

# 16. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*

Ana María Maldonado Alconada, Jesús V. Jorrín Novo

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. La técnica permite separar moléculas cargadas y explota diferencias en movilidad cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo sobre un soporte inerte, generalmente sobre geles de poliacrilamida (PAGE). En la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), como su propio nombre indica, se utilizan agentes desnaturalizantes de proteínas, como pueden ser: detergentes (p.e. SDS), caótrofos (p.e. urea) y agentes reductores (2- mercaptoetanol, DTT). Para la visualización de las proteínas se utilizan diferentes métodos de tinción, siendo el más habitual el azul de coomassie. En la SDS-PAGE, la separación es función del tamaño (masa molecular), lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas. Para ello se compara la movilidad electroforética ( $R_f$ ) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido. En esta práctica, en la que se pretende que el alumno comprenda el fundamento teórico de esta técnica y sus aplicaciones, se llevará a cabo la separación de proteínas de hojas de *A. thaliana* mediante SDS-PAGE.

*Palabras clave:* Desnaturalizante, electroforesis, proteínas, rubisco.

*Abreviaturas empleadas:* APS: persulfato amónico; DTT: ditionitrosol; PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida; SDS-PAGE: electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida; SDS: dodecil sulfato sódico; TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Separación electroforética de proteínas.

La separación y purificación de proteínas son necesarias para llevar a cabo el estudio y caracterización del proteoma de los sistemas biológicos. Para ello, éstas deben ser separadas selectivamente a partir de muestras complejas mediante un procedimiento de fraccionamiento adecuado. Los métodos de

separación se basan en diferentes características de las proteínas tales como solubilidad, tamaño o carga, entre otras. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis.

El término *electroforesis* fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis para definir el fenómeno por el cual una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo. La electroforesis es una herramienta analítica simple, rápida y muy sensible, lo que la convierte en una técnica de gran utilidad para la separación y el estudio de moléculas cargadas tales como proteínas y ácidos nucleicos.

Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación:

- i) Electroforesis capilar.
- ii) Electroforesis en papel.
- iii) Electroforesis en gel de agarosa.
- iv) Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- v) Isoelectroenfoque.
- vi) Electroforesis bidimensional.

En este capítulo, haremos referencia a la electroforesis en gel de poliacrilamida, y más concretamente a la electroforesis desnaturizante. La descripción de los otros tipos de electroforesis puede encontrarse en la bibliografía recomendada (Westermeier, 2001).

Los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis) debido a su buena resolución y gran versatilidad. Además, poseen una serie de ventajas tales como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica y fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida. En la mayoría de los casos, el gel se dispone entre dos receptáculos independientes y separados que contienen tampón de electroforesis y los electrodos positivo y negativo, de forma que la conexión eléctrica entre ambos receptáculos sólo es posible a través del gel. Una vez que la electroforesis ha tenido lugar, el gel de poliacrilamida se puede teñir, documentar o incluso se puede purificar la molécula de interés cortando literalmente el fragmento del gel.

En la Figura 1, se representa la reacción de polimerización de la acrilamida. Los geles de poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular retardando el movimiento de macromoléculas grandes mientras que permiten a moléculas más pequeñas moverse libremente, potenciando de esta forma la separación. El entramado de los geles de poliacrilamida se genera mediante la polimerización, a través de radicales libres, de monómeros de acrilamida en presencia de pequeñas cantidades de "bis-acrilamida" (N,N,N',N'-metilen-bis-acrilamida). Se forman enlaces cruzados entre los

polímeros de acrilamida, de manera que se generan geles con tamaño de poro determinado tanto por la concentración total (%T) como por la concentración relativa de acrilamida y de bisacrilamida. El tamaño del poro puede ser ajustado para optimizar la separación de la muestra de interés. Así, geles con un porcentaje alto de acrilamida (10-15%T) son óptimos para la separación de proteínas de pequeño tamaño (menores de 50KDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10%T) son los indicados para la separación de proteínas mayores. Generalmente la relación utilizada entre acrilamida y bisacrilamida es 37,5:1.

La reacción de polimerización se inicia por un sistema redox de catálisis. El TEMED cataliza la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de APS y que actúa como iniciador.

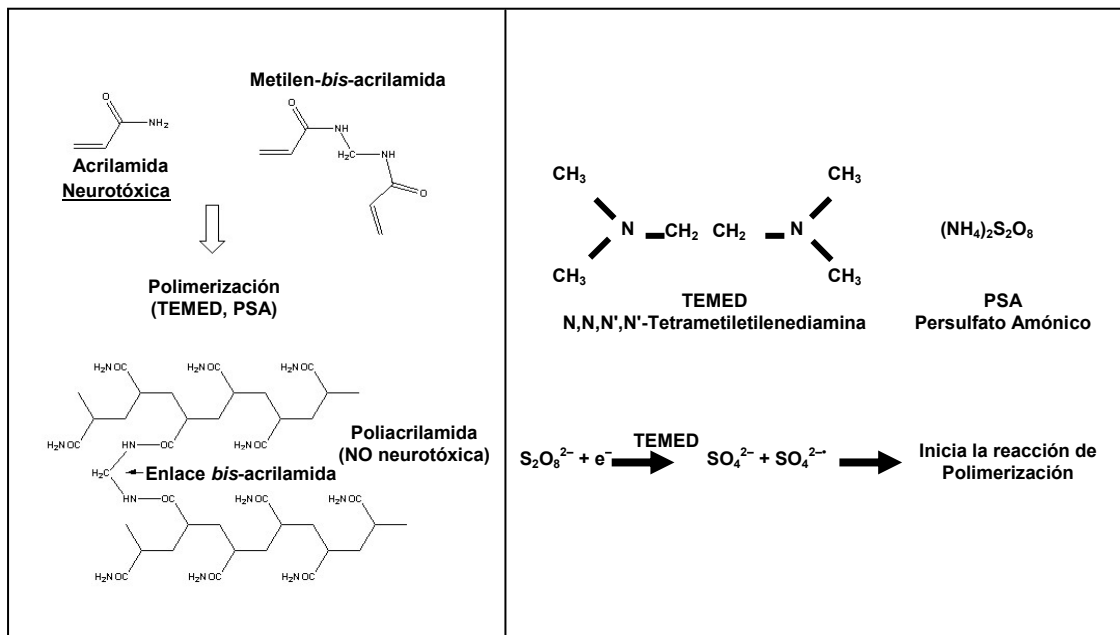


Figura 1. Reacción de polimerización de la acrilamida

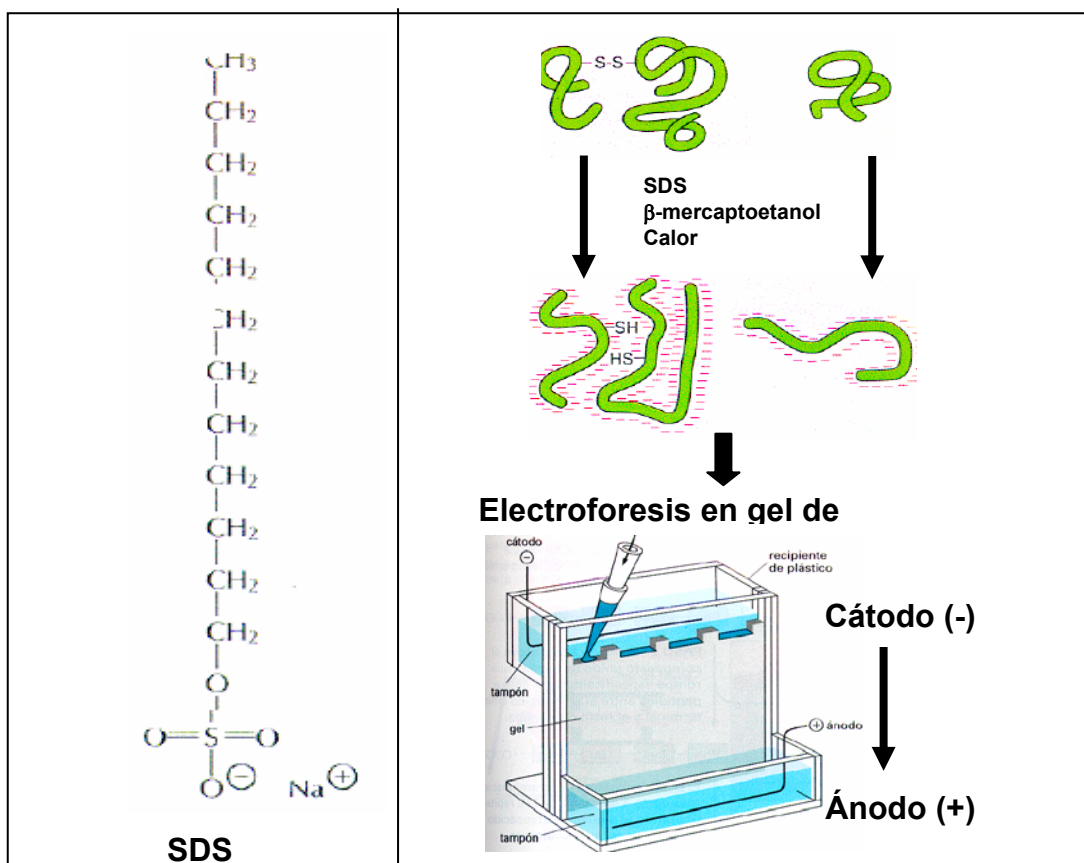
## 1.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del tampón de electroforesis, así como el tratamiento de las muestras. Como su propio nombre indica, en el segundo tipo, y no en el primero, se incluyen agentes desnaturizantes: reductores, detergentes y caótopos. En el primer caso, las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no sólo en función de su carga eléctrica, sino también según su tamaño y forma. Por el contrario, cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico SDS (Figura 2), éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturizándolas. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptarán una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Como media, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. La carga nativa original de la molécula está

completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturizantes como son un agente reductor, generalmente el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), y agentes caótopos, que como la urea, rompen puentes de hidrógeno. Para asegurar la disociación de las proteínas en sus subunidades y la pérdida de la estructura secundaria de las proteínas se suele calentar la muestra antes de ser cargada en el gel. A diferencia de la electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE las proteínas se separan únicamente en función de su tamaño.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes fue originalmente descrita por Laemmli en 1970.

En la Figura 2, se presenta a modo de esquema el efecto que tienen el tratamiento de las proteínas con los agentes desnaturizantes. La SDS-PAGE se usa frecuentemente, como es el caso de la presente práctica, para determinar el peso molecular de proteínas desconocidas mediante la comparación de su movilidad electroforética relativa ( $R_F$ ) con la de proteínas estándar de peso molecular conocido, y para determinar el número de subunidades de un complejo de proteínas. La SDS-PAGE es un método mucho más resolutivo que la electroforesis en condiciones nativas; sin embargo, debido a que las proteínas se desnaturizan, es imposible detectar actividad enzimática.

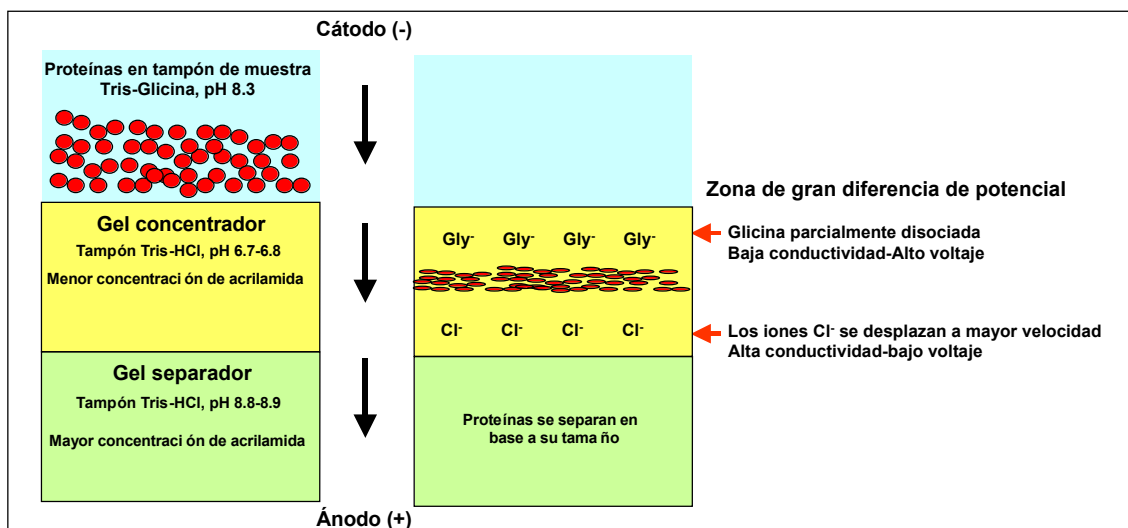


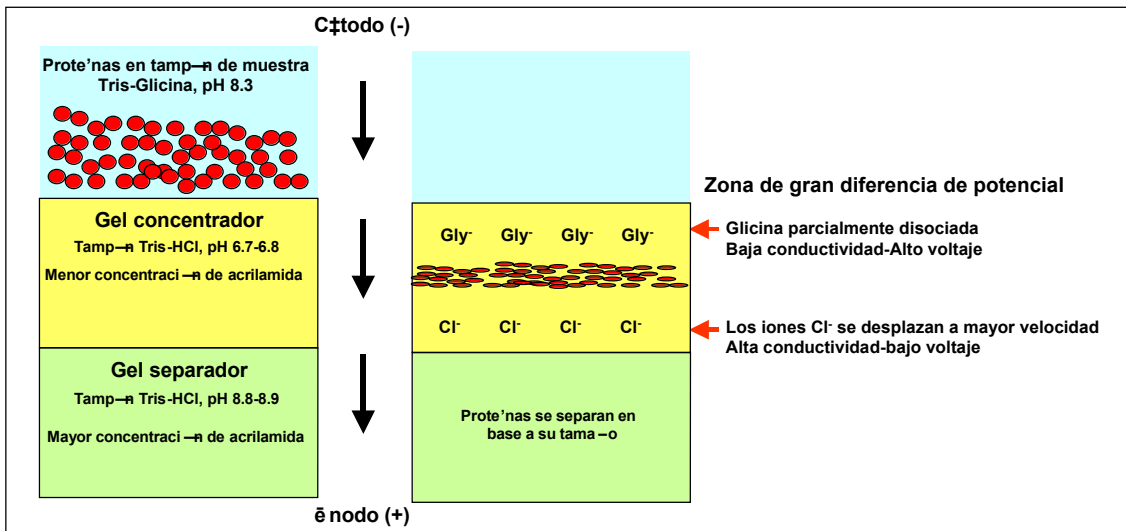
**Figura 2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.** Estructura del SDS. El tratamiento de las muestras con agentes desnaturalizantes provoca la desnaturalización de las proteínas, pérdida de la estructura secundaria y la disociación de las subunidades. Las proteínas quedan cargadas negativamente y migran del polo negativo al positivo durante la electroforesis.

Actualmente existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en base a los tampones empleados:

- i) El *sistema continuo de Weber y Osborn*. En este sistema existe un único gel separador que emplea el mismo tampón en los tanques y en el gel.
- ii) El *sistema discontinuo o de Laemmli* que se llevará a cabo en la presente práctica. Consta de dos tipos de geles: un gel, llamado concentrador con un tamaño de poro no restrictivo (grande) que se forma sobre un segundo gel llamado separador. En este sistema cada uno de los geles se prepara con tampones de diferente pH y fuerza iónica, y el tampón de electroforesis es un tercer tipo de tampón.

El fundamento del sistema discontinuo se esquematiza en la Figura 3. La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones cloruro  $\text{Cl}^-$  del gel y la movilidad del ión glicina  $\text{Gly}^-$  del tampón de muestra. Por tanto, entre ambos frentes existe una zona de baja conductividad y gran diferencia de voltaje, de forma que las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre ambos iones. Una vez en el gel separador, el pH básico favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipéptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloruro. A partir de este momento las proteínas migran a través del gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme de forma que se separan en base a su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles.





**Figura 3. Sistema discontinuo.** Empaquetamiento de las proteínas en el gel concentrador.

Los geles se pueden generar en una gran variedad de tamaños. En esta práctica usaremos mini-geles.

### 1.3. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida. Métodos de tinción.

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE pueden ser visualizadas en el gel mediante diversos métodos de tinción: fluorescencia, plata y azul coomassie, siendo este último el más utilizado. Este método de tinción presenta una sensibilidad de hasta 50 ng de proteína.

### 1.4. Determinación del peso molecular

La SDS-PAGE se usa, como ilustraremos en la presente práctica, para determinar el peso molecular de proteínas. Para ello se compara el  $R_f$  de la proteína problema con el de proteínas de referencia cuyo peso molecular se conoce. Recordemos que el  $R_f$  es el parámetro experimental asociado a esta técnica, y se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

El frente del gel se determina por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, como puede ser el colorante azul de bromofenol. El procedimiento se explica detalladamente en la sección de resultados.

### 1.5. Objetivos

- i) Familiarizarse con las técnicas de electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.
- ii) Separación de proteínas de un extracto de hojas de la planta *Arabidopsis thaliana* mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida.

- iii) Determinación del peso molecular de las proteínas en estudio.
- iv) Presentación y discusión de los resultados en el correspondiente cuaderno de prácticas.

## 2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

A continuación se detalla el material e instrumental necesarios para la realización de la práctica. Cada grupo dispondrá como material biológico de partida de un extracto de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana* disuelto en el tampón de carga.

### 2.1. Equipamiento

pH-metro.  
Agitador magnético.  
Balanzas de precisión.  
Centrífuga de mesa.  
Equipo de electroforesis para mini-geles con accesorios (sistema de montaje y preparación de geles, espaciadores para geles de 0,75 mm de espesor, peines para formar 10 pocillos, placas de cristal).  
Fuente de electroforesis.  
Bloque seco.  
Agitador orbital.  
Transiluminador.  
Sistema de documentación.

### 2.2. Material

Agua destilada.  
Rotulador indeleble.  
Etiquetas adhesivas de papel.  
Espátulas.  
Tijeras.  
Botellas de vidrio o plástico para almacenar soluciones.  
Papel de filtro.  
Matraz.  
Vasos de precipitado y probetas (25, 50 y 100 ml).  
Imán para agitación magnética.  
Guantes de goma.  
Pipetas automáticas y puntas (2-50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l y 200-1000  $\mu$ l).  
Pipetas de cristal de 1, 2, 5 y 10 ml y pipetas Pasteur.  
Tubos eppendorf de 1,5 ml.  
Gradillas.  
Frasco lavador con agua destilada.  
Bandejas de plástico para el teñido de geles .

### 2.3. Reactivos

Extractos proteicos de hojas de *A. thaliana*.  
Solución de acrilamida/*bis*-acrilamida 30% (preparado comercial).  
Tris-base.

SDS.  
Glicerol.  
Azul de bromofenol.  
2-Mercaptoetanol.  
Glicina (forma ácida).  
Persulfato amónico.  
TEMED (preparado comercial).  
Azul de coomassie (CBB R-250).  
Proteínas estándar de peso molecular conocido (comercial).

### **3. PROTOCOLO A REALIZAR**

#### **3.1. Preparación del gel de poliacrilamida**

En la presente práctica se van a preparar mini-geles de 0,75 mm de espesor. Las cantidades indicadas para la preparación de las soluciones en el anexo corresponden a la preparación de dos geles. Cada uno de ellos consta de un gel concentrador de aproximadamente 2 cm de longitud que contiene los pocillos para cargar las muestras, y un gel separador de aproximadamente 6 cm. En la figura 4, se ilustra el montaje del sistema de electroforesis, la preparación de los geles y el procedimiento a seguir<sup>1</sup>.

**3.1.1.** Se prepara el sistema de electroforesis mini-gel tal como se indica en la Figura 4 (b).

**3.1.2.** Preparación del gel separador al 13%.

Se mezcla en un matraz (capacidad aproximada de 100 mL) los componentes en el orden que se indica en el anexo I.<sup>2</sup>

Con cuidado, utilizando una pipeta Pasteur, se añade la mezcla en el interior del molde hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor, de forma que quede suficiente espacio para el gel concentrador (se debe calcular 1 cm más de la longitud de los pocillos del peine) (Fig 4, c).

A continuación, usando una pipeta limpia, se cubre la superficie del gel con isobutanol, isopropanol o agua destilada. Esto previene el contacto del oxígeno con el gel que inhibe la reacción de polimerización (Fig 4, d).

La polimerización del gel debe de ocurrir en unos 30 minutos.

**3.1.3.** Preparación del gel concentrador al 3%.

Se elimina el alcohol que cubre el gel separador, y se lava la parte superior del gel 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier residuo de acrilamida no polimerizada. Se seca el líquido restante en la parte de superior del gel con papel de filtro con cuidado de no dañar el gel.

---

<sup>1</sup> ATENCIÓN: La acrilamida y bisacrilamida son agentes neurotóxicos que se absorben a través de la piel. Es necesario llevar guantes durante todo el proceso, incluso después de polimerizar el gel, ya que puede contener cantidades de material no polimerizado.

<sup>2</sup> NOTA: La polimerización comienza en el momento en que se añade el TEMED, por lo tanto se debe trabajar con rapidez a partir de este momento.



Se mezclan en un matraz los componentes en el orden indicado en el anexo<sup>2</sup>.

Utilizando una pipeta Pasteur, se introduce la solución directamente sobre la superficie del gel separador (Fig 4, e). Inmediatamente se inserta el peine en la solución concentradora con cuidado para evitar que se formen burbujas de aire (Fig 4, f).

Se espera hasta que el gel haya polimerizado (aproximadamente 30 minutos).

Se retira el peine cuidadosamente con un movimiento vertical (Fig 4., g). Usando una botella de lavado, se enjuagan los pocillos 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier resto de acrilamida.

### **3.2. Preparación de las muestras**

En el tiempo de espera durante la polimerización se preparan las muestras que se van a cargar en el gel.

Con ayuda de una micropipeta P-20 se toman 20 µl de extracto proteico de *Arabidopsis* preparado en tampón de carga (ver anexo) en un tubo eppendorf. No se olvide preparar un tubo eppendorf con las proteínas estándar de peso molecular conocido.

Se fijan las tapas de los tubos y se calientan en un termobloque a 100°C durante 5 minutos.

Se centrifugan 15 segundos a máxima velocidad para concentrar el volumen en el fondo del tubo.

### **3.3. Electroforesis**

**3.3.1.** Se insertan las placas con los geles polimerizados en la unidad de electroforesis tal como se indica en la Figura 4 (h,i).

**3.3.2.** Se prepara el tampón de electroforesis a partir de la solución concentrada (ver anexo) y se añade en los reservorios interior y exterior (Fig 4, j). Se retiran, si las hubiera, las burbujas de aire y restos de acrilamida del interior de los pocillos, introduciendo tampón de electroforesis en los mismos.<sup>3</sup>

**3.3.3.** Se aplican las muestras con ayuda de una micropipeta P-20 (hasta 20 µl) en los pocillos, en un orden predeterminado y previamente anotado (Fig 4, k). No se olvide añadir, en un carril, la solución de proteínas estándar, de peso molecular conocido.<sup>4</sup>

**3.3.4.** Se conectan los electrodos a la cubeta de electroforesis y a la fuente de alimentación y se aplica corriente eléctrica. La corriente eléctrica recomendada para geles de 0,75 mm de grosor es un voltaje constante de 100-200V (Fig 4, l,m,n).<sup>5,6</sup>

---

<sup>3</sup> NOTA: es importante comprobar que el reservorio superior está totalmente sellado y no tiene pérdidas, de manera que los pocillos estén sumergidos en tampón de electroforesis. Para ello se añade primero el tampón en el reservorio superior y se deja un tiempo. Entonces, se añade el tampón al tanque inferior.

<sup>4</sup> NOTA: Se aplican las muestras lentamente para que no rebosen.

<sup>5</sup> ATENCIÓN: no se puede confundir electrodo negro, cátodo (-) y electrodo rojo, ánodo (+), que se deben conectar a las terminales negra y roja respectivamente. Recordad que las

**3.3.5.** La duración aproximada del proceso es de 40-45 minutos. Una vez acabada la electroforesis, cuando el frente de azul de bromofenol alcanza la parte inferior del gel, se desconecta la fuente de alimentación, retirándose los electrodos y sacando los geles de la cubeta de electroforesis. Estos se depositan en la mesa de trabajo (Fig 4, ñ).

**3.3.6.** Se sacan los geles de acrilamida del interior del molde, separando cuidadosamente con ayuda de una espátula ambos cristales (Fig 4, p). Se elimina el gel concentrador (Fig 4, q) y se hace una muesca al gel en una de las esquinas para orientar la posición de las muestras (por ejemplo en la esquina inferior contraria al patrón de proteínas).

### **3.4. Tinción del gel con azul de coomassie**

Las bandas de proteínas, una vez terminada la electroforesis, se visualizan tiñendo los geles con una solución de azul de coomasie. La tinción se realiza con agitación suave durante, al menos, 30 min.<sup>7</sup>

**3.4.1.** Se trasfiere el gel de la placa de vidrio a un recipiente que contiene la solución de tinción de coomassie (anexo; Fig 4, r). Se deja el gel en agitación suave con suficiente volumen de esta solución a temperatura ambiente durante 1 hora. (Fig 4., s).<sup>8</sup>

**3.4.2.** Se elimina la solución de tinción con una pipeta y se conserva para futuras tinciones.

**3.4.3.** Se añade solución decolorante (anexo)<sup>9</sup> y se incuba en agitación para eliminar el exceso de coloración hasta que sólo queden teñidas de azul las proteínas, cambiando la solución decolorante tantas veces como sea necesario. El gel puede estar en esta solución toda la noche pero se pueden empezar a observar las proteínas en 20 minutos.

**3.4.4.** Se elimina la solución de desteñido y se añade agua destilada (o acético al 10%). Los geles pueden conservarse de esta forma durante largos periodos de tiempo de forma casi indefinida a 4°C.

---

proteínas tratadas con SDS están cargadas negativamente y migrarán hacia el electrodo positivo (rojo).

<sup>6</sup> Nota: Comprueba durante la electroforesis que el reservorio superior del tampón no tiene pérdidas. En caso de que esto ocurra, apaga la fuente de corriente, rellena el reservorio de tampón y continua corriendo el gel.

<sup>7</sup> CUIDADO: Es necesario llevar guantes durante todo el proceso ya que las proteínas presentes en la piel pueden contaminar el gel.

<sup>8</sup> NOTA: esta incubación puede prolongarse toda la noche.

<sup>9</sup> ATENCIÓN: Se debe operar en la campana extractora de gases siempre que se está manipulando metanol, ya que es tóxico.



**Figura 4. Desarrollo de la práctica.** Material de electroforesis vertical (a); montaje del sistema (b); Preparación del gel separador (c,d) y concentrador (e-g); electroforesis (h-ñ); tinción del gel (o-s)

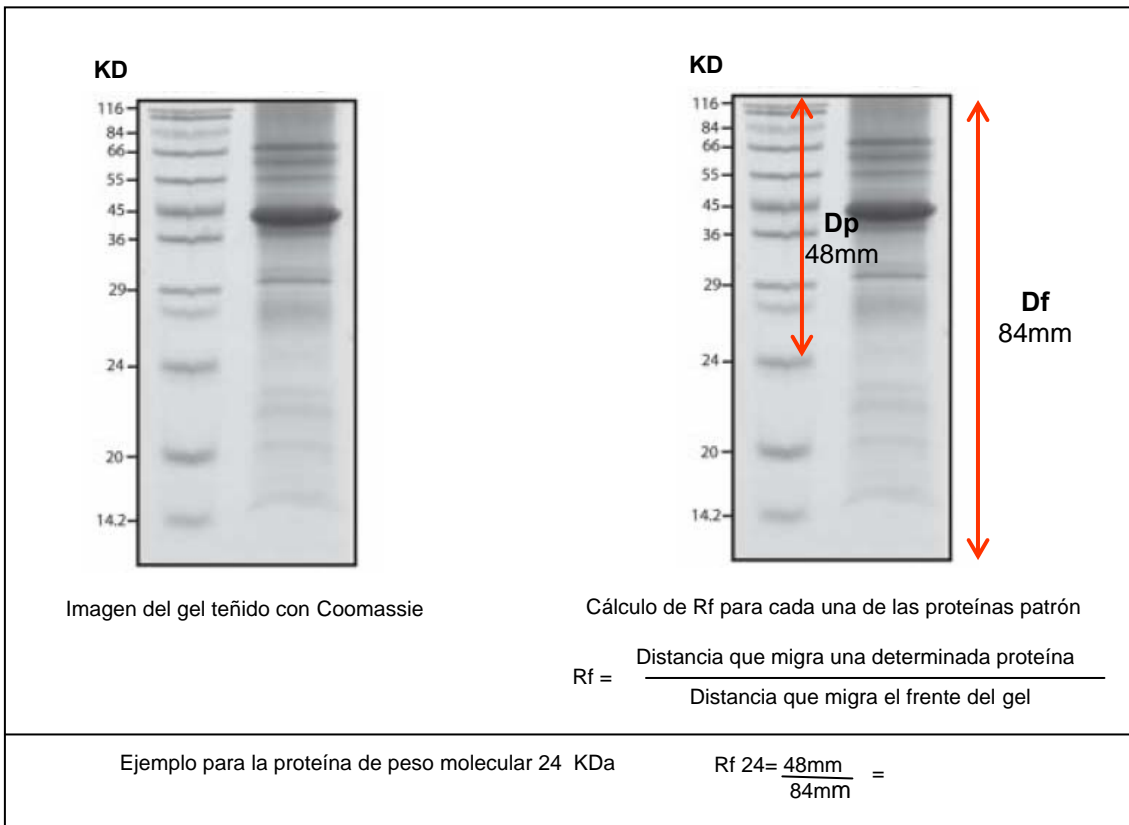
## 4. RESULTADOS

**4.1.** Representa en una figura, similar a la de la Figura 5, los resultados obtenidos.

**4.2.** Mide y anota la distancia recorrida por el frente del gel ( $D_f$ ), y por cada una de las proteínas estándar ( $D_p$ ). Calcula el correspondiente valor de  $R_f$  para cada una de ellas y anótalo en una tabla.

**4.3.** Representa los valores del logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar frente a su movilidad relativa.

**4.4.** Calcula el peso molecular de las proteínas de *Arabidopsis* indicadas.



**Figura 5. Esquema de los resultados obtenidos en la separación de proteínas de *Arabidopsis* mediante SDS-PAGE.** En el carril izquierdo, se han cargado las proteínas estándar, y se indica el valor de su peso molecular en KDa para cada una de ellas. En el segundo carril se observa el aspecto del extracto de proteínas de hojas de *Arabidopsis*.

Proteína	Distancia recorrida (Dp) (mm)	Rf

## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Durante la realización de la práctica el alumno debe anotar todas las incidencias que tengan lugar durante la misma e incluir todos los comentarios que considere interesantes.

También debe examinar el perfil de las proteínas totales de hojas de *Arabidopsis*.

**5.1.** Comentar el rango de peso molecular de las proteínas separadas.

**5.2.** Determinar el Peso Molecular de las proteínas mayoritarias. ¿Se podría identificar qué banda de proteína corresponde a la rubisco?

**5.3.** En base a los resultados obtenidos, ¿qué se podría decir de la resolución de la técnica? ¿Cómo se podría aumentar la resolución? ¿Cuál habría sido el resultado de la práctica si la concentración de acrilamida empleada en el gel separador hubiera sido mayor o menor?

**5.4.** El peso molecular para una determinada proteína en un gel ND-PAGE es de 280 kDa, mientras que el peso molecular para la misma proteína en un SDS-PAGE es de 70 kDa. ¿Cómo se podría explicar?

**5.5.** El peso molecular de una proteína, en base a la secuencia de DNA del gen correspondiente, se estima que es 65 kDa. El análisis en SDS-PAGE revela un peso molecular de 55 kDa. ¿Cómo se podría explicar?

## **6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA**

Se aconseja al alumno que consulte la bibliografía recomendada para un total aprovechamiento de la práctica.

Hames BD, Ricwood D (2002): "Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach", 3ª ed. Oxford University Press. Excelente libro que explica en detalle desde un punto de vista práctico los protocolos de separación electroforéticas de proteínas.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685. Descripción del método SDS-PAGE.

Nelson DL, Cox MM (2001). "Principios de Bioquímica", 3ª ed. Omega (Barcelona, España). Libro básico de bioquímica.

Westmeier R (2001): "Electrophoresis in Practise", 3ª ed. WILEY-VCH Verlag GmbH (Weinheim, Alemania). Explica en detalle los métodos de separación electroforéticas. Consultar los capítulos que hacen referencia a SDS-PAGE de proteínas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores de este capítulo agradecen a Rafael Susín la realización de las fotos que ilustran esta práctica.

## **ANEXO: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO**

NOTA: Una vez preparadas las soluciones, éstas se almacenan en botellas de cristal y se mantienen a 4°C, salvo que se indique lo contrario.

### **1. Soluciones para SDS-PAGE**

**1.1.** Tampón para el gel separador Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

<b>Solución tampón Tris –HCl 1,5 M pH 8,8</b>	
	100 mililitros
Tris-base	18,17 g
Disolver en 80ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 8,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

**1.2. Tampón para el gel concentrador Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.**

<b>Solución tampón Tris –HCl 0,5 M pH 6,8</b>	
	100 mililitros
Tris-base	6,05 g
Disolver en 80ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 6,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

**1.3. SDS al 10% (peso/volumen)<sup>a</sup>:**

<b>Solución SDS 10%<sup>b</sup></b>	
	100 mililitros
SDS	10 g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Agua destilada	Hasta 100 ml

<sup>a</sup>El SDS precipita si la temperatura ambiente es inferior a 18°C. Calentar ligeramente para favorecer la disolución.

<sup>b</sup>El SDS se debe manipular siempre con guantes y mascarilla.

**1.4. Persulfato amónico (APS) al 10%.**

<b>Solución APS 10%<sup>a</sup></b>	
	10 mililitros
APS	10 g
Disolver en 8 mL de agua destilada	
Agua destilada	Hasta 10 ml

<sup>a</sup>Una vez preparados los 10 mL se reparten en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se conservan a -20°C hasta su uso.

**1.5. Gel separador al 13% de acrilamida en tampón Tris-H-Cl 0,375 M, pH 8,8**

<b>Gel separador 13%</b>	
	10 mililitros <sup>a</sup> (g)
Tris HCl 1,5M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30% <sup>a</sup>	4,3 ml
APS 10 %	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
Agua destilada	Hasta 10 ml (aproximadamente 3 ml)

<sup>a</sup>No pipetear nunca con la boca. La acrilamida es neurotóxica y cancerígena, por lo que se manipulará siempre con guantes y se usarán gafas protectoras.

**1.6. Gel concentrador al 3% de acrilamida en tampón Tris-H-Cl 0,125 M, pH 6,8**

<b>Gel separador 3%</b>	
	10 mililitros
0,5M Tris HCl pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30% <sup>a</sup>	1 ml
APS 10 %	0,100 ml
TEMED	0,005 ml
Agua destilada	Hasta 10 ml (aproximadamente 6,20 ml)

<sup>a</sup>No pipetear nunca con la boca. La acrilamida es neurotóxica y cancerígena, por lo que se manipulará siempre con guantes y se usarán gafas protectoras.

### 1.7. Tampón de la muestra.

<b>Tampón de muestra<sup>a</sup></b>	
Tris HCl 0,5M pH 6,8	1 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS 10%	1,6 ml
Azul de Bromofenol, 1% <sup>b</sup>	0,4 ml
2-mercaptoetanol <sup>c</sup>	0,4 ml
Agua destilada	3ml

<sup>a</sup>Debe de prepararse inmediatamente antes de usar. Alternativamente se puede preparar y mantener a temperatura ambiente, sin el 2-mercaptoetanol, y añadir éste inmediatamente antes de su uso.

<sup>b</sup>Utilizar una solución concentrada previamente preparada que contiene 1 g disuelto en 100 mL de agua destilada.

<sup>c</sup>Manipularlo en la campana, ya que el 2-mercaptoetanol es tóxico y huele muy mal.

### 1.8. Tampón de electroforesis Tris-Glicina pH 8,3.

<b>Tampón de electroforesis 10 X Tris Glicina pH 8,3</b>	
	1 litro <sup>a</sup>
Tris base	30 g
Glicina	144g
SDS	10g
Disolver en 800 ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 8.3 con HCl concentrado	
Agua destilada	Hasta 1 litro

Nota: la solución está concentrada 10 veces y antes de utilizarla hay que diluirla 10 veces, como se indica.

<b>Tampón de electroforesis 1X Tris Glicina pH 8.3</b>	
	1 litro
Solución concentrada 10X	100ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

## 2. Soluciones para tinción del gel con azul de Coomassie.

### 2.1. Solución de tinción azul de Coomassie

<b>Tampón de tinción azul de Coomassie<sup>a,b</sup></b>	
	1 litro <sup>a</sup>
Azul de Coomassie R-250	1g
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml

Agua destilada	Hasta 1 litro
----------------	---------------

<sup>a</sup>Se debe preparar en la campana de gases, ya que el metanol es tóxico

<sup>b</sup>Mantener en agitación hasta la disolución de la mayor parte de colorante.  
Filtrar y almacenar a temperatura ambiente en botellas de color topacio.

## 2.2. Solución decolorante de geles

<b>Solución decolorante de geles<sup>a</sup></b>	
	1 litro <sup>a</sup>
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

<sup>a</sup>Se debe preparar en la campana de gases, ya que el metanol es tóxico