

ELECTROFORESIS

WESTERN BLOT

ELISA

INTEGRANTES:

- ✓ Arguelles, Rocío
- ✓ Assandri, Matías
- ✓ Almirón, Marianela
- ✓ Buonanduci, Facundo
- ✓ Gómez, Alan
- ✓ Miller, Florencia
- ✓ López, Rocío
- ✓ Vidal, Sol
- ✓ Sillingardi, Leonardo
- ✓ Soria, Estefania

ELECTROFORESIS

FUNDAMENTO

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Es decir, la velocidad de migración electroforética depende de la densidad de la carga de la molécula (relación carga/masa), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. Por lo tanto, la velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e

Inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio ($v = q E / f$)

El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por un tiempo muy prolongado de corrida electroforética.

METODOLOGIA

1) Preparación del gel

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilenediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) que se añade en forma de persulfato amónico. Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel. La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador). La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

2) Separación electroforética

En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes:

- 1) una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.
- 2) Una electroforesis nativa es la que se somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma.

Pueden realizarse estudios de funcionalidad de las proteínas separadas (actividad enzimática, capacidad de unión de anticuerpos, unión a receptores, etc).

Hay 2 formas de realizarla:

1. -Gel con pH alto para que las proteínas adquieran carga neta negativa y se muevan en dirección al ánodo.
2. -Se siembra la disolución proteica en el centro del gel, así proteínas ácidas corren hacia el ánodo y básicas hacia el cátodo.

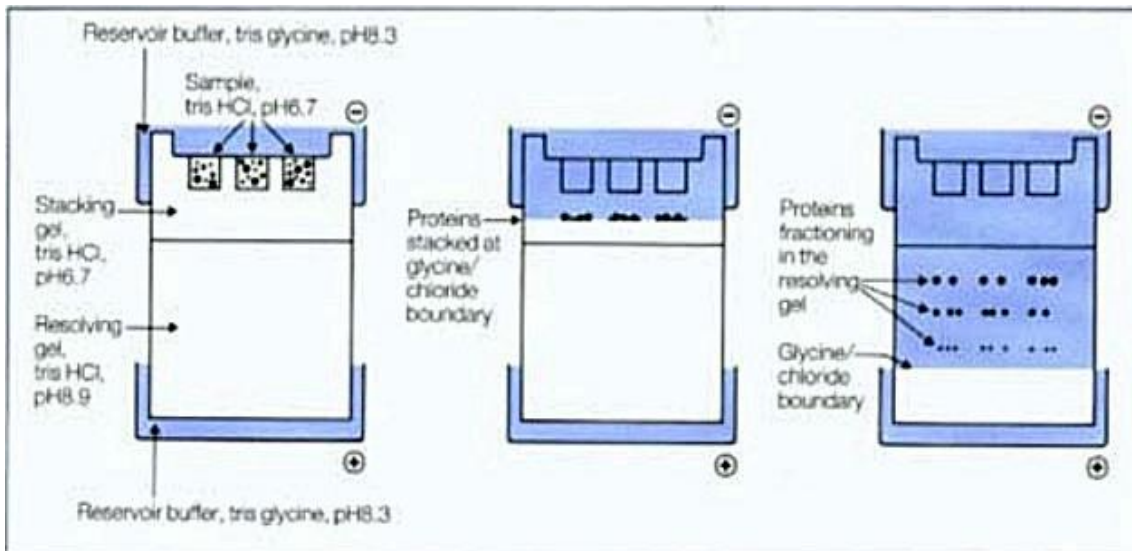


Figura 1

La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. El buffer que contiene a la muestra y el del gel espaciador tiene un pH dos unidades menor que el del reservorio inferior. El pH del buffer del reservorio superior, que debe contener un ácido débil (por lo general glicina, $pK_{a2} = 9,78$) se ajusta a un valor cercano al del reservorio inferior.

La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón. En la FIGURA 1 se muestran secuencialmente la situación en (a) al principio de la electroforesis, (b) durante el proceso de apilamiento ('stacking') y (c) durante la separación en el gel resolutor. El primer gel ('stacking') es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el segundo gel que es el que realmente separa las proteínas. Este sistema es especialmente adecuado para analizar muestras diluidas sin perder resolución.

SDS-PAGE

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinadas con técnicas de inmunoelectrotransferencia.

Gracias al SDS la mayoría de las proteínas adquieren una relación carga/masa idéntica por lo que se obtiene un fraccionamiento que obedece a: la diferencia de peso, a la longitud de la cadena (tamaño) y la forma de la proteína.

El SDS desnaturaliza las proteínas, elimina sus estructuras secundarias y terciarias (sin alterar los enlaces disulfuro) y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa.

Esta técnica tiene gran utilidad ya que a través de la movilidad electroforética relativa podemos determinar el peso molecular de las proteínas. En la práctica utilizamos un patrón de peso molecular PM conocido y solo comparando las distancias recorridas podemos calcular el peso molecular.

3) DETECCION

Tras la electroforesis, el gel debe ser teñido (lo más habitual con Coomassie blue o tinción argentea, permitiendo la visualización de proteínas separadas por su procesamiento posterior). Tras la tinción las diferentes proteínas aparecerán como bandas distintas en el gel. Es común correr marcadores moleculares de tamaño molecular conocido en una calle aparte del gel para calibrarlo y determinar el peso de las proteínas desconocidas comparando la distancia recorrida con la del marcador. Aun así se pueden dar falsos positivos y negativos., un contaminante que migre conjuntamente puede aparecer en la misma banda que la proteína deseada. Esta co migración también puede hacer que la proteína migre en una posición diferente o que no sea capaz de penetrar en el gel.

4) Aplicaciones

Algunas de las aplicaciones para estos tipos de electroforesis son:

- Evaluar los componentes de una muestra compleja (Por ej. lisado bacteriano).
- Determinación del peso molecular.
- Evaluación de la eficiencia de un paso de purificación: Esto es, puede seguirse el progreso de un procedimiento de purificación de una proteína, ya que el numero de bandas de proteína visibles en el gel debe disminuir tras cada nuevo paso de purificación.
- Evaluar la inducción de proteínas recombinantes en un cultivo bacteriano.
- Primer paso de un Western Blot.
- Segundo paso de una electroforesis en gel en 2D (el primer paso es un Isoelectroenfoque).

WESTERN BLOT

El Western Blot es una técnica analítica usada para detectar una proteína específica en un extracto crudo, mediante el uso de anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune de un animal (inmunoglobulinas) que son capaces de detectar proteínas ajenas (antígenos) y unirse específicamente a ellas.

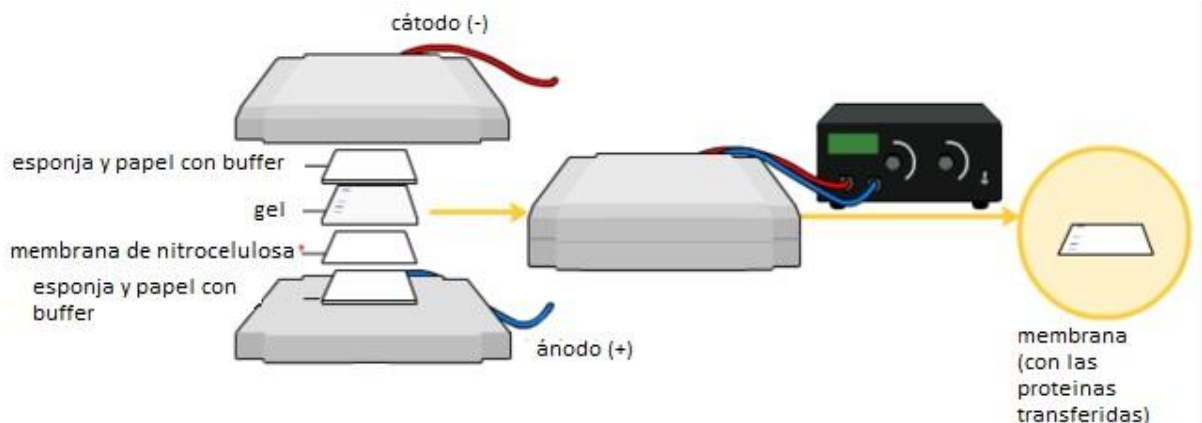
METODOLOGIA

El procedimiento comienza con una corrida electroforética en gel de poliacrilamida para separar las proteínas de la muestra según el criterio del método utilizado (SDS-PAGE con β -mercaptoetanol o sin el, electroenfoque, electroforesis nativa, entre otros).

Luego, las proteínas ya separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa que las une con firmeza y en forma no específica por difusión, aunque la más utilizada en la actualidad es la electrotransferencia.

Si se usa la difusión, una vez que las proteínas fueron separadas el gel se recubre con una hoja de nitrocelulosa que a su vez se cubre con una capa gruesa de toallas de papel y el ensamble entero se comprime con una placa pesada. En consecuencia el líquido en el gel se transfiere a través de la nitrocelulosa.

La otra posibilidad es emplear la electrotransferencia que se basa en aplicar una corriente eléctrica y la utilización de un tampón de transferencia para llevar las proteínas desde el gel a la membrana. Para ello se apilan en forma de sándwich los siguientes elementos: esponja, papeles empapados con buffer de transferencia, gel, membrana, papeles empapados con buffer y esponja, y luego se le aplica una corriente eléctrica a todo el montaje para que las proteínas corran al polo positivo y se atrapen en la membrana. Esta técnica es más rápida e involucra a una mayor cantidad de proteínas que los otros métodos.



Una vez lograda la transferencia de la banda de proteínas a la membrana de nitrocelulosa por alguno de los dos tipos de transferencia descritos se corrobora el éxito de dicha transferencia por tinción con algún colorante como el Panceau S que es fácil de remover.

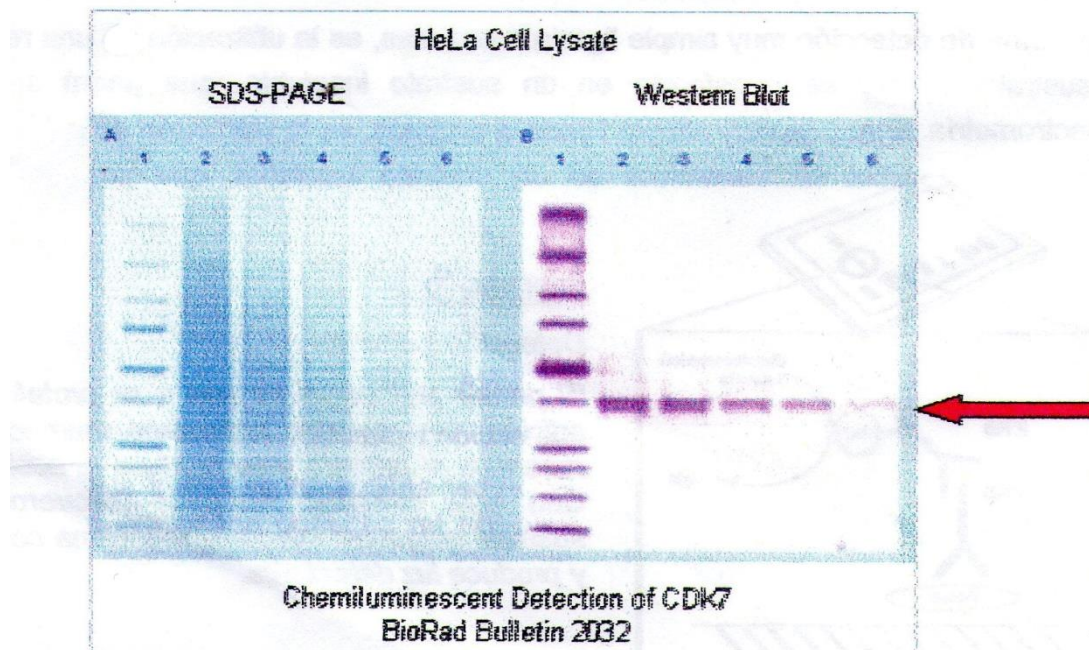
Los sitios de adsorción de la nitrocelulosa no ocupados por proteínas se bloquean con una proteína no específica como la caseína (proteína de la leche) para prevenir la adsorción no específica de los anticuerpos que luego se incorporan.

La membrana es sumergida en una solución que contiene al anticuerpo específico primario que se asociara a la proteína de interés. Luego de eliminar por lavado el exceso de anticuerpo primario la membrana se incubaba con un segundo anticuerpo dirigido contra el anticuerpo específico. Este segundo anticuerpo está acoplado de manera covalente a una enzima detectable con facilidad por métodos

espectrofotométricos. Este método se conoce como detección indirecta. Luego de eliminar el exceso de anticuerpo secundario, la enzima acoplada al anticuerpo se detecta mediante una reacción cromogénica en la membrana, lo que hace que aparezcan bandas coloreadas sobre la nitrocelulosa en el lugar donde estaba la proteína de interés. De esta forma el experimentador puede seguir el desarrollo de la enzima en cada banda de proteína.

Otro de los métodos sería la detección directa, que utiliza un anticuerpo primario ya marcado con una enzima o sonda fluorescente permitiendo detectar el antígeno sobre la superficie de la membrana.

Resultado:



La calle 1 corresponde al control positivo. Se observa que para la proteína indicada con la flecha, el resultado fue positivo y por lo tanto es proteína está presente en la célula HeLa

ELISA

Ensayo Inmunoabsorbente Unido a Enzima

El ELISA es un ensayo que permite la cuantificación de una proteína en una mezcla mediante el uso de un anticuerpo y un antígeno. Si bien el fundamento es la especificidad de la unión anticuerpo-antígeno al igual que el Western Blot, el procedimiento es mucho más sencillo y rápido, aunque de menor sensibilidad con respecto a este último.

Utilidad

Dado que la muestra no necesita ningún tipo de preparación, es un procedimiento simple en los laboratorios de análisis clínicos, donde se parte de una muestra de sangre o de orina. Es utilizado para la detección de enfermedades tales como HIV, hepatitis B o C, o infecciones como toxoplasmosis, enfermedad de Lyme, *Helicobacter pylori*, entre otras. Un resultado positivo indica que el anticuerpo está presente porque cumple su función y por lo tanto el paciente ha contraído la enfermedad determinada. También se suele diagnosticar la cantidad de una determinada proteína o sustancia en estos fluidos corporales, tales como hormonas proteicas o drogas.

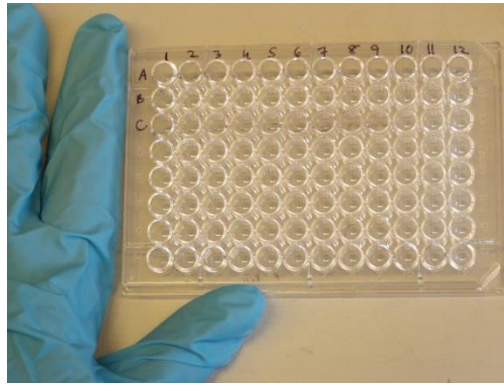
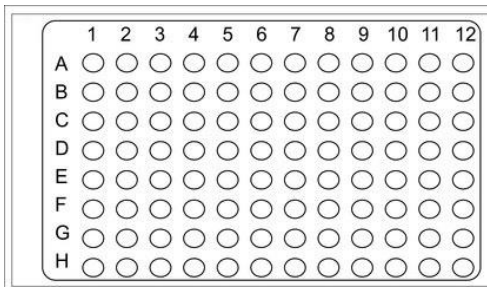
Una desventaja es que esta prueba suele presentar falsos positivos, sobre todo en el diagnóstico de HIV o la enfermedad de Lyme, por ello usualmente se procede a una segunda prueba confirmatoria mediante el método de Western Blot, el cual identifica las proteínas afectadas por el HIV separándolas por su peso molecular y luego agregando los anticuerpos marcados con enzimas, que al agregarle un sustrato específico generan productos detectables.

Metodología.

- 1) Se fija el anticuerpo a una fase sólida como el poliestireno.
- 2) Los sitios de unión no específicos en la superficie se bloquean.
- 3) La muestra que contiene el antígeno se aplica a la placa.
- 4) Se une el antígeno al anticuerpo fijado. La placa se lava para eliminar el antígeno no unido.
- 5) Se añade un anticuerpo específico que también se unirá al antígeno ya fijado, pero a otro epítipo (secuencia específica del antígeno a la cual se une un anticuerpo).
- 6) Anticuerpos secundarios marcados con enzimas se aplican como anticuerpos de detección que también se unen al primer anticuerpo (sólo en el método indirecto).
- 7) La placa se lava para eliminar los conjugados anticuerpo-enzima no unidos.
- 8) Se añade el sustrato de la enzima unida al anticuerpo primario (método directo) o al anticuerpo secundario (método indirecto)
- 9) Reacción del sustrato con la enzima
- 10) El producto emite una señal detectable, como cambio de color.

Equipamiento

Se utiliza una placa de plástico de 96 pocillos (12 columnas enumeradas 8 filas A-H) en los cuales se hacen sucesivas diluciones para cuantificar y se utiliza 2 columnas para los respectivos controles positivos y negativos. La placa es tratada para aumentar su capacidad de adsorción de moléculas (fenómeno de superficie) y posee pocillos con fondos ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en espectrofotómetros de lectura de placas específicos que han recibido el nombre de lectores ELISA.



Esquema de una placa de ELISA (izquierda) y fotografía (derecha).

Ensayos

Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos:

Competitivo:

En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra.

No competitivo:

Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color.

Detección

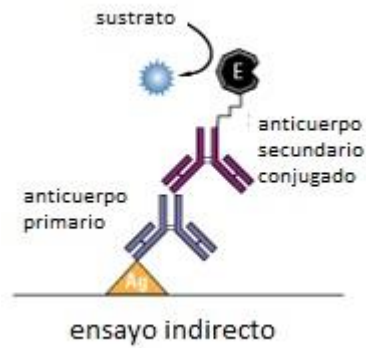
La etapa final en todos los sistemas de ELISA es el paso de detección. Se pueden utilizar marcadores radiactivos, fluorescentes o enzimas a las cuales se les agrega un sustrato. La enzima convierte el sustrato en un producto detectable. Si un ELISA se ha construido y desarrollado correctamente, entonces la intensidad de la señal que se produce cuando el sustrato se añade es directamente proporcional a la cantidad de antígeno capturado en la placa. Los tipos de enzima y sustrato que se utilizan son los mismos que los del Western Blot.

Directa: el método de detección directa utiliza un anticuerpo, marcado primario que reacciona directamente con el antígeno. La detección directa de un antígeno marcado se utiliza con frecuencia para detectar drogas o en la orina en las pruebas de embarazo para realizar en el hogar, que detecta una hormona que solo está presente en la mujer embarazada.

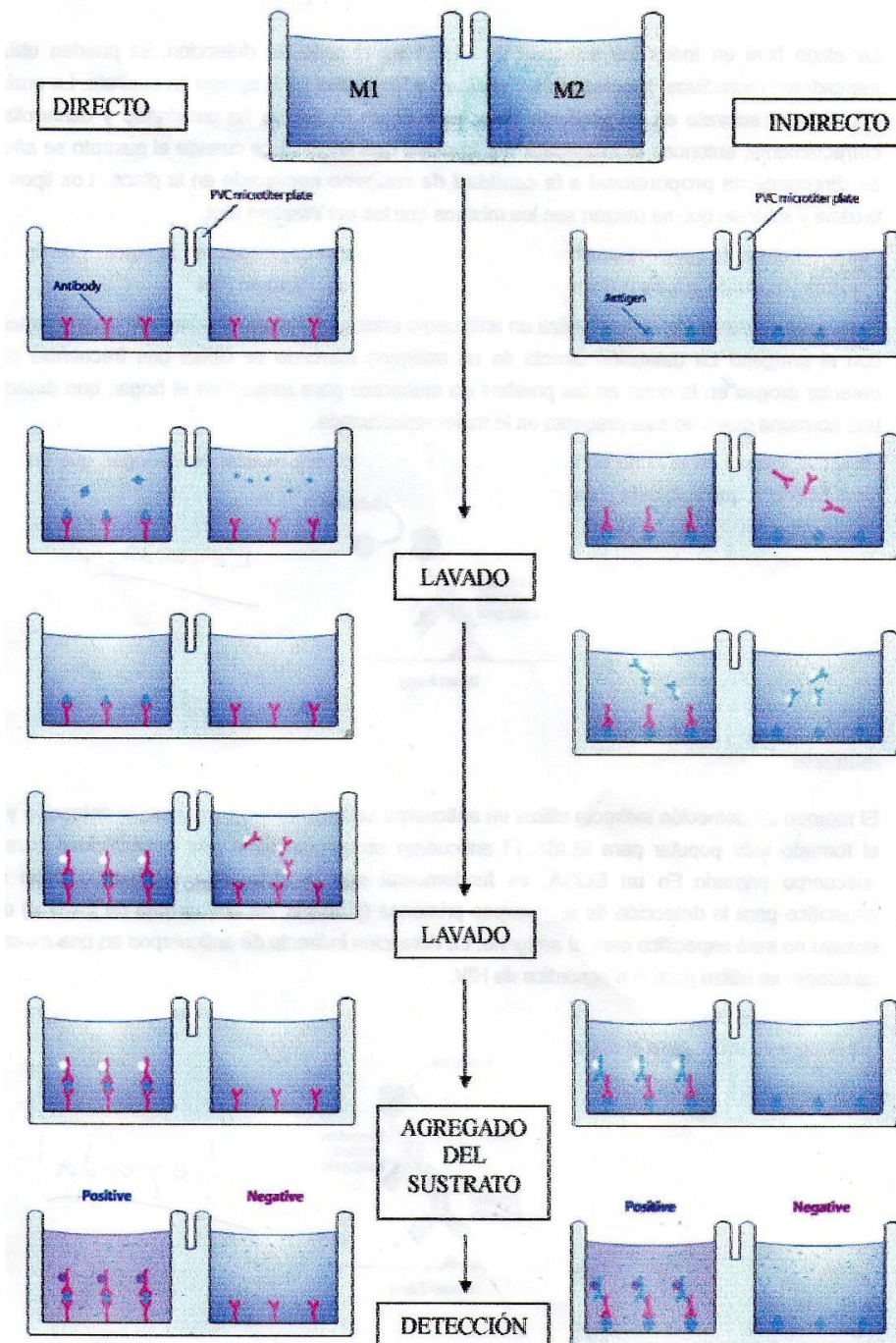


Esquema de detección directa.

Indirecto: el método de detección indirecta utiliza un anticuerpo secundario marcado para la detección y es el formato más popular para ELISA. El anticuerpo secundario tiene una especificidad para el anticuerpo primario. En un ELISA, es fundamental que el anticuerpo secundario sea específico para la detección de anticuerpo primarios (y no por los anticuerpos de captura) o el ensayo no será específico para el antígeno. La detección indirecta de anticuerpos en una muestra de sangre se utiliza para el diagnóstico de HIV.



Esquema de detección indirecta



Esquema comparativo de ELISA directo e indirecto

Bibliografía:

Lehninger, Principios De Bioquímica, quinta edición.

Voet-Voet, Bioquímica, tercera edición.

<http://es.wikipedia.org>

<http://books.google.com.ar/books?id=RcMak8yKAHcC&pg=PA52&lpg=PA52&dq=electroforesis+sistemas+continuos+y+discontinuos&source=bl&ots=EOU3e5N7uX&sig=DVqIBitOS2Qn195uPA->

[KJODznZI&hl=es&sa=X&ei=BCZEUoe9A62t4APEpIGAaw&ved=0CFcQ6AEwCA#v=onepage&q=electroforesis%20sistemas%20continuos%20y%20discontinuos&f=false](http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/poli.htm)

<http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/poli.htm>

