

LOCALIZACIÓN Y CAPTURA DE PROTEÍNAS AISLADAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN SISTEMAS DISCONTÍNUOS DE ELECTROLITOS.

Leopoldo Güereca, María Soledad Juárez y Francisco Bolivar.

Instituto de Biotecnología. UNAM. Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. CP 62210, México.

Fax: (777) 3 18 23 88, e-mail: polo@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Electroforesis preparativa, proteínas.

Introducción. La electroforesis en gel de poliacrilamida es una de la técnicas más utilizadas para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Su versatilidad y poder de resolución contrastan con su simplicidad experimental. Para un sistema discontinuo de electrolitos dado, existe una concentración única de monómeros para la cual un componente particular migra apenas separado del frente de migración. Dicho frente incluye obviamente a todos los componentes de movilidad mayor y puede visualizarse incluyendo un colorante. Esta propiedad puede ser aprovechada para eliminar en primera instancia a todos los componentes que migran con el frente, y constituye una forma sencilla de ubicar a la proteína de interés para recuperarla por elución electroforética, separada de las proteínas de movilidad menor, las cuales permanecen en el gel. Por otra parte, la composición de electrolitos del gel separador permite modular la velocidad del frente con el fin de extender la aplicación de esta técnica desde péptidos hasta proteínas de masa molecular elevada, empleando geles de concentraciones moderadas de monómeros.

El objetivo de este trabajo consiste en mostrar la utilidad de esta técnica de localización en la purificación de cantidades del orden de un miligramo de proteína, por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Metodología. Empleando un sistema clásico (1,2), para electroforesis en condiciones desnaturizantes, se estableció el intervalo de concentraciones de monómeros requeridas para la ubicación de proteínas de masa molecular conocida (marcadores de peso molecular) entre 10 y 200 kDa. Se estudió el efecto de la composición de electrolitos del gel separador y la influencia del porcentaje de monómero entrecruzador N,N'-Metilen-bis-acrilamida. A partir de estos resultados se efectuó el aislamiento de la enzima α -amilasa de *B. subtilis*, proteína capaz de recuperar actividad en las condiciones apropiadas. Este mismo sistema, en ausencia de detergente, se ocupó para demostrar la aplicación del método en la purificación de proteínas nativas por electroforesis en condiciones no desnaturizantes. Utilizando una proteína colorida (mioglobina) se ilustra el proceso de concentración de la muestra, resolución del componente de interés, salida del frente y elución del componente de interés, que ocurren durante la electroforesis. También se demostró la validez del método separando péptidos de cianogénolisis de mioglobina, en un sistema para electroforesis en soluciones diluidas de ácido acético desarrollado en nuestro laboratorio (3). La confiabilidad del método de ubicación se estudió en términos de la movilidad relativa de albúmina de suero de bovino empleando geles formados en situaciones diversas.

Resultados y discusión. La eficacia del método propuesto de ubicación y recuperación se ilustra en la figura con el análisis de las fracciones de la purificación de porinas de *E. coli* por electroforesis preparativa (7.5%T, 3%C, pH 8.2) en condiciones desnaturizantes. De la proteína total (carril 2), una parte se elimina con el frente (carril 3). Posteriormente se recuperan fracciones del material eluido (carril 4). La movilidad electroforética de las proteínas complejadas con SDS varía linealmente con la masa molecular, lo cual facilita la planeación de las condiciones de purificación. No obstante que algunas enzimas pueden ser renaturalizadas parcialmente, muchas proteínas se inactivan de manera permanente en presencia de SDS. En la separación de proteínas nativas en condiciones no desnaturizantes, el logaritmo de la movilidad relativa varía linealmente con la concentración de acrilamida expresada como %T.

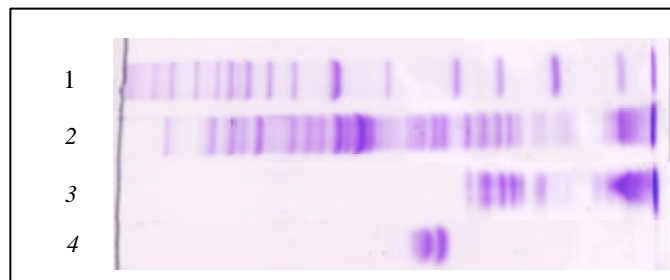


Fig1. Análisis de fracciones de la purificación de porinas de *E. coli* EGPA (Laemmli) 9%T, 3%C.

Conclusiones. Este método es un indicador confiable de la elución electroforética de una proteína particular, siempre que se asegure la calidad de los reactivos y el estado de las soluciones, así como la precisión de las medidas (volúmenes y concentraciones). Su aplicación requiere de un sistema de electrolitos apropiado, y de la polimerización eficiente de los monómeros en las condiciones de dicho sistema.

Bibliografía.

1. Davis, B.J. (1974). Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404-427.
2. Laemmli, U.K.. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680- 685.
3. Güereca L., Juárez, M. S., Bolivar F. (2002). Diseño y aplicaciones de un sistema de electrolitos para electroforesis en medio ácido. *XXV Congreso Latinoamericano de Química*. Sociedad Química de México. Cancún Quintana Roo. México, 22-26 de septiembre, 2002.

