INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PESQUERO

INFORME DE ASESORAMIENTO Y TRANSFERENCIA

Número	Páginas	Fecha de aprobación
026	006	15 ABR 2015

Dirección: DIRECCIÓN DE INFORMACIÓN, OPERACIONES Y TECNOLOGIA

Programa / Gabinete: Desarrollo de Productos, Procesos y Transferencia de Tecnología

Actividad:

CAPACITACIÓN EN EL METODO DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Se capacitó a la Bqca. Daniela Lorena Lamas en la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta actividad forma parte de la beca de formación superior de la UNMDP bajo la co-dirección de la Dra. Agueda Massa. El tema de estudio es "Extracción y caracterización de enzimas proteolíticas de los desechos provenientes de la comercialización de la merluza *Merluccius hubbsi* y del calamar *Illex argentinus*".Se realizaron corridas electroforéticas para la resolución de mezclas proteicas complejas de residuos de anchoíta y merluza.

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

SOLICITADO POR Institución: Cargo:

PREPARADO POR

Firma:

SALOMONE, ANDREA

Nombre: LAURA

APROBADO POR

Jefe de Programa / Gabinete

Lic. RAUL RETA
Director de Área
DIRECCIÓN DE Información, Operación y Tecnología

Dr. OTTO C. WÖHLER
DIRECTOR
Dirección Nacional de Investigación
INIDEP
Director Nacional de Investigación

Director del INIDEP

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

CAPACITACIÓN EN EL METODO DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Salomone, Andrea Laura

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Objetivo

Se capacitó a la Bqca. Daniela Lamas en la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta actividad forma parte de la beca de formación superior de la UNMDP bajo la co-dirección de la Dra. Agueda Massa. El tema de estudio es "Extracción y caracterización de enzimas proteolíticas de los desechos provenientes de la comercialización de la merluza *Merluccius hubbsi* y del calamar *Illex argentinus*". La capacitación consistió en la explicación de la metodología y los fundamentos de la técnica, y además se realizaron corridas electroforéticas para la resolución de muestras proteicas complejas de residuos de anchoita y merluza.

Introducción

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula. Cada molécula se desplaza en el campo eléctrico alcanzando una velocidad constante. En el estado estacionario, la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) se equilibra con la resistencia al avance (fuerza de fricción hidrodinámica) en el medio en que se desplaza.

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Controlando la concentración de ambas se obtienen geles de diferente diámetro de poro. Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE.
En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales. Al incluir bisacrilamida, ésta da lugar a puntos de ramificación en el polímero, lo que permite formar una matriz tridimensional, dando lugar al gel de poliacrilamida. El tamaño de los huecos o poros que forma la retícula del polímero depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento (es decir, de la proporción de bisacrilamida con respecto al total). Así, variando la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas. Al ser discontinua, este tipo de electroforesis utiliza un gel concentrador con bajo grado de reticulación y pH 6,8 en la porción superior y un gel separador con grado de reticulación mayor con valores entre 6% y 15%.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular. Para que esta dependencia sea correcta, es preciso romper los puentes disulfuro intra e intercatenarios, para lo cual se añade a la

preparación de la muestra un agente reductor. Como consecuencia de este tratamiento y de la presencia de SDS durante toda la separación (tanto en el buffer de electroforesis como en la composición del gel), las proteínas se mantienen lineales (estructura primaria intacta).

Al llevarse a cabo en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970), las proteínas pierden su conformación tridimensional y así se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso y a la longitud de la cadena, migrando en relación a su masa cuando se aplica un campo eléctrico (**Fig.1**). Es una técnica semipreparativa que en el laboratorio de Tecnología se utiliza como método de rutina para observar los perfiles proteicos de procesos de ensilados biológicos, harinas, hidrólisis enzimáticas, homogenatos, etc., ya que es un método altamente reproducible y de costo relativamente bajo.

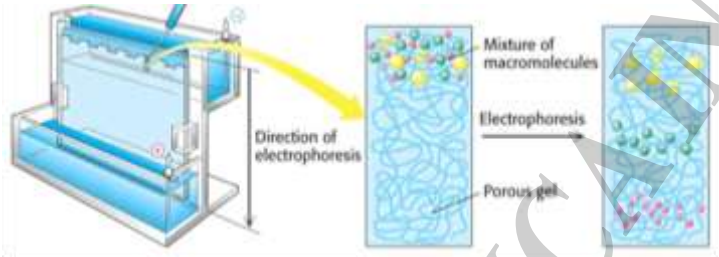

Figura 1. SDS-PAGE: perfil de migración de proteínas según su masa (kDa)

COPIA ELECTRÓNICA ANIDIF

Materiales

• Fuente de electroforesis
• Baño de incubación
• Cuba de electroforesis con cristales, peines y separadores
• Formador de geles
• Pipetas automáticas, puntas descartables y tubos de 1,5 ml de polipropileno
• Solución de acrilamida/bisacrilamida: 30 % acrilamida y 0.8 % bisacrilamida en agua destilada
• SDS: 10 % en agua destilada
• APS: 100 mg/mL en agua destilada
• TEMED (solución comercial)
• Buffer del gel separador: Tris 1M; pH = 8,8
• Buffer del gel acumulador: Tris 0,5 M; pH = 6,8
• Buffer de la muestra 5X: 2,5 ml de SDS 10%; 0,2 ml de 2-mercaptoetanol; 0,5 ml de azul de bromofenol 0,05%; 0,3 ml de buffer de electroforesis; 1 ml de glicerol y 0,5 ml de Tris 0,5 M pH 6,8
• Buffer de electroforesis: 14,4 g/l de glicina, 3 g/l de Tris (base) y 10 ml/l de SDS 10%
• Marcadores de peso molecular o proteínas puras.

Procedimiento experimental

1. Montaje del sistema de electroforesis

Se montó el “sandwich” con dos placas de vidrio (uno de ellos tiene un rebaje) y la goma separadora entre ambos lados y se colocó en el soporte formador de geles. Se

empleó un gel separador con un 12% de acrilamida y un gel acumulador con un 4% de acrilamida. Los geles fueron preparados mezclando en un vaso de precipitados, los componentes indicados en la **Tabla 1** (el persulfato y el TEMED inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar) y rápidamente se procedió al llenado con la mezcla (las cantidades indicadas son para dos geles). La solución de acrilamida/bisacrilamida se debe utilizar con guantes (es neurotóxica hasta que polimeriza).

Componentes	Gel Separador (12 %)	Gel Acumulador (4 %)
Acril/Bis Acril 30%	6 ml	0,67 ml
Tris 1M pH 8,8	3,8 ml	-
Tris 0,5M pH 6,8	-	0,5 ml
SDS 10%	0,15 ml	0,04 ml
APS	0,15 ml	0,04 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml
Agua	4,9 ml	2,7 ml

Tabla 1. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados en el trabajo.

Primero se polimerizó el gel separador. Para ello se rellenó, con la mezcla todavía líquida, el espacio entre las dos placas hasta unos 2 cm del borde superior del cristal corto. Se añadió encima una pequeña cantidad de agua destilada para que la superficie del gel quede recta. Se dejó polimerizar el gel entre 30 y 60 minutos, según las condiciones del ambiente. Se retiró el agua destilada y se secó la parte interior de los vidrios con un papel de filtro. Posteriormente se añadió sobre el gel separador la mezcla del gel "acumulador" y antes de que polimerice se introdujo en la parte superior el "peine", que formará en el gel acumulador los pocillos para luego poder contener las muestras. Una vez polimerizado el gel concentrador, se retiraron el peine y los separadores. Se llenó la cuba con buffer de electroforesis y se cargaron las muestras en los pocillos.

2. Preparación de la muestra

Se tomó el volumen necesario de muestra, se mezcló en relación 4:1 con el buffer de siembra 4X y se calentó cada muestra durante 10 minutos a 100ºC. Se centrifugaron los tubos a baja velocidad durante un minuto para concentrar toda la muestra en el fondo del tubo. Se aplicaron las muestras y los patrones de peso molecular en los pocillos del gel, usando micropipetas con puntas finas.

3. Desarrollo de la electroforesis

Se conectaron los cables de la cuba a una fuente de corriente continua y se aplicó un voltaje de 80V hasta que el frente de corrida (visible por la banda azul de bromofenol) entró en el gel separador, para luego incrementar el voltaje a 120 V. Cuando el frente de corrida se acercó al extremo inferior del gel, se desconectó la fuente de poder y se separaron las placas de vidrio con ayuda de una espátula, y el gel se colocó en un recipiente para su tinción con Azul de Coomassie, ácido acético y metanol durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se traspasó el gel a la solución de destinción (ácido acético, metanol y agua), y se dejó reposar durante toda la noche. Una vez que el gel perdió completamente la coloración, se tomaron fotografías.

COPIA ELECTRÓNICA FIDEP

Resultados

Se llevaron a cabo electroforesis sobre muestras de residuos de anchoíta y merluza. En las **Figuras 2** a **5** se muestran los resultados de las corridas electroforéticas.

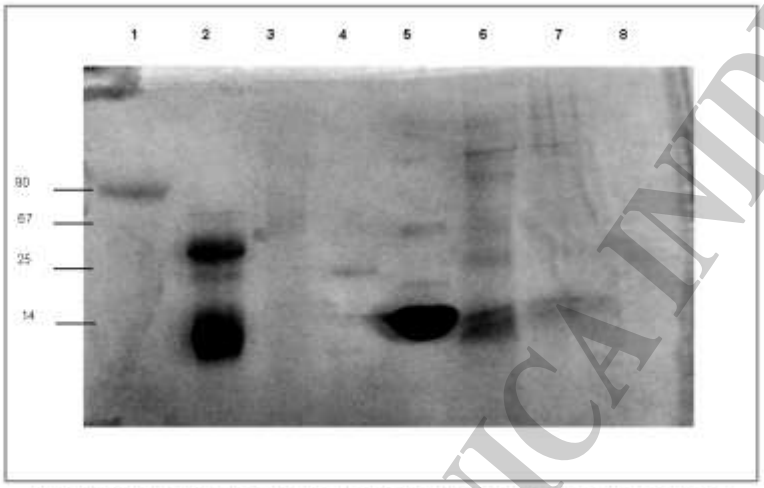

Figura 2. SDS-Page 12 % Homogenato de Anchoita. 1.Pepsina; 2. Papaina; 3. Pancreatina; 4. Tripsina; 5. Lisozima; 6. Homogenato Crudo Anchoita; 7. Precipitacion con Acetona; 8. Sobrenadante

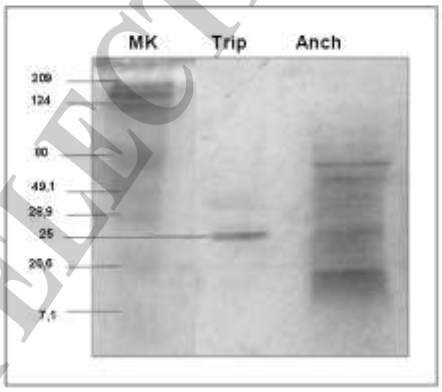

Figura 3: SDS-PAGE 12 %. Homogenato de Anchoita. Mk: marcador peso molecular (kDa). Trip: Tripsina. Anch: Anchoita.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

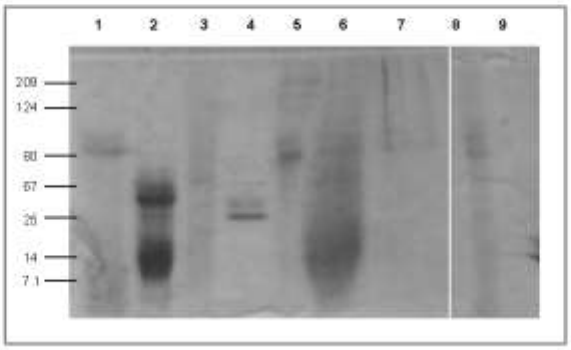

Figura 4. SDS-Page 12 %. Homogenato de Merluza. 1.Pepsina; 2. Papaina; 3. Pancreatina; 4. Tripsina; 5. Peso Molecular; 6. Homogenato Crudo Merluza; 7. Precipitación con TCA/Acetona; 8. Precipitación con Acetona; 9. Sobrenadante

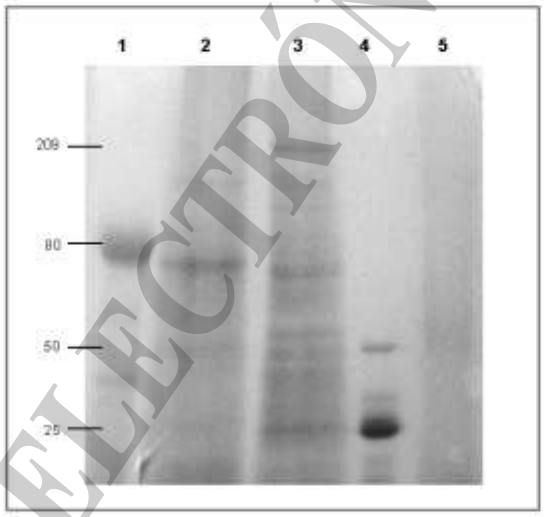

Figura 5. SDS-Page 10 % De Homogenatos. 1.Pepsina; 2.Anchoita. 3. Merluza; 4.Tripsina; 5.Pancreatina. PM en kDa

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

Referencias

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structructural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227:680-685*