

PRÁCTICA Nº 11:

ELECTROFORÉISIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS

1. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta práctica es separar las proteínas en una muestra de suero mediante la técnica de electroforesis.

2. FUNDAMENTO

Las proteínas son moléculas anfóteras, pueden estar cargadas positiva o negativamente o no estarlo, según el pH del medio en el que se encuentran.

Así pues, cuando el pH del medio que circunda las proteínas es neutro, éstas se comportan como partículas no cargadas; sin embargo, si el pH del medio que las rodea es ácido, las proteínas adquieren una carga eléctrica neta positiva. Y, por el contrario, cuando el pH es básico (o alcalino), las proteínas se cargan negativamente.

En la electroforesis de proteínas séricas, el suero se deposita sobre un soporte empapado en una solución alcalina y se aplica una corriente eléctrica que lo atraviesa.

Como las proteínas, en medio básico, adquieren una carga eléctrica negativa, estas se van desplazando progresivamente hacia el ánodo. A este proceso se le denomina migración de las proteínas.

Pero en el suero hay una gran variedad de proteínas y cada una de ellas adquiere la carga eléctrica negativa de una forma más o menos intensa. Así pues, las más electronegativas avanzan más rápidamente hacia el ánodo y las menos electronegativas lo hacen más lentamente.

Al cabo de un cierto tiempo, las proteínas se agrupan atendiendo a su electronegatividad y, por lo tanto, a su capacidad de migración. Estas agrupaciones proteicas adoptan el aspecto de bandas y reciben el nombre de fracciones.

Si se deja transcurrir la corriente eléctrica durante un tiempo suficiente, se distinguen varias fracciones, separadas unas de otras como consecuencia de su diferente capacidad de migración.

Cuando el soporte utilizado para la electroforesis de proteínas séricas es una tira de acetato de celulosa, en el suero normal se encuentran cinco fracciones proteicas.

Estas fracciones proteicas, ordenadas de mayor a menor movilidad electroforética, son las siguientes:

- Albúmina.
- α_1 globulinas
- α_2 globulinas
- β globulinas
- γ globulinas

Si la muestra es plasma, se distingue una fracción más que corresponde al fibrinógeno y que se sitúa entre las β y las γ globulinas.

La albúmina es una especie molecular simple, pero cada fracción globulínica está formada, a su vez, por numerosas proteínas, cuya separación se realiza por técnicas más específicas.

3. MATERIAL

- Un soporte de electroforesis y, en concreto, tiras de acetato de celulosa.
- Un aplicador de muestra.
- Cubeta de electroforesis.
- Un alimentador o fuente de corriente eléctrica.

- Dos cables de conexión entre el alimentador y la cubeta de electroforesis. El cable negro es para la conexión al cátodo y el cable rojo es para la conexión al ánodo.
- Un espectrofotómetro o/y un fotodensitómetro
- Dos probetas de 100 ml de capacidad.
- Papel de filtro.
- Un vidrio de reloj.
- Tres bateas.
- Una pinza.
- Una placa de vidrio
- Una estufa
- Tubos de ensayo
- Un reloj
- Un agitador rotatorio.

4. **REACTIVOS**

- Una solución tampón, en concreto, una solución de Veronal sódico a una concentración de 0,04 mol/l y un pH de 8,6. Este tampón es utilizado en electroforesis porque no precipita ni desnaturaliza las proteínas.
- Un colorante de proteínas, en concreto, negro Amido.
- Decolorante de negro Amido. Éste ha de prepararse de la siguiente forma:
 - Metanol 47,5 ml
 - Agua..... 47,5 ml
 - Ácido acético..... 5 ml

- Solución transparentadora.
- Deshidratante: metanol.

5. **MUESTRAS**

- Suero recientemente obtenido.

6. **PROCEDIMIENTO**

1. Sumergir las tiras de acetato de celulosa en un exceso de solución tampón (aproximadamente 50 ml/tira) durante 15 minutos como mínimo.
2. Absorber el exceso de tampón de las tiras, situándolas entre dos hojas de papel de filtro.
3. Verter en el interior de la cubeta, la cantidad de tampón suficiente para que los electrodos queden cubiertos.
4. Montar las tiras sobre el puente elegido. Es imprescindible que las tiras queden dispuestas con su cara absorbente (mate) hacia arriba. Para estar seguros de ello, la esquina cortada de las tiras debe estar cercana al analista y hacia su lado derecho.
5. Fijar las tiras al puente.
6. Introducir en la cubeta el puente con las tiras, de forma que los extremos de éstas queden sumergidos en el tampón.
7. Situar al suero del paciente mediante el aplicador sobre el extremo catódico de cada una de las tiras y, aproximadamente, a un cm de su borde libre. Se considera extremo catódico de la tira al extremo de ésta más cercano al cátodo.
El aplicador se carga de muestra tocando suavemente la lámina de suero previamente dispuesta sobre un portaobjetos.

8. Conectar la cubeta al alimentador, usando el cable negro para el cátodo y el rojo para el ánodo. De esta manera, se hace atravesar la corriente eléctrica desde el extremo catódico de las tiras hasta su extremo anódico.
9. Tapar la cubeta y conectar el alimentador a la red eléctrica.
10. Aplicar mediante el alimentador una corriente eléctrica de 200 voltios a las tiras durante 35 o 40 minutos.
11. Transcurrido ese tiempo, desconectar el alimentador de la red eléctrica y de la cubeta.
12. Soltar las tiras del puente.
13. Colorear las tiras, sumergiéndolas en una batea con negro Amido (en proporción de, aproximadamente, 200 ml/tiras) con su cara absorbente hacia abajo unos cinco minutos.
14. Retirar el colorante de las tiras, excepto en los lugares donde éste se ha fijado a las proteínas. Esto se realiza mediante baños sucesivos de las tiras en el decolorante bajo agitación, hasta que se pongan de manifiesto claramente las bandas de proteínas y el fondo sea blanco.

7. LECTURA DE RESULTADOS

Se puede realizar de dos maneras:

- Una, más antigua, consiste en realizar una lectura de los resultados presentes en la tira de electroforesis, tras su decoloración, mediante espectrofotometría. Este método consiste en lo siguiente:
 - Cortar, por separado, cada una de las bandas presentes en cada tira.
 - Depositar cada banda en un tubo de ensayo debidamente rotulado con el nombre de la fracción que se supone que corresponde a esa banda.
 - Añadir 3 ml de un disolvente apropiado a cada uno de los tubos que contienen bandas asignadas a globulinas y 9 ml del mismo disolvente al tubo que contiene la banda atribuida a la albúmina. El disolvente utilizado depende del colorante empleado. En este caso, como se ha empleado negro Amido, se utiliza ácido acético al 80%.
 - Medir la absorbancia de cada una de las soluciones coloreadas, obtenidas previamente mediante un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda comprendida entre los 580 nm y los 620 nm (generalmente a 600 nm), pues el colorante empleado es negro Amido y esta sustancia absorbe bien la luz a esa longitud de onda). La absorbancia de la solución coloreada que corresponde a la albúmina debe multiplicarse por tres, pues está tres veces más diluida que el resto.
 - Calcular el porcentaje que corresponde a cada absorbancia con respecto a la suma de todas ellas. Esto concuerda con el porcentaje que corresponde a cada fracción con respecto al total de proteínas séricas. Por lo que, si se conoce la concentración de proteínas totales en el suero, se puede dar un valor cuantitativo a cada fracción. Esto se hace con la siguiente fórmula:

$$\text{g/dL de cada fracción} = \frac{\% \text{ de cada fracción} \cdot \text{g/dL de proteínas totales}}{100}$$

- Actualmente, la tira de electroforesis es leída mediante fotodensitometría. Para ello se requiere un transparentado previo de la misma y el empleo posterior de un fotodensitómetro.

La tira de electroforesis es transparentada de la siguiente manera:

- Deshidratar la tira, sumergiéndola en un baño de metanol durante un minuto, aproximadamente
- Sumergir la tira en una mezcla de soluciones transparentadoras preparada recientemente. Esto debe hacerse bajo agitación y durante uno o dos minutos.

- Extender la tira sobre una placa de vidrio, de forma que su cara absorbente quede en contacto con el cristal.
Esto debe hacerse procurando que no se formen burbujas de aire, aunque si se forman, pueden ser retiradas con algo parecido a un rodillo.
- Calentar la placa de vidrio en una estufa ajustada a una temperatura entre 60 y 70°C. hasta que la transparencia de la tira sea completa (tres o cuatro minutos)
- Dejar enfriar la tira a temperatura ambiente durante unos 30 minutos.
- Retirar la tira del vidrio.
En vez de calentar la placa de vidrio, también se puede dejar aproximadamente durante una hora a temperatura ambiente hasta que las tiras se suelten.

El fotodensitómetro debe ser ajustado a una longitud de onda apropiada para el colorante empleado en la tinción de las fracciones, así éstas absorberán luz de forma correcta. En este caso, como se ha utilizado negro Amido, se debe seleccionar en el fotodensitómetro una emisión de luz a unos 600 nm.

La tira, convenientemente transparentada, se sitúa en una posición correcta en el fotodensitómetro, y éste efectúa un barrido de las bandas presente en ella con la luz seleccionada previamente. Tras el barrido de las bandas, el fotodensitómetro traza un electroforetograma, conocido, en este caso, como **proteinograma**, en el que cada curva corresponde a una fracción.

El fotodensitómetro también mide el área de la superficie delimitada por cada curva y calcula el porcentaje que corresponde a cada una de ellas con respecto a la suma de todas las áreas.

Además, si con anterioridad se introduce en el fotodensitómetro el valor de la concentración de las proteínas totales, el aparato también incorpora al informe la concentración de cada fracción proteica.

Los porcentajes normales que representan cada una de las fracciones con respecto al valor total de las proteínas contenidas en el suero son, aproximadamente, los siguientes:

- Albúmina:61,0% \pm 4
- α_1 globulinas.....2,5 % \pm 1,5
- α_2 globulinas..... 8,0% \pm 2
- β globulinas.....10,0% \pm 2
- γ globulinas.....16,0% \pm 3,5

En algunas enfermedades, se produce un aumento o/y una disminución en determinadas fracciones proteicas del suero. Estas alteraciones se ponen de manifiesto al realizar una electroforesis de proteínas séricas.