

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

Presencia de Sodio Dodecil Sulfato bajo condiciones reductoras (SDSPAGE)

Método rápido, reproducible y de bajo costo

Utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas

Técnica analítica semipreparativa : se separan biomoléculas según su tamaño molecular bajo la acción de un campo eléctrico. (Laemmli 1.970).

Permite separar proteínas haciéndolas pasar por un gel o resina: bisAcrilamida, la cual es un agente entrecruzador que genera un polímero sobre el cual se adherirán las proteínas.

La separación electroforética se realiza en condiciones desnaturizantes, al añadir compuestos que alteren las condiciones nativas de las proteínas y que se agrupan en una solución denominada: tampón de carga.

GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

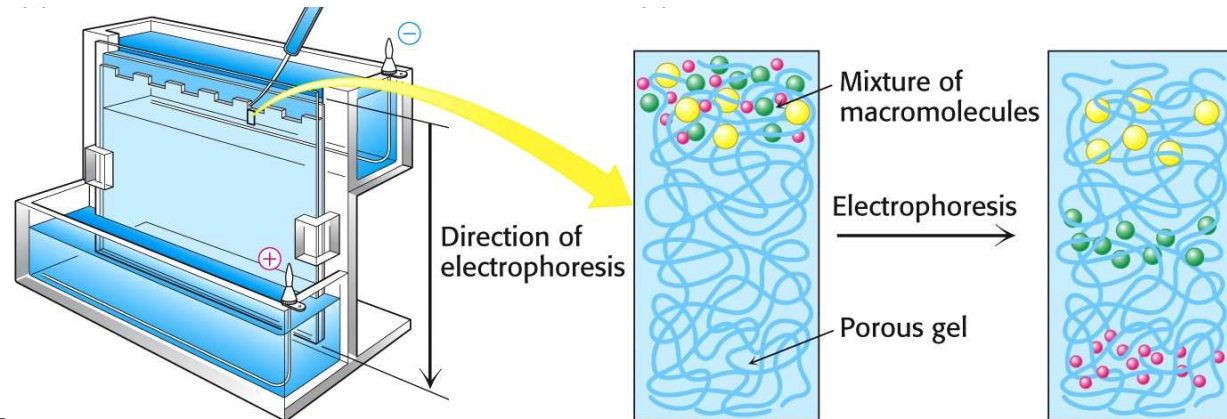
Soporte: Gel de Poliacrilamida

* Polimerización de dos componentes: **Acrilamida + Bisacrilamida**

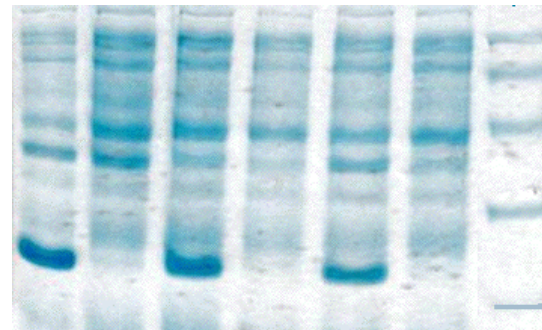
* Variación de la concentración → variación del tamaño de poro

↑ [poliacrilamida] ↓ tamaño poro

Electroforesis vertical



1. Preparación del gel
2. Montaje de la cubeta
3. Aplicación de la muestra
4. Electroforesis
5. Detección por tinción:
 Azul de Coomassie
 Sales de plata



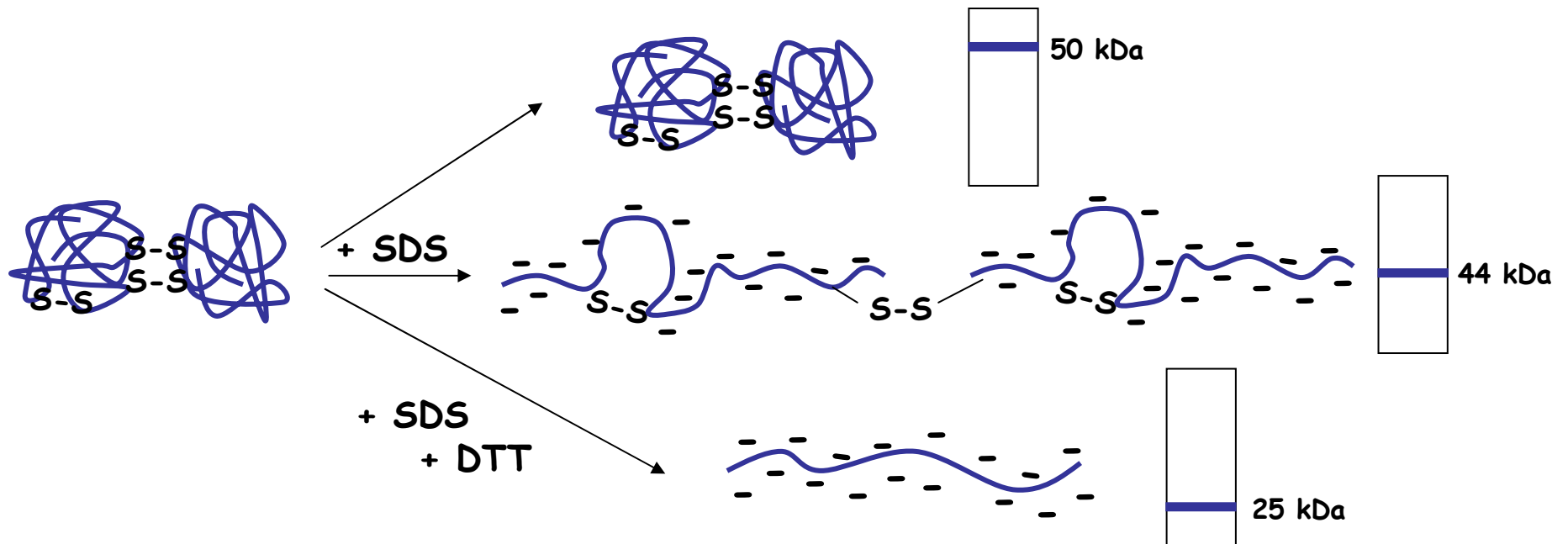
Condiciones de la PAGE:

* No desnaturalizantes: separamos por CARGA y TAMAÑO → PAGE

* **Desnaturalizantes:** separamos sólo por **TAMAÑO** → SDS-PAGE

Agentes desnaturalizantes: SDS (dodecilsulfato sódico), urea,
reductores: DTT, β-mercaptoetanol

- **SDS:** detergente aniónico (-), dota a todas las proteínas de carga (-) todas migrarán hacia el ánodo (+), separándose sólo por tamaño

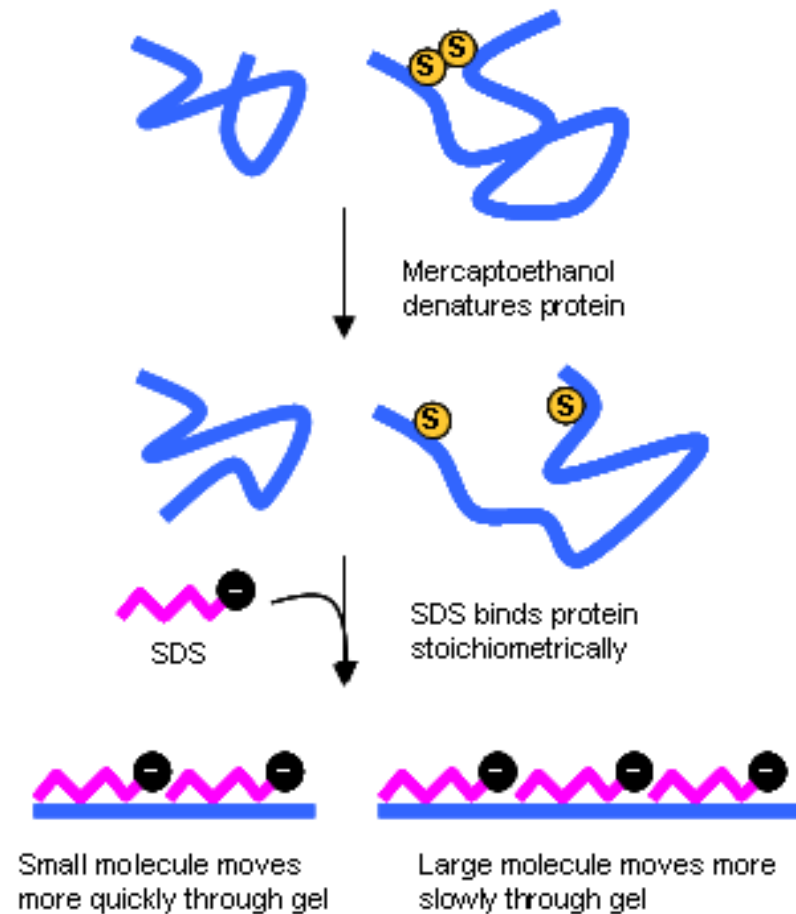


Tampón de carga contiene:

Mercaptoetanol, un agente reductor, que se encarga de eliminar los puentes disulfuro que se forman en la estructura terciaria de las proteínas entre los restos Cisteína

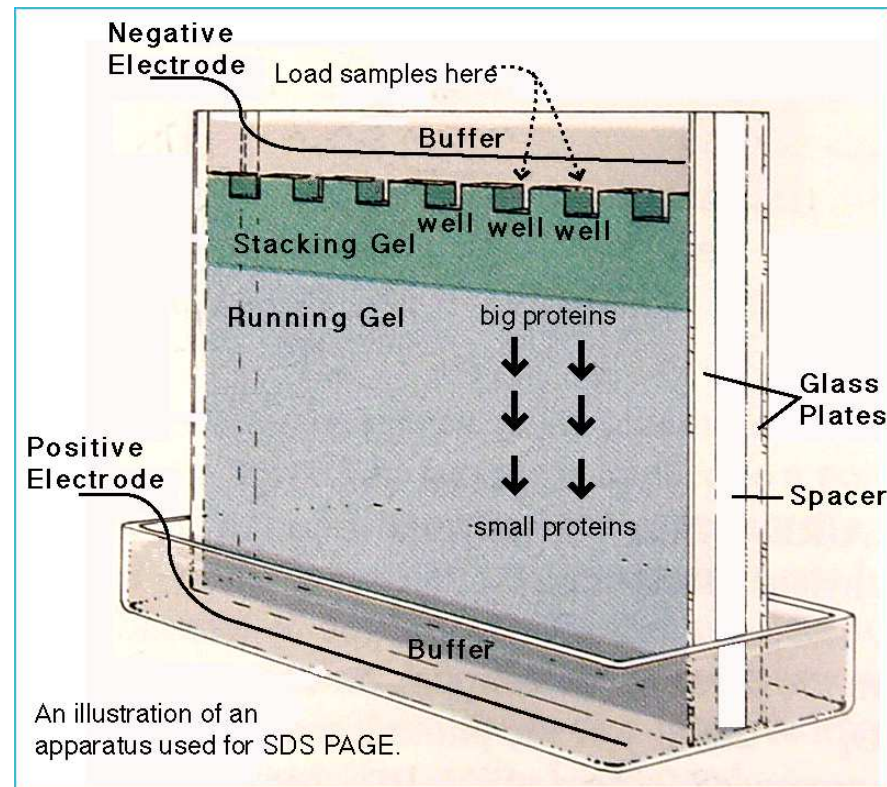
El SDS (lauril sulfato) es el detergente que se une a las proteínas, las desnaturaliza y le aporta sus cargas negativas

Azul de bromofenol, colorante con carga negativa y con una movilidad electroforética que equivaldría a pequeños polipéptidos. Su función es la de marcar el frente de electroforesis.



Al aplicar un campo eléctrico a la muestra inmersa en el tampón de carga, el complejo proteína-SDS migrará hacia el polo positivo y se separará según su tamaño.

Los polipéptidos de menor peso molecular migrarán más rápido.
Los de alto peso lo harán más lentamente.



Las aplicaciones más comunes de esta técnica son:

Análisis del grado de pureza de una proteína

Determinación de su peso molecular

Verificación de la concentración de proteínas

Detección de proteólisis

Identificación de proteínas inmunoprecipitadas

Separación de proteínas marcadas con isótopos radioactivos

Ventajas:

Gran poder de separación por **TAMAÑO**

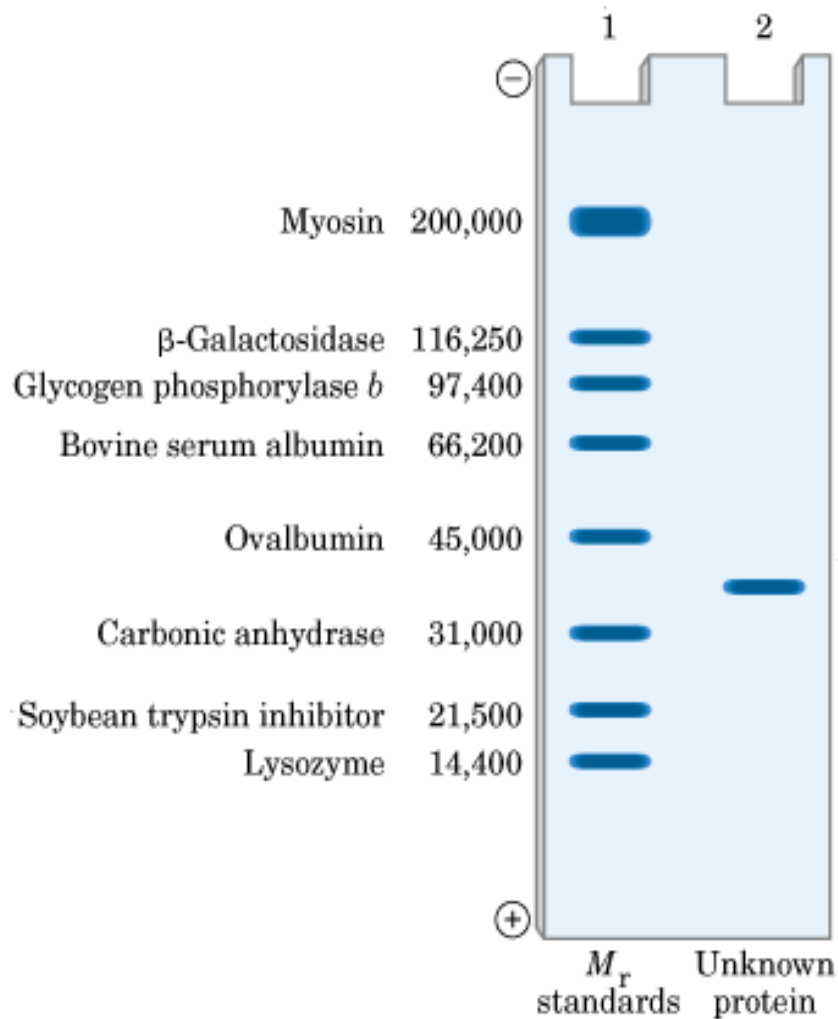
Químicamente inertes

Transparentes (permite densitometría)

Estables (pH, fuerza iónica, temperatura)

Versatilidad en cuanto al tamaño de poro y entramado uniforme

SDS-PAGE: determinación del peso molecular



(a)

Marcadores de peso molecular:

Mezcla de diferentes proteínas preteñidas de las que conocemos el peso molecular.

Por comparación podemos averiguar el PM **aparente** de nuestra proteína.

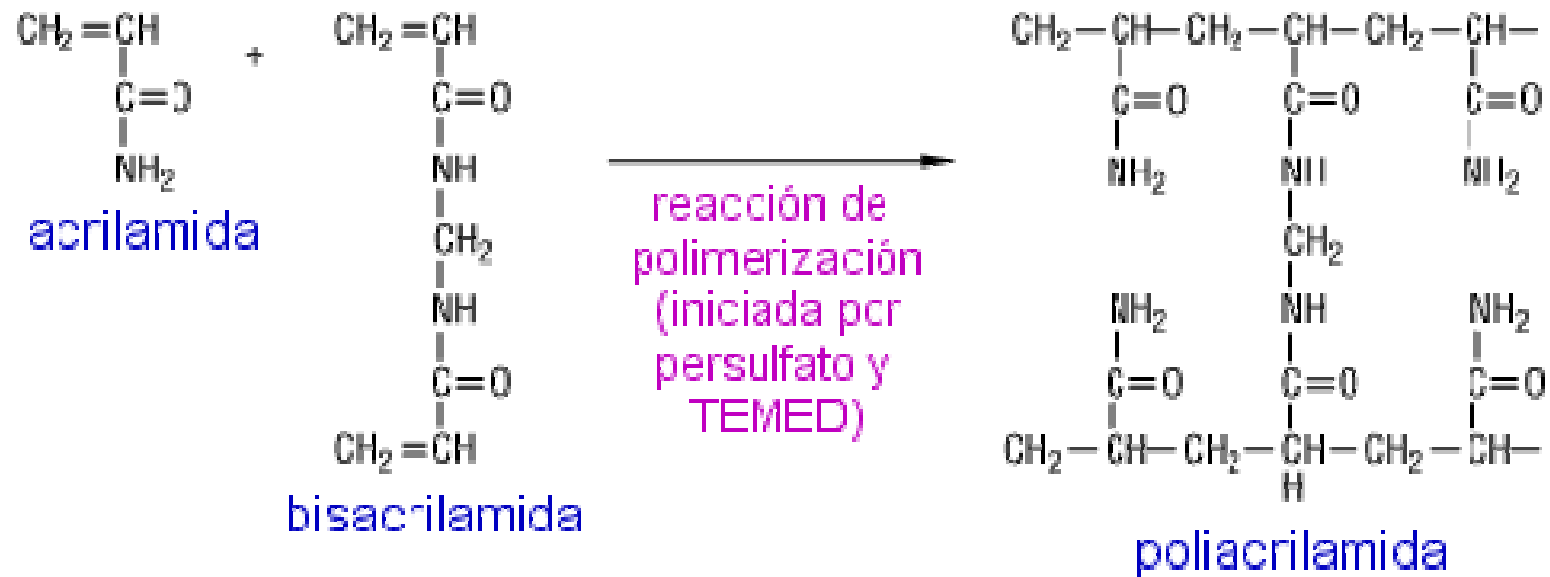
Cuatro componentes líquidos:

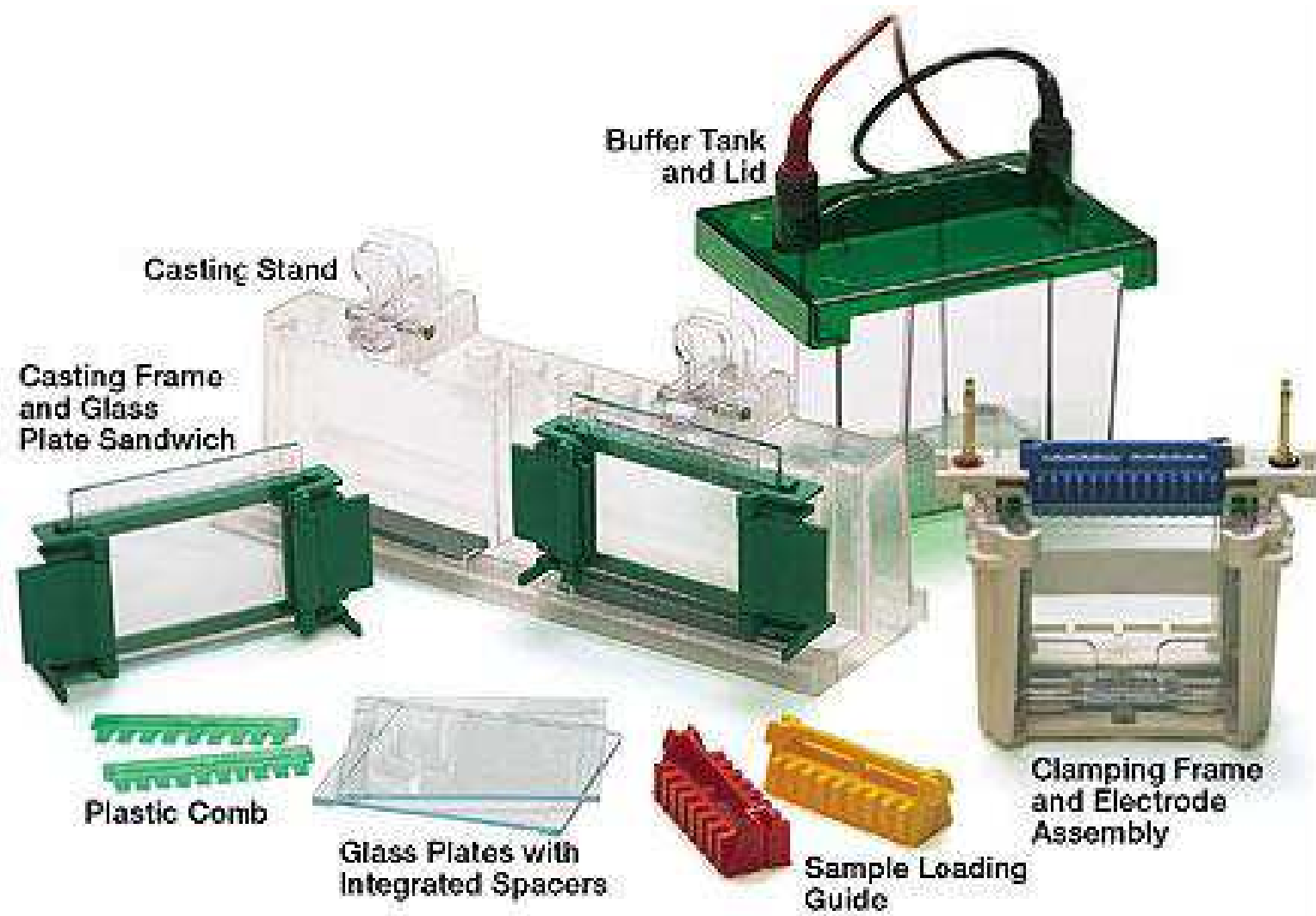
Acrilamida

Agente entrecruzante Bisacrilamida

APS (Persulfato de amonio) radicales sulfato inician la polimerización

TEMED (Tetrametilen, etilendiamina) propaga la polimerización





Buffer Tank and Lid

Casting Stand

Casting Frame and Glass Plate Sandwich

Clamping Frame and Electrode Assembly

Plastic Comb

Glass Plates with Integrated Spacers

Sample Loading Guide

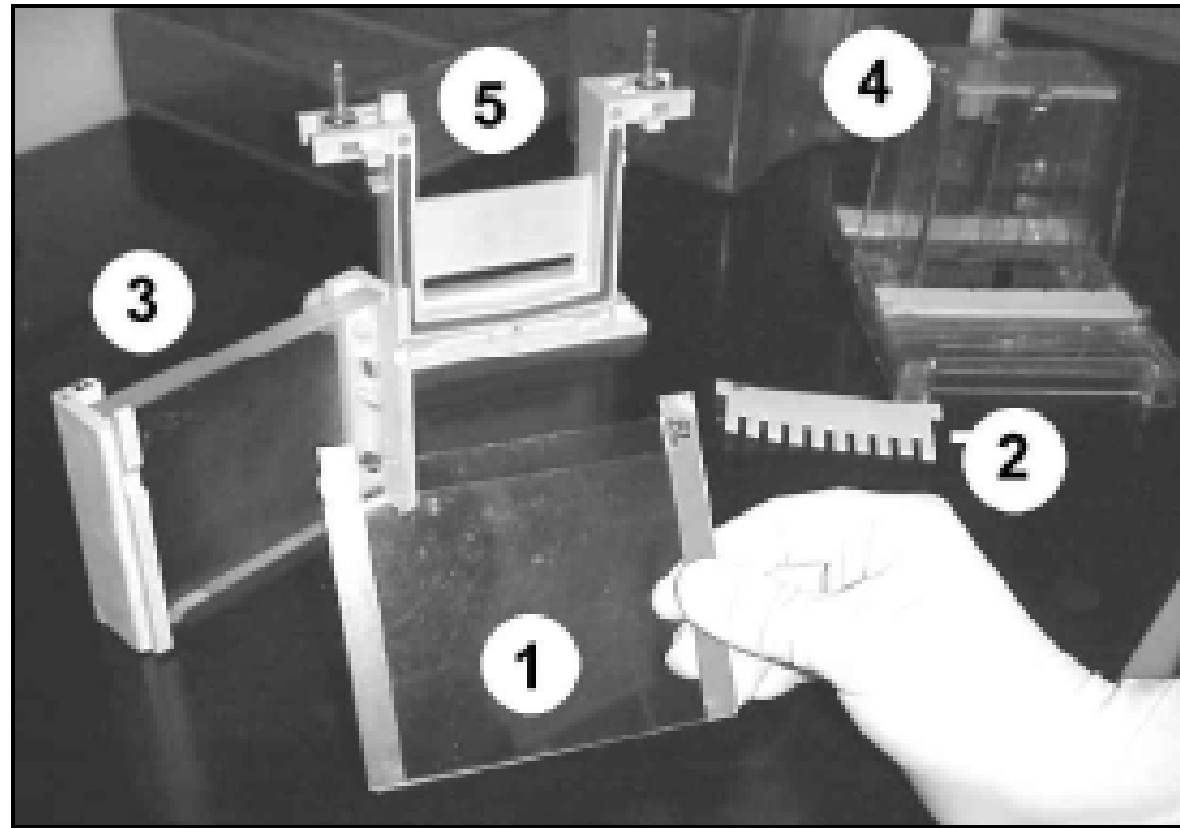


Figura 13.5: Preparación de un gel de poliacrilamida: partes. (1) vidrios separados por reglitas de teflón, que determinan el grosor del gel; (2) peine para formar los hoyos para muestras; (3) bloque de plástico para ensamblar los vidrios; (4) base para realizar el chorreo del gel; (5) núcleo de la cámara de electroforesis, con los electrodos.

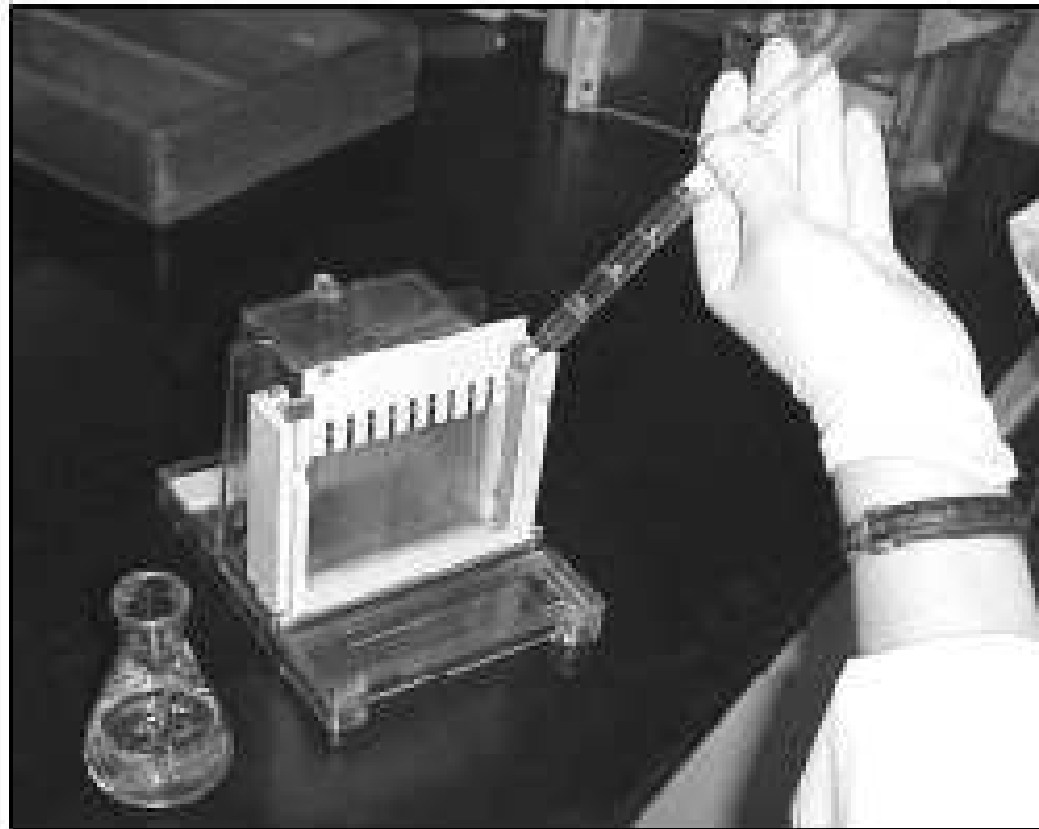


Figura 13.6: Polimerización del gel. Una vez ensambladas las piezas del molde, los componentes del gel se mezclan con los catalizadores e inmediatamente se vierten en el espacio entre los vidrios.

Geles de Corrida y Apilamiento

Técnica de electroforesis discontinua. Se preparan 2 geles:

el gel de corrida donde se separan las proteínas

el gel de apilamiento o gel concentrador (stacking) que concentra la mezcla

El gel de Corrida que separará las muestras posee mayor concentración de Acrilamida (10%) y pH más básico (8,3). Ofrece mayor resistencia en la corrida

El gel de apilamiento posee baja concentración de acrilamida (4%) en tampón ligeramente ácido (Tris/HCl 1M pH 6,8). Ofrece poca resistencia a la mezcla de proteínas sometidas a electroforesis por tanto lo atraviesan con relativa rapidez.

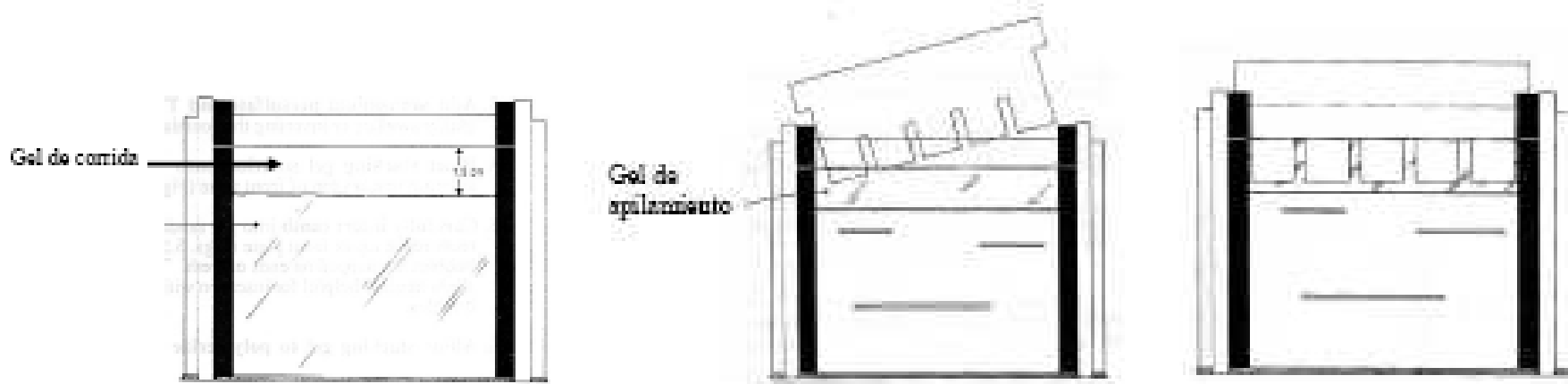
Una vez preparado y polimerizado el gel de corrida, se prepara, en la parte superior de éste el gel de apilamiento.

Bajo la acción del campo eléctrico, la mezcla proteica, colocada sobre el gel de apilamiento, comienza a migrar hacia el polo positivo.

Cuando las proteínas atraviesan el gel de apilamiento, se encuentran con la resistencia ejercida por el gel de corrida de manera que aquellas proteínas retardadas puedan alcanzar al resto y todas inicien la separación desde el mismo punto, mejorando así la calidad de la corrida.

El gel de apilamiento se prepara siempre a una concentración de acrilamida del 4%, mientras que el gel de separación o gel de corrida se prepara según el rango óptimo de resolución:

Porcentaje de acrilamida	Rango de separación (tamaño)
15%	15-45 kDa
12,5%	15-60 kDa
10%	18-75 kDa
7,5%	30-120 kDa
5%	60-212 kDa



Preparación y colocación de las muestras

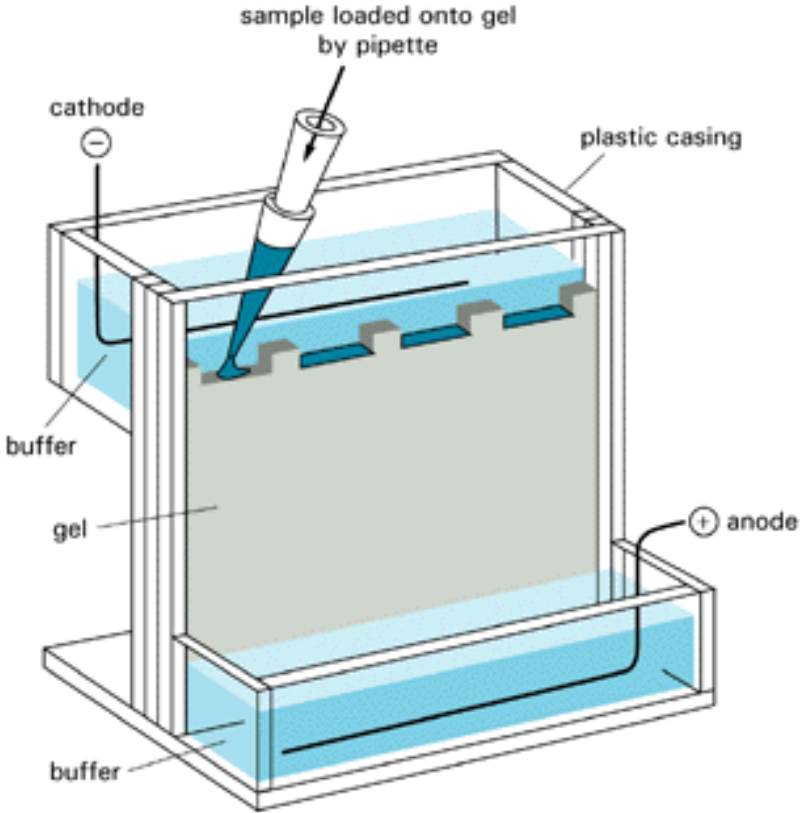
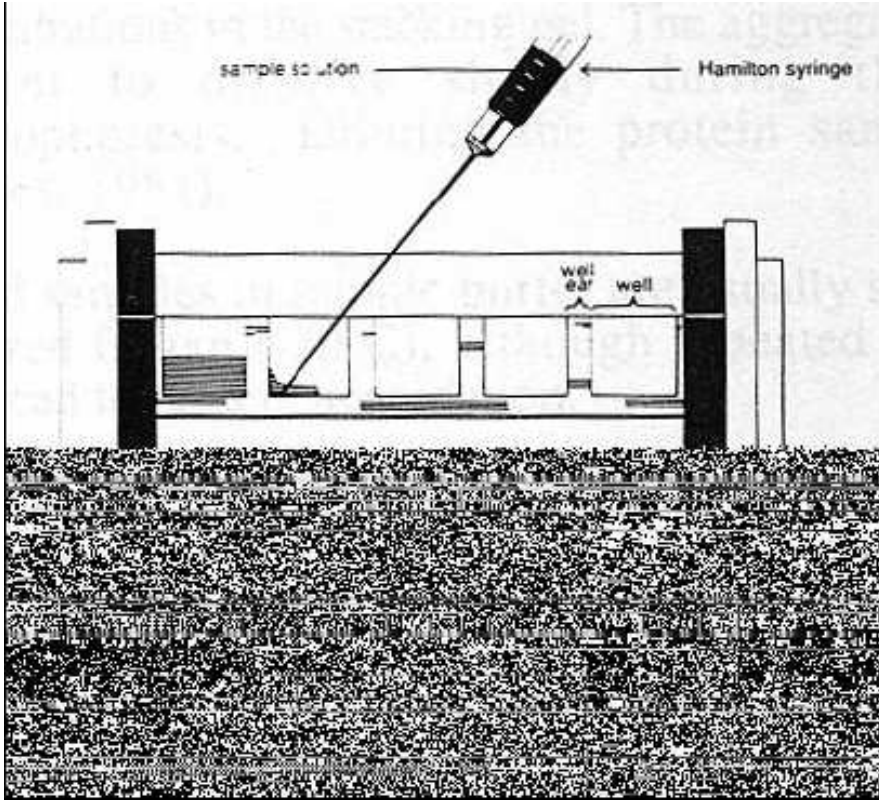
Cuando el gel de apilamiento haya polimerizado, colocar el cassette en el tanque de electroforesis con aproximadamente 500 ml tampón de corrida en el cual estén sumergidos los electrodos.

Quitar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos del gel.

Preparar las muestras. Se tomarán 20 μl de la muestra y se diluirán con 20 μl de tampón muestra 5X por pocillo. Calentar 3 min. a 90°C para desnaturalizar.

Incluir un estándar de peso molecular.

Semrar 20µl de muestra por pocillo mediante el uso de una pipeta hamilton



Corrida Electroforética aplicando corriente (100 mA) de 40 a 80 volts 2 h aprox

Finalizada la corrida, extraer los vidrios cuidadosamente del cassette y separarlos de manera que el gel quede posado sobre uno de los vidrios.

Sumergir el gel en solución colorante azul de Coomassie durante 40 minutos.

Sumergir el gel en solución decolorante metanol, ácido acético glacial, agua dest. para eliminar las asociaciones inespecíficas del gel al colorante.

Observar las bandas proteicas.

