

PROBLEMA BIOQUÍMICO
*Estimación del peso molecular de
una proteína por electroforesis en
un gel de poliacrilamida*

Un tema de bioquímica

PROBLEMA BIOQUÍMICO

ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Hiram Lozano Ruiz (1), Angélica Rueda y Sánchez de la Vega* (1)

(1) Laboratorio 3. Departamento de Bioquímica

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco. Gustavo A. Madero. C.P. 07360, CDMX, México.

*Autor de correspondencia correo E: rueda@cinvestav.mx

INTRODUCCIÓN

La electroforesis es un método de separación cuyo principio se basa en el movimiento de moléculas cargadas eléctricamente a través de una matriz, que puede ser un gel o un papel filtro, mediante una corriente eléctrica. La movilidad electroforética de las moléculas en un campo eléctrico depende de factores como la carga eléctrica neta, la relación carga/masa y la forma molecular, además de la porosidad y viscosidad de la matriz en la que migran las moléculas. La electroforesis se utiliza para separar mezclas complejas de proteínas, investigar la composición de subunidades, identificar modificaciones postraduccionales, verificar la abundancia relativa de proteínas en una muestra o para purificar proteínas para su uso en aplicaciones adicionales. La técnica de electroforesis fue implementada por primera vez en 1937, por el científico sueco Arne Tiselius, quien, usando un tanque en forma de "U" en el que colocaba una mezcla de proteínas en contacto directo con una solución amortiguadora, determinaba la movilidad electroforética al aplicar una corriente eléctrica. Dependiendo de la carga neta de las proteínas en la mezcla, éstas se movilizaban; por ejemplo, las proteínas con carga neta negativa se movían hacia el ánodo (+), mientras que las que tenían carga neta positiva se movían hacia el cátodo (-) (1).

Existen muchas variantes de la electroforesis, las más usadas en un laboratorio de bioquímica son las que usan condiciones no desnaturalizantes y las desnaturalizantes. En el primer tipo de electroforesis se separan las proteínas en su estado nativo e incluso activo. En el caso de enzimas, esta electroforesis permite determinar su actividad catalítica en el gel al poner el sustrato dentro del mismo gel y medir la desaparición de éste o la generación de productos. La separación en este tipo de electroforesis depende de la carga neta, y la forma y la masa molecular de las proteínas nativas. En contraste, la electroforesis desnaturalizante separa las proteínas únicamente por su peso molecular, ya que las proteínas pierden su estructura nativa por la acción de detergentes como el dodecilsulfato de sodio y agentes reducidores como el 2-mercaptoetanol o el ditiotreitol (2). Esta característica hace a este tipo de electroforesis de gran utilidad para el trabajo de laboratorio.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) es un tipo de electroforesis desnaturalizante utilizada para estimar la masa molecular relativa de proteínas y su abundancia relativa en una muestra, así como la pureza de las muestras de proteínas. El SDS es un detergente aniónico (cargado negativamente) con una cadena alifática de 12 carbonos que puede disolver moléculas hidrofóbicas y desnatura-

lizar las estructuras secundarias y terciarias de péptidos y proteínas sin enlaces disulfuro. El SDS se une a las proteínas en una proporción constante, en una relación de 1.4 g de SDS/g de proteína, es decir, aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. En presencia del SDS, las proteínas conservan solamente su estructura primaria y una gran carga negativa en proporción a la masa de la proteína, lo que determina que migrarán hacia el ánodo del campo eléctrico (3). La poliacrilamida es una mezcla compuesta por polímeros de acrilamida y N, N'-metilenbisacrilamida; esto permite la formación de un gel de porosidad controlada, la cual se reporta en función del porcentaje de acrilamida en el gel (%). Este gel es mecánicamente resistente y químicamente inerte.

En la técnica de SDS-PAGE, se utiliza un gradiente de dos geles. Un gel concentrador, el cual tiene una menor concentración de poliacrilamida (3-5%) y pH de 6.8, y un gel separador que tiene una mayor concentración de poliacrilamida (8-20%) y pH de 8.8. Al aplicar la corriente eléctrica, la mezcla de proteínas pasa primero por el gel concentrador, el cual contiene iones cloruro con una movilidad electroforética mayor que la movilidad de las proteínas, y un amortiguador de electroforesis con glicina, la cual tiene baja movilidad. El resultado es un "sándwich" entre el cloruro y la glicina, lo que asegura que las proteínas se concentren y entren juntas al siguiente gel. En el gel separador, debido a que se prepara con un amortiguador de pH más alcalino, la glicina pasa a su forma aniónica y por su bajo peso molecular migra más rápidamente, facilitando la movilidad de las proteínas; sin embargo, debido al tamaño de poro más cerrado de este gel, por la mayor concentración de poliacrilamida, las proteínas se separan según su peso molecular (1,3).

Esta técnica de SDS-PAGE también permite el análisis de subunidades de una proteína con el uso de agentes reductores en el amortiguador para preparar las muestras (que también contiene SDS y azul de bromofenol), como el 2-mercaptopetanol o el ditiotreitol, ya que rompen los enlaces entre polipéptidos individuales unidos por puentes disulfuro, por lo que el análisis de la movilidad relativa de una proteína de interés en un gel SDS-PAGE, en presencia y en ausencia de agentes reductores, permite hacer deducciones sobre las subunidades que la componen (4).

Un aspecto muy relevante de la electroforesis de tipo SDS-PAGE, es que es muy útil para determinar el peso molecular (PM) aproximado de una proteína mediante la interpolación de su movilidad relativa

(Rf) en una gráfica de regresión lineal, la cual se obtiene al graficar el \log_{10} PM de proteínas conocidas (eje Y) que se pueden adquirir comercialmente

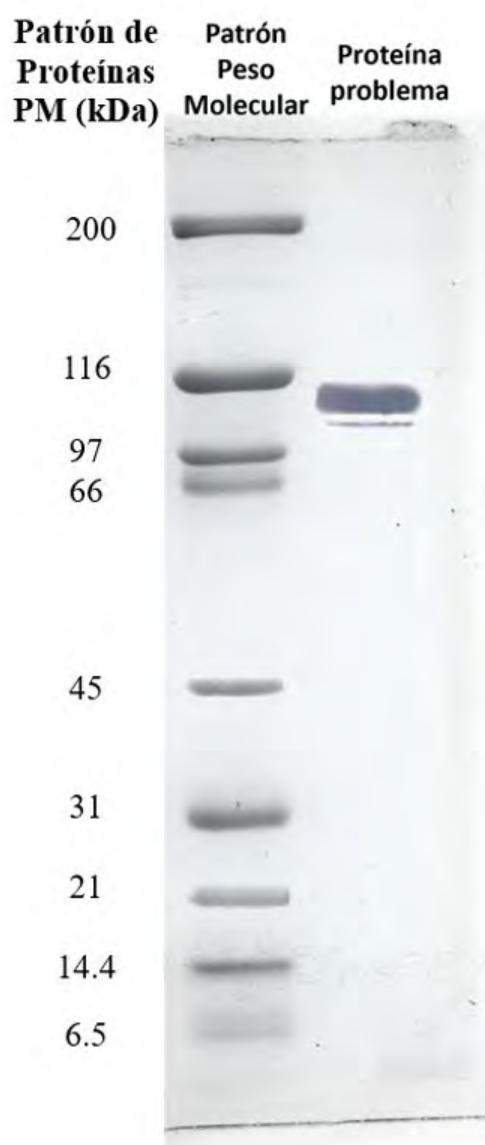


Figura 1. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5 %, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Patrón de proteínas de referencia con peso molecular (PM) conocido de arriba hacia abajo: 200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14.4 y 6.5 kDa. Carril 2: Proteína problema.

vs el Rf de cada una de estas proteínas en el gel (eje X). El Rf se determina al medir la distancia de migración (en cm) de las bandas de las proteínas patrón (con PM conocido) en el gel de poliacrilamida, respecto al frente de migración del gel (en cm), como lo haremos más adelante. Con este método experimental se puede estimar el PM de una

proteína con una exactitud de $\pm 10\%$ (5); por lo que se recomienda usar otros métodos teóricos o experimentales si se quiere determinar el PM con mayor certeza.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para este problema bioquímico utilizaremos un gel separador de poliacrilamida al 7.5 % para realizar una electroforesis del tipo SDS-PAGE de una muestra de proteína purificada, a la cual se le estimará su peso molecular (PM) aproximado, utilizando un patrón de proteínas con PM conocido, teñidas con una solución de azul de Coomassie.

PREGUNTAS

Utilizando la imagen adjunta (Fig. 1) que corresponde a un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 7.5 %, con un patrón de proteínas de PM conocido en el carril 1, y una proteína de PM desconocido en el carril 2, realice las siguientes actividades:

1) Mida la distancia de migración del frente del gel en cm (distancia que abarca todo el recorrido de un compuesto de movilidad máxima, como el azul de bromofenol) y la distancia de migración de cada banda proteica desde la marca de inicio del pozo en el carril del patrón de proteínas de PM conocido y en el carril de la proteína problema.

2) Determine el valor de movilidad relativa (R_f) de cada banda de proteína, usando la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de la proteína (cm)}}{\text{distancia de migración del frente del gel (cm)}}$$

3) Elabore una tabla con los valores de R_f de las proteínas de referencia y los valores de $\log_{10} \text{PM}$ de dichas proteínas (los PM de las proteínas de referencia son: 200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14.4 y 6.5 kDa).

4) Grafique los valores de $\log_{10} \text{PM}$ vs R_f y realice el ajuste de los datos a la ecuación lineal $y = mx + b$.

5) Utilizando la ecuación de dicha gráfica, interpole el valor de R_f de la proteína problema para calcular su PM aproximado.

6) La bomba ATPasa de Ca^{2+} del Retículo Sarco/Endoplásmico (SERCA2, Uniprot Entry P11507·AT2A2_RAT) es la proteína que se reporta en el carril 2 del gel de poliacrilamida; ésta es una proteína de una sola cadena polipeptídica con 1043 residuos de aminoácidos. Calcule su PM según su composición aminoacídica y compárela con el PM obtenido en el gel. ¿Qué tan cercano fue el PM calculado en el gel, respecto al PM obtenido por la composición aminoacídica?

7) Observando el comportamiento de los datos en la gráfica obtenida en el punto 4 (Fig. 2) explique los factores que pudieron haber afectado su linealidad.

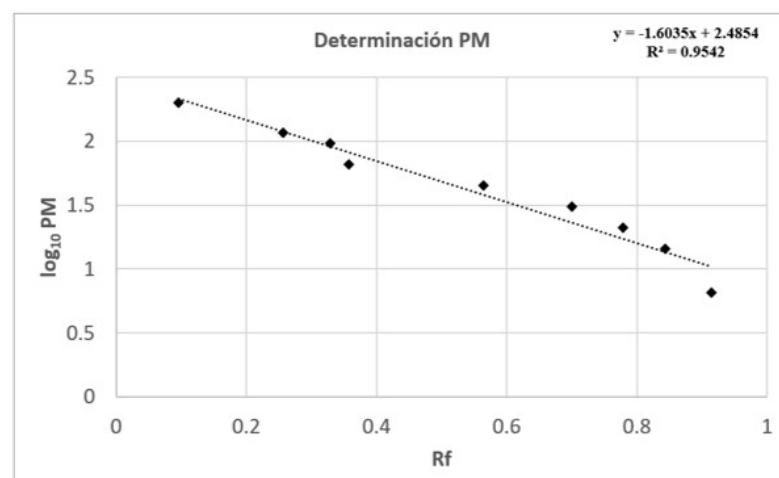


Figura 2. Gráfica para la determinación del PM de una proteína de interés. Gráfica que muestra el ajuste de los puntos de $\log_{10} \text{PM}$ de las proteínas de referencia vs su movilidad relativa (R_f) a la función de ecuación de la recta $y = mx + b$ para la estimación del PM de una proteína de interés. Los valores de la pendiente m y de la ordenada al origen b , se reportan en la parte superior derecha de la gráfica.