

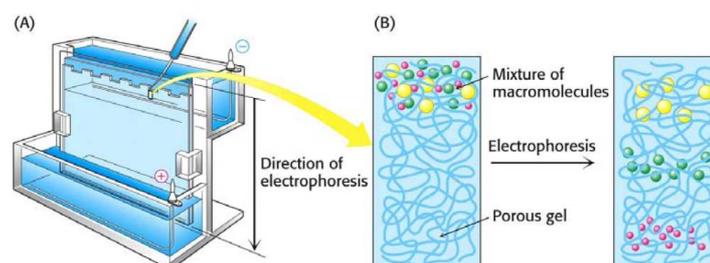
SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

OBJETIVO: utilizar la técnica de la **electroforesis en gel** para analizar la **purificación** de la enzima lisozima. Se analizará la composición proteica de las distintas fracciones y se constatará el **grado de pureza de la lisozima**.

FUNDAMENTO

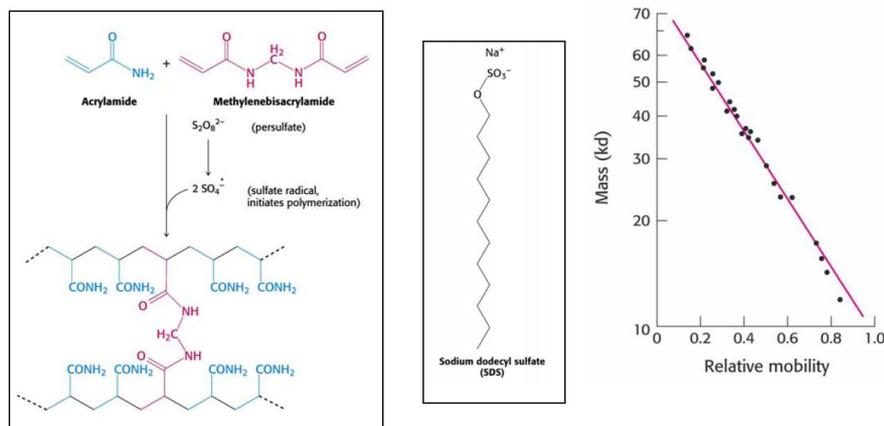
La electroforesis es la migración de iones en un campo eléctrico. Es una de las técnicas analíticas más importantes dentro de la Bioquímica. Las moléculas biológicas (ADN, proteínas, vitaminas, etc.) poseen cargas eléctricas, y por tanto poseen esta propiedad de movilidad en un campo eléctrico. La movilidad dependerá de la carga que presentan al pH que trabajemos. **La electroforesis en gel** es el método más conveniente para realizar separaciones de macromoléculas (ADN y Proteínas). El soporte de la electroforesis (el gel) es un entramado tridimensional que impide o reduce la difusión. Este gel ha de ser compatible con los tampones usados y debe permitir la entrada del líquido en los poros (reticulados hidratables).

Los soportes pueden ser más o menos restrictivos según que el tamaño de poros limite o impida el paso de las moléculas. Los más restrictivos, como los geles de **acrilamida-bisacrilamida**, oponen impedimento al paso de las moléculas, participando así en el proceso de separación. Entre los menos restrictivos está la agarosa. El tamaño de poro que da unas dimensiones moleculares de criba de los geles puede ser establecido previamente. El gel en la electroforesis retarda, en mayor o menor medida, a las moléculas mayores respecto a las de menor tamaño. Las separaciones moleculares están pues basadas en el **tamizado molecular** junto a la **movilidad electroforética** de las moléculas que van a ser separadas.



Para llevar a cabo la electroforesis se necesita: A) una **fuentes de Tensión** que proporciona el campo eléctrico, mediante dos electrodos, positivo (ánodo) y negativo (cátodo), entre los que se establece la diferencia de potencial. B) **una cubeta** o recipiente, en cuyos extremos se sitúan los electrodos. C) un **soporte electroforético**. D) el **tampón de electroforesis**: durante la electroforesis se produce electrolisis del agua, generándose protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilos en la proximidad del cátodo; el tampón evitará que el entorno anódico se acidifique y el catódico se haga más básico a lo largo de la electroforesis.

El polímero utilizado para la formación del gel es la **acrilamida** y la **bis-acrilamida**, los cuales se polimerizan mediante la adición de catalizadores (**persulfato amónico, TEMED**). En nuestro caso, la separación de las proteínas se verá condicionada **sólo por su tamaño** y no por su carga ya que previamente las proteínas serán desnaturadas utilizando un **detergente (SDS)**, el cual despliega a las proteínas y se queda pegado a su superficie confiriéndole una gran carga negativa. Esa gran carga negativa enmascara la carga intrínseca de la proteína, y **las proteínas una vez tratadas con SDS presentan todas la misma carga, y la separación será debida solamente a la masa molecular de la proteína.**



PROTOCOLO

La separación electroforética se lleva a cabo según el método descrito por **Laemmli** en geles de poliacrilamida (al 16% en acrilamida)

- A **15 µl** de las **Fracciones F₀ – F₃** se le añaden, en un eppendorf, **tampón de carga (x3)**: (**Tris-HCl 0,125 M**, pH 6,8; **SDS 4%**; **glicerol 20%**; **2-mercaptoetanol 10%**; **Azul de bromofenol 0,008%**).
- **Calentar** las muestras a **95°C** durante **3 min**.
- **Cargar** en pocillos **10 µl de F₃** y **5 µl del estándar** de proteínas
- **Correr la electroforesis** en tampón Tris-HCl 0,025 M, pH 8,8, glicina 0,192 M y SDS 0,1%, a una intensidad de corriente constante de 30 mA hasta que el azul de bromofenol esté aproximadamente a 1 mm del extremo inferior del gel.
- Desmontar el gel y **teñirlo** con metanol/acético/H₂O (5/1/5) con azul de Coomassie (1 g/l).
- **Desteñir** el gel en metanol/acético/H₂O (10/10/80).