

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (ISOELECTROENFOQUE y SDS-PAGE)

Introducción

Como bien sabemos, la electroforesis es un método de separación de moléculas biológicas que se basa en la migración de las mismas según su carga en un campo eléctrico. Luego se desarrolló la electroforesis bidimensional, que es una combinación secuencial de:

1. el enfoque isoelectrico y
2. la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

De este modo se es capaz de separar:

- proteínas de masa molecular idéntica que difieren en su pI ó
- proteínas con valores de pI similares pero con diferentes masas moleculares.

El nombre de la técnica, 2D (IEF+SDS-PAGE), sugiere que separa las proteínas:

- ❖ **En una primera dimensión:** mediante isoelectroenfoque (IEF) las separa según su punto isoelectrico (pI)
- ❖ **En una segunda dimensión:** las separa por su peso molecular (MW) por SDS-PAGE; SDS ya que se emplea Dodecil Sulfato Sódico (detergente) y PAGE dado que las proteínas corren en un gel de poliacrilamida.

Las partículas migrarán hacia el cátodo o el ánodo en relación a su carga. Su movilidad depende de una combinación de:

- su carga
- su peso molecular
- su estructura tridimensional

Isoelectroenfoque (IEF)

El Isoelectroenfoque es un tipo de electroforesis que se emplea para separar moléculas cargadas.

Fundamento:

Una proteína tiene grupos cargados de ambas polaridades, por lo que presenta un punto isoelectrico (pI) que corresponde al valor de pH al cuál la molécula posee carga neta (z) igual a cero (zwitterion), y por lo tanto es inmóvil en un campo eléctrico.

En un zwitterion simple, $pI = (pK_1 + pK_2)/2$ (Fig. A); mientras que para un aminoácido de cadena lateral ácido-base, pI es el promedio de los pK entre la especie con carga +1 y -1 (Fig. B).

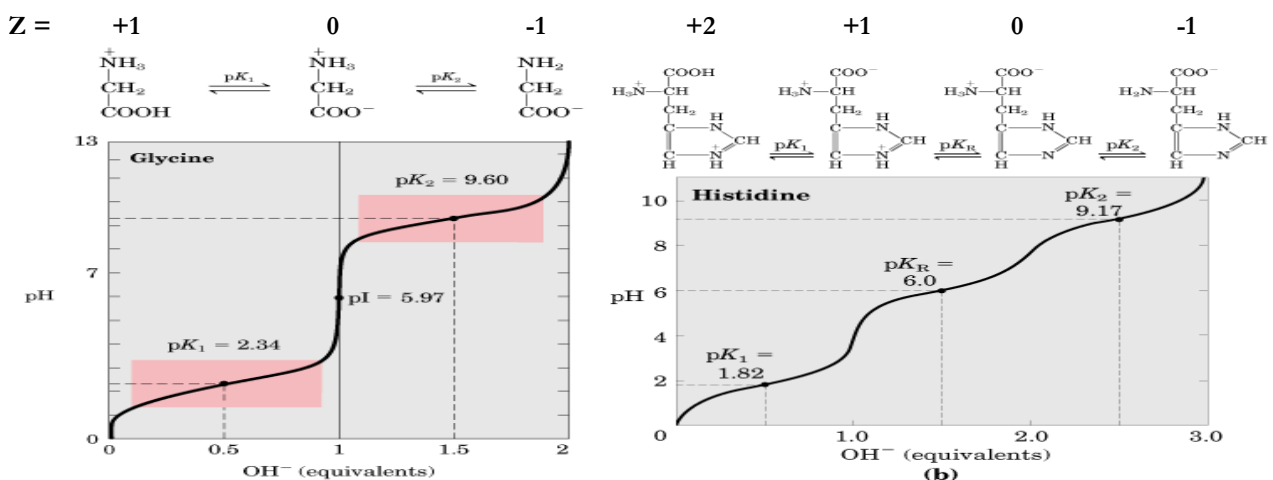


Fig. A) Curva de titulación del aminoácido Glicina. Fig. B) Curva de titulación del aminoácido Histidina.

Se establece un gradiente de pH en el gel de poliacrilamida, que puede tener forma de cilindro o lámina, realizando una electroforesis de una mezcla de polianfolitos (polímeros pequeños con múltiple carga). El gel suele tener urea, de concentración cercana a 6M, que a diferencia del SDS no posee carga y no puede afectar en forma directa la carga neta de las proteínas. Se coloca la muestra (mezcla de proteínas obtenida) en un buffer de baja fuerza iónica y con la aplicación de una diferencia de voltaje, las proteínas cargadas se desplazan hasta alcanzar un pH equivalente a su punto isoeléctrico.

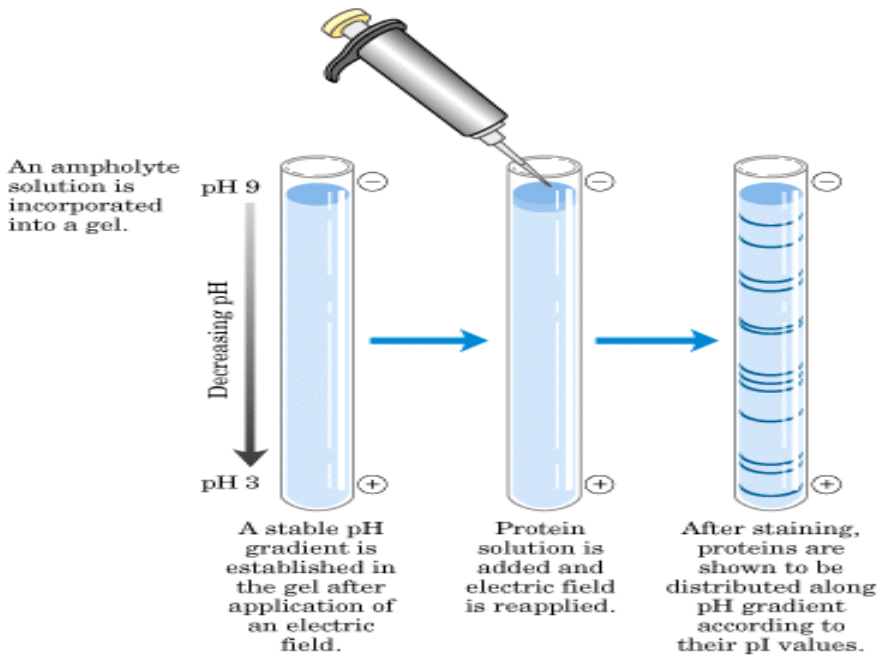
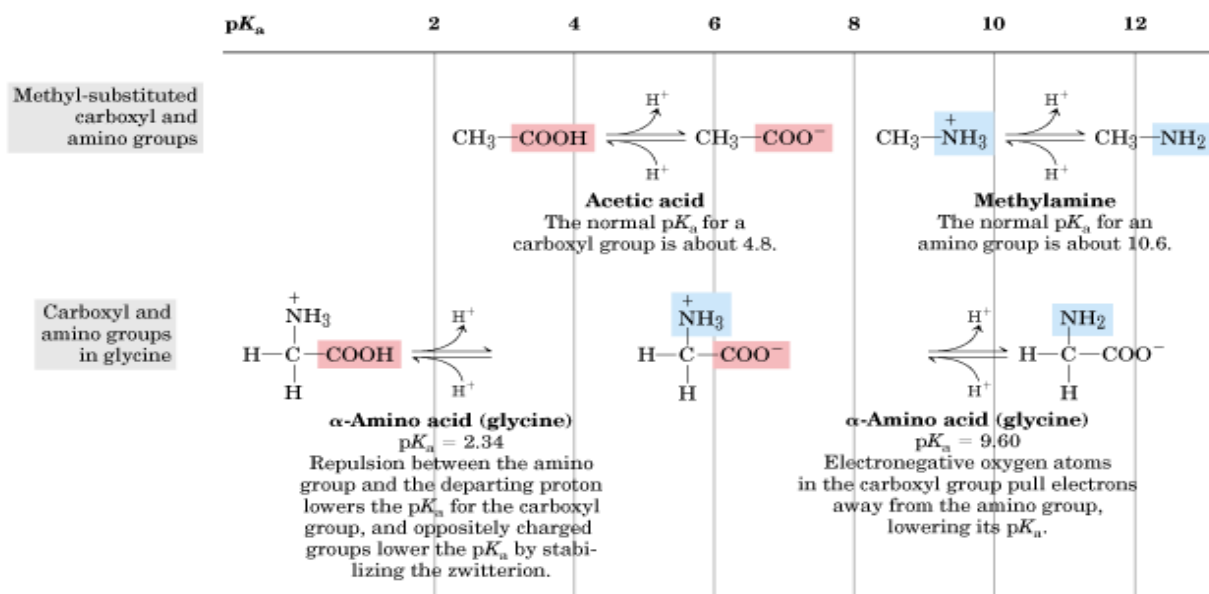


Fig. C) Enfoque isoeléctrico. Se establece un gradiente estable de pH en el gel por adición de anfólitos adecuados. Se coloca una mezcla de proteínas en un pocillo del gel y se aplica un campo eléctrico. Las proteínas se distribuyen a lo largo del gel de acuerdo con sus valores de pI.

Al aplicar la diferencia de potencial las proteínas que se encuentran en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente, y migrarán hacia el cátodo; mientras que aquellas que se encuentran en regiones de pH más altos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo.



Ventajas:

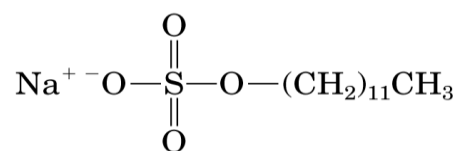
- ❖ Un anfólito siempre se detiene en la zona en la que el pH coincide con su punto isoeléctrico.
- ❖ Gran repetitividad: los resultados no están sujetos a variaciones debidas a las condiciones experimentales, tales como la diferencia de potencial eléctrico aplicada.
- ❖ Gran poder de resolución.
- ❖ La muestra se puede colocar en cualquier zona del medio de soporte, en la zona cercana al cátodo, al ánodo o en el centro del mismo.

Aplicaciones:

- ❖ La capacidad del IEF de separar las proteínas en bandas definidas lo hace **útil como herramienta analítica y preparativa**. Varias preparaciones proteicas que se creían homogéneas se separaron en varios componentes mediante esta técnica.
- ❖ Una de las aplicaciones más importantes de la IEF es la **electroforesis bidimensional**, que consiste en la separación de proteínas según su pI y su respectivo peso molecular (MW).

Electroforesis SDS-PAGE

En este tipo de electroforesis utilizamos dodecil sulfato de sodio (SDS), que es un detergente usado en muchas preparaciones bioquímicas dado que se une con firmeza a las proteínas y las hace asumir una estructura desordenada de manera de obtener una eficiente desnaturalización.



Sodium dodecyl sulfate
(SDS)

Fundamento:

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) separa a las macromoléculas en el orden de sus masas moleculares por los efectos de filtración por geles.

Este tipo de electroforesis es una variante de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) donde los geles se forman por polimerización de la acrilamida y la N,N'-metilen bisacrilamida inducida por radicales libres en un buffer.

Las proteínas unen SDS en una proporción bastante uniforme de alrededor de 1,4g del detergente por gramo de proteína (que equivale a 1 molécula de SDS cada 2 residuos aminoacídicos aproximadamente).

La carga otorgada por el SDS enmascara a las cargas proteicas intrínsecas de forma que las proteínas tratadas con SDS tienden a presentar relaciones carga/masa casi idénticas y formas similares (desplegadas). Es por esto que la separación ocurre por efecto de filtración de geles en función del MW (separación por tamaño o largo de la cadena polipeptídica).

Las masas moleculares de las proteínas se determinan con una precisión del 5-10 % con esta técnica, y las movilidades relativas de las proteínas varían en forma lineal con el logaritmo de sus masas moleculares.

Algunas proteínas están formadas por más de una cadena polipeptídica; al tratarla con SDS se rompen las interacciones no covalentes entre estas subunidades. De esta manera el SDS-PAGE nos permite obtener masas moleculares de las subunidades de la proteína en vez de la proteína intacta. Distinto es el caso cuando tenemos subunidades unidas por puentes disulfuro. En éste último caso, para separar las subunidades se agrega mercaptoetanol a los geles SDS-PAGE de manera de escindir los puentes di-sulfuro por reducción.

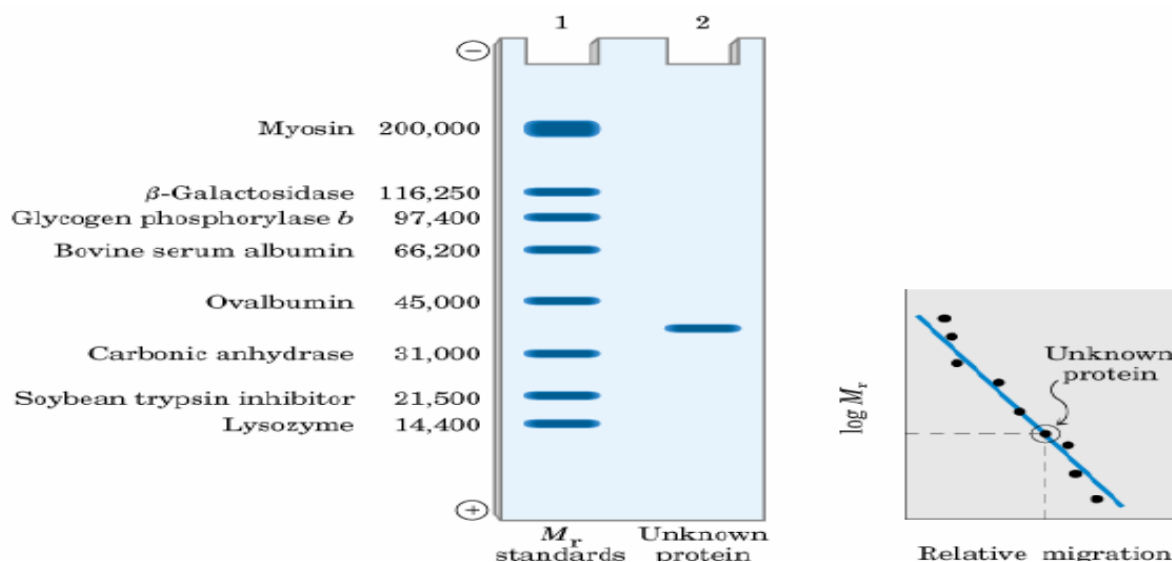


Fig. D) Determinación de la masa molecular de una proteína. En la imagen de la izquierda podemos ver proteínas patrón de masa molecular conocida en el carril 1 del gel revelado luego de la electroforesis. Estas proteínas marcadas se pueden utilizar para determinar la masa molecular de una proteína desconocida (carril 2). Una gráfica del $\log M_r$ de las proteínas patrón frente al desplazamiento relativo de las mismas es lineal, lo que permite leer la masa molecular de la proteína desconocida.

Aplicaciones:

Pueden analizarse las proteínas contenidas en:

- ❖ líquidos biológicos: sangre, plasma, suero (plasma sin fibrinógeno), orina, líquido sinovial, saliva, lágrimas.
- ❖ Alimentos, especialmente lácteos y cereales.
- ❖ En investigación y en clínica, tanto humana como animal

Electroforesis Bidimensional

La electroforesis 2D (IEF+SDS-PAGE) es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma (conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma en un momento dado).

Dicha técnica pasa por las siguientes etapas:

1. **Preparación de la muestra;** En este paso se emplean agentes caotrópicos, surfactantes y agentes reductores. Los agentes caotrópicos, como la urea, provocan la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que son solubilizados por los agentes surfactantes. Los agentes reductores, como el DTT (Dithiothreitol, aunque también se emplean otros reductores alternativos no cargados), completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro.
2. **Separación en la 1ª dimensión (Isoelectroenfoque);** Separación de la mezcla de proteínas según sus puntos isoeléctricos.
3. **Separación en la 2ª dimensión (SDS-PAGE);** Las proteínas se separan en función de su peso molecular.
4. **Revelado;** Los métodos más usados son la tinción con azul Coomassie -que se fija a las proteínas pero no al gel-, la tinción fluorescente con Sypro Ruby y la tinción con Plata. La tinción de azul Coomassie clásica puede detectar normalmente bandas de proteína de 50 ng, mientras que la tinción con plata incrementa este límite de sensibilidad en unas 50 veces.

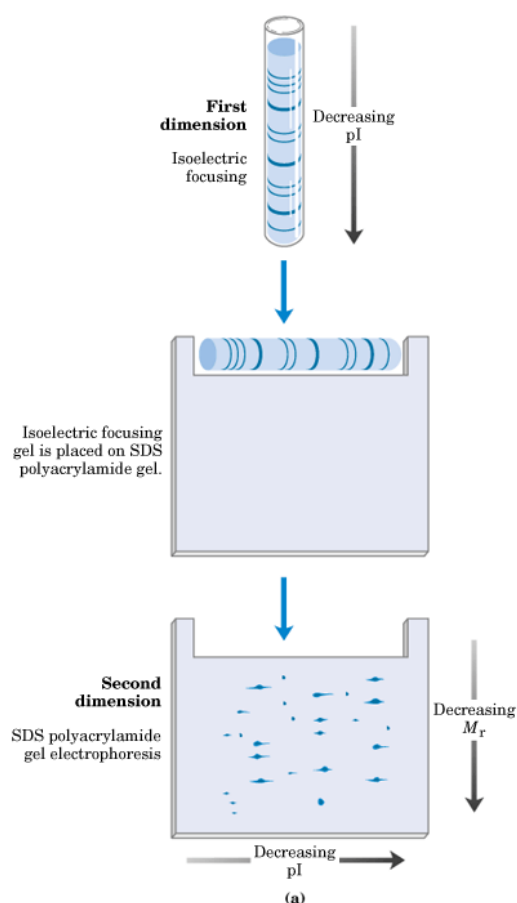


Fig. E) Electroforesis bidimensional. Las proteínas se separan en un primer momento mediante enfoque isoeléctrico en un gel cilíndrico. A continuación se extiende el gel horizontalmente sobre un segundo gel, en forma de plancha, y las proteínas se separan mediante electroforesis SDS-PAGE. La separación horizontal refleja las diferencias de pI; la vertical refleja las diferencias en masa molecular.

Aplicaciones:

La aplicación principal es la proteómica de expresión; con esta técnica se puede comparar de forma cualitativa y cuantitativa la expresión de proteínas de dos muestras. La aparición y desaparición de manchas proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas, mientras que la intensidad de las mismas permite conocer sus niveles de expresión. Este método de trabajo, llamado DIGE (Difference gel electrophoresis), permite la comparación de tejidos normales con tejidos enfermos; o la de células tratadas con drogas o sometidas a diferentes estímulos. Para esto se procede al marcaje de muestras con fluorocromos (como por ejemplo Cy3, Cy5, Cy2) antes del IEF, y finalizado el experimento se realiza la visualización en escáner confocal y análisis automático.

Bibliografía

<http://148.206.53.231/tesuami/UAMI14317.pdf>; fecha de visita 20/09/13

http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm?iframe=true&width=95%&height=95%; fecha de visita 20/09/13

Lehninger, A. (1994) Principles of Biochemistry. 3rd ed.

Voet-Voet Bioquímica Ed. Panamericana 3ª. Ed.