

15. Electroforesis: electroforesis en papel de proteínas séricas

Isaac Túnez Fiñana

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba

RESUMEN

La electroforesis consiste en la separación de partículas aprovechando su traslado mediante la aplicación de campos eléctricos. La capacidad de movimiento de las diferentes moléculas depende de la intensidad del campo aplicado, su carga y su peso molecular. Existen diferentes tipos, que se engloban en dos: libre o de frente móvil y de zona. El objetivo será clarificar los conceptos con ella relacionados, la metodología y práctica de la electroforesis en papel, así como su relevancia en el estudio de las proteínas séricas.

Palabras Clave: acetato de celulosa, electroforesis, movilidad electroforética, proteínas séricas.

Abreviaturas empleadas. PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida; SDS-PAGE: electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida; SDS: dodecil sulfato sódico

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Se denomina electroforesis al transporte de partículas en un campo eléctrico. Cualquier ión o molécula cargada eléctricamente migrará cuando se someta a la acción de un campo eléctrico. A un pH determinado, muchas moléculas biológicas poseen carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH y composición del medio en que se encuentren. Con técnicas electroforéticas, es posible separar los diferentes componentes de una mezcla de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas cargadas.

En el laboratorio clínico, la aplicación más importante de la electroforesis es la separación de proteínas presentes en el suero, orina y otros fluidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo y el líquido sinovial. El objetivo principal de la práctica estará dirigido a la comprensión e identificación de conceptos físicos teóricos relacionados con este tipo de técnicas, así como la descripción de las mismas y su uso.

1.2. Movilidad electroforética

Si se aplica un campo eléctrico a una mezcla de moléculas cargadas, éstas migrarán al electrodo de polaridad opuesta. Cuando una molécula de carga q se encuentra en un campo eléctrico de magnitud E , la fuerza que provoca la

aceleración de la partícula será qE . Dicha fuerza se verá contrarrestada por la resistencia friccional f dando una velocidad resultante v , de forma que:

$$qE = fv$$

Aplicando las leyes de Stokes para una molécula esférica de radio r que se mueva a través de un medio de viscosidad n , se cumple:

$$f = 6nr$$

A partir de las anteriores expresiones se obtiene:

$$qE = 6nrv$$

La movilidad electroforética V de una molécula se define como la migración por unidad de campo de fuerza, de modo que:

$$V = v/E = q/f = q/6nr$$

Por tanto, la movilidad electroforética depende de la carga de las partículas y del coeficiente de fricción f , que es dependiente del tamaño de la molécula, de su forma y de la viscosidad del medio.

1.3. Tipos de electroforesis

1.3.1. Electroforesis de frente móvil o libre

Las sustancias a separar se introducen en un tubo en forma de U, disueltas en un tampón de pH y fuerza iónica adecuados. Se colocan dos electrodos en sendos brazos del dispositivo, entre los que se crea un campo eléctrico, provocando que las moléculas de proteína cargadas emigren hacia los electrodos de polaridad opuesta. Las diferentes proteínas se desplazan a velocidades diferentes de acuerdo con sus cargas y coeficientes de fricción respectivos, formándose nubes (o frentes) que se desplazan en la disolución tampón.

Este desplazamiento puede seguirse con diversos sistemas ópticos que ponen de manifiesto las sustancias según se van separando. Para impedir la mezcla por convección de las proteínas que emigran se necesita un sofisticado aparato y a su vez se precisa el empleo de muestras muy grandes. Esta es la razón por la que la electroforesis de frente móvil ha sido sustituida por la electroforesis de zona.

1.3.2. Electroforesis de zona

En esta técnica, la muestra está obligada a desplazarse sobre un soporte sólido de papel, celulosa o gel. La pequeña cantidad necesaria de muestra permite que las moléculas migren en discretas zonas o bandas. La electroforesis zonal de biomoléculas cargadas, generalmente se lleva a cabo en una disolución estabilizada con un medio que sirve de soporte.

- Electroforesis en papel

La muestra se aplica sobre una tira de papel de filtro humedecido con una

disolución tampón, bien en el centro o en cualquiera de los extremos del papel, dependiendo de las sustancias a separar y del pH del tampón. Los extremos de la tira se sumergen en dos recipientes separados que contienen la disolución tampón y en los que se hallan colocados los electrodos.

Se conectan los electrodos a una fuente de tensión continua y se aplica una diferencia de potencial durante el tiempo adecuado. Al aplicar una corriente directa, las moléculas cargadas de la mezcla emigran hacia los electrodos de polaridad opuesta formando bandas en el papel. La velocidad de emigración de una molécula, depende preferentemente de su carga. Completada la electroforesis, se desconecta la fuente de tensión y se secan las tiras sobre una superficie, limpia, seca y lisa (cristal, azulejo, etc...).

El revelado se realiza empleando los mismos métodos que los utilizados en cromatografía sobre papel, mediante la acción de los colorantes adecuados.

La electroforesis y la cromatografía en papel tienen ciertas similitudes. Sin embargo, mientras que la electroforesis separa las moléculas fundamentalmente en función de su carga, la cromatografía lo hace en base a una amplia gama de características (ejemplos, solubilidad en la cromatografía de reparto, polaridad en la de adsorción, carga en la de intercambio iónico, etc.).

La electroforesis en papel se emplea principalmente en la separación de sustancias de bajo peso molecular como aminoácidos y péptidos. La difusión que se produce puede disminuirse aumentando la diferencia de potencial entre los electrodos con lo que se reduce el tiempo de desarrollo. Este tipo de electroforesis se denomina de "alto voltaje". El revelador para localizar las sustancias sería la ninhidrina en el caso de péptidos y aminoácidos.

Las electroforesis en papel también pueden hacerse en tiras de acetato de celulosa, que son químicamente más homogéneas y tienen la ventaja de ser transparentes, con lo que las sustancias a separar, una vez teñidas o reveladas, pueden cuantificarse por densitometría. Es muy útil en los laboratorios clínicos por su fácil manipulación y su rápido desarrollo.

La principal aplicación es la separación de proteínas del suero, conociéndose el resultado como proteinograma. Las fracciones proteicas del suero que se separan mediante este tipo de electroforesis son la albúmina y las globulinas α_1 , α_2 , β y γ .

El acetato de celulosa se utiliza también para separ lipoproteínas. El resultado obtenido se denomina lipidograma. Las fracciones lipoproteicas son denominadas β , pre- β y γ . El tampón más usado es el veronal, a pH 8,6. La separación se realiza de forma análoga a la de proteínas y se produce en unos 30 minutos. Las lipoproteínas, una vez separadas, se localizan tiñéndolas con colorantes que se unen a la fracción lipídica, como "Negro Sudán" o "Ciba 7B Fat Red".

Electroforesis análogas a las de proteínas y lipoproteínas, utilizando como soporte el acetato de celulosa, se han aplicado también para la separación de isoenzimas de la lactato deshidrogenasa y la creatín-quinasa.

- Electroforesis en gel

Un gel es un estado intermedio entre el sólido y el líquido. Este tipo de electroforesis se halla entre los métodos más resolutivos y convenientes empleados en la separación de macromoléculas. Los geles de uso más generalizado son: poliacrilamida y agarosa. Éstos poseen poros de diferentes dimensiones moleculares que delimitan la velocidad de traslado y moléculas trasladadas durante el proceso electroforético. De esta forma, la separación no se produce sólo por las diferentes cargas de las moléculas, sino también por las diferencias de tamaño. Los geles están formados por un reticulado de polímeros (constituyendo una red enmarañada) y el líquido intersticial en el que se encuentra inmerso esta red.

Existe una gran variedad de tipos de electroforesis en gel, que se pueden agrupar en dos categorías:

- Electroforesis en gel en una dimensión (continuo o discontinuo)
 - PAGE-nativa
 - SDS-PAGE
 - Isoelectroenfoque
- Electroforesis en gel en dos dimensiones (bidimensional)

Según las aplicaciones u objetivos que se pretendan conseguir en una práctica o experimento, se utilizará un tipo u otro de electroforesis en gel. Los geles discontinuos mejoran la resolución de la electroforesis pues se consigue agudizar las bandas en gran medida por el uso de esta técnica conocida como electroforesis a pH discontinuo que precisa de dos geles y dos tampones diferentes.

La PAGE-nativa se utiliza para separar proteínas en condiciones no desnaturalizantes, por tanto, en función de la carga intrínseca de las mismas. La SDS-PAGE es muy útil para calcular el peso molecular de una proteína concreta ya que separa las proteínas según su tamaño. El isoelectroenfoque es un tipo de PAGE en una dimensión que se basa en la separación de moléculas de acuerdo a sus diferentes puntos isoeléctricos.

La electroforesis en gel en dos dimensiones combina el isoelectroenfoque (primera dimensión) con la SDS-PAGE (segunda dimensión). Es una técnica muy resolutiva, y el mejor método analítico para separar proteínas que existe hoy en día.

1.3.3. Electroforesis capilar

Aunque la electroforesis en gel en sus diversas formas resulta un método común y efectivo para la separación de moléculas, el proceso de separación puede durar varias horas, siendo difícil de cuantificar y automatizar.

La técnica aquí presentada se lleva a cabo en el interior de tubos capilares (1–10 μm de diámetro). Estos capilares disipan el calor rápidamente permitiendo la aplicación de campos eléctricos elevados, reduciendo así los tiempos de separación.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

2.1. Equipamiento

Sistema de electroforesis.
Fotodensitómetro.

2.2. Material

Pipetas de 1–5 ml.
Micropipetas o pipetas de pistón de 25–1000 μ l.
Puntas desechables.
Vasos de precipitado.
Tiras de papel especial (Whatman 1, 3, etc.) de filtro o de acetato de celulosa, impregnadas en la solución amortiguadora correspondiente.

2.3. Reactivos

Agua destilada.
Soluciones amortiguadoras.
Colorantes.
Decolorantes.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

3.1. Electroforesis en papel

3.1.1. Se adaptan convenientemente a la cámara de electroforesis las tiras impregnadas con la solución amortiguadora.

3.1.2. Se aplica la muestra. Se depositan de 10–15 μ l en una fina banda en la zona del cátodo paralela a los polos de la cubeta electroforética, para separar proteínas del suero o de cualquier líquido biológico (orina, líquido cefalorraquídeo, etc...).

3.1.3. Se separan las diferentes fracciones mediante el paso de la corriente. La duración depende de la intensidad y el voltaje suministrado. Se aplican 0,26 mA por cm de ancho de la tira.

3.1.4. Acabada la separación, la tira se retira y seca en la estufa entre 60–110°C.

3.1.5. Se colorea sumergiendo la tira en la solución colorante durante 5 min. El tiempo de coloración varía según el colorante empleado, oscilando entre 5–30 min.

3.1.6. Se lava 3 veces con una solución de acético al 5%.

3.1.7. Se seca a temperatura ambiente.

3.1.8. Se decolora, retirando el exceso de colorante. Se deja sólo el que ha sido fijado por las proteínas.

3.1.9. Se valora por fotodensitometría. Consiste en hacer pasar la tira por un haz de luz que es absorbida según la cantidad de proteína coloreada.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Las fracciones proteicas del suero que se separan por electroforesis en acetato de celulosa son la albúmina y las globulinas α_1 , α_2 , β y γ . En condiciones normales, los porcentajes de cada fracción que se obtiene con el análisis densitométrico de las tiras, son los siguientes:

PROTEÍNAS SÉRICAS	%
Albúmina	53-67
Globulinas α_1	2,5-5
Globulinas α_2	7-13
Globulinas β	9-14
Globulinas γ	10-21

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

6. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

González de Buitrago JM (1985): Electroforesis . En González de Buitrago JM (eds): “Técnicas de Laboratorio Clínico”, 1ª ed. Editorial Alambra (Madrid, España), pp. 117 – 125.

González de Buitrago JM (1998): Osmometría. Cromatografía. Electroforesis. Técnicas electroquímicas. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade M, Sánchez A (eds): “Bioquímica Clínica”, 1ª ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana(Madrid, España), pp. 17 – 27.

Vidal C (1988): Electroforesis. En Lozano JA, Tudelo J (eds): “Prácticas de Bioquímica. Experimentación y Simulación”, 1ª ed. Editorial Síntesis (Madrid, España), pp. 37 – 45.

ANEXO: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

1. Soluciones para la electroforesis

1.1. Tampón veronal/veronato sódico

Veronal/veronato sódico, pH 8,6		
	1 litro (g)	1 litro (g)
Veronal (ácido dietilbarbitúrico)	1,84	15,45
Veronal sódico	10,40	2,76
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

1.2. Tampón acetato/veronal

Acetato/veronal, pH 8,6	
	1 litro
Veronal sódico	10 g
Acetato sódico	6,5 g
HCl 0,1 M	64,5 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

2. Soluciones de colorantes utilizados en las tinciones

2.1. Solución de negro amido

Negro Amido	
	1 litro
Metanol	450 ml
Ácido acético	100 ml
Negro amido	6,0 g
Agua destilada	450 ml

2.2. Solución de azul de bromofenol

Azul de bromofenol	
	100 ml
Metanol	100 ml
Bicloruro de Hg	A saturación
Azul de bromofenol	100 mg

2.3. Solución de azocarmin B

Azocarmin B	
	100 ml
Azocarmin B	10 g
Metanol (50%)	90 ml
Ácido acético	10 ml