; los hay de dos tipos:

- × Tubo. Consiste en un tubo de vidrio de dimensiones variables, aunque normalmente es de 15-20 cm de largo × 0.5-0.8 cm de diámetro interno, abierto por los extremos. Se tapa el orificio inferior y se rellena con la disolución de polimerización sobre la que se deposita una pequeña cantidad de butanol (con esto se evita que al polimerizar el gel forme menisco y se excluye el oxígeno que interfiere en la polimerización). Una vez formado el gel, se elimina el butanol y se retira la tapa inferior del tubo. En la actualidad, la utilización de PAGE en tubo ha quedado restringida a la primera dimensión en electroforesis bidimensionales, PAGE preparativa y algunos casos muy específicos de análisis de proteínas radioactivas.
- × Placa. Es la forma más habitual en la que se desarrolla la PAGE. Puede llevarse a cabo en posición horizontal o vertical (dependiendo del tipo de cubeta empleada), aunque lo más habitual (sobre todo para la separación de proteínas) es el modo vertical (figura 10).

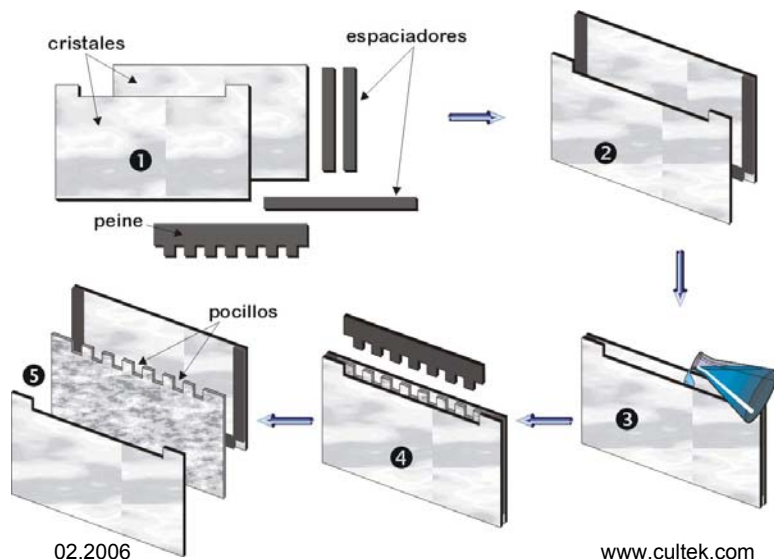


Fig. 10. Preparación del gel para una electroforesis en placa. Elementos para ensamblar el molde. Los espaciadores (sujetados con pinzas de presión) colocados sobre los cristales forman el molde. Adición de la solución de monómeros. Colocación del peine en la parte superior. El gel formado presenta los pocillos donde aplicar las muestras. Las dimensiones habituales de los gels son: 10-20 cm (L) × 10-15 cm (A) × 0.5-1.5 mm (E).

Si se aumenta la longitud del gel, aumenta la resolución de la electroforesis, aunque también se incrementa su duración. Asimismo, cuanto mayor sea la anchura del gel, mayor será el número de pocillos y, por lo tanto, el de muestras que se pueden analizar simultáneamente y en idénticas condiciones. El espesor del gel y las dimensiones de los pocillos viene determinado por el grosor de los espaciadores y el tamaño del peine determina la cantidad de muestra que puede aplicarse.

Una modalidad de la electroforesis vertical es la realizada con geles en gradiente en los que la concentración de acrilamida (%T) aumenta progresivamente desde la parte superior del gel hasta la inferior, es decir, el tamaño de poro decrece de forma inversa. Este gradiente de concentración de acrilamida puede ser lineal o no (cóncavo, en pasos, etc.), aunque los primeros son los más utilizados. Con estos geles el intervalo de tamaños de proteínas que pueden separarse se incrementa considerablemente frente a los geles homogéneos y presentan una mayor resolución. Además, las moléculas de la parte delantera de la banda se frenan más (encuentran antes los poros más pequeños) que las moléculas de la parte trasera, con lo que las bandas se estrechan, concentrándose sobre su parte delantera, produciendo bandas muy finas y con una gran resolución.

En la cubeta, el tampón del reservorio superior cubre el gel y los pocillos en los que se ha de cargar la muestra. Con el fin de que ésta, disuelta en el mismo tampón, no difunda al depositarla en los pocillos, se le puede añadir un compuesto que aumente su densidad (normalmente, glicerol o sacarosa). El volumen de muestra que puede aplicarse a cada pocillo depende del tamaño de la propia muestra y del pocillo, pero oscila entre 10-100 μ L con un máximo de 200 μ L. En el tampón de la muestra, también se añade el marcador electroforético (el más utilizado es el azul de bromofenol) para poder determinar el final del proceso.

- **PAGE en condiciones no desnaturalizantes.** La modalidad más sencilla es la descrita en apartados anteriores en las que la muestra se carga directamente en el gel en el cual se va a producir la separación, por lo tanto, la concentración del gel es uniforme y hay un único tampón. La PAGE se desarrolla en condiciones en las que no se altera la conformación nativa de las proteínas separadas, por lo que finalizada la electroforesis, pueden realizarse estudios de funcionalidad de dichas proteínas separadas (actividad enzimática, capacidad de unión de anticuerpos, unión a receptores, etc.)

Otra modalidad de electroforesis no desnaturalizante es aquella en la que el tampón presente en los reservorios es diferente al que impregna el gel, el cual tampoco es homogéneo, ya que, en realidad, hay dos geles diferentes en uno solo: una zona de resolución (donde tiene lugar la separación de las proteínas) que se polimeriza sin colocar el peine (por lo que la parte superior presenta un frente plano) y otra pequeña zona de concentración de 1-3 cm, que se polimeriza sobre la anterior (quedan fundidas), que contiene los pocillos de aplicación de la muestra y cuya finalidad es concentrar la muestra en la zona de contacto con la zona de resolución (figura 11).

Este hecho es debido a que la zona de concentración tiene un tamaño de poro muy grande (2.5-3.0%T), por lo que no es restrictiva frente al de la zona de resolución cuyo tamaño de poro sí es restrictivo.

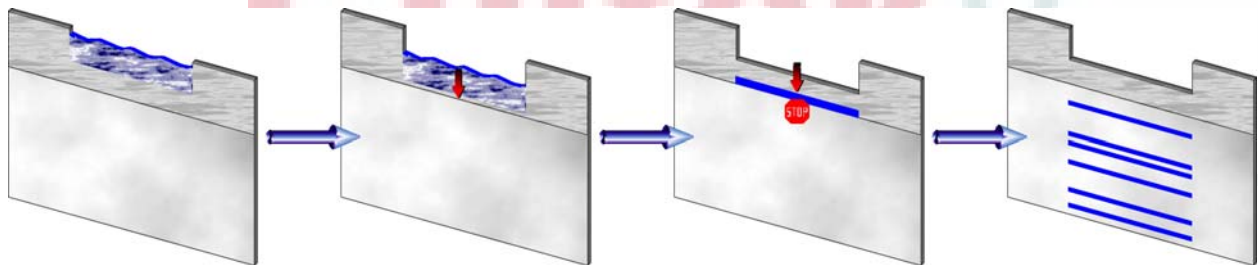


Fig. 11. PAGE en condiciones no desnaturalizantes en sistemas de tampón discontinuo.

- **PAGE en condiciones desnaturalizantes.** En presencia de algunos compuestos químicos, las proteínas pierden su estructura nativa; tales compuestos, llamados agentes desnaturalizantes, producen el desplegamiento de la proteína que queda, así, sin la organización tridimensional característica de su funcionalidad biológica.

En algunas proteínas hay puentes disulfuro entre los residuos de Cys (para formar cistinas) de una misma cadena polipeptídica (puentes intracatenarios) o de diferentes cadenas (puentes intercatenarios) de algunas proteínas con estructura cuaternaria. Estos puentes se pueden romper mediante tratamiento con determinados agentes reductores, como por ejemplo, el β -mercaptoetanol (β -ME) o el ditioneitol (DTT).

Otros agentes desnaturalizantes de proteínas, son la urea y determinados detergentes. La urea interfiere con las reacciones hidrofóbicas de las proteínas y debe incluirse en el tampón de la muestra y en todos los que se empleen para la preparación de los geles; las principales aplicaciones de la urea es en la separación de las histonas, así como de proteínas nucleares y ribosomales (ya que tienen mucha tendencia a agregar y son insolubles) y para el análisis conformacional de proteínas (mediante geles con gradientes transversales de urea).

Los detergentes afectan a la estructura nativa de las proteínas y a las interacciones con otras moléculas (proteínas, lípidos, etc.), ya que las interacciones hidrofóbicas de las proteínas son sustituidas por interacciones detergentes-proteína. Existen tres tipos principales de detergentes:

- × Detergentes no iónicos. Son débilmente desnaturalizantes y no alteran la carga de las proteínas a las que se unen; se pueden utilizar en geles con urea y en electroenfoque. Los más empleados son el Triton X-100 y el Octilglucósido, particularmente para solubilizar proteínas de membrana. Se utilizan a concentraciones de 0.1-3.0% (p/v) y deben incluirse en el tampón de la muestra y en el del gel.
 - × Detergentes iónicos. Pueden tener carga positiva (catiónicos) que se usan para la separación de proteínas muy ácidas o muy básicas; el más utilizado es el cetiltrimetilamonio (CTAB). Otros poseen carga negativa y un fuerte carácter desnaturalizante; el más empleado es el dodecilsulfato sódico o lauril sulfato sódico (SDS)
 - × Detergentes anfóteros. Son débilmente desnaturalizantes y no afectan a la carga de las proteínas; algunos, como el 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS) solubilizan muy bien las proteínas de membrana. Son compatibles con la utilización de urea y su uso es frecuente como alternativa a los detergentes no iónicos.
- **PAGE-SDS.** Permite el cálculo de parámetros moleculares (al contrario que el resto de los tipos de electroforesis), pues los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular. El SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características

comunes independientemente de las de cada proteína.

Las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos).

Como ya se ha comentado, la movilidad electroforética en una PAGE es función del tamaño y de la carga por unidad de masa; como ésta es constante para todos los complejos SDS-proteína (que, además, tienen la misma forma elipsoide), esta movilidad es solamente función de la masa molecular, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa.

En resumen, la SDS-PAGE es la electroforesis más utilizada para el análisis de proteínas debido a:

- × La gran mayoría de las proteínas son solubles en SDS.
- × Todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto, en el mismo sentido.
- × Su densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.
- × La separación depende de un parámetro físico-químico, como es la masa molecular, que se puede calcular.
- × Los complejos SDS-proteína se tiñen fácilmente.

La preparación de la muestra es de la máxima importancia para asegurar que todo lo comentado anteriormente se cumple. Al tampón en el que va disuelta la muestra (Tris HCl; 0.05M, pH = 6.8) se añade un exceso de SDS (2% p/v); para facilitar la unión del SDS a las proteínas, la muestra se calienta a 100°C durante al menos 3-5 minutos y, opcionalmente, se añade β-ME (5% v/v) ó DTT (20 mM) si se requieren condiciones reductoras. Para incrementar la densidad de la disolución de la muestra, se añade glicerol o sacarosa al 10% (p/v) y como marcador azul de bromofenol al 0.001% (p/v).

La cantidad de muestra que se añade depende de la sensibilidad de la tinción posterior que se vaya a utilizar, pero como regla general y para geles de 20×20 cm de 1.5mm de espesor y tinción con azul de Coomassie, se suele añadir entre 1-10µg de muestra (más de 100µg de proteína supone una sobrecarga del gel).

El SDS debe incluirse en el tampón de los reservorios, en los de los geles (de concentración y de resolución) y en el de la muestra para mantener las condiciones desnaturalizantes. La PAGE-SDS puede realizarse en condiciones reductoras o no reductoras; la ausencia de reductores se traduce en que si las proteínas poseen puentes disulfuro, el SDS sólo producirá una desorganización parcial de la estructura (figura 12). Si son dos o más las cadenas unidas por puentes disulfuro intercatenarios, en presencia de SDS, quedarán más o menos desplegadas en función de la posición de los puentes disulfuros (figura 13).

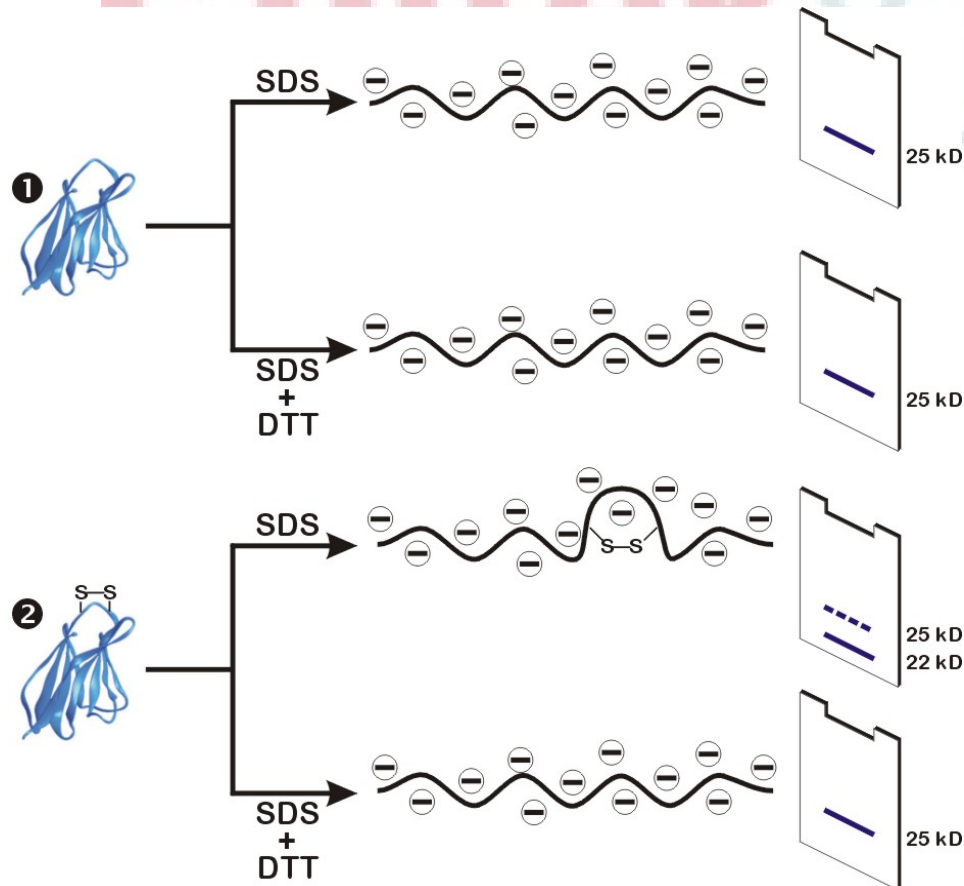


Fig. 12. Efecto del SDS y del DTT en la movilidad electroforética de proteínas monoméricas. En una proteína nativa de 25 kDa, carente de puentes disulfuro, el tratamiento con SDS (—) ó SDS+DTT (-----) producen idéntico resultado. La proteína con un puente disulfuro intracatenario, en presencia de SDS se desnaturaliza parcialmente, manteniendo sin desplegar la zona que abarca el disulfuro. El tratamiento con SDS+DTT rompe el puente disulfuro y permite el despliegue total de la proteína.

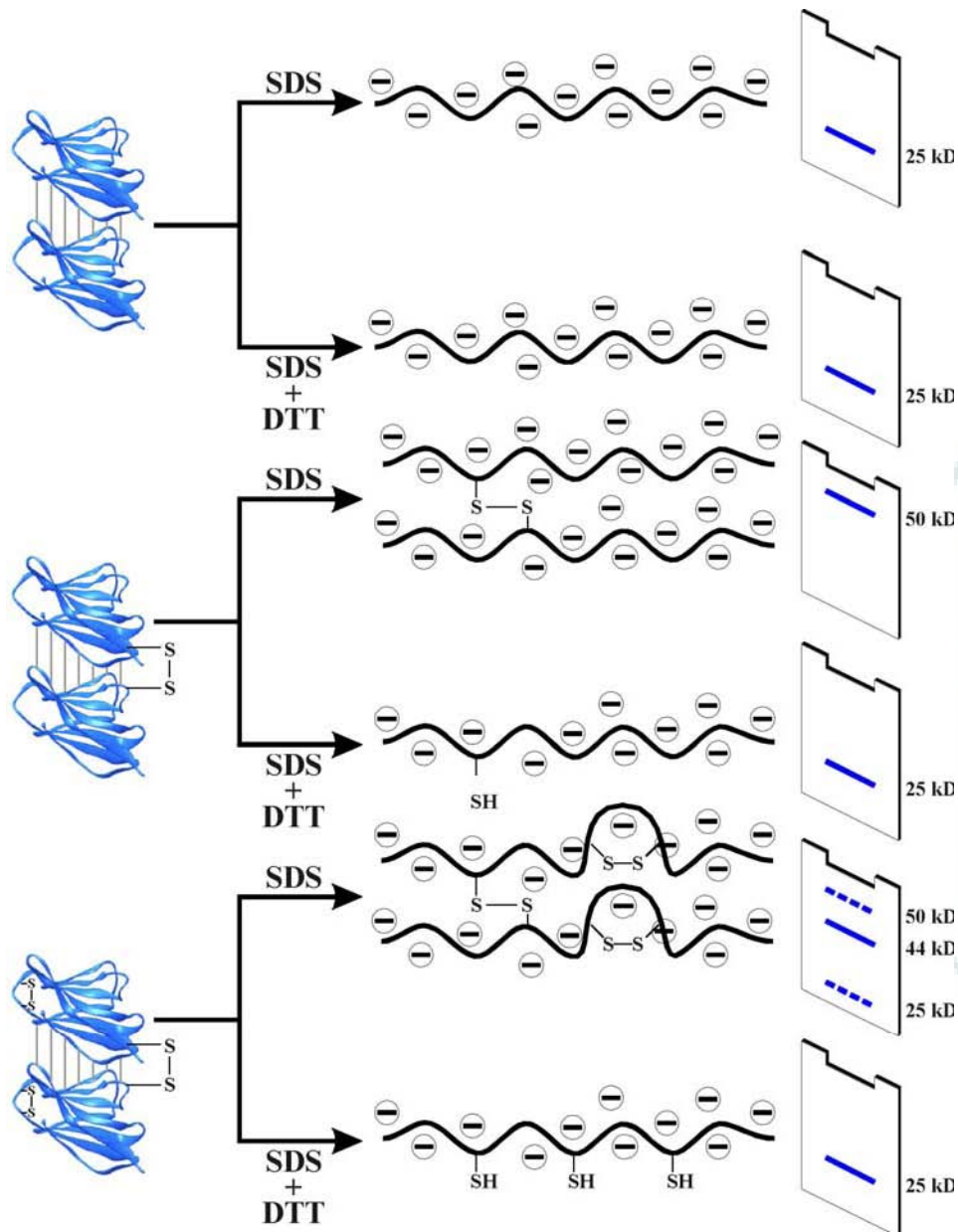


Fig. 13. Efecto del SDS y del DTT en la movilidad electroforética de proteínas oligoméricas.

Una vez finalizada la PAGE, se separa el gel de las placas de vidrio haciendo palanca con una espátula y se visualiza con un colorante; el más utilizado es el azul de Coomassie con el que se pueden visualizar 0.1-0.5 µg de proteína por banda. Otro método de tinción es con sales de plata, que tiene como principal ventaja su elevada sensibilidad (hasta 0.1ng de proteína por banda), aunque tiene como desventajas que es muy laboriosa y cara, presenta elevado background, baja reproducibilidad, algunas proteínas no se tiñen y, sobre todo, no es totalmente específico de proteínas, ya que algunos lipopolisacáridos, ácidos nucleicos y polisacáridos también se tiñen.

Un método de sensibilidad comparable a la tinción con sales de plata, emplea compuestos fluorescentes que se unen específicamente a las proteínas (la unión puede realizarse antes o después de la electroforesis), como el cloruro de dansilo (detecta hasta 10ng de proteína por banda), la fluoescamina (detecta hasta 3-5ng de proteína por banda) y el MDPF (2-metoxi-2,4-difenil-3(2H) furanona; detecta hasta 1ng de proteína por banda).

Una vez teñido el gel de poliacrilamida, la imagen que se obtiene es un conjunto de bandas coloreadas sobre un soporte transparente. Su análisis permite identificar el número mínimo de componentes (bandas) de cada muestra. Cada banda se caracteriza por su movilidad electroforética relativa ("Ur")

$$U_r = \frac{L_{\text{muestra}}}{L_{\text{marcador}}} \quad \begin{cases} L_{\text{muestra}} \equiv \text{Longitud recorrida por la muestra} \\ L_{\text{marcador}} \equiv \text{Longitud recorrida por el marcador} \end{cases}$$

La PAGE es un criterio de pureza negativo, es decir, permite saber si una muestra no es homogénea (porque aparecen varias bandas en un gel) pero no permite establecer que sea homogénea (puede haber varias proteínas que tengan la misma movilidad electroforética y aparecerían como una sola banda).

En las condiciones de la SDS-PAGE, si se representan los valores de logaritmo del peso molecular ($\log M$) frente a la movilidad electroforética (U_r) de un conjunto de proteínas, se obtiene una relación lineal (figura 14). Normalmente, se utiliza un conjunto de proteínas de peso molecular conocido (marcadores de peso molecular) que se someten a SDS-PAGE en el mismo gel que se analizan las proteínas cuyos peso molecular se desea conocer.

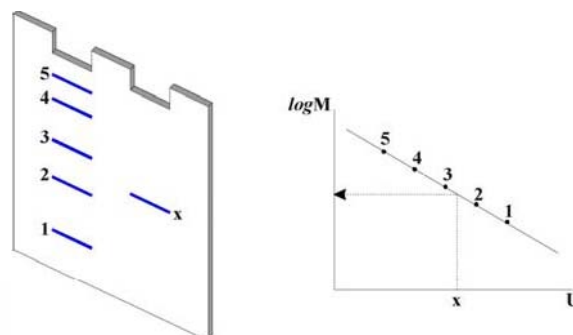


Fig. 14. Cálculo de pesos moleculares de proteínas por SDS-PAGE.

Es importante señalar que la relación lineal entre $\log M$ y U_r se mantiene para una concentración dada de poliacrilamida (%T) y sólo en un corto intervalo de peso molecular. De forma general, en geles del 15%T la relación lineal es válida para proteínas comprendidas entre 12 y 45 kDa; en geles del 10%T, el intervalo lineal va entre 15 y 70 kDa, y en los del 5%T, entre 25 y 200 kDa.

Hay proteínas con un comportamiento anómalo en SDS-PAGE; en las glicoproteínas y las lipoproteínas, que llevan unidos azúcares o lípidos, la parte no proteica no une SDS y puede impedir el acceso del mismo a la proteína. Por ello, las glicoproteínas y lipoproteínas unen menos SDS que la mayoría de las proteínas; esto hace que la relación carga/tamaño sea menor y, por lo tanto, tengan menor movilidad electroforética y se comporten como si tuvieran mayor tamaño.

Electroforesis bidimensional.

Es una sucesión de dos electroforesis distintas (o en distintas condiciones) realizadas sobre una misma muestra. En la primera de ellas (primera dimensión) se separan los componentes de la muestra según un criterio (carga, tamaño o pI), y en la segunda (segunda dimensión) según un parámetro distinto del anterior. De esta manera, se combinan dos modos de separación diferentes y se consigue el máximo de resolución posible mediante técnicas electroforéticas.

La primera dimensión puede llevarse a cabo, por ejemplo, en condiciones no desnaturizantes y la segunda en condiciones desnaturizantes; las proteínas ribosomales se separan en un gel discontinuo en la primera dimensión, seguido por otro continuo en la segunda, y ambos en presencia de urea; las histonas se separan en geles con urea y ácido en la primera dimensión y utilizando tritón/ácido/urea en la segunda.

Sin embargo, normalmente, la idea de electroforesis bidimensional suele referirse a la combinación de los dos tipos de electroforesis más resolutivos: electroenfoque (primera dimensión) y SDS-PAGE (segunda dimensión) (figura 15).

La electroforesis bidimensional puede considerarse como un criterio de pureza positivo debido a su gran poder de resolución, aceptándose que la aparición de una sola mancha indica una muestra homogénea.

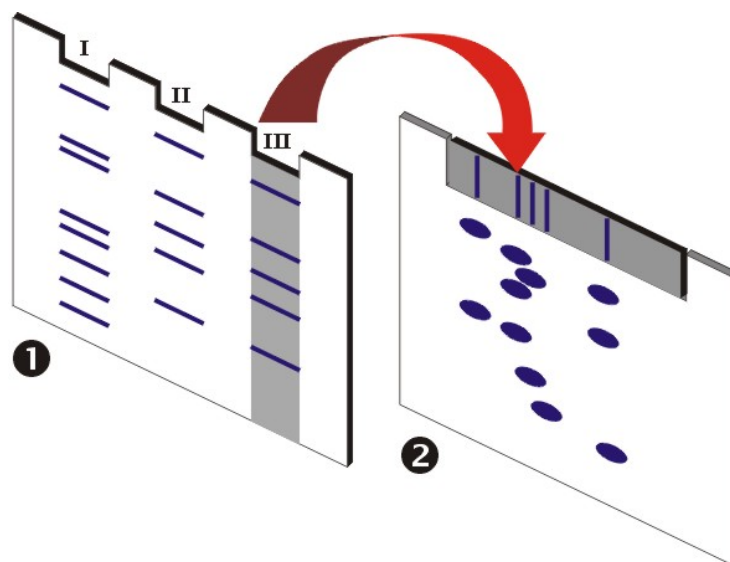


Fig. 15. Electroforesis bidimensional. Primera dimensión (SDS-PAGE). En el pocillo I se aplica el marcador de pesos moleculares y en los pocillos II y III la muestra. El carril del pocillo III (sombreado) se corta y el resto del gel se tiñe. El carril III se coloca sobre un nuevo gel que se ha polimerizado sin pocillos, donde se desarrolla la segunda dimensión (EEF) perpendicularmente a la primera. Obsérvese que algunas bandas producen más de una mancha en la segunda dimensión.

Electroenfoque.

Es un tipo particular de electroforesis en la que los compuestos anfóteros se separan según su punto isoeléctrico (pI; pH al cual la carga neta de la proteína es nula) en un gradiente continuo de pH.

La carga neta de una proteína es función del pH:

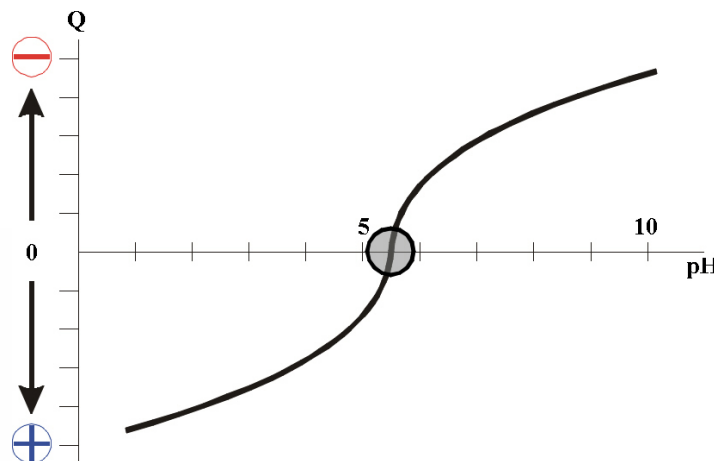
$$\begin{cases} \text{pH} > \text{pI} \Rightarrow \text{Carga neta negativa} \\ \text{pH} = \text{pI} \Rightarrow \text{Carga neta nula} \\ \text{pH} < \text{pI} \Rightarrow \text{Carga neta positiva} \end{cases} \quad (\text{figura 16})$$


Fig. 16. Curva de titulación de una proteína. Representación de la carga neta (Q) de una proteína en función del pH.

En todos los métodos electroforéticos descritos anteriormente, la difusión es un fenómeno con efectos negativos, que tiende a ensanchar las bandas, disminuyendo la resolución. En el EEF el efecto de la difusión es mínimo y por ello posee una enorme resolución, pudiendo llegar a separar proteínas que difieran en 0.001 unidades de pI. Esto se debe a que si una proteína focalizada en su pI se desplazase por difusión, adquiriría carga (positiva o negativa según hacia el polo que difundiera) y por efecto del campo eléctrico volvería a la zona de su pI; esto se llama efecto focalizante del EEF y es el responsable de su enorme resolución. Además, el EEF aumenta su resolución al disminuir el intervalo de gradiente de pH.

Por todo esto, el disponer de un gradiente estable de pH es lo esencial del EEF; para ello, se emplean compuestos anfóteros de bajo peso molecular llamados anfolitos portadores, que son pequeñas poliaminas (alrededor de 750 kDa) con abundantes grupos ácidos y básicos, con un pI que abarca desde 2.5 hasta 11.0, con gran capacidad de tamponación cerca de su pI y con una gran solubilidad y conductividad.

Una disolución de una mezcla de estos anfolitos tendrán un pH próximo al promedio de los pI. Si esta disolución se emplea para la preparación de un gel de poli(acrilamida), al aplicar una diferencia de potencial cada molécula de anfolito migrará hacia uno u otro polo en función de su carga, hasta alcanzar la zona de su pI. Cuando se alcanza el equilibrio queda formado un gradiente de pH a lo largo del gel. Si, debido a la difusión, los anfolitos abandonasen la zona de su pI, adquirirían carga y experimentarían el efecto focalizante mencionado anteriormente.

Los gradientes de pH generados en algunos soportes, como los geles de poli(acrilamida), muestran el fenómeno denominado deriva catódica, que consiste en que el gradiente se hace inestable con el tiempo y se desplaza, junto con las proteínas, hacia el cátodo; esto se debe, fundamentalmente, al flujo electroosmótico. La deriva catódica puede evitarse variando la naturaleza química del gel (se usan derivados de acrilamida, como la 3-dimetilaminopropil metacrilamida) o utilizando gradientes de pH inmovilizados (que se consigue copolimerizando con la acrilamida los compuestos químicos que establecerán el gradiente, por lo que las moléculas que forman el gradiente están fijas sobre las propias fibras de poli(acrilamida)).

La variedad más utilizada de EEF es la analítica. El gel se prepara a partir de una disolución de acrilamida (3-5%T para facilitar la movilidad) y bisacrilamida en agua, a la que se añaden los anfolitos. La preparación del gel es totalmente análoga a la de PAGE, aunque también puede llevarse a cabo en cubetas horizontales, en cuyo caso los geles son de muy poco grosor (<0.5 mm) y se polimerizan sobre láminas de plástico tratadas especialmente para que se adhieran al gel.

El EEF puede llevarse a cabo en condiciones que mantengan la estructura nativa de las proteínas o en condiciones desnaturalizantes, incorporando, además de los anfolitos, urea (8M) o detergentes ni iónicos o anfóteros (pero nunca detergentes iónicos como el SDS).

Si el EEF se va a desarrollar en un gel con un gradiente de pH inmovilizado, se utiliza un formador de gradiente (sistema de vasos comunicantes) y dos disoluciones con distinta densidad (una más densa de carácter ácido, por lo que quedará en la parte inferior del gel y otra más básica de menor densidad que quedará en la parte superior del gel).

El desarrollo del EEF es más complejo que el de la PAGE, ya que se utilizan voltajes variables (ya que según se va formando el gradiente, los anfolitos van perdiendo carga hasta llegar a su pI, con lo que se reduce la conductividad del medio); en el EEF se necesitan fuentes de alimentación capaces de generar 3.000V, para proporcionar intensidades constantes del orden de 50-150mA. Estos voltajes tan elevados lleva asociado un importante incremento de temperatura, por lo que el soporte debe estar refrigerado a 4°C o alrededor de 10°C si se utilizan geles con urea (ya que la urea precipita a 4°C).

Una de las aplicaciones más importantes del EEF es el cálculo de pI (figura 17); en el pocillo I se aplican los marcadores de pI, y en el II la muestra (X) cuyo pI se desea conocer. El carril III (sombreado) se emplea para determinar el gradiente de pH. Una vez corrido el gel, se trocea el carril III y cada segmento (de 1-2 mm) se introduce en 1mL de agua, determinándose su pH. Finalmente, se representa el pH de cada fracción, frente a su posición en gel. La distancia migrada por la muestra (X) se interpola en la recta obtenida, determinándose así su pH.

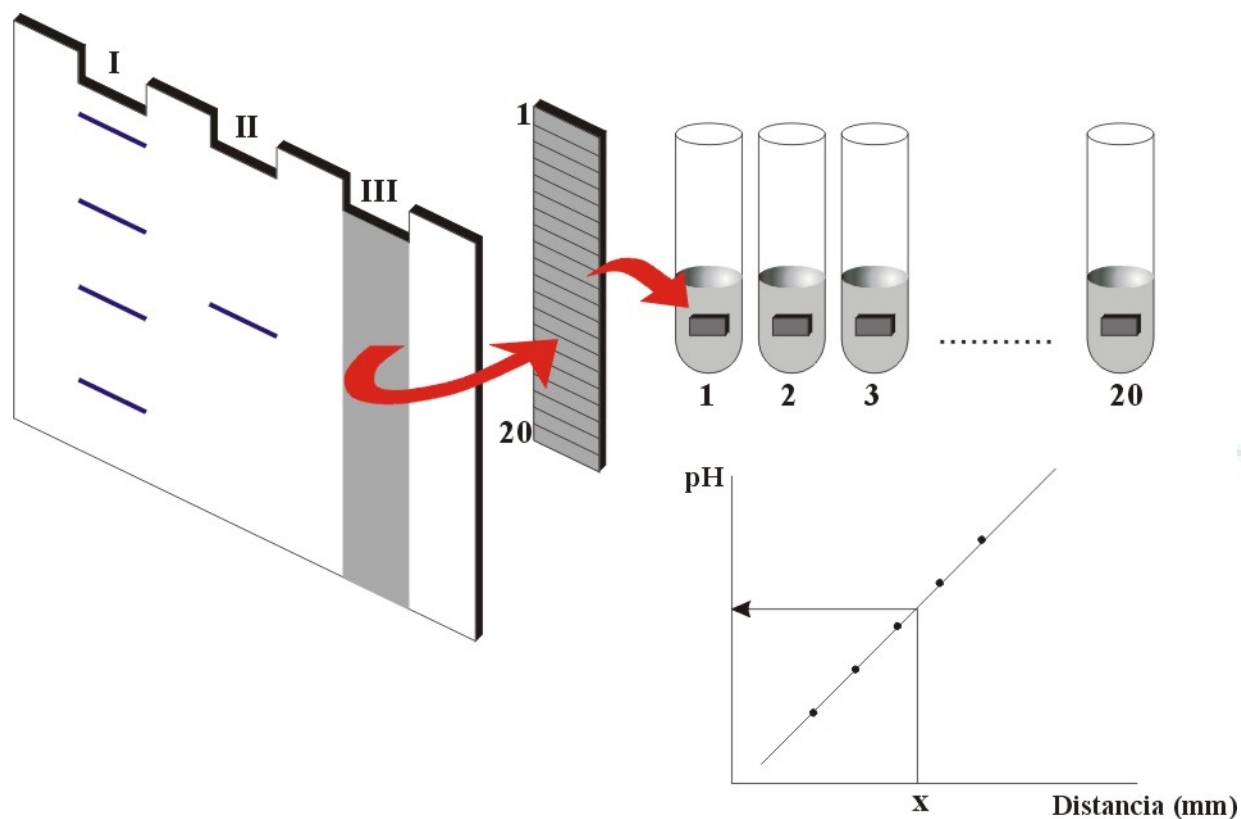


Fig. 17. Determinación del punto isoeléctrico de una muestra.

Hay que volver a destacar, una vez más, que el EEF es un criterio de pureza negativo, es decir, varias bandas indican que la muestra es heterogénea, pero la aparición de una única banda no permite afirmar que la muestra sea homogénea, ya que pueden coexistir proteínas diferentes con igual pI; no obstante, cuanto menor sea el gradiente de pH utilizado, mayor será la probabilidad de que al aparecer una banda, la muestra sea homogénea.

Transferencia a membranas (Western Blot).

Finalizada la PAGE, se puede obtener información acerca de las proteínas si éstas se transfieren desde el gel a una membrana. El proceso de transferencia se denomina blotting y fue originariamente descrita por E. M. Southern para el caso de DNA (Southern Blot); posteriormente y continuando con la misma terminología, se describió para el caso de RNA y proteínas (Northern y Western Blot respectivamente).

Una vez en la membrana, las proteínas están accesibles (cosa que no ocurre en el gel) para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación; en la mayoría de los casos, estas moléculas son anticuerpos (el proceso se conoce como inmunoblotting), pero también pueden ser lecitinas, ácidos nucleicos, receptores o cualquier otro ligando.

El proceso consta de cuatro fases (figura 18):

- **Transferencia.** Puede llevarse a cabo por diferentes métodos (difusión, aplicando vacío, por capilaridad), pero para proteínas separadas en geles de poliacrilamida se suele recurrir a un campo eléctrico que se aplica perpendicularmente al plano del gel.
 - × El primer sistema de realizar la transferencia emplea una cubeta similar a las de electroforesis de tipo vertical en la que los electrodos son un conjunto de hilos de platino. El gel y la membrana están emparedados entre un conjunto de hojas de papel de filtro y láminas de esponja, mantenidas por un marco o armazón de plástico.
 - × El segundo sistema emplea una cubeta horizontal y los electrodos son placas de grafito o metálicas; el gel, la membrana y el conjunto de hojas de papel de filtro a cada lado quedan emparedados por los electrodos, siendo uno de ellos la propia base de la cubeta.

La primera membrana utilizada para la transferencia fue de nitrocelulosa, que posee una buena capacidad de unión de proteínas ($250\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y hay variedades con diferentes grados de porosidad según el tamaño de las proteínas a transferir. Las proteínas quedan unidas a la membrana de forma no covalente, mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

Las membranas de naturaleza hidrofóbica (PVDF [difluoruro de polivinilideno]) presentan ventajas frente a las de nitrocelulosa, ya que retienen mayor cantidad de proteínas, son compatibles con la mayoría de los sistemas de detección, mecánicamente son más estables y presentan una gran resistencia química a los reactivos utilizados para la caracterización estructural de las proteínas.

- **Bloqueo de la membrana.**
- **Unión del ligando.**
- **Detección.**

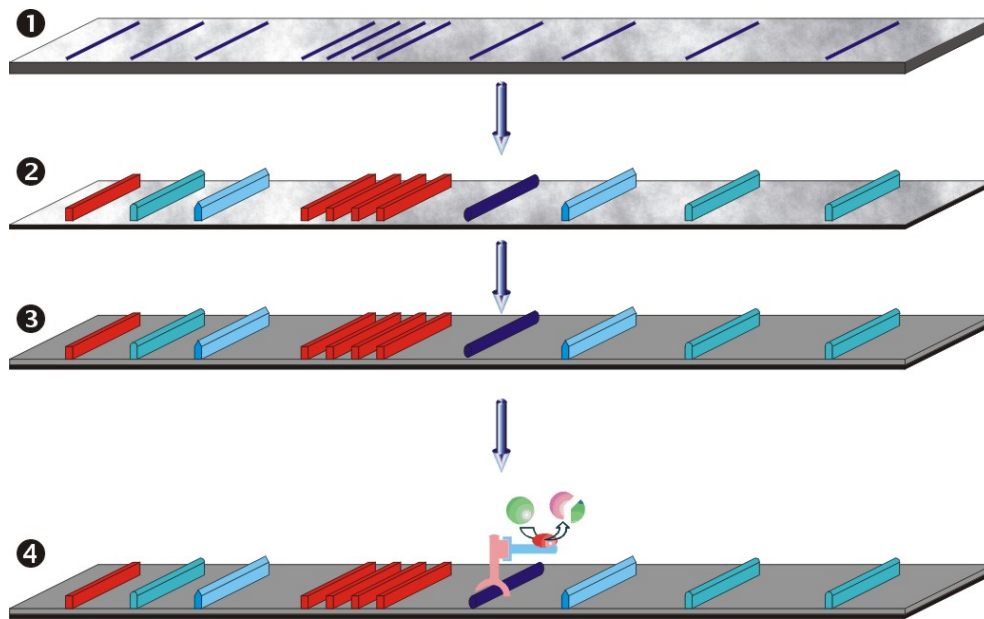


Fig. 18. Fases de un Western Blot. ❶ Transferencia de las proteínas a la membrana. ❷ Bloqueo de la membrana no ocupada por las proteínas con BSA (3-5%, p/v), leche en polvo desnatada (3%, p/v) o Tween 20 (0.1%) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. ❸ Unión del ligando específico (anticuerpo primario) a la-s proteína-s transferidas. ❹ Detección mediante un anticuerpo secundario conjugado con HRP o FA.

Cultek

Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis de ácidos nucleicos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA. En los tampones habitualmente utilizados, los ácidos nucleicos están cargados negativamente y migran hacia el ánodo. Cada molécula aporta una carga negativa (procedente del grupo fosfato), por lo que la relación carga/tamaño es prácticamente constante e idéntica para todas las moléculas, independientemente de su tamaño (un nucleótido tendrá la misma movilidad que un fragmento de doble cadena de 800pb o uno de 5kb).

La electroforesis de DNA se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida. Ambos soportes son restrictivos para los ácidos nucleicos, de modo que los diferentes fragmentos (al tener la misma relación carga/tamaño), migran en función de su tamaño y/o conformación (tabla II).

- Los geles de poliacrilamida (en cubetas verticales) se emplean para fragmentos pequeños de DNA (5-500pb), así como para la mayoría de los RNA.
- Los geles de agarosa (en cubetas horizontales) se utilizan para fragmentos grandes de DNA (500pb-10Mb); utilizando agarosas de distintas concentraciones (distinto grado de reticulación) pueden separarse fragmentos de hasta 50kb aplicando un campo eléctrico constante; para separar fragmentos de tamaño superiores a 50kb se utiliza la electroforesis de campo pulsante en la que la dirección del campo eléctrico cambia periódicamente.

Electroforesis en geles de agarosa.

Se trata del método más común para el análisis, purificación y obtención de DNA. Las agarosas disponibles comercialmente presentan una amplia gama de grados de pureza y especificaciones. La presencia de polisacáridos sulfatados, contaminantes en algunas agarosas, puede ser perjudicial, ya que son inhibidores de las enzimas con las que va a tratarse el DNA purificado en la electroforesis (polimerasas, ligasas, endonucleasas de restricción, etc.).

Un aspecto importante de las agarosas es su estado físico. La agarosa estándar gelifica a 35°C y funde a 80-90°C, aunque las hay modificadas por adición de grupos hidroxietilo, que gelifican a menos de 30°C y funden a 65°C. Estos datos son importantes, ya que finalizada la electroforesis, el gel se puede licuar a temperatura superior a la de fusión y así separar el DNA en disolución.

Tabla II. Concentraciones de agarosa o acrilamida utilizadas para la separación electroforética de fragmentos lineales de DNA de diferentes tamaños.

Agarosa (%)	Intervalo de tamaños separables (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10.0
0.9	0.5-7.0
1.2	0.4-6.0
1.5	0.2-3.0
2.0	0.1-2.0

Acrilamida (%)	Intervalo de tamaños separables (kb)
3.5	1000-2000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
20.0	6-100

También es importante tener en cuenta la fragilidad del gel. Su resistencia mecánica se expresa en gr/cm², que representa el peso que puede soportar 1 cm² de un gel de agarosa al 1%. La agarosa estándar tiene una resistencia de 1000-2000gr/cm², las de bajo punto de fusión alrededor de 200gr/cm² y las de alta resistencia llegan hasta 6000gr/cm².

Hay agarosas de gran reticulado para fragmentos de pequeño tamaño molecular; utilizadas a concentraciones de 2.0-4.5% (y mantenidas a 4°C) separan eficazmente fragmentos de DNA de 700-3000pb. Además, algunas son transparentes lo que facilita enormemente el proceso de detección.

Finalmente, indicar que en la agarosa, el flujo electroosmótico (EEO) va en contra de la dirección de migración del DNA (hacia el ánodo), lo que perjudica la resolución, por lo que es muy aconsejable utilizar agarosas con valores muy bajos de EEO.

El modelo más habitual de cubeta horizontal, en la que se realiza la electroforesis en geles de agarosa, es bastante similar al descrito en la

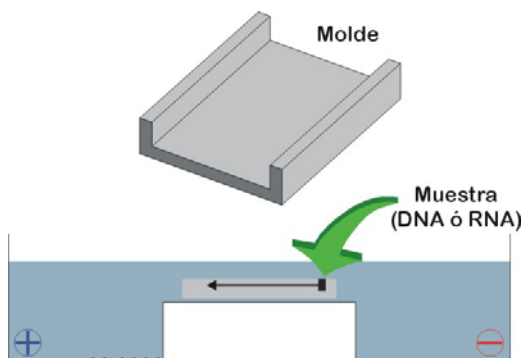


Fig. 19. Electroforesis submarina en geles de agarosa. La cubeta se aloja en su parte central al soporte (gel). La flecha horizontal indica la dirección de migración de la muestra. El molde empleado se muestra en la parte superior; habitualmente, en la cubeta se colocan ambos, molde y gel, como una unidad.

La electroforesis submarina se lleva a cabo de modo que el tampón cubra totalmente el gel; con esta disposición se disipa mejor el calor generado por el paso de la corriente y se consigue un campo eléctrico muy eficaz. Para conseguir el máximo de resolución, suelen emplearse geles de 15-20 cm de largo y 3-4 mm de grosor.

La separación de fragmentos lineales de DNA de doble cadena (dsDNA) se realiza a un pH cercano a la neutralidad, pero para el DNA monocatenario (ssDNA) se utiliza NaOH (50mM).

La muestra de DNA se carga en los pocillos en una disolución (idealmente en el mismo tampón de la electroforesis) a la que se le incrementa la densidad con sacarosa (40% p/v), glicerol (30% p/v) o ficoll (15% p/v), y se le añade uno o varios marcadores, como, por ejemplo, azul de bromofenol (0.25%; tiene una movilidad electroforética semejante a un dsDNA de 300pb), xylene cianol FF (0.25%) o verde de bromocresol (0.25%; para geles alcalinos).

El volumen de muestra que se puede cargar depende de las dimensiones de los pocillos practicados, del tamaño de los fragmentos de DNA y de su diversidad, pero no suele sobrepasar los 50 μ L; cuanto mayor sea el tamaño del DNA, menos cantidad puede cargarse por pocillo. Para pocillos de tamaño medio (0.5 \times 0.5 \times 0.15cm) pueden cargarse 500ng-1 μ g de DNA de tamaño único; cuando existen tamaños diferentes, la cantidad puede incrementarse hasta 30-50 μ g. La cantidad mínima de DNA que puede cargarse depende del límite del método de detección utilizado y así, con bromuro de etidio (BrEt) cantidades menores de 5ng/pocillo son escasamente visibles.

Para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA analizados, se incluye en el gel (habitualmente en los pocillos de los extremos del gel) un conjunto de patrones, fragmentos de DNA de tamaños conocidos (fragmentos de restricción de DNA virales o plasmídicos, como pBR322, pAT153, fago λ).

También pueden realizarse electroforesis bidimensionales en geles de agarosa, la muestra se digiere con una endonucleasa de restricción y los fragmentos se separan en una primera dimensión. Posteriormente, los fragmentos se tratan con una segunda endonucleasa de restricción sobre el propio gel o sobre una membrana de DEAE-celulosa (es lo más habitual) y los subfragmentos obtenidos se separan en la segunda dimensión, de modo similar descrito anteriormente para proteínas. Esta modalidad es habitual en estudios de mapeo genético.

Factores que afectan a la movilidad electroforética del DNA.

El voltaje que se aplica en los geles de agarosa depende de la resolución requerida y del tamaño de los fragmentos a separar. Entre 1-10V/cm (los cm se refieren a la distancia entre los electrodos), la movilidad electroforética de los fragmentos lineales de dsDNA es proporcional al voltaje aplicado; sin embargo, si se incrementa el voltaje, los fragmentos grandes cambian su movilidad electroforética, sin que ésta guarde relación con su tamaño.

En general, la separación de fragmentos grandes de DNA es mejor a bajos voltajes (aunque esto incrementa el tiempo de electroforesis). Sin embargo, elevados voltajes producen bandas estrechas y bastante bien resueltas cuando se trata de fragmentos pequeños.

Un dsDNA lineal se mueve en un gel de agarosa a una velocidad que es dependiente del tamaño del poro del gel. A mayor concentración de agarosa, menor diámetro de poro y menor movilidad. La movilidad electroforética de los fragmentos de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño, expresado en pares de bases (figura 20).

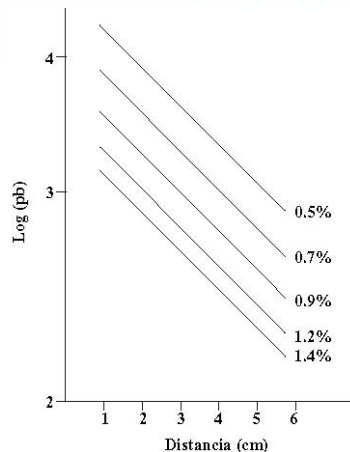


Fig. 20. Relación entre el tamaño de los fragmentos de dsDNA lineal y su movilidad electroforética, para diferentes concentraciones (%T) de agarosa.

Cuanto mayor es el fragmento de DNA, más se retarda a lo largo del recorrido por el gel. Así, los fragmentos se van ordenando hacia el ánodo en relación a su tamaño. Por encima de 50kb, son tan largos que avanzan prácticamente con la misma velocidad y no se separan.

Los extremos del fragmento de DNA tienen más facilidad para moverse y cambiar de dirección que la parte central, de modo que la estructura lineal puede combarse, adoptando forma de horquilla, por lo que puede "engancharse" en las fibras del gel, dificultando su migración. Este fenómeno es muy acusado en fragmentos de tamaño intermedio, y es la causa del fenómeno conocido como inversión de banda, por la cual estructuras de tamaño intermedio migran más lentamente que otras mayores. Este fenómeno es más acusado a elevadas concentraciones de agarosa y bajos voltajes.

Si se incrementa el voltaje para intentar acelerar la separación, las estructuras pueden perder flexibilidad, deformarse y estirarse en la dirección del campo eléctrico adoptando forma de varilla rígida, por lo que no se apreciarían diferencias de tamaño y no habría separación.

Cuando se trata de estructuras circulares, la movilidad electroforética aumenta con el grado de enrollamiento, es decir, cuanto más "retorcido" este el DNA circular, más compacto es, atraviesa mejor el gel y tiene mayor movilidad, por lo que avanza más. Las estructuras circulares superenrolladas

de DNA se mueven con una velocidad que depende del grado de superenrollamiento (Lk). Aquellas moléculas con grado de superenrollamiento nulo se mueven más lentamente que las de valores mayores de grado de superenrollamiento (positivo o negativo, es decir, en un sentido o en otro), y estructuras superenrolladas con distinto grado de superenrollamiento e idéntico tamaño, pueden ser separadas por electroforesis en geles de agarosa (figura 21). En la figura 22 se muestra la movilidad electroforética de distintas formas de DNA circular en relación a al de un fragmento lineal del mismo tamaño.

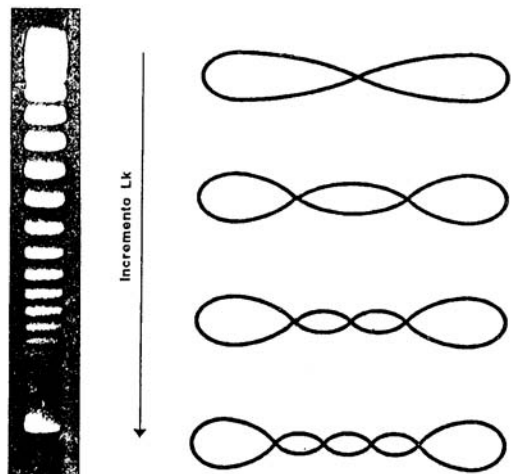
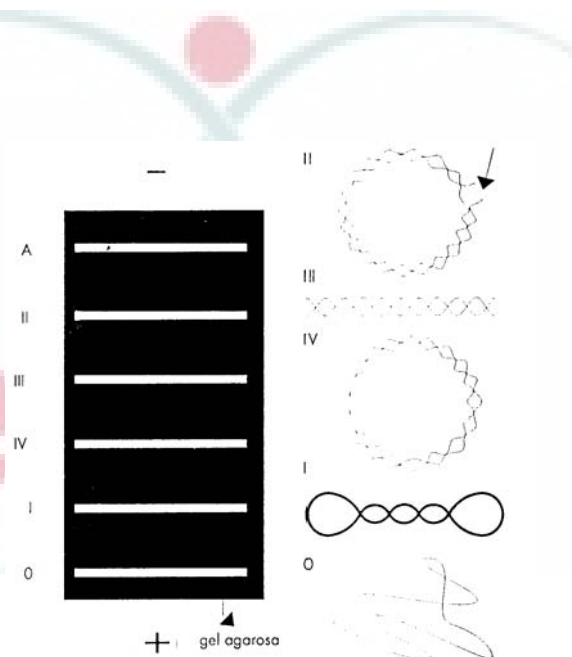


Fig. 21. Relación entre la movilidad electroforética y el grado de superenrollamiento de estructuras circulares de DNA. En la parte izquierda, un DNA circular con diferentes valores de Lk analizado en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con BrEt; las estructuras con mayor Lk presentan una mayor movilidad electroforética. En la parte derecha, representación esquemática de estructuras circulares de dsDNA con distintos grados de superenrollamiento.

Fig. 22. Posiciones relativas de diferentes formas de DNA de la misma longitud en un gel de agarosa. Formas (0): ssDNA circular cerrado; (I): dsDNA circular superenrollado; (II): dsDNA circular mellado (abierto en una hebra); (III): dsDNA lineal; (IV): dsDNA circular cerrado. (A): punto de aplicación de la muestra.



La temperatura no afecta a la movilidad electroforética entre 4°C y 30°C, por ello la electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente, salvo que se utilice agarosa de bajo punto de fusión, en cuyo caso conviene realizar la electroforesis a 4°C. A los voltajes habituales a los que se realizan las electroforesis (1-10V/cm) los pequeños aumentos de temperatura debidos a la resistencia del gel no afectan al DNA ni al gel.

Detección del DNA.

Como ya se ha comentado anteriormente, el BrEt se utiliza para la tinción del DNA, lo que se puede realizar antes (añadiendo el BrEt al propio gel durante su formación) o después (sumergiendo el gel en una disolución con BrEt) de la electroforesis. Es un agente intercalante, ya que se intercala entre pares de bases contiguas del DNA, aumentando la longitud de éste, lo que reduce la movilidad electroforética del fragmento considerado en un 15%. Esto se debe a que al introducirse entre las bases, la doble hélice de DNA se abre y queda menos girada, con lo que aumenta su longitud y se hace menos flexible. Este aumento de tamaño del DNA tratado con BrEt debe tenerse en cuenta si la electroforesis se hace en presencia de este compuesto.

Hay dos maneras fundamentales para visualizar DNA una vez finalizada la electroforesis: mediante compuestos fluorescentes que se unen específicamente a los ácidos nucleicos y con tinción de plata (normalmente para geles de poliacrilamida). Si el DNA está radiactivamente marcado (32P, 35S) se detecta por autorradiografía y si lo está con nucleótidos fluorescentes, las bandas pueden incluso observarse según van migrando por el gel.

La detección con BrEt es el método más habitual para detectar DNA en los geles de agarosa; este compuesto tiene un rendimiento cuántico bastante bajo en medios acuosos (polares), pero se incrementa notablemente cuando pasa a un entorno hidrofóbico, lo que sucede cuando se intercala en el DNA. Así, las bandas de DNA pueden detectarse sumergiendo el gel en una disolución acuosa de BrEt (0.5-1.0µg/mL) e iluminando con luz UV, la cual es absorbida por la sonda y emitida a $\lambda=590\text{nm}$; puede utilizarse radiación de $\lambda=254\text{nm}$, que es absorbida por el DNA y transferida al BrEt ó $\lambda=302\text{nm}$ ó 366nm que es absorbida directamente por la sonda fluorescente. Si se emplea radiación de 254nm ó 302nm, la intensidad de fluorescencia es mayor que si se utiliza 366nm; además, la de 254nm produce más roturas en el DNA que la de 302nm, por lo que es ésta última la λ empleada preferentemente.

Puesto que las bandas sólo son visibles mientras se están iluminando, para tener los resultados de forma permanente, es necesario fotografiar el gel bajo iluminación (figura 23). Para los geles habituales (10×6×0.5cm), 20-30 minutos son suficientes para que el BrEt los impregne, aunque si la concentración de agarosa es superior al 4%, el tiempo debe aumentarse. Con BrEt pueden detectarse bandas conteniendo 1-10ng de DNA, aunque otros compuestos fluorescentes (SYBR-Green, TOTO-1 y YOYO-1) son capaces de detectar 50-60pg/banda de DNA ó RNA.

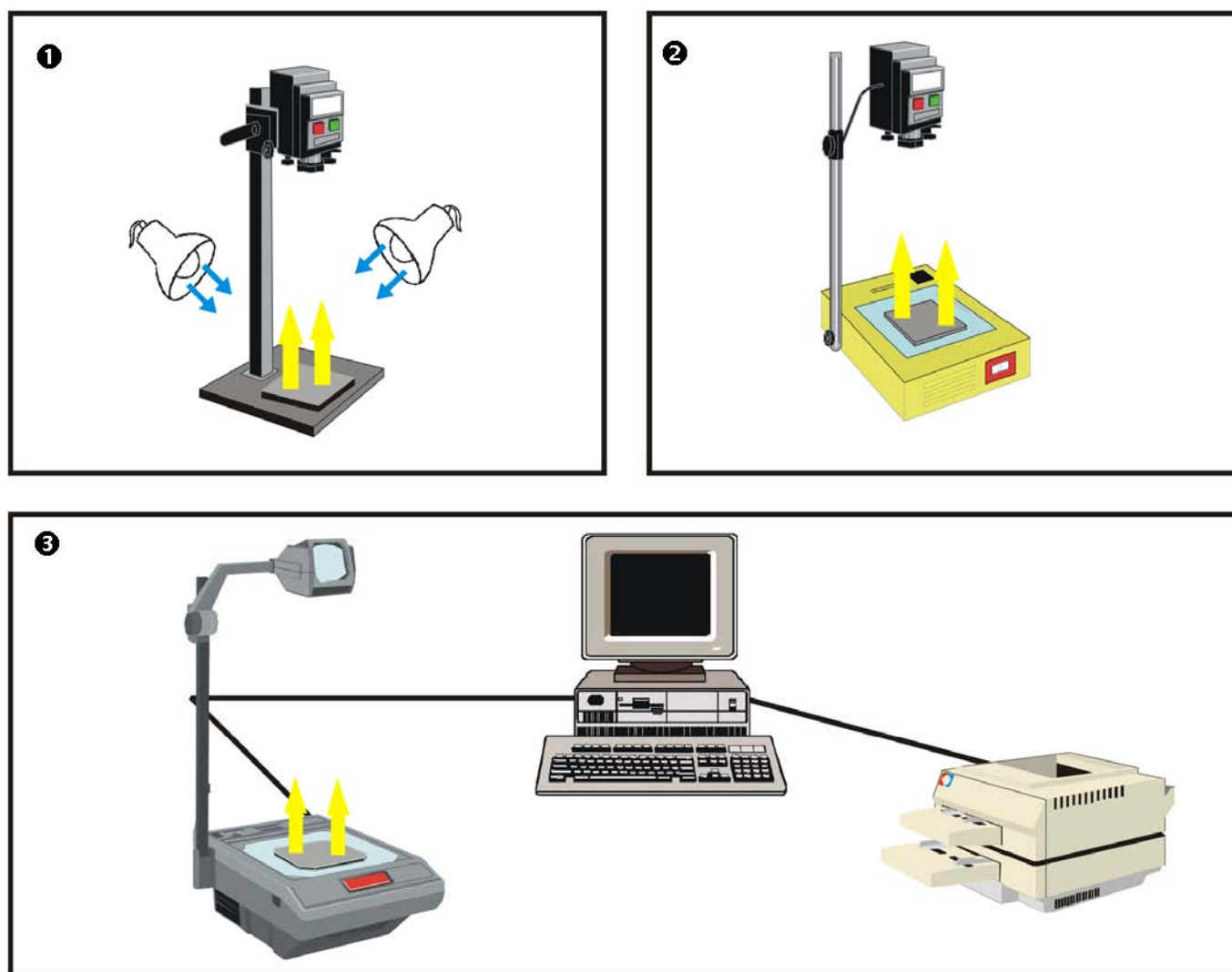


Fig. 23. Iluminación y fotografía de geles de agarosa. Iluminación incidente. Iluminación por transmisión (transiluminación). Videocámara con la imagen del gel sobre el transiluminador. Las flechas amarillas representan la radiación emitida (fluorescencia) por los complejos DNA-BrEt.

Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes.

Se lleva a cabo en modo submarino como ya se ha descrito. Se utiliza para la separación de fragmentos de DNA monocatenario grandes (1000-2000 nucleótidos) y especialmente para el análisis de mRNA, que se transfiere posteriormente a membranas para su detección (Northern Blot). La transferencia e hibridación son similares a las descritas para el DNA, pero teniendo en cuenta que el mRNA es monocatenario.

Para lograr una buena separación y para calcular con fiabilidad los tamaños es necesario que las moléculas estén completamente desnaturizadas, ya que la estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos está mantenida esencialmente por el apareamiento (tanto inter- como intracatenario) de bases complementarias; para asegurar esta desnaturización se utilizan agentes desnaturizantes como la temperatura, el pH básico y diversos agentes químicos dependiendo del soporte y del ácido nucleico. No pueden utilizarse agentes desnaturizantes que rompan los puentes de hidrógeno (urea, formamida) ya que afectan también a la agarosa (sus fibras se mantienen mediante puentes de hidrógeno).

Transferencia a membranas (Southern y Northern Blot).

Las moléculas de DNA o RNA separadas en los geles de agarosa pueden ser transferidas a membranas de nitrocelulosa o de nylon. La transferencia se realiza tras la desnaturización del DNA o RNA. La unión a la membrana ocurre a través del esqueleto azúcar-fosfato de la molécula de DNA o RNA, quedando libres y expuestas las bases nitrogenadas. Esto permite localizar e identificar secuencias específicas en los fragmentos transferidos, incubando la membrana con sondas específicas radiactivas o de otra naturaleza, que hibridan con la secuencia complementaria, revelando su posición por autorradiografía de la membrana.

De esta manera puede identificarse un fragmento específico de DNA o RNA entre toda la población de estructuras separadas por electroforesis y transferidas a la membrana. La sensibilidad del método es muy elevada y pueden detectarse $<0.1\mu\text{g}$ de DNA o RNA usando una sonda marcada con ^{32}P (figura 24); por ejemplo, una secuencia única de 1.000pb presente en el genoma humano (1 parte en 3 millones) puede ser detectada por este método a partir de $10\mu\text{g}$ de DNA genómico.

Las membranas de nitrocelulosa dan mejor resolución que las de nylon, pero éstas últimas presentan varias ventajas por lo que su uso es más extendido: tienen una mejor consistencia (las de nitrocelulosa son bastante frágiles y pueden desmenuzarse con la manipulación) y poseen mayor capacidad de unión de DNA, pudiendo ser utilizadas para hibridaciones sucesivas; además, producen poca fluorescencia de fondo (fluorescencia inespecífica) al ser iluminadas con radiación UV, lo que es muy útil para la detección de bandas de DNA.

La desnaturalización de los fragmentos de DNA, previa a la transferencia, se realiza introduciendo el gel en una disolución de NaOH que se neutraliza posteriormente. Las cadenas de DNA desnaturalizadas no deben ser muy largas para que la transferencia sea efectiva y, así, fragmentos mayores de 15-20kb deben ser fragmentados previamente con radiación UV o tratamiento ácido.

La transferencia puede realizarse por capilaridad, por electroforesis (electrotransferencia), por centrifugación o por succión (mediante una bomba de vacío), aunque los dos últimos sistemas necesitan dispositivos específicos, por lo que su uso es más restringido. Normalmente, la electrotransferencia se utiliza cuando la separación del DNA se ha realizado en geles de poliacrilamida (dado que el reticulado es más denso que el de la agarosa). El tiempo de transferencia depende del grosor del gel, del porcentaje de agarosa y del tamaño de los fragmentos de DNA. Una vez en la membrana, el DNA se fija a ella mediante calentamiento a 80°C o iluminación con radiación UV.

Al igual que en el Western Blot, las regiones de la membrana no ocupadas por el DNA transferido deben bloquearse, para evitar que al añadir la sonda, ésta se una inespecíficamente a la membrana y produzca un fondo en el revelado. Para realizar este bloqueo, la membrana se sumerge en una disolución que contenga sustancias de elevado peso molecular, como ficoll (400kDa), polivinilpirrolidona (360kDa) o seroalbúmina bovina (66kDa), además de DNA heterólogo de diversos orígenes (bacteriano, timo de ternera, esperma de salmón, etc.).

La formación de las estructuras híbridas (heterodúplex) entre la sonda y la secuencia complementaria buscada es muy dependiente de las condiciones experimentales (particularmente de la temperatura); para realizarla se utilizan dos sistemas: en el primero, la membrana se introduce en una bolsa de plástico hermética que contiene la disolución con la sonda, controlándose la temperatura por inmersión en un baño termostatzado; el segundo, utiliza hornos de hibridación, introduciendo las membranas en botellas que contienen la disolución de la sonda.

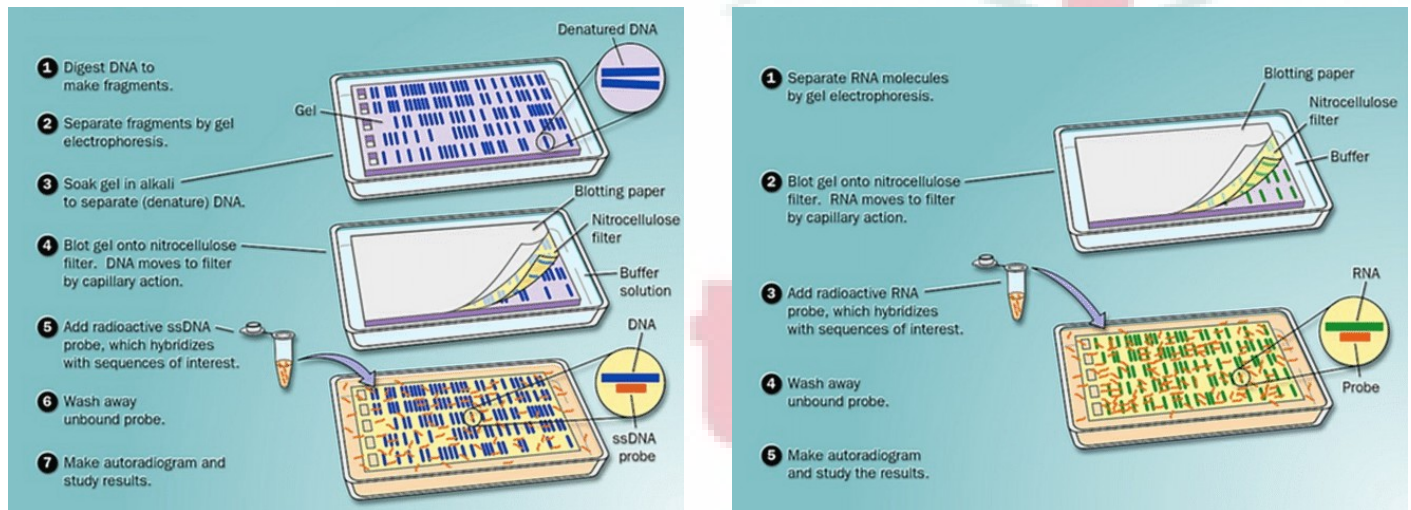


Fig. 24. Esquema de desarrollo de un Southern Blot (izquierda) y un Northern Blot (derecha).

Electroforesis en campos pulsantes (PFGE).

Con las electroforesis descritas hasta ahora, se pueden separar fragmentos de hasta 20kpb, e incluso hasta 50kpb con geles de agarosa de muy baja concentración. Schwartz y Cantor desarrollaron en 1984 un sistema denominado electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) con el que consiguieron separar cromosomas de levadura de varios cientos de kpb. La PFGE consigue la separación de grandes fragmentos de DNA induciendo su reorientación mediante cambios periódicos en el campo eléctrico, cuya duración determina el intervalo de tamaños que se pueden separar (cuanto mayor sea el tamaño de los fragmentos a separar, mayor ha de ser la duración de los campos aplicados).

En una PFGE los fragmentos se someten a dos campos eléctricos de distinta orientación. Al aplicarse el primero (E1) durante cierto tiempo, los fragmentos se estiran y se orientan según la dirección de dicho campo. Si ahora se aplica un segundo campo (E2), perpendicular al anterior, se obliga a los fragmentos de DNA a relajarse y elongarse y alinearse de acuerdo con este segundo campo eléctrico. Cuanto menos tarde una molécula en reorientarse, antes migra en la dirección de E2; el tiempo que se consume en esta reorientación depende del tamaño de los fragmentos, tardando más los mayores. Aplicando sucesivos cambios de campo eléctrico (E1/E2/E1/E2/E1/E2 etc.) se consigue la separación de los fragmentos en función de su tamaño.

El ángulo α que forman las direcciones de los campos eléctricos E1 y E2 se denomina ángulo de reorientación, y determina lo que deben "girar" los fragmentos de DNA cada vez que cambia la orientación del campo. Normalmente se utilizan ángulos $>100^\circ$; cuando se opera a un ángulo fijo, éste es de 120° , aunque si el dispositivo permite seleccionar diferentes ángulos, se trabaja entre 100° y 120° ; esto es particularmente útil para la separación de fragmentos muy grandes de DNA ($>2\text{Mb}$).

La duración de los campos eléctricos que se alternan se denomina duración del pulso y determina el intervalo de los tamaños de DNA que se pueden separar; estos intervalos son muy variables, desde fracciones de segundo para fragmentos muy pequeños hasta 1-2 horas para fragmentos muy grandes ($>5\text{Mb}$) (Tabla III).

Para una duración de pulso dada, aquellos fragmentos de gran tamaño que no hayan tenido tiempo a reorientarse en la nueva dirección del campo no se separan, pero no permanecen inmóviles en el gel; se mueven muy lentamente, pero juntos, sin resolverse en bandas distintas y aparecen como una zona más o menos ancha en la parte superior del gel; dicha zona se denomina zona de compresión.

Es importante destacar que la utilidad de la PFGE es análoga a la de la electroforesis convencional, salvo que los fragmentos de DNA separados son de mayor tamaño. Esto hace que la transferencia a membranas no pueda hacerse directamente, ya que para tamaños superiores a las 20kb los fragmentos se han de dividir en otros menores mediante radiación UV o tratamiento con ácido (HCl). También puede ser utilizada para electroforesis bidimensionales, cambiando las condiciones en cada dimensión; esto permite el mapeo genético de grandes regiones de DNA o de cromosomas enteros pequeños.

El equipo necesario para realizar una PFGE se diferencia notablemente del de otras electroforesis, tanto en la cubeta como en la fuente de alimentación. La cubeta tiene un conjunto de electrodos en lugar de un par, cuya disposición y diseño posibilitan las distintas orientaciones del campo eléctrico; los electrodos de platino son de mayor grosor que en el resto de las electroforesis, ya que los cambios periódicos de polaridad producen una marcada corrosión de los mismos. La cubeta tiene, además, un sistema de recircularización del tampón a temperatura estrictamente controlada, de modo que no se produzcan variaciones de temperatura en el gel (Figura 25). La preparación de los geles de agarosa no difiere de los ya descrito para otras electroforesis de DNA; se utilizan geles de agarosa al 0,5-1,0% (20×20 ó 15×15 cm), de bajo flujo electroosmótico y elevada resistencia (Figura 26).

Tabla III. Relación entre la duración del pulso y la resolución en una PFGE.

Duración del pulso	Intervalo de separación	Resolución máxima	Duración del proceso (h)	Voltaje (V)
0,3seg	1-10kb	1-10kb	1	450
0,5seg	5-30kb	10-25kb	2	450
0,8seg	30-50kb	35-50kb	3	450
5seg	20-100kb	60-90kb	4	300
25seg	40-400kb	200-300kb	6	300
45seg	40-600kb	400-550kb	10-24	300
100seg	40-1.000kb	700-900kb	17-40	165-200
125seg	100-1.600kb	800-1.200kb	17-40	165-200
20min	1-2,5Mb	1,6-2,5Mb	100-140	165-200
30min	1,6-3Mb	2,5-3Mb	100-140	165-200
40min	1,6-6Mb	2,5-6Mb	140	30
75min	2-9Mb	3-6Mb	140-170	30
90min	1-10Mb	6-9Mb	185	30
100min	3-13Mb	7-10Mb	190-200	30
180min	3-13Mb	10-13Mb	190-200	27

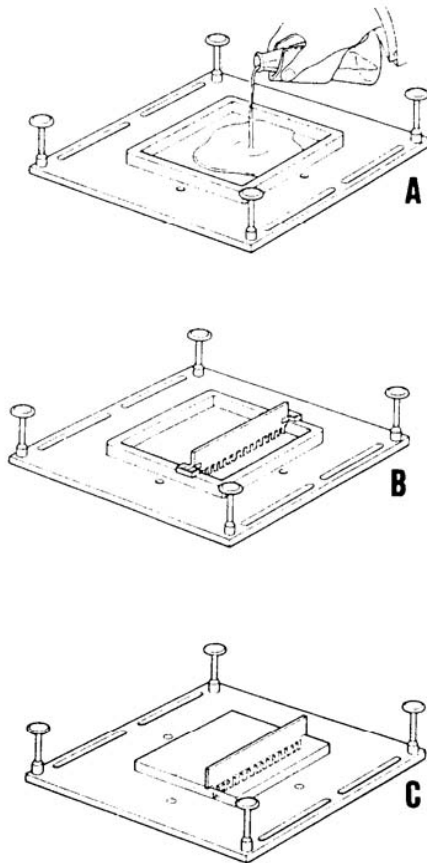


Fig. 25. Cubeta utilizada en una PFGE con simetría hexagonal. Tapa con cable de conexión incorporado, por lo que retirando la tapa se desconecta la corriente. Dispositivo hexagonal con los electrodos embutidos. Plataforma con el gel incorporado. Cubeta con el sistema refrigerante (serpentin) en su base. El conjunto se ensambla según esta dispuesto en la figura (sobre, sobre y sobre los anteriores).

02.2006

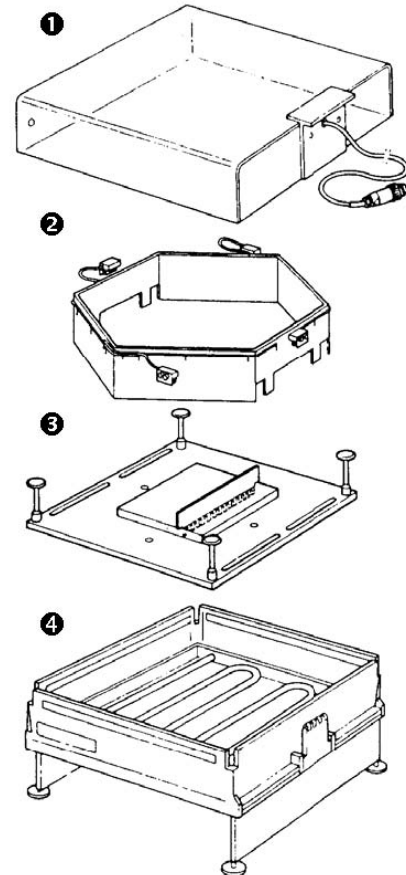


Fig. 26. Preparación de un gel de agarosa para PFGE. A la agarosa fundida se vierte sobre la bandeja que lleva adosada el molde. B colocación del peine, soportado en los extremos sobre el molde. C una vez gelificada la agarosa se retira el molde quedando el gel sobre la bandeja, que se coloca en la cubeta.

La preparación y aplicación de la muestra es la fase más delicada de la PFGE por el gran tamaño de las estructuras que se manejan, lo que las hace fácilmente fragmentables. El DNA suele cargarse en el gel como una disolución concentrada (de mucha viscosidad), junto con agarosa fundida o embebido en pequeños bloques o tacos de agarosa sólida (Figura 27). La utilización de una u otra forma depende del tamaño del DNA a analizar y de la naturaleza de la muestra. Los fragmentos de 200-300kb pueden cargarse como disoluciones directamente en el gel, pero para fragmentos mayores de 500kb no se suele emplear el DNA aislado como tal y sí las propias células que lo contiene.

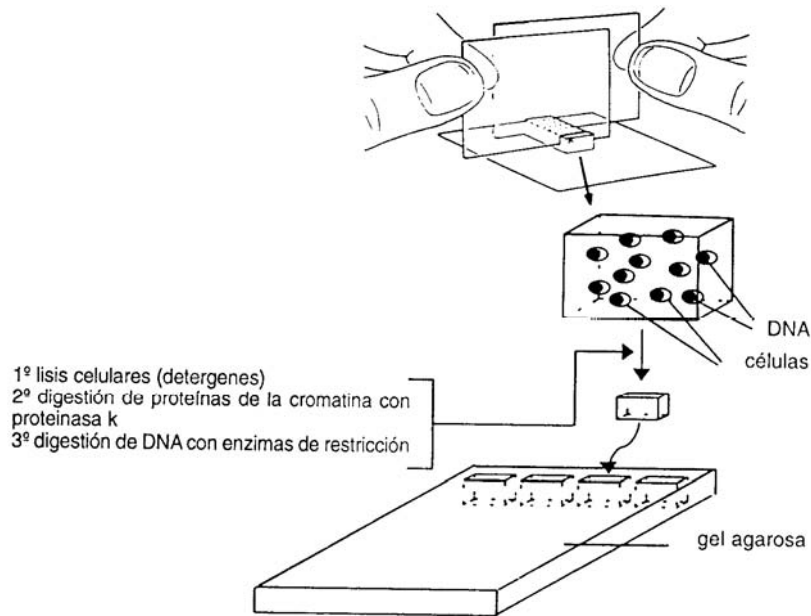


Fig. 27. Preparación de la muestra para PFGE en bloques de agarosa. A partir de un bloque grande, que contiene las células cuyo DNA se desea analizar, se cortan pequeños tacos (parte superior) del tamaño de los pocillos practicados en el gel (parte inferior). Todos los procesos de lisis celular y digestiones enzimáticas se realizan sobre el taco de agarosa.

Cultek