



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Historia, fundamentos y métodos de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

History, fundamentals, and methods of protein electrophoresis in polyacrylamide gels.

García Trejo, José J.<sup>1\*</sup> y Ortega, Raquel<sup>1</sup>.

1. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

\*Correspondencia. Edificio F, Facultad de Química, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacan, CDMX, México.  
CP. 04510 Tel. +52 (55) 56 22 38 99 Ext. 44449 y 44450, [jjgartre@unam.mx](mailto:jjgartre@unam.mx)

---

### Resumen

La electroforesis es una de las técnicas más poderosas en la bioquímica y la biología molecular modernas, dado que permite separar macromoléculas para estudiarlas de manera aislada y definir sus propiedades, funciones y mecanismos en las importantes reacciones biológicas de los seres vivos. En este artículo nos concentraremos en la electroforesis de proteínas. Las funciones biológicas, aunque codificadas en el ADN o ARN en general las llevan a cabo las proteínas en todos los seres vivos, ya sea en forma de enzimas, receptores, transportadores, bombas primarias y secundarias, proteínas estructurales, etc. Es por ello que la electroforesis de proteínas es una técnica tan poderosa, no sólo permite analizar la pureza de una muestra, sino que ayuda a determinar interacciones con otras proteínas, sustratos, ligandos, etc, y además ayuda a determinar los niveles de expresión de las proteínas dentro de las células, lo cual permite definir la relevancia de la función de una proteína dentro de cualquier ser vivo. Por todas estas razones, la electroforesis de proteínas se revisará en su historia y fundamentos, así como los protocolos más comunes para su uso en los laboratorios ya sean de investigación, biomédicos, farmacéuticos, biotecnológicos o clínicos.

*Palabras claves:* Proteína, electroforesis, gel, poliacrilamida, PAGE.

### Abstract

Electrophoresis is one of the most powerful techniques in modern biochemistry and molecular biology, since it allows the separation of macromolecules to study them in isolation and define their properties, functions and mechanisms in the important biological reactions of living beings. In this article we will focus on protein electrophoresis. The biological functions, although encoded in DNA or RNA in general, are carried out by proteins in all living beings, either in the form of enzymes, receptors, transporters, primary and secondary pumps, structural proteins, etc. That is why protein electrophoresis is such a powerful technique, that does not only allows to analyze the purity of a sample, but it helps to determine interactions with other proteins, substrates, ligands, etc., and also helps to determine the expression levels of proteins within cells, which helps in defining the relevance of the function of a protein within any living being. For all these reasons, protein electrophoresis will be reviewed in its history and fundamentals, as well as the most common protocols for its use in the laboratories, either of research, biomedical, pharmaceutical, biotechnological or clinical.

*Keywords:* Protein, electrophoresis, gel, polyacrylamide, PAGE.

---

## Introducción

A diferencia de los sistemas inorgánicos o inertes, los sistemas biológicos son comúnmente muy complicados en el sentido de que su composición molecular es demasiado compleja y heterogénea, dado que las funciones vitales de las células y los organismos requieren de muchas moléculas y macromoléculas funcionando simultáneamente. Por lo tanto, el análisis experimental de los sistemas biológicos en el laboratorio no es nada sencillo pues para analizar sistemas tan complicados, se requiere de dominar, o al menos conocer a fondo los fundamentos y principios de muchas técnicas en el laboratorio. A nivel bioquímico, este análisis se vuelve de muy alta precisión, dado que se tienen que analizar a veces no sólo muestras heterogéneas de mezclas de macromoléculas que son las responsables de las funciones biológicas, sino también muestras de muy alta pureza y homogeneidad a tal grado que su composición es prácticamente de una sola macromolécula biológica. Gracias a esto se pueden realizar estudios de la función y estructura de muchas macromoléculas y saber su papel en alguna ruta metabólica, funciones o disfunciones biológicas asociadas a muchas enfermedades.

En el laboratorio, los ácidos nucleicos son útiles en la biología molecular moderna en técnicas de clonación, subclonación para el análisis de proteínas recombinantes por ejemplo, como se ha discutido en otros capítulos de este *Mensaje Bioquímico* 45 [1], pero en general la mayoría de las funciones biológicas no las realizan los ácidos nucleicos como el ADN o el ARN, sino las encargadas de hacer casi todas las funciones biológicas más vitales e importantes para los seres vivos son las proteínas; y sí, a veces algunos ácidos nucleicos, lípidos o carbohidratos dentro de las macromoléculas más importantes, pero las proteínas son las más versátiles en cuanto a su alta variabilidad en estructura y diversidad de funciones. Por dar algunos ejemplos, las hay desde enzimas en todas las rutas metabólicas, receptores y traductores de señales membranales, nanomotores que producen (ATP sintasas) o consumen (ATPasas) energía química vital en forma de ATP, reguladores de expresión genética, inhibidores enzimáticos y represores genéticos, proteínas estructurales de citoesqueleto, o de flagelos, o de matriz extracelular, proteínas de adhesión o de locomoción, toxinas, hormonas, anticuerpos, proteínas transportadoras de oxígeno o lípidos, cadenas de transporte de electrones respiratorias o fotosintéticas, canales iónicos, transportadores transmembranales o permeasas, chaperonas, proteasas, etc. En este sentido se

puede decir que los ácidos nucleicos como el ADN o el ARN forman parte del “alma” o “espíritu” de las células guardando la información hereditaria, pero de acuerdo al dogma central de la biología molecular, la información biológica pasa de ADN a ARN mensajero y de ahí en la mayoría de los casos a proteína funcional, por lo cual las proteínas son las más diversificadas pues son las que nos hacen a los seres vivos y en nuestro caso, humanos de carne y hueso, y son las que realizan la mayoría del trabajo duro y la gran diversidad de funciones que concertadas forman una célula viva, un virus o un organismo complejo y funcional.

Por lo tanto, para poder estudiar a fondo a los sistemas biológicos, los bioquímicos y/o biólogos moleculares debemos dominar o conocer a fondo muchas de las técnicas para el análisis de las macromoléculas, y en este artículo nos concentraremos en las proteínas dado que son las más versátiles. Dentro de estas técnicas que tenemos que dominar en el laboratorio se encuentran por ejemplo la determinación de concentración de proteínas en una muestra, las determinaciones cuantitativas o semicuantitativas de análisis bioquímicos en la microbiología clínica, las determinaciones de concentración de anticuerpos específicos en el suero, las medidas de concentración de metabolitos en una muestra, las determinaciones del contenido de ácidos grasos o de ADN o ARN en una muestra biológica, las determinaciones de actividades enzimáticas, etc.

Para poder estudiar proteínas purificadas, se describen también en este mismo volumen del *Mensaje Bioquímico* 45 [1] las técnicas de purificación de proteínas como una mezcla de técnicas de precipitación diferencial, ultrafiltración, ultracentrifugación, cromatografía líquida, etc. Una vez que está relativamente pura una proteína, se puede entonces proceder a las técnicas más sofisticadas como microscopía electrónica, la difracción por rayos X de proteínas y ácidos nucleicos, la resonancia magnética nuclear de proteínas (RMN), el dicroísmo circular, etc.

## Un poco de historia

Los dos autores de este trabajo llegamos a trabajar en los laboratorios de la Dra. Marietta Tuena Sangri y del Dr. Armando Gómez Puyou<sup>†</sup>, ambos Investigadores Eméritos de la UNAM, y a este último uno de nosotros (José J. García-Trejo), cuando era su alumno de posgrado, le preguntó cuál en su opinión sería la técnica más poderosa del laboratorio en la bioquímica. En ese tiempo, la

respuesta esperada podría haber sido las poderosas técnicas de RMN, la cristalografía de proteínas, o la microscopía electrónica (ME, ahora crio-ME, o criomicroscopía electrónica que ya es tan, o más poderosa que la cristalografía de proteínas) debido a su auge, cualquiera de ellas podría ser la técnica más poderosa. Sin embargo, -y contrario a lo esperado-, el Dr. Gómez-Puyou sin pensarlo mucho contestó que para él, la técnica más poderosa en la bioquímica era la **Electroforesis de Proteínas**. La opinión del Dr. Gómez Puyou, no es cualquiera, dado que es uno de los científicos más prominentes y brillantes que ha dado México y la UNAM al mundo. Por lo tanto la pregunta obvia fue: ¿porqué para él la electroforesis de proteínas sería más poderosa que la cristalografía de proteínas, o la RMN, o la ME? La respuesta del Dr. Gómez-Puyou fue muy espontánea:

“José, piénselo, imagínese los laboratorios de investigación en el siglo XIX, en los años 30’s a 60’s, las muestras biológicas eran unas mezclas invisibles de composición incierta, y purificar una proteína era un proceso a ciegas, era literalmente dar “palos de ciego”, pues se obtenían fracciones que tenían la función biológica o bioquímica en estudio, pero nunca se tenía la certeza de qué tan pura estaba su proteína, o si contenía muchos o pocos contaminantes, los cuales podrían o no contribuir a la función o reacción biológica o bioquímica en estudio. En resumen las ciencias biológicas, y en particular la bioquímica y la biología molecular se dividen en “antes” y “después” de la **Electroforesis de Proteínas**”.

Ese día entendí la gran importancia y poder de la electroforesis de proteínas, pensar que desde Gregor Mendel y Charles Darwin, pasando por Fritz Lipmann, Hans Krebs, Max Perutz, Linus Pauling, Rosalind Franklin, Peter Mitchel y Paul D. Boyer, entre otros, todos ellos (excepto injustamente Rosalind Franklin) premios Nobel de Química, hicieron sus descubrimientos “a ciegas” sin tener disponibles las técnicas de electroforesis actuales, eso me sorprendió tanto que desde ese día los admiré todavía más de lo que ya los admiraba. Uno como estudiante piensa que la electroforesis de proteínas nació y creció en paralelo con la bioquímica de inicios del siglo pasado, pero la verdad es que no fue hasta 1970 que el protocolo más usado en la electroforesis de proteínas actual fue publicado por U.K. Laemmli [2], antes de 1970 todo lo demás se descubrió relativamente a ciegas. También me sorprendió mucho que cuando el Dr. Gómez Puyou me abrió la mente a la maravillosa técnica de la electroforesis de proteínas, caí en la cuenta de que yo nunca había hecho ni un solo gel de electroforesis de

proteínas en su laboratorio, de tal modo que me sentí tan ignorante y apenado que acto seguido ese mismo día me dí a la tarea de ir a la biblioteca (costumbre inexistente ahora) y leer los artículos originales de Electroforesis de Proteínas de Laemmli [2] y Schägger & Von Jagow [3] que son las técnicas de mayor uso y utilidad en la Bioquímica y Biología molecular actual. Tenía que conocer bien la técnica antes de poder hacer un gel, buen hábito que tristemente ahora está en desuso. Para revertir este efecto de no-lectura, en este artículo se citan, se resumen y se invita a los lectores a leer los artículos originales, y evitar otras fuentes de origen incierto.

A lo largo de esta revisión veremos que las aplicaciones de la Electroforesis en Gel de Proteínas no se limitan solamente a determinar el grado de pureza de una proteína, sino que si se aplican bien las técnicas de Electroforesis de Proteínas se pueden resolver subunidades componentes de complejos multiproteicos, interacciones proteína-proteína, cuantificación del contenido de alguna proteína en una muestra, estimación de los niveles de expresión de una proteína en una célula, asociaciones y actividad de enzimas en geles nativos, purificación de proteínas en geles preparativos, interacciones proteína-ligando, y entre muchas otras aplicaciones, más recientemente se ha desarrollado la famosa Proteómica que se basa en geles de dos dimensiones para determinar los niveles de expresión de varias proteínas en una célula o muestra biológica en diferentes condiciones de crecimiento o de estrés, asociado o no a enfermedades de gran importancia. Hoy en día, algunas aplicaciones de la electroforesis de proteínas, pueden ser definitivas en el laboratorio clínico por ejemplo, para el diagnóstico de algunas enfermedades relacionadas con proteínas del suero, o en la determinación la relación o cociente LDL/HDL. En este último caso por ejemplo en algunos laboratorios clínicos la electroforesis de proteínas ya se ofrece como un estudio en particular para la determinación de proteínas o cocientes de contenido de proteínas en sangre. Sin embargo, la aplicación más frecuente de la electroforesis de proteínas es en la definición del grado de pureza de una proteína en particular ya sea para uso en investigación o en análisis clínicos, así como estudios mas finos de interacciones o niveles de expresión de las proteínas de interés en estudio.

Dado que la electroforesis es una de las técnicas más poderosas para análisis de proteínas y de ADN o ARN en el laboratorio, repasaremos primero algo de la historia y fundamentos de esta importante técnica del laboratorio. Nos concentraremos específicamente en la electroforesis de proteínas dado que es

primordial para las ciencias biológicas básicas, y aplicaciones bioquímicas, biomédicas y biotecnológicas actuales. Por lo tanto no se desarrollará el tema ni los métodos de la electroforesis de ácidos nucleicos como el ADN o el ARN en agarosa dado que, como se mencionó, ese tema se revisará en otro artículo y conferencia en línea de TAB XLVIII y este *Mensaje Bioquímico* 45 [1].

El término de electroforesis proviene de dos palabras griegas, *Elektro* que significa “electricidad” y *Phoros* que significa “movimiento”. Se trata de una técnica de separación de partículas basada en la velocidad diferencial de migración que se observa en las moléculas y partículas con cargas o neutras dispuestas en un medio acuoso, debido a la atracción y/o repulsión que sufren en un campo eléctrico, causando su movimiento a través de una matriz.

La técnica se ha venido mejorando de manera progresiva hasta convertirse en indispensable para el desarrollo actual de la bioquímica y biología molecular y en la purificación analítica de proteínas y ácidos nucleicos.

Establecer los inicios históricos de un desarrollo científico es un poco difícil ya que tendríamos que remontarnos hasta 1791, momento en el que Faraday enuncia las leyes de electrólisis, o a 1809 con Alexander Reuss, el primero en realizar lo que se considera la primera electroforesis. Colocó dos tubos de fondo abierto de vidrio llenos de agua en una loseta de arcilla húmeda, con mucho cuidado depositó arena en el fondo de cada tubo y conectó los tubos a una batería. El agua al final del tubo conectado al polo positivo de la batería se tornó lechosa conforme las partículas de arcilla migraban a través de la arena y posteriormente Hermann von Helmholtz generalizaría las observaciones experimentales mediante una ecuación electroforética en 1879 [4].

Cabe mencionar que durante el siglo XIX se llevaron a cabo aportaciones teóricas y prácticas que sentaron las bases para el posterior desarrollo de la técnica. Esta época ha sido considerada por algunos historiadores como oscura, sin embargo, esto parece excesivo ya que dió lugar al nacimiento de conceptos y técnicas que tuvieron mucha importancia en el desarrollo de la naciente Bioquímica y posteriormente de la Biología Molecular.

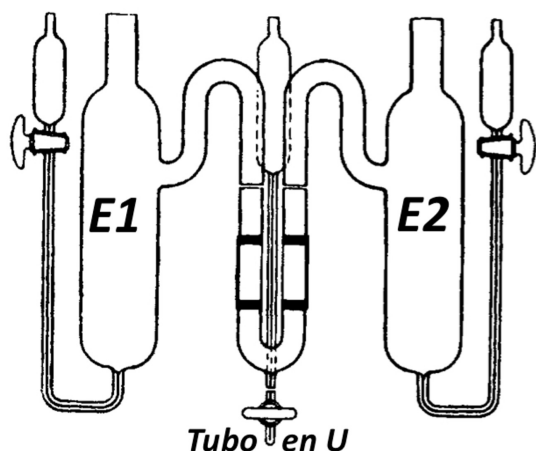
En 1926, Theodor Svedberg (Suecia) fue galardonado con el premio Nobel de química por sus estudios en la química de los coloides. Para

conseguir la precipitación de las partículas coloidales (proteínas), Svedberg tuvo que construir una ultracentrífuga, diseñada por él mismo, sus primeros modelos podían alcanzar por encima de las 30,000 rotaciones por minuto (rpm, velocidad que producía una aceleración varios miles de veces superior a la de la gravedad), siendo considerado por ello el pionero de la técnica de la ultracentrifugación, de reconocida utilidad en la separación de macromoléculas y numerosas sustancias de interés bioquímico [4]. Actualmente las ultracentrífugas siguen siendo muy útiles y las de mayor velocidad alcanzan velocidades de 120,000 rpm o probablemente mayores.

Svedberg logró determinar con precisión los pesos moleculares de proteínas altamente complejas como la hemoglobina. En esa época, Svedberg le propuso a un joven químico, estudiante de su laboratorio, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius trabajar en electroforesis de proteínas analizando su migración mediante la técnica de frente móvil, utilizando sistemas ópticos de detección análogos a los que a él le habían proporcionado tantos éxitos en centrifugación. Como resultado de este trabajo tan arduo en 1930 Tiselius publicó su tesis de Doctorado: “El método del frente móvil en el estudio de electroforesis de proteínas” en la que presentaba una nueva técnica para examinar algunas propiedades físico-químicas de estas macromoléculas. Los experimentos los llevó a cabo en un tubo de cuarzo en forma de U en cuyo interior las proteínas ionizadas se movían libremente y sus frentes de avance se detectaban y fotografiaban utilizando luz ultravioleta, empleando los conocimientos sobre fotografía de estrías de August Toepler (complejo método de detección óptico) [4]. Sin embargo, la técnica presentaba inicialmente dos problemas: Uno de los problemas que tenía era la pérdida de resolución de los frentes de proteína debido a la convección térmica causada por el calentamiento eléctrico de la solución y dos la dificultad de aislamiento de las partículas que no tenían una velocidad de migración muy elevada. Estos problemas serían solucionados tras la estancia de post-doctorado de Tiselius en el laboratorio de S.A. Taylor en Princeton, donde entró en conversaciones con miembros del Instituto Rockefeller. A su regreso en 1937, Tiselius logró reducir este efecto introduciendo una celda electroforética con una sección rectangular en un recipiente a 4°C, donde el agua tiene su máxima densidad. Esta mejora hizo de la electroforesis de frente móvil un método analítico de cierta precisión. Así, Tiselius fue capaz de describir cuatro frentes móviles en el análisis de suero correspondientes a la albúmina, a la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas. Además, vio que esta última aumentaba

después de infección e inmunización. Debido a su gran contribución en el desarrollo de la técnica de electroforesis y por la importancia de su descubrimiento sobre la naturaleza compleja de las proteínas del suero, Arne Tiselius recibió el Premio Nobel en 1948 [4].

Sin embargo, la técnica de electroforesis de frente móvil tenía serias limitaciones: mezcla de los componentes por diferencias de densidad, difusión de las sustancias tras desconectar la corriente y otros problemas relacionados con el diseño de los tubos en forma de U (ver Figura 1). Esto hizo que la técnica fuera quedando en desuso (Tiselius 1937 [5,6]).



**Figura 1. Aparato de electroforesis de proteínas de Tiselius.** E1 y E2 corresponden a los electrodos del ánodo y el cátodo del aparato. En medio se muestra el tubo en U donde se cargaban las muestras por medio de una válvula de inyección en la parte inferior del tubo en U. Las proteínas migraban de acuerdo a sus cargas en el campo eléctrico a lo largo del tubo en U en fase líquida, y posteriormente se añadió una fase sólida para mejorar el procedimiento. Modificado de Tiselius, 1937 [6].

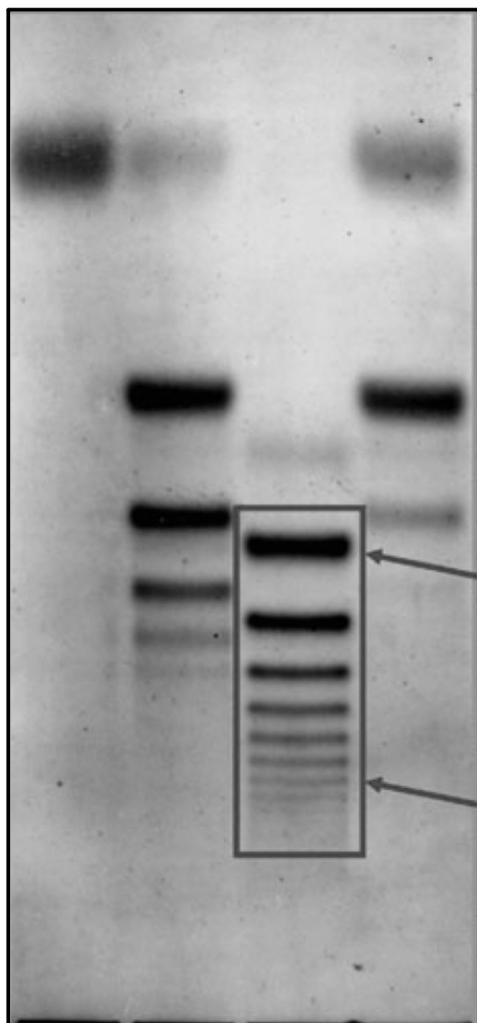
En 1950 Haglund y Tiselius trabajaron para luchar contra las corrientes de convección y diseñaron un aparato preparativo en el cual la electroforesis se llevaba a cabo en un tubo vertical lleno de esferitas de vidrio para contrarrestar la convección. El método fue mejorando por Flodin y Kupke sustituyendo las bolitas de vidrio por celulosa tratada con etanol. De esta forma se conseguía la estabilización frente a la convección suprimiendo muy eficazmente la electroendosmosis y la adsorción de las proteínas [4].

La inclusión de una matriz sólida, además de la fase líquida, permitió agregar un nuevo punto de separación y versatilidad en la electroforesis. Esto provocó que se buscaran soportes más adecuados que permitieran la separación de proteínas, anteriormente

se habían utilizado geles de gelatina y agar, pero esto fue muy limitado dado que al calentarse se fundían. En 1955, Smithies [7-9] fue el primero en utilizar geles de almidón para la separación de proteínas (Figura 2). Estos geles aumentaron significativamente la resolución alcanzada con el papel en la separación de proteínas de suero [4].

Sin embargo, seguían existiendo inconvenientes y uno era la baja reproducibilidad de los experimentos debido a la imposibilidad de controlar el tamaño del poro de los geles ya que esto era fundamental para la separación de las proteínas (Smithies, 1955. [7-9]). Más adelante se empezaron a emplear diferentes tipos de geles como los de dextrano granulado por Flodin en electroforesis de zona. Kohn en 1957 empleó como soporte acetato de celulosa [4]. En 1961 Stellan Hjerten [10] usó agarosa, creada por la eliminación del componente con azufre cargado del agar, como soporte y también empleó éstos para separar moléculas de bajo peso molecular y proteínas coloreadas y pudo ver que éstas se desplazaban más lentamente. Ello llevó al descubrimiento más adelante del denominado Sephadex y que resultó tan importante en el desarrollo de la cromatografía.

Era imprescindible encontrar un soporte que ayudara a controlar el tamaño del poro. Y fue Hjerten quien utilizó geles a base de poli(acrilamida) y vio que se podía controlar el poro. Desafortunadamente, fueron Raymond y Weintraub en 1959 [11], y Davis y Ornstein, 1959 [12] quienes publicaran el uso de este polímero en la electroforesis de zona con geles de poli(acrilamida). Demostraron que podrían controlar la variación del tamaño del poro en el gel, y así aumentar la resolución de iones en función de diferencias dimensionales y concentrar los iones de la muestra en una zona estrecha antes de realizar la separación electroforética como soporte para electroforesis [13]. Para visualizar las proteínas en el gel después de la electroforesis se utilizó inicialmente Negro Amido, que fue rápidamente sustituido por el Azul Brillante de Coomassie, ya que el Negro de Amido presentaba menores límites de detección para proteínas [4].



**Figura 2. Primer gel de electroforesis de proteínas vertical en matriz de almidón.** Previo a estos geles verticales, las electroforesis se realizaban inicialmente en papel en una versión de electroforesis horizontal, pero se perdía la consistencia de las bandas por difusión. En la matriz de almidón se obtuvo por primera vez por Smithies la resolución de isoformas o variantes de la haptalbúmina en el carril central que se encierra en un rectángulo vertical. Las flechas indican las variantes de la haptalbúmina humana que se lograron separar. Figura modificada de la referencia [4].

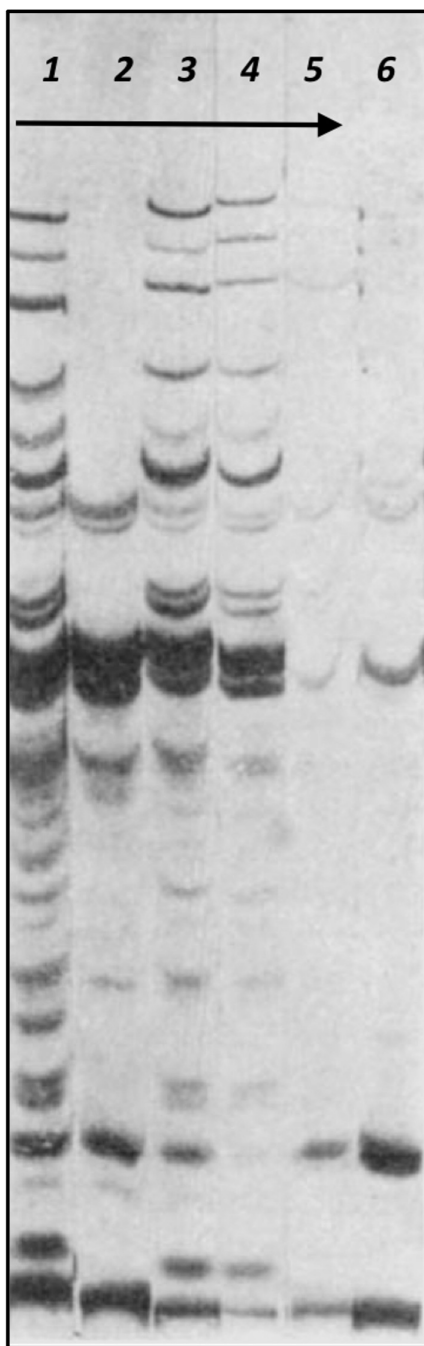
En 1967 Shapiro, Viñuela y Maizel [14] publicaron un importante trabajo que describía la relación que existe entre la movilidad electroforética de las proteínas en un gel (homogéneo) de poliacrilamida en presencia del detergente iónico dodecil sulfato sódico (SDS) y el peso molecular. Comprobaron que la movilidad electroforética del complejo proteína-SDS era lineal, y que disminuía en función del logaritmo del peso molecular de las proteínas. Esta técnica se sigue empleando actualmente para determinar la pureza de una proteína y su tamaño molecular en condiciones desnaturizantes. En la electroforesis en condiciones

nativas, si se hacen estudios a diferentes concentraciones de gel, también es posible obtener una relación entre el coeficiente de retardo de una proteína y su peso molecular [14].

Después de varias estandarizaciones, finalmente en 1970, Laemmli [2] publicó su famoso protocolo en geles de poliacrilamida que es el método más utilizado y más citado desde entonces y en la actualidad, debido a varias ventajas que se detallan a continuación. El artículo original se publicó en la revista *Nature* [2] cuando Laemmli estaba estudiando la proteólisis limitada del fago T4, y para ello la técnica de desarrollo de electroforesis fue crucial para resolver los fragmento de proteólisis limitada obtenidos del virus (Figura 3).

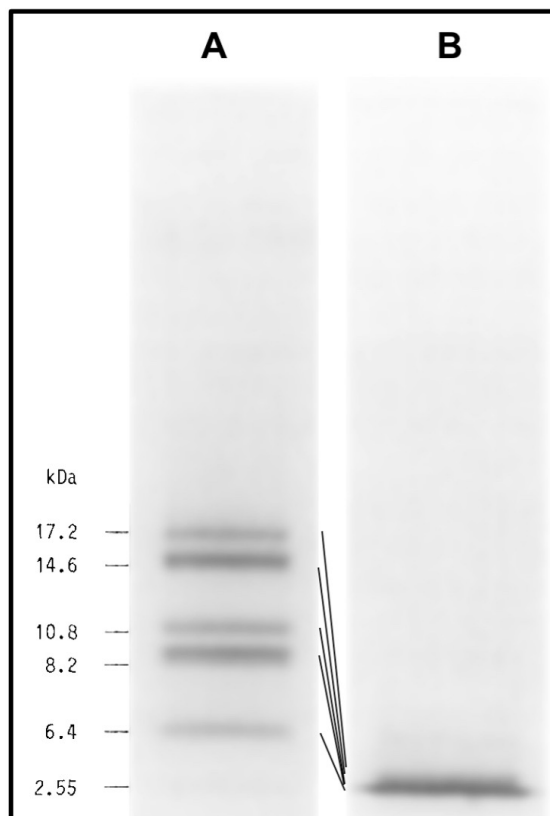
La revista *Nature* reporta para este artículo un número de citas > 52,000 hasta el mes de Junio del 2021, esto podría hacer de este artículo el más citado en Bioquímica, dado que comparativamente, por ejemplo uno de los artículos más citados es el del método de Lowry y cols., para determinar la concentración de proteínas en el *Journal of Biological Chemistry* [15], del cual hablaremos enseguida en la sección de *Métodos* de esta revisión, y este artículo de Lowry y cols. [15], fue publicado unos veinte años antes del de Laemmli [2] y aunque el de Lowry y cols., que se considera uno de los más citados, el *J. Biol. Chem.*, la revista, reporta  $\approx 10,800$  citas en todos los índices de citas hasta el mes de Junio del 2021. En resumen el artículo de Laemmli [2] está citado aproximadamente 5 veces más que el famoso artículo de Lowry y cols. [15]. Esto habla del gran impacto de las técnicas de electroforesis en poliacrilamida que ha tenido en la bioquímica y biología molecular modernas.

Estadísticamente, sin descartar que hay otros métodos muy útiles a parte del de Lowry para medir proteína de los cuales se recomendarán algunos en este artículo más adelante, esto también sugiere que muy probablemente, y lamentablemente, hay muchos artículos en donde hacen experimentos de electroforesis de proteínas, sin medirle, como debería de ser, la concentración de proteína a las muestras, lo cual es un mal hábito porque en teoría no se debería cargar un gel sin saber la cantidad de proteína que se cargó en cada carril del mismo. A este respecto, a continuación se recomiendan algunos métodos de determinación de proteína útiles para no cargar los geles de proteínas “a ciegas” sin medirle la concentración de proteína a las muestras a cargar en el gel.



**Figura 3. Primeros gels de poliacrilamida separando a las proteínas del bacteriófago T4.** La imagen muestra la primera figura modificada del artículo original de Laemmli [2], donde cada número corresponde a un gel de electroforesis vertical corrido en formato cilíndrico (cada número no corresponde a un carril si no a un gel vertical cilíndrico). Las proteínas se marcaron con  $C^{14}$  de tal manera que se muestra el revelado por autoradiografía (incubación de los gels con una placa autoradiográfica). Del gel 1 al 5 se muestran los grados de purificación de diferentes preparaciones del fago T4 llegando a los denominados “fantasmas de fagos” que contienen menos proteínas que son sólo de la cápside, sin el ADN y otras proteínas del fago. El gel 6 contiene fagos con un marcaje con un pulso corto de  $C^{14}$ . Imagen modificada de Laemmli [2].

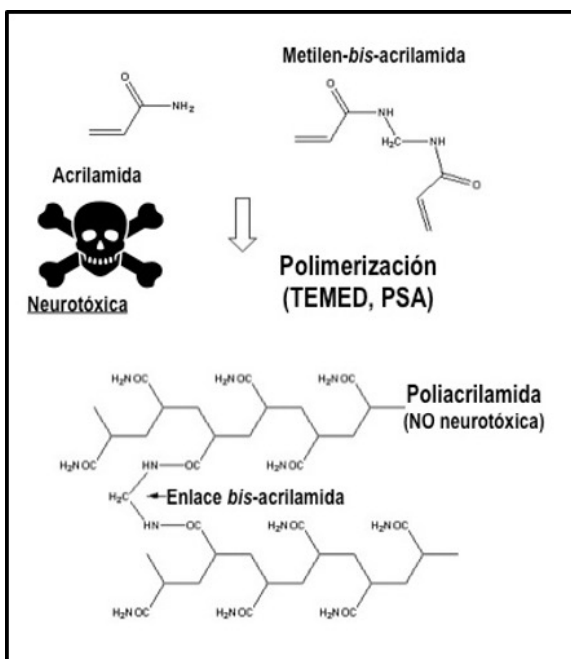
Finalmente, un método electroforético de mayor resolución en proteínas de bajo peso molecular se hizo muy popular y se usa mucho actualmente dado que puede resolver proteínas muy pequeñas o péptidos de mejor manera que los gels tipo Laemmli [2]. Estos gels los publicaron el grupo de Schägger y Von Jagow [3], con algunas modificaciones a los gels Laemmli sobre todo en el amortiguador del gel separador que proporciona mayor viscosidad y separación en la parte baja de los gels donde se separan las proteínas más pequeñas. Una comparación de estos gels de Schägger y Von Jagow [3] con los Laemmli [2] se muestra en la Figura 4. En esta imagen se puede ver claramente que los gels de tipo Laemmli tienen poca resolución en la parte inferior de los gels donde se aglomeran las proteínas de bajo peso molecular (Figura 4B), mientras que los gels tipo Schägger & Von Jagow separan mejor a las proteínas en este intervalo de pesos menores a 20 kDa.



**Figura 4. Mejor separación de proteínas de bajo peso molecular en gels tipo Schägger & Von Jagow.** En ambos gels A y B se cargó la misma muestra en cantidad y composición con una mezcla de proteínas pequeñas de 6-17kDa, se observa una mejor separación en los gels tipo Schägger & Von Jagow (A) que en los tipo Laemmli (B). Figura modificada de la referencia [2].

## Fundamentos y principios básicos de los geles de poli(acrilamida) para la separación de proteínas

Como probablemente ya habrán leído pero vale la pena recordar, los geles de poli(acrilamida) se forman por enlaces covalentes entre monómeros de acrilamida que es neurotóxica y cancerígena, y su entrecruzamiento con *N,N'*-metilen-bis-acrilamida. Esto se muestra en la Figura 5. Cabe mencionar que una vez polimerizada, la poli(acrilamida) que forma el gel ya no es neurotóxica ni cancerígena, pero hay que tener precaución de evitar contacto directo con el polvo o solución del monómero de la acrilamida, por lo cual siempre se deben polimerizar los geles con guantes, bata, y de preferencia con cubrebocas y goggles o careta para evitar el contacto con la piel y los ojos (ver Figura 5).



**Figura 5. Polimerización de la acrilamida para formar el gel.** La acrilamida polimeriza por el catalizador TEMED y el iniciador persulfato de amonio (PSA). La *N,N'*-metileno-bis-acrilamida entrecruza a los polímeros de acrilamida. Se forma una malla cuyo diámetro de poro es determinado por la concentración de acrilamida/*bis*-acrilamida.

Colateralmente, y como medida de precaución, cabe mencionar que algunos alimentos que contienen almidón al freirse en aceite o tostarse producen acrilamida monomérica. La acrilamida se forma a altas temperaturas ( $\geq 120$  °C) por una forma de la reacción de Maillard donde los carbohidratos como la glucosa reaccionan con la asparagina, lo cual sintetiza acrilamida. Esta reacción se favorece en ambientes deshidratados. Los alimentos que contienen almidón o azúcares y proteínas y forman

acrilamida después de freirse o tostarse incluyen las papas fritas, en todas sus formas y presentaciones, lo cual implica que seguramente el camote frito, y el plátano frito, además del pan tostado, las galletas y los pasteles, y tristemente también el café, pero este último sobre todo en su forma soluble. Así que hay que evitar consumir todos estos alimentos en grandes cantidades para evitar la ingesta de acrilamida monomérica, neurotóxica y cancerígena.

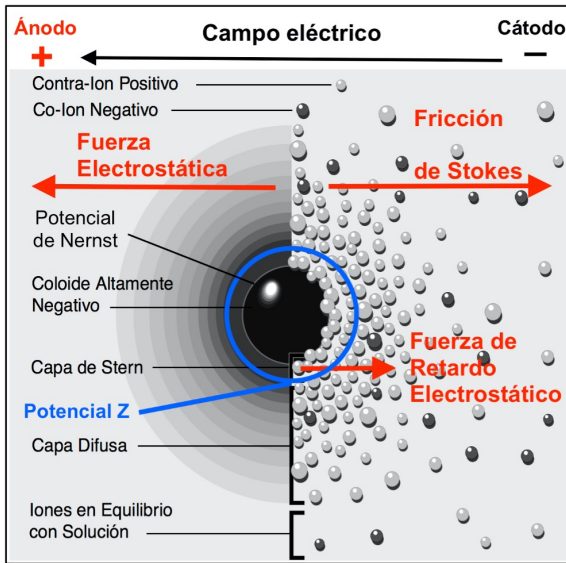
Volviendo a los geles, la polimerización de la acrilamida se realiza por el catalizador tetrametilendiamina (TEMED) y el iniciador persulfato de amonio (PSA), de preferencia a temperatura ambiente dado que las bajas temperaturas inhiben la polimerización. A mayor concentración de la mezcla acrilamida/*bis*-acrilamida, menor el tamaño del poro de la red del gel, y por lo tanto habrá menor movilidad de las proteínas mientras mayor sea la concentración de acrilamida/*bis*-acrilamida. Estos geles de poli(acrilamida) se caracterizan por ser desnaturizantes de las proteínas, es decir se les añade en general un detergente iónico fuerte como es el dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual tiene carga negativa y eso además de desnaturizar a las proteínas al abrir su núcleo central hidrofóbico, las envuelve con una capa de cargas negativas en su forma desnaturizada.

No da tiempo ni espacio suficientes para explicar el formalismo completo de la fisicoquímica de la electroforesis de proteínas, pero se puede resumir así: La movilidad electrocinética de una proteína ( $\mu E$ ) (que se asemeja a un coloide negativo, dado que la carga con el detergente SDS es negativa) es definida por Smoluchowski como el cociente entre el potencial zeta, o potencial electrocinético ( $Z$ ), y la constante dieléctrica del medio ( $\epsilon$ ), dividido entre la viscosidad del gel ( $h$ ):

$$\mu E = \epsilon Z/h$$

Es decir, a mayor potencial zeta, mayor movilidad electroforética. El potencial eléctrico de superficie de la proteína se define como potencial de Nernst. El potencial Zeta es el potencial en el límite de la capa de Stern con la zona de fricción de la partícula en el medio. La teoría de Smoluchowski implica que la movilidad eléctrica no depende de la carga neta de la partícula, sino de su densidad de carga superficial que generará un potencial Zeta determinado (Figura 6) [16].

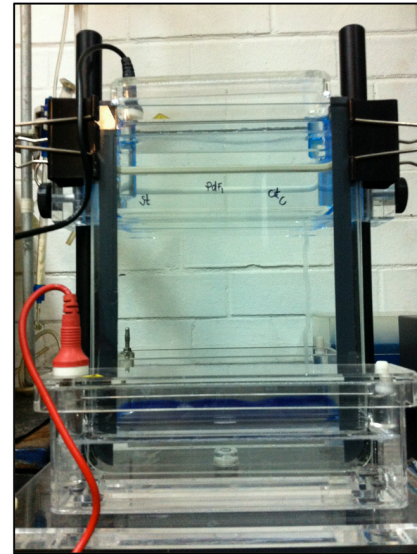
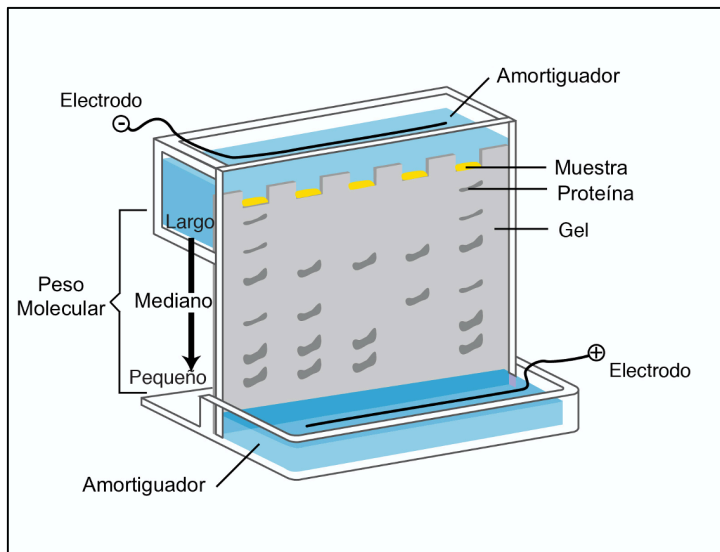




**Figura 6. Fuerzas actuando sobre una proteína en una electroforesis.** El potencial eléctrico en la superficie real de la proteína es el potencial de Nernst. En la frontera de la capa de Stern y la zona de fricción se denomina **potencial Zeta (Z)**. La movilidad electroforética depende de este potencial Z.

El SDS provoca que el potencial Zeta de las partículas proteicas sea *el mismo*, debido a que genera una densidad de carga superficial constante para todas las proteínas. Por tanto, *la movilidad relativa entre diferentes proteínas depende únicamente de la fuerza de fricción, y, por tanto del tamaño de partícula y su peso molecular y de la viscosidad (o porcentaje de acrilamida) del gel*. De acuerdo a la fricción de Stokes, derivada del radio de Stokes de cada proteína, la velocidad de migración será inversamente proporcional al tamaño de la proteína, es decir a mayor peso molecular o mayor viscosidad del gel, menor movilidad relativa.

En la Figura 7 se muestra un esquema con un modelo de una cámara de electroforesis clásica, donde se muestran los reservorios para el electrodo y amortiguador del cátodo (-, suele estar en la parte superior) y el electrodo y amortiguador del ánodo (+, suele estar en la parte inferior) de la cámara de electroforesis. Las muestras se cargan en los pozos y carriles superiores [16].



**Figura 7. Cámara de electroforesis de proteínas.** Izquierda: Dibujo de una cámara estándar de electroforesis. La corriente y potencial eléctrico se establecen verticalmente a lo largo del gel polimerizado entre dos cristales, separando a las proteínas como bandas de diferente peso, las cuales se muestran como si ya se hubiera corrido y teñido el gel. Las proteínas de mayor tamaño migran poco y se retienen en la parte superior del gel, y las de menor tamaño migran más rápido hacia la parte inferior. Derecha: cámara estándar de electroforesis real, llevando a cabo una corrida electroforética desnaturizante tipo Laemmli. Se muestra en rojo el cable de electrodo del ánodo (+) y en negro el del cátodo (-). Se observa el frente de las muestras de gel que contiene el azul de bromofenol en la parte inferior del gel a la altura de la tapa del reservorio inferior del amortiguador del ánodo (+). Estos geles estándar miden aproximadamente 25-30 cm de largo, mientras que los minigeles que se usan más frecuentemente miden aproximadamente 7.5-8.0 cm de largo.

Posterior a la corrida electroforética se necesitan métodos de tinción y desteñido para revelar las bandas de las proteínas separadas en el gel. La

tinción más común es la del azul de Coomassie dado que es un método relativamente económico pues las soluciones de tinción y desteñido se pueden reusar un

par de veces, no más. El otro método útil, cuando la sensibilidad del método de Coomassie no es suficiente pues hay muy poca proteína en los geles, es la tinción por plata. En ambos métodos se destiñe el fondo del gel para remover el colorante del gel y dejar preferentemente el colorante unido a las proteínas. Hay algunos otros métodos con tinciones colorimétricas como el Deep Purple o el Cyber-green que compiten en sensibilidad con la tinción por Coomassie y plata pero son más costosos. Todos estos métodos se resumen en el libro de B. D. Hames con consejos prácticos muy útiles [17].

### Determinación de la concentración total de proteínas en la muestra previo a la electroforesis.

Antes de correr cualquier gel de proteínas, es primordial medir con buena precisión la concentración de las proteínas ([proteína]) en la muestra que se va a usar para la electroforesis (Diagrama 1). Se recomiendan los métodos de Lowry [15] o el mismo modificado por previa precipitación con ácido tricloroacético (TCA) de Peterson [18]. Este último tiene la ventaja de que elimina moléculas que pueden interferir con la determinación colorimétrica de las proteínas, aunque se puede usar cualquier otro método, por ejemplo el del Ácido

Bicinconínico (BCA) o el de Bradford. En cualquier caso debe obtenerse una curva estándar lineal con coeficiente de correlación  $> 0.9$  para poder confiar en la determinación de la [proteína] en la muestra. Conociendo la [proteína] se pueden cargar las muestras calculando por el volumen de carga, la cantidad precisa de proteína en cada muestra y por lo tanto en cada carril del gel. No determinar la [proteína] de las muestras puede llevar a sobrecargar o subcargar el gel. Cuando se sobrecarga un carril con demasiada proteína se distorsiona la corrida de ese carril y la de los carriles vecinos, y las bandas no se separan bien. Al contrario, si se carga muy poca proteína en un carril, pueden no poderse detectar las proteínas de interés. Ambos casos se evitan al medir la [proteína] de las muestras.

En algunos geles es necesario cargar la misma cantidad de proteína en todos los carriles, esto es sólo posible si se realiza la previa determinación de la [proteína] de cada muestra. Sólo en los casos de geles urgentes que no precisan de conocer la [proteína] se pueden correr si medirla.

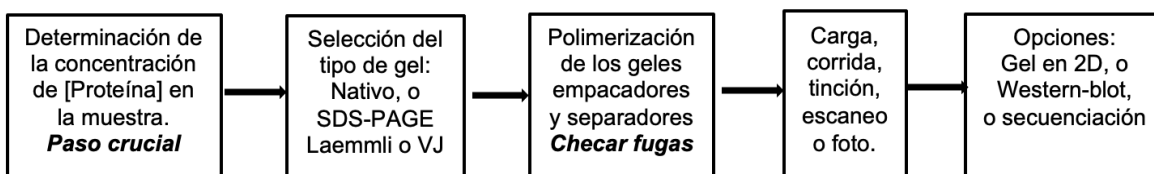


Diagrama 1. Procedimiento general para la electroforesis de proteínas:

### Métodos más comunes para separar electroforéticamente proteínas en geles de poliacrilamida: Laemmli y Schägger & Von Jagow

En todos los geles actuales de proteínas, salvo casos excepcionales que así lo requieran, se debe polimerizar primero el gel separador en la parte inferior del gel, y luego encima de éste se polimeriza un gel empacador que concentra a las proteínas de las muestras en una sola banda y así se garantiza que todas las proteínas de las muestras arranquen su migración electroforética desde un mismo lugar que es el inicio del gel separador.

Actualmente se corren en su mayoría mini geles dado que se ahorra así mucha acrilamida y muestras de proteína, y corren relativamente rápido en  $\approx 1-2$  horas; mientras que los geles originales o estándar

(como el de la Figura 7) son de mayor tamaño y se tardan de 12-24 horas en correr. Sólo cuando se requiere una mayor separación o cargar cantidades mayores a 100-200  $\mu\text{g}$  de proteína por carril se realizarán geles de tamaño estándar, de lo contrario con los mini geles es suficiente. Se debe probar primero con agua que no haya fugas entre los cristales y la base inferior de goma donde se polimerizará el gel para evitar derrames de la acrilamida monomérica en solución dado que es neurotóxica. Una vez comprobado que no hay fugas se procede a polimerizar los geles con sus componentes completos de amortiguador, acrilamida/bis, TEMED y persulfato de amonio (PSA, preparado fresco o congelado y descongelado 1-4 veces). La polimerización se lleva unos 20 minutos por cada gel separador y concentrador a temperatura ambiente, se debe evitar el frío que inhibe la polimerización.

A continuación se detallan algunos protocolos útiles para los métodos más comunes de Laemmli [2] ó de Schagger & Von Jagow [3] calculados a partir de los artículos originales.

- El gel corre en promedio a 120V. El tiempo aproximado de corrida es de  $\approx 1$  h.
- Usar agua desionizada (Milli-Q) en todos los amortiguadores para evitar sobrecalentamiento.

1. Mini geles tipo Laemmli o en amortiguador de Tris/Glicina

Este protocolo se derivó de la referencia original de Laemmli del 1970 [2].

Amortiguador para gel separador (4X)  
100mL pH 8.8

Tris 18.17 g  
SDS 10% 4 mL

Amortiguador para gel concentrador (4X)  
100mL pH 6.8

Tris 6.06 g  
SDS 10% 4 mL

Amortiguador de muestra  
10mL

Glicerol 1 mL  
SDS 10% 2 mL  
Azul de bromofenol 2 mg  
Amortiguador concentrador 1.25 mL  
 $\beta$ -mercaptoetanol 20  $\mu$ L

Amortiguador de corrida (1X, IL)

Tris 3 g  
Glicina 14.4 g  
SDS 1 g

Preparación de un minigel tipo Laemmli

	Separador 15%	Concentrador 4%
ABmix 30%	3 mL	0.54 mL
Amortiguador 4X	1.5 mL	1.0 mL
H <sub>2</sub> O	1.5 mL	2.46 mL
TEMED	6 $\mu$ L	4 $\mu$ L
PSA 10%	60 $\mu$ L	40 $\mu$ L

**NOTA: Pasos cruciales.**

- ABmix Se refiere a la mezcla de Acrilamida/bis-acrilamida y su porcentaje (p/v).
- Antes de cargarse las muestras, deben hervirse bien tapadas herméticamente durante al 2-5 minutos para desnaturalizar bien a las proteínas.

2. Mini geles de Schagger & Von Jagow o en amortiguador de Tris/Tricina

Amortiguador gel (3X)  
100mL pH 8.45

Tris 3 M 36.34 g  
SDS 0.3% 0.9 g

Amortiguador de carga  
10 mL

	Amortiguador gel	Concentración final
Amortiguador gel	1.25 mL	
SDS (10%)	1.0 mL	1.0%
Glicerol	1.5 mL	15%
DTT (1M)	10 $\mu$ L	1 mM
Azul de bromofenol	2 mg	

Amortiguador superior cátodo  
1L pH 8.25

Tris 12.11 g 0.1M  
Tricina 17.93 g 0.1M  
SDS 1 g 0.1%

Amortiguador inferior ánodo  
1L pH 8,93

Tris- HCl 24.06g 0.2M

Preparación del mini gel

	Separador 16%	Concentrador 4%
ABmix 30%	3.2 mL	0.533 mL
Amortiguador gel 3X	2 mL	2 mL
Glicerol 80%	0.8 mL	--
H <sub>2</sub> O	--	2.466 mL
PSA 10%	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L

**NOTA: Pasos cruciales.**

- Antes de cargar las muestras, deben hervirse bien tapados durante 1- 5 min.
- El gel corre a 100V hasta alcanzar el separador y posteriormente se aumenta a 120V.
- El tiempo aproximado de corrida es de 1 ½- 2 h.

Existe una versión actualizada de este método original [3] con detalles técnicos y solución o prevención de posibles errores. Para ver estos detalles se recomienda leer la siguiente de referencia de Schägger [19].

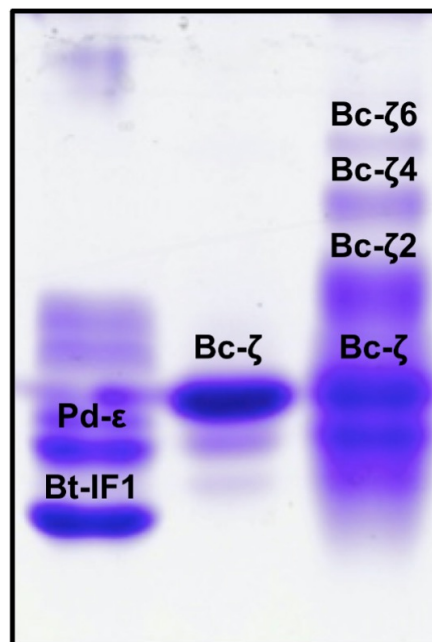
El lector debe considerar que si se requiere separar proteínas desnaturalizadas de pesos moleculares superiores a 20-25 kDa, deberá usar de preferencia los geles tipo Laemmli, mientras que si se quiere separar mejor proteínas menores a 20-25 kDa o péptidos menores a 1-2 kDa, es preferible usar geles tipo Schägger & Von Jagow. Los geles Laemmli usan un solo amortiguador para el gel separador y el concentrador [2], corren mas rápido y se calientan menos, mientras que los geles tipo Schägger & Von Jagow usan dos amortiguadores diferentes para el gel concentrador y separador, respectivamente [3].

En resumen, dependiendo de los requerimientos experimentales y las propiedades de las proteínas de interés es que se puede escoger entre geles de tipo Laemmli o tipo Schägger & Von Jagow. Una técnica muy usada es la de hacer geles de gradiente al aumentar linealmente la concentración de acrilamida de la parte superior a la parte inferior del gel hasta del 4% al 22% de acrilamida, esto resuelve mejor tanto las proteínas <20-25 kDa en la parte inferior del gel, como las >20-25 kDa en la parte superior del gel. Los gradientes se forman como se indica en la referencia [17] en cuarto frío para evitar se polimerice el gel durante el gradiente.

**Geles Nativos tipo Laemmli o Schägger & Von Jagow**

En ocasiones se desea separar proteínas o complejos multiproteicos en su forma nativa y funcional, para eso se han desarrollado técnicas de electroforesis nativa donde se elimina el detergente fuerte SDS, o se substituye por otro detergente suave no iónico y así las proteínas se separan estructuradas en su forma nativa por su relación carga/masa propia además de sus pesos moleculares. Esto se realiza cuando se quiere por ejemplo estimar la actividad

enzimática relativa en geles de algunas enzimas, o cuando se quiere separar un complejo multiproteico de otros para resolverlo posteriormente en sus subunidades interactuantes en otros geles de doble dimensión que se describirán más adelante.



**Figura 8. Gel nativo Laemmli.** De izquierda a derecha: el primer carril se cargó una mezcla de las subunidades inhibidoras IF<sub>1</sub> de *Bos taurus* (BtIF<sub>1</sub>) y  $\epsilon$  de *P. denitrificans* (Pd- $\epsilon$ ). En el segundo carril la subunidad zeta ( $\zeta$ ) de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa de *Brucella canis* (Bc- $\zeta$ ), y en el tercer carril la misma Bc- $\zeta$  pero incubada en condiciones de agregación en dímero, tetrámero, y hexámeros.

Los geles Laemmli nativos, se preparan con el mismo protocolo descrito arriba de los geles desnaturalizantes tipo Laemmli, pero se les remueve por completo el detergente (SDS) tanto de los amortiguadores concentrador, separador y de muestra, como del amortiguador de corrida. En ausencia de SDS, las proteínas migran por su relación propia carga/masa de tal manera que de acuerdo a su punto isoelectrico (pI, ver adelante), si son proteínas negativas al pH de los amortiguadores de gel y de corrida se mantiene la orientación normal de los electrodos de cátodo y ánodo para que las proteínas con carga negativa migren al ánodo [17]. Si las proteínas a separar son positivas al pH de los geles Laemmli, se deben invertir los polos de la cámara de electroforesis para que las proteínas positivas migren al cátodo. La cargas de las proteínas se predicen conociendo el pI teórico de las mismas que se puede predecir en línea con los servidores NCBI-proteínas o algún otros servidor de proteómica en línea. Un ejemplo de un gel nativo tipo Laemmli se muestra en la Figura 8. Aquí en los carriles las

proteínas migran con su relación carga/masa todas con su carga negativa. Se muestra cómo estos geles pueden resolver formas oligoméricas de una misma proteína (Subunidad  $\zeta$  de la ATP sintasa de *Brucella canis*, Bc- $\zeta$ ). Las proteínas con mayor relación carga/masa migran más abajo (por ejemplo las subunidades  $\epsilon$  de *Paracoccus denitrificans* (Pd- $\epsilon$ ) e IF<sub>1</sub> de *Bos taurus* (Bt-IF<sub>1</sub>)).

### Geles nativos tipo Schagger y Von Jagow

Para complejos multiproteicos de membrana como los complejos respiratorios I-V bacterianos o mitocondriales, se estandarizó un protocolo denominado de Geles Nativos Azules (Blue Native-PAGE o BN-PAGE) que se fundamenta en que las proteínas de membrana se solubilizan con un detergente suave no iónico como lo es el lauril maltósido (LM) o la digitonina (Dig) y las proteínas se pretiñen con azul de Coomassie tipo serva en el amortiguador de carga y se mantiene el azul de Coomassie en el amortiguador del gel. Las proteínas se solubilizan en un amortiguador de alta fuerza iónica mantenida con ácido aminocaproico (EACA) lo cual aumenta la solubilidad de las proteínas de membrana, y se corre en presencia del azul de Coomassie durante toda la corrida. Esto mantiene a las proteínas en su forma nativa y al mismo tiempo las recubre de la carga negativa del azul de Coomassie [20]. Existe también una versión sin azul de Coomassie (Clear Native PAGE o CN-PAGE) donde estos complejos multiproteicos se separan por su carga negativa natural en ausencia del azul de Coomassie y en forma nativa solubilizados con los mismos detergentes suaves no cargados.

Estos geles nativos son óptimos para complejos multiproteicos de  $\approx 100$  a  $>1000$  kDa y separan muy bien los complejos respiratorios I-V incluyendo supercomplejos respiratorios que se forman de manera nativa en las mitocondrias o membranas bioenergéticas de bacterias. Se corren a voltaje más bajo (30 V) toda la noche en frío, dado que la corriente y la relación carga/masa es menor pues carecen de SDS, se tardan más en correr y se corren en frío, para evitar que se calienten y las bandas de proteínas se difundan en corridas tan largas. A continuación se muestra un protocolo derivado del artículo original de Schagger y Von Jagow de los geles azules nativos o BN-PAGE [20]. El punto crucial es realizar una buena solubilización con la relación detergente/proteína recomendada de 2-4 mg de detergente/mg de proteína. De nuevo es indispensable conocer de manera precisa la concentración de proteína de las muestras. La solubilización se hace añadiendo lentamente

alícuotas del detergente en frío y agitando suavemente 30-60 minutos [20].

### 3. Geles azules nativos Schagger & Von Jagow (BN-PAGE)

#### Amortiguador del cátodo (1X)

150 mL pH 7

	Concentración final	
Tricina	50 mM	1.36 g
Bis-tris	15 mM	0.48 g
Serva Blue G		0.01% (p/v)

Se guarda a 4°C sin el Serva, el cual se agrega justo previo al iniciar la corrida.

#### Amortiguador del ánodo (1X)

250 mL pH 7

	Concentración final	
Bis-Tris	50 mM	2.66 g

#### Amortiguador para gel (3X)

pH 7

Conc. Final Para 200 mL (1X)

6-aminocaproico (EACA)	1.5 M	39.3 g
Bis-Tris	150 mM	6.27 g

#### Mezcla para el gel azul nativo:

	Empacador (3.5%, 5mL)	Separador (11%, 15 mL)
H <sub>2</sub> O	8 mL	4.5 mL
AB Mix (30%)	0.4 mL	5.5 mL
Amortiguador (3X)	1.666 mL	5.0 mL
TEMED	5 $\mu$ L	15 $\mu$ L
PSA (10%)	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L

**NOTA:** Azul Serva G 0.1%: Se prepara en 0.5 M de EACA pH 7.0, se filtra por membranas de 0.2  $\mu$ m y se guarda a -20°C, se usa a una proporción de 30ng/1 $\mu$ g de proteína.

Además del método original [20], existe una versión actualizada del mismo [21] para más detalles.

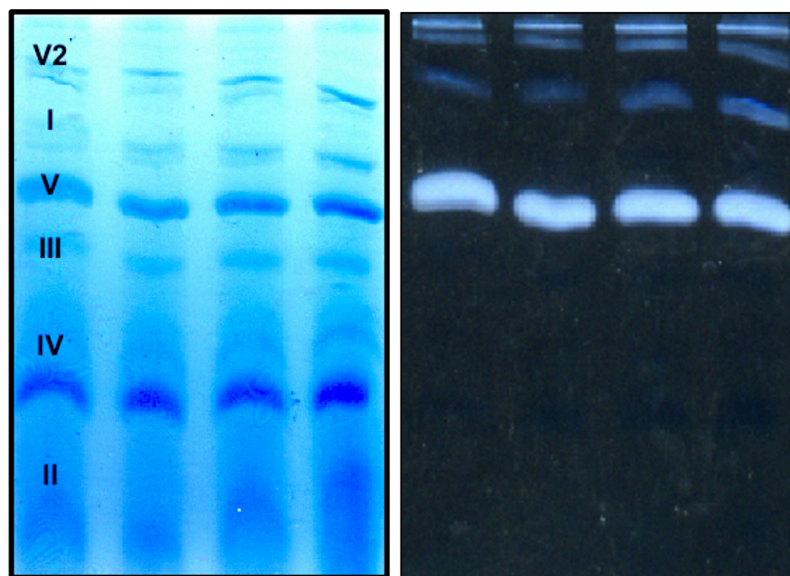
Un ejemplo de estos geles nativos donde se puede resolver de manera semi-cuantitativa la actividad de las enzimas en su forma nativa, se muestra en la Figura 9. Se solubilizaron mitocondrias con digitonina, se ultracentrifugó a 45000 rpm para remover membranas restantes y el sobrenadante se aplicó a los pozos de un gel azul nativo de gradiente

4-16% de acrilamida tipo Schägger & Von Jagow [20]. Se separaron los 5 complejos respiratorios mitocondriales (I-V) de acuerdo a su peso molecular, y se tomó una fotografía del gel al terminar la corrida (izquierda). Posteriormente, se reveló la actividad de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa por precipitación de fosfato de plomo como bandas blancas sobre fondo negro (derecha). La banda superior prominente blanca y azul, es el monómero de la ATP sintasa o complejo (V), el dímero (V2) y demás oligómeros de la ATP sintasa se retienen arriba. Esto muestra claramente que los complejos multiproteicos de alto peso molecular mantienen su estructura y funciones nativas. Estos geles pueden hacerse preparativos para aislar y electroeluir a cada uno de estos complejos para posteriores estudios cinéticos o estructurales.

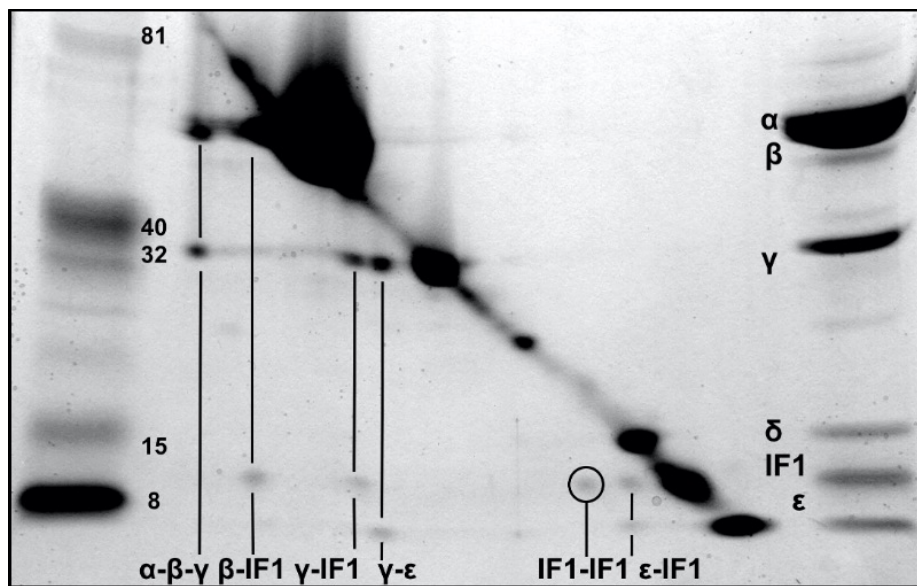
### Electroforesis en doble dimensión desnaturante tipo No-reductora/Reductora

La electroforesis también sirve para resolver interacciones proteína-proteína de tipo puentes disulfuro al realizar geles en doble dimensión 1D No-Reductora/2D Reductora. En la 1D se realiza la electroforesis desnaturante en ausencia de reductores (DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol), ya sea de tipo Laemmli [2] o Schägger -Von Jagow [3]. Esto mantiene a los puentes disulfuro intactos. Después se recorta el carril del gel de la 1D y se coloca horizontalmente sobre un gel de 2D reductor (+DTT

o  $\beta$ -mercaptoetanol), previa preincubación del carril en condiciones igualmente reductoras. En estas condiciones, las proteínas entrecruzadas por puentes disulfuro (S-S) que se mantuvieron unidas covalentemente en la 1D, se separan en la 2D como puntos alineados verticalmente, mientras que las proteínas no unidas por puentes disulfuro se resuelven como una diagonal lineal. Estos geles en general se pueden hacer de gradiente de acrilamida o lineales. Los puentes disulfuro pueden ser naturales o inducidos por agentes entrecruzadores reversibles como el DSP (ditiobis-succinimidil-propionato) entre otros [17]. En la Figura 10 se muestra un gel 1D No-reductor/2D reductor, resolviendo a las subunidades del complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> de la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino. Con este gel se demostró por primera vez la interacción IF<sub>1</sub>- $\gamma$  que inhibe la rotación de la enzima, mostrándose además otras interacciones  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ,  $\beta$ -IF<sub>1</sub>,  $\gamma$ - $\epsilon$ , IF<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>, e IF<sub>1</sub>- $\epsilon$  [22]. La interacción  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> se resolvió con ésta técnica un año previo a la confirmación de esta observación de la interacción  $\gamma$ -IF<sub>1</sub> por resolución atómica por cristalografía de rayos-X [23], de tal modo que la electroforesis en 2D puede ser una herramienta muy poderosa para encontrar nuevas interacciones proteína-proteína. Resultados similares observamos con el inhibidor  $\zeta$  de la F<sub>1</sub>-ATPasa de *Paracoccus denitrificans* lo cual hizo predecir que la  $\zeta$  y la IF<sub>1</sub> se unen en el mismo sitio inhibitorio de sus F<sub>1</sub>s [24,25].



**Figura 9. Geles azules nativos.** Se cargaron 50  $\mu$ g de proteínas mitocondriales por carril solubilizadas con [digitonina] creciente (de izquierda a derecha) de 1-4 mg de Digitonina/ mg de proteína mitocondrial. Posterior a la corrida el gel se digitalizó (izquierda) antes de revelar la actividad de ATPasa (derecha) por precipitación de fosfato de plomo. Los complejos respiratorios I-IV se separan por tamaño o peso molecular. V=ATP sintasa monomérica; V2 es el dímero de la ATP sintasa. Las bandas superiores más delgadas con actividad de ATPasa son oligómeros de la ATP sintasa (terámeros, exámeros etc), que forman las crestas de la membrana interna mitocondrial.



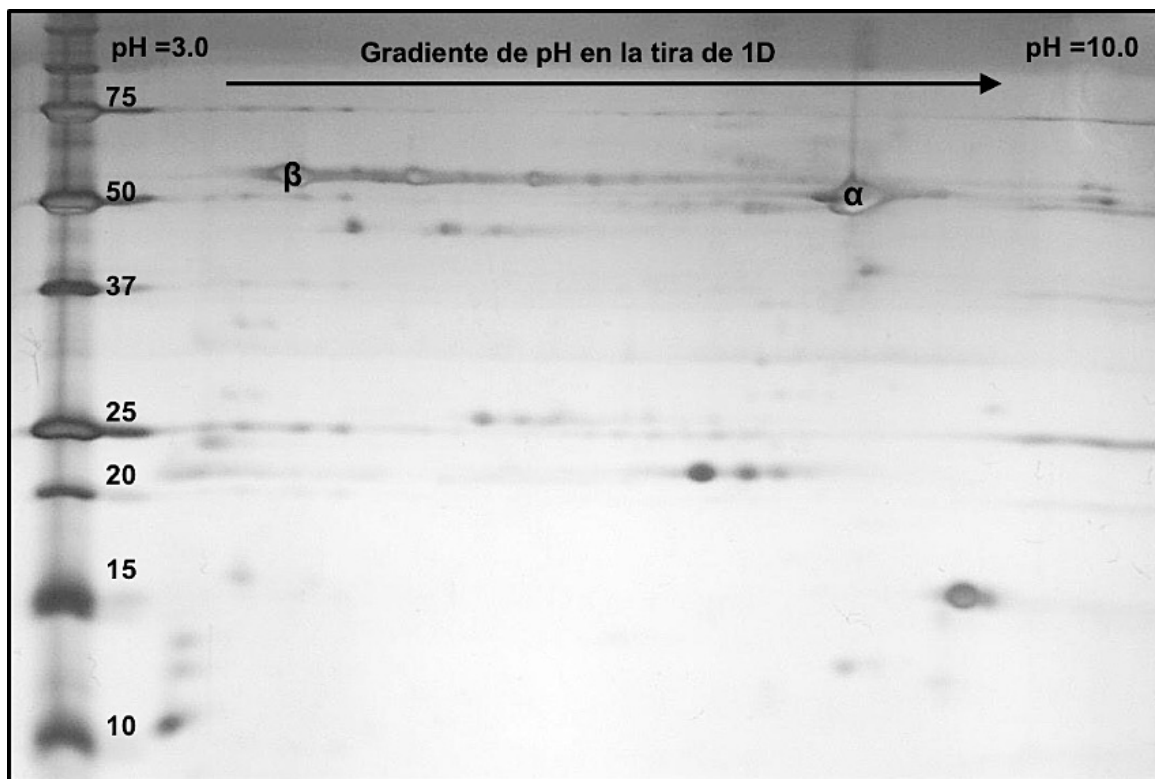
**Figura 10. Gel desnaturalizante 2D No-reductor/Reductor para resolver interacciones proteína- proteína.** El complejo nativo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> (400 μg) se entrecruzó con DSP, para posteriormente cargarlo en electroforesis 1D no-reductora en un carril similar al estándar de la derecha, luego se preincubó con reductor DTT previo a la electroforesis 2D-Reductora en presencia también de DTT. Los dos geles 1D y 2D fueron geles desnaturalizantes tipo Laemmli de gradiente (10-22% de acrilamida/*bis*-acrilamida). Las líneas verticales indican las proteínas separadas en la 2D que se mantenían puenteadas por S-S en la electroforesis 1D, es decir las subunidades que interactúan a una distancia <12 Angstroms (Å). La interacción novedosa en este caso fue el aducto IF<sub>1</sub>-γ, demostrando por primera vez que la IF<sub>1</sub> inhibe el giro del rotor de este importante nanomotor. Estos geles se corren de mayor tamaño en cámaras estándar como la mostrada en la Figura 7 para aumentar la resolución de los mismos. Figura modificada de Minauro-Sanmiguel y cols., 2002 [22].

### Geles en doble dimensión de separación por Isoelectroenfoque/ Desnaturalizante

El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica donde las proteínas migran hasta alcanzar su pI, es decir donde pierden su carga en un gradiente de pH a lo largo de geles preempacados con anfólitos. Estos geles se corren como 1D en IEF y 2D desnaturalizante ya sea tipo Laemmli o Schägger y Von Jagow. El gradiente de pH es en general de 3-10 pero hay geles preparados para IEF con gradientes más pequeños para resolver regiones específicas de intervalos cortos de pH y pIs. Los geles comúnmente se venden prepolimerizados con los anfólitos ya separados a lo largo de geles en tiras para la 1D, y se pueden polimerizar o se compran preempacados para la 2D desnaturalizante. Para realizar la 2D se preincuba la tira de 1D con la parte superior del gel 2D previo a correr la 2D. Ambos geles son desnaturalizantes dado que las muestras se solubilizan con desnaturalizantes no iónicos y en ausencia de SDS pues se evita al máximo la presencia de sal en la 1D para facilitar que las proteínas migren a su pI durante la IEF en la 1D. Una vez que se transfieren las proteínas de la tira al gel en 2D, se corre la 2D en condiciones desnaturalizantes ya sea en geles lineales o de gradiente de acrilamida

para evitar se salgan las proteínas más pequeñas [17]. El gel se tiñe en general con plata o a veces con Coomassie, si hay una cantidad generosa de proteínas que se resuelven como puntos a lo largo de toda la superficie en 2D. La separación a lo largo del eje horizontal es por pH, pI e IEF, y la separación vertical en la 2D es por peso molecular ya sea tipo Laemmli o Schägger y Von Jagow o alguna otra técnica. Un ejemplo se muestra en la Figura 11.

Este tipo de geles en 2D han dado pauta a bases de datos con los proteomas de muchos organismos y microorganismos en línea, donde se identifican las proteínas resueltas como puntos por espectrometría de masas o algún otro tipo de secuenciación. Estos mapas de geles en 2D son la base para determinar los cambios de expresión de las proteínas en diferentes condiciones de crecimiento, de salud o enfermedad, en caso de muestras de pacientes con enfermedades tan severas como el cáncer, la diabetes etc. La proteómica moderna se debe al desarrollo de este tipo de electroforesis en 2D. Para ver una base de datos de proteómica de varios microorganismos se puede seguir el link: <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/index.cgi>. En este link las proteínas ya identificadas se marcan con cruces rojas y se muestra de manera interactiva su identidad.



**Figura 11. Gel en 2D IEF/Desnaturalizante del complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> mitocondrial de *Bos taurus*.** Se cargaron aproximadamente 80 µg del complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub> mitocondrial en una tira de IEF con un gradiente de pH lineal de 3-10. Se corrió la 1D toda la noche y al otro día la tira se preincubó para transferencia de las proteínas con la parte superior del gel de 2D desnaturalizante /tipo Laemmli de gradiente de 4-22% de acrilamida/bis-acrilamida. Se corrió la 2D desnaturalizante y se tiñó con plata. Se resuelven todas las subunidades del complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>, en particular es muy clara la posición de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en las manchas prominentes en la parte superior del gel. La subunidad  $\alpha$  tiene un pI calculado de 9.16 y migra hacia el pH=10 a la derecha, y la subunidad  $\beta$  tiene un pI de 5.26 y migra hacia el pH 3.0 de la izquierda. La  $\beta$  tiene un peso de 55 kDa y la  $\alpha$  de 50 kDa. Sus migraciones corresponden muy bien a sus pIs y al estándar de 50 kDa, que se muestra con los demás estándares en el carril de la izquierda. El gel fue sobre-teñido y por eso se ven los puntos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  blanqueados. Los demás puntos de proteínas no se identificaron hasta ahora pero deben ser  $\gamma$ ,  $\delta$ , IF<sub>1</sub> y  $\epsilon$ . Gel corrido por JJGT.

### Geles en doble dimensión tipo Nativo/Desnaturalizante

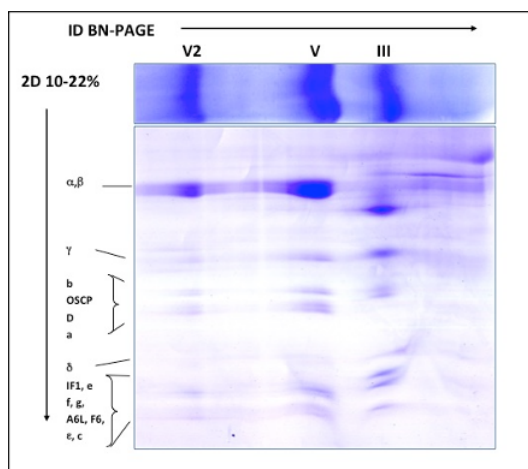
Finalmente, veremos algunos ejemplos de electroforesis en 2D tipo nativo-desnaturalizante. Los ejemplos mejor conocidos de esta técnica son los geles en 1D BN-PAGE-2D desnaturalizante tipo Schägger y Von Jagow. Para realizar estos geles se realiza una 1D BN-PAGE como se explicó anteriormente [20] y se muestra en la Figura 9, y un carril o banda se recorta del gel y se coloca horizontalmente sobre el gel en 2D desnaturalizante que puede ser de tipo Schägger & Von Jagow [3] o Laemmli [2], como en la Figura 12. La 1D separa complejos proteicos de alto peso molecular en su

forma nativa, y la 2D separa las subunidades de cada complejo alineadas verticalmente. Entre ambos geles se polimeriza un gel concentrador para que las proteínas se concentren al electroeluirse del carril de la 1D. Un ejemplo de estos geles 2D obtenido a partir de solubilizados de membranas internas mitocondriales con digitonina se muestra en la Figura 12.

### Conclusiones

La electroforesis de poliacrilamida de proteínas revolucionó la bioquímica y la biología molecular, especialmente desde 1970 cuando aparecieron los primeros métodos consolidados de esta técnica de separación de proteínas.





**Figura 12. Resolución de las subunidades de los complejos III, V y V2 mitocondiales por 2D BN-SDS-PAGE.** Se corrió en el sentido que indica la flecha cargando 50  $\mu$ g de proteína solubilizada de partículas submitocondiales de hígado de rata en un gel nativo de gradiente de 4-11% tipo Schägger & Von Jagow [20]. Posteriormente el carril de la 1D se recortó y se colocó sobre un gel empacador del gel 2D (10-22% tipo Laemmli [2]). Se corrió la 2D por 1-2 h a voltaje de 120 V y se tiñó con azul de Coomassie. Se resolvieron los complejos respiratorios III, ATP sintasa (V) y su dímero (V2) en el gel 1D y sus subunidades en el gel 2D. Se indican las subunidades de la ATP sintasa tanto en su forma monomérica como dimérica.

Antes de realizar cualquier gel de electroforesis de proteínas, es crucial medir con mucha precisión la concentración de proteínas de la muestra en estudio. Esto permitirá poder cargar con mucha precisión la cantidad de proteína adecuada para cada pozo y carril del gel nativo o desnaturizante que necesita correr. La separación de proteínas en geles de proteína no sólo indica el grado de pureza de una proteína o preparación proteica, sino permite resolver interacciones proteína-proteína, la composición de

subunidades de complejos multiproteicos, y hacer análisis semi-cuantitativos de expresión de proteínas por técnicas de geles en 2D conformando la proteómica moderna y la base de la resolución de los proteomas de los seres vivos, su células y organelos.

La combinación de geles nativos y desnaturizantes permite resolver proteínas en su estado nativo y activo para estudios funcionales y estructurales, y estos geles pueden posteriormente aplicarse en electro-transferencias de tipo Western-Blot, para identificar o cuantificar la expresión de proteínas con anticuerpos específicos en un tipo celular, microorganismo o tejido, en condiciones normales o de patogénesis. La proteómica moderna se aplica en diagnóstico y predicción de riesgo de algunas enfermedades y en análisis clínicos convencionales. El poder de la electroforesis de proteínas perdurará por muchos años dado que son las proteínas las que realizan la mayoría de las funciones esenciales para todos los seres vivos.

En resumen, *un gel de proteínas dice más que mil palabras.*

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT de la UNAM número IN-217520, vigente para JJGT. Se agradece al Dr. Roderick A. Capaldi de la Universidad de Oregon (U of O), por el entrenamiento en Electroforesis de Proteínas y Biología Molecular durante el postdoctorado de JJGT en su laboratorio del Institute of Molecular Biology, U of O.

### Referencias

- TAB. (2021) Taller de Actualización Bioquímica TAB 2021. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM., Facultad de Medicina, UNAM. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/>
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379
- Kurien, B. T. a. S., R.H. (2012) *Protein Electrophoresis. Methods and Protocols*, Humana Press. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, New York, USA.
- Tiselius, A. (1937) Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem J* **31**, 1464-1477
- Tiselius, A. (1937) A new apparatus for the electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* **33**, 12
- Smithies, O. (1955) Grouped variations in the occurrence of new protein components in normal human serum. *Nature* **175**, 307-308
- Smithies, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* **61**, 629-641
- Smithies, O., and Walker, N. F. (1955) Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* **176**, 1265-1266
- Hjerten, S. (1967) Free zone electrophoresis. *Chromatogr Rev* **9**, 122-219
- Raymond, S., and Weintraub, L. (1959) Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711
- Davies, B. J. and Ornstein, L. (1959) A new high resolution electrophoresis method. *Delivered at The Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine.*
- Ornstein, L. (1964) Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 321-349
- Shapiro, A. L., Vinuela, E., and Maizel, J. V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by

- electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-820
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275
  16. A.T., A. (1986) *Electrophoresis : theory, techniques, and biochemical and clinical applications*, New York, USA.
  17. Hames, B. D. (1998) *Gel Electrophoresis. A practical approach.*, Oxford University Press, New York
  18. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356
  19. Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**, 16-22
  20. Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231
  21. Wittig, I., Braun, H. P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**, 418-428
  22. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and García, J.J. (2002) Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 433-443
  23. Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* **10**, 744-750
  24. Zarco-Zavala, M., Morales-Rios, E., Mendoza-Hernandez, G., Ramirez-Silva, L., Perez-Hernandez, G., and Garcia-Trejo, J. J. (2014) The zeta subunit of the F1FO-ATP synthase of alpha-proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure. *FASEB J* **28**, 2146-2157
  25. Garcia-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernandez-Luna, E., Ortega, R., and Mendoza-Hernandez, G. (2016) The Inhibitory Mechanism of the zeta Subunit of the F1FO-ATPase Nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and Related alpha-Proteobacteria. *J Biol Chem* **291**, 538-546
-



**DR. JOSÉ J. GARCÍA TREJO**

**ID ORCID: 0000-0003-2597-9457**

Medalla Gabino Barreda, Licenciado, Maestro y Doctor en Investigación Biomédica Básica por la UNAM, como alumno de los Dres. Marietta Tuena Sangri y Armando Gómez-Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Realizó tres estancias en el extranjero, una 1ª posdoctoral y 2ª de investigación con el Dr. Roderick A. Capaldi de la Universidad de Oregon, USA, y una 3ª en el Royal Free Hospital de Londres, UK con el Dr. Jan W. Taanman.

Fue repatriado al Instituto Nacional de Cardiología y actualmente es Profesor-Investigador Titular en la Facultad de Química de la UNAM. Es miembro continuo del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) de candidato a Investigador Nivel I y actualmente Nivel-II.

Su campo de investigación es la estructura, función, disfunción, regulación, y evolución del nano-motor que le da la energía vital del ATP a todas las formas de vida: la ATP sintasa. Sus contribuciones más importantes son: 1) Resolución de la fuente de energía para la rotación del nanomotor en la unión de ADP y ATP; 2) Resolución de mecanismos patogénicos y posibles terapias génicas de las miopatías mitocondriales debidas a mutaciones en el ADN mitocondrial humano; 3) Contribución al análisis proteómico y genómico de cardiomiopatías humanas asociadas a enfermedades cardiovasculares y crónicas como el síndrome metabólico o la diabetes; 4) Estudios de proteómica mitocondrial en la transformación de células normales a neoplásicas; 5) Primera resolución en 2D y 3D de la estructura dimerica de la ATP sintasa que le da forma a las crestas mitocondriales; y 5) descubrimiento de la subunidad

ζ y resolución de su mecanismo unidireccional de uñeta-trinquete como nuevo inhibidor natural de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa en *Paracoccus denitrificans* y demás α-proteobacterias; 6) Propuesta de un antiviral (Lamivudina o 3TC) con posible doble reúso contra varios tipos de cáncer y contra el coronavirus SARS-CoV-2 de la pandemia de COVID-19.

Ha colaborado con el Dr. Stephan Wilkens y con dos Premios Nobel de Química, el Dr. Kurt Wüthrich y el Dr. John E. Walker, y más recientemente con el Dr. Hiroyuki Noji de la Universidad de Tokio, quien demostró por primera vez de manera directa la rotación del nanomotor ATP sintasa por nanotecnología.

Recibió la Medalla Dr. José Laguna de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, de la cual es miembro, y el 3er lugar del premio PROFOP otorgado por el IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial) y la UNAM, por su primera patente con aplicaciones en biorremediación (desnitrificación) de aguas potables y residuales.

Ha publicado 46 artículos internacionales, la mayoría como primer autor o autor correspondiente con >1000 citas en las mejores revistas incluyendo: *Cell Reports*; *P.N.A.S. USA*; *American Journal of Human Genetics (AJHM)*, *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, *Biochemistry (USA)*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes (JOB)*, *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, *Frontiers* etc, siendo revisor de las últimas 5 y de *Nature Communications (USA)*; *FEMS Microbiology*, etc.

Es conferencista invitado a la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil; Universidad de la Plata, Argentina; Universidad de Miami, Florida, USA; Instituto de Biología Molecular e Celular (IBMC), Porto, Portugal; a la Universidad de Tokio, Japón; AnalytiX Conferences, en Fukuoka, Japón y Miami, USA; y las European Bioenergetics Conferences (EBEC, Italia y Hungría).

Autor de un libro internacional, 7 artículos nacionales, 2 artículos de divulgación, tutor principal de 5 tesis doctorales, 2 de maestría y 3 de licenciatura. Realiza una intensa labor docente impartiendo Fisiología Microbiana (licenciatura, QFB) y Bioquímica (Posgrado en Ciencias Bioquímicas); actualmente Bioenergética y Métodos de Análisis de Proteínas; y previamente Termodinámica de Proteínas y Cinética Enzimática.